



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

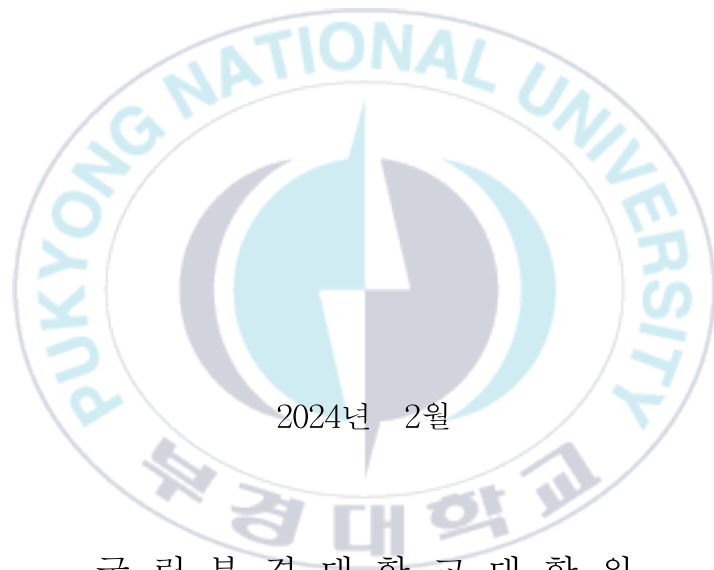
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

강도다리, *Platichthys stellatus*의 혈액,  
항산화효소 및 면역 반응에 미치는  
카드뮴과 미세플라스틱의  
복합 영향



2024년 2월

국립부경대학교대학원

수산생명의학과

권나영

이 학 석 사 학 위 논 문

강도다리, *Platichthys stellatus*의 혈액,  
항산화효소 및 면역 반응에 미치는  
카드뮴과 미세플라스틱의  
복합 영향

지도교수 강 주 찬

이 논문을 석사학위논문으로 제출함.

2024년 2월

국립부경대학교대학원

수산생명의학과

권 나 영

권나영의 이학석사 학위논문을 인준함.

2024 년 02 월 16 일



위 원 장 이학박사 김 기 홍 (인)

위 원 이학박사 김 광 일 (인)

위 원 이학박사 강 주 찬 (인)

## 목차

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| 표 목차 .....            | iii |
| 그림 목차 .....           | iv  |
| Abstract .....        | 11  |
| I. 서론 .....           | 1   |
| II. 재료 및 방법 .....     | 5   |
| 1. 미세플라스틱과 카드뮴 .....  | 5   |
| 2. 실험 방법 .....        | 6   |
| 3. 조직 내 MP 축적 .....   | 8   |
| 4. 조직 내 Cd 축적 .....   | 9   |
| 5. 성장률 .....          | 11  |
| 6. 혈액 분석 .....        | 12  |
| 7. 항산화 분석 .....       | 13  |
| 8. 면역 반응 .....        | 14  |
| 9. 통계 분석 .....        | 15  |
| III. 결과 .....         | 16  |
| 1. 미세플라스틱 특성 분석 ..... | 16  |
| 2. 조직 내 MP 축적 .....   | 19  |
| 3. 조직 내 Cd 축적 .....   | 22  |
| 4. 성장률 .....          | 24  |
| 5. 혈액 분석 .....        | 28  |
| 6. 항산화 분석 .....       | 38  |

|                |    |
|----------------|----|
| 7. 번역 반응 ..... | 41 |
| IV. 고찰 .....   | 44 |
| V. 결론 .....    | 55 |
| VI. 참고문헌 ..... | 56 |



## 표 목차

Table 1. The chemical components of seawater and experimental condition used in the experiments. .... 9

Table 2. Detection limits and concentrations of cadmium found in certified reference materials. .... 13



## 그림 목차

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) images of MPs particles which were used in this study. ....                                                                                                                                                                                                                                   | 22 |
| Fig. 2. The result of particle size distribution analysis. ....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 23 |
| Fig. 3. The images of MPs stained with Nile Red. a) Virgin MPs b) MPs observed in gills dissolved in 10% KOH c) MPs observed in intestine dissolved in 10% KOH d) MPs observed in liver dissolved in 10% KOH                                                                                                                             | 25 |
| Fig. 4. MPs accumulation in gills, intestine and liver of starry flounder, <i>Platichthys stellatus</i> exposed to MPs for 10 and 20 days. Values with different superscript are significantly different in 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Turkey's multiple range test. ....                                            | 26 |
| Fig. 5. Cd accumulation in gills, intestine and liver of starry flounder, <i>Platichthys stellatus</i> exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values with different superscript are significantly different in 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Turkey's multiple range test. ....                                      | 28 |
| Fig. 6. BWG of starry flounder, <i>Platichthys stellatus</i> exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean $\pm$ S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test. .... | 30 |
| Fig. 7. SGR of starry flounder, <i>Platichthys stellatus</i> exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean $\pm$ S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.      |    |

..... 31

Fig. 8. HSI of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 32

Fig. 9. RBC count of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test. .... 35

Fig. 10. Hb of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 36

Fig. 11. GOT of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 37

Fig. 12. GPT of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 38

Fig. 13. ALP of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 39

Fig. 14. Glucose of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 40

Fig. 15. TP of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 41

Fig. 16. Calcium of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 42

Fig. 17. Magnesium of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 43

Fig. 18. SOD activity in gills, intestine and liver of starry flounder,

*Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 45

Fig. 19. CAT activity in gills, intestine and liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 46

Fig. 20. LZM activity in gills, intestine and liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 48

Fig. 21. IgM level in gills, intestine and liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

..... 49

The combined effects of cadmium and microplastic on blood physiology, antioxidant and immune response in the starry flounder, *Platichthys stellatus*

Na Yeong Kwon

Department of Aquatic life medicine, The Graduate School,  
Pukyong National University

### Abstract

Microplastics (MPs; > 5mm) which widely spread in aquatic environment have a large surface area, making it advantageous for adsorbing various environmental pollutants including heavy metals. Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal used in a variety of industries and released into the aquatic environment. In this study, accumulation, blood physiology, antioxidant and immune response of *Platichthys stellatus* (length  $14.884 \pm 0.88\text{cm}$ , weight  $49.288 \pm 8.44\text{g}$ ) exposed to MPs and Cd for 10 and 20 days were analyzed. The experimental concentrations were set at control, MPs  $500\mu\text{g/L}$  (MPs-L), MPs  $1000\mu\text{g/L}$  (MPs-H), Cd  $50\mu\text{g/L}$ , Cd-MPs combined exposure groups (Cd  $50\mu\text{g/L}$  plus MPs-L and Cd  $50\mu\text{g/L}$  plus MPs-H). The MPs accumulation in gills, intestine and liver of *P. stellatus* were significantly increased in the MPs-H and Cd  $50\mu\text{g/L}$  plus MPs-H groups. The MPs accumulation profile was in the order of intestine > gills > liver. The Cd accumulation in gills, intestine and liver of *P. stellatus* were significantly increased in the Cd-MPs combined exposure groups. The Cd accumulation profile was in the order of liver > gills > intestine. Growth rate were measured in Body weight gain (BWG), Specific growth rate (SGR) and Hepatosomatic index (HSI). BWG and SGR were significantly decreased in the Cd-MPs combined exposure groups

and HSI was significantly increased in the Cd 50 $\mu$ g/L plus MPs-H groups. In the blood physiology, red blood cell (RBC) count and hemoglobin (Hb) were significantly decreased in the Cd-MPs combined exposure groups. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Alkaline phosphatase (ALP), Glucose and magnesium were significantly increased in the Cd-MPs combined exposure groups. While, total protein (TP) and calcium were significantly decreased in the Cd-MPs combined exposure groups. In the antioxidant response, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in gills, intestine and liver of *P. stellatus* were significantly increased in the Cd-MPs combined exposure groups. In the immune response, lysozyme (LZM) and immunoglobulin M (IgM) in gills, intestine and liver of *P. stellatus* were significantly decreased in the Cd 50 $\mu$ g/L plus MPs-H groups. Our results suggest that the toxicity of Cd-MPs combined exposure is higher than single exposure, and that combined exposure may cause physiological changes and immune decline.

## I. 서론

1975년부터 2016년까지 전 세계 플라스틱 생산량은 연간 3억 3,500만 톤 이상으로 크게 증가하였다(Banaee et al., 2019). 산업 발전은 플라스틱 제품의 소비 증가를 촉진했으며 상당한 양의 플라스틱 폐기물이 수중 환경으로 배출되었다(He et al., 2018). 이러한 환경에 노출된 플라스틱은 물리적, 화학적 및 생물학적 과정을 통해 생분해되기 어려운 5mm 이하의 작은 입자인 미세플라스틱 (Microplastic, MP)으로 조각나며 MP는 최근 새로운 환경 오염 물질로 주목받고 있다(Barboza et al., 2018; Lee et al., 2023; Lu et al., 2018). 일반적으로 1차 MP는 화장품, 치약 및 페인트에 포함된 합성 폴리머 입자에서 나온 인위적으로 작게 만든 플라스틱인 1차 MP와 환경에 버려진 큰 플라스틱 파편이 자외선, 열 및 파도로 인해 파편화된 2차 MP로 분류된다 (Anderson et al., 2016; Cole et al., 2011). MP는 담수, 해양 및 퇴적물을 포함한 다양한 환경 조건에서 발견되고 있으며, 해양 환경에 축적된 MP 농도는 지속적으로 증가하고 있는 추세이다(Wen et al., 2018). 특히 산업활동이 활발하게 이루어지고 있는 일부 지역의 강, 하천 및 연안에서는 최대 4,500mg/L까지의 MP 농도가 검출되었다고 보고되기도 하였다(Green et al., 2017). 게다가, 수생생물이 MP에 노출되면 장 손상, 산화 스트레스, 내분비 교란 및 면역 약화 같은 여러 가지 독성영향이 나타날 수 있으며 성장률과 생존률이 감소할 수 있다(Choi et al., 2018; Lei et al., 2018). 추가적으로, MP는 넓은 표면적을 가지기 때문에 수중 환경에 존재하는 잔류성 유기 오염 물질 및 중금속과 같은 독성 화학물질과 흡착하기 유리하다(Teuten et al., 2009). 그러므로 오염물질이 흡착된 MP는 그 자체의 독성뿐만 아니라 수생생물 생체 내 다양한 오염물질의 축적 및 독성을 유도하는 수송체 역할을 할 수 있다(Lee et al., 2023).

카드뮴(Cadmium, Cd)은 비닐 플라스틱 제조, 금속 및 플라스틱 파이프 생산과 같은 다양한 산업 및 제조업에 널리 사용되는 매우 독성이 강한 중금속이자 가장 일반적인 환경 오염 물질 중 하나이다(Yu et al., 2019). 산업활동을 통해 발생하는 산업폐수의 배출로 인해 폐수 내의 Cd가 수생환경으로 유입됨으로써 수생환경 내 Cd의 농도가 증가하고 있다(Banaee et al., 2019). 일반적으로 Cd는 수생환경에서 호산성 및 친유성인 이온의 형태로 존재하여 높은 이동성을 가진다(Elleuch et al., 2021). 그리고 Cd 이온은 다양한 유기 입자와 복합체를 형성하여 수생환경을 광범위하게 위협할 수 있으며, 미량의 농도로도 독성 영향을 유발할 수 있다(Kumar and Singh, 2010). 수생생물의 생체 내로 유입된 Cd 이온은 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 생성에 기여하며(Angeli et al., 2013), 세포 내 분자들과 상호작용하여 항산화 붕괴, DNA 돌연변이 및 단백질 구조 변형을 일으킨다(Macías-Mayorga et al., 2015). 축적된 Cd 이온은 생물의 에너지 소모를 유도하여 다양한 생화학적 변화를 발생시킴으로써 성장 억제, 혈액학적 및 생화학적 장애, 산화스트레스 그리고 면역 억제를 유발할 수 있다(McRae et al., 2018; Zhang et al., 2017). Cd 이온은 어류 세포막의 칼슘 이온 위치와 경쟁하여 칼슘 항상성에 영향을 미침으로써 칼슘 흡수장애, 고혈당증 및 마그네슘 흡수장애와 같은 이온 교란을 초래할 수 있다(Lee et al., 2022). 게다가, Cd 이온은 대부분의 금속효소의 금속 결합 부위에 높은 친화성을 가지기 때문에 대사 및 신호 전달 기능을 차단하여 세포독성을 유발한다(McRae et al., 2018).

크기가 작은 MP는 어류의 섭식 활동을 통해 장으로 이동하거나, 아가미와 피부를 통해 흡수되어 최종적으로 순환계에 도달하고 혈액 항산화 장애를 일으킬 수 있다(Wang et al., 2020). 또한 어류 혈액은 중금속 노출로 인한 변화에 민감하며, 신장, 비장 및 간에 축적된 Cd는 조혈 조직 활동을 억제하여 빈혈을 유발한다(Lee et al., 2022). 이러한 환경 독성물질은 순환계에 유입되어 호르몬 장애, 대사 장애, 용혈성 빈혈, 염증 반응을 일으킨

다(Choi et al., 2023a). 어류 내에서 혈액학적 특성과 혈장 성분은 건강 상태에 대한 생리학적 지표로 간주되며 중금속과 MP의 독성 영향을 모니터링하는 중요한 지표로 평가된다(Kim et al., 2021).

ROS는 정상적인 세포 활동에 의한 부산물로 생성되며 세포 사이 또는 세포 내 신호 전달을 포함한 세포 활동 유지 및 생존에 중요한 역할을 한다(Snezhikina et al., 2019). 어류는 체내 적절한 ROS 수준을 유지하기 위해 항산화 효소, 비효소 항산화제, 미네랄 및 비타민을 포함한 복잡한 항산화 방어 시스템을 발달시켰으며, ROS의 생성이 항산화 방어 능력을 초과하였을 때 산화스트레스가 발생한다(Deng et al., 2017). MP와 Cd 노출은 어류 체내에서 산화스트레스를 유발하여 세포 항상성 장애, 세포 기능 손상, 세포사멸, 염증, 대사 장애, 단백질 변이 그리고 지질 과산화와 같은 다양한 독성 영향을 미칠 수 있다(Lee et al., 2022; Madeira et al., 2013; Shengchen et al., 2021). 따라서 항산화 효소의 활성화와 억제제는 MP와 Cd의 독성을 평가하는 중요한 바이오마커로서 역할을 할 수 있다(Brandts et al., 2018).

면역은 외부 요인에 대한 유기체의 기본적인 방어 메커니즘으로, MP와 Cd 같은 환경오염물질은 어류의 면역에 영향을 미친다(Choudhury et al., 2021). MP 노출은 어류의 장을 손상시켜 영양분 섭취 장애를 유발함으로써 면역 체계의 활성을 위한 에너지 공급을 방해하게 되어 호중구 세포성분 방출, 대식세포의 식균 작용 저하 및 LZM 활성 감소 등의 면역 저하를 일으킬 수 있다(Hirt and Body-Malapel, 2020). 또한, Cd 노출은 어류 림프계의 기능 장애, 면역 억제, 백혈구 수 감소, 림프구 증식, 호중구의 식세포작용 저하 및 대식세포의 활성 억제와 같은 독성효과를 유발한다(Jiaxin et al., 2020). 환경오염물질 노출에 의한 어류 비특이적 면역의 변화는 면역 반응의 생체 지표 역할을 할 수 있으며, 더 나아가 MP와 Cd 노출로 인해 발생하는 독성 영향을 평가하는데 유용할 것이다(Wen et al.,

2018).

어류는 환경에 따른 생리적, 생화학적 변화가 일어나기 때문에 수생환경에 대한 효과적인 생물학적 지표 역할을 한다(Farombi et al., 2007). 강도다리(Starry flounder, *Platichthys stellatus*)는 질병에 강한 광염성 어류이며 한국, 일본, 알래스카, 북미 등의 해양 환경에 서식하는 냉수성 어종이다(Choi et al., 2023b). 주로 연안 수심 약 150m에 서식하며 겨울철 낮은 수온에서도 생존율이 높아, 국내에서 선호하는 상업적 양식용 어류이다(Lim et al., 2013). 최근 플라스틱 사용량이 급증함에 따라 MP에 흡착된 환경오염물질의 조합은 수생태계에서 자주 발견된다(De Frond et al., 2019). Cd와 MP 단독 노출에 대한 독성 영향은 연구되어 있으나 복합 노출에 대한 어류의 생리적 반응은 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 두 가지의 독성 화합물이 어류에 미치는 독성 영향을 조사하여 독성 영향 기준을 마련하는 것이 본 연구의 주요 목표 중 하나이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 미세플라스틱과 카드뮴

직경 34-50 $\mu\text{m}$ 의 고분자 Polyethylene(PE) 분말(CAS number: 9002-88-4, Sigma Aldrich)이 본 연구에 사용되었다. 실험에 사용된 MP의 정확한 입자 모양, 크기 그리고 입자 분포도를 파악하기 위해 1mg의 MP를 주사 전자 현미경(Scanning electron microscopy, SEM)과 Laser Diffraction Particle Size Analyzer로 분석했다.

Cd는 순도 99.9%의 Cadmium chloride( $\text{CdCl}_2$ ; analytical grade; 99.9% purity, CAS number: 10108-64-2, Sigma Aldrich)를 사용하였다.  $\text{CdCl}_2$  5g을 증류수 1L에 용해시켜서 5g/L 농도의  $\text{CdCl}_2$  stock solution을 제작하였다.

## 2. 실험 방법

본 실험에서 사용한 실험어 *P. stellatus*는 체중  $49.288 \pm 8.44\text{g}$ , 체장  $14.884 \pm 0.88\text{cm}$ 의 개체를 기장 동백리 양식장에서 구입하였다. 2주 동안 500L 원형 수조에서 순치하였으며, 순치 시 수온  $19.65 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하며 2일에 한 번씩 환수하였다. 먹이는 시중에서 판매되는 강도다리용 사료를 구입하여 급이하였다. 순치 과정 중에 12시간의 명암 광주기를 정확하게 유지하였다. 순치 후 외관상 질병이 없는 개체를 선별하여 실험에 사용하였다. 24마리씩 100L 원형 수조 6개에 나누어 담아 하루 2회 어체중의 2%를 급이 하였다. 각 수조에는 20일 동안 Cd와 MP를 복합 노출시켰으며, 그 농도는 Control, MPs  $500\mu\text{g/L}$ (MPs-L), MPs  $1000\mu\text{g/L}$ (MPs-H), Cd  $50\mu\text{g/L}$ , Cd  $50\mu\text{g/L}$  + MPs-L 및 Cd  $50\mu\text{g/L}$  + MPs-H이다. 미리 카드뮴과 미세플라스틱을 24시간 동안 반응시킨 물에 어류를 옮기는 방식으로 2일에 한 번 환수하였다. 실험에 사용한 사육수의 화학적 구성 성분은 Table 1과 같다. *P. stellatus*는 국립 부경대학교 동물실험관리위원회에서 동물실험승인을 받아 실험을 진행하였다(PKNUIACUC-2022-55). 실험 기간은 총 20일로, 10일 차와 20일 차에 샘플링하였다. 각 실험군에서 12마리의 어류를 선별하여 MS-222(3-aminobenzoic acid ethyl ester ethanesulfonate, Sigma-Aldrich)로 마취시켰다. 채혈 전 모든 실험어의 체중과 체장을 측정하였고, Heparin으로 처리된 주사기를 이용하여 미부정맥에서 1 mL의 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액 시료를  $4^\circ\text{C}$ 에서 10분간  $3,000\text{g}$ 로 원심분리함으로써 혈장을 추출하여 혈장 성분 분석 전까지  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관했다. 12마리의 실험어로부터 아가미, 장 그리고 간 조직 샘플을 분리하여  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관했다. 해부된 12마리 중 6마리의 조직 샘플은 항산화 분석에 이용하였고, 나머지 6마리는 MP 축적 분석에 이용하였다.

Table 1. The chemical components of seawater and experimental condition used in the experiments.

| Item                          | Value       |
|-------------------------------|-------------|
| Temperature (°C)              | 19.65 ± 0.5 |
| pH                            | 8.06 ± 0.5  |
| Salinity (‰)                  | 31.63 ± 0.8 |
| Dissolved Oxygen (mg/L)       | 7.28 ± 0.6  |
| Chemical Oxygen Demand (mg/L) | 1.27 ± 0.07 |
| Ammonia (μg/L)                | 14.1 ± 0.9  |
| Nitrite (μg/L)                | 1.3 ± 0.05  |
| Nitrate (μg/L)                | 10.39 ± 1.0 |

### 3. 조직 내 MP 추적

각 실험군에서 6마리 실험어의 아가미, 장 그리고 간 조직 시료를 추출하여 무작위로 선택하고 추적 분석에 사용하였다. MP 추적 분석을 위해 Nile red 염색법을 이용하였고 분석 방법은 Shim et al. (2016)에 따랐다. 아가미, 장 그리고 간 조직 시료를 10% KOH 용액 200 mL가 담긴 비커에 옮기고 유리 교반용 자석을 넣은 후 교반기를 이용하여 40℃에서 48시간 동안 교반하였다. 조직 용해액을 100 $\mu$ m와 20 $\mu$ m 체( $\varnothing$  75mm, Chunggye, Inc., Korea)로 체질하고 채집된 입자를 염화아연( $\text{ZnCl}_2$ , density 1.7 g/cm<sup>3</sup>)이 들어 있는 유리 깔때기로 옮겨 밀도 분리한 후 24시간 방치하여 하층에 가라앉은 고형물을 제거하였다. 상등액을 1 $\mu$ m 크기의 Polycarbonate Track Etched(PCTE) Membrane filter(GVS, 47mm)에 진공 펌프로 감압 여과한 후 24시간 동안 건조하였다. 염색을 위해 Nile red 분말(CAS number: 7385-67-3, Sigma Aldrich)을 acetone (HPLC grade, Fisher ChemicalTM)에 용해시켜 50mg/L의 Nile red stock solution을 제작하였다. 그리고 Nile red stock solution과 n-hexane을 혼합하여 5mg/L의 Nile red working solution을 제작하였다. 조직이 용해된 10% KOH를 여과한 후 건조된 Membrane filter에 200 $\mu$ L의 Nile red working solution을 분주하여 30분 동안 암실에서 반응시켰다. 그 후, n-hexane 100 $\mu$ L를 분주하여 염색용액을 희석 후 형광현미경으로 관찰하였다.

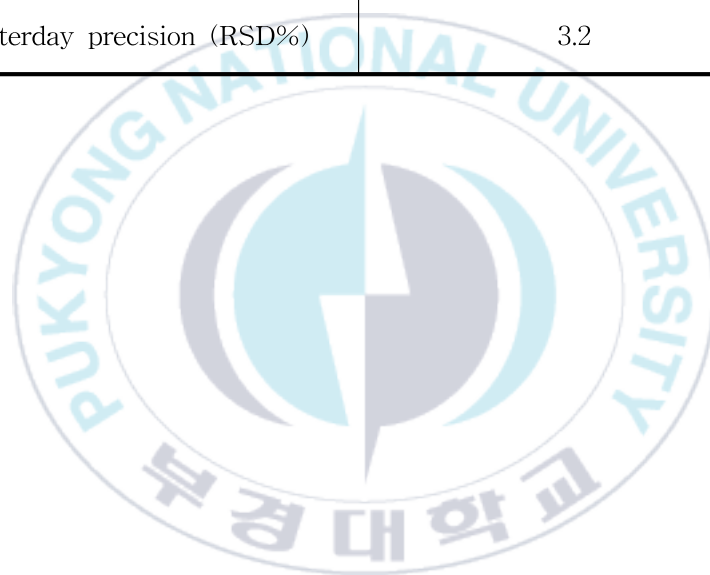
#### 4. 조직 내 Cd 측정

실험어 체내 Cd 측정량은 해양수산부 해양환경공정시험기준을 참고하여 실험을 진행하였다.  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관된 아가미, 장 그리고 간 조직 시료를 상온에서 해동하여 48시간 동안 동결건조하였다. 건조된 시료를 아게이트 모르타르에서 갈아 0.1g을 취하여 테프론 용기에 담았다. 산 처리를 위해 시료가 담긴 테프론 용기에 65% 진한 질산( $\text{HNO}_3$ ) 1mL를 분주하고 2시간 동안 실온에서 반응시킨 후 70% 진한 과염소산( $\text{HClO}_4$ ) 1mL를 분주하여 뚜껑을 닫아 밀봉하였다. 밀봉된 테프론 용기를 가열판 위에 놓고 온도를  $150^{\circ}\text{C}$ 까지 서서히 증가시켜 24시간 동안 반응 후, 서서히 방냉하였다. 시료가 상온에 도달하면 뚜껑을 열어 시료와 산이 완전히 건조될 때까지 재가열하여 시료를 분해하였다. 완전히 분해된 시료에 2% 희석질산 용액 10mL를 분주하고 뚜껑을 닫아 밀봉한 후 온도를  $80^{\circ}\text{C}$ 까지 서서히 증가시켜 2시간 동안 반응하였다. 용해가 완료된 시료를 Syringe Filter(Hyundai micro. Co., Ltd)를 이용하여 필터링하였다. 전처리가 완료된 시료 용액을 이용하여 ELAN 6600DRC ICP-MS(Perkin-Elmer)로 매뉴얼에 따라 Cd 측정량을 분석하였다. 조직 내 Cd 측정량 단위는  $\mu\text{g/g}$ 로 표시하였다.

ICP-MS 표준용액으로 ICP-multi-element standard solution VI (Merck)를 사용하여 검량선을 작성하였다. Cd 측정을 위해 Certified Reference Materials(CRM)을 분석하여 분석 방법의 정확성과 정밀도를 추정하였다. CRM으로 DOLT-3 (dogfish liver, The National Research Council of Canada, Canada)를 이용하였다(Table 2).

Table 2. Detection limits and concentrations of cadmium found in certified reference materials.

| Item                                   | Value      |
|----------------------------------------|------------|
| Certified value (mg kg <sup>-1</sup> ) | 19.4 ± 0.6 |
| Measured value (mg kg <sup>-1</sup> )  | 18.8 ± 0.9 |
| Recovery (%)                           | 97         |
| Interday precision (RSD%)              | 3.2        |



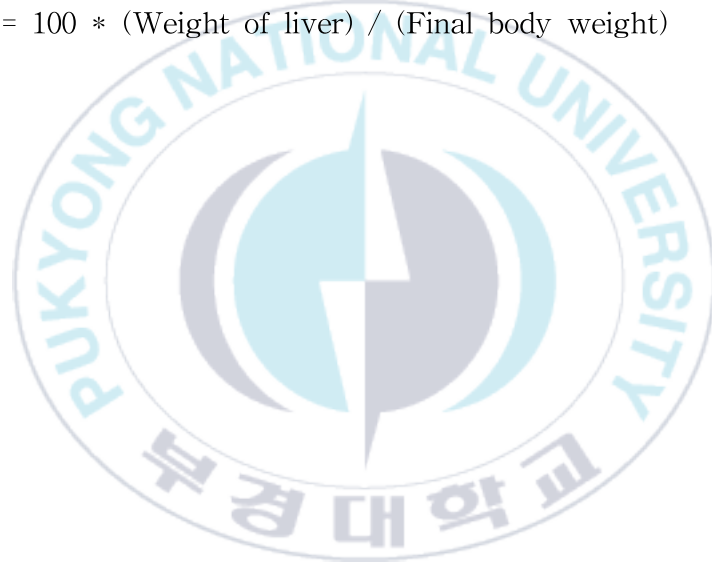
## 5. 성장률

노출 실험 전 *P. stellatus*의 체장과 체중을 측정하였으며, 10일 차와 20일 차에 각각 체장, 체중 및 간중량을 측정하였다. BWG, SGR, HSI를 측정하였으며 계산 방법은 다음과 같다.

$$\text{BWG}(\%) = 100 * (\text{Final weight} - \text{Initial weight}) / (\text{Initial weight})$$

$$\text{SGR}(\%) = 100 * (\ln(\text{Final weight}) - \ln(\text{Initial weight})) / (\text{Duration})$$

$$\text{HSI}(\%) = 100 * (\text{Weight of liver}) / (\text{Final body weight})$$



## 6. 혈액 분석

Heparin으로 처리된 주사기를 이용하여 미부정맥에서 1 mL의 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액으로 RBC count, Hb 농도를 즉시 측정하였다. RBC count는 Hayem's solution으로 400배 희석한 후, hemocytometer(Improved Neubauer, Germany)를 사용하여 광학현미경으로 관찰 및 계수하였다. Hb 농도는 Clinical kit(Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하여 Cyan-methemoglobin 방법으로 측정하였으며 단위는 g/dL로 표시하였다.

혈장 내 유기성분과 무기성분의 변화를 관찰하기 위하여 4℃에서 10분간 3000g로 원심분리하여 혈장을 분리하였다. GOT와 GPT는 Clinical kit(Asan Pharm. Co., Ltd)의 매뉴얼에 따라 Reitman-Frankel 방법으로 분석하였고 단위는 Karmen/mL로 표시하였다. ALP는 Clinical kit(Asan Pharm. Co., Ltd)의 매뉴얼에 따라 분석하였고 단위는 K-A로 표시하였다. Glucose는 Clinical kit(Asan Pharm. Co., Ltd)의 매뉴얼에 따라 GOD/POD 방법으로 분석하였고 단위는 mg/dL로 표시하였다. TP는 Clinical kit(Asan Pharm. Co., Ltd)의 매뉴얼에 따라 Biuret 방법으로 분석하였고 단위는 g/dL로 표시하였다. Calcium은 Clinical kit(Asan Pharm. Co., Ltd)의 매뉴얼에 따라 O-Cresolphthalein-Complexon(OCPC) 방법으로 분석하였고 단위는 mg/dL로 표시하였다. Magnesium은 Clinical kit(Asan Pharm. Co., Ltd)의 매뉴얼에 따라 Xylidyl blue 방법으로 분석하였고 단위는 mg/dL로 표시하였다.

## 7. 항산화 분석

아가미, 장 그리고 간 조직을 채취한 후 인산 완충 식염수(PBS, 0.1M, pH 7.4)를 이용하여 세척하였다. 세척한 조직 샘플의 무게와 PBS의 비율을 1:10이 되도록 분주한 후 Teflon-glass homogenizer(099CK4424, Glass-Col, Germany)를 사용하여 균질화하였다. 균질액은 4℃에서 30분간 10,000g로 원심분리하였으며, 상등액을 추출하여 분석 전까지 -80℃에서 보관하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad Protein Assay Kit(Bio-Rad Laboratories, Inc., Korea)를 이용하여 Bradford (1976) 염료결합법으로 분석하였으며, 소의  $\gamma$ -글로불린을 표준용액으로 사용하였다.

SOD 활성은 SOD Assay kit(Dojindo Molecular Technologies, Inc.)의 매뉴얼에 따라 WST-1의 환원반응에 대한 50% inhibitor rate로 측정하는 SOD 활성을 측정하였다. SOD의 1단위는 시료용액 20 $\mu$ L에 포함된 WST-1과 과산화물 음이온의 환원반응을 50% 억제하는 SOD 효소의 양으로 정의된다. SOD 활성은 분광광도계를 사용하여 450nm에서 측정되었으며 unit/mg protein으로 표시하였다.

CAT 활성은 OxiSelect™ Catalase Assay Kit(Cell Biolabs, Inc.)를 사용하여 측정하였다. 과산화수소와 대응되는 quinonimine dye coupling 생성물은 반응 혼합물에 남아 있는 과산화수소의 양과 관련이 있다. CAT 활성은 분광광도계 520nm에서 측정되었으며, 단위는 unit/mg protein으로 표시하였다.

## 8. 면역 반응

아가미, 장 그리고 간 조직을 채취한 후 PBS(0.1M, pH 7.4)를 이용하여 세척하였다. 세척한 조직 샘플의 무게와 PBS의 비율을 1:10이 되도록 분주한 후 Teflon-glass homogenizer(099CK4424, Glass-Col, Germany)를 사용하여 균질화하였다. 균질액은 4℃에서 20분간 1,000g로 원심분리하였으며, 상등액을 추출하여 분석 전까지 -80℃에서 보관하였다. LZM 활성은 Fish LZM ELISA Kit(Catalog number: MBS099538; MyBioSource; San Diego; USA)의 매뉴얼에 따라 분석하였고 단위는 U/mg protein으로 표시하였다. IgM 수준은 Fish IgM ELISA Kit(Catalog number: MBS042385; MyBioSource; San Diego; USA)의 매뉴얼에 따라 분석하였고 단위는  $\mu$ g/mg protein으로 표시하였다.



## 9. 통계 분석

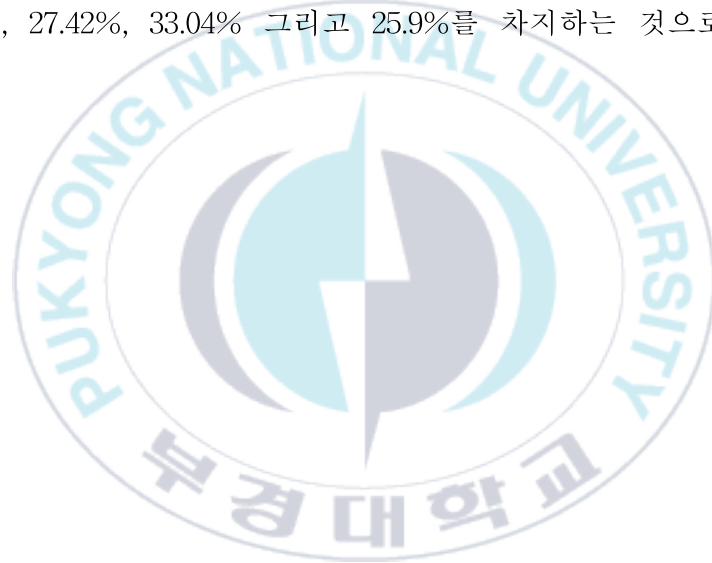
본 연구의 통계분석은 각 농도(n=6)에 대해 3회 반복 실험한 수조에서 10일 차와 20일 차에 각각 2마리의 실험어를 샘플링하여 수행하였다. 데이터 분석과 통계 분석은 SigmaPlot 12.0(Systat Software, Inc., USA)과 SPSS/PC+ statistical package software version 20(SPSS Ince, Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행하였다. One-way ANOVA와 Turkey's multiple range test를 사용하여 농도 구간의 유의미한 차이가 입증되었다. 통계 결과의 유의 수준은  $P < 0.05$ 로 설정하였고 모든 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 표현하였다.



### III. 결과

#### 1. 미세플라스틱 특성 분석

MP의 SEM 이미지는 Fig. 1에 나타났다. 이는 MP가 구형 모양을 가지며 MP의 입자 크기가  $20\mu\text{m}$  미만에서  $50\mu\text{m}$  이상으로 다양하다는 것을 의미한다. 입도 분석 결과, 입도가  $20\mu\text{m}$  미만,  $20\sim34\mu\text{m}$ ,  $34\sim50\mu\text{m}$ ,  $50\mu\text{m}$  이상이 13.63%, 27.42%, 33.04% 그리고 25.9%를 차지하는 것으로 나타났다. (Fig. 2).



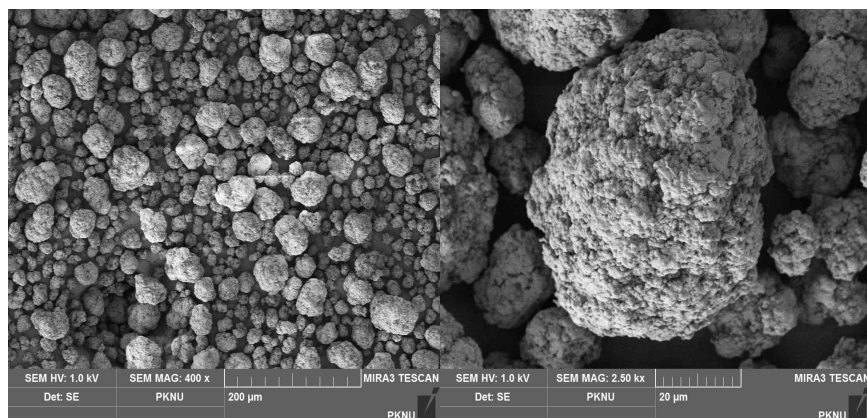
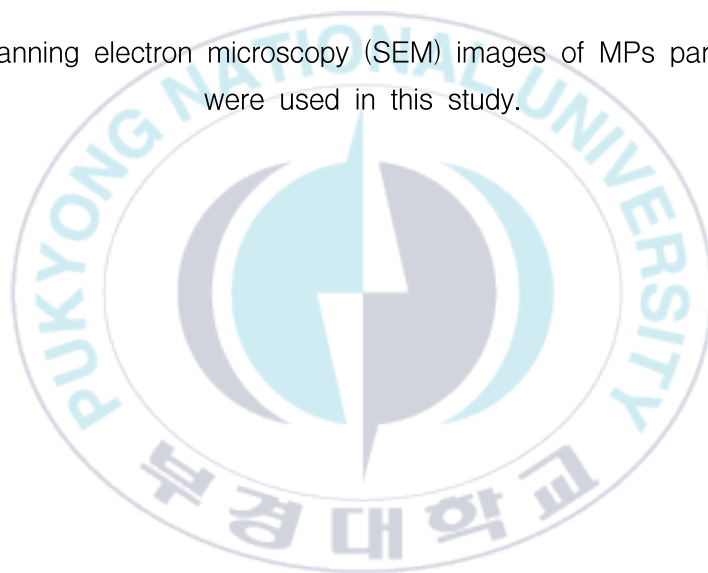


Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) images of MPs particles which were used in this study.



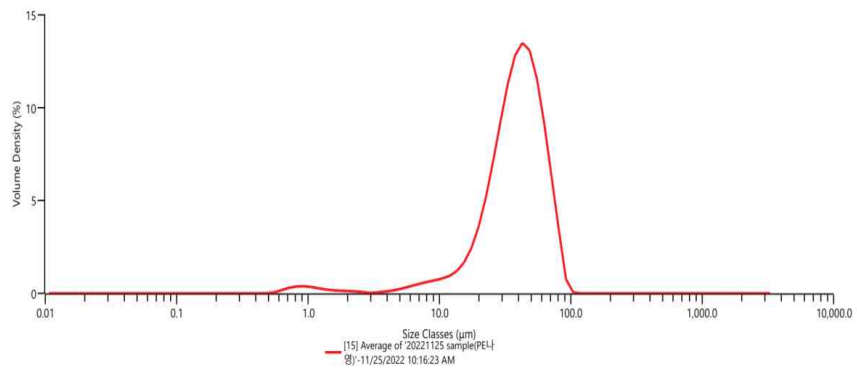


Fig. 2. The result of particle size distribution analysis.



## 2. 조직 내 MP 축적

*P.stellatus*의 아가미, 장, 그리고 간에 축적된 MP를 형광현미경에 부착된 카메라로 촬영하였고, Nile red working solution으로 염색된 MP는 형광 녹색으로 염색되었다(Fig. 3). MP 농도가 증가함에 따라 아가미, 장 그리고 간에서의 MP 축적은 농도 의존적으로 증가하였다( $P < 0.05$ ) (Fig. 4). Cd의 존재는 MP 축적에 유의미한 영향을 미치지 않았다. 축적 양상은 장 > 아가미 > 간 순으로 나타났다. 아가미와 장에서 발견되는 MP의 크기는 본 실험에 사용된 제품의 크기 범위 ( $34\sim 50\mu\text{m}$ ) 내에서 다양하게 존재하는 것으로 나타났으나, 간에서는 상대적으로 작은 크기( $< 20\mu\text{m}$ )가 관찰되었다.



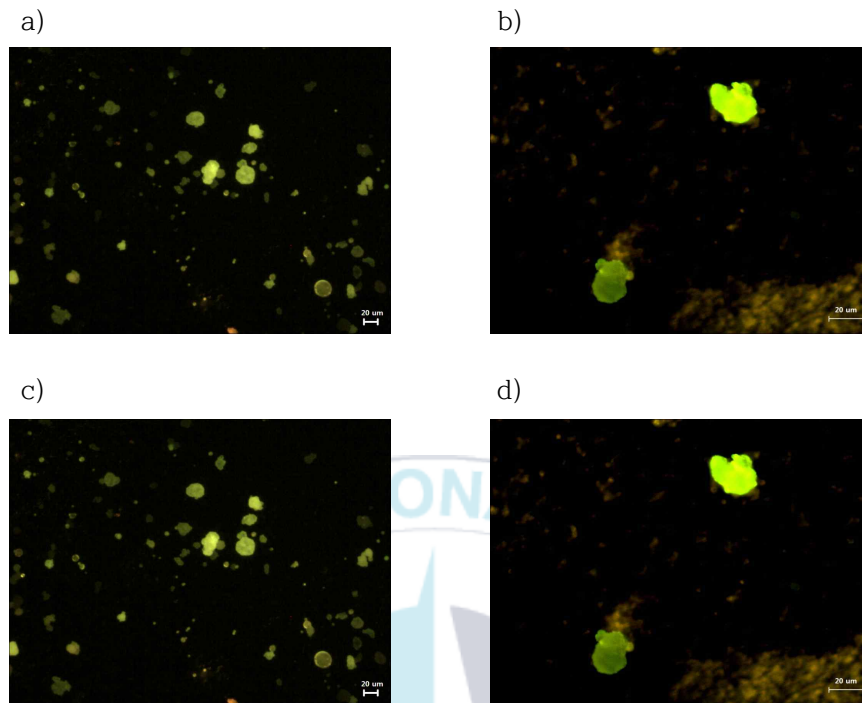


Fig. 3. The images of MPs stained with Nile Red. a) Virgin MPs b) MPs observed in gills dissolved in 10% KOH c) MPs observed in intestine dissolved in 10% KOH d) MPs observed in liver dissolved in 10% KOH

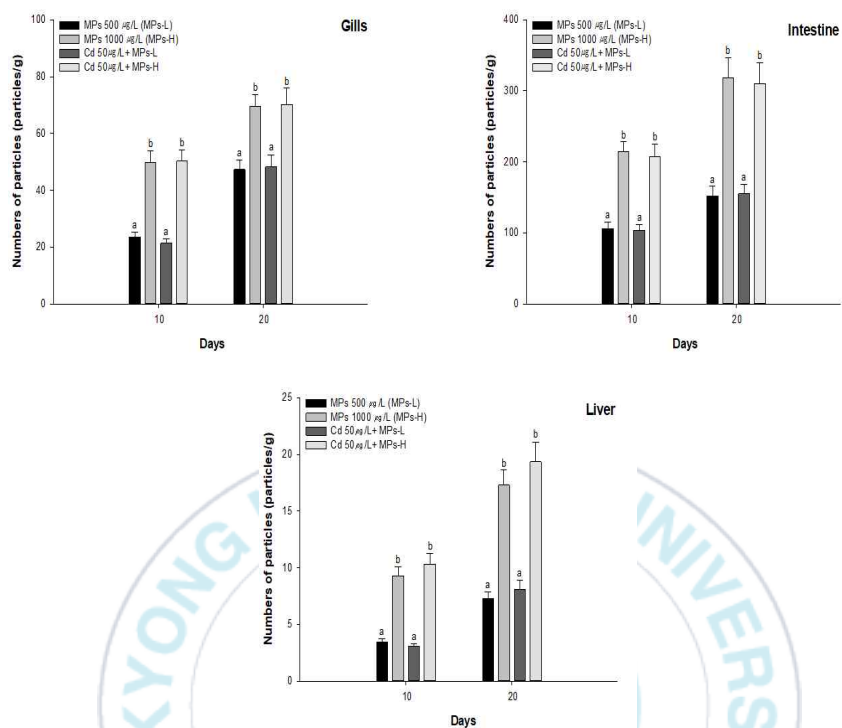
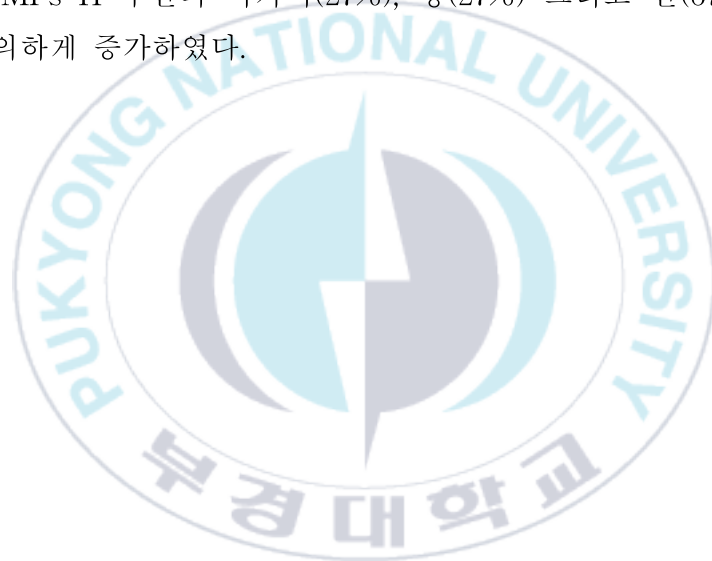


Fig. 4. MPs accumulation in gills, intestine and liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to MPs for 10 and 20 days. Values with different superscript are significantly different in 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Turkey's multiple range test.

### 3. 조직 내 Cd 축적

*P.stellatus*의 아가미, 장, 그리고 간에 축적된 Cd를 ICP-MS를 이용하여 분석하였다. MP 농도가 증가함에 따라 아가미, 장 그리고 간에서의 Cd 축적은 증가하였다( $P < 0.05$ ) (Fig. 5). 축적 양상은 간 > 아가미 > 장 순으로 나타났다. 10일 차의 경우, Cd  $50\mu\text{g/L}$  구간에 비해 Cd  $50\mu\text{g/L}$  + MPs-L 구간의 아가미(29%)와 Cd + MPs-H 구간의 아가미(60%), 장(23%) 그리고 간(57%)에서 Cd 축적이 유의하게 증가하였다. 20일 차의 경우, Cd + MPs-H 구간의 아가미(27%), 장(27%) 그리고 간(67%)에서 Cd 축적이 유의하게 증가하였다.



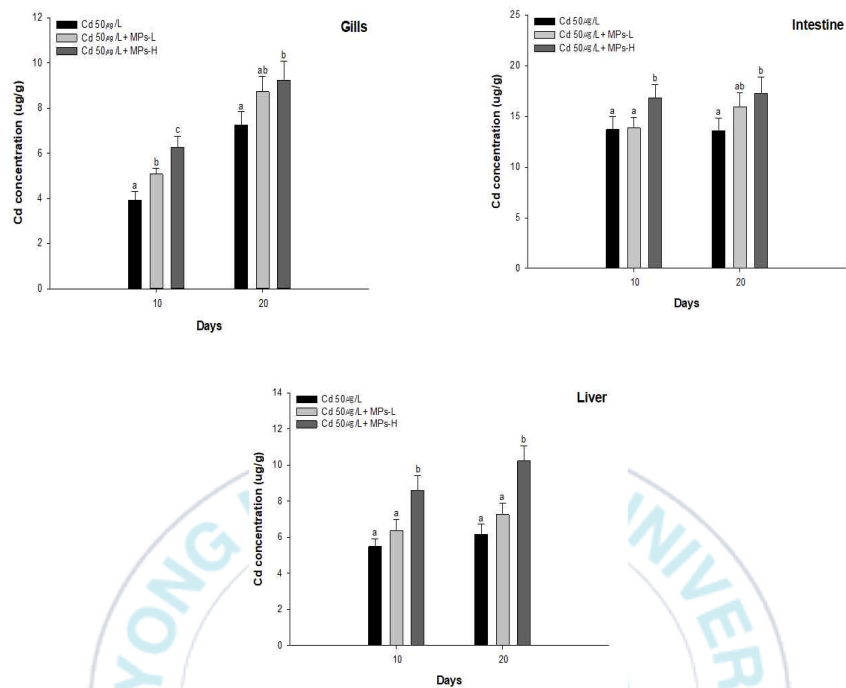


Fig. 5. Cd accumulation in gills, intestine and liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values with different superscript are significantly different in 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Turkey's multiple range test.

#### 4. 성장률

Cd와 MP에 노출된 *P.stellatus*의 성장 지표(BWG, SGR, HSI)는 Fig. 6-8. 에 나타내었다. BWG는 10일 차와 20일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-L과 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ ). SGR은 10일 차와 20일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-L과 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ ). HSI는 10일 차와 20일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ).



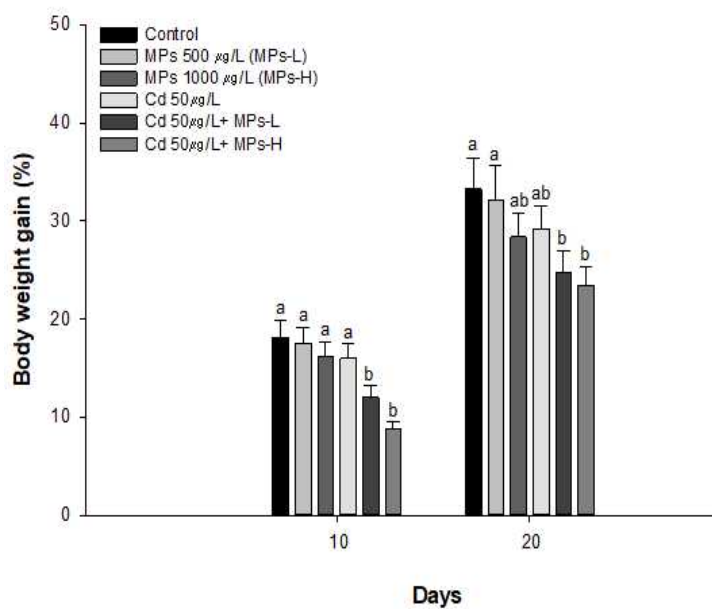


Fig. 6. BWG of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

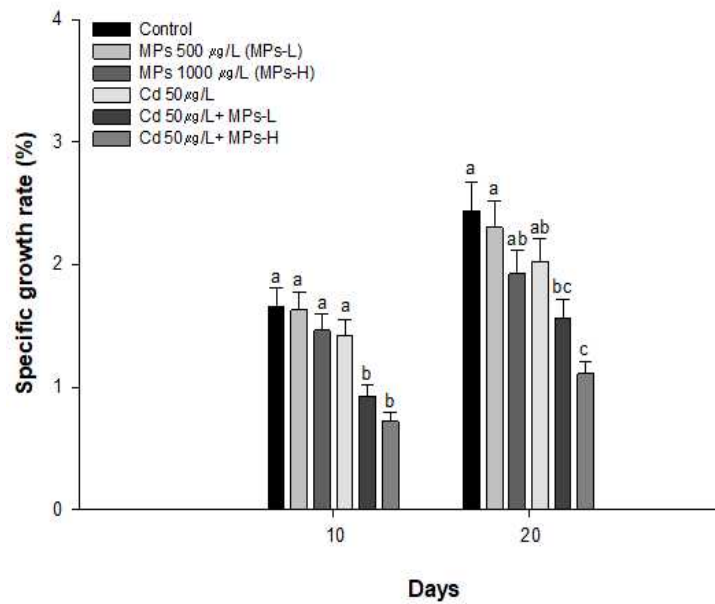


Fig. 7. SGR of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

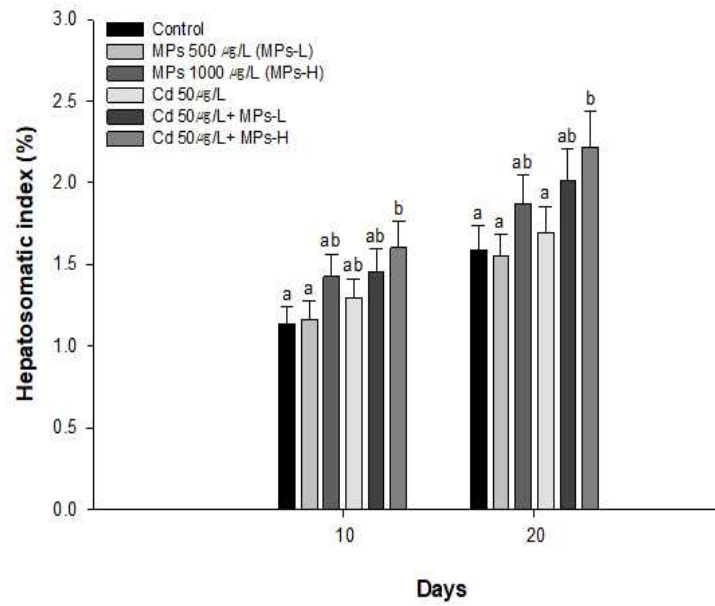


Fig. 8. HSI of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

## 5. 혈액 분석

Cd와 MP에 노출된 *P.stellatus*의 혈액학적 성상(RBC count, Hb)는 Fig. 9-10. 에 나타내었다. RBC count는 10일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 감소하였고, 20일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-L과 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ ). Hb는 10일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 감소하였고, 20일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-L과 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ ).

Cd와 MP에 노출된 *P.stellatus*의 혈장 성분(GOT, GPT, ALP, Glucose, TP, Calcium, Magnesium)은 Fig. 11-17. 에 나타내었다. GOT는 10일 차와 20일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ). GPT는 10일 차와 20일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ). ALP는 10일 차와 20일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-L과 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ ). Glucose는 10일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 증가하였고, 20일 차에 MP 1000 $\mu$ g/L과 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ). TP는 10일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 감소하였고, 20일 차에 MP Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-L과 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ). Calcium은 10일 차와 20일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ ). Magnesium은 10일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 증가하였고, 20일 차에 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-L과 Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-H 구간에서 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ).

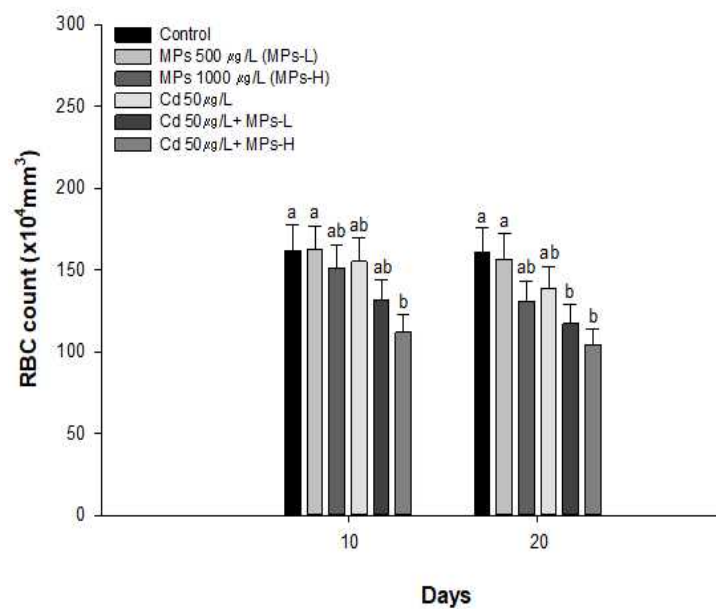


Fig. 9. RBC count of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

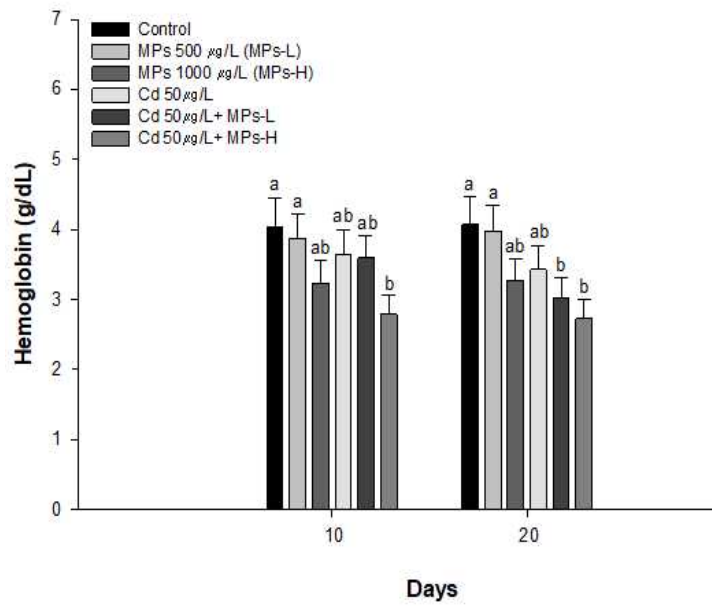


Fig. 10. Hb of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

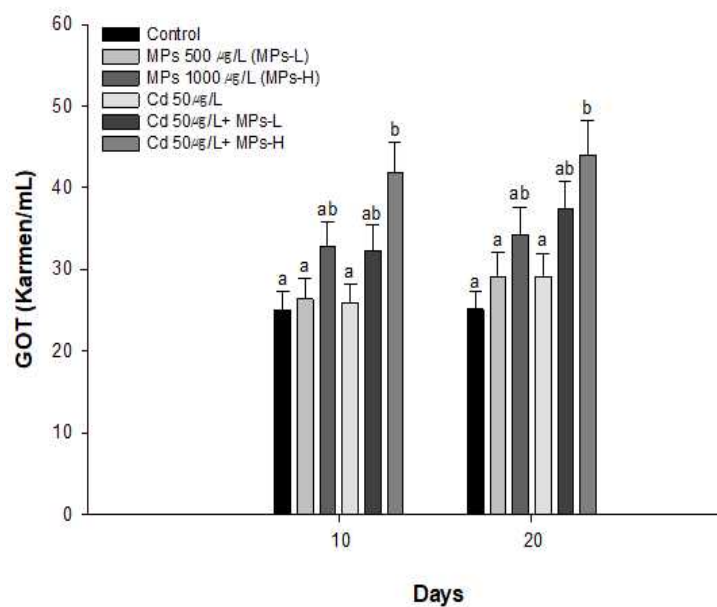


Fig. 11. GOT of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

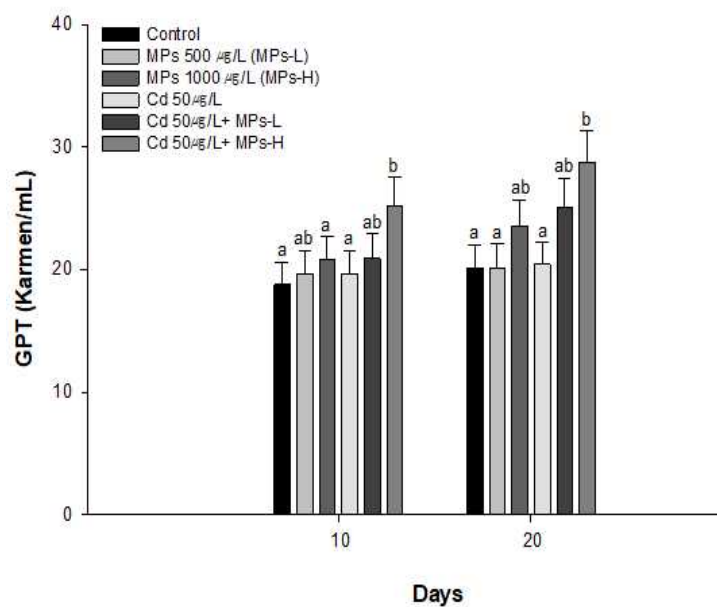


Fig. 12. GPT of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

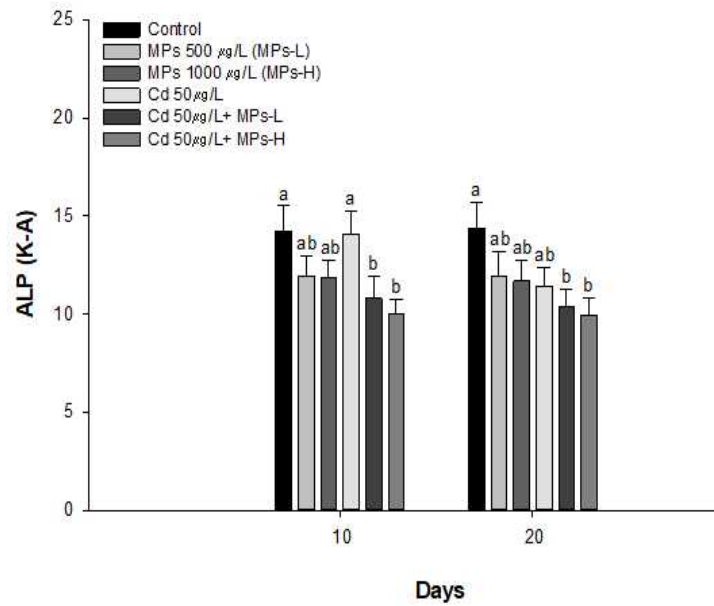


Fig. 13. ALP of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

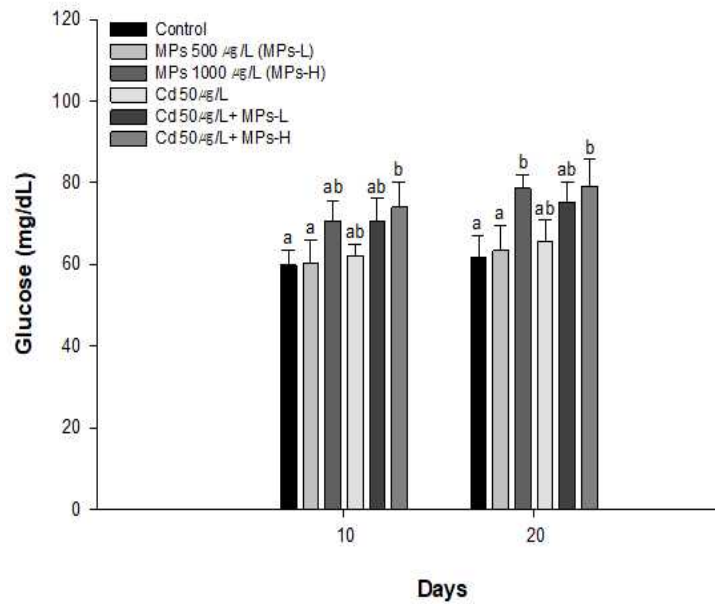


Fig. 14. Glucose of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

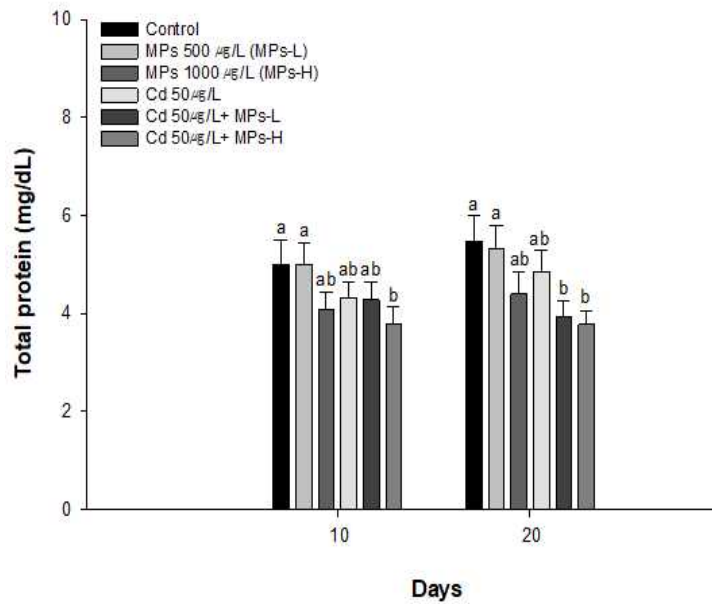


Fig. 15. TP of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

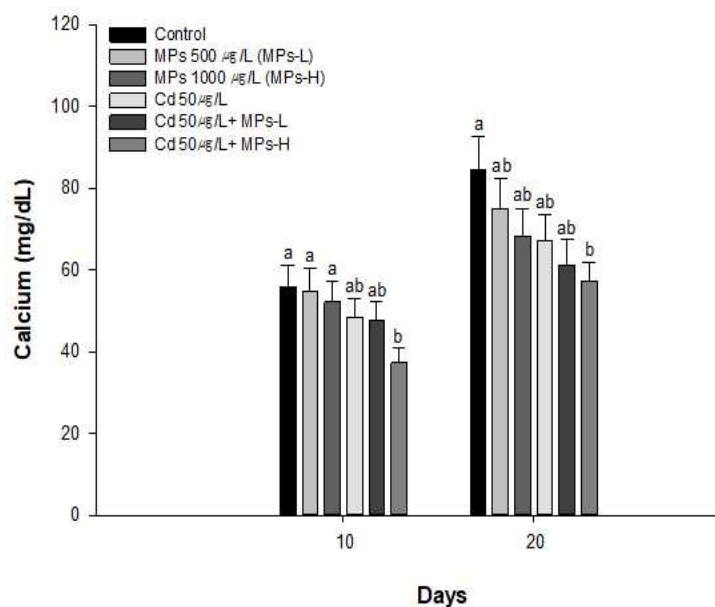


Fig. 16. Calcium of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

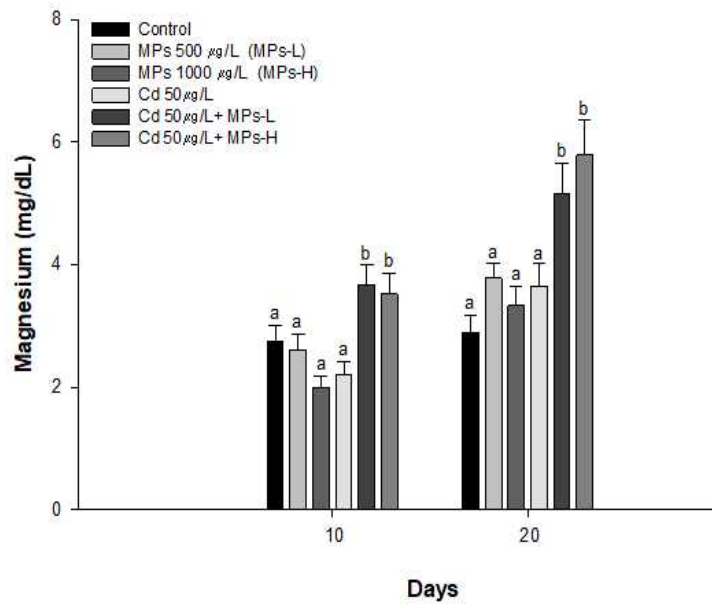
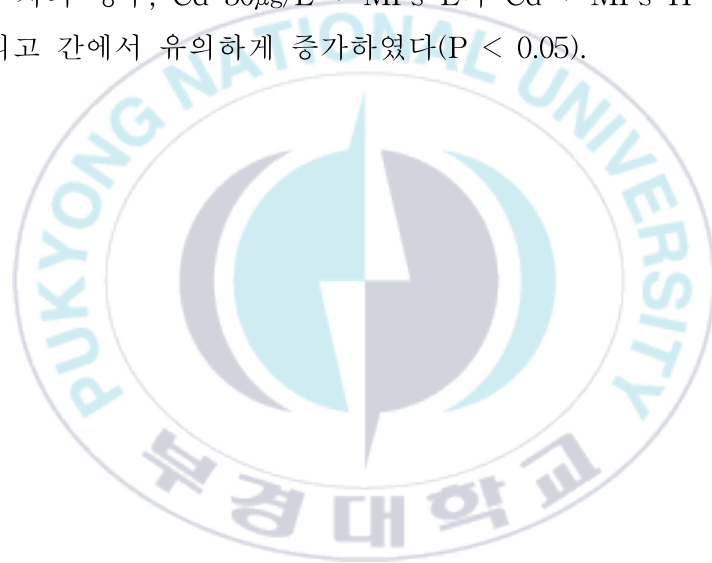


Fig. 17. Magnesium of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

## 6. 항산화 분석

Cd와 MP에 노출된 *P.stellatus*의 아가미, 장 그리고 간에서의 항산화 반응(SOD, CAT)을 Fig. 18-19. 에 나타내었다. SOD는 10일 차의 경우, Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-L과 Cd + MPs-H 구간의 장과 간에서 유의하게 증가하였다. 20일 차의 경우, Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-L 구간의 장과 간, Cd + MPs-H 구간의 아가미, 장 그리고 간에서 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ). CAT는 10일 차의 경우, Cd + MPs-H 구간의 장 그리고 간에서 유의하게 증가하였다. 20일 차의 경우, Cd 50 $\mu$ g/L + MPs-L과 Cd + MPs-H 구간의 아가미, 장 그리고 간에서 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ).



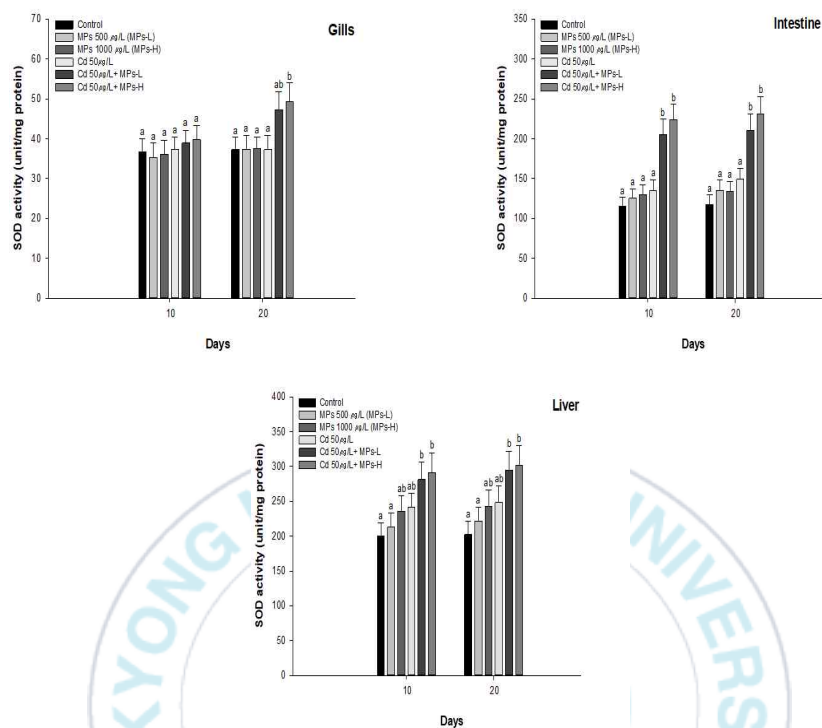


Fig. 18. SOD activity in gills, intestine and liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

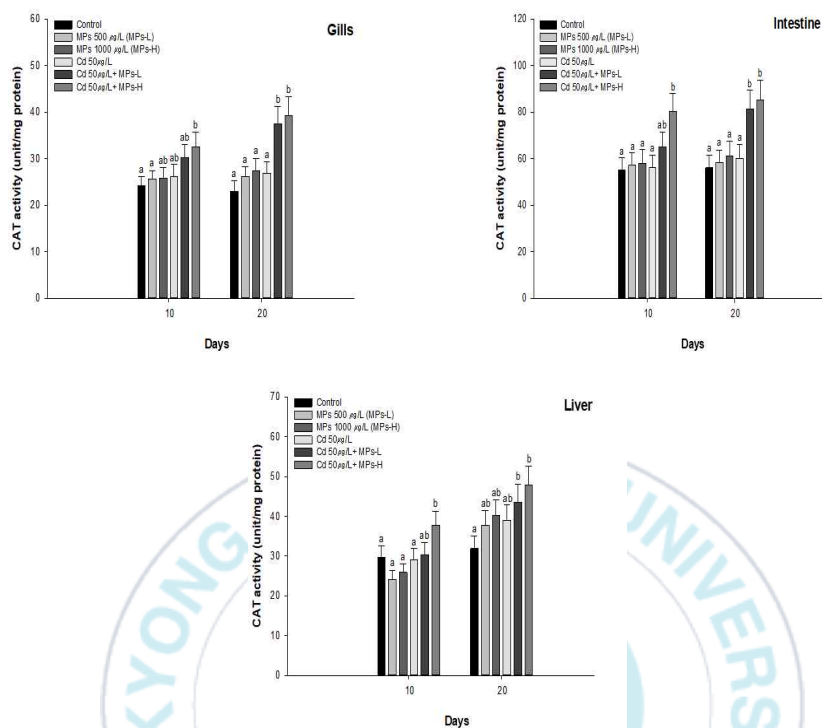
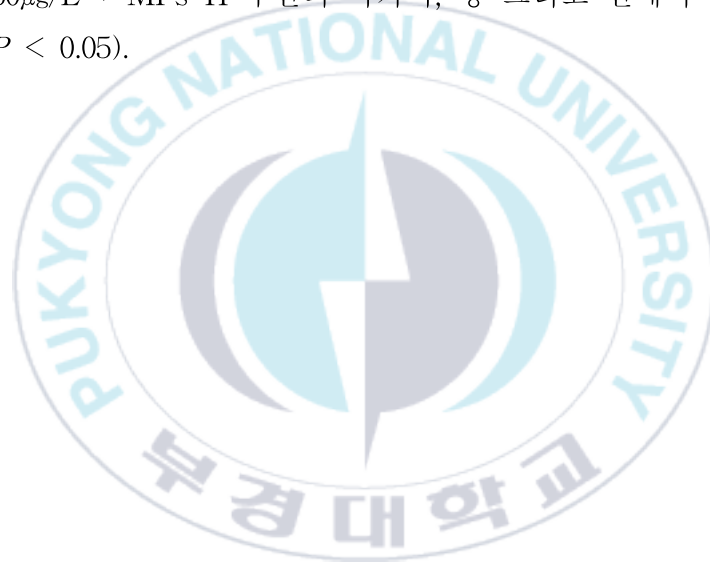


Fig. 19. CAT activity in gills, intestine and liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

## 7. 면역 반응

Cd와 MP에 노출된 *P.stellatus*의 아가미, 장 그리고 간에서의 면역 반응 (LZM, IgM)을 Fig. 20-21. 에 나타내었다. LZM은 10일 차의 경우, Cd 50  $\mu\text{g/L}$  + MPs-H 구간의 아가미, 장 그리고 간에서 유의하게 감소하였다. 20일 차의 경우, Cd 50  $\mu\text{g/L}$  + MPs-H 구간의 아가미, 장 그리고 간에서 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ ). IgM은 10일 차의 경우, Cd 50  $\mu\text{g/L}$  + MPs-H 구간의 아가미, 장 그리고 간에서 유의하게 감소하였다. 20일 차의 경우, Cd 50  $\mu\text{g/L}$  + MPs-H 구간의 아가미, 장 그리고 간에서 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ ).



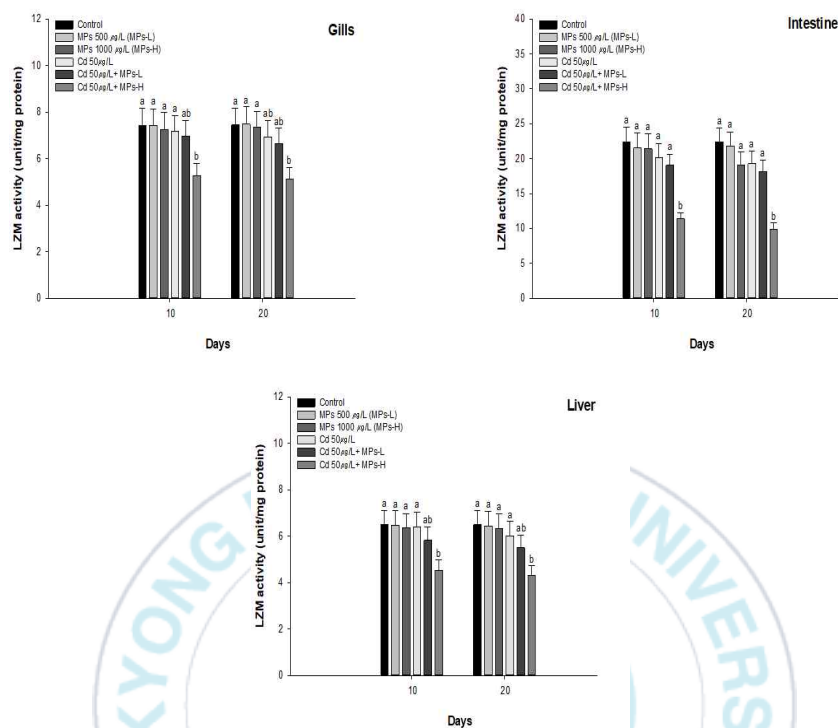


Fig. 20. LZM activity in gills, intestine and liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

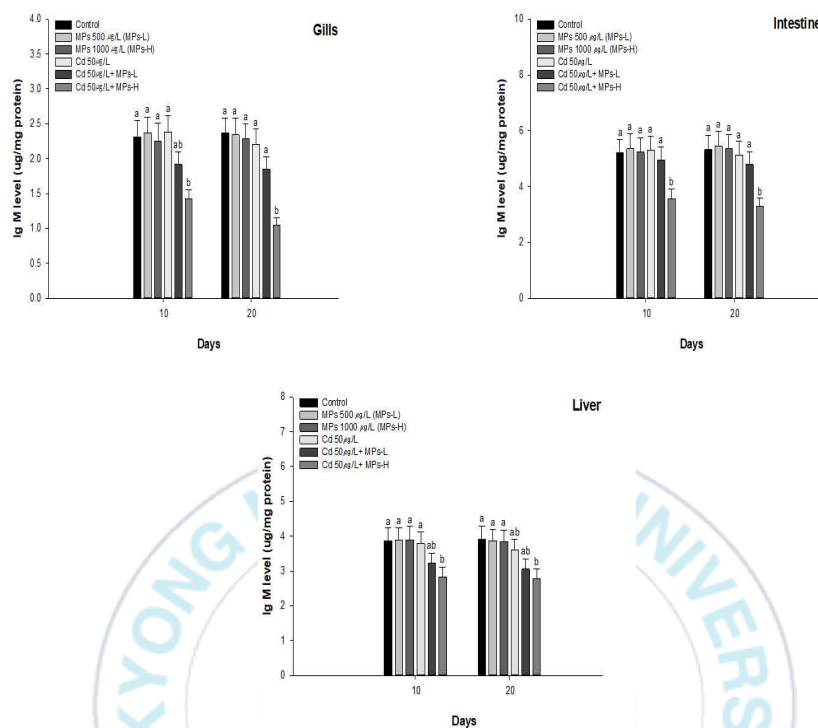


Fig. 21. IgM level in gills, intestine and liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to Cd and MPs for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

## IV. 고찰

자연 수생태계의 어류는 여러 오염물질의 혼합물에 동시에 노출되는 경우가 많아 환경오염물질 사이의 상호작용과 어류에 미치는 영향을 평가하는 것이 중요하다(Banaee et al., 2019). 어류의 생물축적 지표는 오염물질을 식별하고 노출 경로를 평가하여 환경오염물질의 이동 경로를 밝히기 위한 바이오마커로서 역할을 할 수 있다(Van der Oost and Vermeulen, 2003). 또한 어류의 MP 축적은 먹이 사슬 내에서 주요한 문제가 될 수 있으며 궁극적으로 이를 섭취하는 인간에게 영향을 미칠 수 있다(Lusher et al., 2013). 작은 크기의 MP를 어류가 먹이로 착각하여 직접 섭취하거나 MP를 함유한 다른 유기체의 섭취를 통해 간접적으로 섭취한 후 장으로 운반되는데, 장은 환경오염물질이 고농도로 축적되는 기관이다(Brandts et al., 2018; Wang et al., 2020). 실제로 본 연구에서 *P.stellatus*의 MP 축적은 장 > 아가미 > 간 순으로 농도 의존적으로 증가하였으며, 이러한 결과는 장에 가장 많은 양의 MP가 축적됨을 시사한다. 선행 연구들에 따르면, 일반적으로 어류에 의해 섭취된 MP는 장에 가장 많이 잔류하며(Abbasi et al., 2018), Yu et al. (2023)는 MP에 노출된 crucian carp(*Carassius carassius*)의 아가미, 장 그리고 간에서 시간 및 농도 의존적으로 MP 축적이 증가하였음을 나타냈다. Kashiwada (2006)는 MP에 노출된 Japanese medaka(*Oryzias latipes*)의 장에 가장 많은 양의 MP 축적이 확인되었고 아가미와 간에서도 MP가 발견되었다고 보고하였다. 마찬가지로 Ding et al. (2018)은 MP에 노출된 red tilapia(*Oreochromis niloticus*)의 간 보다 장에서 더 많은 축적이 검출되었다고 보고하였다. 섭취된 MP는 어류 위장관에 축적되어 장의 구조적 및 기능적 악화를 일으켜 섭식장애, 가짜 포만감 유발, 영양분 흡수 방해, 성장 저해, 생리적 스트레스 그리고 질병률 및 사망률 증가와 같은 문제를 일으킬 수 있다(Cole et al., 2015; Jabeen et al.,

2018). 더 나아가, MP는 호흡을 통해 아가미에 축적되기도 하며, 어류 체 내에 유입된 MP는 순환계를 통해 간과 같은 다른 장기로 전이될 수 있다 (Abbasi et al., 2018). Yin et al. (2018)은 MP에 노출된 jacopecover(*Sebastes schlegelli*)의 아가미와 장에 축적된 MP를 관찰하여 호흡과 섭취 모두 어류의 MP 흡수 경로임을 나타내었고, 표면적이 넓은 아가미는 수인성 환경오염물질 노출에 의한 축적의 주요 경로임을 시사하였다. Lu et al. (2016)은 MP에 노출된 zebra fish(*Danio rerio*)의 조직에 MP 크기에 따라 축적되는 분포 양상이 다르고, 작은 크기의 MP가 순환계를 통해 간으로 전달될 수 있음을 보고했다. 이는 간에서 상대적으로 작은 크기(< 20 $\mu$ m)의 MP가 관찰된 본 연구의 결과와 유사하다.

중금속 축적에 대한 연구는 이에 민감한 수생생물의 구조적 및 기능적 장애를 분석할 수 있으며 중금속 오염이 환경에 미치는 영향을 평가하는 바이오마커 역할을 할 수 있다(Wicklund et al., 1988). Cd는 수생생물 내에서의 대사나 배설이 어려워 생물축적이 발생하며 먹이 사슬을 통해 다양한 생물로 전이되어 생태계를 위협할 수 있다(Levit et al., 2010). Cd는 어류의 호흡에 의해 아가미로 흡수되며 순환계를 거쳐 간에 축적되고 최종적으로 다양한 조직에 전이된다(Liu et al., 2022). 게다가, 어류 조직 내에 축적된 Cd 축적량은 Cd 노출 농도와 노출 시간에 따라 차이가 나타날 수 있다(Wu et al., 2007). 본 연구에서 *P.stellatus*의 Cd 축적은 간 > 아가미 > 장 순으로, 이러한 결과는 간에 가장 많은 양의 Cd가 축적되는 것으로 보인다. 일반적으로 Cd는 아가미, 장, 간, 신장, 비장 등 대사적으로 활동적인 조직에 축적되며(Kumar and Singh, 2010), Cao et al. (2012)은 Cd에 노출된 Japanese flounder(*Paralichthys olivaceus*)의 간에서 가장 높은 Cd 축적량을 보였다고 나타냈다. 마찬가지로, Cirillo et al. (2012)은 Cd에 노출된 gilthead bream(*Sparus aurata*)의 간에 축적된 Cd 농도가 가장 많이 높아짐을 나타냈다. 또한, Yeşilbudak and Erdem (2014)은 Cd에 노출된 common carp(*Cyprinus carpio*)와 Nile Tilapia(*Oreochromis niloticus*)의

간에서 아가미보다 높은 Cd 축적을 나타냈다고 보고하였다. 어류의 간에 Cd가 축적되면 혈관 울혈, 충혈, 간세포의 액포 변성, 췌장 세포 괴사 및 췌장 주위 간세포의 지방 변화 등 간 조직의 병리학적 장애를 유발할 수 있다(Dangre et al., 2010). 게다가, Al-Asgah et al. (2015)은 Cd에 노출된 *O. niloticus*의 아가미에 시간이 지날수록 더 높은 Cd 축적을 보이며, Cd 이온은 수송과 확산을 통해 어류 아가미 내에 축적될 수 있음을 나타냈다(Okocha and Adediji, 2011). 또한, 유기물질과 결합한 Cd를 직접 섭취함으로써 어류의 장에 Cd가 축적될 수 있으며(Kumar and Singh, 2010), Wu et al. (2007)은 Cd 노출 15일 후 hybrid tilapia(*Oreochromis sp.*)의 장에 138.9배 이상의 높은 축적률을 보였음을 나타냈다.

MP는 넓은 표면적과 가짐으로써 다른 오염물질과의 흡착에 유리하고, 수생생물로 하여금 환경오염물질의 생체 축적률에 영향을 미칠 수 있는 벡터 역할을 할 수 있다(Sleight et al., 2017). 게다가 MP 표면은 극성과 다공성으로 금속을 흡착하는 데 유리한 역할을 하며, MP가 부식될수록 표면적이 넓어져 더 많은 금속을 흡착할 수 있다(Rochman et al., 2014). Brennecke et al. (2016)은 중금속을 단독으로 노출한 해수보다 MP와 중금속을 복합 노출한 해수에서 더 높은 금속 농도가 측정되었으며, 이를 바탕으로 MP가 중금속의 매개체 역할을 할 수 있음을 나타냈다. 본 연구에서 *P.stellatus*의 아가미, 장 그리고 간의 Cd 축적은 10일 차, 20일 차 모두 Cd 50 $\mu$ g/L 구간에 비해 Cd + MPs-H 구간에서 유의하게 증가하였다. 이는 호흡 및 섭식 활동을 통해 해수 내 Cd 이온뿐만 아니라 Cd를 흡착한 MP가 어류 체내로 유입됨으로써 Cd에 대한 노출 빈도가 높아졌기 때문에 Cd 단독노출 구간에 비해 Cd-MP 복합노출 구간에서 Cd 농도가 유의하게 높아진 것으로 예상된다. Lu et al. (2018)은 Cd와 MP에 단독 및 복합 노출된 *D.rerio*의 아가미, 장 그리고 간에서 Cd 단독노출 구간보다 복합노출 구간에서 더 높은 Cd가 측정되었음을 보고했다. 게다가, Chen et al. (2022)은 Cd와 MP에 단독 및 복합 노출된 grass carp(*Ctenopharyngodon*

*idellus*)에서 Cd 단독노출 구간에 비해 Cd-MP 복합노출 구간에서의 Cd 축적이 80% 이상 증가한 것으로 보고하였으며, 이는 Cd 축적이 MP의 존재에 의해 증가할 수 있음을 시사한다.

어류의 성장률은 환경오염물질에 의해 직간접적으로 영향을 받을 수 있으며 독성 연구에서 널리 사용되는 평가 지표이다(Koojiman and Bedaux, 1996). Cd와 MP는 어류의 대사 요구 증가 및 생리적 기능 장애를 유발하여 성장 지연을 초래한다(Taslima et al., 2022; Yin et al., 2018). 본 연구에서 Cd와 MP의 단독노출은 *P. stellatus*의 성장률에 영향을 미치지 않았지만, Cd-MP에 복합노출은 어류의 BWG와 SGR를 유의하게 감소시켰으며 HSI를 유의하게 증가시켰다. 이와 같은 결과는 Cd-MP 복합노출이 어류의 성장률 저해를 유발할 수 있음을 나타낸다. 마찬가지로, 선행 연구에서 MP와 중금속 복합노출 시 성장률에 부정적인 영향을 미치는 것으로 보고되었다. Chen et al. (2023)은 Cd 10 $\mu$ g/L + MP 100 $\mu$ g/L에 복합노출된 largemouth bass(*Micropterus salmoides*)에서 시간이 지남에 따라 BWG와 SGR이 감소했으며, MP에 흡착된 Cd를 어류가 더 많이 흡수하여 성장 장애가 나타났음을 보고하였다. 또한, Jinhui et al. (2019)은 Cd-MP에 복합노출된 yellow seahorse(*Hippocampus kuda*)에서 SGR의 유의한 감소를 나타냈으며, 이는 환경오염물질에 노출된 어류가 신체 기능 유지를 위해 성장에너지를 소비하여 대사율을 높였기 때문이라고 보고하였다. Liu et al. (2011)은 Cd에 노출된 javeline goby(*Synechogobius hasta*)에서 HSI의 유의한 증가를 보고하였다; Yin et al. (2018) 또한 MP에 노출된 *S.schlegelli*에서 HSI의 유의한 증가를 보고하였으며, 이는 Cd와 MP의 독성을 대사하기 위한 어류 간의 비정상적인 대사로 인한 결과임을 나타냈다.

수생태계에 환경오염물질이 유입되면 어류 혈액의 산소 운반 능력과 혈액 내 전해질 균형에 영향을 미쳐 혈액학적 성상에 변화를 유발할 수 있다

(Kim et al., 2021). 따라서 환경 스트레스에 노출된 혈액을 분석하는 것은 어류의 생리학적 상태와 건강을 평가하는 데 중요한 지표이다(Witeska et al., 2022). Cd는 어류의 용혈 및 적혈구 파괴로 인한 빈혈, 적혈구 수치 증가, 철분 결핍 및 세포막 손상을 유발할 수 있다(Shahjahan et al., 2022). 또한, MP는 어류 순환계로 흡수되어 지질 과산화, 대사 장애 및 염증 반응을 유발한다(Ma et al., 2020). 본 연구에서 Cd와 MP의 단독노출은 *P. stellatus*의 RBC count와 Hb에 영향을 미치지 않았지만, Cd-MP 복합노출은 RBC count와 Hb의 유의한 감소를 유발하였으며, 이는 Cd-MP 복합노출이 어류의 빈혈을 초래할 수 있음을 나타낸다. 선행 연구에 따르면, Cd와 MP 노출 시 RBC count와 Hb가 감소하는 것으로 보고되었다. Al-Asghar et al. (2015)은 Cd에 급성 노출된 *O. niloticus*에서 RBC count와 Hb의 유의한 감소를 보고하였다. 마찬가지로, Hamed et al. (2019)은 고농도의 MP에 노출된 *O. niloticus*에서 RBC count와 Hb의 유의한 감소를 보고하였으며, 이를 통해 Cd와 MP의 독성이 적혈구의 용혈과 생산의 억제를 유발하여 혈중 내 용존산소량을 감소시킬 수 있음을 시사했다.

어류의 혈장 유기 및 무기성분은 어류 스트레스 반응, 간 기능 및 미네랄 균형에 대한 환경오염물질의 독성을 평가하는데 유용한 어류 건강 지표이다(Mirghaied et al., 2017). Cd는 어류의 간, 신장 및 세뇨관 손상 및 칼슘 대사 장애를 유발하며(Liu et al., 2022), MP는 지방 대사, 면역 방어, 혈액 응고, 삼투압 및 분자 수송과 관련된 혈장 단백질의 기능을 방해한다(Kim et al., 2021). 이러한 환경오염물질 노출은 간 세포 손상을 유발하여 GOT와 GPT 같은 효소가 혈류로 방출되는 것을 증가시킨다(Kim et al., 2021; Shahjahan et al., 2022). 본 연구에서 *P. stellatus*의 GOT와 GPT는 Cd와 MP 단독노출에서 변화가 관찰되지 않았지만 Cd-MP 복합노출에서 유의한 증가가 관찰되었으며, 이는 Cd-MP 복합노출이 어류의 간 기능 억제를 유발할 수 있음을 시사한다. 선행 연구에 따르면, Banaee et al. (2019)은 Cd-MP에 복합노출된 *C. carpio*에서 GOT의 유의한 증가를 보고

하였으며 이는 Cd와 MP 독성에 따른 미토콘드리아 및 세포막 손상 유도  
에 의한 것으로 설명했다. Wei et al. (2023)은 Cd와 MP 단독노출보다  
Cd-MP에 복합노출된 *C.carassius*에서 GOT와 GPT가 유의적으로 증가한  
것을 보고하였으며 이는 MP와 Cd의 복합노출이 단독 노출에 비해 독성이  
증가하여 더 높은 수준의 간 기능 장애를 유발함을 나타낸다.

ALP는 단백질 인산화, 세포 성장 및 세포 사멸을 포함한 생리학적 과정  
에 필수적인 효소이며 세포막의 손상은 혈액 내 ALP에 영향을 미친다  
(Sharma et al., 2014). 따라서 ALP는 일반적으로 환경 스트레스 요인의  
바이오마커로 사용된다(Lee et al., 2023). 본 연구에서 Cd와 MP의 단독노  
출은 *P. stellatus*의 ALP에 영향을 미치지 않았지만, Cd-MP에 복합노출  
되었을 때 ALP가 유의하게 증가하였으며, 이는 Cd-MP 복합노출이 어류  
의 간 기능 장애 및 면역 억제를 유발할 수 있음을 나타낸다. 선행 연구에  
따르면, Banaee et al. (2019)은 Cd, MP 단독노출 및 Cd-MP에 복합노출  
된 *C.carpio*에서 ALP의 유의한 증가를 보고하였으며 이는 Cd와 MP가 지  
질 과산화와 세포막의 산화적 손상을 유발하여 어류 혈액 내 ALP를 증가  
시킬 수 있음을 나타냈다. Wen et al. (2018)은 Cd와 MP 단독노출 및 복  
합노출된 *S. aequifasciatus*에서 ALP의 유의한 증가를 보고하였으며 이는  
Cd와 MP의 독성이 어류의 생리학적 과정에 영향을 미칠 수 있음을 시사  
한다.

Glucose는 환경오염물질 노출에 대한 어류의 건강 및 스트레스 지표로  
사용된다(Javed and Usmani, 2015). 일반적으로 혈당 수치는 Glucose 생산  
과 글리코겐 저장의 균형이 항상성을 이루는데, 어류가 Cd와 MP 같은 환  
경오염물질에 노출되면 즉각적인 에너지 수요를 충족하기 위해 Glucose  
생산이 증가함으로써 혈당이 증가한다(Naqash et al., 2020; Shahjahan et  
al., 2022). 본 연구에서 Cd 단독노출은 *P. stellatus*의 Glucose에 영향을 미  
치지 않았지만, 고농도 MP 단독노출과 Cd-MP 복합노출은 Glucose의 유

의한 증가를 유발하였으며, 이는 고농도의 MP 단독노출과 Cd-MP 복합노출이 어류에게 스트레스 요인으로 작용하여 간 대사 장애와 같은 독성효과를 유발할 수 있음을 나타낸다. 선행 연구에 따르면, Banaee et al. (2019)은 Cd와 MP 단독노출 및 Cd-MP에 복합노출된 *C.carpio*에서 Glucose의 유의적인 증가를 보고하였으며 이를 통해 Cd와 MP가 Glucose 항상성과 관련된 신호 전달 경로를 방해할 수 있음을 나타냈다. Al-Asgah et al. (2015)은 Cd에 노출된 *O.niloticus*에서 Glucose의 유의한 증가를 보고하였으며, Zhao et al. (2020)은 MP에 만성적으로 노출된 *D.rerio*에서 Glucose의 유의한 증가를 보고하였다. 이러한 선행연구들은 Cd와 MP가 스트레스 요인으로 작용하며, 간의 글리코겐 분해와 해당작용 활성화를 유발할 수 있음을 시사한다.

TP는 어류의 삼투압 항상성, pH 균형, 대사산물 운반 그리고 면역 반응을 포함한 생리학적 과정에 필수적이며, 환경오염물질 노출 시 어류의 영양 상태를 간접적으로 보여주기 때문에 유용한 건강 지표로 사용된다(Esmaeili, 2021). 어류가 Cd 그리고 MP와 같은 환경오염물질에 노출되면 TP 수준이 변화하여 단백질 대사, 지질대사 및 삼투압 장애가 발생할 수 있다(Al-Asgah et al., 2015; Kim et al., 2021). 본 연구에서는 Cd와 MP의 단독노출은 *P. stellatus*의 TP에 영향을 미치지 않았지만, Cd-MP의 복합노출은 TP의 유의한 감소를 나타내었으며, 이는 Cd-MP 복합노출이 어류의 단백질 합성 장애를 유발할 수 있음을 시사한다. 선행 연구에 따르면, MP와 중금속 복합노출 시 TP는 감소하는 것으로 보고되었다. Banaee et al. (2019)은 Cd-MP에 복합노출된 *C.carpio*에서 TP의 유의한 감소를 보고하였으며 이를 통해 Cd와 MP가 어류의 필수 아미노산 흡수 방해, 소화율 감소 및 간 손상으로 인한 단백질 합성 장애 등을 유발할 수 있음을 나타냈다. Al-Asgah et al. (2015)은 Cd에 노출된 *O.niloticus*에서 TP의 감소를 보고하였으며, Lee et al. (2023)은 MP에 노출된 Korean bullhead(*Pseudobagrus fulvidraco*)에서 TP의 유의한 감소를 보고하였다.

이러한 선행연구들은 Cd와 MP가 어류 체내에서 독성을 유발하여 단백질 합성 저하, 세포 파괴 및 간 기능 장애와 같은 독성효과를 초래할 수 있음을 시사한다.

Calcium 그리고 Magnesium과 같은 혈장 무기성분은 환경오염물질의 독성을 나타내는 건강 지표이다(Lee et al., 2023). Cd 이온은 어류 아가미를 통해 세포막의 Calcium 통로와 경쟁하여 칼슘 항상성에 영향을 미치고 Calcium ATPase 억제, 저칼슘혈증, 고혈당증 및 고마그네슘혈증과 같은 이온 교란을 초래할 수 있다(Lee et al., 2022). 어류는 일반적으로 신장을 통해 Magnesium을 배설함으로써 혈장 내 Magnesium 수치를 낮추는데, MP 독성으로 인해 Calcium과 Magnesium에 관련된 이온 항상성에 부정적인 영향을 미칠 수 있다(Choi et al., 2023a; Lee et al., 2023). 본 연구에서 Cd와 MP의 단독노출은 *P. stellatus*의 Calcium과 Magnesium에 영향을 미치지 않았지만, Cd-MP에 복합노출은 Calcium의 유의한 증가와 Magnesium의 유의한 감소를 유발하였다. 이는 Cd-MP 복합노출이 어류 체내의 Calcium과 Magnesium 이온 항상성 장애를 유발할 수 있음을 나타낸다. 선행 연구에 따르면, Lee et al. (2022)은 Cd에 노출된 *P. olivaceus*에서 Calcium의 유의한 감소를 보고하였으며, Lee et al. (2023)은 MP에 노출된 *P. fulvidraco*에서 Calcium의 유의한 감소를 보고하였다. 이러한 선행연구들은 Cd와 MP 노출이 Calcium 항상성 장애를 유발할 수 있음을 시사한다. Kim et al. (2004)은 Cd에 노출된 *S. schlegelli*에서 Magnesium의 유의한 증가를 보고하였으며, 이를 통해 Cd 노출이 어류의 신장 기능 장애를 유발할 수 있음을 나타냈다.

어류는 Cd와 MP 같은 환경오염물질에 노출되면 ROS 과잉 생성으로 인한 산화스트레스가 유발되어 지질 과산화, 조직 손상 및 세포 산화환원 불균형과 같은 독성 영향이 유발될 수 있다(Hamed et al., 2020; Xie et al., 2019). 어류는 체내의 ROS 양의 균형을 유지하기 위해 복잡한 항산화 시

시스템을 발달시켰으며, SOD와 CAT 같은 항산화 효소는 환경오염물질 노출로 인해 어류 체내에 과잉 생성된 ROS를 억제하기 때문에 대표적인 어류의 산화스트레스 지표로 사용된다(Ighodaro and Akinloye, 2018; Souid et al., 2013). ROS는 SOD에 의해  $H_2O_2$ 로 전환될 수 있으며,  $H_2O_2$ 는 CAT에 의해 대사되어  $H_2O$ 와  $O_2$ 로 전환됨으로써 산화스트레스로부터 어류를 보호한다(Wen et al., 2018). 본 연구에서 Cd와 MP의 단독노출은 *P. stellatus*의 SOD와 CAT에 영향을 미치지 않았지만, Cd-MP 복합노출은 SOD와 CAT를 유의하게 증가시켰으며, 이는 Cd-MP 복합노출이 어류의 항산화 반응을 활성화시킬 수 있음을 나타낸다. 선행 연구에 따르면, Chen et al. (2023)은 Cd-MP에 복합노출된 *M. salmoides*에서 SOD와 CAT의 유의한 증가를 보고하였으며 이를 통해 Cd와 MP 노출은 산화 손상을 유발하여 항산화 효소를 활성화시킬 수 있음을 나타냈다. Lee et al. (2022)은 Cd에 노출된 *P. olivaceus*의 아가미 및 간에서 SOD와 CAT의 증가를 보고하였고 Lee et al. (2023)은 MP에 노출된 *P. fulvidraco*의 아가미, 장 및 간에서 SOD와 CAT의 유의한 증가를 보고하였다. 이를 통해 Cd와 MP가 과잉 ROS 유발 요인으로 작용함으로써 어류의 산화스트레스를 유발할 수 있으며, SOD와 CAT와 같은 항산화 효소의 발현을 증가시켜 항산화 반응을 유도할 수 있음을 나타냈다.

면역 체계는 기생충, 바이러스 등 다양한 병원체를 감지하고 질병으로부터 유기체를 보호하는 유기체 내의 생물학적 구성 요소 및 과정이다(Rauta et al., 2012). 어류의 면역 체계는 환경오염물질로 인해 부정적인 영향을 받기 때문에 일반적인 어류 건강 지표로 활용된다(Segner et al., 2012). Cd는 어류의 과잉 ROS를 생성을 유도함으로써 세포 내 염증 관련 신호전달 체계를 자극하며 세포성 및 체액성 면역의 변화를 초래한다(Park et al., 2020). MP는 물리적으로 어류의 장 손상 및 염증을 유발하여 영양분 흡수를 간접적으로 방해함으로써 어류의 면역 활성화에 악영향을 미칠 수 있다(Kim et al., 2021). LZM은 환경오염물질, 병원체 등에 노출되었을 때 식세

포의 자극으로 생성되며, 독성물질과 환경적, 생물학적 요인에 따라 활성이 달라지기 때문에 어류의 선천성 면역에 중요한 지표이다(Saurabh and Sahoo, 2008; Kim et al., 2021). 본 연구에서 Cd와 MP의 단독노출은 *P. stellatus*의 LZM에 영향을 미치지 않았지만, Cd-MP에 복합노출은 LZM을 유의하게 감소시켰으며, 이는 Cd-MP 복합노출이 면역 체계의 손상을 유발할 수 있음을 나타낸다. 선행 연구에 따르면, Banaee et al. (2019)은 Cd-MP에 복합노출된 *C. carpio*에서 LZM의 감소를 보고하였으며 이를 통해 Cd와 MP가 LZM 활성을 감소시켜 병원균에 대한 저항성을 저하시킬 수 있음을 시사한다. El-Boshy et al. (2014)은 Cd에 급성 노출된 North african catfish(*Clarias gariepinus*)에서 LZM의 유의한 감소를 보고하였고 Zhou et al. (2022)은 MP에 노출된 *O. latipes*의 간에서 LZM의 유의한 감소를 보고하였다. 이를 통해 Cd와 MP 노출이 LZM의 기능을 저하시키고 식균 작용을 방해할 수 있으며, 더 나아가 병원균에 대한 잠재적인 저항성을 낮출 수 있음을 시사한다.

병원체에 대한 후천성 면역의 주요 지표인 면역글로불린은 B 림프구에서 분비되고 다양한 환경 독성과 같은 항원을 인식한다(Rauta et al., 2012). 특히 IgM은 어류에 가장 많이 분포하는 면역글로불린으로, 다양한 조직에서 발견되며 병원체 용해 및 옹소닌화, 보체 경로 활성화 및 식균 작용을 위한 응집 반응 매개 등 전신 면역에서 다양한 영향을 미치기 때문에 환경오염물질의 독성에 대한 면역 지표로 사용된다(Choi et al., 2023c; Mashoof and Michael, 2016). 본 연구에서 Cd와 MP의 단독노출은 *P. stellatus*의 IgM에 영향을 미치지 않았지만, Cd-MP 복합노출은 IgM을 유의하게 감소시켰으며, 이는 Cd-MP 복합노출이 어류의 면역 시스템을 억제하여 면역을 저하시킬 수 있음을 시사한다. Wang et al. (2019)은 Cd에 노출된 goldfish(*Carassius auratus*)에서 IgM의 감소를 보고하였으며 Choi et al. (2023c)은 MP에 노출된 *C. carassius*에서 IgM의 유의적인 감소를 보고하였다. 이러한 선행연구들은 Cd와 MP가 어류 림프구 내 세포 사멸

을 유도하여 면역글로불린의 생성을 감소시킴으로써 면역 체계 기능 장애를 유발할 수 있음을 시사했다.



## V. 결론

결론적으로, 본 연구에서 *P. stellatus*의 조직 내 MP 축적은 농도 의존적으로 증가하였으며, 장 > 아가미 > 간 순으로 축적되는 경향을 보였다. 조직 내 Cd 축적은 간 > 아가미 > 장 순으로 농도 의존적인 축적 경향을 보였으며, Cd 50 $\mu$ g/L 구간에 비해 Cd + MPs-H 구간에서 Cd 축적이 유의하게 증가하였다. 성장률 (BWG, SGR, HSI)의 경우, MP와 Cd의 단독 노출에서는 영향이 나타나지 않았지만 Cd-MP의 복합노출에서는 유의한 변화를 보였다. 마찬가지로, 혈액학적 정상 (RBC count, Hb)은 Cd-MP의 복합노출에서 유의적인 감소가 나타났다. 혈장 성분의 경우, GOT, GPT, ALP, Glucose 및 Magnesium은 Cd-MP의 복합노출에서 유의적인 증가가 나타났으며, Glucose는 MP 1000 $\mu$ g/L 구간에서도 유의적으로 증가했다. TP 및 Calcium은 Cd-MP의 복합노출에서 유의적인 감소가 나타났다. 항산화 반응 (SOD, CAT)은 Cd-MP의 복합노출에서 유의적으로 증가했으며, 면역 반응 (LZM, IgM)은 Cd-MP의 복합노출에서 유의적으로 감소했다. 본 연구의 결과로, Cd가 존재하는 환경 내의 MP는 어류 체내의 Cd 축적을 증가시킴으로써 Cd의 수송체 역할을 할 수 있음을 확인하였다. 또한 Cd와 MP 단독노출보다 Cd-MP 복합노출은 더 높은 혈액학적 및 생리학적 독성을 유발하는 것으로 나타났다. 하지만, 현재 수생환경에서 MP와 중금속을 포함한 환경성오염물질의 복합노출에 의한 수생생물의 독성 영향에 대한 연구는 미흡한 실정이며, 향후 다양한 종류의 MP와 환경오염물질의 복합노출에 대한 독성 영향 지표를 마련하는 연구가 필요하다.

## VI. 참고문헌

- Abbasi, S., Soltani, N., Keshavarzi, B., Moore, F., Turner, A., & Hassanaghaei, M. (2018). Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf. *Chemosphere*, 205, 80-87.
- Al-Asgah, N. A., Abdel-Warith, A. W. A., Younis, E. S. M., & Allam, H. Y. (2015). Haematological and biochemical parameters and tissue accumulations of cadmium in *Oreochromis niloticus* exposed to various concentrations of cadmium chloride. *Saudi journal of biological sciences*, 22(5), 543-550.
- Anderson, A. G., Grose, J., Pahl, S., Thompson, R. C., & Wyles, K. J. (2016). Microplastics in personal care products: Exploring perceptions of environmentalists, beauticians and students. *Marine pollution bulletin*, 113(1-2), 454-460.
- Banaee, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A., Haghi, B. N., Akhlaghi, M., & Derikvandy, A. (2019). Evaluation of single and combined effects of cadmium and micro-plastic particles on biochemical and immunological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 236, 124335.
- Barboza, L.G.A., Dick Vethaak, A., Lavorante, B.R.B.O., Lundebye, A.K., Guilhermino, L., 2018a. Marine microplastic debris: an emerging issue for food security, food safety and human health. *Mar. Pollut. Bull.* 133, 336e348.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Brandts, I., Teles, M., Gonçalves, A. P., Barreto, A., Franco-Martinez, L., Tvarijonaviciute, A., ... & Oliveira, M. (2018). Effects of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine. *Science of the total environment*, 643, 775–784.
- Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., & Canning-Clode, J. (2016). Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178, 189–195.
- Chen, M., Bao, X., Yue, Y., Yang, K., Liu, H., Yang, Y., ... & Duan, N. (2023). Combined effects of cadmium and nanoplastics on oxidative stress, histopathology, and intestinal microbiota in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 569, 739363.
- Chen, X., Wang, J., Xie, Y., Ma, Y., Zhang, J., Wei, H., & Abdou, A. I. E. (2022). Physiological response and oxidative stress of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) under single and combined toxicity of polystyrene microplastics and cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 245, 114080.
- Choi, J. H., & Kim, J. H. (2023a). Toxic effects of sub-acute microplastic (polyamide) exposure on the accumulation, hematological, and antioxidant responses in crucian carp, *Carassius carassius*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 102, 104199.
- Choi, J. H., Kim, J. H., & Kang, J. C. (2023b). The mercury accumulation and its effects on antioxidant and immune responses in starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to dietary mercury. *Fish & Shellfish Immunology*, 135, 108658.

- Choi, J. H., Lee, J. H., Jo, A. H., Choi, Y. J., Choi, C. Y., Kang, J. C., & Kim, J. H. (2023c). Microplastic polyamide toxicity: Neurotoxicity, stress indicators and immune responses in crucian carp, *Carassius carassius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 265, 115469.
- Choi, J. S., Jung, Y. J., Hong, N. H., Hong, S. H., & Park, J. W. (2018). Toxicological effects of irregularly shaped and spherical microplastics in a marine teleost, the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Marine pollution bulletin*, 129(1), 231-240.
- Choudhury, C.; Mazumder, R.; Biswas, R.; Sengupta, M. Cadmium exposure induces inflammation through the canonical NF- $\kappa$ B pathway in monocytes/macrophages of *Channa punctatus* Bloch. *Fish Shellfish. Immunol.* 2021, 110, 116 - 126.
- Cirillo, T., Amodio Cocchieri, R., Fasano, E., Lucisano, A., Tafuri, S., Ferrante, M. C., ... & Isani, G. (2012). Cadmium accumulation and antioxidant responses in *Sparus aurata* exposed to waterborne cadmium. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 62, 118-126.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2015). The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environmental science & technology*, 49(2), 1130-1137.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine pollution bulletin*, 62(12), 2588-2597.
- Dangre, A. J., Manning, S., & Brouwer, M. (2010). Effects of cadmium on hypoxia-induced expression of hemoglobin and

- erythropoietin in larval *sheepshead minnow*, *Cyprinodon variegatus*. *Aquatic Toxicology*, 99(2), 168–175.
- De Frond, H. L., van Seville, E., Parnis, J. M., Diamond, M. L., Mallos, N., Kingsbury, T., & Rochman, C. M. (2019). Estimating the mass of chemicals associated with ocean plastic pollution to inform mitigation efforts. *Integrated environmental assessment and management*, 15(4), 596–606.
- Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., & Ren, H. (2017). Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific reports*, 7(1), 1–10.
- Ding, J., Zhang, S., Razanajatovo, R. M., Zou, H., & Zhu, W. (2018). Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental pollution*, 238, 1–9.
- El-Boshy, M. E. S., Gadalla, H. A., & El-Hamied, F. M. A. (2014). Immunological, hematological and biochemical changes induced by short term exposure to cadmium in catfish (*Clarias gariepinus*). *J. Coast. Life Med*, 2(3), 175–180.
- Elleuch, J., Hmani, R., Drira, M., Michaud, P., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2021). Potential of three local marine microalgae from Tunisian coasts for cadmium, lead and chromium removals. *Science of The Total Environment*, 799, 149464.
- Esmaili, N. (2021). Blood performance: a new formula for fish growth and health. *Biology*, 10(12), 1236.
- Fafioye, O. O., Adebisi, A. A., & Fagade, S. O. (2004). Toxicity of

- Parkia biglobosa and Raphia vinifera extracts on *Clarias gariepinus* juveniles. African Journal of Biotechnology, 3(11), 627-630.
- Farombi, E. O., Adelowo, O. A., & Ajimoko, Y. R. (2007). Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. International journal of environmental research and public health, 4(2), 158-165.
- Green, D. S., Boots, B., O'Connor, N. E., & Thompson, R. (2017). Microplastics affect the ecological functioning of an important biogenic habitat. Environmental science & technology, 51(1), 68-77.
- Hamed, M., Soliman, H. A., Osman, A. G., & Sayed, A. E. D. H. (2019). Assessment the effect of exposure to microplastics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juvenile: I. blood biomarkers. Chemosphere, 228, 345-350.
- Hamed, M., Soliman, H. A., Osman, A. G., & Sayed, A. E. D. H. (2020). Antioxidants and molecular damage in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to microplastics. Environmental Science and Pollution Research, 27, 14581-14588.
- He, D., Luo, Y., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Lei, L., 2018. Microplastics in soils: analytical methods, pollution characteristics and ecological risks. TrAC Trends Anal. Chem. 109, 163 - 172.
- Hirt, N., & Body-Malapel, M. (2020). Immunotoxicity and intestinal effects of nano-and microplastics: a review of the literature. Particle and fibre toxicology, 17, 1-22.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and

- glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287–293.
- Jabeen, K., Li, B., Chen, Q., Su, L., Wu, C., Hollert, H., & Shi, H. (2018). Effects of virgin microplastics on goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, 213, 323–332.
- Javed, M., & Usmani, N. (2015). Impact of heavy metal toxicity on hematology and glycogen status of fish: a review. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85, 889–900.
- Jiaxin, S., Shengchen, W., Yirong, C., Shuting, W., & Shu, L. (2020). Cadmium exposure induces apoptosis, inflammation and immunosuppression through CYPs activation and antioxidant dysfunction in common carp neutrophils. *Fish & shellfish immunology*, 99, 284–290.
- Jinhui, S., Sudong, X., Yan, N., Xia, P., Jiahao, Q., & Yongjian, X. (2019). Effects of microplastics and attached heavy metals on growth, immunity, and heavy metal accumulation in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110510.
- Kashiwada, S. (2006). Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental health perspectives*, 114(11), 1697–1702.
- Kim, J. H., Yu, Y. B., & Choi, J. H. (2021). Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics: A

- review. Journal of Hazardous Materials, 413, 125423.
- Kim, S. G., Kim, J. W., & Kang, J. C. (2004). Effect of dietary cadmium on growth and haematological parameters of juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). Aquaculture Research, 35(1), 80–86.
- Kooijman, S. A. L. M., & Bedaux, J. J. M. (1996). Analysis of toxicity tests on fish growth. Water Research, 30(7), 1633–1644.
- Kotiadis, V. N., Duchen, M. R., & Osellame, L. D. (2014). Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–General Subjects, 1840(4), 1254–1265.
- Kumar, M., Kumari, P., Gupta, V., Anisha, P. A., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2010). Differential responses to cadmium induced oxidative stress in marine macroalga *Ulva lactuca* (*Ulvales*, *Chlorophyta*). Biometals, 23, 315–325.
- Kumar, P., & Singh, A. (2010). Cadmium toxicity in fish: An overview. GEF Bulletin of Biosciences, 1(1), 41–47.
- Lee, D. C., Choi, Y. J., & Kim, J. H. (2022). Toxic effects of waterborne cadmium exposure on hematological parameters, oxidative stress, neurotoxicity, and heat shock protein 70 in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish & Shellfish Immunology, 122, 476–483.
- Lee, J. H., Kang, J. C., & Kim, J. H. (2023). Toxic effects of microplastic (Polyethylene) on fish: Accumulation, hematological parameters and antioxidant responses in Korean Bullhead,

- Pseudobagrus fulvidraco*. Science of The Total Environment, 877, 162874.
- Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., ... & He, D. (2018). Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. Science of the total environment, 619, 1-8.
- Levit, S. M. (2010). A literature review of effects of cadmium on fish. no. November.
- Lim, H. K., Min, B. H., Kwon, M. G., Byun, S. G., Park, M. S., Jeong, M. H., ... & Chang, Y. J. (2013). Blood physiological responses and growth of juvenile starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to different salinities. Journal of Environmental Biology, 34(5), 885.
- Liu, X. J., Luo, Z., Li, C. H., Xiong, B. X., Zhao, Y. H., & Li, X. D. (2011). Antioxidant responses, hepatic intermediary metabolism, histology and ultrastructure in *Synechogobius hasta* exposed to waterborne cadmium. Ecotoxicology and environmental safety, 74(5), 1156-1163.
- Liu, Y., Chen, Q., Li, Y., Bi, L., Jin, L., & Peng, R. (2022). Toxic effects of cadmium on fish. Toxics, 10(10), 622.
- Lu, K., Qiao, R., An, H., & Zhang, Y. (2018). Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere, 202, 514-520.
- Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., ... & Ren, H. (2016). Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. Environmental

science & technology, 50(7), 4054-4060.

- Lusher, A. L., Mchugh, M., & Thompson, R. C. (2013). Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine pollution bulletin*, 67(1-2), 94-99.
- Ma, H., Pu, S., Liu, S., Bai, Y., Mandal, S., & Xing, B. (2020). Microplastics in aquatic environments: Toxicity to trigger ecological consequences. *Environmental Pollution*, 261, 114089.
- Macías-Mayorga, D., Laiz, I., Moreno-Garrido, I., & Blasco, J. (2015). Is oxidative stress related to cadmium accumulation in the Mollusc *Crassostrea angulata*?. *Aquatic Toxicology*, 161, 231-241.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Vinagre, C., & Diniz, M. S. (2013). Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 166(2), 237-243.
- Mashoof, S., & Criscitiello, M. F. (2016). Fish immunoglobulins. *Biology*, 5(4), 45.
- McRae, N. K., Gaw, S., & Glover, C. N. (2018). Effects of waterborne cadmium on metabolic rate, oxidative stress, and ion regulation in the freshwater fish, inanga (*Galaxias maculatus*). *Aquatic Toxicology*, 194, 1-9.
- Mirghaed, A. T., Ghelichpour, M., Hoseini, S. M., & Amini, K. (2017). Hemolysis interference in measuring fish plasma biochemical indicators. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43, 1143-1151.

- Naqash, N., Prakash, S., Kapoor, D., & Singh, R. (2020). Interaction of freshwater microplastics with biota and heavy metals: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(6), 1813–1824.
- Okocha, R. C., & Adedeji, O. B. (2011). Overview of cadmium toxicity in fish. *Journal of Applied Sciences Research*, 7(7), 1195–1207.
- Park, K., Han, E. J., Ahn, G., & Kwak, I. S. (2020). Effects of combined stressors to cadmium and high temperature on antioxidant defense, apoptotic cell death, and DNA methylation in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Science of the Total Environment*, 716, 137130.
- Rauta, P. R., Nayak, B., & Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunology letters*, 148(1), 23–33.
- Rochman, C. M., Hentschel, B. T., & Teh, S. J. (2014). Long-term sorption of metals is similar among plastic types: implications for plastic debris in aquatic environments. *PLOS one*, 9(1), e85433.
- Saurabh, S., & Sahoo, P. K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture research*, 39(3), 223–239.
- Segner, H., Wenger, M., Möller, A. M., Köllner, B., & Casanova-Nakayama, A. (2012). Immunotoxic effects of environmental toxicants in fish—how to assess them?. *Environmental science and pollution research*, 19, 2465–2476.
- Shahjahan, M., Taslima, K., Rahman, M. S., Al-Emran, M., Alam, S. I., & Faggio, C. (2022). Effects of heavy metals on fish

- physiology - a review. *Chemosphere*, 300, 134519.
- Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: an overview. *Indian journal of clinical biochemistry*, 29, 269–278.
- Shengchen, W., Jing, L., Yujie, Y., Yue, W., & Shiwen, X. (2021). Polystyrene microplastics-induced ROS overproduction disrupts the skeletal muscle regeneration by converting myoblasts into adipocytes. *Journal of hazardous materials*, 417, 125962.
- Shim, W.J., Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., 2016. Identification and quantification of microplastics using Nile red staining. *Mar. Pollut. Bull.* 113, 469 - 476.
- Sleight, V. A., Bakir, A., Thompson, R. C., & Henry, T. B. (2017). Assessment of microplastic-sorbed contaminant bioavailability through analysis of biomarker gene expression in larval zebrafish. *Marine pollution bulletin*, 116(1-2), 291–297.
- Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S., & Dmitriev, A. A. (2019). ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- Soud, G., Souayed, N., Yaktiti, F., & Maaroufi, K. (2013). Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 89, 1–7.
- Taslima, K., Al-Emran, M., Rahman, M. S., Hasan, J., Ferdous, Z., Rohani, M. F., & Shahjahan, M. (2022). Impacts of heavy metals on early development, growth and reproduction of fish - A review. *Toxicology Reports*, 9, 858–868.

- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Björn, A., ... & Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, 364(1526), 2027–2045.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57–149.
- Wang, N., Gao, C., Zhang, P., Guan, L., Wang, Y., Qin, Y., & Li, Y. (2019). Effect of *Bacillus cereus* against cadmium induced hematological disturbances and immunosuppression in *Carassius auratus gibelio*. *Fish & Shellfish Immunology*, 89, 141–148.
- Wang, W., Ge, J., & Yu, X. (2020). Bioavailability and toxicity of microplastics to fish species: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 189, 109913.
- Wang, W., Ge, J., & Yu, X. (2020). Bioavailability and toxicity of microplastics to fish species: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 189, 109913.
- Wei, W., Yang, Q., Xiang, D., Chen, X., Wen, Z., Wang, X., ... & Xu, J. (2023). Combined impacts of microplastics and cadmium on the liver function, immune response, and intestinal microbiota of crucian carp (*Carassius carassius*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 261, 115104.
- Wen, B., Jin, S. R., Chen, Z. Z., Gao, J. Z., Liu, Y. N., Liu, J. H., & Feng, X. S. (2018). Single and combined effects of microplastics and cadmium on the cadmium accumulation, antioxidant defence and innate immunity of the discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*).

- Environmental Pollution, 243, 462–471.
- Wicklund, A., Runn, P., & Norrgren, L. (1988). Cadmium and zinc interactions in fish: Effects of zinc on the uptake, organ distribution, and elimination of  $^{109}\text{Cd}$  in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 17, 345–354.
- Witeska, M., Kondera, E., Ługowska, K., & Bojarski, B. (2022). Hematological methods in fish - Not only for beginners. Aquaculture, 547, 737498.
- Wu, S. M., Shih, M. J., & Ho, Y. C. (2007). Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 145(2), 218–226.
- Xie, D., Li, Y., Liu, Z., & Chen, Q. (2019). Inhibitory effect of cadmium exposure on digestive activity, antioxidant capacity and immune defense in the intestine of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 222, 65–73.
- Yeşilbudak, B., & Erdem, C. (2014). Cadmium accumulation in gill, liver, kidney and muscle tissues of common carp, *Cyprinus carpio*, and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 92, 546–550.
- Yin, L., Chen, B., Xia, B., Shi, X., & Qu, K. (2018). Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacoever (*Sebastes schlegelii*). Journal of Hazardous Materials, 360, 97–105.

- Yin, L., Chen, B., Xia, B., Shi, X., & Qu, K. (2018). Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jack mackerel (*Sebastes schlegelii*). *Journal of Hazardous Materials*, 360, 97–105.
- Yu, J. N., Kim, S. K., Sagong, J., Ryu, S. H., & Chae, B. (2019). Identification of microsatellite markers and their application in yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco* Richardson, 1846) population genetics of Korea. *Journal of genetics*, 98(1), 2.
- Yu, Y. B., Choi, J. H., Choi, C. Y., Kang, J. C., & Kim, J. H. (2023). Toxic effects of microplastic (polyethylene) exposure: Bioaccumulation, hematological parameters and antioxidant responses in crucian carp, *Carassius carassius*. *Chemosphere*, 332, 138801.
- Zhang, Z., Zheng, Z., Cai, J., Liu, Q., Yang, J., Gong, Y., ... & Xu, S. (2017). Effect of cadmium on oxidative stress and immune function of common carp (*Cyprinus carpio* L.) by transcriptome analysis. *Aquatic Toxicology*, 192, 171–177.
- Zhao, Y., Bao, Z., Wan, Z., Fu, Z., & Jin, Y. (2020). Polystyrene microplastic exposure disturbs hepatic glycolipid metabolism at the physiological, biochemical, and transcriptomic levels in adult zebrafish. *Science of the Total Environment*, 710, 136279.
- Zhou, Y., Zhao, L., Xu, H., Xu, E. G., Li, M., & Wang, Y. (2022). Long-term exposure to polystyrene nanoplastics impairs the liver health of medaka. *Water*, 14(17), 2767.