

## 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 미세플라스틱 급성 노출에 따른 혈액성상 및 혈장성분의 변화

김소희, 김가현, 김지수, 김준환\*, 전유현<sup>1</sup>, 조재황<sup>1</sup>, 김석렬<sup>2</sup>, 김대희<sup>1</sup>

선문대학교 수산생명의학과, <sup>1</sup>국립수산과학원 서해수산연구소, <sup>2</sup>공주대학교 스마트수산자원학과

## Changes in hematological parameters and plasma components of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to acute microplastics

So-Hee Kim, Ga-Hyun Kim, Ji-Su Kim, Jun-Hwan Kim\*, Yu-Hyeon Jeon<sup>1</sup>, Jae-Hwang Cho<sup>1</sup>, Seok-Ryel Kim<sup>2</sup> and Dae-Hee Kim<sup>1</sup>

Sun Moon University, Department of Aquatic Life and Medical Science, Asan 31460, Republic of Korea

<sup>1</sup>West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Incheon 22383, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Smart Fisheries Resources, Kongju National University, Yesan 32439, Republic of Korea

### \*Corresponding author

Jun-Hwan Kim

Tel. 041-675-3773

E-mail. junhwan1982@korea.kr

Received: 6 August 2021

First Revised: 2 September 2021

Second Revised: 9 September 2021

Revision accepted: 10 September 2021

**Abstract:** Juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (mean weight  $66.7 \pm 7.1$  g; mean length  $19.2 \pm 0.9$  cm) in a bio-floc environment were exposed to microplastic (PE: polyethylene, size 40–48  $\mu\text{m}$ ) at 0, 4, 20, 100, 500 and 2,500  $\text{mg L}^{-1}$  for 96 hours. No *P. olivaceus* deaths were observed following microplastic exposure. In the plasma components, calcium was significantly decreased whereas there was no significant change with magnesium following microplastic exposure. Glucose was significantly decreased with over 100  $\text{mg L}^{-1}$  at 48 hours and 20  $\text{mg L}^{-1}$  at 96 hours. Cholesterol was significantly decreased with over 20  $\text{mg L}^{-1}$  after 48 hours, whereas there was no significant change in the total protein content. In enzymatic plasma components, the AST (Aspartate aminotransferase) was significantly decreased by microplastic exposure. The results of this study indicate that acute exposure to microplastic induces blood physiological changes in *P. olivaceus*.

**Keywords:** microplastics, *Paralichthys olivaceus*, acute exposure, hematological parameters, plasma components

## 서 론

플라스틱은 저비용, 탄력성, 내구성에서 큰 장점을 가진 인공 합성 소재로 다양한 산업에서 활용되고 있으며, 그 생산량은 약 3억톤이다 (Yu *et al.* 2020). 폐기된 플라스틱은 다양한 경로를 통해 수중 환경으로 유입되며, 자가 축

매 반응, 열 산화, 광분해 및 생물학적 분해 등의 과정을 통해 1~1000  $\mu\text{m}$  크기의 미세 플라스틱 조각으로 될 수 있다 (Karami *et al.* 2016). 미세 플라스틱은 넓은 표면적을 가지며, 독성을 유발하는 중금속 및 유기 오염 물질의 흡착을 통해 그것을 섭취한 수생 생물에게 영향을 미친다 (Yu *et al.* 2020). 폴리에틸렌 (polyethylene, PE)은 대표적인 열가소

성 플라스틱으로 전 세계 생산량의 38%이며, 분해 속도가 빠르기 때문에 수중 환경에서 검출되는 미세 플라스틱의 90%를 차지한다(Ter Halle *et al.* 2016).

수환경에서 고농도의 미세 플라스틱 노출은 생물에게 독성으로 작용할 수 있다. 수중 생물의 체내로 유입된 미세 플라스틱은 소화관 막힘, 천공, 궤양과 같은 1차적인 물리적 영향을 받는다. 어류의 아가미 호흡을 통해 유입된 미세 플라스틱은 아가미 막힘을 초래해 호흡장애 및 상피조직 손상에 따른 출혈을 유발한다. 플라스틱 첨가제로 사용되는 diethyl phthalate, bisphenol A와 같은 물질은 어류의 간 및 신장독성으로 작용한다(Montuori *et al.* 2008; Kang and Min 2010; Dreolin *et al.* 2019). 또한, 수중 미세 플라스틱은 입자표면에 polychlorinated biphenyls (PCBs)와 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)와 같은 다양한 물질들이 흡착되어 이를 섭취한 어류의 혈액성상 및 다양한 건강지표에 독성영향을 미친다(Corcoran *et al.* 2015; Pannetier *et al.* 2019). 어류에서 PE의 독성은 다양한 형태를 보이며, 신경장애(무기력 또는 과민행동), 생식 및 대사장애와 같은 다양한 생리적 교란을 유발한다(Mak *et al.* 2019). 미세플라스틱 독성은 수생물에게 산화스트레스에 따른 세포교란장애를 유발하고 면역체계를 저하시킨다(Banaee *et al.* 2020; Han *et al.* 2020).

미세플라스틱은 어류 혈액 독성으로 작용할 수 있으며, 조혈조각손상에 따른 용혈 및 적혈구 생성억제로 인해 Hematocrit와 Hemoglobin 수치의 감소를 유발할 수 있다(Hamed *et al.* 2019; Kim *et al.* 2021). 또한, bisphenol A과 같은 플라스틱 첨가제는 어류 적혈구수축을 유발하여 혈액학적 성상의 변화를 초래한다(Krishnapriya *et al.* 2017). 독성물질 노출은 어류에서 Hemoglobin 합성 저해, 적혈구 기형 및 파괴에 따른 용혈 및 빈혈로 이어져 Hemoglobin과 Hematocrit 수치를 감소시킨다. 구강 및 아가미를 통해 유입된 미세플라스틱은 혈액순환 과정에서 혈관과 적혈구에 물리적인 손상을 가하며(Su *et al.* 2019; Cho *et al.* 2020), 혈액단백질과 결합하여 화합물형성으로 인한 혈액순환 저하(Yong *et al.* 2020), 혈전 및 심장기능장애를 유발한다(Browne *et al.* 2008). 독성물질에 의한 빈혈 및 용혈작용은 혈액학적 성상의 변화를 야기하고 조직 내 산소공급의 저하로 인한 대사장애를 초래한다(Siddeswaran *et al.* 2020). 또한 순환계로 유입된 미세플라스틱은 혈액학적 성상에 영향을 미치고 이는 지질과산화 및 염증을 유발한다(Yu *et*

*al.* 2018).

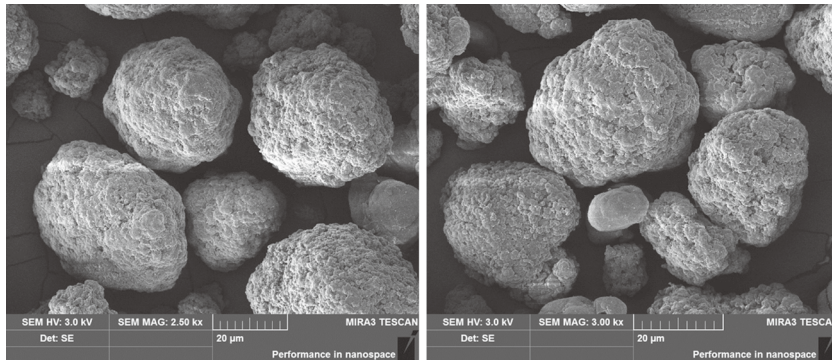
바이오플락 기술은 사육수를 교환하지 않거나 최소화하여 유입수로 인한 질병전파억제, 연안 배출수 오염저감 등의 장점을 가지는 친환경 양식기술이다(Crab *et al.* 2012). 또한, 바이오플락은 다양한 유용 미생물을 이용하여 암모니아, 아질산 등의 독성물질을 제거하고, 이 미생물 군이 양식 생물에게 재섭식됨으로써 선순환구조를 가진 효율적인 양식 시스템이다(Kim *et al.* 2018). 현재까지 바이오플락 기술은 갑각류 및 담수어 위주로 연구되어 왔으며, 해산어류의 적용은 초기 연구 단계에 있다. 따라서 안정적인 양식 생산을 위해서 다양한 독성에 대한 사육기준의 정립이 필요하다(Azim *et al.* 2008).

넙치는 국내 어류 양식 생산량에서 가장 높은 비중을 차지하는 어종이며, 빠른 성장과 내병성을 가진 해산어류이다(Jeon *et al.* 2013; Cho *et al.* 2019). 현재까지 넙치의 독성 노출에 따른 내성관계 연구는 많이 이루어졌으나, 연안환경에서 주 오염원으로 평가되는 미세플라스틱 노출과 친환경 양식 시스템인 바이오플락 사육에 대한 연구는 부족하다. 따라서 본 실험의 목적은 바이오플락 환경에서 미세플라스틱 노출이 실험어인 넙치의 혈액학적 성상 및 혈장 성분에 미치는 영향을 확인하는 데 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어 및 실험환경

본 실험에 이용된 넙치(평균 무게  $66.7 \pm 7.1$  g; 평균 전장  $19.2 \pm 0.9$  cm)는 충남태안의 종묘생산장에서 분양 받아 실험에 이용하였다. 실험 노출 전 2주간 순치 후, 150 L 원형 수조를 이용하여 노출을 실시하였다. 실험 기간 중 수질(수온, 용존산소, 염분, pH)은 휴대용 수질 분석기(YSI-Professional plus; YSI Inc., USA)를 이용하여 측정하였으며, 질산화물(암모니아, 아질산, 질산)은 분석용 키트(Merck & Co., Inc., USA)를 이용하여 측정하였다(Table 1). 노출은 미세플라스틱(polyethylene, PE 40~48  $\mu$ m, Sigma Chemical, St. Louis, MO)을 구매하여, 각 수조에 0, 4, 20, 100, 500, 2,500 mg L<sup>-1</sup>의 농도로 96시간 노출을 실시하였다. 미세플라스틱을 전자현미경으로 확인한 결과 실제 크기는 20~50  $\mu$ m 수준으로 나타났다(Fig. 1). 최고 농도인 2,500 mg L<sup>-1</sup>의 미세플라스틱 노출은 해양환경에 존재하는 농도보다 매



**Fig. 1.** Scanning Electron Microscope image of polyethylene (40–48 µm, Sigma Chemical, St. Louis, MO) (Magnification, ×3000; Scale bar = 20 µm).

**Table 1.** The chemical components of seawater and experimental condition

Item	Value
Temperature (°C)	21.6 ± 0.6
pH	8.13 ± 0.05
Salinity (‰)	32.2 ± 0.3
Dissolved Oxygen (mg L <sup>-1</sup> )	8.46 ± 0.34
Ammonia (mg L <sup>-1</sup> )	0.23 ± 0.03
Nitrite (mg L <sup>-1</sup> )	0.03 ± 0.01
Nitrate (mg L <sup>-1</sup> )	0.37 ± 0.08

우 높은 농도이며, 본 연구에서 산정한 농도는 예비노출실험을 바탕으로 넙치의 내성한계에 대한 지표 제시를 위한 농도설정이다. 실험노출은 150 L 원형수조 6개를 이용하여 실시하였으며, 각 농도별 수조에 10마리씩 입식(총 60마리) 후 노출 48시간 5마리씩 sampling을 실시했으며, 노출 96시간 5마리씩 sampling을 실시했다.

## 2. 혈액학적 성상

미세플라스틱 노출 48시간과 96시간 후, 혈액학적 분석을 위해 채혈을 실시하였다. 혈액은 헤파린 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 처리된 주사기를 이용해 채취 후, 즉시 적혈구용적(Hematocrit)과 헤모글로빈(Hemoglobin)을 측정하였다. Hematocrit는 모세관 내로 혈액을 넣어, Microhematocrit centrifuge (VS-12000; Korea)에서 12,000 rpm, 10분간 원심분리 후 Micro-hematocrit reader를 이용하여 측정하였다. Hemoglobin 수치는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd., Korea)를 이용하여 Cyan-methemoglobin 법으로 측정하였다(Kim *et al.* 2019).

## 3. 혈장성분 분석

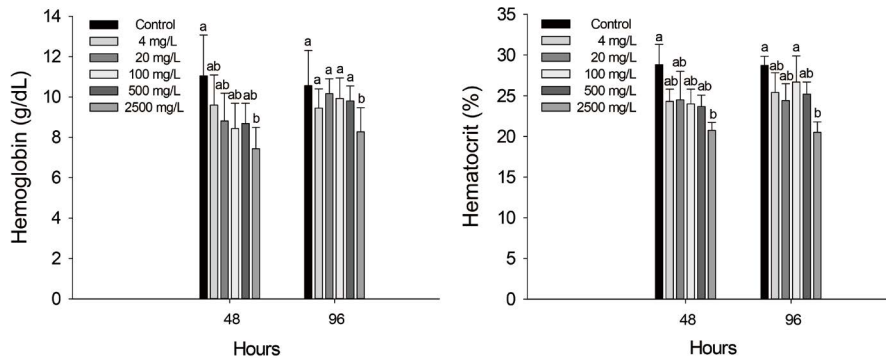
미세플라스틱 노출에 따른 혈장성분을 분석하기 위해 채취한 혈액을 4°C에서 3000×g로 15분간 원심분리 후 혈장을 분리하였다. 혈장 무기성분으로 칼슘(Calcium), 마그네슘(Magnesium)을 측정하였다. 칼슘은 OCPC 법, 마그네슘은 Xylidyl blue-I 법에 따라 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd., Korea)를 이용하여 측정하였다. 혈장 유기성분으로 혈당(Glucose), 콜레스테롤(Cholesterol) 및 총 단백질(Total protein)을 측정하였다. 혈당은 GOD/POD 법, 콜레스테롤은 비색법, 총 단백질은 Biuret 법에 의해 시판되고 있는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하였다. 혈장 효소활성으로 AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransaminase) 및 ALP (Alkaline phosphatase)를 측정하였다. AST와 ALT는 505 nm에서 Reitman-Frankel 법을 이용하여 분석하였다(Kim *et al.* 2020). 모든 분석은 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하여 측정하였다.

## 4. 통계분석 방법

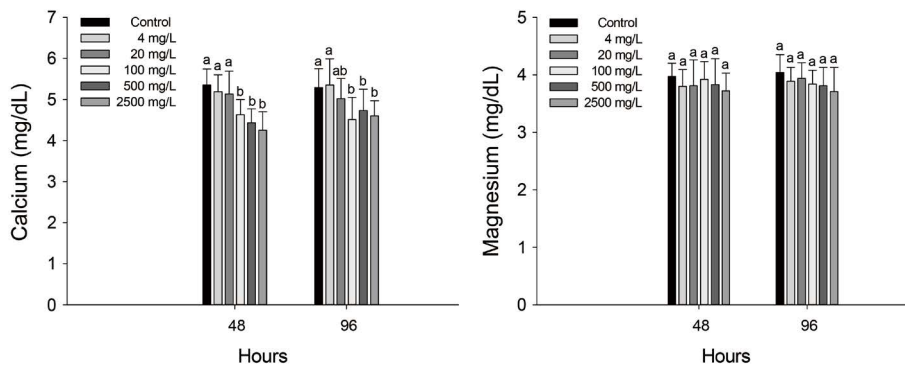
본 실험분석은 노출물질 농도에 따른 각 5마리를 분석에 이용하였다. 실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시하여 Tukey's multiple range test를 통해  $P < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 5. 윤리 승인 및 참여 동의

본 연구의 참가자들은 국립수산과학원에서 실시하는 동물보호, 동물복지 및 동물실험에 대한 교육을 받았습니다.



**Fig. 2.** Hematological parameters such as hemoglobin and hematocrit of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to microplastics for 96 hours. Values with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



**Fig. 3.** Inorganic plasma components such as calcium and magnesium of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* were exposed to microplastics for 96 hours. Values with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

본 연구에 사용된 모든 실험동물은 국립수산물품질관리원 기관 동물관리 및 사용위원회에서 승인한 프로토콜에 따라 관리되었습니다.

## 결 과

### 1. 혈액학적 성상

미세플라스틱 96시간 노출에 의한 넙치 혈액성상의 변화는 Fig. 2에 나타났다. 미세플라스틱 노출에 의한 넙치 hemoglobin 수치는 미세플라스틱 노출 48시간 및 96시간 2,500 mg L<sup>-1</sup>의 농도에서 유의적인 감소를 나타냈다 ( $P < 0.05$ ). 미세플라스틱 노출에 의한 넙치 hematocrit 수치는 미세플라스틱 노출 48시간 및 96시간 2,500 mg L<sup>-1</sup>의 농도에서 유의적인 감소를 나타냈다 ( $P < 0.05$ ).

### 2. 혈장성분

미세플라스틱 96시간 노출에 의한 넙치 혈장무기성분의 변화는 Fig. 3에 나타났다. 미세플라스틱 노출에 의한 넙치 혈장 calcium 수치는 미세플라스틱 노출 48시간 및 96시간 100 mg L<sup>-1</sup> 이상의 농도에서 유의적인 감소를 나타냈다 ( $P < 0.05$ ). 반면, 넙치 혈장 magnesium 수치는 미세플라스틱 노출에 의해 유의적 변화를 나타내지 않았다.

미세플라스틱 96시간 노출에 의한 넙치 혈장유기성분의 변화는 Fig. 4에 나타났다. 미세플라스틱 노출에 의한 넙치 혈장 glucose 수치는 미세플라스틱 노출 48시간 100 mg L<sup>-1</sup> 이상의 농도에서 유의적인 감소를 나타냈으며, 노출 96시간 20 mg L<sup>-1</sup> 이상의 농도에서 유의적인 감소를 나타냈다 ( $P < 0.05$ ). 미세플라스틱 노출에 의한 넙치 혈장 cholesterol 수치는 미세플라스틱 노출 48 및 96시간 20 mg L<sup>-1</sup> 이상의 농도에서 유의적인 감소를 나타냈다 ( $P < 0.05$ ). 미세플라스틱 노출에 의한 넙치 혈장 total protein 수치는

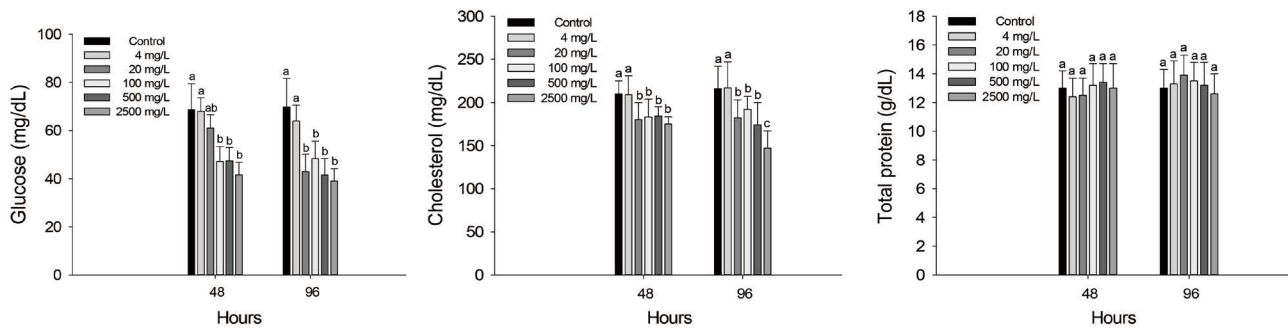


Fig. 4. Organic plasma components such as glucose, cholesterol, and total protein of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to microplastics for 96 hours. Values with different superscript were significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

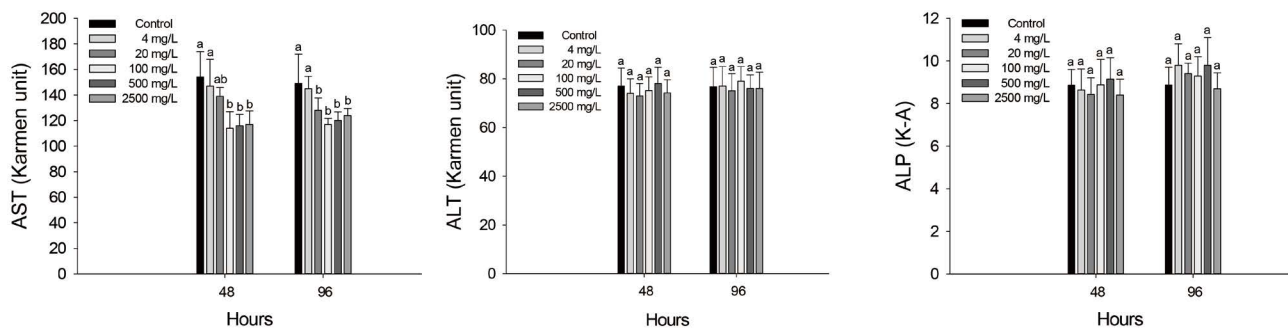


Fig. 5. Enzymatic plasma components such as AST, ALT, and ALP (AST: Aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase, ALP: Alkaline phosphatase) of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to microplastics for 96 hours. Values with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

유의적인 변화는 나타나지 않았다.

미세플라스틱 96시간 노출에 의한 넙치 혈장유기성분의 변화는 Fig. 5에 나타났다. 미세플라스틱 노출에 의한 넙치 혈장 AST 수치는 미세플라스틱 노출 48시간  $100 \text{ mg L}^{-1}$  이상의 농도에서 유의적인 감소를 나타냈으며, 노출 96시간  $20 \text{ mg L}^{-1}$  이상의 농도에서 유의적인 감소를 나타냈다 ( $P < 0.05$ ). 반면, 넙치 혈장 ALT 및 ALP 수치는 미세플라스틱 노출에 의한 유의적인 변화는 나타나지 않았다.

## 고찰

독성물질은 어류 순환계에 독성으로 작용하여 신생 적혈구 생성억제와 같은 조혈기능 장애를 초래할 수 있다 (Javed and Usmani 2015). 어류 혈액학적 성상은 미세플라스틱 노출에 의해 영향을 받으며, 적혈구의 수명감소 및 골수줄기세포 활동억제로 인한 빈혈을 유발한다(Burgos-

Aceves *et al.* 2019). Hemoglobin은 적혈구 내 산소를 운반하는 단백질로 환경 요인에 민감하게 반응하여 어류의 건강을 평가하는 데 사용된다. 수중 독성은 어류 hemoglobin 합성 및 혈액 삼투압의 변화를 초래하여 스트레스로 작용할 수 있으며, 늘어난 대사량에 따른 혈중산소를 보충하기 위한 혈액량 상승으로 일시적인 적혈구의 증가를 보일 수 있으나, 한계농도 이상의 독성노출이 지속되면 조혈기관 괴사로 인한 적혈구의 감소를 초래할 수 있다(Annune and Oladimeji 1994). Svoboda (2001)는 산화아연 (ZnO)에 의한 틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 hemoglobin 및 hematocrit의 감소를 보고했으며, 이는 부신 수질에서 epinephrine 방출로 인한 비장수축으로 판단된다(Kumar and Banerjee 2016). Hematocrit 수치는 급성빈혈 및 적혈구 생성 장애의 지표가 될 수 있으며, 독성노출로 인한 적혈구 용해 및 순환기계 장애를 평가하는 중요한 지표로 사용된다(Fazio *et al.* 2012; Kim *et al.* 2019, 2020, 2021). 본 실험에서 *P. olivaceus*의 hemoglobin 농도는 전반적으로 감소



하는 추세를 보였으나 통계적 유의성은 보이지 않았다. 하지만, hematocrit 수치는 미세플라스틱 노출에 의해 유의적 감소를 보였다. Hamed *et al.* (2019)는 미세플라스틱 노출이 *O. niloticus*의 조혈기능 저하에 따른 빈혈을 보고했으며, 이는 hematocrit 및 hemoglobin 농도의 감소를 나타낸다고 보고했다. Srivastava and Reddy (2020)에 따르면 BPA (Bisphenol A)의 노출이 stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*의 hematocrit 및 hemoglobin의 유의적 감소를 보고한 바 있다. 이는 독성노출에 의해 조혈기관에서 미성숙 적혈구를 생산하고 정상 적혈구의 감소로 인한 microcytic anemia로 판단된다. 또한, PVC (Polyvinyl Chloride)에 노출된 African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*에서 hemoglobin과 hematocrit 수치의 유의적 감소를 보였으며, 이는 PVC의 독성작용으로 조혈기관인 신장, 비장 손상 및 비정상적 적혈구 합성으로 인한 macrocytic anemia에 의한 것으로 판단된다(Iheanacho and Odo 2020a, b).

혈장 내 무기성분인 calcium과 magnesium은 삼투 및 이온 조절능력에 중요한 역할을 하는 성분이다(Kim and Kang 2017). 아가미를 통해 어류 체내로 들어온 미세플라스틱은 chloride cell에 독성으로 작용하여 삼투조절장애를 야기할 수 있다(Roda *et al.* 2020). Calcium은 아가미 막에 존재하는  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger과 세포막의  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase에서 이온 수송에 관여하여 효소 활성을 촉진한다(Flik and Verboost 1993). Magnesium은 효소 활성화 및 기질에 영향을 미치는 무기성분으로, 에너지대사와 단백질 합성을 제어한다. 또한, 체내 이온수송에 관여하는 Na-K-Cl cotransporter 및  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase의 보조인자로 사용된다(Bijvelds *et al.* 1998). 미세플라스틱(MP)의 노출은 연못 거북, *Emys orbicularis* 혈장 calcium의 유의적 증가를 나타냈으며, 이는 부갑상선 활성화와 기능 항진증으로 인한 호르몬 수치 증가에 의한 것으로 판단된다(Banaee *et al.* 2020). 반대로, 미세플라스틱(MP)의 노출은 연못 거북, *E. orbicularis* 혈장 magnesium의 유의적 감소를 나타냈으며, 이는 미세플라스틱 축적에 의한 장애로 판단된다(Banaee *et al.* 2020). 또한, Lei *et al.* (2018)은 미세플라스틱(PE)에 노출된 제브라피쉬, *Danio reio* 혈장 calcium 농도 변화를 보고하였다. Kang and Min (2010)은 PCP (pentachlorophenol)에 노출된 *P. olivaceus* 혈장 calcium 농도의 감소를 보고했으며, 이러한 감소는 신장 세뇨관의 흡수기능장애 및 아가미 상피세포의 막투과성 변화에 의한 것이라고 보고했다. 납 노출은 조피볼락, *Sebastes schlegelii* 혈장 calcium과

magnesium은 유의적 감소를 유발하였으며, 이는 납 유발 독성에 의한 이온 조절 손상을 초래했음을 의미한다(Kim and Kang 2017). 수은에 노출된 금붕어, *Carassius auratus*는 prolactin 분비 장애로 인해 calcium 항상성 붕괴로 혈장 calcium의 증가를 보였다고 보고하였다(Suzuki *et al.* 2003, 2004). Suvetha *et al.* (2010) 역시 독성 물질에 노출된 winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*의 혈장 calcium과 magnesium 농도의 증가를 보고했으며, 이러한 증가는 삼투조절장애로 인한 것으로 판단된다. 카드뮴의 수중 노출은 *O. mossambicus* 혈장 calcium의 유의적 감소를 유발했으며, 이는 아가미 상피세포 투과성 증가로 인한 이온유출로 인한 것으로 판단된다(Pratap *et al.* 1989). 본 실험에서 미세플라스틱에 노출된 *P. olivaceus*의 혈장 calcium은 유의적 감소를 나타냈으며, 이는 미세플라스틱 노출이 어류의 이온조절에 교란을 미칠 수 있음을 의미한다. 하지만, 미세플라스틱에 노출된 *P. olivaceus*의 혈장 magnesium의 유의적 변화는 관찰되지 않아, 이온교란에 대한 영향은 항목에 따라 제한적으로 나타나는 것으로 보여진다.

어류 혈장 glucose 농도는 독성노출에 의해 변화할 수 있으며, 스트레스를 평가하는 중요한 지표로 사용된다. 혈중 glucose의 증가는 순환계 내에서 catecholamine이나 corticosteroid 농도의 증가로 인해 야기될 수 있다(Pottinger and Carrick 1999). 이와 같은 증가는 독성을 해독하기 위한 대사에너지 확보를 위해 간 조직의 글리코겐이 분해에 의한 것으로 판단된다(Hamed *et al.* 2019). 본 실험에서 미세플라스틱에 노출된 *P. olivaceus*의 혈중 glucose는 유의적 감소를 보였으며, 이는 과도한 미세플라스틱 독성에 의한 항상성 붕괴 및 탄수화물의 과도한 소진에 의한 것으로 판단된다. Hamed *et al.* (2019)는 미세플라스틱 노출 농도가 증가함에 따라 *O. niloticus* 혈장 glucose의 점진적인 감소를 보고했다. Chen *et al.* (2020)에 따르면 미세플라스틱에 노출된 *D. rerio*의 혈장 glucose 농도는 감소되었으며, 이는 스트레스로 인한 과잉행동으로 대사에너지 급증에 따른 것으로 판단된다. 혈중 cholesterol은 세포막과 혈장 내 지단백질, 스테로이드 호르몬의 주요성분이며, 미세플라스틱의 노출은 혈액순환계를 통해 지단백 생합성 및 대사장애로 인한 콜레스테롤 수치의 변화를 초래할 수 있다(Karami *et al.* 2016). 또한, 혈중 cholesterol은 스트레스로 인해 증가한 대사에너지를 충족하기 위해 일시적으로 상승할 수 있으며, 금속에 노출된 largemouth blackbass, *Micropterus salmoides*에서 혈중 cholesterol의 증가 경향

을 보였다(Banaee *et al.* 2019). 반면, 미세플라스틱에 노출된 *C. gariepinus*에서는 혈중 cholesterol 및 지단백질 수치의 유의적 감소를 보였다. 이러한 감소 경향은 영양 결핍과 혈관 내 생합성 장애로 인한 것으로 판단된다(Hamed *et al.* 2019). 하지만, 본 실험에서 미세플라스틱에 노출된 *P. olivaceus*의 혈중 cholesterol은 유의적으로 감소하는 경향을 나타냈으며, 이는 미세플라스틱 노출에 따른 콜레스테롤 합성의 저하에 따른 것으로 판단된다. 혈장 단백질은 어류 체내 항상성유지 및 체액 누출을 방지하며, 혈중 철 구리와 같은 금속 이온 대사에 관여하는 주요 유기화합물인 transferrin과 ceruloplasmin과 같은 대표적인 대사단백질이다(Firat and Kargin 2010). 미세플라스틱(MP)에 노출된 잉어, *Cyprinus carpio*는 혈중 total protein를 비롯한 단백질의 감소를 나타냈으며, 이는 독성영향에 따른 단백질 합성 감소 및 급격히 늘어난 대사에너지 소모로 인한 것으로 판단된다(Haghi and Banaee 2017). 또한, Haghi and Banaee (2017)에 따르면 *H. fossilis*를 미세플라스틱에 노출시켰을 때 간독성으로 작용하여 단백질 합성을 억제하고 총 단백질의 변화로 나타났다. 하지만, 본 실험에서 미세플라스틱에 노출된 *P. olivaceus*의 혈중 total protein은 유의적 변화를 나타내지 않았으며, 이는 미세플라스틱 노출이 본 연구에서 단백질 합성에 대한 영향은 제한적임을 의미한다.

어류의 효소는 독성물질에 의한 세포손상을 판단할 수 있는 지표이며, 미세플라스틱 노출은 어류 순환계를 통해 장기로 축적되고 세포막손상에 따른 효소의 변화로 나타났다(Hamed *et al.* 2019). AST (Aspartate aminotransferase) 및 ALT (Alanine aminotransferase)는 amino acids의 이화작용에 직접적인 영향을 미치고, amino acids와 keto acids 간의 상호교환의 촉매로 사용되는 간 효소이며, 수생동물의 단백질 및 탄수화물 생리대사를 확인할 수 있는 주요한 지표이다(Ramaswamy *et al.* 1999). 미세플라스틱에 노출된 참게, *Eriocheir sinensis*는 미세플라스틱 농도 증가에 따른 AST의 유의적 상승 후 하락을 보였다. 이와 같은 저농도에서 상승경향은 미세플라스틱 독성으로 인한 간 세포막 손상에 따른 oxaloacetate의 활성 촉진으로 인한 것으로 판단된다(Kim *et al.* 2021). 반면 고농도에서는 오히려 유의적 하락을 보였는데 이는 독성증가에 따른 세포투과성 상승으로 AST가 아가미로 배출되어 감소한 것으로 판단된다(Yu *et al.* 2018). 미세플라스틱 노출 시 *O. niloticus*의 AST의 유의적 증가를 보였으며, 미세플라스틱 독성에 의한 독

성스트레스에 따른 대사에너지 확보를 위해 amino acid 회전을 증가에 따른 일시적 증가로 판단된다(Hamed *et al.* 2019). 본 실험에서 *P. olivaceus*의 AST는 유의적인 감소를 나타냈으며, 이와 같은 감소는 독성물질 노출에 의한 교란으로 판단된다. Baby and Raj (2011) 역시 독성 스트레스 하에서의 비정상적 교환작용으로 인한 대사에너지 결핍이 감소로 나타났다고 주장했다. 반면, 미세플라스틱 노출에 따른 혈장 ALT의 유의적 변화는 나타나지 않았다. 이는 미세플라스틱 노출에 따른 독성이 지표에 의해 제한적으로 나타날 수 있음을 의미한다.

ALP (Alkaline phosphatase)는 glycosyl phosphatidylinositol을 통해 외부지질층과 세포막을 고정시킨다. 또한 탈인산화를 통해 염증반응을 억제하고, 인산염 및 칼슘 흡수를 도와 골격형성에 주요한 역할을 하는 효소이며 수생물에서는 간과 세포막의 정상기능여부를 판단하는데 쓰이는 생체지표 중 하나이다(Villanueva *et al.* 1997; Haghi and Banaee 2017). 독성 남세균, *Microcystis aeruginosa*에 노출된 *O. niloticus*의 ALP는 유의적 증가를 보였으며, 독성스트레스에 의한 세포막 삼투압의 변화로 인한 것으로 판단된다(Molina *et al.* 2005). 미세플라스틱에 노출된 blue discus, *Symphysodon aequifasciatus*는 ALP의 유의적인 상승을 보였으며, 이는 독성에 의한 세포막 손상에 의해 가수분해효소인 ALP가 세포막 밖으로 유출된 것으로 보인다(Wen *et al.* 2018). 미세플라스틱 노출은 *C. carpio*의 ALP의 유의적 증가를 나타냈으며, 이는 구강 및 장 점막을 통해 침투한 미세플라스틱이 담관, 신장관, 장 점막, 간 세포막에 손상을 유발하고 간 조직 괴사에 의한 ALP 상승으로 판단된다(Haghi and Banaee 2017). 본 실험에서 미세플라스틱에 노출된 넙치의 ALP는 유의적 변화를 보이지 않았으나, 증가 후 감소 경향을 보였으며, 이는 세포 손상에 따른 염증반응과 이를 해독하기 위한 탈인산화 작용으로 일시적인 ALP 상승으로 나타났으나 독성영향의 증가로 인한 세포해독작용의 교란과 체내 면역시스템의 붕괴로 인해 효소활성 감소에 인한 것으로 판단된다(Lallès 2019).

## 적 요

본 실험에서 미세플라스틱의 노출은 넙치의 혈액학적 성장인 hemoglobin 및 hematocrit 수치의 유의적인 감소를

유발하였다. 또한 미세플라스틱의 노출은 넙치 혈장 무기 성분인 calcium, 유기성분인 glucose 및 cholesterol, 효소성분인 AST의 유의적인 변화를 나타냈다. 본 연구에서 바이오플락 환경에서 미세플라스틱의 노출이 어류의 혈액생리에 영향을 주며 독성으로 작용하는 것을 확인할 수 있었다. 향후, 일반 해수와 바이오플락 환경으로 각각 양성한 넙치를 이용하여 사육환경의 변화에 의한 미세플라스틱 노출 영향의 차이에 대해서도 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다. 본 연구는 다양한 어종에서 종별 미세플라스틱의 농도 연구에서 미세플라스틱 노출에 따른 종별 독성영향 비교평가를 위한 기본 자료로 활용될 수 있을 것이다. 하지만, 바이오플락 환경에서 미세플라스틱의 응집은 미세플라스틱의 독성에 영향을 미치는 중요한 요소이기 때문에 (Choi *et al.* 2020), 향후 연구에서 철저한 모니터링과 함께 다양한 미세플라스틱 독성에 미치는 요소에 대한 추가연구가 필요할 것이다.

## 사 사

이 논문은 2021년 국립수산물과학원 ‘바이오플락을 이용한 해수양식 기술개발 (대하, 넙치) (R2021014)’의 지원으로 수행된 연구입니다.

## REFERENCES

- Annune PA and AA Oladimeji. 1994. Acute toxicity of cadmium to juveniles of *Clarias gariepinus* (Teugels) and *Oreochromis niloticus* (Trewavas). J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng. 29:1357–1365.
- Azim ME and DC Littl. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 283:29–35.
- Baby J and SJ Raj. 2011. Effect of curacron toxicity on aminotransferases (ALT and AST) in the serum of the fish *Cyprinus carpio*. Int. J. Biol. Chem. 5:207–211.
- Banaee M, A Gholamhosseini, A Suredda, S Soltanian, MS Fereidouni and ATA Ibrahim. 2020. Effects of microplastic exposure on the blood biochemical parameters in the pond turtle (*Emys orbicularis*). Environ. Sci. Pollut. Res. 28:9221–9234.
- Banaee M, S Soltanian, A Suredda, A Gholamhosseini, BN Haghi, M Akhlaghi and A Derikvandy. 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.
- Bijvelds MJ, JA Velden, ZI Kolar and G Flik. 1998. Magnesium transport in freshwater teleosts. J. Exp. Biol. 201:1981–1990.
- Browne MA, A Dissanayake, TS Galloway, DM Lowe and RC Thompson. 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). Environ. Sci. Technol. 42:5026–5031.
- Burgos-Aceves MA, L Lionetti and C Faggio. 2019. Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced response in fish. Sci. Total Environ. 670:1170–1183.
- Chen Q, C Lackmann, W Wang, TB Seiler, H Hollert and H Shi. 2020. Microplastics lead to hyperactive swimming behaviour in adult zebrafish. Aquat. Toxicol. 224:105521.
- Cho JH, SR Kim, YB Hur, KM Lee and JH Kim. 2020. Tolerance limit of nitrite exposure to hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂): hematological parameters and plasma components. Korean J. Environ. Biol. 38:93–100.
- Cho YR, HS Kim, SK Kim, SK Kim, SR Kim, YB Hur and JH Kim. 2019. Bio-floc technology application in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* aquaculture according to the difference of closed recirculating systems. Korean J. Environ. Biol. 37:129–135.
- Choi B, J Kim and S Choi. 2020. A mini-review on microplastics in drinking water treatment processes. J. Korean Soc. Water Wastewater 34:357–371.
- Corcoran PL, T Norri, T Ceccanese, MJ Walzak, PA Helm and CH Marvin. 2015. Hidden plastics of Lake Ontario, Canada and their potential preservation in the sediment record. Environ. Pollut. 204:17–25.
- Crab R, T Defoirdt, P Bossier and W Verstraete. 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. Aquaculture 356:351–356.
- Dreolin N, M Aznar, S Moret and C Nerin. 2019. Development and validation of a LC-MS/MS method for the analysis of bisphenol a in polyethylene terephthalate. Food Chem. 274:246–253.
- Fazio F, F Filicetto, S Marafioti, V Di Stefano, A Assenza, F Placenti and S Mazzola. 2012. Automatic analysis to assess hematological parameters in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). Mar. Freshw. Behav. Physiol. 45:63–73.
- Flik G and PM Verbost. 1993. Calcium transport in fish gills and intestine. J. Exp. Biol. 184:17–29.
- Firat Ö and F Kargin. 2010. Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*.



- mis niloticus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58:151–157.
- Haghi BN and M Banaee. 2017. Effects of micro-plastic particles on paraquat toxicity to common carp (*Cyprinus carpio*): biochemical changes. Int. J. Environ. Sci. Technol. 14:521–530.
- Hamed M, HA Soliman, AG Osman and AEDH Sayed. 2019. Assessment the effect of exposure to microplastics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juvenile: I. blood biomarkers. Chemosphere 228:345–350.
- Han SK. 2020. The concept of microplastics and their occurrence, transport, biological effects, and management methods in the ocean. J. Environ. Health Sci. 5:610–626.
- Iheanacho SC and GE Odo. 2020a. Dietary exposure to polyvinyl chloride microparticles induced oxidative stress and hepatic damage in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Environ. Sci. Pollut. Res. 27:1–15.
- Iheanacho SC and GE Odo. 2020b. Neurotoxicity, oxidative stress biomarkers and haematological responses in African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to polyvinyl chloride microparticles. Comp. Biochem. Physiol. Part C-Toxicol. Pharmacol. 232:108741.
- Javed M and N Usmani. 2015. Impact of heavy metal toxicity on hematology and glycogen status of fish: a review. Proc. Natl. Acad. Sci., India Sect. B 85:889–900.
- Jeon GH, SH Cho, HS Kim, SH Myung, HJ Kim, WG Jung and KJ Lee. 2013. Effects of the inclusion of Kimchi lactic acid bacterial culture in extruded pellets on the growth, body composition and immune response of Juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 46:552–558.
- Kang JC and EY Min. 2010. Changes of hematological parameters in olive flounder *Paralichthys olivaceus* exposed to pentachlorophenol. J. Fish Pathol. 23:189–198.
- Karami A, N Romano, T Galloway and H Hamzah. 2016. Virgin microplastics cause toxicity and modulate the impacts of phenanthrene on biomarker responses in African catfish (*Clarias gariepinus*). Environ. Res. 151:58–70.
- Kim JH and JC Kang. 2017. Toxic effects on bioaccumulation and hematological parameters of juvenile rockfish *Sebastes schlegelii* exposed to dietary lead (Pb) and ascorbic acid. Chemosphere 176:131–140.
- Kim JH, SK Kim and JH Kim. 2018. Bio-floc technology application in flatfish *Paralichthys olivaceus* culture: Effects on water quality, growth, hematological parameters, and immune responses. Aquaculture 495:703–709.
- Kim JH, EH Jeong, SR Kim and SK Kim. 2019. Changes in water quality and hematological parameters according to the stocking density of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* raised in bio-floc environment. Korean J. Environ. Biol. 37:155–163.
- Kim JH, YB Yu and JH Choi. 2021. Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics: A review. J. Hazard. Mater. 413:125423.
- Kim KM, HJ Lee, HB Yun, JH Cho and SR Kim. 2020. Changes of hematological parameters and plasma components in the hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) by acute ammonia exposure. Korean J. Environ. Biol. 38:40–46.
- Krishnapriya K, G Shobana, S Narmadha, M Ramesh and V Maruthappan. 2017. Sublethal concentration of bisphenol A induces hematological and biochemical responses in an Indian major carp *Labeo rohita*. Ecohydrol. Hydrobiol. 17:306–313.
- Kumar R and TK Banerjee. 2016. Arsenic induced hematological and biochemical responses in nutritionally important catfish *Clarias batrachus* (L.). Toxicol. Rep. 3:148–152.
- Lallès JP. 2019. Biology, environmental and nutritional modulation of skin mucus alkaline phosphatase in fish: A review. Fish Shellfish Immunol. 89:179–186.
- Lei L, S Wu, S Lu, M Liu, Y Song, Z Fu and D He. 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. Sci. Total Environ. 619:1–8.
- Mak CW, KCF Yeung and KM Chan. 2019. Acute toxic effects of polyethylene microplastic on adult zebrafish. Ecotox. Environ. Safe. 182:109442.
- Molina R, I Moreno, S Pichardo, A Jos, R Moyano, JG Monterde and A Cameán. 2005. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. Toxicon 46:725–735.
- Montuori P, E Jover, M Morgantini, JM Bayona and M Triassi. 2008. Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene terephthalate and glass bottles. Food Addit. Contam. 25:511–518.
- Pannetier P, B Morin, C Clérandeau, J Laurent, C Chapelle and J Cachot. 2019. Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental microplastics collected on beaches: Part II-adverse effects on Japanese medaka early life stages. Environ. Pollut. 248:1098–1107.
- Pottinger TG and TR Carrick. 1999. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. Aquaculture 175:351–363.
- Pratap HB, H Fu, RAC Lock and SW Bonga. 1989. Effect of waterborne and dietary cadmium on plasma ions of the teleost *Oreochromis mossambicus* in relation to water calcium lev-

- els. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 18:568–575.
- Ramaswamy M, P Thangavel and N Panneer Selvam. 1999. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) enzyme activities in different tissues of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) exposed to a carbamate pesticide, carbaryl. Pestic. Sci. 55:1217–1221.
- Roda JFB, MM Lauer, WE Risso and CB dos Reis Martinez. 2020. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction? Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol. 242:110659.
- Siddeswaran S, S Umamaheswari and M Ramesh. 2020. Toxicity assessment of acetylsalicylic acid to a freshwater fish *Cyprinus carpio*: haematological, biochemical, enzymological and antioxidant responses. pp. 191–215. In: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Water: Emerging Contaminants and Ecological Impact. Springer. Berlin.
- Srivastava B and PB Reddy. 2020. Haematological and Serum Biomarker Responses in *Heteropneustes fossilis* Exposed to Bisphenol A. Nat. Environ. Pollut. Technol. 19:1577–1584.
- Su L, H Deng, B Li, Q Chen, V Pettigrove, C Wu and H Shi. 2019. The occurrence of microplastic in specific organs in commercially caught fishes from coast and estuary area of east China. J. Hazard. Mater. 365:716–724.
- Suvetha L, M Ramesh and M Saravanan. 2010. Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 29:44–49.
- Suzuki N, A Kambegawa and A Hattori. 2003. Bisphenol A influences the plasma calcium level and inhibits calcitonin secretion in goldfish. Zool. Sci. 20:745–748.
- Suzuki N, M Yamamoto, K Watanabe, A Kambegawa and A Hattori. 2004. Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from the suppression of scale bone cells: the scale is a good model for the evaluation of heavy metals in bone metabolism. J. Bone Miner. Metab. 22:439–446.
- Svoboda M. 2001. Stress in fishes. A review. Bull. VURH Vodnany (Czech Republic) 37:169–191.
- Ter Halle A, L Ladirat, M Martignac, AF Mingotaud, O Boyron and E Perez. 2017. To what extent are microplastics from the open ocean weathered? Environ. Pollut. 227:167–174.
- Villanueva J, R Vanacore, O Goicoechea and R Amthauer. 1997. Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*: regional distribution and membrane association. J. Exp. Zool. 279:347–355.
- Wen B, SR Jin, ZZ Chen, JZ Gao, YN Liu, JH Liu and XS Feng. 2018. Single and combined effects of microplastics and cadmium on the cadmium accumulation, antioxidant defence and innate immunity of the discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*). Environ. Pollut. 243:462–471.
- Yong CQY, S Valiyaveetil and BL Tang. 2020. Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. Int. J. Environ. Health Res. 17:1509.
- Yu P, Z Liu, D Wu, M Chen, W Lv and Y Zhao. 2018. Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver. Aquat. Toxicol. 200:28–36.