

신규방오도료물질(Diuron, Irgarol)이 말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 배아발생과 지연에 미치는 독성영향

최 훈^{1,2}, 박윤호¹, 이주욱¹, 권기영¹, 황운기^{1,*}

¹국립수산과학원 서해수산연구소 해양생태위해평가센터, ²국립인천대학교 생명과학과

Toxic effects of new anti-fouling agents (diuron and irgarol) on the embryogenesis and developmental delay of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*

Hoon Choi^{1,2}, Yun-Ho Park¹, Ju-Wook Lee¹, Ki-Young Kwon¹ and Un-Ki Hwang^{1,*}

¹Marine Ecological Risk Assessment Center, West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science (NIFS), Incheon 22383, Republic of Korea

²Department of Life Science, Incheon National University, Incheon 22012, Republic of Korea

***Corresponding author**

Un-Ki Hwang

Tel. 032-745-0680

E-mail. vngi1@korea.kr

Received: 13 October 2020

Revised: 17 October 2020

Revision accepted: 21 October 2020

Abstract: The aim of this study was to define the toxic effects of diuron and irgarol, which are new-antifouling agents, on the fertilization rate and normal embryogenesis rate in the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. In addition, the study was intended to confirm the hindrance of development in sea urchins. The fertilization rate of *H. pulcherrimus* was not decreased by the tested concentrations. However, the normal embryogenesis rate was decreased in a concentration-dependent manner. The 50% effective concentrations (EC₅₀) of normal embryogenesis rate were 7.12 mg L⁻¹ and 2.31 mg L⁻¹, respectively. As the embryos developed into pluteus larvae, after 18 h of exposure to diuron and irgarol at EC₅₀, development of the early gastrula stage was delayed, and significant developmental delays were observed after 24 h. After this, continuous developmental delays were observed in the process leading to the early gastrular, gastrular, early pluteus, and pluteus stages. Therefore, the toxic effects of diuron and irgarol on sea urchins were attributed to the delay in the developmental processes in the early life stages. Diuron and irgarol are highly persistent in the environment and have known-well toxic effects on various marine organisms including invertebrates, as shown in this study. Therefore, it is urgent to establish an environmental protection strategy to prevent the pollution of and preserve the marine environment.

Keywords: diuron, irgarol, *Hemicentrotus pulcherrimus*, acute toxicities, development hindrance

서 론

다양한 생물로 인하여, 선박이나 양식 시설물을 포함한 해양구조물에 생기는 경제적 손실을 막기 위하여 사용되던 트리부틸주석이나 트리페닐주석과 같은 유기주석 화합물(Tributyltin; TBT)은, 1960년대 이후 급격한 사용으로 해양생물에게 다양한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Kim and Park 2001; Dubey and Roy 2003; Cho 2011; Dafforn *et al.* 2011; Han 2012). 국제해사기구(IMO; International Maritime Organization)에서는 2003년부터는 사용금지, 2008년에는 선체 잔존금지 등의 사용 규제에 의해 유럽을 중심으로 Copper (I) salt, Copper oxide (Cu_2O)와 Thiocyanate (CuCHNS), Zinc pyrithione (ZnPT)와 같은 유기금속 방오도로 물질들이 개발되어 사용되어 왔으나, 생물위해성이 지적되면서(Karlsson *et al.* 2010; OSPAR 2010; Ytreberg *et al.* 2010; Cima and Ballarin 2012), 현재는 Diuron, Irgarol, Chlorothalonil, Dichlofluanid, Sea-nine 211과 같은 비금속 유기방오도로 물질들이 개발되어 사용되고 있다(Voulvoulis *et al.* 2000; Cresswell *et al.* 2006; Yamada 2007; Chapman *et al.* 2014; Amara *et al.* 2018).

신방오도로물질 중 Diuron과 Irgarol은 북서 유럽과 지중해 연안에서 가장 높은 농도로 분포하는 물질이며(Price and Readman 2013), 국내의 경우도 Diuron과 Irgarol은 선박 이동량이 많은 연안 지역에서 가장 높은 농도(Diuron: $35 \sim 1,360 \text{ ng L}^{-1}$, Irgarol: 14 ng L^{-1})로 검출되고 있다(Kim *et al.* 2014; Kim *et al.* 2015). Diuron과 Iragrol은 식물 광합성계의 Photosystem II의 Q_B 가 담당하는 플라스토퀴논의 결합부위와 경쟁함으로써 광합성 과정 내 전자전달을 차단하여, 식물성 플랑크톤을 포함한 일차 생산자에게 유해한 것으로 알려져 있다(Jones *et al.* 2003; Maccinnis-NG *et al.* 2003; Lambert *et al.* 2006; Bao *et al.* 2011). 이외에도 다수의 연구결과가 US-EPA에 보고되어 있으나, 연안 정착성 생물에 대한 영향을 파악한 연구는 매우 부족한 실정이다.

말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*)는 한국, 중국 및 일본 등과 같은 동북아 지역의 조간대 암반에서 주로 서식하는 생물(Agatsuma 2001; Hwang *et al.* 2014)로, 생식소를 식용으로 이용하고 있어 수산학적으로도 매우 중요할 뿐만 아니라, 생식세포의 획득과 인공수정을 통한 배아획득이 쉬우며, 독성에 대한 민감성이 뛰어나 해양환경공정 시험 기준의 해양생물 공정시험법으로 등록된 유용 수산생물이다(Hwang *et al.* 2020).

본 연구에서는 해양생태계 내 1차 소비자를 대표하는 *H. pulcherrimus*를 이용하여 비금속 유기 방오도로 물질인 Diuron과 Irgarol의 독성영향을 평가하고자 하였으며, 이 결과를 바탕으로 무영향농도(NOEC; Non-effective concentration), 최소영향농도(LOEC; Low-effective concentration), 반수영향농도(EC_{50} ; 50% effective concentration) 및 10% 영향농도(EC_{10} ; 10% effective concentration) 등을 산출하여, 이 물질들의 해양환경 기준농도 설정을 위한 자료로 활용하고, 더불어 이 물질들이 초기배아 발생 단계별로 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험생물 및 생식세포 획득

말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*)는 2020년 2월 전라북도 부안군 격포리 연안($35^{\circ}38'04''\text{N}$, $126^{\circ}27'41''\text{E}$) 암반지대에서, 직경 3.5 cm 이상으로 충분히 성장한 개체를 선별하여 채집하였다. 채집된 *H. pulcherrimus*는 아이스박스 내에서 저온상태로 실험실로 이송되어, 1 t 규모의 유수식 수조에서 $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 순치한 뒤, 시험에 사용하기 전 개체의 표면을 해수로 깨끗이 세척하여 사용되었다.

생식세포는 체강 내에 0.5 M KCl 용액 1 mL를 주사하여 방란·방정을 유도하였으며, 필터해수가 담긴 비커에 *H. pulcherrimus*의 생식공을 노출시켜 생식세포의 자연배출을 유도하여 포집하였다. 포집된 생식세포는 멸균된 1회용 스포이드를 사용하여 이물질을 제거한 뒤, 3회 이상 충분히 세정한 후에 시험에 사용하였다. 모든 시험 간 사용된 해수는 자연해수를 membrane filter (pore size $0.45 \mu\text{m}$)로 여과하여 사용하였다.

2. 시험용액 조성

시험에 사용된 신방오도로 Diuron ($\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{S}$, Cas No. 28159-98-0)과 Irgarol ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$, Cas No. 28159-98-0)은 DMSO (Dimethylsulfoxide, Sigma-aldrich, USA)를 carrier solvent로 사용하여 고농도($10,000 \text{ mg L}^{-1}$)의 stock solution을 제작한 뒤, 여과해수로 희석하여 사용하였다. 이때 시험생물에게 노출되는 DMSO의 농도는 DMSO의 최종 농도는 NOEC 값인 0.1% 이하로 노출되도록 조성하였다(Manzo *et al.* 2006). 시험농도 범위는 예비실험을 통하여

0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 mg L⁻¹으로 설정되었으며, 모든 시험간 대조구는 0.45 μm membrane filter로 여과된 자연해수를 사용하였다.

3. 수정률, 정상 배아발생률 시험 및 초기발달과정 확인

수정률 시험의 경우, 6 well plate에 시험용액을 농도별로 10 mL씩 3반복으로 분주한 뒤, 시험용액당 1 μL의 정자를 분주하여 Diuron과 Irgarol에 30 min 동안 노출시켰다. 정자가 시험물질에 30 min간 노출된 이후, well당 100~150개의 난자를 넣고, 10 min 뒤 수정막의 형성 유무로 수정률을 판단하였다.

정상 배아발생률의 경우, 방란·방정을 유도하여 얻은 난자에 정자를 넣어 10 min간 인공수정을 유도하였다. 10 min 이후 수정난을 현미경으로 관찰하여 90% 이상의 수정률을 확인한 뒤 시험에 사용하였다. 시험용액은 6 well plate에 농도별로 10 mL씩 3반복으로 분주되었으며, 시험용액당 수정란 100~150개씩 분주하여 온도 16±0.5°C, 광량 100±10 μmol photons·m²·s⁻¹, 광주기 8 Light : 16 Dark 하에서 배양하였다. 측정시기는 *H. pulcherrimus*가 인공수정 후 pluteus 유생으로 발달되는 시기인 64h에 각각 측정하여 정상 배아발생률을 측정하였다(Hwang et al. 2014). 정상 배아발생은 4-armed pluteus stage 유생의 4개의 arm이 정상으로 발달하였는지의 유무로서 판단하였다. 본 시험방법은, 해양환경공정시험기준의 해양생물공정시험기준 제 25항, 성계를 이용한 해양생태독성 시험방법에 의

거하여 수행되었다(Table 1). 또한, Diuron과 Irgarol이 *H. pulcherrimus*의 초기 배아발달과정에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 시험물질에 대한 64h-정상 배아발생률의 반수 영향농도(EC₅₀)에 정상 수정란을 100~150개씩 분주하여 노출시키고, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h, 6h, 12h, 18h, 24h, 42h, 50h, 64h에 각각 현미경 하에서 수정란의 발달상태를 확인하였다. 발달상태 확인방법의 경우, 관측시기별 무작위로 100개의 수정란을 선정하여 관찰하였고, 해당하는 발달단계를 비율로 나타냈다(Fig. 3).

4. 통계분석

실험 간 유의성 검정은 SigmaPlot 12.0 version (Systat Software, Inc., San Jose, California, USA)의 Student's t-test로 비교하였으며 *p*가 0.05 혹은 0.01 이하인 것을 유의한 것으로 판단하였다. 정상 유생발생률에 대한 EC₅₀와 95% 신뢰구간(95% Confidence Interval; 95% CI)은 Toxicalc 프로그램 (Toxicalc 5.0, Tidepool scientific software, USA)의 probit 통계법을 이용하여 분석하였다. NOEC 및 LOEC도 Toxicalc 프로그램의 Dunnett's test를 이용하여 분석하였다.

결 과

정상 수정률은 *H. pulcherrimus*의 정자와 난자, 수정 후에

Table 1. Experimental conditions for this research using *Hemicentrotus pulcherrimus*

Class	Condition
Endpoint	10 min Fertilization rate (%) 64 h Normal embryogenesis (%)
Observation time	0.5h, 1.5h, 2h, 2.5h, 6h, 12h, 18h, 24h, 42h, 50h, 64h
Culture type	Static non-renewal
Photoperiod	Ambient light condition and 8L : 16D period
Temperature	16±0.5°C
Salinity	32±1.0
pH	8.0±0.5
Test solution volume	10 mL (6 well plate)
Culture medium	Filtrated sea water (0.45 μm membrane filter)
Number of repeats	Over the 3 replicate
Initial density of sperms and fertilized eggs	1 μL cleaned sperm mL ⁻¹ 10-15 fertilized egg mL ⁻¹
Acceptability criterion	Over the 90% fertilization rate Over the 80% normal embryogenesis at control

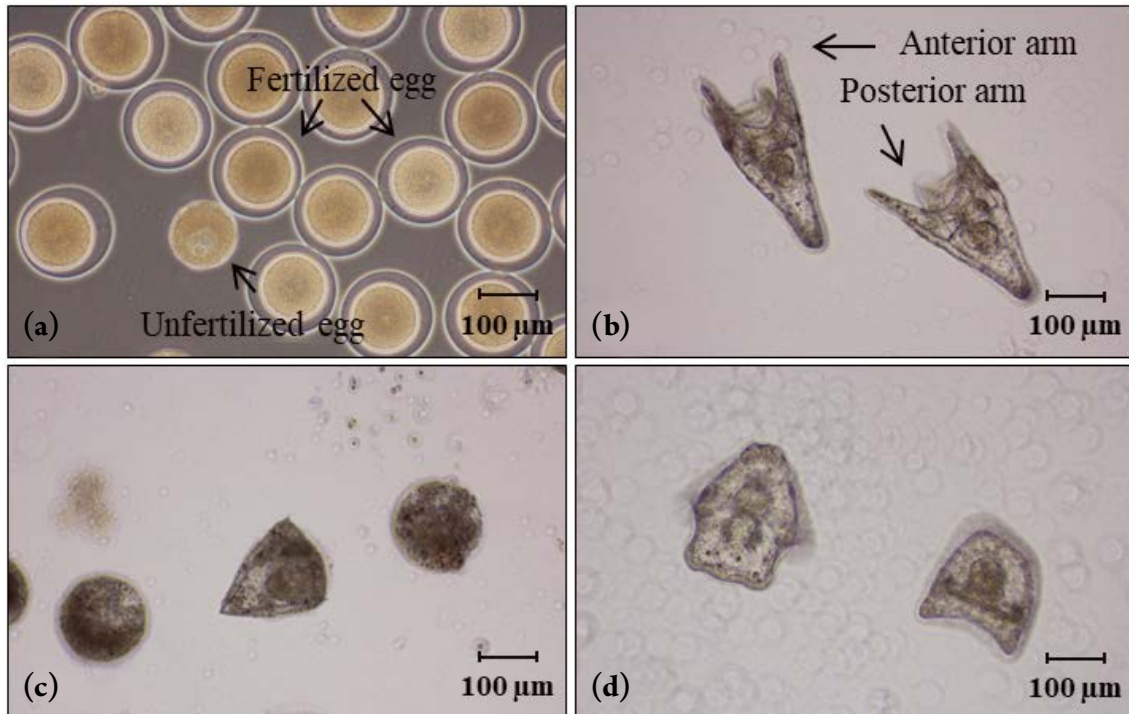


Fig. 1. The malformed shapes of *Hemicentrotus pulcherrimus* in the observed early developmental stages. A normal fertilized egg and an abnormal fertilized egg (a) of *H. pulcherrimus*, determined by the presence or absence of a fertilized layer. Normal pluteus larva (b), undeveloped larva (c), and abnormal development larva (d) of *H. pulcherrimus* were observed under exposure to pollutants.

수정막의 형성 유무로 판단되며(Fig. 1a), 수정 후에 정상적인 배아발생은 pluteus 유생으로의 형태 변이로 판단하나(Fig. 1b), 비정상적으로 배아가 발생할 경우에는 Fig. 1c, d에서 나타났듯이 anterior arm과 posterior arm가 나타나지 않는다.

수정률의 경우는 Diuron과 Irgarol의 최고농도인 40 mg L^{-1} 에서도 수정률의 저해가 나타나지 않았으나(Fig. 2a), 배아발생률은 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 2b). Diuron에 노출된 *H. pulcherrimus*의 정상 배아발생률은 5 mg L^{-1} 까지는 유의한 차이가 나타나지 않았으나, 10 mg L^{-1} 에서 정상 유생발생률이 83.00%로 유의하게 감소하여, 최고농도인 40 mg L^{-1} 에서는 정상 배아발생률을 관찰할 수 없었다($p < 0.01$). Irgarol의 경우는 실험 최소농도인 1.25 mg L^{-1} 에서 정상 배아발생률이 84.00%로 유의적으로 감소하기 시작하여($p < 0.01$), 농도가 증가할수록 감소하는 농도의존성을 나타내었다(Fig. 2b).

*H. pulcherrimus*에 대한 신망오도료의 독성값을 살펴보면, 정상 배아발생률의 EC_{10} 값은 Diuron과 Irgarol에 대하여 $4.11 \pm 0.30 \text{ mg L}^{-1}$, $1.30 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$ 을 나타냈고, EC_{50}

값은 $7.12 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$, $2.31 \pm 0.07 \text{ mg L}^{-1}$ 로 나타났다. NOEC와 LOEC 값은 Diuron에서 1.25 mg L^{-1} , 2.5 mg L^{-1} , Irgarol에서 0.625 mg L^{-1} , 1.25 mg L^{-1} 로 나타났다(Table 2). EC_{50} 값을 기준으로 Diuron과 Irgarol의 독성민감성을 비교해 보면, Irgarol이 약 2배가량 독성이 강한 것으로 나타났다.

또한, 64h-정상 배아발생률의 반수영향농도(EC_{50})에 정상 수정란을 노출시켜 Pluteus 유생으로 발달하는 과정을 총 10단계(Zygote, 2-cells, 4-cells, 8-cells, Morular, Blastula, Early gastrula, Gastrula, Early pluteus, Pluteus)로 나누어 발달에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 3). 0~12h까지 유의미한 차이를 보이지 않았으나, 18h에 early gastrular stage로의 발달이 지연되기 시작하여, 24h부터는 유의한 차이를 나타냈다. 24h 관측결과 대조군에서 Early pluteus stage가 77.7%를 차지하는 것으로 나타났으나, Diuron과 Irgarol 노출군에서는 Early gastrular가 71.7%, 81.0%를 차지하여 gastrular stage로의 발달이 지연되는 것으로 나타났다. 이후 노출 24~50h 동안 대조군에서는 Early pluteus에서 pluteus로 정상적으로 발달이 이루어져 50h이면 대부분의

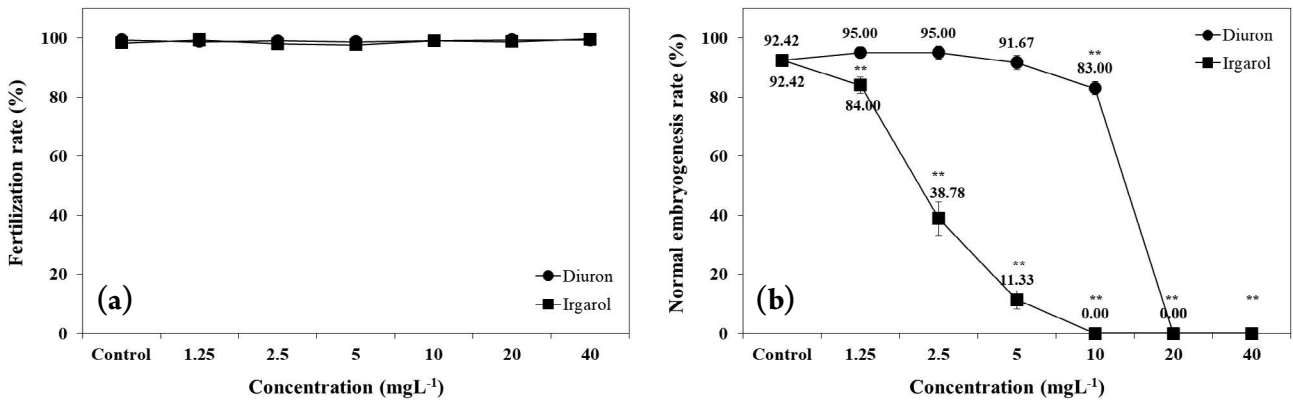


Fig. 2. Fertilization rate (%) and normal embryogenesis rate (%) of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, exposed to serial dilutions of diuron and irgarol. The vertical bar denotes the confidence interval and the asterisks indicate significant differences ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$) as determined by one-way ANOVA.

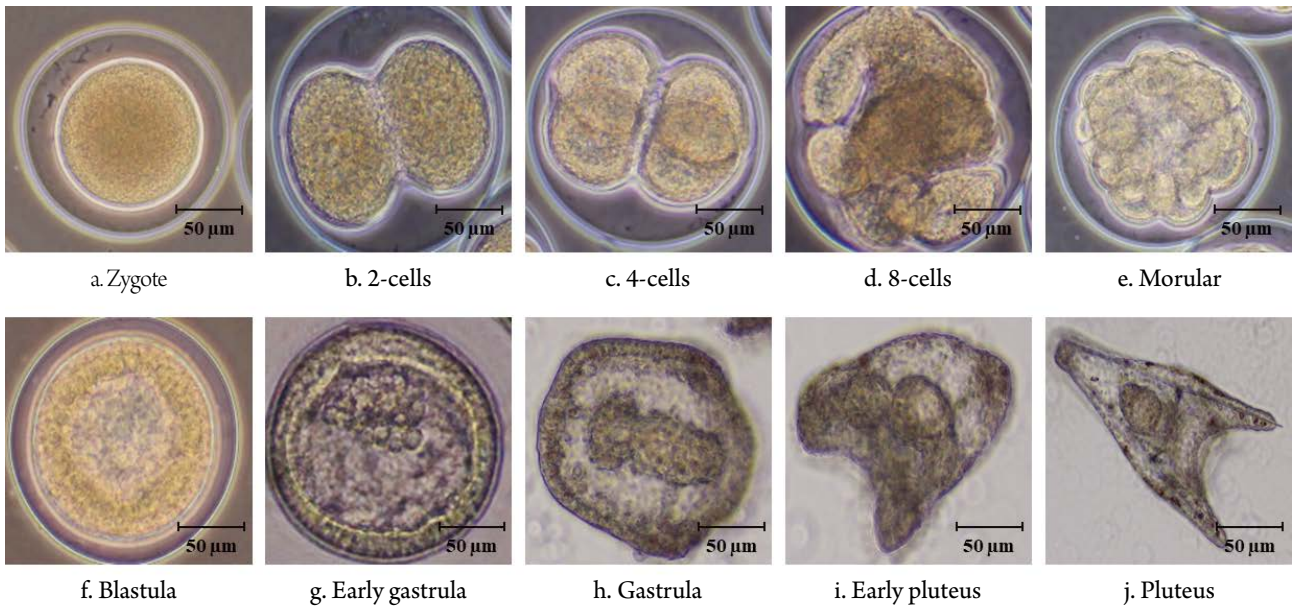


Fig. 3. Early sea urchin developmental stages of *Hemicentrotus pulcherrimus* divided by observation time. The cleavage-stages of *H. pulcherrimus* embryos are described based on 2-, 4-, or 16-cells, followed by the blastula (central cavity surrounded by an epithelial layer), and gastrula (formation of the archenteron) stages. The larva is defined morphologically as an early pluteus or pluteus larva.

수정란이 pluteus 유생으로 발달하는 것에 비하여, Diuron 과 Irgarol에 노출군에서는 Early pluteus에서 Pluteus로 발달하는 과정에서도 지연이 나타났다(Fig. 4). 결과적으로 *H. pulcherrimus*의 초기 배아 발달과정에서 신방오도료물질 Diuron과 Irgarol은 Early gastular-gastular-Early pluteus-Pluteus로 이어지는 과정에서 배아 발달을 지연하여, 64h에 정상 배아발생률에 차이를 나타낸 것으로 판단된다.

고 찰

우리나라는 해운 및 수산업의 발달로 인해 방오물질의 사용량이 많으며, TBT의 사용금지 조치 이후에 사용되기 시작한 신방오물질인 Diuron과 Irgarol은 한국 연안해역에서 매우 높은 농도로 존재하며 가장 흔하게 검출되는 물질이다. Kim *et al.* (2014)에 의하면, 전국 11개 주요항구(인천, 군산, 목포, 여수, 광양, 통영, 부산, 울산, 포항, 울진, 속초)

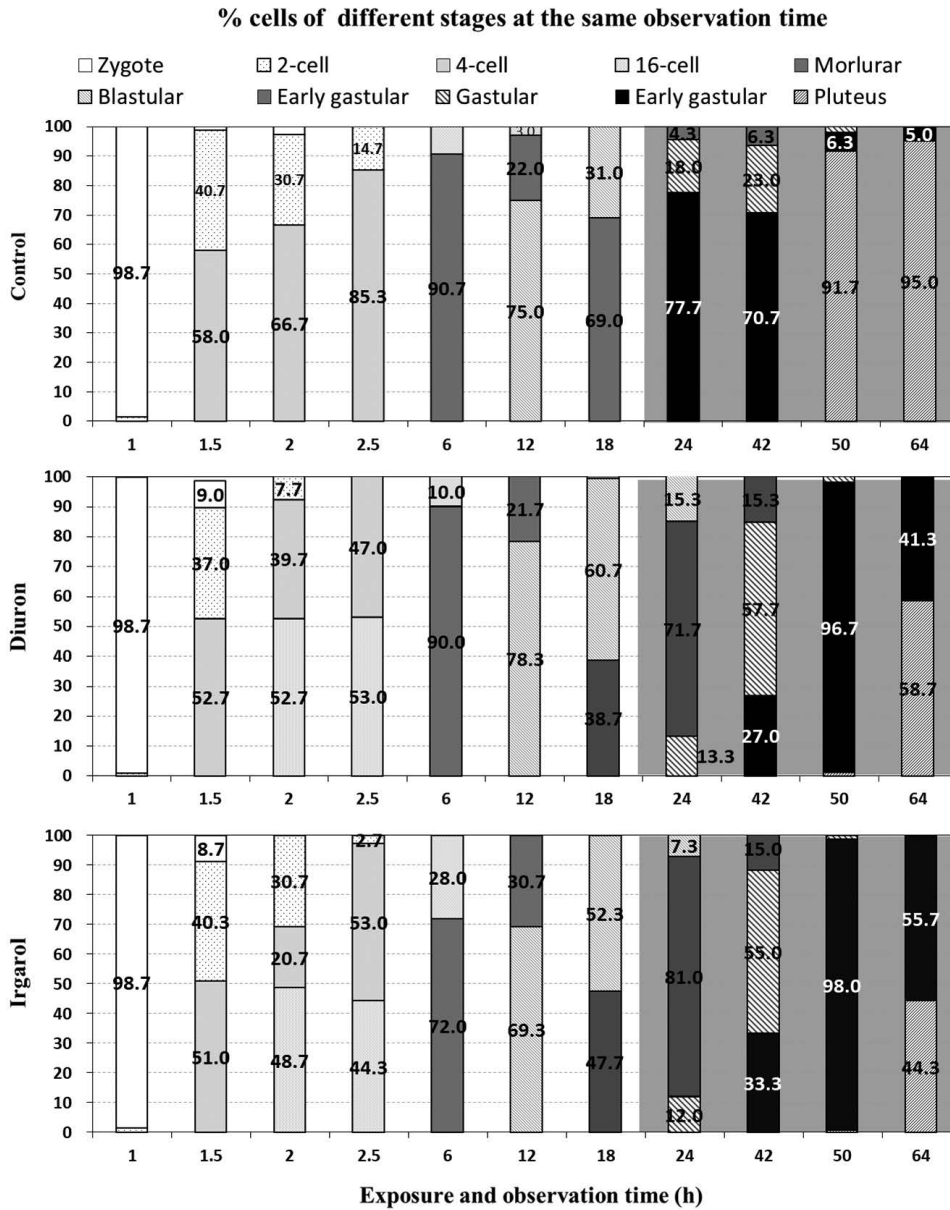


Fig. 4. The ratio of developmental stages of *Hemacentrotus pulcherrimus* embryo cells at each observation time. The concentration of diuron and irgarol was set to 50% effective concentration values (EC₅₀). The reason for the degradation of development at each observation time may be due to the delay in development over time. The development hindrance began to appear at 18 hours of observation, resulting in significant differences after 24 hours of exposure.

중 42%, 진행만 내 13개 어항 중 73%, 마산만, 행암만, 고현만 내 18개 지점 중 64%에서의 Diuron 농도는 영국의 환경표준농도 (EQS; Environmental Quality Standard) 값인 100 ng L⁻¹을 초과한 바 있다. 위에서 언급한 환경 내 Diuron 농도 및 각국의 수질기준과, 본 연구에서 도출한 Diuron의 독성값을 비교해 보면, 정상 배아발생물의 반수영향농도

(EC₅₀)와 최소영향농도 (LOEC)는 7.12 mg L⁻¹, 2.5 mg L⁻¹로, 우리나라 전국 연안의 해수 내 Diuron의 분포범위인 5~1,360 ng L⁻¹, 영국의 EQS 값인 100 ng L⁻¹, EU의 예측무영향농도 (PNEC; Predicted No Effect Concentration) 200 ng L⁻¹, 네덜란드의 최대허용농도 (MPC; Maximum permissible concentration) 430 ng L⁻¹보다 높은 것으로 나타났다. Irgarol

의 경우, EC₅₀와 LOEC는 2.31 mg L⁻¹, 1.25 mg L⁻¹로 나타났으며, 우리나라 전국연안의 해수 내 Irgarol의 분포범위인 0~14 ng L⁻¹, 네덜란드와 영국의 EQS 값인 24 ng L⁻¹, 영국의 PNEC 값인 43.9 ng L⁻¹ 보다는 상회하는 것으로 나타났다 (Table 2).

이와 같이, 1차 소비자인 성게의 독성값이 환경 내의 농도 및 각국의 수질기준과 가이드라인을 상회하며, 해양환경 내의 신방오도료의 농도는 독성 영향을 일으킬 만큼 충분히 높지 않다고 나타났다. 하지만, Diuron과 Irgarol 및 그 분해산물인 M1은 광합성작용 중 Photosystem II의 억제를 통한 식물독성으로 해양생태계와 생산자에게 잠재적으로 유해할 수 있다고 알려져 있을 뿐만 아니라 (Okamura et al. 2000; Zhang et al. 2008; Sjollem et al. 2014; Jung et al. 2017; Kottuparambil et al. 2017), 먹이연쇄를 통해 전이되어 생물체 내에서 Cytochrome p450 산화반응과 Mitochondria의 전자전달 방해를 통해 활성산소(ROS)를 발생시켜 세포 구조 성분을 변화시키고 세포사멸을 일으키는 것으로 보고된 바 있다 (Michael et al. 2013; Tanja et al. 2018). 또한, Irgarol은 해양환경 내에서 분해되어, M1 (2-methylthio-4-tert-butylamino-6-amino-s-triazine), M2 (3-[4-tert-butylamino-6-methylthiol-s-triazine-2-ylamino]propionaldehyde)와 같은 형태로 존재하며 (Lam et al. 2004), 동일 지점에서 Irgarol 농도보다 14.38~30.81배 높게 분포하는 것으로 알려져 있다 (Zhang et al. 2019). 또한, M2는 구조적으로 aldehyde 치환기가 존재하기 때문에 생물군에 미치는 위해성이 Irgarol 보다 높은 것으로 알려져 있다 (Lam et al. 2006). 결과적으로 Diuron과 Irgarol은 환경 내 농도에 비하여 해양생물에 미칠 수 있는 잠재적 독성영향이 과소평가된 경향이 있다.

또한, 말뚝성게 외에도 5종의 성게 (*Mesocentrotus nudus*, *Lytechinus variegatus*, *Paracentrotus lividus*, *Anthocidaris crassispina*, *Glyptocidaris crenularis*)의 독성값 중 EC₅₀ 값을 기준으로 비교해 보면, *H. pulcherrimus*의 독성값은 *M. nudus* 보다는 민감하고, *L. variegatus*, *P. livividus*, *A. crassispina*, *G. crenularis* 보다는 둔감한 것으로 나타났다. 이는, 일반적으로 동일 생물종에서도 환경 및 생태적 특이성에 의하여 독성 민감성에 차이를 나타낼 수 있기에, 구체적인 이유를 확인하기는 어렵다. 또한, 성게종마다 초기배아단계에서의 생육 적정 수온이 상이하며, 발생시간에도 차이가 존재하므로, 성게종 간의 민감도 차이는 이러한 생리·생태학적 특징에 기인하는 것으로 사료된다 (Choi et al. 2020).

Table 2. Toxicity evaluation using normal embryogenesis of sea urchins exposed to the antifouling agents

Species group/ common name	Species	Toxicant	Effect measurement	Observation duration (h)	NOEC (mg L ⁻¹)	LOEC (mg L ⁻¹)	EC ₅₀ (mg L ⁻¹)	EC ₁₀ (mg L ⁻¹)	References
Invertebrates /Sea urchin	<i>Hemacentrotus pulcherrimus</i>	Diuron	Embryogenesis	64	1.25	2.5	7.12 ± 0.04	4.11 ± 0.30	This study
		Irgarol			0.625	1.25	2.31 ± 0.07	1.30 ± 0.01	
	<i>Mesocentrotus nudus</i>	Diuron	Embryogenesis	48	< 1.25	1.25	20.07 ± 3.97	-	Hwang et al. 2020
		Irgarol			< 1.25	2.5	22.45 ± 0.33	-	
	<i>Lytechinus variegatus</i>	Diuron	Embryogenesis	24	1	2	3.75 ± 0.25	0.99 ± 0.63	Perina et al. 2011
		Irgarol			1	2	1.49 ± 0.02	1.07 ± 0.03	
	<i>Paracentrotus lividus</i>	Diuron	Embryogenesis	48-50	-	0.25	2.39 ± 0.21	-	Manzo et al. 2006
		Irgarol			-	-	0.99 ± 0.69	-	
	<i>Anthocidaris crassispina</i>	Diuron	Embryogenesis	32	0.001	-	-	-	Kobayashi and Okamura 2002
		Irgarol			-	-	-	-	
<i>Glyptocidaris crenularis</i>	Diuron	Embryogenesis	48	-	-	0.42	-	Xu et al. 2011	

EC₅₀: 50% Effective concentration, NOEC: No observed effective concentration, LOEC: Lowest observed effective concentration
 Water Quality Criteria or Guideline of Diuron; EOS of UK: 100 ng L⁻¹, PNEC of EU: 200 ng L⁻¹, Dutch of MPC: 430 ng L⁻¹
 Water Quality Criteria or Guideline of Irgarol; EOS of Dutch and UK: 24 ng L⁻¹, PNEC of UK: 43.9 ng L⁻¹

현재까지, Diuron과 Irgarol이 해양 무척추동물에게 미치는 영향의 메커니즘은 알려져 있지 않다. 하지만, 무척추동물의 초기 배아발생과정 중에 Diuron에 노출될 경우 발달에 방해가 일어난다고 알려져 있으며, Irgarol에 노출된 경우, 주로 칼슘 항상성에 영향을 미쳐 골격 변형에 영향을 받아 기형 유생이 관찰된다고 알려져 있다(Manzo et al. 2006). 또한, Moon et al. (2019)에 의하면 신방오도료는 수생생물의 신경계 및 근육세포 발달에 결함을 일으키며, 면역계에 교란을 일으키고, 넵치의 배아형성에 결함을 나타낸다고 한다. 본 연구의 결과에서도 Diuron과 Irgarol은 성체의 배아 발달을 지연시키는 것으로 나타났으며, 2-cell, 4-cell, 8-cell, 상실기 이전까지는 저해가 나타나지 않지만, 상실기부터 영향을 받기 시작해, 초기낭배기(Early gastrular)와 낭배기를 거쳐 초기 pluteus 유생에서 정상 pluteus 유생으로 발달하는 과정에 지연 및 기형이 발생하는 것으로 나타났다. 향후 골격형성, 단백질합성, 신경계 영향 등과 같이 초기발생에 관련된 유전독성 시험을 수행하는 것은 Diuron과 Irgarol이 성체류의 초기발생의 지연에 작용하는 원리를 확인할 수 있을 것으로 보인다.

Omae (2003)와 Moncada (2004)에 의하면, 해양환경 내에서 잔류성이 높은 Diuron은 43~2,180일의 반감기를 가지며, Irgarol의 반감기는 100~350일로 잔류성이 매우 높은 것으로 알려져 있다. 또한, Diuron과 Irgarol은 제초제로 사용되는 물질로서, 농업에 사용되고 강이나 하천을 따라 배출되어 해양환경으로 지속적으로 유입된다. 이와 같은 신방오도료물질의 특성은 결국 해양환경 내에서 농도를 지속적으로 증가시킬 것으로 판단된다.

연안구역의 대표적인 오염물질인 신방오도료물질은 시험생물 및 노출 시간 등과 같은 차이로 인하여 생물체 내에 미치는 영향이 다양하게 나타날 수 있기에, 유용 시험생물종을 이용한 시험방법의 표준화는 매우 중요하다. 본 연구에서는 조건대 암반에 서식하는 *H. pulcherrimus*의 초기 배아발생 단계를 이용해 신규방오도료에 대한 다양한 독성값을 도출하였으며, 이들 독성값은 Diuron과 Irgarol과 같은 해양환경의 오염물질에 대한 환경보호 전략 수립을 위한 기초자료로 활용될 것이다.

적 요

본 연구에서는 신방오도료 Diuron과 Irgarol이 해양 무

척추동물인 말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*)에게 미치는 독성영향을 10 min-수정물과 64 h-정상 유생발생물의 EC₅₀, NOEC, LOEC 값을 통하여 확인하였으며, 해당 오염물질이 *H. pulcherrimus*의 초기발생단계에 미치는 지연효과를 확인하고자 하였다. 실험결과, Diuron과 Irgarol은 시험농도(40 mg L⁻¹)에서 *H. pulcherrimus*의 수정물에 영향을 미치지 않았으며, 정상 유생발생물에 대한 EC₅₀값은 각각 7.12 mg L⁻¹, 2.31 mg L⁻¹로 나타났다. 또한, 수정란이 pluteus 유생으로 발달하는 과정에서 반수영향농도의 Diuron과 Irgarol의 노출 경과시간이 18 h에 도달하면, early gastrular stage로의 발달이 지연되기 시작하여, 24 h에서부터 유의미한 발달지연이 확인되었다. 이후 지속적인 발달지연이 관찰되어, Early gastrular-gastrular-early pluteus-pluteus로 이어지는 과정에서 발달지연이 나타났다. Diuron과 Irgarol은 잔류성이 높으며, 본 연구결과와 같이 무척추동물을 포함한 다양한 해양생물 군에 독성영향이 있는 것으로 알려져 있다. 이에, 해양 환경의 오염을 방지하고 보전하기 위하여, 관련된 규정의 마련을 통하여 환경보호 전략이 필요하다.

사 사

본 논문은 2020년도 국립수산과학원 정상과제(R2020-027) 연구비 지원으로 수행하였습니다.

REFERENCES

- Agatsuma Y. 2001. Ecology of *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Pseudocentrotus depressus*, and *Anthocidaris crassispina*. pp. 363-374. In: Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. Elsevier Science. Netherlands.
- Amara I, W Miled, RB Slama and N Ladhari. 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine. Environ. Toxicol. Pharmacol. 57:115-130.
- Bao V, K Leung, JW Qiu and M Lam. 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. Mar. Pollut. Bull. 62:1147-1151.
- Chapman J, C Hellio, T Sullivan, R Brown, S Russell, ENL Kitteringham and F Regan. 2014. Bioinspired synthetic macroalgae : examples from nature for antifouling applications. Int. Biodeter. Biodegr. 86:6-13.
- Choi H, JW Lee, YH Park, SM Lee, YS Choi, S Heo and UK

- Hwang. 2020. Toxic effects of phenanthrene on fertilization and normal embryogenesis rates of *Mesocentrotus nudus* and *Hemicentrotus pulcherrimus*. Korean J. Environ. Biol. 38:333-342.
- Cima F and L Ballarin. 2012. Immunotoxicity in ascidians: Anti-fouling compounds alternative to organotins III - The case of copper (II) and Irgarol 1051. Chemosphere 89:19-29.
- Cho GO. 2011. A study on the long-term variation of the distribution of organotin compounds and imposex in *Thais clavigera* on the coast of Korea. M.S. Thesis. Chonnam National University. Gwangju, Korea. pp. 47-56.
- Cresswell T, JP Richards, GA Glegg and JW Readman. 2006. The impact of legislation on the usage and environmental concentrations of Irgarol 1051 in UK coastal waters. Mar. Pollut. Bull. 52:1169-1175.
- Dafforn KA, JA Lewis and EL Johnston. 2011. Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. Mar. Pollut. Bull. 62:453-465.
- Dubey SK and U Roy. 2003. Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. Appl. Organomet. Chem. 17:3-8.
- Han SK. 2012. Distribution of antifouling agent using Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) method in southwestern coast of Korea. J. Korean Soc. Mar. Environ. Saf. 18:85-93.
- Hwang UK, CW Lee, SM Lee, KH An and SY Park. 2008. Effects of salinity and standard toxic metals (Cu, Cd) on fertilization and embryo development rates in the sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*). J. Environ. Sci. 17:775-781.
- Hwang UK, DH Kim, HM Ryu, JW Lee, SY Park and SK Han. 2014. Effect of Bisphenol A on early embryonic development and the expression of Glutathione S-transferase (GST) in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). Korean J. Environ. Biol. 32:234-242.
- Hwang UK, JW Lee, HM Ryu, JC Kang and SK Han. 2015. Effect of phenol on embryo development and expression of metallothionein in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. Ocean Sci. J. 50:701-708.
- Hwang UK, JW Lee, YH Park, S Heo and H Choi. 2020. Toxic effects of antifouling agents (diuron and irgarol) on fertilization and normal embryogenesis rates in the sea urchin (*Mesocentrotus nudus*). Korean J. Environ. Biol. 38:207-215.
- Jones RJ, J Muller, D Haynes and U Schreiber. 2003. Effects of herbicides diuron and atrazine on corals of the Great Barrier Reef, Australia. Mar. Ecol. Prog. Ser. 251:153-167.
- Jung JH, J Ko, EH Lee, KM Choi, M Kim, UH Yim, JS Lee and WJ Shim. 2017. RNA seq- and DEG-based comparison of developmental toxicity in fish embryos of two species exposed to Iranian heavy crude oil. Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 196:1-10.
- Karlsson J, E Ytreberg and B Eklund. 2010. Toxicity of anti-fouling paints for use on ships and leisure boats to non-target organisms representing three trophic levels. Environ. Pollut. 158:681-687.
- Kim GY and MO Park. 2001. Evaluation of butyltin compounds and its distribution among seawater, sediment and biota from the Kwangyang bay. J. Korean Fish. Soc. 34:291-298.
- Kim NS, WJ Shim, UH Yim, SH Hong, SY Ha, GM Han and KH Shin. 2014. Assessment of TBT and organic booster biocide contamination in seawater from coastal areas of South Korea. Mar. Pollut. Bull. 78:201-208.
- Kim NS, SH Hong, JG An, KH Shin and WJ Shim. 2015. Distribution of butyltins and alternative antifouling biocides in sediments from shipping and shipbuilding areas in South Korea. Mar. Pollut. Bull. 95:484-490.
- Kottuparambil S, MT brown, JH Park, SY Choi, HJ Lee, HG Choi, S Depuydt and TJ Han. 2017. Comparative assessment of single and joint effects of diuron and Irgarol 1051 on Arctic and temperate microalgae using chlorophyll a fluorescence imaging. Ecol. Indic. 76:304-316.
- Lam KH, MHW Lam, PKS Lam, T Qian, Z Cai, H Yu and RYH Cheung. 2004. Identification and characterization of a new degradation product of Irgarol-1051 in mercuric chloride-catalyzed hydrolysis reaction and in coastal waters. Mar. Pollut. Bull. 49:356-367.
- Lambert SJ, KV Thomas and AJ Davy. 2006. Assessment of the risk posed by the antifouling booster biocides Irgarol 1051 and diuron to freshwater macrophytes. Chemosphere 63:734-743.
- Lee S, J Chung, H Won, D Lee and YW Lee. 2011. Analysis of antifouling agents after regulation of tributyltin compounds in Korea. J. Hazard. Mater. 185:1318-1325.
- Maccinis-Ng CMO and PJ Ralph. 2003. Short term response and recovery of *Zostera capricorni* photosynthesis after herbicide exposure. Aquat. Bot. 76:1-15.
- Manzo S, S Buono and C Cremisini. 2006. Toxic effects of Irgarol and Diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51:61-68.
- Michael CRA, KR Matthew and RB Matthew. 2013. Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. CA-Cancer J. Clin. 63:120-142.
- Moncada A. 2004. Environmental Fate of Diuron. Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA.
- Moon YS, MK Kim, CP Hong, JH Kang and JH Jung. 2019. Overlapping and unique toxic effects of three alternative antifouling biocides (Diuron, Irgarol 1051[®], Sea-Nine 211[®]) on

- non-target marine fish. *Ecotox. Environ. Safe.* 180:23–32.
- Okamura H, I Aoyama, D Liu, RJ Maguire, GJ Pacepavicius and YL Lau. 2000. Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Res.* 34:3523–3530.
- Omae I. 2003. General aspects of tin-free antifouling paints. *Chem. Rev.* 103:3431–3448.
- OSPAR. 2010. Assessment of the Impact of Shipping on the Marine Environment. Quality status report 2010. OSPAR Commission (Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic), London.
- Price ARG and JW Readman. 2013. 12 Booster biocide antifoulants: is history repeating itself? In: *Late Lessons from Early Warnings: Science, Precaution, Innovation.* European Environment Agency, Copenhagen, Denmark.
- Sjollema SB, G MarinezGarcia, HG Geest, MHS Kraak, P Booji, AD Vethaak and W Admiraal. 2014. Hazard and risk of herbicides for marine macroalgae. *Environ. Pollut.* 187:106–111.
- Tanja ZS, Z Zuzana and P Alica. 2018. Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 69:109–125.
- Voulvoulis N, MD Scrimshaw and JN Lester. 2000. Occurrence of four biocides utilized in antifouling paints, as alternatives to organotin compounds, in waters and sediments of a commercial estuary in the UK. *Mar. Pollut. Bull.* 40:938–946.
- Yamada H. 2007. Behaviour, occurrence, and aquatic toxicity of new antifouling biocides and preliminary assessment of risk to aquatic ecosystems. *Bull. Fish. Res. Agen.* 21:31–45.
- Ytreberg E, J Karlsson and B Eklund. 2010. Comparison of toxicity and release rates of Cu and Zn from anti-fouling paints leached in natural and artificial brackish seawater. *Sci. Total Environ.* 408:2459–2466.
- Zhang AQ, GJ Zhou, M H W Lam and KMY Leoung. 2019. Toxicities of Irgarol 1051 derivatives, M2 and M3, to two marine diatom species. *Ecotox. Environ. Safe.* 182:109455.
- Zhang ZB, JY Hu, JH Zhen, XQ Wu and C Huang. 2008. Reproductive inhibition and transgenerational toxicity of triphenyltin on medaka (*Oryzias latipes*) at environmentally relevant tip levels. *Environ. Sci. Technol.* 42:8133–8139.