

미역(*Undaria pinnatifida*) 배우체의 생존 및 상대성장률을 이용한 dichlofluanid의 독성영향 평가

황운기, 박윤호¹, 심보람², 이주욱^{2,*}

국립수산과학원 기후환경연구부 갯벌연구센터, ¹국립환경과학원 환경건강연구부 위해성평가연구과

²국립수산과학원 서해수산연구소 기후환경자원과

Assessment of the toxic effects of dichlofluanid using survival and relative growth rate on brown alga *Undaria pinnatifida*

Un-Ki Hwang, Yun-Ho Park¹, Bo-Ram Sim² and Ju-Wook Lee^{2,*}

Tidal Flat Research Center, NIFS, Gunsan 53001, Republic of Korea

¹Risk Assessment Division, Environmental Health Research Department, NIER, Incheon 22689, Republic of Korea

²West Sea Fisheries Research Institute, NIFS, Incheon 22383, Republic of Korea

Contribution to Environmental Biology

- Dichlorofluanid caused a significant decrease in the survival and relative growth rate of *U. pinnatifida* female gametophytes.
- The toxicity values of dichlorofluanid on female gametophytes are expected to be used as reference data for assessing the toxic effects on *U. pinnatifida*.

*Corresponding author

Ju-Wook Lee

Tel. 032-745-0681

E-mail. leejuwook84@gmail.com

Received: 19 September 2023

First revised: 15 October 2023

Second revised: 24 October 2023

Revision accepted: 8 November 2023

Abstract: Biocide dichlofluanid breaks down quickly and accumulates easily in sediment, potentially causing a persistent impact on various marine organisms. We analyzed the potential toxicity of dichlofluanid on major aquaculture species in Korea, *Undaria pinnatifida*. Female gametophytes of *U. pinnatifida* were exposed to dichlofluanid at concentrations of 0, 1, 2, 4, 8, 16, and 32 mg L⁻¹, and their survival and relative growth rate were analyzed. The no observed effect concentration (NOEC), lowest observed effect concentration (LOEC), and median lethal concentration (LC₅₀) for female gametophyte survival were determined as 1, 2, and 10.82 (95% CI: 8.87–13.23) mg L⁻¹, respectively. The NOEC, LOEC, and median effective concentration (EC₅₀) for relative growth rate were 1, 2, and 6.58 (95% CI: 6.03–7.17) mg L⁻¹, respectively. Female gametophytes of *U. pinnatifida* were expected to experience toxic effects at concentrations above 2 mg L⁻¹ of dichlofluanid. These research findings are expected to serve as important reference data for evaluating the toxicity effects of *U. pinnatifida* in its early life stages when exposed to dichlofluanid.

Keywords: Antifouling agent, dichlofluanid, seaweed, *Undaria pinnatifida*, gametophyte

1. 서 론

Booster biocides (BBs)는 방오제의 방오능력을 향상

시키기 위해 개발되었다(Jung *et al.* 2017). 강력한 방오 능력을 가진 tributyltin (TBT)가 2008년 국제해사기구(International Maritime Organization)로부터 금지됨에

따라 cuprous oxide 및 cuprous thiocyanate와 같은 구리 화합물이 주요 방오도로 성분으로 사용되고 있다(Chen *et al.* 2015). 구리화합물은 연체동물과 따개비를 제거하는데 탁월하였으나 TBT와 비교하여 방오능력이 제한적이며 유지기간이 짧아 매해 방오페인트 도장이 필요한 단점이 있다(Almeida *et al.* 2023). 따라서 방오능력을 보완하기 위해 BBs를 개발 및 적용하고 있고(Amara *et al.* 2018), 현재 chlorothalonil, copper pyritihone, dichlofluanid, diuron, irgarol, dichloroocetylthiazolinone (DCOIT), (benzothiazol-2-ylthio)methyl thiocyanate (TCMTB), zinc pyritihone, zineb 등의 BBs는 전 세계적으로 가장 많이 사용되고 있다(Amara *et al.* 2018; Almeida *et al.* 2023).

BBs는 TBT와 같은 유기주석화합물에 비해 비표적 해양생물에게 낮은 독성 효과를 나타내며, 반감기가 짧아 해양환경 내 빠르게 분해되는 것으로 알려져 있다(Amara *et al.* 2018). 하지만 chlorothalonil, irgarol, copper pyritihone, zinc pyritihone 등은 일부 해양생물에서 TBT 수준의 높은 독성 효과가 밝혀졌고(Bao *et al.* 2011), 플랑크톤, 무척추동물, 어류 등 다양한 해양생물을 대상으로 BBs의 독성영향이 보고되고 있다(Bao *et al.* 2011; Heo *et al.* 2021; Campos *et al.* 2023; Luo *et al.* 2023; Tokur and Aksoy 2023). 또한 BBs는 방오능력 향상을 위하여 1~3개가 혼합되어 방오도로 성분을 구성하기 때문에 다양한 해양생물에서 복합적인 독성영향이 나타난다(Paz-Villarraga *et al.* 2022). 하지만 독성이 잘 알려진 chlorothalonil, irgarol, copper pyritihone, zinc pyritihone에 비해 dichlofluanid와 같이 방오성분으로 등록된 비율이 낮은 BBs에 대한 독성연구는 부족하다(Abreu *et al.* 2020).

Dichlofluanid (N-dichlorofluoromethylthio-N', N'-dimethyl-N-phenylsulphamide)는 농작물을 보호하기 위하여 오래전부터 제초제 또는 살균제로 사용되어 왔다(Tokur and Aksoy 2023). Dichlofluanid는 절지류, 곤충, 포유류와 같은 육상생물에서 높은 독성이 발견되었고 이러한 연구결과는 dichlofluanid가 해양환경으로 유입 및 축적되면 해양생물에게 독성영향을 미칠 가능성이 크다는 것을 시사한다(Cima and Varello 2020; Cai *et al.* 2021; Lee *et al.* 2022a). 1~1,000 μM 에 노출된 어류 세포주(*Epithelioma Papulosum Cyprini*)에서 dichlofluanid

의 독성영향이 보고되었으며(Tokur and Aksoy 2023), 0.1~100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에 노출된 패류(*Perna perna*)에서 산화스트레스를 유발하였다(Rola *et al.* 2020). 1~3,125 nM에 노출된 패류(*Mytilus edulis*)와 50~1,600 nM에 노출된 성게(*Paracentrotus lividus*)의 배아 발달과 성장도 감소하는 것으로 보고되었다(Bellas 2006). 또한, 3.33~33.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에 노출된 멧게(*Botryllus schlosseri*)에서 혈액 및 면역독성을 나타냈고(Cima and Varello 2020), dichlofluanid는 무척추동물 이외에도 2.6 μM 에 노출된 갈조류(*Saccharina latissima*)에서 광합성을 저하시키는 독성영향이 보고되었다(Johansson *et al.* 2012).

우리나라는 세계적인 해조류 양식 강국이며 해조류 양식산업은 국내 지역사회에 경제적으로 매우 중요하다. 따라서 독성이 잘 알려진 TBT와 BBs뿐만 아니라 독성이 잘 알려지지 않은 dichlofluanid와 같은 BBs가 해조류에 미치는 독성영향을 파악하는 것이 중요하다. 따라서 우리나라에서 많이 양식되고 있는 미역(*Undaria pinnatifida*)의 암배우체를 이용하여 dichlofluanid의 독성영향을 평가하고자 하였다. 본 연구결과는 dichlofluanid의 기준농도 및 BBs 간의 독성영향을 비교하기 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시험생물

독성평가에 사용된 *U. pinnatifida*의 암배우체는 국립수산물연구원 해조류연구소에서 분양받아 국립수산물연구원 서해수산연구소에서 1개월 이상 계대배양하였다(Fig. 1). 암배우체 계대배양에는 PESI 배양액(Tatewaki *et al.* 1996)을 사용하였고 PESI 배양액은 0.45 μm membrane filter (mixed cellulose ester membrane Advance A045A047A; Advantec, California, USA)로 여과 및 멸균한 자연해수를 이용하여 제조하였다. 암배우체는 온도 15°C, 광량 60~80 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 광주기 12 light : 12 dark 조건에서 1 L 둥근플라스크에서 계대배양하였고, 주 1회 배양액을 전수 교환하였다. 계대배양 중 암배우체의 원활한 성장을 위하여 공기를 주입하였고 규조류 오염을 방지하기 위해 계대배양 및 시험에 사용된 모든 PESI 배양액에는 GeO_2 를 1 mg L^{-1} 첨가하였다.

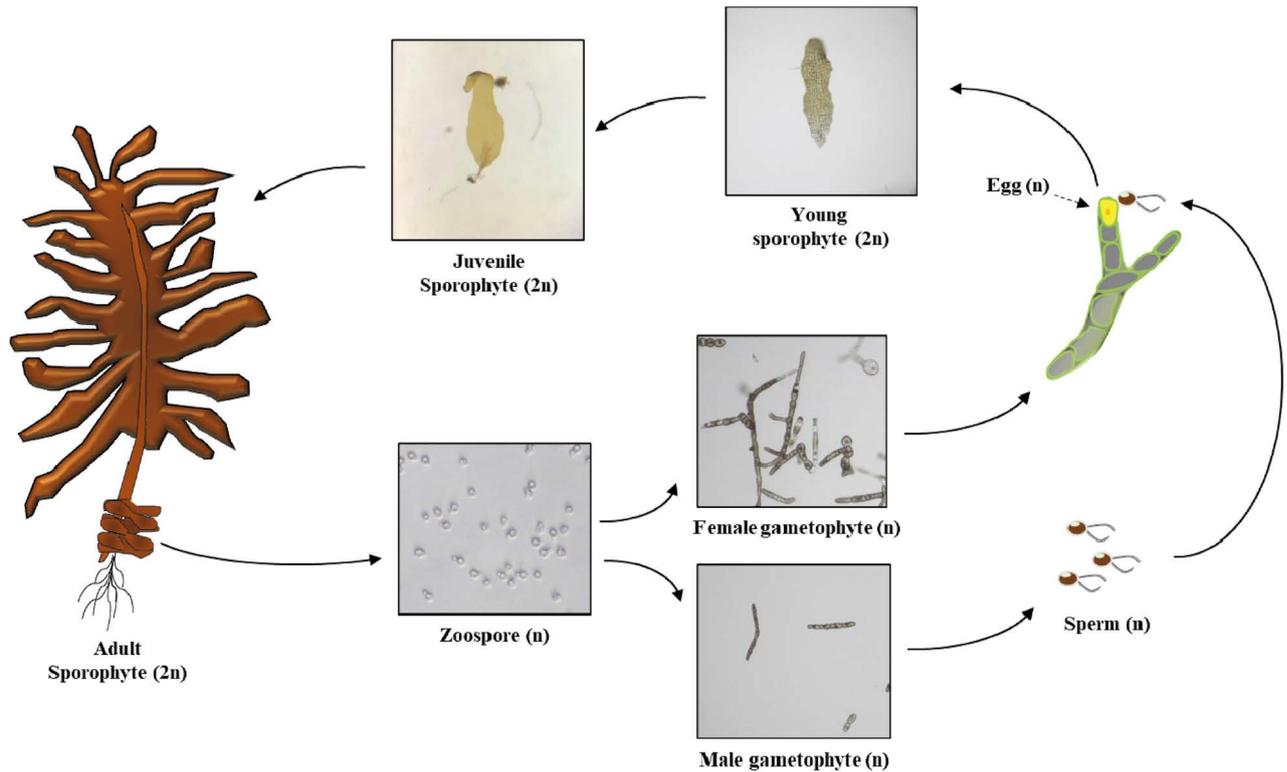


Fig. 1. Life cycle of *Undaria pinnatifida*.

2.2. 암배우체 균일화

PESI 배양액 100 mL에 계대배양 중인 암배우체 1 g을 넣고 mixer (HR2607; Koninklijke Philips N.V., Amsterdam, Netherlands)로 30초 분쇄하였다. 분쇄 후 40 μm cell strainer (Falcon 40 μm cell strainer, Corning, New York, USA)로 여과하여 40 μm 이상의 분쇄되지 않은 암배우체를 제거하였다. 40 μm 미만의 암배우체를 수거하여 온도 15°C, 광량 10 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 광주기 12 light : 12 dark 조건에서 3일간 회복을 유도하였고 40 μm cell strainer로 여과하여 약 40~50 μm 크기의 암배우체를 수거하였다. 수거한 암배우체는 hemocytometer (Counting chambers with V-slash, Marienfeld Superior, Lauda-Konigshofen, Germany)을 이용하여 최종 밀도 200 female gametophytes mL^{-1} 로 정량하였다.

2.3. Dichlofluanid 농도조성

Dichlofluanid (CAS 1085-98-9, Sigma-Aldrich, St. Luis, USA)를 DMSO (Dimethylsulfoxide, CAS No. 67-68-

5, Sigma-Aldrich)에 녹여 1,000 mg L^{-1} 의 stock solution을 제조하였다. Dichlofluanid stock solution 0.032 mL을 PESI 배양액 99.968 mL로 희석하여 32 mg L^{-1} 을 제조하고 PESI 배양액을 이용하여 반수희석하여 0 (control), 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg L^{-1} 의 농도로 희석하였다. Dichlofluani의 농도범위는 예비실험을 통하여 결정하였으며 (Fig. 2), 각 제조된 시험용액의 DMSO 농도범위는 0.001~0.032%였고 암배우체의 생존 및 성장에 영향이 없는 것을 확인하였다 (Park *et al.* 2023).

2.4. 암배우체 생존율 및 상대성장률 분석

미역과 같은 갈조류 암배우체는 영양성장률이 높아 수배우체에 비해 더 많은 바이오매스를 축적할 수 있다 (Liu *et al.* 2016). 이로 인해 암배우체 세포가 수배우체에 비해 일반적으로 2~4배 크기 때문에 (Lee *et al.* 2022b), 생존율과 상대성장률의 관찰과 평가에 용이하다. 200 female gametophytes mL^{-1} 로 균일화된 암배우체 2 mL를 2 mL micro tube (Microcentrifuge tube 2.0 mL, SPL Life Sciences, Korea)

에 넣고 3,000 rpm으로 5분간 원심분리(Smart-R17; Hanil Science, Korea)하여 배양액을 제거하였다. 배양액이 제거된 2 mL tube에 dichlofluanid 시험용액을 각각 1 mL 주입하고 voltex mixer (VM-10; Daihan Scientific, Korea)로 균일하게 섞어주었다. 암배우체를 96 well plate (96 well cell culture plate, SPL Life Sciences)의 각 well에 0.25 mL씩 3반복 분주하고 온도 $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 광량 $60 \pm 5 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 광주기 12 light : 12 dark 조건에서 3일(생

존율) 또는 5일(상대성장률) 배양하였다(Table 1).

생존율을 분석하기 위해 3일 배양된 암배우체를 광학현미경(IX70; Nikon, Tokyo, Japan)으로 무작위로 50개의 생존 유·무를 계수하였으며, 암배우체가 손상되어 투명하게 관찰되는 경우 사멸로 판단하였다(Fig. 3A). 상대성장률을 분석하기 위해 5일 배양된 암배우체를 무작위로 50개를 선택하여 이미지분석프로그램(iWorks 2.0, Nahwoo Trading, Suwon, Korea)을 이용하여 길이를 측정하였다(Fig. 3B). 생존율과 상대성장률은 3회 반복 전체 150개체

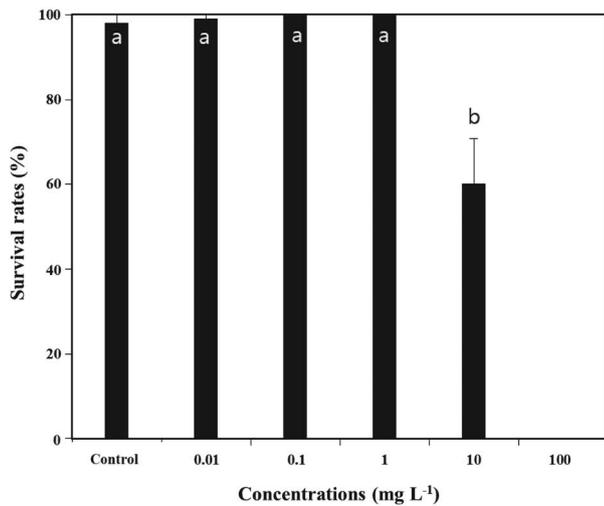


Fig. 2. Dichlofluanid range test on the survival rate of female gametophyte of *Undaria pinnatifida*. Vertical bars represent mean \pm SD. Female gametophyte was analyzed in 50 individuals. Different letters present significant differences ($p < 0.05$), as determined by Tukey's multiple range test.

Table 1. Culture condition on female gametophyte of *Undaria pinnatifida*

Test parameter	Condition
Culture type	Static non-renewal toxicity test
Photoperiod	Ambient light condition and 12L : 12D period
Light intensity	$60 \pm 5 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Temperature	$15.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$
Salinity	$30.0 \pm 1.0 \text{ psu}$
pH	8.0 ± 0.1
Solution	Filter ($0.45 \mu\text{m}$) and sterilized seawater
Test solution volume	0.25 mL
Culture medium	PESI medium
Initial spore density	$200 \text{ gametophytes mL}^{-1}$
Experiment period	3 days (survival rate), 5 days (relative growth rate)
Validity	Survival rate $> 90\%$, Relative growth rate > 0.158

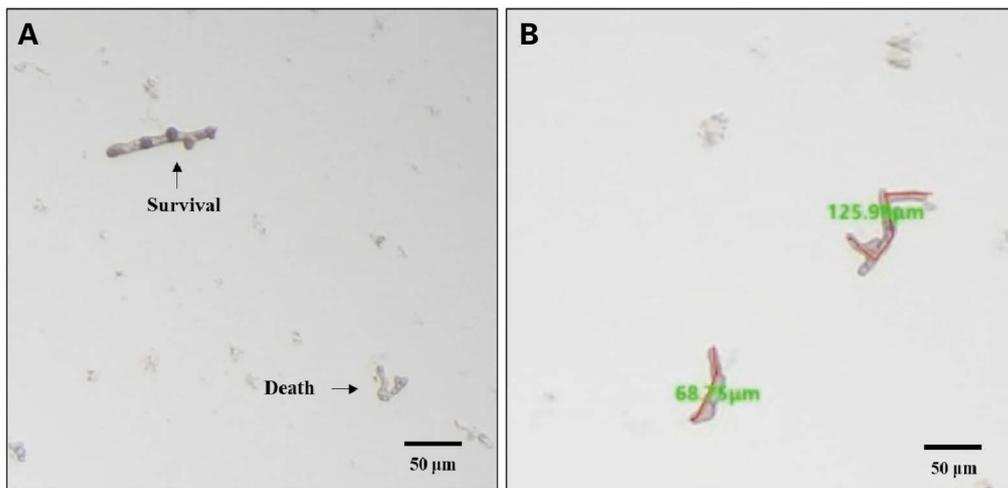


Fig. 3. Measurement of female gametophyte survival rate (A) and relative growth rate (B) in *Undaria pinnatifida*.

Table 2. Survival and relative growth rate in female gametophyte of *Undaria pinnatifida* exposed to dichlofluanid

Dichlofluanid concentration (mg L ⁻¹)	Survival rate (%)	Relative growth rate
Control	98.0±2.6 ^a	0.175±0.034 ^a
1	97.7±2.5 ^a	0.177±0.025 ^a
2	88.3±1.5 ^b	0.145±0.026 ^b
4	80.8±2.8 ^c	0.140±0.047 ^b
8	71.4±6.0 ^d	0.069±0.040 ^c
16	28.4±3.6 ^e	0.018±0.033 ^d
32	-	-

Different letters present significant differences ($p < 0.05$), as determined by Tukey's multiple range test.

를 측정하였고 시험결과 유효기준은 암배우체의 최적환경조건에서 10회 측정된 생존율과 상대성장률 결과를 바탕으로 생존율은 90%, 상대성장률은 0.158로 결정하였다 (MOF 2018; Lee *et al.* 2022b). 생존율 및 상대성장률은 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{생존율 (\%)} = S_t/S_0 \times 100$$

(S_0 = 전체 암배우체 수, S_t = 노출시간 동안 생존한 암배우체 수)

$$\text{상대성장률} = (\ln G_t - \ln G_0)/t$$

(G_0 = 초기 암배우체 길이, G_t = 노출후 암배우체 길이, t = 노출시간)

2.5. 통계분석

Dichlofluanid 독성평가 결과 사이의 유의성을 비교하기 위하여 IBM SPSS Statistics ver. 20 (IBM, New York, USA) 프로그램의 Tukey 다중비교 테스트로 유의성을 분석하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다. Dichlofluanid에 대한 암배우체의 생존율 및 상대성장률의 반수치사농도 (median lethal concentration, LC₅₀), 반수영향농도 (median Effective Concentration, EC₅₀)와 95% 신뢰구간 (95% confidence interval)은 Toxicalc software (Toxicalc 5.0, Tidepool scientific software, USA)의 logit 통계법을 이용하였고 무영향농도 (No Observed Effective Concentration, NOEC)와 최소영향농도 (Lowest

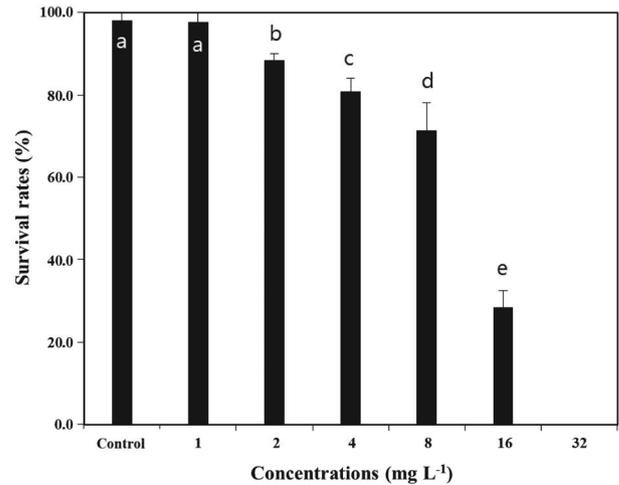


Fig. 4. Change of survival rate on female gametophyte of *Undaria pinnatifida* exposed to dichlofluanid. Vertical bars represent mean±SD. Female gametophyte was analyzed 3 times with 50 individuals each. Different letters present significant differences ($p < 0.05$), as determined by Tukey's multiple range test.

Observed Effective Concentration, LOEC)는 Dunnett's test로 계산하였다.

3. 결과

3.1. 암배우체의 생존율 및 상대성장률

U. pinnatifida 암배우체의 생존율 및 상대성장률은 dichlofluanid 농도가 높아질수록 감소하는 농도의존적인 반응을 나타냈다 (Table 2). 암배우체 생존율은 2 mg L⁻¹부터 유의적으로 ($p < 0.05$) 감소하기 시작하여 16 mg L⁻¹에서 대조구 평균값 대비 약 71% 이상 급격하게 감소하였고 (Fig. 4), 상대성장률 또한 2 mg L⁻¹부터 유의적으로 ($p < 0.05$) 감소하기 시작하여 8 mg L⁻¹에서 대조구 평균값 대비 약 60% 이상 급격하게 감소하였다 (Fig. 5). 시험 최고농도 32 mg L⁻¹에서는 암배우체가 생존하지 못하여 생존율 및 상대성장률이 분석되지 못하였다.

3.2. *U. pinnatifida* 암배우체를 이용한 dichlofluanid의 독성평가

Dichlofluanid에 노출된 *U. pinnatifida* 암배우체의 생존율 및 상대성장률 결과는 표준독성반응인 sigmoid 곡선으로 분석되었다 (Fig. 6). Dichlofluanid에 대한 암배우

체의 생존율과 상대성장률의 NOEC와 LOEC는 1, 2 mg L⁻¹로 나타났고 생존율의 LC₅₀ (95% confidence interval)은 10.82 (8.87~13.23) mg L⁻¹, 상대성장률의 EC₅₀ (95% confidence interval)은 6.58 (6.03~7.17) mg L⁻¹로 나타났다(Table 3). 암배우체의 상대성장률은 생존율과 같은 농도에서 dichlofluanid의 영향을 받기 시작하였지만, 생존율보다 dichlofluanid에 민감하게 반응하였다.

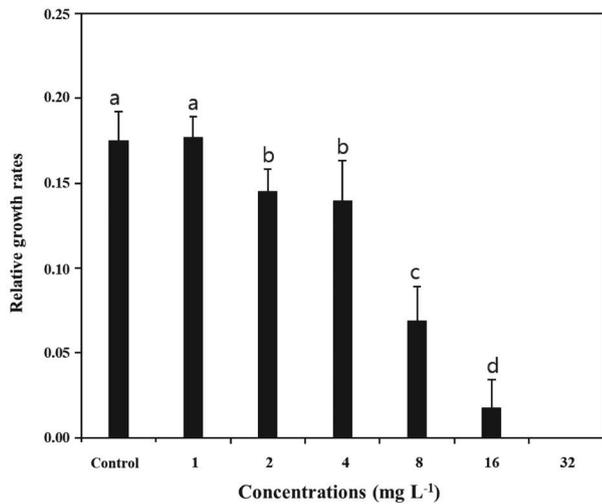


Fig. 5. Change of relative growth rate on female gametophyte of *Undaria pinnatifida* exposed to dichlofluanid. Vertical bars represent mean ± SD. Female gametophyte was analyzed 3 times with 50 individuals each. Different letters present significant differences ($p < 0.05$), as determined by Tukey's multiple range test.

4. 고 찰

Dichlofluanid는 오래전부터 제초제 및 살균제로 개발되어 사용되고 있으며(Tokur and Aksoy 2023), 최근 10년간 선박 및 해양구조물의 biofouling을 억제하기 위한 방오페인트 성분으로 광범위하게 사용되고 있다(Cima and Varello 2020). Dichlofluanid는 광량이 충분한 환경에서 OH⁻에 의해 축매되는 친핵성 가수분해로 인해 해양환경에서 분해가 매우 빠르게 나타나 반감기가 약 2시간 이내로 매우 짧다(Cai *et al.* 2021). Dichlofluanid는 빠르게 가수분해되어 분해산물인 N,N-dimethyl-N'-phenylsulfamide (DMSA)를 생성하게 된다(Koning *et al.* 2020). DMSA는 반감기가 약 48일로 dichlofluanid에 비

Table 3. Toxicity values of the female gametophyte of *Undaria pinnatifida* exposed to dichlofluanid (mg L⁻¹)

Values*	Survival rates	Relative growth rates
NOEC	1.0	1.0
LOEC	2.0	2.0
LC ₅₀	10.82	-
EC ₅₀	-	6.58
95% CI	8.87-13.23	6.03-7.17

*NOEC: no observed effective concentration, LOEC: lowest observed effective concentration, LC₅₀: median lethal concentration, EC₅₀: median effective concentration, 95% CI: 95% confidence interval.

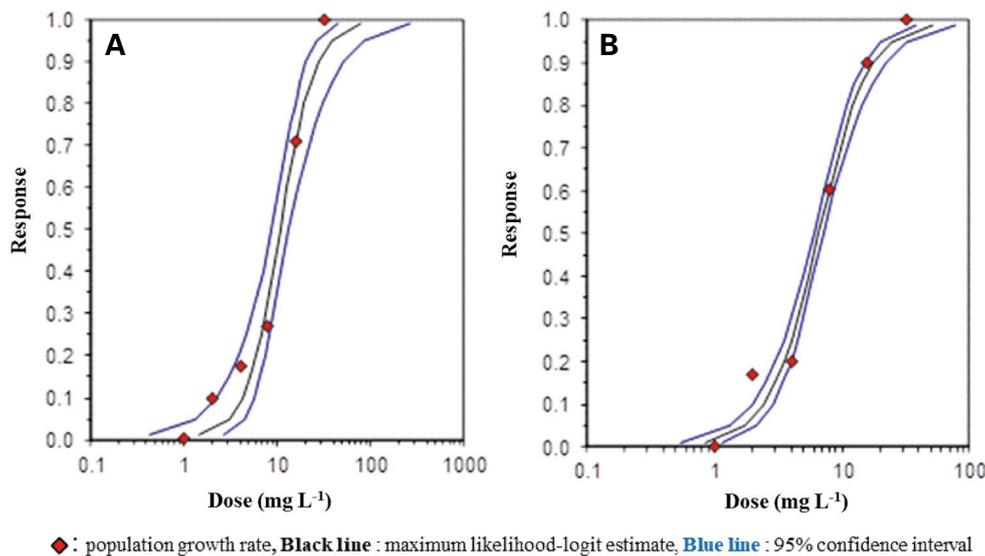


Fig. 6. Concentration-response curves for the effects of dichlofluanid on the survival rate (A) and the relative growth rate (B) of *Undaria pinnatifida* female gametophyte.

해 안정적이고 독성영향이 상대적으로 낮은 것으로 알려져 있다(Cai *et al.* 2021). 따라서 빠른 가수분해속도 및 분해산물의 독성만을 고려하여 dichlofluanid의 독성영향을 과소평가하고 사용이 증가할 수 있다(Hamwijk *et al.* 2005; Lee *et al.* 2022a). Dichlofluanid의 가수분해 속도는 광조건 이외에도 pH, 온도 및 해양환경 내 용해된 유기물에 따라 상당한 영향을 받는 것으로 나타났다(Lee *et al.* 2022a). Dichlofluanid는 미립자 물질과 결합하는 특성이 강해 퇴적물과 쉽게 결합하고, pH가 증가할수록 dichlofluanid와 퇴적물 사이의 결합력이 증가한다(Cima and Varello 2020; Cai *et al.* 2021). DMSA는 퇴적물에서 N,N-dimethylsulfamide (N,N-DMS)로 변환되어 독성이 감소하지만 N,N-DMS는 친수성 화합물이며 반감기가 1,000일 이상이기 때문에 해양환경의 광범위한 지역에 영향을 미칠 수 있다(Koning *et al.* 2020). 이러한 가수분해속도 변동과 결합특성으로 dichlofluanid와 분해산물은 갯벌과 같은 퇴적물 내 축적되어 지속적으로 해양환경으로 방출될 수 있다.

Dichlofluanid와 분해산물은 생물영양 및 축적 메커니즘이 아직 명확히 밝혀지지 않았지만 해양생물에게 독성영향을 나타낼 수 있는 물질로 확인되었다(Konstantinou and Albanis 2004; Cima and Varello 2020; Koning *et al.* 2020). Dichlofluanid는 glutathione (GSH)을 포함한 thiol group과 결합하여 reactive oxygen species (ROS) 생성을 유도하고 산화스트레스를 일으킨다(Rola *et al.* 2020; Lee *et al.* 2022a). Hydroxyl radical, hydrogen peroxide (H_2O_2), Super oxide anion (O_2^-)와 같은 과도한 ROS의 생성은 미토콘드리아의 호흡을 억제하고(Rola *et al.* 2020; Lee *et al.* 2023), 지질과산화(lipoperoxide)를 유발하여 세포막을 손상시키는 세포독성을 일으킨다(Lee *et al.* 2023). 특히 dichlofluanid는 지질과산화를 심각하게 발생시키는 것으로 알려진 carbon tetrachloride보다 강력하게 지질과산화를 유발했다(Suzuki *et al.* 2004). 이러한 산화스트레스는 단백질의 구조를 변화시켜 기능을 억제하고 DNA 복제 및 복구를 방해하는 등 해양생물의 다양한 조직에서 독성영향을 나타내 세포사멸을 유발하게 된다(Lee *et al.* 2023; Park *et al.* 2023).

Dichlofluanid는 미세조류, 박테리아, 무척추동물, 어류 및 해조류에서 다양한 독성영향이 보고되었다(Table 4). 특히 갑각류와 패류에서 심각한 독성영향이 보고

되었다(Bellas 2006; Rola *et al.* 2020; Lee *et al.* 2022b). Dichlofluanid에 5분 노출된 발광박테리아(*Vibrio fischeri*) 발광량, 24시간 노출된 물벼룩(*Daphnia magna*) 유영저해율, 30시간 노출된 미세조류(*Selenastrum capricornotum*)의 개체군성장률의 EC_{50} 은 각각 0.113 ± 0.018 , 1.3 ± 0.17 , 0.064 ± 0.0118 $mg\ L^{-1}$ 로 보고되었고 특히 *V. fischeri*와 *D. magna*는 독성이 더 높다고 알려진 irgarol과 chlorothalonil보다 dichlofluanid의 독성이 높게 나타났다(Fernández-Alba *et al.* 2002). Dichlofluanid에 96시간 노출된 갑각류(*Neomysis awatschensis*)의 어린개체와 성체의 생존율의 LC_{50} 은 각각 $3.1\ \mu g\ L^{-1}$, $24.5\ \mu g\ L^{-1}$ 로 보고되었다(Lee *et al.* 2022a). Dichlofluanid에 48시간 노출된 성게(*Paracentrotus lividus*)의 배아 발달(EC_{50} , $627\ \mu g\ L^{-1}$) 및 유생성장(EC_{10} , $206\ \mu g\ L^{-1}$)을 억제하였고 진주담치(*Mytilus edulis*)의 배아발달(EC_{50} , $81\ \mu g\ L^{-1}$)을 감소시켰다(Bellas 2006). 피낭동물(*Botryllus schlosseri*)의 운동성 및 식세포 작용을 감소시키고 혈액세포 사멸과 산화스트레스를 나타냈다(Cima and Varello 2020). 홍합(*Perna perna*)은 dichlofluanid의 농도 $0.1\sim 100\ \mu g\ L^{-1}$ 범위에서 족사형성 억제부터 산소소비량 증가, 항산화 방어 감소 등 생리적인 기능에 부정적인 영향을 나타냈다(Rola *et al.* 2020). 또한 어류 fathead minnow의 세포주(*Epithelioma Papulosum Cyprini*)를 dichlofluanid에 24시간 및 96시간 노출하였을 때 IC_{50} (half maximal inhibitory concentration)은 각각 7.313 와 $11.941\ mg\ L^{-1}$ 로 나타났다(Tokur and Aksoy 2023).

본 연구결과 또한 dichlofluanid는 *U. pinnatifida* 암배우체의 생존율과 상대성장률에 독성영향을 미쳤다. 암배우체의 독성영향은 dichlofluanid에 농도의존적으로 증가하는 경향이 나타났다. *U. pinnatifida* 생존율 및 상대성장률의 EC_{50} 값 10.82 , $6.58\ mg\ L^{-1}$ 기준으로 갑각류와 패류에 비해 dichlofluanid에 민감하게 반응하지 않았다. 2009년 우리나라 연안 해수 평균농도가 $13.43\ ng\ L^{-1}$ 으로 조사된 것으로 미루어(Lee *et al.* 2010) 우리나라 해양환경 내 존재하는 dichlofluanid는 *U. pinnatifida* 배우체에 영향을 미치기 어렵다. Dichlofluanid와 같은 $\mu g\ L^{-1}$ 이하의 미세오염물질(micropollutants)은 매우 낮은 농도로 인해 생물영향이 급격하게 발생하지 않을 수 있지만, 환경 내 축적되고 지속적으로 방출되어 해양생물에게 부정적인 영향을 미칠 수 있다(Johnson *et al.* 2020). 대표적으

Table 4. Toxicity values of organic booster biocides in marine organisms (mg L⁻¹)

Species	End points	Chlorothalonil	Dichlofluanid	DCOIT	Irgarol	Diuron	Reference
Bacteria							
<i>Vibrio fischeri</i>	5 min, EC ₅₀		0.036±0.0047				Fernandez-Alba et al. 2002
Algae							
<i>Nitzschia pungens</i>	96 h, EC ₅₀	0.361 ± 0.129	0.267 ± 0.038	-	0.0006 ± 0.0008	0.0066 ± 0.0068	Jung et al. 2017
<i>Selenastrum capricornutum</i>	72 h, EC ₅₀	0.0068 ± 0.001	-	0.003 ± 0.0004	0.0108 ± 0.0017	0.045 ± 0.0079	Fernandez-Alba et al. 2002
<i>Saccharina latissima</i>	3.25 h, EC ₅₀	-	-	0.621 (0.223-1.044)*	0.010 (0.007-0.013)	0.007 (0.004-0.011)	Johansson et al. 2012
<i>Undaria pinnatifida</i>	3 d, LC ₅₀	0.141 (0.121-0.166)	-	-	-	-	Park et al. 2023
			10.82 (8.87-13.23)				This study
	5 d, EC ₅₀		5.58 (6.03-7.17)				
<i>Ulva pertusa</i>	48 h, EC ₅₀	-	-	0.890 (0.833-0.946)	0.172 (0.111-0.232)	0.128 (0.101-0.154)	Lee et al. 2020b
	96 h, EC ₅₀	-	-	0.783 (0.664-0.902)	0.048 (0.033-0.066)	0.069 (0.064-0.075)	Lee et al. 2020c
Crustacean							
<i>Artemia</i> sp.	48 h, LC ₅₀	2.683 ± 0.102	154.944 ± 49.428	0.318 ± 0.092	9.734 ± 2.268	30.573 ± 1.732	Jung et al., 2017
<i>Brachionus plicatilis</i>	72 h, EC ₅₀	0.506 (0.424-0.606)					Heo et al. 2021
<i>Daphnia magna</i>	48 h EC ₅₀	0.028 ± 0.005			7.3 ± 1.24	8.6 ± 1.3	Fernandez-Alba et al. 2002
<i>Elasmopus rapax</i>	96 h, LC ₅₀	0.067 (0.053-0.084)		0.004 ± 0.0007			Bao et al. 2011
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	96 h, LC ₅₀	0.29 (0.26-0.33)					Onduka et al. 2012
<i>Neomysis avatschensis</i>	96 h, LC ₅₀		0.0031				Lee et al. 2022a
<i>Palaemonetes pugio</i>	96 h, LC ₅₀	0.396 (0.331-0.472)					Key et al. 2003
<i>Tigriopus japonicus</i>	96 h, LC ₅₀	0.091 (0.086-0.096)			2.4 (1.7-3.4)	11.0 (10.5-11.4)	Bao et al. 2011
Echinodermata							
<i>Paracentrotus lividus</i>	48 h, EC ₅₀ embryo		0.227				Bellas 2006
	48 h, EC ₅₀ juvenile		0.627				
Shellfish							
<i>Mytilus edulis</i>	48 h, EC ₅₀		0.081				Bellas 2006
Fish							
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	7 day, LC ₅₀			0.014 (0.011-0.017)	25 (14-80)	74 (29-3,684)	Okamura et al. 2002
	28 day, LC ₅₀			0.014 (0.011-0.017)	0.88 (0.46-1.3)	0.23 (0.0089-0.59)	
Fish cell (CHSE-sp)	24 h, EC ₅₀			2.6	100 <	52	
Fathead minnow (EPC)	24 h, IC ₅₀		7.313				Tokur and aksy 2003

* The numbers within the parentheses represent the confidence interval of the toxicity values.

로 dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT)는 북미에서 미세조류의 개체수를 감소시켰으며 (Batucan *et al.* 2022), polychlorinated biphenyl (PCB)는 고래류의 생식기능에 이상을 유발하는 것이 보고되었다 (Jepson *et al.* 2016). 이처럼 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이하의 미세오염물질에 장기간 노출되는 경우 발생할 수 있는 독성영향은 명확하게 예측하기 어렵다. Dichlofluanid 또한 우리나라 연안에서 농도가 지속적인 증가가 예상되며 (Lee and Lee 2016), 농약으로 사용되어 해양환경으로 지속적으로 유입되고 있어 해양생물을 이용한 dichlofluanid의 독성영향 평가는 중요하다고 판단된다.

일반적으로 제초기 또는 살균제 기원의 BBs는 광계 II (photosystem II)의 반응중심 단백질의 전자전달을 억제하여 해조류에서 광합성 독성을 나타내지만 (Deng *et al.* 2012; Lee *et al.* 2020a), dichlofluanid는 광계II를 억제하는 반응이 발견되지 않았다 (Johansson *et al.* 2012). Dichlofluanid는 광계II를 억제하는 것으로 보이지만 해조류의 성장에 필수적인 carbon concentrating mechanism (CCM)에 영향을 미쳐 간접적으로 광합성 작용을 억제하는 것으로 보인다 (Johansson *et al.* 2012). 해조류의 CCM은 세포막 외부의 미세 산성영역과 HCO_3^- 를 CO_2 로 변화를 촉매하는 세포질 탄산탈수효소 (enzyme carbonic anhydrase)의 조합이다 (Mercado *et al.* 2006). 해수에서 CO_2 의 확산 저항이 크기 때문에 해조류와 같은 수중 광합성 생물의 광합성 속도는 제한적이다 (Axelsson *et al.* 2000). 이러한 광합성 속도 저하를 극복하기 위하여 CCM은 H β -ATPases에 의해서 양성자를 원형질막 밖으로 배출하고 세포막 외부를 산성화시킨다 (Klenell *et al.* 2004). 외부에 축적된 산성으로 인해 CO_2 구배 차이가 발생하고 외부의 CO_2 가 더 빠르게 세포 내로 유입되어 광합성 속도가 유지될 수 있도록 CO_2 를 공급한다 (Mercado *et al.* 2006). CCM의 기능이 억제되면 CO_2 의 부족으로 광합성 속도가 급격하게 감소하기 때문에 간접적으로 광합성 독성영향을 나타낼 수 있다 (Mercado *et al.* 2006; Johansson *et al.* 2012). 이는 비특이적 작용이며 dichlofluanid의 thiol group과 결합하여 (Rola *et al.* 2020) CCM과 연관된 효소의 활성을 감소시키고 결국 간접적으로 CCM에 영향을 미치는 것으로 판단된다 (Johansson *et al.* 2012).

Dichlofluanid는 스페인, 독일, 그리스 덴마크의 선박활동이 활발한 연안에서 최대 600 ng L^{-1} 로 검출되며

(Daehne *et al.* 2017; Cima and Barello 2020; Koning *et al.* 2020; Cai *et al.* 2021), 우리나라 또한 dichlofluanid가 검출되었다 (Lee and Lee 2016). Dichlofluanid는 우리나라의 주요 만에서 2006년 평균 $7.62 (0\sim 61.69) \text{ ng L}^{-1}$, 2009년 평균 $13.43 (0\sim 67.96) \text{ ng L}^{-1}$ 으로 검출되었고 특히 울산, 부산, 군산 등 대형항만에서 높게 나타났다 (Lee *et al.* 2010). 또한 2006, 2009, 2013년 우리나라 연안의 어항, 항만의 BBs (chlorothalonil, dichlofluanid, irgarol 1051) 농도를 분석한 결과 3가지 BBs의 평균농도는 10.83, 54.33, 63.06 ng L^{-1} 으로 2006년 이후 방오제 오염이 증가하고 있으며, 2009년과 2013년 어항에서 dichlofluanid의 비율은 50% 이상이었다 (Lee and Lee 2016). 2015년 부산 13개와 울산 11개 지점을 포함하는 우리나라 연안 15개 지점의 퇴적물에 대한 분석결과 dichlofluanid는 검출되지 않았으나, 분해산물인 DMSA는 1개 지점을 제외하고 모두 검출되었다 (Lee *et al.* 2015). 유기주석화합물을 제외한 BBs는 한국 연안에서 평균 $443 (195\sim 738) \text{ ng g}^{-1} \text{ dry weight}$ 으로 조사되었으며, 특히 울산만과 부산만에서 각각 $505 (132\sim 790)$, $898 (371\sim 2,664) \text{ ng g}^{-1} \text{ dry weight}$ 으로 높게 검출되었고 DMSA는 chlorothalonil과 octyltin과 함께 가장 높은 비율을 차지하는 BBs였다 (Lee *et al.* 2015). Dichlofluanid는 도포된 상태에서 해양환경으로 침출되는 것으로 알려져 있고 (Cai *et al.* 2021), 방오제 용도뿐만 아니라 농약성분으로도 많이 활용되기 때문에 수계를 따라 우리나라 연안에 지속적으로 유입될 수 있다 (Lee *et al.* 2015; Lee and Lee 2016). 2008년 사용이 금지된 TBT가 아직까지 우리나라 연안에서 높은 농도로 검출되는 것으로 미루어 (Lee *et al.* 2015), 퇴적물에 쉽게 축적되는 dichlofluanid의 농도 또한 시간이 지날수록 증가할 것으로 예상된다. 따라서 *U. pinnatifida*와 같은 주요 양식해조류 보호와 해조류의 건강도에 미치는 영향을 평가하기 위해 지속적인 연구가 필요하며, 본 연구결과와 독성값은 dichlofluanid에 대한 *U. pinnatifida* 초기생활사의 건강도를 평가하기 위한 기초자료로 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

적 요

Dichlofluanid는 해양환경 내 빠르게 분해되지만 농약 및 방오제로 사용되고 퇴적물에 쉽게 축적되어 지속

적으로 해양환경으로 유입되고 있다. Dichlofluanid는 다양한 해양생물에게 독성영향을 미치는 것으로 알려져 있지만 해조류에 대한 독성연구는 충분히 보고되지 않았다. 따라서 우리나라의 주요 양식생물인 미역(*Undaria pinnatifida*) 암배우체의 생존율 및 상대성장률을 이용하여 dichlofluanid의 독성영향을 분석하였다. *U. pinnatifida*의 암배우체를 dichlofluanid (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg L⁻¹)에 노출하였고 암배우체 생존율의 무영향농도 (NOEC), 최소영향농도 (LOEC), 반수치사농도 (LC₅₀)는 1, 2, 10.82 (8.87~13.23) mg L⁻¹, 상대성장률의 NOEC, LOEC, 반수영향농도 (EC₅₀)은 1, 2, 6.58 (6.03~7.17) mg L⁻¹로 분석되었다. 본 연구결과는 dichlofluanid에 대한 *U. pinnatifida* 암배우체의 독성영향을 평가하기 위한 중요한 참고자료로 활용될 것으로 기대된다.

CRedit authorship contribution statement

UK Hwang: Writing-Original draft, Writing-Review & editing. **BR Sim:** Methodology. **YH Park:** Investigation. **JW Lee:** Conceptualization, Writing-Review & editing, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

사 사

본 연구는 2023년 국립수산물과학원 갯벌연구센터 (R2023027)의 연구비 지원으로 수행되었다.

REFERENCES

- Abreu FEL, JNL da Silva, ÍB Castro and G Fillmann. 2020. Are antifouling residues a matter of concern in the largest South American port? J. Hazard. Mater. 398:122937. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122937>
- Almeida JC, ÍB Castro, BZ Nunes and E Zanardi-Lamardo. 2023. Antifouling booster biocides in Latin America and the Caribbean: A 20-year review. Mar. Pollut. Bull. 189:114718. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114718>
- Amara I, W Miled, RB Slama and N Ladhari. 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 57:115-130. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.12.001>
- Axelsson L, JM Mercado and FL Figueroa. 2000 Utilization of HCO₃⁻ at high pH by the brown macroalga *Laminaria saccharina*. Eur. J. Phycol. 35:53-59. <https://doi.org/10.1080/09670260010001735621>
- Bao VWW, KMY Leung, JW Qiu and MHW Lam. 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. Mar. Pollut. Bull. 62:1147-1151. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.041>
- Batucan NS, LA Tremblay, GL Northcott and CD Matthaei. 2022. Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. Environ. Adv. 7:100164. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100164>
- Bellas J. 2006. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. Sci. Total Environ. 367:573-585. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.028>
- Cai Y, JT Koning, K Bester and UE Bollmann. 2021. Abiotic fate of tolylfluanid and dichlofluanid in natural waters. Sci. Total Environ. 752:142160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142160>
- Campos BG, LB Moreira, GFE Pauly, ACF Cruz, FC Perina, G Abreu, G Fillmann and DMS Abessa. 2023. Water and sediment toxicity and hazard assessment of DCOIT towards neotropical marine organisms. Environ. Pollut. 330:121797. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121797>
- Chen L, Y Xu, WW Wang and PY Qian. 2015. Degradation kinetics of a potent antifouling agent, butenolide, under various environmental conditions. Chemosphere 119:1075-1083. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.056>
- Cima F and R Varello. 2020. Immunotoxicity in Ascidians: Antifouling compounds alternative to organotin-V. the case of dichlofluanid. J. Mar. Sci. Eng. 8:396. <https://doi.org/10.3390/jmse8060396>
- Daehne D, C Fürle, A Thomsen, B Watermann and M Feibicke. 2017. Antifouling biocides in German marinas: Exposure assessment and calculation of national consumption and emission. Integr. Environ. Assess. Manag. 13:892-905. <https://doi.org/10.1002/ieam.1896>
- Deng X, K Gao and J Sun. 2012. Physiological and biochemical responses of *Synechococcus* sp. PCC7942 to irgarol and diuron. Aquat. Toxicol. 122-123:113-119. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.05.001>

- org/10.1016/j.aquatox.2012.06.004
- Fernández-Alba AR, MD Hernando, L Piedra and Y Chisti. 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Anal. Chim. Acta* 456:303–312. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00037-5)
- Hamwijk C, A Schouten, EM Foekema, JC Ravensberg, MT Col-lombon, K Schmidt and M Kugler. 2005. Monitoring of the booster biocide dichlofluanid in water and marine sediment of Greek marinas. *Chemosphere* 60:1316–1324. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.072>
- Heo S, JW Lee, H Choi, SJ Yoon, KY Kwon, UK Hwang and YH Park. 2021. Toxic effect of chlorothalonil, an antifouling agent, on survival and population growth rate of a marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Korean J. Environ. Biol.* 39:390–398. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2021.39.3.390>
- Jepson PD, R Deaville, JL Barber, À Aguilar, A Borrell, S Murphy, J Barry, A Brownlow, J Barnett, S Berrow, AA Cunningham, NJ Davison, M etn Doeschate, R Esteban, M Ferreira, AD Foote, T Genov, J Giménez, J Loveridge, À Llavona, V Martin, DL Maxwell, A Papachlimitzou, R Penros, MW perkins, B smith, R de Stephanis, N Tregenza, P Verborgh, A Fernandez and RJ Law. 2016. PCB pollution continues to impact populations of orcas and other dolphins in European waters. *Sci. Rep.* 6:18573. <https://doi.org/10.1038/srep18573>
- Johansson P, KM Eriksson, L Axelesson and H Blanck. 2012. Effects of seven antifouling compounds on photosynthesis and inorganic carbon use in sugar kelp *Saccharina latissima* (Linnaeus). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63:365–377. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9778-z>
- Johnson AC, X Jin, N Nakada and JP Sumpter. 2020. Learning from the past and considering the future of chemicals in the environment. *Science* 367:384–387. <https://doi.org/10.1126/science.aay663>
- Jung SM, JS Bae, SG Kang, JS Son, JH Jeon, HJ Lee, JY Jeon, M Sidharthan, SH Ryu and HW Shin. 2017. Acute toxicity of organic antifouling biocides to phytoplankton *Nitzschia pungens* and zooplankton *Artemia* larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 124:811–818. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.047>
- Key PB, SL Meyer and KW Chung. 2003. Lethal and sub-lethal effects of the fungicide chlorothalonil on three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Contam. Agric. Wastes* 38:539–549. <https://doi.org/10.1081/PFC-120023512>
- Klenell M, P Snoeijs and M Pedersen. 2004. Active carbon uptake in *Laminaria digitata* and *L. Saccharina* (Phaeophyta) is driven by a proton pump in the plasma membrane. pp. 41–53. In: *Biology of the Baltic Sea. Developments in Hydrobiology*, Vol 176 (Kautsky H and P Snoeijs, eds.). Springer. Dordrecht, Germany. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0920-0_4
- Koning JT, UE Bollmann and K Bester. 2020. The occurrence of modern organic antifouling biocides in Danish marinas. *Mar. Pollut. Bull.* 158:111402. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111402>
- Konstantinou IK and TA Albanis. 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: A review. *Environ. Inter.* 30:235–248. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00176-4)
- Lee H, J Park, K Shin, S Depuydt, S Choi, J De Saeger and T Han. 2020c. Application of a programmed semi-automated *Ulva pertusa* bioassay for testing single toxicants and stream water quality. *Aquat. Toxicol.* 221:105426. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105426>
- Lee H, S Depuydt, S Choi, T Han and J Park. 2020b. Rapid toxicity assessment of six antifouling booster biocides using a microplate-based chlorophyll fluorescence in *Undaria pinnatifida* gametophytes. *Ecotoxicology* 29:559–570. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02207-2>
- Lee JW, AH Jo, DC Lee, CY Choi, JC Kang and JH Kim. 2023. Review of cadmium toxicity effects on fish: Oxidative stress and immune responses. *Environ. Res.* 236:116600. <http://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116600>
- Lee JW, H Choi, YH Park, SM Lee, YS Choi, S Heo and UK Hwang. 2020a. Toxic evaluation of antifouling paint (Irgarol and Diuron) using the population growth rate of marine diatom, *Skeletonema costatum*. *J. Mar. Life Sci.* 5:9–16. <https://doi.org/10.23005/KSMLS.2020.5.1.9>
- Lee JW, YH Park, BR Sim, HJ Jeon, S Heo and UK Hwang. 2022b. A study of environmental conditions of survival rate and relative growth rate in female gametophyte of *Undaria pinnatifida* for toxicity assessment. *J. Mar. Life Sci.* 7:86–93. <https://doi.org/10.23005/ksmls.2022.7.2.86>
- Lee MRN, UJ Kim, IS Lee, MK Choi and JE Oh. 2015. Assessment of organotin and tin-free antifouling paints contamination in the Korean coastal area. *Mar. Pollut. Bull.* 99:157–165. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.038>
- Lee S and YW Lee. 2016. Determination of the concentrations of alternative antifouling agents on the Korean coast. *Mar. Pollut. Bull.* 113:263–257. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.030>
- Lee S, MN Haque and JS Rhee. 2022a. Acute and mutigen-erational effects of environmental concentration of the antifouling agent dichlofluanid on the mysid model, *Neomysis awatschensis*. *Environ. Pollut.* 311:119996. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119996>
- Lee SE, HS Won, YW Lee and DS Lee. 2010. Study on the new antifouling compounds in Korean coasts. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85:538–543. <https://doi.org/10.1007/s00128-010-0145-3>

- Liu F, SJ Pang and SQ Gao. 2016. Growth performance of unialgal gametophytes of the brown alga *Saccharina japonica* in mass culture conditions. *J. Appl. Phycol.* 28:1145–1152. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0675-5>
- Luo HW, M Lin, XX Bai, B Xu, M Li, JJ Ding, WJ Hong and LH Guo. 2023. Water quality criteria derivation and tiered ecological risk evaluation of antifouling biocides in marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 187:114500. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114500>
- Mercado JM, JR Andria, JL Perez-Llorens, JJ Vergara and L Axelsson. 2006. Evidence for a plasmalemma-based CO₂ concentrating mechanism in *Laminaria saccharina*. *Photosynth. Res.* 88:259–268. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9039-y>
- MOF. 2018. Korean Standard Method of Examination for Marine Environment. Ministry of Oceans and Fisheries. Sejong, Korea. <https://www.law.go.kr/LSW/admRullInfoP.do?admRulSeq=2100000170850#J6-0:0>. Accessed August 29, 2023
- Okamura H, T Watanabe, I Aoyama and M Hasobe. 2002. Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere* 46:945–951. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00204-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00204-1)
- Onduka T, A Kakuno, K Kono, K Ito, K Mochida and K Fujii. 2012. Toxicity of chlorothalonil to marine organisms. *Fish. Sci.* 78:1301–1308. <https://doi.org/10.1007/s12562-012-0562-9>
- Park YH, BR Sim, UK Hwang and JW Lee. 2023. The impact of chlorothalonil on female gametophyte survival rate and relative growth rate of *Undaria pinnatifida*. *Korean J. Environ. Biol.* 41:256–265. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2023.41.3.256>
- Paz-Villarraga CA, IB Castro and G Fillmann. 2022. Biocides in antifouling paint formulations currently registered for use. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29:30090–30101. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17662-5>
- Rola RC, AS Guerreuro, H Gabe, MA Geihs, CE da Rosa and JZ Sandrini. 2020. Antifouling biocide dichlofluanid modulates the antioxidant defense system of the brown mussel *Perna perna*. *Mar. Pollut. Bull.* 157:111321. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111321>
- Suzuki T, H Nojiri, H Isono and T Ochi. 2004. Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil. *Toxicology* 204:97–107. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.025>
- Tatewaki M. 1966. Formation of a crustose sporophyte with unilocular sporangia in *Scytosiphon lomentaria*. *Phycologia* 6:62–66. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-6-1-62.1>
- Tokur O and A Aksoy. 2023. Environmental concentrations of antifouling biocides affect cell proliferation, possibly by a synergic interaction. *J. Sea Res.* 191:102330. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2022.102330>