

Chlorothalonil이 미역(*Undaria pinnatifida*) 배우체의 생존 및 상대성장률에 미치는 영향

박윤호, 심보람¹, 황운기², 이주욱^{1,*}

국립환경과학원 환경건강연구부 위해성평가연구과, ¹국립수산과학원 서해수산연구소 기후환경자원과,

²국립수산과학원 기후환경연구부 갯벌연구센터

The impact of chlorothalonil on female gametophyte survival rate and relative growth rate of *Undaria pinnatifida*

Yun-Ho Park, Bo-Ram Sim¹, Un-Ki Hwang² and Ju-Wook Lee^{1,*}

Risk Assessment Division, Environmental Health Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Republic of Korea

¹West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Incheon 22383, Republic of Korea

²Tidal Flat Research Center, National Institute of Fisheries Science, Gunsan 53001, Republic of Korea

Contribution to Environmental Biology

- Chlorothalonil caused a significant decrease in the survival and relative growth rate of *Undaria pinnatifida* female gametophyte.
- The findings on the impact concentration, in a concentration-dependent manner, on female gametophytes are anticipated to be utilized as reference data for evaluating the effects of chlorothalonil on the health of *Undaria pinnatifida*.

*Corresponding author

Ju-Wook Lee

Tel. 032-745-0681

E-mail. leejuwook84@gmail.com

Received: 3 August 2023

Revised: 22 August 2023

Revision accepted: 29 August 2023

Abstract: Chlorothalonil is continuously introduced into the marine environment and has significant toxic effects on various marine organisms, however, research on its effect on seaweed is limited. Therefore, we analyzed the impact of chlorothalonil on the early life stages of major aquaculture species in Korea, *Undaria pinnatifida*. *U. pinnatifida* female gametophytes were exposed to different concentrations of chlorothalonil (0, 0.03, 0.05, 0.10, 0.20, and 0.40 mg L⁻¹), and their survival rate 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 0.05, 0.10, and 0.141 (0.121–0.166) mg L⁻¹. NOEC, LOEC, and median effective concentration (EC₅₀) for relative growth rate were 0.10, 0.20, and 0.124 (0.119–0.131) mg L⁻¹. Therefore, female gametophytes of *U. pinnatifida* are expected to experience toxic effects at concentrations above 0.05–0.10 mg L⁻¹ of chlorothalonil. These research findings are anticipated to serve as crucial reference data for evaluating the effects of chlorothalonil on the health of *U. pinnatifida* in the early life stages.

Keywords: antifouling agent, chlorothalonil, seaweed, *Undaria pinnatifida*, gametophyte

1. 서 론

Biofouling은 해수에 노출된 인공구조물 표면에 미생물, 조류와 같은 해양생물이 부착되어 발생한다(Amara *et al.* 2018). Biofouling은 선박의 연료소비와 해양구조물의 유지보수 비용을 증가시켜 경제적 손실을 일으킨다(Soroldoni *et al.* 2017). Biofouling으로 인한 경제적 손실을 막기 위하여 방오도료(Antifouling agents, AFs)를 사용한다. AFs는 해수에 노출된 인공물의 표면에 도포되어 해양생물의 부착을 막는다. AFs 성분으로 유기주석 방오제(organotin biocides)인 tributyltin (TBT)이 가장 널리 사용되었으나, 심각한 생물독성으로 2003년 국제해사기구에서 사용이 금지되었다. 현재 TBT를 대체하기 위하여 copper oxide (Cu₂O)와 copper thiocyanate (CuSCN)가 사용되며(Amara *et al.* 2018), 부족한 방오능력을 보완하기 위하여 다양한 booster biocides (BBs)가 AFs에 첨가된다(Yee *et al.* 2016). 이러한 BBs는 TBT로 대표되는 유기주석 방오제보다 독성이 낮게 알려져 있지만 다양한 수생생물에게 독성을 나타낼 가능성이 보고되었다(Jung *et al.* 2017; Morais *et al.* 2023).

BBs 중에서 chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachlorobenzene-1,3-dicarbonitrile, CTN)은 세계에서 두 번째로 많이 사용되는 유기염소계 살균제이다(Lin *et al.* 2019). CTN은 1966년 잔디를 보호하기 위하여 처음 사용되었고(Van Scoy and Tjeerdema 2014), 농작물의 진균성 병원균을 방제하기 위하여 농업산업에 광범위하게 사용되고 있다(Zhang *et al.* 2017). CTN은 탁월한 살균능력으로 선박 및 해양구조물 표면에 박테리아, 대형조류, 홍합과 같은 무척추동물의 부착 및 성장을 방지하기 위한 BBs로 사용되고 있다(Lee *et al.* 2019; Li *et al.* 2020). CTN은 일반적으로 포유류 독성이 낮게 알려져 있지만(Guerreiro *et al.* 2020), 플랑크톤과 어류 등의 해양생물에게 독성영향이 보고된 바 있다(Lee *et al.* 2019; Lopes *et al.* 2020; Heo *et al.* 2021). CTN은 로티퍼(*Brachionus plicatilis*)의 생존율과 개체군성장률을 감소시켰으며(Heo *et al.* 2021), 어류의 부화, 생존, 성장 등 대부분의 생활사에서 독성영향을 발생시켰다(Hamer *et al.* 2019; Lopes *et al.* 2020). CTN은 Zebrafish (*Danio rerio*)의 간과 뇌에서 유전자 전자를 변화시켰으며(Christen *et al.* 2019), 산화스트레스를 유발하였다(Lopes *et al.* 2020). CTN의 분해산물 SDS-3701 (4-hydroxy-chlorothalonil)

과 chlorothalonil sulfonic acid (R417888) 또한 지속적으로 환경 내 잔류하여 수생 생물에게 영향을 미칠 수 있다(Zhang *et al.* 2016).

해양생물의 CTN에 대한 영향을 분석하기 위하여 플랑크톤, 갑각류, 어류와 같은 다양한 생물을 이용한 연구가 진행되고 있지만(Jung *et al.* 2017; Morais *et al.* 2023), 해조류에 대한 연구는 부족하다. 해조류는 해양생태계 내 1차 생산자이며, 생태계 기능과 건강성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다(Al-Dulaimi *et al.* 2021). 또한 우리나라와 같은 해조류 양식 강국에서 해조류는 지역사회에 산업적 및 경제적으로 미치는 영향이 크다. 따라서 우리나라에서 가장 많이 양식되는 해조류 중에 하나인 미역(*Undaria pinnatifida*)의 초기생활사를 이용하여 CTN의 생물영향평가를 수행하였다. *U. pinnatifida* 암배우체의 생존율 및 상대성장률을 이용하여, CTN에 대한 무영향농도(No observed effective concentration, NOEC), 최소영향농도(Lowest observed effective concentration, LOEC), 반수치사농도(Median lethal concentration, LC₅₀) 또는 반수영향농도(Median effective concentration, EC₅₀)를 산출하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시험생물

본 연구에서 사용된 *U. pinnatifida*의 암배우체는 국립수산물품질관리원 수산종자육종연구소에서 분양받았다. 암배우체는 PESI 배양액(Tatewaki *et al.* 1966)을 이용하여 1L 둥근 플라스크에 광주기 12 Light : 12 Dark, 온도 15°C에서 1개월 이상 계대배양하였고 배양액은 주 1회 교환하였다. 규조류로 인한 오염을 막기 위하여 서해수산연구소에서 취수된 자연해수를 0.45 µm membrane filter (Mixed cellulose ester membrane Advance A045A047A; Adventec, CA, USA)로 여과 후 멸균하여 사용하였고 PESI 배양액에 GeO₂를 1 mg L⁻¹의 농도로 첨가하였다. 계대배양 중인 *U. pinnatifida*의 암배우체 1g을 PESI 배양액 100 mL와 함께 mixer (HR2607; Koninklijke Philips N.V., Amsterdam, Netherlands)에 넣어 약 30초 분쇄하였다. 분쇄한 암배우체는 50 µm sieve를 이용하여 50 µm 이상의 암배우체를 제거한 뒤 광주기 12 Light : 12 Dark, 온도 15°C, 광량 10 µmol photon m⁻² s⁻¹의 낮은 광량에서 3일간 배양하였다.

3일 후 암배우체를 50 µm sieve를 이용하여 손상된 암배우체를 제거하고 50~60 µm 크기의 암배우체를 수거하였다. 수거된 암배우체는 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 200 female gametophytes mL⁻¹로 정량하였다.

2.2. Chlorothalonil 농도 조성

시험에서 사용된 CTN (chlorothalonil, CAS No. 1897-45-6, Sigma-Aldrich Inc., St. Luis, USA)은 DMSO (Dimethylsulfoxide, CAS No. 67-68-5, Sigma-Aldrich Inc.)를 carrier solution으로 이용하여 1,000 mg L⁻¹의 stock solution을 제조하였다. CTN의 stock solution 0.04 mL를 99.96 mL의 PESI 배양액에 넣어 시험최고농도 40 mg L⁻¹를 100 mL 제조하고 PESI 배양액으로 반수희석하여 0, 0.03, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 mg L⁻¹의 농도를 조성하였다. 시험용액 제조에 carrier solution으로 사용된 DMSO의 농도범위는 0.0025~0.04%였으며, 암배우체를 같은 농도범위에 노출시켜 생존율 및 상대성장률에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. CTN의 시험최고농도 0.4 mg L⁻¹는 0.01~10.0 mg L⁻¹ 범위의 range test를 통해 결정하였다.

2.3. 배양조건

2 mL micro tube (Microcentrifuge tube 2.0 mL, SPL Life Sciences, Korea)에 200 female gametophytes mL⁻¹로 정량된 암배우체 2 mL을 넣고 3,000 rpm으로 5분간 원심분리(Smart-R17; Hanil Science Industrial, Korea)하여 배양액을 제거하였다. 배양액이 제거된 2 mL tube에 미리 제

조한 시험용액을 농도별로 1 mL 넣고 votex mixer (VM-10; Daihan Scientific Co., Ltd, Korea)를 이용하여 암배우체를 균일하게 섞어주었다. 암배우체가 포함된 시험용액은 96 well plate의 각 well에 0.25 mL씩 3반복 분주하였다. 96 well plate는 온도 15.0±0.5°C, 광량 60±5 µmol photon m⁻² s⁻¹ 조건에서 3일(생존율)과 5일(상대성장률) 배양하였고 자세한 배양조건은 Table 1에 나타내었다(Lee et al. 2022).

2.4. 암배우체 생존율

CTN에 노출된 암배우체의 생존율을 분석하기 위하여 3일 배양된 각 well의 암배우체를 광학현미경(IX70; Nikon Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 무작위로 50개 3반복 계수하였다. 생존율은 암배우체의 세포가 손상 및 파괴되어 투명하게 변화된 경우 사멸로 측정하였고(Fig. 1A), 유의성 기준은 최적조건에서 10회 반복 배양된 암배우체 생존율 평균값(99±1%)의 90%로 결정하였다(MOF 2018; Lee et al. 2022). 생존율은 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

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

(S₀ = 전체 암배우체 수, S = 생존한 암배우체 수, t = 노출시간)

2.5. 암배우체 상대성장률

CTN에 노출된 암배우체의 상대성장률을 분석하기 위하여 배양하기 전 각 well의 암배우체의 초기 길이와 5일 배양된 암배우체 길이를 광학현미경으로 관찰하였다. 이미지분석프로그램(iWorks 2.0; Nahwoo Trading Co., Suwon, Korea)을 이용하여 초기 암배우체와 5일 배양한 암배우체를 무작위로 50개 3반복으로 길이를 측정하였다(Fig. 1B). 대조구의 상대성장률이 0.14 이상일 경우에 유의한 실험 결과로 판단하였으며, 유의성 기준은 최적조건에서 10회 반복 배양된 암배우체의 상대성장률 평균값(0.176±0.002)의 90% (0.158)로 결정하였다(MOF 2018; Lee et al. 2022). 상대성장률은 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

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

(G₀ = 초기 암배우체 길이, G_t = 노출후 암배우체 길이, t = 노출시간)

Table 1. Experimental culture condition of *Undaria pinnatifida*

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

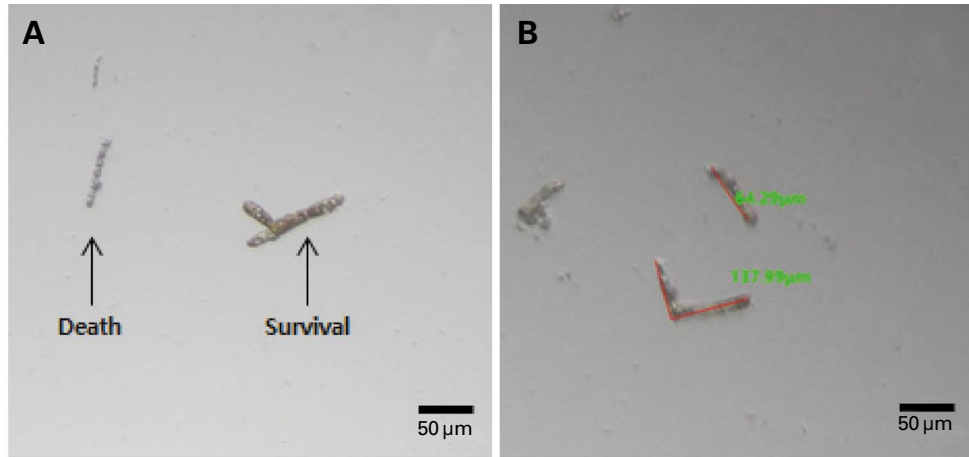


Fig. 1. Measurement of survival rate (A) and relative growth rate (B) of *Undaria pinnatifida* female gametophyte.

2.6. 통계분석

CTN 노출에 따른 대조구와 실험군 사이의 유의성을 비교하기 위하여 IBM SPSS Statistics ver. 20 (IBM Co., New York, USA) 프로그램의 Tukey 다중비교 테스트로 유의성을 분석하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다. CTN에 대한 암배우체의 생존율 및 상대성장률의 반수치 사농도(LC₅₀), 반수영향농도(EC₅₀)와 95% 신뢰구간(95% confidence interval)은 Toxicalc software (Toxicalc 5.0; Tidepool scientific software, USA)의 logit 통계법을 이용하였고 무영향농도(NOEC)와 최소영향농도(LOEC)는 Dunnett's test로 계산하였다.

3. 결 과

3.1. 암배우체의 생존율

U. pinnatifida 암배우체의 생존율은 최소농도 0.03 mg L⁻¹에서 97.3±2.1%로 대조구 98.1±1.0%와 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 생존율이 90% 이상으로 시험 기준에 적합하였다(Fig. 2). 생존율은 0.05 mg L⁻¹ 농도부터 유의적($p < 0.05$)으로 감소하기 시작하였고 대조구 대비 0.20 mg L⁻¹의 농도에서 70% 이상 급격하게 감소하였다. 실험 최고농도 0.40 mg L⁻¹에서 암배우체는 모두 사멸하였다. CTN에 노출된 *U. pinnatifida* 암배우체의 생존율은 농도가 증가할수록 생존율이 감소하는 농도의존적인 경향을 나타냈다(Fig. 2).

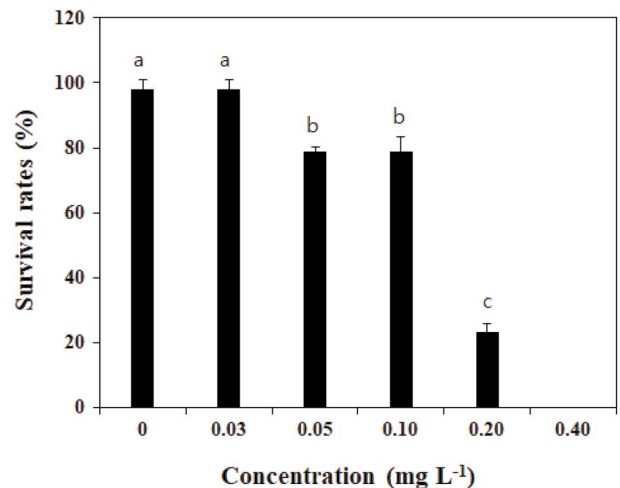


Fig. 2. Change of survival rate on female gametophyte of *Undaria pinnatifida* exposed to chlorothalonil. Vertical bars represent mean±SD. Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$), as determined by Tukey's multiple range test.

3.2. 암배우체 상대성장률

U. pinnatifida 암배우체의 상대성장률은 최소농도 0.03 mg L⁻¹에서 0.18±0.04로 대조구 0.17±0.03과 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 상대성장률이 0.158 이상으로 시험 기준에 적합하였다(Fig. 3). 상대성장률은 0.10 mg L⁻¹ 농도부터 유의적($p < 0.05$)으로 감소하기 시작하였고 대조구 대비 0.20 mg L⁻¹의 농도에서 90% 이상 급격하게 감소하였다. 실험 최고농도 0.40 mg L⁻¹에서 암배우체는 모두 사멸하여 상대성장률이 나타나지 않았다. CTN에 노출된

U. pinnatifida 암배우체의 상대성장률은 농도가 증가할수록 상대성장률이 감소하는 농도의존적인 경향을 나타냈다 (Fig. 3).

3.3. *U. pinnatifida* 암배우체를 이용한 CTN 영향평가

CTN에 노출된 *U. pinnatifida* 암배우체의 생존율과 상대성장률은 표준독성반응인 sigmoid 형태를 나타냈다 (Fig. 4). CTN에 대한 암배우체 생존율의 NOEC와 LOEC는

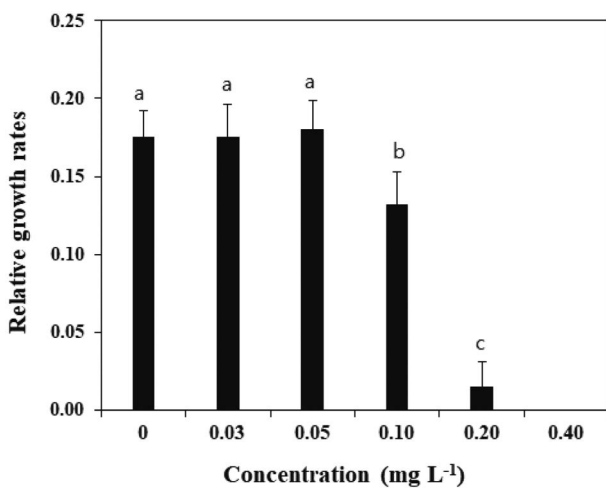


Fig. 3. Change of relative growth rate on female gametophyte of *Undaria pinnatifida* exposed to chlorothalonil. Vertical bars represent mean \pm SD. Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$), as determined by Tukey's multiple range test.

각각 0.03, 0.05 mg L⁻¹로 나타났고 LC₅₀과 95% confidence interval은 각각 0.141, 0.121~0.166 mg L⁻¹로 나타났다 (Table 2). CTN에 대한 암배우체 상대성장률의 NOEC와 LOEC는 0.05, 0.10 mg L⁻¹로 나타났고 EC₅₀과 95% confidence interval은 각각 0.124, 0.119~0.131 mg L⁻¹로 나타났다 (Table 2). 암배우체의 상대성장률은 생존율에 비해 LC₅₀ 및 EC₅₀ 값을 기준으로 CTN에 대한 민감하게 반응하였다.

4. 고찰

CTN은 작물의 질병을 예방하기 위해서 사용되는 살충제 및 살균제이다 (Cima *et al.* 2008; DeLorenzo and

Table 2. Effect values of the female gametophyte of *Undaria pinnatifida* exposed to chlorothalonil

Values*	Survival rates (mg L ⁻¹)	Relative growth rates (mg L ⁻¹)
NOEC	0.03	0.05
LOEC	0.05	0.10
LC ₅₀	0.141	-
EC ₅₀	-	0.124
95% CI	0.121-0.166	0.119-0.131

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

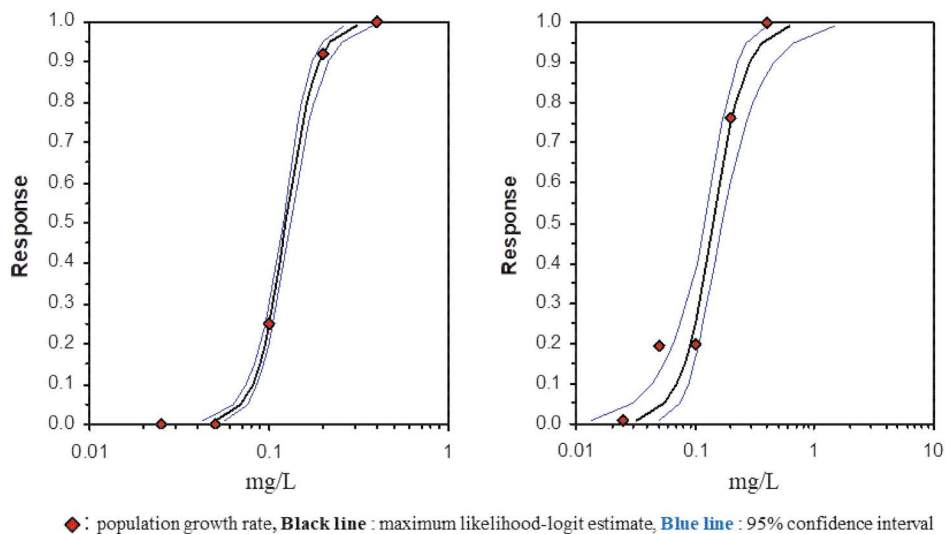


Fig. 4. Concentration-response curves for the effects of chlorothalonil on survival rate (A) and relative growth rate (B) of *Undaria pinnatifida* female gametophyte.

Fulton 2012). CTN은 8.8일의 짧은 반감기와 조류(bird)와 해양 포유류에 대한 독성이 낮아 살균제와 BBs로 가장 널리 사용된 물질 중 하나이다(Cima *et al.* 2008; Guerreiro *et al.* 2020). 하지만 CTN은 다양한 해양생물에게 독성영향을 나타내는 것으로 보고되었으며, SDS-3701과 R417888 같은 독성이 높은 분해산물 생성한다(Amara *et al.* 2018). CTN은 glutathione (GSH)을 감소시키고 해당 작용을 억제할 수 있기 때문에 대사장애, 면역스트레스, 산화스트레스와 같은 광범위한 독성영향을 나타낼 수 있다(DeLorenzo and Fulton 2012; Amara *et al.* 2018; Haque *et al.* 2019). 이는 식세포 활동을 증가시키고 동시에 면역 반응을 과도하게 활성화하여 스트레스를 발생시키고 세포사멸을 유발한다(Guerreiro *et al.* 2017). 또한 항산화효소 GSH와 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)에 결합하여 항산화능력을 감소시켜 산화스트레스를 증가시키고(DeLorenzo and Fulton 2012; Guerreiro *et al.* 2017), 뉴런의 GABA-A receptor의 Na⁺ 흡수를 방해하여 신경전달물질(acetylcholine, AChE)의 활성을 억제하고 신경독성을 유발할 수 있다(Haque *et al.* 2019; Heo *et al.* 2021). 게다가 CTN은 다른 살충제 성분인 atrazine과 같은 물질과 혼합되었을 경우 독성영향이 상승되는 것이 보고된 것을 미루어, 다른 BBs와의 시너지 효과로 인한 독성영향이 증가할 가능성도 가지고 있다(DeLorenzo and Serrano 2003).

본 연구 결과에서도 CTN은 *U. pinnatifida* 암배우체의 생존율과 상대성장률에 강한 독성영향을 나타냈으며, CTN의 농도가 증가할수록 독성영향이 증가하는 농도의존적인 경향을 나타냈다. 암배우체의 CTN에 대한 생존율의 LC₅₀은 0.141 mg L⁻¹, 상대성장률의 EC₅₀은 0.124 mg L⁻¹로 분석되었다. CTN은 암배우체 생존율과 상대성장률 뿐만 아니라 미세조류, 갑각류, 무척추동물 등 다양한 생물에서 독성반응이 보고되었다. CTN은 다양한 농도에서 (0.36~2.68 mg L⁻¹) 곰팡이 포자 발아를 억제하고, 미세조류와 artemia 유충의 생존율 및 개체군성장률을 급격하게 감소시켰다(Wyss *et al.* 2004; Jung *et al.* 2017). 또한 갈조류(*Saccharina latissimi*)에서 산소발생과정을 억제하고 광합성 능력을 감소시켰다(Johansson *et al.* 2012). CTN에 노출된 녹조류(*Dunaliella tertiolecta*와 *Pseudokirchneriella subcapitata*)의 96 h EC₅₀은 0.064, 0.19 mg L⁻¹로 보고되었고(DeLorenzo and Serrano 2003), 규조류(*Skeletonema*

costatum)의 72 h EC₅₀은 0.95 µg L⁻¹로 매우 높은 독성영향이 나타났다(Onduka *et al.* 2012). 로티퍼(*B. plicatilis*) 생존율의 24 h LC₅₀은 0.057 mg L⁻¹, 개체군성장률의 72 h EC₅₀은 0.506 mg L⁻¹로 나타났다(Heo *et al.* 2021) 물벼룩(*Daphnia magna*) 생존율의 48 h LC₅₀은 0.13~0.20 mg L⁻¹ 사이로 보고되었고(Ernst *et al.* 1991), 갑각류(*Tigriopus japonicus*) 유영저해율의 24 h EC₅₀은 0.016 mg L⁻¹였다(Onduka *et al.* 2012). 새우류(*Marsupenaeus japonicus*) 생존율의 96 h LC₅₀은 0.29 mg L⁻¹로 나타났다(Onduka *et al.* 2012), 새우류(*Palaemonetes pugio*) 유생, 배아, 성체의 96 h EC₅₀은 각각 0.131, 0.735, 0.204 mg L⁻¹로 보고되었다(Key *et al.* 2003). 특히 CTN은 무척추동물에서 특히 높은 독성이 나타났다. 진주담치(*Mytilus edulis*) 정상배아발달의 48 h EC₅₀은 8.8 µg L⁻¹로 독성영향이 보고되었고 성체(*Paracentrotus lividus*) 배아발달과 유생성장에 미치는 48 h EC₅₀은 6.6, 0.5 µg L⁻¹로 매우 높은 독성영향을 나타냈다(Bellas 2006). 이처럼 CTN과 분해산물은 다양한 해양생물에게 유해한 영향을 미칠 수 있다(DeLorenzo and Fulton 2012; Onduka *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2016; Amara *et al.* 2018).

CTN은 영국 연안 해수에서 1.38 µg L⁻¹로 조사되었으며, 우리나라 서해, 남해, 동해의 주요 항만의 해수에서 평균 29.78, 29.77, 8.49 µg L⁻¹로 검출되었고 전 세계적으로 검출이 보고되고 있다(Voulvoulis *et al.* 2000; Lee *et al.* 2011; Lee *et al.* 2015). 연안 퇴적물에서도 CTN이 전 세계적으로 검출되고 있다(Morais *et al.* 2023). 영국, 그리스, 멕시코 등의 해양환경을 포함한 다양한 지역에서 CTN 또는 분해산물이 검출되었으며, 우리나라 울산만(1.3~422 ng g⁻¹)과 부산만(22~1,065 ng g⁻¹) 퇴적물에서도 CTN이 검출되었다(Lee *et al.* 2015). 다양한 환경에서 CTN의 검출은 농수 또는 토양 침출수, 선박에 사용되는 AFs와 선박평형수(ballast water)가 직접적인 원인으로 판단된다(Lee *et al.* 2011; Morais *et al.* 2023).

CTN은 해양환경에서 검출되고 수생생물에게 심각한 독성영향에도 불구하고 유럽연합과 영국 및 스위스를 제외한 대부분의 나라에서 수질기준 또는 규제농도가 없다(Thomas and Brooks 2010; Lopes *et al.* 2020; Hintze *et al.* 2021). CTN과 같은 AFs는 지하수 및 강을 통해 해수로 지속적으로 유입되고 있기 때문에 전 세계적으로 CTN과 같은 BBs의 농도가 증가하고 있다(Voulvoulis *et al.* 2000; Lee

Table 3. Toxicity values of booster biocides in marine organisms (mg L⁻¹)

Species	End points	Chlorothalonil	Dichlofluanid	Sea-Nine 211 (DCOIT)	Irgarol	Diuron	Copper pyriithione	Zinc pyriithione	Reference
Microalgae									
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	96 h, EC ₅₀	0.064 (0.062-0.065)							DeLorenzo and Serrano 2003
<i>Nitzschia pungens</i>	96 h, EC ₅₀	360.963 ±129.040	377010 ±58.691	267368 ±38.269	0.586 ±0.825	6.640 ±6.792	4.908 ±2.560	5.513 ±1.358	Jung et al. 2017
<i>Skeletonema costatum</i>	72 h, EC ₅₀	0.00095 (0.00087-0.001)							Onduka et al. 2012
	96 h, EC ₅₀	0.013 (0.0073-0.023)			0.00057 (0.00041-0.00081)	0.0059 (0.0047-0.0074)		0.0017 (0.0015-0.0019)	Bao et al. 2011
Macroalgae									
<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
	3 d, LC ₅₀	0.141 (0.121-0.166)							This study
<i>Undaria pinnatifida</i>	5 d, EC ₅₀	0.124 (0.119-0.131)							
	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
<i>Ulva pertusa</i>	96 h, EC ₅₀			0.783 (0.664-0.902)	0.048 (0.033-0.066)	0.069 (0.064-0.075)		3.556 (2.555-5.147)	Lee et al. 2020a
Crustacean									
<i>Artemia larvae</i>	48 h, LC ₅₀	2.683 ±0.102	154.944 ±49.428	0.318 ±0.092	9.734 ±2.268	30.573 ±1.732	0.319 ±0.016	3.147 ±0.187	Jung et al., 2017
<i>Balanus amphitrite</i>	24 h, LC ₅₀						0.063 (0.059-0.067)	0.210 (0.200-0.230)	Bao et al. 2011
	24 h, LC ₅₀	0.057 (0.049-0.066)							Heo et al. 2021
<i>Brachionus plicatilis</i>	72 h, EC ₅₀	0.506 (0.424-0.606)							
	48 h, LC ₅₀							0.02 (0.02-0.03)	Garaventa et al. 2010
<i>Daphnia magna</i>	48 h, LC ₅₀	0.13-0.20							Ernst et al. 1991

Table 3. Continued

Species	End points	Chlorothalonil	Dichlofluanid	Sea-Nine 211 (DCOIT)	Irgarol	Diuron	Copper pyriithione	Zinc pyriithione	Reference
<i>Eiasmopus rapax</i>	96 h, LC ₅₀	0.067 (0.053-0.084)					0.011 (0.0087-0.013)	0.029 (0.019-0.044)	Bao et al. 2011
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	96 h, LC ₅₀	0.29 (0.26-0.33)							Onduka et al. 2012
<i>Palaeomonetes pugio</i>	96 h, LC ₅₀ Embryo	0.396 (0.331-0.472)							Key et al. 2003
	96 h, LC ₅₀ adult	0.153 (0.120-0.195)							
	96 h, LC ₅₀ larvae	0.050 (0.044-0.055)							
<i>Tigriopus japonicus</i>	24 h, EC ₅₀	0.016 (0.014-0.018)							Onduka et al. 2012
	96 h, LC ₅₀	0.091 (0.086-0.096)			2.4 (1.7-3.4)	11.0 (10.5-11.4)	0.030 (0.026-0.036)	0.17 (0.15-0.19)	Bao et al. 011

et al. 2015). 따라서 *U. pinnatifida*와 같은 주요 양식해조류 보호와 해조류의 건강도에 미치는 영향을 평가하기 위해 지속적인 연구가 필요하며, 본 연구에서 구명된 NOEC, LOEC, EC₅₀은 *U. pinnatifida* 초기생활사의 건강도를 평가하기 위한 기준자료로 활용될 것으로 기대된다.

적 요

TBT 사용이 금지된 이후, 방오도료의 방오능력을 보완하기 위하여 booster biocides를 추가하여 사용하고 있다. Booster biocides 중에서 chlorothalonil은 해양환경 내 지속적으로 유입되며 다양한 해양생물에게 심각한 독성영향을 미치고 있지만 해조류에 대한 연구는 제한적이다. 따라서 우리나라의 주요 양식생물인 미역(*Undaria pinnatifida*)의 초기생활사에 chlorothalonil이 미치는 영향을 분석하였다. *U. pinnatifida*의 암배우체를 chlorothalonil (0, 0.03, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 mg L⁻¹)에 노출하여 생존율과 상대성장률을 분석하였다. 암배우체 생존율의 무영향농도(NOEC), 최소영향농도(LOEC), 반수치사농도(LC₅₀)는 0.05, 0.10, 0.141 (0.121~0.166) mg L⁻¹이었고 상대성장률의 NOEC, LOEC, 반수영향농도(EC₅₀)은 0.10, 0.20, 0.124 (0.119~0.131) mg L⁻¹로 분석되었다. 따라서, 미역의 암배우체는 0.05~0.10 mg L⁻¹ 이상의 농도에서 독성영향을 받기 시작할 것으로 판단된다. 본 연구의 결과를 chlorothalonil에 대한 *U. pinnatifida* 초기생활사의 건강도를 평가하기 위한 기준자료로 활용될 것으로 기대된다.

CRedit authorship contribution statement

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

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

사 사

본 연구는 2023년 국립수산과학원 경상과제(R2023009)의 연구비 지원으로 국립수산과학원 서해수산연구소 기후환경자원과에서 수행하였다.

REFERENCES

- Al-Dulaimi O, ME Rateb, AS Hursthouse, G Thomson and M Yaseen. 2021. The brown seaweeds of Scotland, their importance and applications. *Environments* 8:59. <https://doi.org/10.3390/environments8060059>
- 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>
- Bao WWW, 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.marpollbul.2011.02.041>
- 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>
- Christen V, J Krebs and K Fent. 2019. Fungicides chlorothanolin, azoxystrobin and folpet induce transcriptional alterations in genes encoding enzymes involved in oxidative phosphorylation and metabolism in honey bees (*Apis mellifera*) at sublethal concentrations. *J. Hazard. Mater.* 377:215–226. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.05.056>
- Cima F, M Bragadrin and L Ballarin. 2008. Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes I. Sea-Nine 211™ and chlorothalonil. *Aquat. Toxicol.* 86:299–312. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.11.010>
- DeLorenzo ME and MH Fulton. 2012. Comparative risk assessment of permethrin, chlorothalonil, and diuron to coastal aquatic species. *Mar. Pollut. Bull.* 64:1291–1299. <https://doi.org/10.1016/j.marpollbul.2012.05.011>
- DeLorenzo ME and L Serrano. 2003. Individual and mixture toxicity of three pesticides; atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Contam. Agric. Wastes* 38:529–538. <https://doi.org/10.1081/PFC-120023511>
- Ernst W, K Doe, P Jonah, J Young, G Julien and P Hennigar. 1991. The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21:1–9. <https://doi.org/10.1007/BF01055550>
- Garaventa F, C Gambardella, A Di Fino, M Pittore and M Faimali. 2010. Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. *Ecotoxicology* 19:512–519. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0461-8>
- Guerreiro ADS, FEL Abreu, G Fillmann and JZ Sandrini. 2020. Effects of chlorothalonil on the antioxidant defense system of mussels *Perna perna*. *Ecotox. Environ. Safe.* 190:110119. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110119>
- Guerreiro ADS, RC Rola, MT Rovani, SRD Costa and JZ Sandrini. 2017. Antifouling biocides: Impairment of bivalve immune system by chlorothalonil. *Aquat. Toxicol.* 189:194–199. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.012>
- Hamer M, SK Maynard and S Schneider. 2019. A pulsed-dose study evaluating chronic toxicity of chlorothalonil to fish: A case study for environmental risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 38:1549–1559. <https://doi.org/10.1002/etc.4421>
- Haque MN, HJ Eom, SE Nam, YK Shin and JS Rhee. 2019. Chlorothalonil induces oxidative stress and reduces enzymatic activities of Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase in gill tissues of marine bivalves. *PLoS One* 14:e0214236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214236>
- 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>
- Hintze S, YSB Hannalla, S Guinhard, D Hunkeler and G Glauser. 2021. Determination of chlorothalonil metabolites in soil and water samples. *J. Chromatogr. A* 1655:462507. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462507>
- Johansson P, KM Eriksson, L Axelsson 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>
- 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.marpollbul.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>
- Lee H, J Park, K Shin, S Depuydt, S Choi, J de Saeger and T Han. 2020a. 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, H Choi, YH Park, Y Lee, S Heo and UK Hwang. 2019. Toxic evaluation of phenanthrene and zinc undecylenate using

- the population growth rates of marine diatom, *Skeletonema costatum*. Korean J. Environ. Biol. 37:372–379. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2019.37.3.372>
- Lee JW, YH Park, BR Sim, HJ Jeon, S Heo and UK Hwang. 2022. 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.2022.72.86>
- Lee MRN, UJ Kim, IS Lee, M 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, 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. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.10.048>
- Li X, Y Yao, S Wang and S Xu. 2020. Resveratrol relieves chlorothalonil-induced apoptosis and necroptosis through miR-15a/Bcl2-A20 axis in fish kidney cells. Fish Shellfish Immunol. 107:427–434. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.11.007>
- Lin H, S Zhao, X Fan, Y Ma, X Wu, Y Su and J Hu. 2019. Residue behavior and dietary risk assessment of chlorothalonil and its metabolite SDS-3701 in water spinach to propose maximum residue limit (MRL). Regul. Toxicol. Pharmacol. 107:104416. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104416>
- Lopes FC, ASV Junior, CD Corcini, JAA Sánchez, DM Pires, JR Pereira, EG Primel, G Fillmann and CDMG Martins. 2020. Impacts of the biocide chlorothalonil on biomarkers of oxidative stress, genotoxicity, and sperm quality in guppy *Poecilia vivipara*. Ecotox. Environ. Safe. 188:109847. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109847>
- 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.
- Morais LG, PK Gusso-Choueri, FEL Abreu, IB Castro, DM Abessa and RB Choueri. 2023. Multilevel assessment of chlorothalonil sediment toxicity to Latin American estuarine biota: Effects on biomarkers, reproduction and survival in different benthic organisms. Sci. Total Environ. 872:162215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162215>
- 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>
- Soroldoni S, F Abreu, IB Castro, FA Duarte and GLL Pinho. 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? J. Hazard. Mater. 330:76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.001>
- 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>
- Thomas KV and S Brooks. 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. Biofouling 26:73–88. <https://doi.org/10.1080/08927010903216564>
- Van Scoy AR and RS Tjeerdema. 2014. Environmental fate and toxicology of chlorothalonil. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 323:89–105. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06746-9_4
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00034-5)
- Wyss GS, R Charudattan, EN Roskopf and RC Littell. 2004. Effects of selected pesticides and adjuvants on germination and vegetative growth of *Phomopsis amaranthicola*, a bio-control agent for *Amaranthus* spp. Weed Res. 44:469–482. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2004.00425.x>
- Yee MSL, PS Khiew, WS Chiu, YF Tan, YY Kok and CO Leong. 2016. Green synthesis of graphene-silver nanocomposites and its application as a potent marine antifouling agent. Colloid Surf. B-Biointerfaces 148:392–401. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.011>
- Zhang M, Z Xu, Y Teng, P Christie, J Wang, W Ren, Y Luo and Z Li. 2016. Non-target effects of repeated chlorothalonil application on soil nitrogen cycling: The key functional gene study. Sci. Total Environ. 543:636–643. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.053>
- Zhang Q, M Saleem and C Wang. 2017. Probiotic strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* BJ1 degrades and reduces chlorothalonil toxicity to soil enzymes, microbial communities and plant roots. AMB Express 7:227. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0530-y>