

국내 주상용 Anti-Fouling System 처리 활성물질이 동근성게 (*Mesocentrotus nudus*)의 배아에 미치는 영향

서진영*, 강정훈, 최진우

한국해양과학기술원 위해성분석연구센터

Effects of Anti-Fouling System (AFS) on embryos of a sea urchin, *Mesocentrotus nudus*

Jin-Young Seo*, Jung Hoon Kang and Jin-Woo Choi

Risk Assessment Research Center, KIOST, Geoje 53201, Republic of Korea

*Corresponding author

Jin-Young Seo
Tel. 055-639-8554
E-mail. jyseo@kiost.ac.kr

Received: 26 August 2019

First Revised: 5 September 2019

Second Revised: 17 September 2019

Revision accepted: 17 September 2019

Abstract: In this study, we aimed to assess the toxicity of biocide present in antifouling paint on embryos of sea urchin, *Mesocentrotus nudus*. Three types of biocide (Sea-nine 211, Diuron, and Irgarol 1051) were selected for the exposure experiment. The EC₅₀ of Sea-nine, Diuron, and Irgarol on the fertilization rate of sea urchin were 32.8 µg L⁻¹, 7,975 µg L⁻¹ and 6,995 µg L⁻¹, respectively. The EC₅₀ of Sea-nine, Diuron, and Irgarol on the development rate of sea urchin were 31.6 µg L⁻¹, 3,044 µg L⁻¹, and 2,267 µg L⁻¹, respectively. The highest toxicity was observed in the presence of Sea-nine.

Keywords: Anti-Fouling System, biocide, sea urchin embryo, fertilization rate, development rate

서 론

선박의 생물 부착을 막기 위해 방오도료가 개발되어 사용되어왔고, 이러한 방오도료 내에는 화학 물질(살조물질)을 함유하고 있어서 선박외부에 생물이 부착되는 것을 방지한다(Boxall *et al.* 2000; Terlizzi *et al.* 2001). 1990년대 이전에는 TBT가 함유된 페인트가 가장 효과적인 anti-fouling 물질로 사용됐으나, 해양환경 및 생물에 미치는 악영향이 알려지면서 1990년대 초반에 전면 사용이 금지되었고, 그 이후 TBT를 대체하기 위한 다양한 방오도료들이 개발되어왔다(Alzieu 2000). 그 중 Irganol 1051, Sea-Nine 211,

Diuron, Chlorothalonil 및 Copper pyriithione, Zinc pyriithione 과 같은 기타 금속 화합물이 가장 일반적으로 사용되는 biocide 물질이다(Konstantinou and Albanis 2004). 이 물질들은 유기주석물질과 비교할 때 환경적으로 덜 해롭다고 알려져 있으나, 최근 일부 연구들을 통해 이 대체 물질들의 유해성이 알려지고 있는 실정이다(Jacobson and Willingham 2000; Sherrard *et al.* 2003; Braithwaite and Fletcher 2005; Mochida *et al.* 2010).

Irganol 1051 [2-methylthio-4-tert-butylamino-6-cyclopropylaminos-triazine]은 강력한 s-triazine 제초제로 반감기는 해수에서 273일이며, Diuron [3,4-dichlorophenyl-1,1-dime-

thylurea]은 non-targer species에 잠재적 독성을 지니는 물질로 반감기는 수중에서 33일이다(Hall *et al.* 1999; Amara *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2019). 이 두 물질은 식물의 광합성을 저해하고 조류의 염록체 내 전자 전달을 손상시킴으로써 방오 작용을 한다(Moon *et al.* 2019). 따라서 주로 잘피, 망그로브, 산호와 저서성 microalgae 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Jones *et al.* 2003; Duke *et al.* 2005; Negri *et al.* 2005; Magnusson *et al.* 2012; van Dam *et al.* 2012; Holmes 2014).

Sea-nine 211 [4,5-dichloro-2-n-octyl-3(2H) isothiazolone]은 수중에서는 24시간 이하, 수중 퇴적물에서는 1시간 이하로 분해가 빠르고 비교적 짧은 반감기를 가진다(Jacobson and Willingham 2000). Sea-nine은 포식세포(phagocyte)의 형태를 변형시키고 괴사를 유발할 뿐 아니라 tunicate 혈구 내 세포골격을 교란하는 작용을 한다(Moon *et al.* 2019). 또한 Sea-nine은 Diuron이나 Irgarol에 비해 이매패류, 극피동물 등의 배아독성, 유생 사망, 면역독성 등을 야기하는 비율이 높은 것으로 알려져 있다(Kobayashi and Okamura 2002; Cima *et al.* 2008; Menin *et al.* 2008; Cima and Matozzo 2010).

본 연구에서 시험생물로 사용한 성게는 수정 및 발생과 같은 초기 생활사 과정을 독성 실험에 이용하기 때문에, 민감도가 좋고 실험 방법이 간단하여 전 세계적으로 환경 평가 및 모니터링에 많이 이용되고 있다(Nacci *et al.* 1986;

Dinnel *et al.* 1987). 성게 배아를 이용한 수정과 발생 실험은 중금속에 대한 독성, 퇴적물의 오염평가 등에 많이 이용되고 있으며, 최근에는 방오 페인트의 독성유무 및 살조제의 독성 평가에도 많이 이용되고 있다(Meador *et al.* 1990; Carr *et al.* 1996; Bellas 2006, 2007; Rial *et al.* 2016). Biocide의 독성을 평가하기 위해 성게(*Paracentrotus lividus*)의 배아를 이용하여 Sea-nine과 Irgarol의 발생독성(EC₁₀, EC₅₀)을 측정하였고(Bellas 2006, 2007), 보라성게(*Anthocidaris crassispin*)의 배아를 이용하여 Sea-nine, Irgarol, Diuron, CuPT, ZnPT 등의 발생독성을 측정하였다(Kobayashi and Okamura 2002). 그러나 국내에서는 TBT, Sea-nine, Cu-pyrithione과 Zn-pyrithione가 조피볼락과 단각류에 미치는 영향(Park *et al.* 2006) 등 일부 연구가 수행되었으나, 성게 배아를 이용한 biocide 위해성 평가에 대한 연구는 국내에서는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 현재 국내외에서 많이 사용되고 있는 biocide 3종에 대한 위해성 여부를 등근성게 배아를 이용한 실험을 통해 평가해 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험생물 준비

실험에 사용된 등근성게(*Mesocentrotus nudus*)는 경남 거제도 주변해역에서 잠수작업을 통하여 채집하였다. 채집

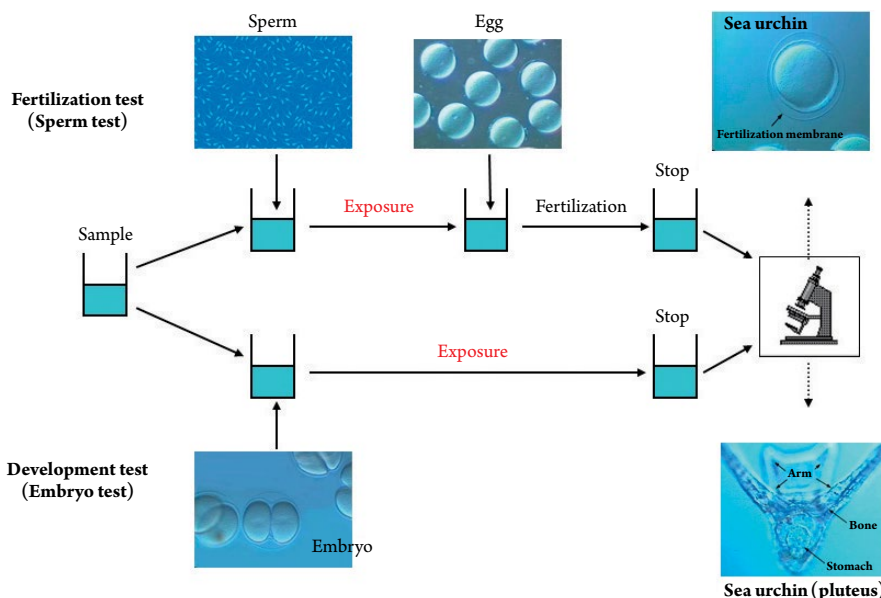


Fig. 1. A schematic diagram for fertilization and development test.

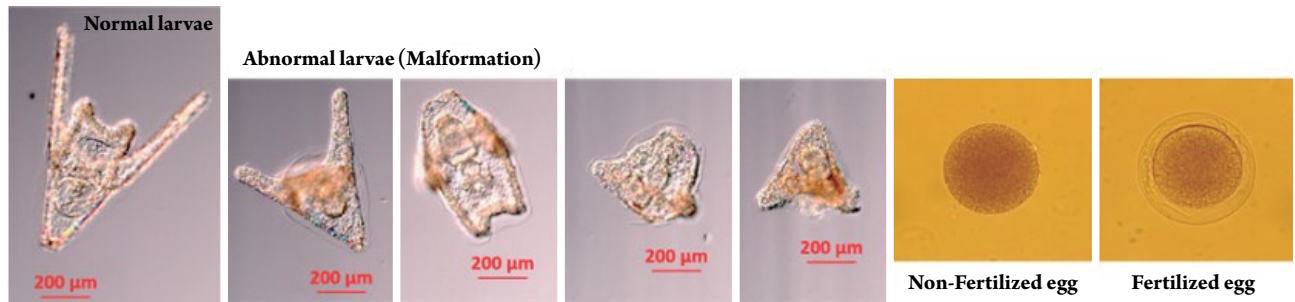


Fig. 2. The normal pluteus larvae and abnormal larvae (left) and fertilized and non-fertilized egg (right) of sea urchin.

된 성체 어미를 실험실로 옮겨 2 ton 용량의 수조에 실험이 실시되기 전까지 사육하였고, 사육하는 동안 먹이로는 건조된 다시마(*Laminaria* sp.)를 공급하였다. 실험에 사용 전까지 사육수의 온도는 20°C로 유지하였다.

2. 실험 방법

성체를 이용한 독성실험은 ASTM과 USEPA의 표준지침서를 Lee (2000) 및 Won (2000)에 의해 수정된 방법을 적용하여 수행되었다. 성체를 이용한 독성 실험의 최종반응(endpoint)으로는 수정률과 발생률의 두 가지가 있다. 수정률 실험은 정자를 시료에 노출시켜 정자의 활력이 얼마나 감소하는지를 알아보는 실험이며, 발생실험은 수정란을 시료에 노출하여 정상적인 플루테우스(pluteus)유생으로 발생하는지 유무를 판단하는 실험법이다(Fig. 1).

정자와 알을 어미로부터 얻기 위하여 1 M-KCl 용액(Lot No. BCBT9546, Sigma-Aldrich, USA)을 어미의 입 주위로 주사하여 산란을 유발하였다. 정자의 경우 파스퇴르피펫을 이용하여 생식공으로부터 방출되는 정자를 직접 수집하여 1.5 mL 용량의 원심분리 튜브에 옮겨 담고 실험전까지 5°C에서 보관하였다. 알의 경우 여과 해수가 담긴 비이커에 암컷을 거꾸로 뒤집어 놓아 방출된 알이 바닥으로 흘러내려 가라앉도록 하였다. 수집된 알은 반복적인 세척 과정을 거쳐 크기가 작거나 미성숙 개체를 제거하였다.

수정실험을 위해 시료를 각 농도 당 well plate (Nunc™ Nunclon™ Vita 24-Well Multi-dish, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)에 1 mL 씩 주입하고, 각 well 마다 50 μL의 정자 희석액을 첨가하였다. 정자를 20분 동안 노출시킨 후, 각 well 마다 100개의 알이 주입될 수 있게 계수 후 알을 주입하였다. 정자와 알이 만나 수정이 이루어지도록 20분간 더 기다린 후, 10% 완충포르말린(Lot No. 1C4031,

Junsei, Japan)을 100 μL 씩 주입하여 실험을 종료하였다. 실험이 종료된 후, 알의 바깥쪽에 투명한 막(수정막)이 형성되어 있는지 여부를 직접 관찰하여 수정란과 미수정란으로 구별하였다(Fig. 2).

발생실험을 위해 시료를 농도별로 유리 바이알(20 mL LS Vial, 22-400 Urea Cap, Wheaton, USA)에 5 mL 주입 후 수정란을 mL 당 100개체가 되게 계수 후 주입하여 배양기(Multi cooling incubator, J-MIC2 type, Jisico, Korea)에서 48 시간, 20°C에서 배양 후 10% 완충포르말린으로 고정 후 실험을 종료하였다. 종료 후 현미경(CX31-32L02, Olympus, Japan) 하에서 정상적으로 발생된 개체(플루테우스 유생), 발생지연, 기형, 사망으로 구분하여 계수하였다(Fig. 2).

3. 실험 농도

실험에는 Biocide 3종; Diuron (Tokyo Kasei Kogyo Ltd, Japan), Irgarol 1051 (Ciba Specialty Chemicals, Japan), Sea-nine 211 (Rohm and Haas Company, USA)을 사용하였다. 대조구 실험 및 실험구 희석을 위한 해수는 거제도 장목만에서 채수하여 여과 후 사용하였다. 실험의 농도는 예비실험을 거쳐 수정률 실험은 Diuron 0.1, 1, 5, 10, 15, 20, 그리고 100 mg L⁻¹, Irgarol 1051은 0.1, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 그리고 100 mg L⁻¹에서 실험을 수행하였다. Sea-nine 211는 1, 5, 15, 20, 100, 그리고 1,000 μg L⁻¹에서 실험을 수행하였다. 발생실험은 Diuron과 Irgarol은 100, 1,000, 10,000 μg L⁻¹에서 실험을 수행하였고, Sea-nine은 1, 10, 100 μg L⁻¹에서 실험을 수행하였다.

4. 통계 분석

등근성계 수정률 및 발생률에 반수영향농도(50% Effec-

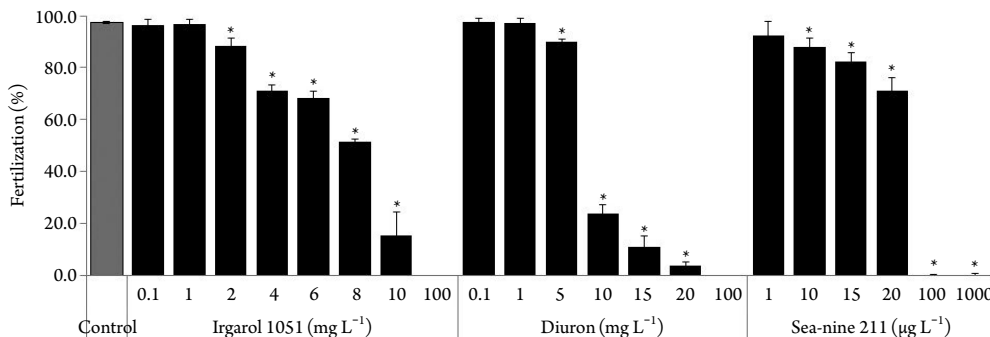


Fig. 3. The fertilization rate of the embryos of sea urchin *Meocentrotus nudus* exposed to biocide (*: $p > 0.01$).

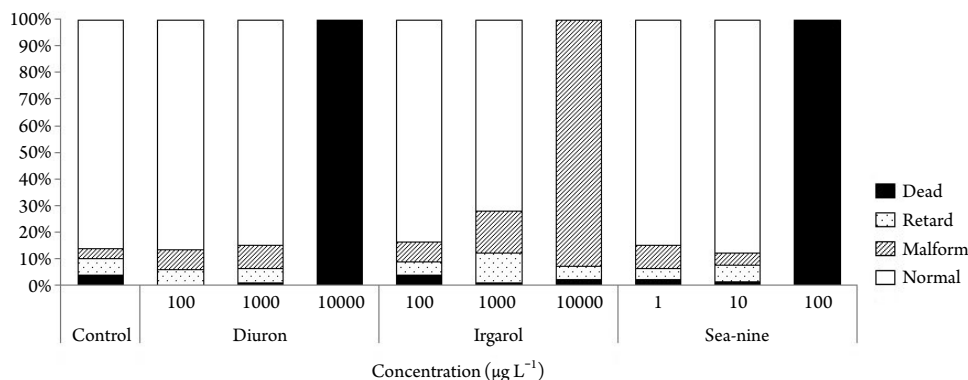


Fig. 4. The percentage composition of the developmental status of *Meocentrotus nudus* embryos exposed to biocide.

tively Concentration; EC_{50})은 Trimmed Spearman-Kärber, 무영향농도(No Observed Effect Concentration; NOEC)와 최소영향농도(Lowest Observed Effect Concentration; LOEC)는 Dunnett's test를 이용하여 분석하였다. 통계 분석에는 Toxcalc (Tidepool scientific software, USA) 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

장목만에서 채수하여 여과한 해수로 진행한 대조실험에서는 둥근성게 수정률이 $97 \pm 0.4\%$ 로 나타났다. Irgarol은 0.1 mg L^{-1} 과 1 mg L^{-1} 에서는 모두 수정률이 95% 이상으로 대조구와 통계적으로 차이를 보이지 않았다($p > 0.01$). 2 mg L^{-1} 에서는 수정률이 88%로 다소 감소하였고, 8 mg L^{-1} 에서는 수정률이 51.5%로 감소하였다. 10 mg L^{-1} 에서는 수정률이 15.7%로 급격히 감소하였고, 100 mg L^{-1} 에서는 수정률이 0%로 나타났다(Fig. 3). Irgarol의 수정률에 대한 EC_{50}

은 6.9 mg L^{-1} 였고, NOEC은 $< 2 \text{ mg L}^{-1}$, LOEC은 2 mg L^{-1} 였다. 발생 실험 결과, Irgarol은 100 µg L^{-1} 에서는 정상적으로 발생된 pluteus 유생의 비중이 $84.1 \pm 5.9\%$ 였고, 1 mg L^{-1} 에서는 $71.0 \pm 4.2\%$ 였다(Fig. 4). 10 mg L^{-1} 에서는 정상발생률이 0%였고, 기형(Malform)의 비중이 92%로 가장 높았고, 발생지연(Retard)의 비중은 5%였다. 발생실험에 대한 Irgarol의 EC_{50} 은 2.3 mg L^{-1} 였고, NOEC은 0.1 mg L^{-1} , LOEC은 1 mg L^{-1} 였다.

Diuron은 0.1 mg L^{-1} 과 1 mg L^{-1} 에서는 수정률이 모두 90% 이상으로 나타나 대조구와 통계적으로 차이를 보이지 않았다. 그러나 10 mg L^{-1} 와 20 mg L^{-1} 에서는 수정률이 각각 23.9%와 4.1%로 크게 감소하였고, 100 mg L^{-1} 에서는 수정률이 0%로 나타났다(Fig. 3). Diuron의 수정률에 대한 EC_{50} 은 7.9 mg L^{-1} , NOEC은 $< 5 \text{ mg L}^{-1}$, LOEC은 5 mg L^{-1} 였다. 발생실험에서는 100 µg L^{-1} 에서 정상적으로 발생된 pluteus 유생의 비중이 $86.4 \pm 1.6\%$ 였고, 1 mg L^{-1} 에서는 $84.8 \pm 2.4\%$ 였다(Fig. 4). 10 mg L^{-1} 에서는 정상발생률이 0%였고, 발생이 전혀 진행되지 않은 Dead 상태를 보였다. 발생

Table 1. Comparison of EC₁₀ or EC₅₀ values of single antifouling biocide estimated for Echinoid (unit: µg L⁻¹)

Species name	End Point	Sea-Nine	Irgarol	Diuron	Reference
Echinoid	EC ₁₀ (Development)	5.9	11,463	-	Bellas (2006)
	EC ₅₀ (Development)	12.1	15,871	-	
<i>Paracentrotus lividus</i>	EC ₁₀ (Development)	2.4	-	-	Bellas (2007)
	EC ₅₀ (Development)	-	-	2,390	Manzo <i>et al.</i> (2006)
<i>Anthocidaris crassispina</i>	No effect (Development)	1 fg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	Kobayashi and Okamura (2002)
<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	EC ₅₀ (Embryogenesis)	14.38	5,890	-	Wang <i>et al.</i> (2011)
<i>Mesocentrotus nudus</i>	EC ₅₀ (Fertilization)	32.8	6,995	7,975	Present study
	EC ₅₀ (Development)	31.6	2,267	3,044	

실험에 대한 Diuron의 EC₅₀은 3.0 mg L⁻¹였고, NOEC은 1 mg L⁻¹, LOEC은 10 mg L⁻¹였다.

Sea-nine 211은 1 µg L⁻¹에서는 수정률이 92.3%로 대조구와 통계적으로 차이를 보이지 않았으나, 10 µg L⁻¹과 100 µg L⁻¹에서는 수정률이 각각 88%, 82%로 감소하였고, 100 µg L⁻¹에서는 수정률이 0.2%로 급격히 감소하였다 (Fig. 3). Sea-nine의 수정률에 대한 EC₅₀은 32.8 µg L⁻¹였고, NOEC은 < 5 µg L⁻¹, LOEC은 5 µg L⁻¹였다. 발생실험에서는 1 µg L⁻¹에서 정상 발생률이 84.1 ± 5.8%였고, 10 µg L⁻¹에서는 87.8 ± 1.6%였다 (Fig. 4). 100 µg L⁻¹에서는 정상발생률이 0%였고, 모두 발생이 전혀 진행되지 않은 Dead 상태를 보였다. 발생실험에 대한 Sea-nine의 EC₅₀은 31.6 µg L⁻¹였고, NOEC은 10 µg L⁻¹, LOEC은 100 µg L⁻¹였다.

이처럼 둥근성게 배아를 이용하여 3종류의 Biocide에 대한 위해성 평가를 수행한 결과, 수정과 발생률 모두에서 Sea-nine의 독성이 가장 강한 것으로 나타났고, Irgarol, Diuron의 순으로 나타났다. 현재까지 보고된 연구 결과들을 살펴보면, Diuron과 Irgarol 1051은 위해성이 Sea-nine 211에 비해 다소 덜한 것으로 나타났고, Sea-nine 211의 독성이 강한 것으로 나타났다 (Amara *et al.* 2018). 성게 (*Paracentrotus lividus*)를 대상으로 발생 실험 (EC₅₀)을 수행한 결과, Sea-nine의 독성이 Irgarol에 비해 1,000배 이상 높은 것으로 나타났고, EC₁₀은 2,000배 가량 높게 나타났다 (Table 1). 본 연구에서도 Sea-nine 211이 둥근성게 수정률에 미치는 영향이 다른 두 종류의 살생물제에 비해 500배 이상, 심지어 Diuron에 비해서는 1,000배 이상 독성이 강한 것으로 나타나 사용에 주의가 필요할 것으로 판단된다.

Sea-nine 211은 매우 낮은 농도에서도 담치나 성게 등의 무척추동물의 배발생과 유생의 성장에 영향을 미치는 것

으로 알려져 있다 (Amara *et al.* 2018). 담치와 굴의 배아발생에 미치는 영향 (EC₅₀)이 각각 2 µg L⁻¹, 7~24 µg L⁻¹에 불과해 매우 낮은 농도에서도 해양 무척추동물의 발생 및 성장과정에 치명적인 영향을 미칠 가능성이 있다. Sea-nine은 본 연구 결과에서도 나타났듯이 이매패류뿐만 아니라 성게의 배아에도 독성이 매우 심각한 것으로 나타났다. 북쪽말뚝성게 (*Strongylocentrotus intermedius*)의 배아를 다양한 살생물제에 각각 노출한 결과, Sea-nine 211에서는 정상적인 유생 발생률이 급격히 감소하였으며 기형의 발생률이 매우 높게 나타났으나, Irgarol에 대한 독성은 덜 민감한 것으로 나타났다 (Wang *et al.* 2011). Diuron은 *P. lividus*를 대상으로 한 실험에서 embryo와 sperms에 비해 juvenile 단계에서의 독성이 강한 것으로 나타났다 (Manzo *et al.* 2006). 이처럼 Sea-nine에 비해 Diuron과 Irgarol의 독성이 낮은 이유는 독성기작의 차이 때문인 것으로 판단된다. Irgarol과 Diuron은 수중 이끼제거에 많이 이용되는 제초제로, 주로 freshwater alga, microalgae, marine algae 등 수서 식물에 미치는 독성이 강한 것으로 나타났다 (Moreland 1980; Okamura *et al.* 2000; Fernández-Alba *et al.* 2002; Ma *et al.* 2002; Braithwaite and Fletcher 2005; Arrhenius *et al.* 2006; Koutsafitis and Aoyama 2006). Sea-nine은 다양한 해양생물의 초기 발생 및 유생의 성장 등에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 성게는 발생 초기 독성에 민감하게 반응하기 때문에 수정 및 배발생과 같은 초기 생활사 단계에서 독성 평가에 많이 이용한다. 종에 따라 다소 차이를 보이지만 대부분의 성게 배아는 24~96시간 동안 배 발생이 진행된다. Sea-nine의 경우 일반적으로 알려진 반감기가 24시간에 불과하다. 짧은 반감기 등의 영향으로 만성독성의 영향은 거의 나타나지 않았으나, 급성 독성의 영향은 다양한 수생생물에 광범

위하게 나타났다(Braithwaite and Fletcher 2005; Arrhenius et al. 2006; Bellas 2006; Yamada 2006; Cima et al. 2008; Wang et al. 2011; Xu et al. 2011). 그러나 현재까지 다양한 해양생물에 대한 Sea-nine을 포함한 Diuron, Irgarol과 같은 대체 살생물제가 미치는 영향에 대한 독성데이터가 축적되고는 있지만, 비표적 해양생물에 대한 정확한 독성 경로나 메카니즘이 알려져 있지 않은 상태이다(Moon et al. 2019). 따라서 생물에 대한 축적따라서 향후 성계를 비롯한 다양한 생물군에 대한 독성영향평가가 필요할 것으로 판단되며, 이러한 물질들에 대한 관리가 필요할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 둥근성게(*Mesocentrotus nudus*)의 배아를 이용하여 전 세계적으로 많이 이용되고 있는 살생물제(Biocides)에 대한 독성 평가를 수행하였다. 실험에 사용한 살생물제는 총 3종, Sea-nine 211, Diuron, Irgarol 1051이었다. 그 중, 둥근성게(*M. nudus*)의 수정과 발생률에 미치는 영향은 모두 EC₅₀을 기준으로 보았을 때, Sea-nine의 독성이 가장 강한 것으로 나타났고, Irgarol, Diuron의 순으로 나타났다. 이러한 살생물제, 특히 Sea-nine은 해양무척추동물의 초기 발생과정과 유생의 성장과정에 치명적인 영향이 있는 것으로 알려져 있으므로 이 물질들에 대한 관리가 필요할 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 한국해양과학기술원의 주요사업인 “한국 주변 해양생태계 변동 이해 및 대응 기반 연구(PE99713)”의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Alzieu C. 2000. Environmental impact of TBT: the french experience. *Sci. Total Environ.* 258:99-102.
- 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.
- Arrhenius A, T Backhaus, F Grönvall, M Junghans, M Scholze and H Blanck. 2006. Effects of three antifouling agents on algal communities and algal reproduction: mixture toxicity studies with TBT, irgarol, and sea-nine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 345:335-345.
- Bellas J. 2006. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Sci. Total Environ.* 367:573-585.
- Bellas J. 2007. Toxicity of the booster biocide Sea-Nine to the early developmental stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquat. Toxicol.* 83:52-61.
- Boxall A, S Comber, A Conrad, J Howcroft and N Zaman. 2000. Inputs, monitoring and fate modelling of antifouling biocides in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 40:898-905.
- Braithwaite RA and RL Fletcher. 2005. The toxicity of Irgarol 1051 and Sea-Nine 211 to the non-target macroalga *Fucus serratus* Linnaeus, with the aid of an image capture and analysis system. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 322:111-121.
- Carr RS, ER Long, HL Windom, DC Chapman, G Thursby, G Sloane and DA Wolfe. 1996. Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:1218-1231.
- Cima F and V Matozzo. 2010. Immunotoxic effects of the antifouling compound Sea-Nine 211 on haemocytes of an edible bivalve mollusk. *Fresenius Environ. Bull.* 19:2297-2302.
- Cima F, M Bragadin and L Ballarin. 2008. Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes. I. Sea-Nine 211 and chlorothalonil. *Aquat. Toxicol.* 86:299-312.
- Dinnel PA, JM Link and QJ Stober. 1987. Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16:23-32.
- Duke NC, AM Bell, DK Pederson, CM Roelfsema and SB Nash. 2005. Herbicides implicated as the cause of severe mangrove dieback in the Mackay region, NE Australia: consequences for marine plant habitats of the GBR world heritage area. *Mar. Pollut. Bull.* 51:308-324.
- Fernández-Alba R, L Piedra, M Mezcuca and MD Hernando. 2002. Toxicity of single and mixed contaminants in seawater measured with acute toxicity bioassays. *Sci. World J.* 2:1115-1120.
- Hall Jr LW, JM Giddings, KR Solomon and R Balcomb. 1999. An ecological risk assessment for the use of Irgarol 1051 as an algaecide for antifoulant paints. *Crit. Rev. Toxicol.* 29:367-437.
- Holmes G. 2014. Australia's pesticide environmental risk assessment failure: the case of diuron and sugarcane. *Mar. Pollut. Bull.* 88:7-13.
- Jacobson AH and GL Willingham. 2000. Sea-nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. *Sci. Total Environ.* 258:103-110.
- Jones R, 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.
- Kobayashi N and H Okamura. 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Mar. Pollut. Bull.* 44:748–751.
- Konstantinou IK and TA Albanis. 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environ. Int.* 30:235–248.
- Koutsaftis A and I Aoyama. 2006. The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. *Environ. Toxicol.* 21:432–439.
- Lee CH. 2000. A study on the sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) bioassay: Sperm and fertilized egg tests. Ph.D. Thesis. Seoul National University, p. 185.
- Ma J, L Xu, S Wang, R Zheng, S Jin, S Huang and Y Huang. 2002. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotox. Environ. Safe.* 51:128–132.
- Magnusson M, K Heimann, M Ridd and AP Negri. 2012. Chronic herbicide exposures affect the sensitivity and community structure of tropical benthic microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 65:363–372.
- 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.
- Meador JP, BD Ross, PA Dinnel and SJ Picquelle. 1990. An analysis of relationship between a sand-dollar embryo elutriate assay and sediment contaminants from stations in an urban embayment of Puget Sound, Washington. *Mar. Environ. Res.* 30:251–272.
- Menin A, L Ballarin, M Bragadin and F Cima. 2008. Immunotoxicity in ascidians: antifouling compounds alternative to organotins. II. The case of Diuron and TCMS pyridine. *J. Environ. Sci. Health B* 43:644–654.
- Mochida K, H Amano, T Onduka, A Kakuno and K Fujii. 2010. Toxicity of 4,5-dichloro-2-n-octyl-3 2H-isothiazolone Sea-Nine 211 to two marine teleostean fishes. *Japanese J. Environ. Toxicol.* 13:105–116.
- Moon YS, M 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.
- Moreland DE. 1980. Mechanisms of action of herbicides. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:597–638.
- Nacci DE, R Walsh and E Jackim. 1986. Guidance manual for conducting sperm cell tests with the sea urchin, *Arbacia punctulata*, for use in testing complex effluents. p. 34. In *Aquatic Toxicology Testing Manual*. USEPA Environmental Res. Lab., Narragansett, RI.
- Negri AP, C Vollhardt, C Humphrey, A Heyward, R Jones, G Eaglesham and KE Fabricius. 2005. Effects of the herbicide diuron on the early life history stages of coral. *Mar. Pollut. Bull.* 51:370–383.
- 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.
- Park KH, KT Lee, JS Lee and KN Han. 2006. Acute toxicity of antifouling agents (TBT, Sea-nine, Cu-pyrithione and Zn-pyrithione) to rockfish *Sebastes schlegeli* and amphipod *Monocorophium acherusicum*. *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Eng.* 9:21–28.
- Rial D, J Santos-Echeandia, XA Alcaez-Salgado, A Jordi, A Tovar-Sanchez and J Bellas. 2016. Toxicity of seabird guano to sea urchin embryos and interaction with Cu and Pb. *Chemosphere* 145:384–393.
- Sherrard RM, CL Murray-Gulde, JH Rodgers and YT Shah. 2003. Comparative toxicity of Chlorothalonil: *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. *Ecotox. Environ. Safe.* 56:327–333.
- Terlizzi A, S Frascchetti, P Gianguzza, M Faimali and F Boero. 2001. Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 317:311–317.
- Van Dam JW, AP Negri, JF Mueller and S Uthicke. 2012. Symbiont-specific responses in foraminifera to the herbicide diuron. *Mar. Pollut. Bull.* 65:373–383.
- Wang H, Y Li, H Huang, X Xu and Y Wang. 2011. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides using the *Strongylocentrotus intermedius* sea urchin embryo test. *Environ. Toxicol. Chem.* 30:692–703.
- Won NI. 2000. Sea urchin bioassay using Korean purple sea urchin *Strongylocentrotus nudus*: Standardization of well plate method. MS Thesis. Seoul National University, p. 106.
- Xu X, X Wang, Y Li, Y Wang and Y Wang. 2011. Acute toxicity and synergism of binary mixtures of antifouling biocides with heavy metals to embryos of sea urchin *Glyptocidaris crenularis*. *Hum. Exp. Toxicol.* 30:1009–1021.
- Yamada H. 2006. Toxicity and preliminary risk assessment of alternative antifouling biocides to aquatic organisms. pp. 213–226. In *Antifouling Paint Biocides*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Zhang AQ, GJ Zhou, MHW Lam and KMY Leung. 2019. Toxicities of Irgarol 1051 derivatives, M2 and M3, to two marine diatom species. *Ecotox. Environ. Safe.* 182:109455.