

미래규제대응 선박부착생물 제어기술 위해성 평가기법 개발: 수중제거기술

Development of risk assessment for control technology to
reduce transfer of ship's biofouling:
In-water cleaning technique

2019.02

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “미래규제대응 선박부착생물 제어기술 위해성 평가기법 개발: 수중제거기술”과제의 1단계 최종 보고서로 제출합니다.

2019. 02.

총괄연구책임자 : 강 정 훈

참여연구원 :

강수민, 강준수, 권오윤, 김영옥, 김문구, 김민주,
김상렬, 김정현, 김현정, 문영선, 배미경, 서진영,
송영경, 신경순, 신민주, 심원준, 유옥환, 이우진,
이형곤, 임운혁, 장 미, 장민철, 장풍국, 정승원,
정주학, 정지현, 차형곤, 최유미, 최정민, 최진우,
한기명, 황청희, 현봉길, 홍상희, Soon Zhi Yang

보고서 초록

과제관리번호	PE99624	해당단계 연구기간	2차년도	단계 구분	1 단계
연구사업명	미래규제대응 선박부착생물 제어기술 위해성 평가기법 개발: 수중제거기술				
연구과제명	미래규제대응 선박부착생물 제어기술 위해성 평가기법 개발: 수중제거기술				
연구책임자	강 정 훈	해당단계 참여연구원수	총 : 41 명 내부 : 16 명 외부 : 25 명	해당단계 연구비	정부 : 684,000 천원 기업 : 천원 계 : 684,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원/ 위해성분석연구센터		참여기업명	해당없음	
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약				보고서 면수	327

1. AFS 처리활성물질 분석기술 개발

- 1-1. AFS 처리활성물질 분석기술 정립 및 공정시험기준안 도출 : CuPT, ZnPT, Diuron, Irgarol, Sea-Nine에 대한 질량분석법을 정립하고 이를 바탕으로 시범지침서를 작성함.
- 1-2. 선박부착 및 수중제거 파생물 시험적용 : 파생물 내 중금속 및 유기계살생물질 잔존 특성을 파악하고 배출되는 입자성 물질의 크기별 분포특성을 파악함.

2. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE영향평가, 지표발굴, 모사실험 및 AFS활성물질 영향 평가

- 2-1. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE영향 및 지표발굴
- 2-1-1. 넙치: 고압세척용출수(Water jet effluents)와 MeOH 추출물에 노출된 배아는 공통적으로 세포 형태형성, 신호전달, 근절섬유 분절기작에 유의하게 영향을 받음
- 2-1-2. 곤쟁이/단각류: 고압세척 용출수는 중금속독성영향으로 인해 MeOH 추출액보다 발생독성이 4배에서 7배까지 높음
- 2-1-3. 둥근성게: 이어도호는 고압세척용출수의 독성이 강한 것으로 나타났고, 이사부호는 MeOH 추출액이 고압세척용출수에 비해 독성이 강한 것으로 나타났음.
- 2-1-4. 동물플랑크톤: 대표 연안요각류 중 *Paracalanus parvus* s.l.이 *Acartia omorii*보다 독성에 더 민감함
- 2-2. 선박부착생물 모사실험 및 LAB-SCALE 영향 평가
- 2-2-1. 넙치: 심장부종 빈도는 Biocide, Silicone, background 실험구의 10,000배 희석구간에서만 유의한 증가를 확인
- 2-2-2. 둥근성게: 모사판 실험에 의한 고압세척용출수 내 독성은 biocide 처리구에서 가장 높았고, MeOH 추출액 중에서는 background 처리구의 독성이 가장 강하게 나타났음.
- 2-2-3. 동물플랑크톤: Silicone 도포 모사판 시험구에서 독성이 가장 낮았고, 나머지 시험구들은 유의한 독성 차이가 없었음

2-3. 국내 주상용 Principal biocide AFS처리 활성물질에 대한 독성영향평가

- 2-3-1. 넓치: 3 종(Sea-Nine, Irgarol, Diuron)의 booster biocides에 배아가 노출 되었을 때, 치골형성, 신호전달, 중추신경뉴런발달 기능 유전자 등의 기작이 유의한 영향을 받음
- 2-3-2. 곤쟁이/단각류: 곤쟁이는 단각류보다 3배 가량 민감한 반수치사율을 보임
- 2-3-3. 둥근성게: Irgarol의 EC₅₀은 4,476 µg/L, Diuron의 EC₅₀은 10,777 µg/L, Sea-Nine의 EC₅₀은 8.134 µg/L, CuPT의 EC₅₀은 3.423 µg/L, ZnPT의 EC₅₀은 6.488 µg/L였음. 둥근성게 배아에 미치는 독성은 CuPT가 가장 높은 것으로 나타났음.
- 2-3-4. 동물플랑크톤: Sea-Nine 2110이 다른 활성물질에 비해 매우 강한 독성을 나타냄

3. 선박부착기인 생물 및 위해성 요인 탐색 및 판별시도

3-1. 선저부착생물 확보 및 판별 그리고 위해성요인 탐색

- 3-1-1. 미세조류: 선박 방오도로 내성 미세조류 탐색 (*Olfantiella onnuriae*)
- 3-1-2. 원생생물: 4척의 선박에서 섬모충 6종 탐색, 장목 2호에서 분리된 *Euplotes* 2종은 국내 미기록 종으로 확인됨
- 3-1-3. 부착대형저서동물: 5척의 연구조사선을 대상으로 부착대형저서동물을 조사한 결과 총 47종이 출현하였으며, 평균 10,297 개체/m²와 생체량 2,381 gWWt/m²이 출현함


3-2. 선박부착생물 모사실험 파생생물 판별

- 3-2-1. 미세조류: 선박부착생물 모사판을 통한 부착 미세조류 군집 파악 및 파생미세조류의 Viability 연구 수행
- 3-2-2. 원생생물: 부착판 섬모충 4종 탐색, 방오도로 처리와 미처리 판의 섬모충 초기생물상은 차이를 보임
- 3-2-3. 부착대형저서동물: Background 모사판에는 유령멍게(*Ciona intestinalis*), 거친대추멍게(*Asciidiella aspersa*), 큰다발이끼벌레(*Bugula neritina*)가 부착하였으며 Treatment 모사판에는 주로 주걱따개비(*Balanus amphitrite*), 삼각따개비(*Balanus trigonus*)가 부착함

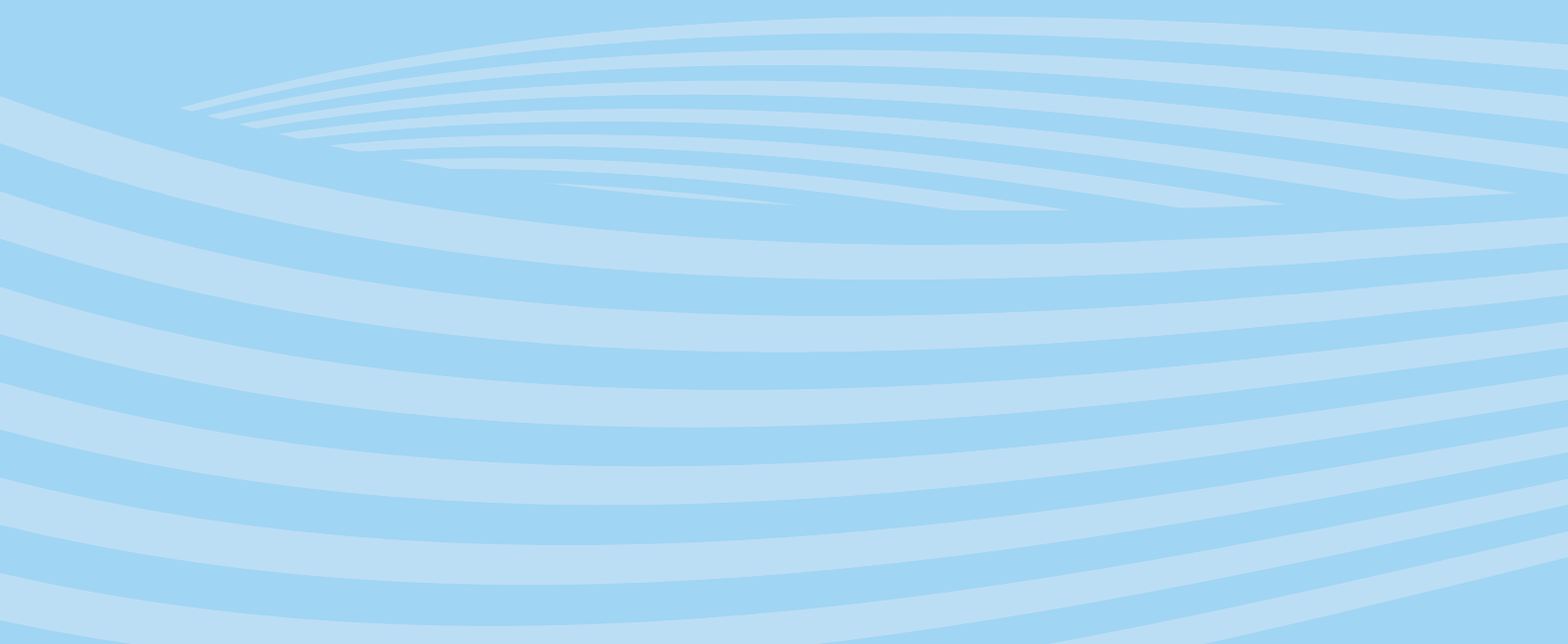
4. 수중제거 핵심 관리요소 선정 및 관리 framework 제시

- 4-1. 수중제거 시나리오 탐색: 현재 사용되는 수중제거 기술은 크게 manual removal, mechanical removal, surface treatment, shrouding techniques 방식으로 구분되며, 국가 간 이동하는 대형 상선에서는 mechanical removal, surface treatment 방식이 주로 사용됨
- 4-2. 관리 수준 대응 핵심 요소 도출: 위해성 평가/관리 대응 핵심요소를 기반으로 40 가지의 수중제거 시나리오를 작성함
- 4-3. 수중제거관리를 위한 위해성평가 기법 제시: 수중제거 시나리오에 대한 RPN 산정 및 MAMPEC 모델 구동에 의한 생물학적·화학적 위해성평가 절차를 완성하여 시범적용 평가하였음

색 인 어 (각 5개 이상)	한글	- 부착원생생물, 부착미세조류, 둥근성게배아, 선박부착생물, 수중제거, 위해성평가, 활성물질, 발생독성
	영어	- Attached marine ciliates, Attached microalgae, Sea urchin embryos, Biofouling, In-water cleaning, Risk assessment, Active substances, developmental toxicity



Development of risk assessment for control technology to
reduce transfer of ship's biofouling:
In-water cleaning technique



미래규제대응 선박부착생물
제어기술 위해성 평가기법 개발:
수중제거기술

요 약 문

I. 제 목

미래규제대응 선박부착생물 제어기술 위해성 평가기법 개발: 수중제거기술

II. 연구개발의 목적 및 필요

1. 연구개발의 목적

- 국제해사기구 미래 해양환경규제 수준의 현실적 설정을 지원하고, 그에 따른 수중제거기술의 신규패러다임 시장진입을 견인할 수 있는 위해성 평가방법 개발
- 국제해사기구에 상정할 국가차원 선박부착생물 수중제거관리 통합프로세스 제시

2. 연구개발의 필요성

- 선박부착생물 수중제거기술 산업시장 진입과정
 - 국제해사기구 미래규제 대응 ‘위해성 평가기법’을 통한 수중제거기술의 시험 및 평가기술 요구
 - ‘선박부착생물 관리 가이드라인’에 명시된 ‘위해성 평가’를 통한 수중제거기술의 환경 친화적 조건 만족할 수 있는 기준 제시
 - 국제해사기구가 2016년 ‘선박부착생물 관리협약’ 작업 예고 후 가이드라인에 명시된 ‘위해성 평가기법’ 개발의 시급성과 중요성이 대두됨
 - 위해성 평가기법의 핵심은 수중제거 파생물에 의한 환경오염 및 외래종 이동 저감임
 - 가까운 미래에 국제해사기구의 ‘해양환경보호위원회’에서 ‘위해성 평가기법’과 ‘수중제거 파생물 회수율’ 기준 설정을 위한 논의 예정
- ‘선박부착생물 관리 가이드라인’ 내 수중제거 기인 환경오염 및 외래종 이동저감을 위한 수중제거장비의 현장운용 체계화
 - 항만 현장에서 적용가능한 수중제거기술 통합 관리프로세스 구축 및 운용 요구증대
 - 항만 도달 선박의 운용기록과 선박 유해성 평가를 통한 수중제거장비 적용 여부 결정
- ‘선박부착생물 관리협약’ 작업 예고 후, 선박부착생물 수중제거기술 산업화 시장의 패러다임 변화를 대비하여, 다양한 기술들의 성능 평가관리 시스템을 구축하여 미래 산업화 시장을 독려하고 시장을 점유하도록 적극진입 유도

- 미래규제 대응 수중제거기술 개발로 국산장비의 시장성 확장 기대
- 환경친화적 성능 갖춘 수중제거기술의 유입을 적극 반영한 항만 통합 관리프로세스 구축 및 운용

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구기간

2017년 1월 1일 - 2018년 12월 31일

2. 연구내용 및 범위

가. AFS 처리활성물질 분석기술 개발

(1) AFS 활성물질 분석기술 정립 및 공정시험기준안 도출

- 대상 처리활성물질 선정 및 LC/MS/MS 기반 mass 라이브러리 구축
- 추출 및 정제 기법 정립 및 액체크로마토그래피 정량 분석조건 도출
- 분석표준화를 위한 공정시험기준안 도출 및 시범지침서 작성
- 국내외 환경 기준 검토 및 독성데이터베이스 기반 위해농도 수준 산출

(2) 선박부착 및 수중제거 모사시험 파생물 시험적용

- 고압세척 파생물 채취 및 활성물질 잔존 특성 파악
- 수중제거 모사시험 실시 및 파생물 내 활성물질 잔존특성 분석
- 세척 배출수 내 입자성 물질 분포특성 파악

나. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE 영향평가, 지표발굴, 모사실험 및 AFS 활성물질 영향 평가

(1) 선박부착 파생물의 LAB-SCALE 영향 및 지표발굴

(가) 넙치배아 발생독성평가

- Ocean급 선박(이어도호)과 Global급 선박(이사부호)의 고압세척 배출수 채집
- 이어도호 및 이사부호 고압세척 배출수 원액 및 메탄올 추출액에 노출된 넙치 배아발생독성영향평가
- RNA-seq 분석기법을 적용한 발생독성평가 및 지표 발굴
- 고압세척배출수 노출에 대한 독성기작규명

(나) 국제시험종(곤쟁이/단각류) 독성평가

- 이어도호 고압세척배출수 원액 및 메탄올 추출액의 단각류/곤쟁이를 이용한 급성 독성영향 평가

- 이사부호 고압세척배출수 원액 및 메탄올 추출액의 요각류/곤쟁이를 이용한 독성 영향 평가
- 고압세척배출수에 노출된 시험생물의 독성과라미터 산출 및 민감도 비교
- (다) 둥근성게 수정률 독성평가
 - 고압세척용출수 및 메탄올 추출액에 노출된 성게의 수정영향 평가
- (라) 동물플랑크톤 독성평가
 - 선박부착 파생물에 대한 동물플랑크톤의 LAB-SACALE 독성영향평가
- (2) 선박부착생물 모사실험 및 LAB-SCALE 영향 평가
 - (가) 넙치배아 발생독성평가
 - 선박표면모사시험 세척수 노출실험 및 독성영향 평가
 - (나) 둥근성게 수정률 독성평가
 - 모사판 실험을 통해 획득된 고압세척용출수 및 메탄올 추출액에 대한 성게의 수정영향 평가
 - (다) 동물플랑크톤 독성평가
 - 모사판 파생물 유출수에 대한 동물플랑크톤의 독성영향평가
- (3) 국내 주상용 Principal biocide AFS처리 활성물질에 대한 독성영향평가
 - (가) 넙치배아 발생독성평가
 - 국내 주상용 5종 booster biocide (Irgarol 1051, Diuron, Sea-Nine 211, CuPT, ZnPT) 선정 및 노출기법 정립
 - 넙치배아 형태발생독성 영향평가
 - RNA-seq 분석기법 기반 발생독성평가 지표 발굴
 - 5종의 booster biocide (Irgarol 1051, Diuron, Sea-Nine 211, CuPT, ZnPT)의 분자 독성영향 기작규명
 - (나) 국제시험종(곤쟁이/단각류) 독성평가
 - Sea-Nine 211에 노출된 단각류/곤쟁이를 이용한 급성독성영향 평가
 - 독성과라미터 산출 및 민감도 비교
 - CuPT, ZnPT에 대한 독성DB를 조사하여 SSD(Species Sensitivity Distribution) 그래프 작성하여 독성민감도 비교 후 HC₅(Hazardous concentration 5%) 도출.
 - (다) 둥근성게 수정률 독성평가
 - 국내 주상용 Principal biocide AFS처리 활성물질에 대한 둥근성게 수정 영향 평가
 - (라) 동물플랑크톤 독성평가

- 국내 주상용 AFS처리 활성물질에 대한 동물플랑크톤의 독성영향평가

다. 선박부착기인 생물 및 위해성 요인 탐색 및 판별시도

(1) 선저부착생물 확보 및 판별 그리고 위해성요인 탐색

(가) 선저부착 미세규조류

- 선저 부착 미세규조류 판별
- 선박 도료 (방오제)의 기질 특이적 부착미세규조류 규명
- 차세대염기서열 분석을 통한 선저 부착 미세규조류 판별

(나) 선저부착 원생생물

- 선박부착 섬모충류 생물상 판별
- Local급 장목1호, 2호, coastal급 이어도호, ocean급 온누리호, global급 이사부호의 hull fouling과 niche areas에서 microfilm을 채집하여 섬모충을 분리 배양
- 배양된 섬모충을 단일 분리하여 세포의 형태 및 분자학적 분석 수행

(다) 선저부착 대형저서동물

- 선박 부착 대형저서동물 분포양상 및 생물상 판별
- 운항지역이 서로 다른 Local급 장목1호, 2호, coastal급 이어도호, ocean급 온누리호, 이사부호 등 총 5척을 대상으로 조사
- Hull fouling areas의 상부, 중부, 선저(flat bottom)와 niche areas의 스러스터(thruster), 프로펠러(propeller) 구역으로 구분하여 조사
- 부착 대형저서동물 종류와 각 운항 해역별 종의 분포차이 및 생태계 위해성 탐색

(2) 선박부착생물 모사실험 파생생물 판별

(가) 선저부착 미세규조류

- 선박 모사판 내 부착 미세규조류 판별
- 선박 모사판 파생 부착 미세조류 생산판별 규명

(나) 선저부착 원생생물

- Treatment(방오도료 도포)와 Background(방오도료 비치리) 모사판에 부착 생활하는 섬모충류를 주간 채집 수행
- 형태학적, 분자학적 분석을 통해 방오도료 노출시간에 따른 섬모충류 생물상 변화 추적

(다) 선저부착 대형저서동물

- 부착판에 가입되는 대형부착생물의 정도(biofouling index) 및 모사실험 조건에 따른 파생생물의 생존율 분석

- 부착관 종류(background, treatment)에 따른 대형부착생물 종류 및 가입률 분석 후 부착관에서 제거 후 생존율 분석
- 퇴적물 상태에 따른 부착생물의 부착관 제거 후 생존율 분석

라. 수중제거관리 framework 제시

(1) 수중제거 시나리오 탐색

- 선박부착생물의 수중제거 기술현황 분석
- 선박부착생물의 국가별 수중제거 관리 사례 검토 및 한계성 분석

(2) 관리 수준 대응 핵심 요소 도출

- 위해성 요소별 이론적 수중제거 시나리오 검토
- 수중제거 관리 수준을 반영할 수 있는 핵심 요소 선정

(3) 수중제거관리를 위한 위해성평가 기법 제시

- 핵심요소 반영 수중제거 시나리오 도출 및 이론적 지표적용
- 위해성 평가지표 반영 이론적 관리 framework도출

IV. 연구개발결과

1. AFS 처리활성물질 분석기술 개발

가. AFS 활성물질 분석기술 정립 및 공정시험기준안 도출

부착생물 수중제거 기술 위해성평가를 위한 핵심 기술 중 하나인 활성물질 분석기술을 정립하기 위한 과정으로, 대상 활성물질을 선정하고, 질량분석에 필요한 각 화합물별 질량라이브리(mass library)를 구축하였으며, 액체크로마토그래피 분리·분석조건을 최적화하였다. 국제적인 활성물질 사용과 규제 동향을 파악하여 활성물질 중 가장 활발히 사용되고 있는 copper pyriithione (CuPT)과 zinc pyriithione (ZnPT), 그리고 과거에 많이 사용되어 현재까지 해양환경 중에 상당량 잔존하는 것으로 알려져 있는 Diuron, Irgarol, DCOIT (Sea-Nine)를 대상 유기활성물질로 선정하였다. 또한 방오도료에 가장 핵심적으로 사용되는 무기 금속 활성물질인 구리와 아연을 대상물질에 포함하였다. 액체크로마토그래피 질량분석기를 이용하여 살생물제를 정량분석하기 위하여 각 화합물의 질량라이브리를 구축하고 여기로부터 분석에 필요한 Q1/Q3 이온을 선정하였으며, 해당 이온을 최고 감도로 분석할 수 있도록 질량분석기 최적화 상수를 산출하였고, 최적의 액체크로마토그래피 분리·분석 조건을 정립하였다. 이를 바탕으로 활성물질 분석 표준화를 위한 공정시험기준안을 도출하여 시범 지침서를 작성하였다. 지침서에는 서론, 시료채취 시 고려사항, 시료 채취 및 보존 방법, 전처리 방법, 정도보증 및 관리, 시료의 분석 부분으로 구성

되었고, 시료 분석에 대한 자세한 내용을 담은 부속서 1, 2, 3을 포함하였다.

나. 선박부착 및 수중제거 모사시험 파생물 시험적용

Zinc pyrithione(172 - 260 ppb)과 copper pyrithione(28.8-187 ppb)이 모든 배의 고압세척배출수에서 검출되었으며, Diuron은 장목2호에서만 검출되었다. Sea-Nine과 Irgarol은 모든 시료에서 검출되지 않았다. Zinc pyrithione과 copper pyrithione 농도는 ECOTOX 데이터베이스에 보고된 전체 독성시험생물종의 약 35-61% 생물종에 치사 영향을 미칠 수 있는 농도 수준으로 확인되었다. 고압세척배출수 내 구리, 아연 농도는 해양환경기준 대비 최대 3,400배, 배출허용기준 대비 최대 22배를 초과하였으며, ECOTOX 데이터베이스에 보고된 거의 모든 시험 생물에 치사영향을 미칠 수 있는 수준이었다. 고압세척배출수의 침전물 내에는 철(12-25%), 아연(16-21%), 구리(0.5-5%) 등의 금속성분이 고농도로 함유되어 있었다. 고압세척배출수 내 총부유물질 농도는 평균 1,570 mg/L로서 청정지역 배출기준에 비해 최대 80배, 하수종말처리장 방류수 수질기준 대비 최대 319배의 높은 수준을 보였다. 고압세척배출수 내 침전물을 입자크기 구간별로 분리 채취하여 입자크기와 입자량 누적분포 관계를 도출하였다. 해조류 내 금속 조성은 침전물과 유사하게 구리, 아연 등의 농도가 상대적으로 높았으며, 이들 농도는 보고된 해조류의 배경농도 대비 각각 최대 68배, 220배 높은 수준이었다. 부착생물 제거 현장에서 수거된 페인트파편과 퇴적물에서는 구리, 철, 아연, 바륨 등이 고농도로 관찰되었으며, 고압세척배출수 침전물, 해조류 등과는 달리 방오도료에 일반적으로 가장 많이 포함되는 구리의 농도가 가장 높게 검출되었다. 제거현장 주변 해수 내 부유물질 농도는 평균 897 mg/L이었으며 선박부착생물 제거 과정 중 주변 해양환경으로 배출되는 고압세척배출수에 의해 해수 내 부유물질 농도는 약 10% 증가하였다. 인근 해수 내에서는 구리, 아연, 망간, 바륨 등 방오도료에 많이 포함되는 중금속이 높은 농도로 검출되었다. 부착생물 제거 작업 후에는 농도가 약 2배 증가하였으며, 해양환경기준(단기)을 구리의 경우 약 39배, 아연은 9.4배를 초과하는 수준이었다. 수중제거 모사시험 세척폐수 내 부유물질 농도는 청정지역 배출기준 대비 55배, 하수종말처리장 방류수 배출기준 대비 최대 218배 초과하는 수준이었다. 활성물질 방오도료 시편의 세척폐수에서는 아연(557 ppb), 구리(359 ppb), 철(103 ppb)이 상대적으로 높은 농도로 검출되었다. 유출된 구리와 아연 농도는 해양환경기준(단기)을 각각 약 120배, 17배 초과하는 수준이었다. 유기계 살생물제는 모든 시편 시료에서 검출되지 않았다. 침전물 내 중금속 또한 활성물질이 포함된 도료 시편에서 구리(5,170 ppb)와 아연(1,070 ppb)이 상대적으로 높은 농도로 검출되었다. 부착생물의 제거작업은 해수 내 용존 활성물질의 농도를 직접적으로 증가시킬 뿐만 아니라 발생된 많은 양의 입자성 파생물이 해수

유동을 따라 이동하면서 지속적으로 해수환경으로 활성성분을 용출시킬 것으로 예상된다.

2. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE 영향평가, 지표발굴, 모사실험 및 AFS 활성물질 영향 평가

가. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE 영향 및 지표발굴

(1) 넙치배아 발생독성평가

선박 방오 페인트(Antifouling paint)는 다양한 살충효과를 가진 중금속을 포함한 화학제로 구성되어 있다. 실제 선박의 연료 효율을 감소시키는 부착생물에 대한 살충효과를 가지고 있어 경제적 효율을 증대시키는 장점을 가지고 있으나, 때때로 선박 수리(water jet cleaning, in-water cleaning, sanding, sand blasting, scraping), 페인팅 작업, 정박 등의 활동으로 페인트 입자나 성분이 해양환경에 유출되어 연안생태계에 영향을 미친다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 연안환경에서 수정란 기간을 거쳐 자어까지 성장하는 넙치배아를 이용하여 Ocean급 연구선인 이어도호와 Global급 연구선인 이사부호의 고압세척배출수에 노출시켜 형태발생독성영향을 평가하였고, 이어 RNA-seq분석을 통해 노출에 반응하는 모든 전사체를 정밀 분석하여 파생물 노출로 인한 독성기작 및 지표를 발굴하고자 하였다. 추가적으로 고압세척용출수를 메탄올로 추출하여 중금속 성분의 독성을 제외한 유기 booster biocide 독성영향만 선택적으로 평가하였다. 두 연구선의 고압세척배출수 노출구에서 형태발생독성(심장부종, 척추만곡, 꼬리지느러미 기형)이 공통적으로 나타났고, 형태기형 발현정도를 비교하였을 때, 고압세척배출수가 MeOH 추출액 노출구보다 유의하게 높게 나타나 중금속이 포함된 고압세척배출수의 독성이 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 이어도호의 고압세척배출수와 MeOH 추출물의 영향을 받는 유전자는 세포형태형성, 신호전달, 근질섬유 분절 유전자 등이 유의하게 영향을 받는 것으로 확인되었다. 이사부호의 고압세척배출수의 RNA sequencing 분석결과, 고압세척배출수에 노출된 배아는 316종의 유전자 증가하였으며, 174종의 유전자가 감소하였다. 이때 증가한 주요 유전자로는 면역, 생식 발생관련 유전자가 유의하게 증가하였으며, 감소한 유전자로는 운반이나 환원반응등과 연관된 유전자들로 확인되었다. MeOH 추출액에 노출된 경우, 생체 대사, 신호전달, 암이나 면역관련 유전자가 증가하였다.

(2) 국제시험종(곤쟁이/단각류) 독성평가

고압세척이나 수중 세척 등의 선체 cleaning작업 중 배출되는 배출수는 지속적으로 연안으로 유입될 수 있는 관심오염원이다. 그러나 이들의 다양한 화학물질이 결합된 형태로써 이들에 대한 연안생물 급성독성자료를 산정한 사례는 매우 드물다. 따라서 본 연구에서는 이러한 선박부착파생물의 연안생물의 독성을 평가하기 위하여 국제시험종이며 비

표적생물인 까막곤쟁이 *Neomysis awatschensis*, 단각류, *Monocorophium uenoi* (350 μm -500 μm)의 유생(<1-day old)을 Ocean급 연구선, 이어도호의 고압세척 배출수와 이를 메탄올로 추출한 추출액에 노출시켜 급성독성 영향을 평가하였다. 단각류에 대한 고압세척 배출수, MeOH 추출물의 반수 치사농도(LC₅₀, 48시간)는 각각 0.642%, 2.798% 였다. 또한 까막곤쟁이에 대한 고압세척 배출수, MeOH 추출액의 반수 치사농도(LC₅₀)는 각각 0.412%, 2.680% 였다. 고압세척 용출수는 중금속독성영향으로 인해 MeOH 추출액보다 발생독성이 4배에서 7배까지 높았다. 또한 까막곤쟁이, (*Neomysis awatschensis*)와 요각류 (*Tigriopus japonicus*)유생을 Global 급 연구선인 이사부호의 고압세척배출수에 노출시켜 급성독성을 평가하였다. 요각류는 고압세척배출수와 MeOH에 노출되었을 때 반수치사농도(LC₅₀, 48시간)가 0.006%, 0.056%로 나타났다. 또한 까막곤쟁이에 대한 고압세척배출수와 MeOH 추출액의 반수 치사농도(LC₅₀)는 각각 0.232%, 0.084% 였다. 고압세척 배출수는 중금속독성영향으로 인해 MeOH 추출액보다 발생독성이 2.7배에서 9배까지 차이가 났다.

(3) 둥근성게 수정률 독성평가

선박부착 파생물의 독성영향을 파악하기 위해 한국해양과학기술원의 연구선 이어도호와 이사부호의 상가수리 시 발생된 고압세척용출수 및 메탄올 추출액에 대한 둥근성게 배아의 노출 실험을 수행하였다. 이어도호 고압세척용출수에 대한 둥근성게의 수정률은 10배와 100배 희석액에서는 각각 0.2±0.5%, 2.3±1.4%였다. 1,000배 희석액에서는 79±5.8% 였다. 이사부호의 고압세척용출수에 대한 둥근성게 수정률은 원액과 10배 희석액에서는 수정률이 각각 0%, 0.2%로 매우 낮았으나, 100배 희석액에서는 수정률이 95.2% 높게 나타났다. 이어도호와 이사부호의 MeOH로 추출액에 대한 둥근성게 수정실험 결과, 이어도호의 추출액은 3배, 30배 희석액에서 모두 수정률이 0%로 나타났고, 3,000배 이상의 희석액에서부터 수정률이 90% 이상으로 나타났다. 이사부호는 2.5배-250배 희석액까지는 수정률이 거의 0%였고, 2,500배 이상의 희석액에서부터 수정률이 90%이상으로 나타났다.

(4) 동물플랑크톤 독성평가

동물플랑크톤에 대한 선박부착 파생물의 독성영향을 확인하기 위하여 한국해양과학기술원 소속 연구선인 이어도호(R/V EARDO) 상가수리 중 고압세척기(Water-jet)를 이용한 선박 선저세척 시 발생된 유출수(Effluents)를 취하여 실험에 사용하였다. 선박부착 파생물에 대한 실험은 Water-jet 배출수와 Water-jet 메탄올 추출물에 대한 요각류 *Acartia omorii*와 *Paracalanus parvus* s.l.의 알(Egg) 부화율과 유생 사망률을 확인하였다. 각 농도별 실험구에서 pH는 8.04±0.03으로 비슷한 수준이었으며, 용존산소(DO)의 포화도도 평균 98.38±0.37로 대부분 포화상태에 가깝게 나타났다. 알 부화율은 *P. parvus*

s.l.의 경우 Water-jet 메탄올 추출물에서 다소 높았으나, *A. omorii*의 경우 명확하게 비교하기 어려웠다. 유생 사망률은 두 종의 요각류 모두 Water-jet 배출수에서 더 높게 나타나 Water-jet 배출수의 독성이 더 강한 것으로 파악되었다. 두 종의 요각류는 전체적으로 *A. omorii*보다 *P. parvus* s.l.이 독성에 더 민감한 반응을 보였다. *P. parvus* s.l.의 24시간 후 반수치사농도(LC₅₀)는 Water-jet 배출수(약 9,000배 희석액)가 Water-jet 메탄올 추출물(약 650배 희석액)에 비해 약 15배 더 높게 나타났다.

나. 선박부착생물 모사실험 및 LAB-SCALE 영향 평가

(1) 넙치배아 발생독성평가

2차 년도에는 선박표면모사시험에서는 선박표면 모사판을 한국해양과학기술원 남해연구소 해상가두리에 설치하여 70일간 부착한 후 표면을 세척하였고 용출수로 독성영향을 평가하였다. 시나리오별로 4개의 선박 표면 모사판 실험구(Biocide, No-Biocide, Silicone, Background)로 분리하여 설치하였고 70일 경과한 후 육상으로 끌어올려 멸균 해수로 세척한 후 용출수를 1,000, 10,000, 100,000배 희석구로 나누어 넙치배아에 노출시켜, 사망률과 형태기형의 빈도를 비교분석 하였다. 꼬리기형 빈도는 silicone, background 실험구의 10,000배 희석구간에서 유의한 증가를 보였고, 척추만곡 빈도는 silicone, background 실험구의 10,000배 희석구간에서 유의한 증가를 보임, 심장부종 빈도는 Biocide, silicone, background 실험구의 10,000배 희석구간에서만 유의한 증가를 확인하였다

(2) 둥근성게 수정률 독성평가

4개의 서로 다른 처리를 한 모사판을 2개월 간 수중 노출 후 고압세척용출수 및 메탄올 추출액에 대한 둥근성게 수정률을 측정하였다. 고압세척용출수에 대한 수정률 실험 결과, Biocide 처리구에서는 원액과 10배 희석액에서 둥근성게의 수정률이 각각 0%, 35%였고, 100배 희석액에서는 수정률이 90% 이상으로 나타났다. No-Biocide와 Background 처리구에서는 원액에서만 수정률이 대조구와 차이를 보였고, Silicone 처리한 모사판은 원액에서도 수정률이 대조구와 차이를 보이지 않았다. No-Biocide 처리구에서는 원액을 여과 후 수행된 실험에서는 수정률이 90%이상으로 높게 나타나, 고압세척용출수 내 독성의 영향보다는 입자성 물질에 의한 영향인 것으로 판단된다. MeOH 추출액에 대한 둥근성게 수정률 실험 결과, Biocide 처리구는 10배 희석액에서부터 80% 이상의 수정률을 보였고, No-Biocide 처리구에서는 100배 희석액부터는 수정률이 90%이상으로 나타났다. Silicone 처리구는 10배 희석액에서 수정률이 96.3±2.1%였다. Background 처리구의 MeOH 추출액은 10배와 100배 희석액에서 모두 수정률이 0%로 나타났다.

(3) 동물플랑크톤 독성평가

AFS 유출수(Effluents)에 대한 동물플랑크톤의 독성영향평가를 위해 모사판 시험(static panel test)을 진행하였다(EXP. 1: Background + Tie coat, EXP. 2: Background + Tie coat + Pain, EXP. 3: Background + Tie coat + Biocide, EXP. 4: Background + Tie coat + silicone). 모사판 파생물 유출수에 대한 부화율 시험에서 독성 구매가 있을 것으로 예측되었던 3종류 시험구(EXP. 1, EXP. 2, EXP. 3)에서 유출수 희석 농도에 대한 부화율이 50-97%로 3종류 모두 유사한 패턴으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 모사판 방오도로 활성물질 농도 분석 및 추가 실험을 통해 검증할 필요성이 있음을 암시한다. 모사판 시험구 EXP. 4(Background + Tie coat + silicone)에서는 모든 농도 구간에서 90% 이상의 부화율을 보여 모사판 파생물 유출수의 독성 영향이 없는 것으로 나타났다.

다. 국내 주상용 Principal biocide AFS처리 활성물질에 대한 독성영향평가

(1) 넙치배아 발생독성평가

TBT가 미치는 해양생물에 대한 심각한 독성영향이 규명되면서 전 세계적으로 친환경적 대체 방오제의 개발 및 적용에 대한 관심이 증가되었다. 그러나 국가마다 신규 개발 및 사용되고 있는 대체 방오제의 다양한 해양생물에 미치는 독성영향 결과는 매우 제한적이며, 연안에 서식하는 비표적 유용생물에 대한 독성자료는 찾아보기 어려운 실정이다. 본연구의 1차년도 연구에서는 국내를 포함한 전 세계적인 상용 booster biocide 인 Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211에 대하여 비표적 생물로서 넙치 배아에 대하여 발생 독성 영향을 평가하였다. 노출 48시간 이후, Irgarol 1051 and Diuron은 10% 미만의 사망 독성을 보였으나 Sea-Nine 211에 노출된 배아는 100 $\mu\text{g/L}$ 노출농도에서 100%가 사망하였다. 형태발생독성은 3종의 booster biocide에 노출된 실험구에서 모두 꼬리지느러미 기형, 척추만곡, 심장부종이 공통적으로 나타났다. 그러나 이들의 기형발생에 대한 민감도는 물질에 따라 차이가 있었으며 Sea-Nine 211 > Irgarol 1051 > Diuron 순으로 발생 독성이 큰 것으로 확인되었다. 또한 본 연구를 통해 High-throughput sequencing (RNA-seq) 기법을 이용하여 독성지표들을 발굴하였다. Diuron에 노출된 넙치배아는 cellular protein localization 관련 유전자들이, Irgarol 1051에 노출된 배아는 immune system processes에 연관된 유전자들이 유의하게 반응하였고, Sea-Nine 211에 노출된 유전자는 actin filament organization과 embryonic morphogenesis에 관련된 유전자가 특이하게 반응하였다.

2차년도에 선별한 주상용 Antifouling biocide인 CuPT, ZnPT 에 넙치 수정란을 48시간 동안 노출시킨 결과, CuPT에 노출된 넙치는 10, 100, 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도에서 각

각 4 ± 1 , 68 ± 22 , 100%의 사망률을 보였다. CuPT 노출 개체가 ZnPT 노출 개체보다 높은 사망률 및 기형률을 보이며 같은 노출농도에서 CuPT가 ZnPT에 비해 독성이 높은 것으로 확인되었다. CuPT와 ZnPT의 RNA-Seq 노출군을 분석한 결과, CuPT 노출군의 경우 517종의 DEG가 증가하였으며, 234종의 DEG가 감소하였다. metabolism, 면역, 발생, 눈 발달에 관련된 유전자가 유의하게 증가된 것으로 나타났다. ZnPT에 노출된 배아는 암, 면역계, 발생 등에 연관된 유전자가 증가 또는 감소된 것으로 나타났다.

(2) 국제시험종(곤쟁이/단각류) 독성평가

Sea-Nine 211은 2017년 현재 국내를 포함한 대부분의 국가에서 미규제 대상물질로서, 가용할 생태독성자료가 부족한 실정이다. 본 연구에서는 해수독성 평가를 위한 대표적인 시험종인 까막곤쟁이와 단각류에 대한 Sea-Nine 211의 급성독성영향을 평가하여 Sea-Nine 211의 기초독성자료를 조사하였다. Sea-Nine 211에 노출된 단각류(*Monocorophium uenoi*)와 곤쟁이(*Neomysis awatschensis*)에 대한 생태독성 파라미터는 LC₅₀ 값이 $18.3 \mu\text{g/L}$ 와, $6.09 \mu\text{g/L}$ 로 각각 산출되었다. 곤쟁이는 단각류보다 3배가량 민감한 반수치사율을 보였다. Sea-Nine 211의 $60 \mu\text{g/L}$ 이상 농도에서는 단각류가 생존하지 못하였고 노출 농도가 낮아짐에 따라 사망률 또한 낮아졌으며 노출농도 $5 \mu\text{g/L}$ 이하에서는 대조구와 유사한 사망률을 나타내었다. 그러나, 곤쟁이의 경우, 농도 $40 \mu\text{g/L}$ 이상 노출시켰을 때 생존하지 못하였고 노출농도 $1 \mu\text{g/L}$ 이하에서는 대조구와 유사한 사망률을 확인할 수 있었다. 2차년도에는 ZnPT와 CuPT의 독성 DB를 이용하여 독성 데이터베이스를 이용하여 SSD (Species Sensitivity Distribution) 그래프를 작성하였고, 민감도 비교를 위하여 HC₅ (Hazardous concentration 5%) 값을 산정하였다. SSD 그래프를 통하여, CuPT 노출 되었을 경우 어류가 갑각류보다 민감한 경향을 보였고, 이들의 HC₅ 값은 0.125 ppb로 산출되었다. ZnPT 노출 되었을 때, HC₅ 값은 0.520 ppb로 산출되었다. 이는 생물종에 따라 CuPT와 ZnPT의 노출에 대한 민감도가 다른 것을 보여주는 결과이다.

(3) 둥근성게 수정률 독성평가

Biocide 5종에 대한 둥근성게 수정률 실험을 실시한 결과, Irgarol의 EC₅₀은 $4,476 \mu\text{g/L}$ 였고, Diuron의 EC₅₀은 $10,777 \mu\text{g/L}$, Sea-Nine 211의 EC₅₀은 $8.134 \mu\text{g/L}$ 였다. CuPT의 EC₅₀은 $3.423 \mu\text{g/L}$ 였고, ZnPT의 EC₅₀은 $6.488 \mu\text{g/L}$ 였다. 따라서 biocide 5종이 둥근성게 수정률에 미치는 영향은 CuPT > ZnPT > Sea-Nine 211 > Irgarol 1051 > Diuron의 순으로 나타났다.

(4) 동물플랑크톤 독성평가

동물플랑크톤에 대한 AFS처리 활성물질의 독성영향을 확인하기 위해 AFS처리 활성물질인 Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211, CuPT, ZnPT에 대한 요각류 알 부화율과 알에서 깨어난 유생의 사망률을 확인하였다. 실험 대상 생물은 우리나라 연안에 우점하는 요각류 *Acartia omorii*와 *Paracalanus parvus* s.l.를 채집하여 실험을 진행하였다. pH와 용존산소(DO)는 대조구와 모든 물질의 농도 구간에서 평균 8.07 ± 0.02 로 비슷한 수준이었으며, 용존산소의 포화도도 평균 98.30 ± 0.26 로 대부분 포화상태에 가깝게 나타났다. 두 종의 요각류의 알 부화율은 Irgarol 1051, Diuron, Sea-Nine 211 순으로 높게 나타났으며 유생 사망률은 Sea-Nine 211, Diuron, Irgarol 1051의 순으로 높게 나타나 Sea-Nine 211의 독성이 가장 강하였고, Irgarol 1051이 가장 약한 것으로 확인되었다. 두 종의 요각류 사이에서는 전체적으로 *A. omorii*가 *P. parvus* s.l.에 비해 높은 부화율과 낮은 유생 사망률을 보여 *A. omorii*가 선박부착 파생물의 독성에 대해 더 높은 내성을 가지는 것으로 보인다. *P. parvus* s.l.의 24시간 후 반수치사농도(LC₅₀)는 Diuron이 2.17 ppm, Irgarol 1051이 1.24 ppm, Sea-Nine 211이 0.007 ppm 순으로 높게 나타나 Sea-Nine 211이 다른 물질에 비해 상당히 강한 독성을 가지는 것으로 나타났다. CuPT와 ZnPT의 반수치사농도(LC₅₀)는 각각 $6.16 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $1.19 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 CuPT보다 ZnPT의 독성정도가 더 민감하였다.

3. 선박부착기인 생물 및 위해성 요인 탐색 및 판별시도

가. 선저부착생물 확보 및 판별 그리고 위해성요인 탐색

(1) 선저부착 미세규조류

선저부착 미세규조류의 선박별 출현량은 Local급>Coastal급>Ocean급 순으로 나타났고, 최우점종은 *Navicula muscatinei*였다.

(2) 선저부착 원생생물

총 4척의 선박에서 부착 섬모충류를 분석한 결과, 총 6종이 발견되었으며, 장목1호에서 1종(*Loxophyllum rostratum*), 장목 2호 2종(*Euplotes parkei*, *E. plicatum*), 이어도호 1종(*Amphisiella annulata*), 온누리호 2종(*Uronychia binucleata*, *Arcuseries petzi*)이 각각 동정되었다. 이사부호에서는 섬모충류가 검출되지 않았고, 장목 2호에서 분리된 *Euplotes* 2종은 국내 미기록 종이며, 이 2종은 선박기인 외래종의 가능성이 높아 추후 면밀한 검토가 필요하다.

(3) 선저부착 대형저서동물

본 조사에서 출현한 대형저서동물은 총 47종, 10,297 개체/m², 생체량 2,381 gWWt/m²이 출현하였다. 출현 종수는 갑각류가 24종 (51.1%), 다모류가 9종 (19.1%), 대형동물은

포함한 기타 분류군이 8종 (17%), 연체동물이 6종 (12.8%) 순으로 출현하였다. 종수와 평균서식밀도는 따개비류가 출현한 갑각류가 가장 우점하였으며, 생체량은 연체동물이 가장 높게 나타났다. 이어도호에 부착하는 대형저서동물의 출현 종수가 총 25종으로 가장 많은 종이 서식하였으며, 장목 2호와 장목 1호는 각각 18종과 19종이 출현하였다. 반면 온누리호와 이사부호의 부착 대형저서동물은 각각 9종과 8종으로 연안을 주로 조사하는 조사선보다 낮은 출현 종수를 보였다. 서식밀도와 생체량은 장목 1호와 이어도호에서 가장 높게 나타났다. 온누리호는 선저(flat bottom)에서 가장 많은 종과 높은 서식밀도 및 생체량을 보였으며, 흰따개비(*B. improvisus*)와 주걱따개비(*B. amphitrite*)가 가장 우점하였다. 이어도호는 niche areas인 프로펠러 샤프트(propeller shaft)에서 가장 많은 17종과 높은 생체량을 보였으며, 서식밀도는 스러스트에서 높게 나타났다. 우점종은 주걱따개비(*B. amphitrite*)와 삼각따개비(*B. trigonus*)로 나타났다. 장목 2호는 상부에서 가장 많은 14종과 선저에서 높은 서식밀도를 보였으며, 생체량은 선측 상부와 프로펠러 샤프트에서 높게 나타났다. 우점종은 삼각따개비(*B. trigonus*)와 우산석회관갯지렁이(*H. ezoensis*)로 선저에서 가장 우점하였다. 장목 1호는 선체의 측면과 선저에서 9-12종의 종수를 보였으며 서식밀도는 중부 정점, 생체량은 프로펠러 샤프트에서 높게 나타났다. 우점종은 주걱따개비(*B. amphitrite*)가 선저에서 극우점하였다. 이사부호는 선체의 측면과 선저에서 2-4종의 낮은 종수를 보였으며 서식밀도와 생체량은 프로펠러 및 샤프트 정점에서 높게 나타났다. 우점종은 주걱따개비 (*B. amphitrite*)가 선체의 측면 및 선저에서, 삼각따개비 (*B. trigonus*)가 프로펠러 및 샤프트, 스러스트 구역에서 우점하였다.

나. 선박부착생물 모사실험 파생생물 판별

(1) 미세규조류

선박모사판의 부착 미세조류 개체수는 control plate (최대 283,533 cells cm⁻²) > treatment plate (최대 45,130 cells cm⁻²)였고, 부착 미세조류의 파생시의 viability 실험결과는 대조구와 처리구에서 계속적으로 증가하였다.

(2) 원생생물

모사실험에서 7주간 총 4종 *Aspidisca leptaspis*, *Diophrys appendiculata*, *Euplotes parkei*, *Protogastrostyla pulchra* 섬모충의 모사판 부착이 확인되었다. Treatment(방오도료 처리)와 background(방오도료 미처리) 모사판에서의 섬모충 생물상은 4주간은 서로 다른 양상을 보였으나, 5주차 이후 두 모사판간 차이가 감소함이 확인되었다. 모사판에서 우점적으로 출현한 *D. appendiculata*와 *E. parkei*는 향후 독성 연구를 위해 배양하였다.

(3) 대형저서동물

대형부착생물은 Background 모사판에는 주로 유령멍게(*Ciona intestinalis*) 거친대추멍게(*Asciidiella aspersa*), 큰다발이끼벌레(*Bugula neritina*)가 부착되었으며, Treatment 모사판에는 주로 주걱따개비(*B. amphitrite*)와 삼각따개비(*B. trigonus*)가 부착되었다. 부착판에 가입되는 대형부착생물의 biofouling index를 분석한 결과, 설치 1개월 후에는 background 모사판에는 3단계, treatment 모사판에는 1단계로 나타났으며, 설치 2개월 후에는 background 모사판에는 5단계, treatment 모사판에는 1단계가 나타났다. 설치 3개월 후에는 background 모사판에는 5단계, treatment 모사판에도 5단계가 나타났으며 설치 4개월 후에는 background 모사판에는 4단계, treatment 모사판에는 4단계가 나타났다. 실험 1의 B1, B2 모사판에는 유령멍게, 딸기멍게, 해면류, 태형동물 등이 부착되어 있었으며 T1과 T2 모사판에는 biofilm만 붙어있었다. B1, B2의 멍게류 등은 실험 2일째 90%이상이 사망하였으며, 최대 실험5일째 까지 생존하였다. 반면에, 해면류와 태형동물은 각각 실험 2일째와 3일째에 100%이상 사망하였다. 실험 2의 B1, B2 모사판에는 부착생물인 유령멍게, 거친대추멍게, 해면류, 태형동물 등과 이동능력을 가진 단각류, 등각류, 다모류 등이 부착되어 있었으며 T1과 T2 모사판에는 biofilm만 붙어있었다. B1, B2의 단각류 등은 실험 2일째 전부 사망하였으며, 멍게류 등은 최대 실험5일째 까지 생존하였다. 해면류는 실험 2일째 100%사망하였으며, 태형동물은 실험 41일째까지도 50%가 생존하였다. 실험 3의 B1, B2 모사판에는 유령멍게, 거친대추멍게, 해면류, 말미잘류, 태형동물 등과 단각류, 등각류, 다모류 등이 부착되어 있었으며 T1과 T2 모사판에는 따개비류가 모사판의 3/4이상 부착되어 있었다. B1, B2의 단각류, 다모류 등은 실험 4일째 전부 사망하였으며, 멍게류 등은 실험 30일째 까지 약 30%이상이 생존하였다. 주름미더덕은 실험 종료일까지 약 33%생존하였으며 해면류는 실험 4일째 100%이상 사망, 태형동물은 실험 19일째 모두 사망하였다. T1, T2은 실험 1일째 부착생물 분리 과정 중 손상된 따개비의 50%가 사망하였으며 실험 종료일까지도 2.5% 생존하였다. 실험 4의 B1, B2 모사판에는 유령멍게, 거친대추멍게, 해면류, 말미잘류, 태형동물 등과 단각류, 등각류, 다모류 등이 부착되어 있었으며 T1과 T2 모사판에는 따개비류와 말미잘류가 모사판의 3/4이상 부착되어 있었다. T1, B1 수조에는 모래를 T2, B2 수조에는 펄을 넣어준 뒤 실험을 진행하였으며 B1, B2의 단각류, 다모류 등은 실험 5일째 전부 사망하였으며 멍게류, 주름미더덕은 실험 33일째 모두 사망하였고 퇴적물에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다. T1, T2의 따개비는 실험 34일째에 사망하였으며, 퇴적물에 파묻힌 개체는 실험 시작 후 빠른 시간 내에 모두 사망하였다. 모든 수조에서 말미잘 번식이 왕성하였으며 실험 종료시까지 생존하였다.

4. 수중제거관리 framework 제시

가. 수중제거 시나리오 탐색

선박부착생물관련 호주와 뉴질랜드는 가장 체계적이고 엄격하게 부착생물의 수중제거 관리를 수행하고 있는 국가로, 2014년부터 선박 위해 관리 기준(Craft Risk Management Standard: CRMS)을 제정하여 4년간 시범 적용 중에 있으며, 2018년 5월부터 강제화 될 예정이다. 그 외 대부분의 유럽 국가는 아국 정부의 특별한 규정이 존재하지 않거나 혹은 국제해사기구의 선박부착생물 규정에 따라 수중 제거가 가능한 dry-dock을 이용해서 부착생물을 제거하는 것으로 확인되었다. 선박부착생물 제거를 위해 현재 사용되고 있는 수중제거 기술은 크게 manual removal, mechanical removal, surface treatment, shrouding techniques 방식으로 구분되며, 국가 간 이동을 하는 대형 상선에서는 mechanical removal, surface treatment 방식이 주로 사용되고 있다. 하지만 전동 브러쉬 방식을 포함한 대다수의 mechanical removal 방식은 선저 방오도료에 영향을 줄 뿐만 아니라 제거된 파생물을 수거할 수 있는 수거 시스템도 없이 사용되고 있다.

나. 관리 수준 대응 핵심 요소 도출

선박부착생물의 수중제거를 가장 체계적으로 관리하고 있는 호주와 뉴질랜드의 문건 검토 및 국내 선박 입출항 현황 등을 종합적으로 고려하여, 가장 핵심요소라 판단되는 biofouling origin, anti-fouling coating(AFC) type, biofouling type, cleaning method, debris capture 적용여부 등을 선정하였다. 선정된 위해성 평가/관리 대응 핵심요소를 기반으로 40 가지의 수중제거 시나리오를 작성하였다. 작성된 수중제거 시나리오를 기반으로 평가지표를 적용한 생물 및 화학 위해성 평가를 실시할 계획이다.

다. 수중제거관리를 위한 위해성평가 기법 제시

국제해사기구는 선체부착생물의 위험성을 인식해서 2011년 ‘선체부착생물에 의한 외래위해 종 이동 저감을 위한 관리 및 제어 가이드라인’을 공표하였고, 향후 이를 강제화하기 위한 국제 협약을 계획하고 있다. 본 연구에서는 향후 강제화 될 국제협약에 효과적으로 대응하기 위해 선체부착생물관리 관련 선도국 사례를 소개하고 수중제거에 대한 환경 위해성 평가 기법에 대해서도 알아보았다. 선체부착생물관리 관련해서 선도국인 호주와 뉴질랜드는 수중제거 시나리오 의거해 수행한 생물 및 화학 위해성 평가를 근간으로 선체부착생물관리 규제안을 마련하였다. 자국 정부의 특별한 규정이 없는 대부분의 유럽 국가들은 국제해사기구의 선체부착생물 규정에 따라 수중제거를 수행하는 것으로 확인되었다. 우리나라인 경우 선체부착생물에 대한 국내법은 존재하지 않고, 해양 생태계법에 의거해서 약 17종의 해양생태계 교란생물만 지정해서 관리하고 있다. 선박 선체에 대한 수중제거는 외래생물 확산 및 수생 환경으로의 화학 물질

방출을 수반하므로, 생물학적 위해성평가와 화학적 위해성평가를 별개로 수행한 후 이 둘의 평가를 종합하여 수중제거 수용 여부를 판단하였다. 생물학적 위해성 평가는 수중제거과정에서 외래생물 유입에 영향을 미치는 핵심요소를 기반으로 40 code의 수중제거 시나리오 작성하고 위해성우선순위(Risk Priority Number, RPN) 점수를 산정하였다. 화학적 위해성평가는 수중제거 시 용출되는 구리(Copper) 농도를 기준으로 MAMPEC(Marine Antifoulant Model to Predict Environmental Concentrations) 모델 프로그램을 사용하여 PEC(Predict Environmental Concentration)값과 PNEC(Predict No Effect Concentration) 값을 산출하였다. 최종적으로 PEC/PNEC 비의 값이 1 이상이면 화학적 위해성이 높음을 의미한다. R/V 이어호가 부산 감천항에서 수중제거를 수행한다는 가정 하에 위해성평가를 시범 실시한 결과, 생물학적 위해성은 RPN이 <10,000 이어서 저위험으로 판단되었으나, PEC/PNEC 비의 값이 1 이상으로 화학적 위해성이 높아 최종적으로 수중제거가 불가능한 것으로 평가되었다. 따라서 우리나라도 선도국 사례를 참조해서 수중제거기술을 개발하고 또한 국내 항만 현실에 맞는 선체부착생물규제 국내법을 제정해야 할 필요가 있다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. AFS 처리활성물질 분석기술 개발

가. AFS 활성물질 분석기술 정립 및 공정시험기준안 도출

- 수중제거 등 다양한 형태로 배출되는 부착과생물 내 활성물질 잔존특성 및 입자분포 특성을 규명하고, 잔존특성과 입자분포특성을 결합한 거동 및 유출평가를 바탕으로 향후 부착생물 제거기술의 위해성평가 수행에 활용
- 정립된 활성물질 분석기술의 표준화 및 기술 확산을 통해 국내 유관 분석기관의 분석능력을 향상시키고 국가 분석능력에 대한 국제적 신인도 향상

나. 선박부착 및 수중제거 모사시험 과생물 시험적용

- 수중제거에 따른 활성물질 배출 특성 및 위해성 평가 결과를 바탕으로 수중제거기술 관련 국제해사기구 미래 규제에 선제적 대응 또는 관련 국제규제 설정을 선도
- 선박부착생물제거 배출물의 물리·화학적 특성을 바탕으로 수중제거 배출물 최적처리기술 등 미래 국제규제에 상응하는 친환경적 수중제거관리 및 수중제거장비 기술개발 유도 및 지원

2. 선박부착 과생물의 LAB-SCALE영향평가, 지표발굴, 모사실험 및 AFS활성물질 영향평가

가. 선박부착 과생물의 LAB-SCALE영향 및 지표발굴

(1) 넙치배아 발생독성평가

- 국내 상용 AFS의 연안중 위해성평가 기초자료로 활용
- 국내연안관리를 위한 과학적 근거로 제시할 수 있음

(2) 국제시험종(곤쟁이/단각류) 독성평가

- 국내 상용 AFS의 국제시험종 기초적인 생태독성자료로 활용
- 국가간 규제 관리를 위한 과학적 근거로 제시할 수 있음

(3) 둥근성게 수정률 독성평가

- 둥근성게 배아를 이용한 실험법을 고압세척용출수에 대한 국제규격시험생물로 등록 및 활용 가능

(4) 동물플랑크톤 독성평가

- 선박부착생물의 생물위해성 평가를 위한 과학적 근거 자료 제공

나. 선박부착생물 모사실험 및 LAB-SCALE 영향 평가

(1) 넙치배아 발생독성평가

- 고압세척배출수에 대한 연안중 위해성평가 기초자료로 활용
- 국내 오염연안관리 및 규제마련을 위한 과학적 근거자료로 제시할 수 있음

(2) 국제시험종(곤쟁이/단각류) 독성평가

- 고압세척배출수에 대한 국제시험종의 기초적인 생태독성자료로 활용
- 국가 간 규제대응을 독성평가 근거자료로 제시할 수 있음

(3) 둥근성게 수정률 독성평가

- 모사실험 파생물 독성 평가에 대한 과학적 근거 제공

(4) 동물플랑크톤 독성평가

- 국제해사기구(IMO)의 미래 환경규제에 대응한 생물위해성 평가기술 지원

다. 국내 주상용 Principal biocide AFS처리 활성물질에 대한 독성영향평가

(1) 넙치배아 발생독성평가

- 국내 주상용 및 기 개발된 AFS의 연안 유출에 대한 연안중 위해성평가 기초자료로 활용
- 국내 연안중 보호를 위한 AFS 규제 및 관리를 위한 과학적 근거로 제시.

(2) 국제시험종(곤쟁이/단각류) 독성평가

- 국내 주상용 및 기 개발된 AFS의 해양환경 유출에 대한 국제시험종 생태독성자료로 활용
- 국가 간 규제 및 연안관리를 위한 시험종 기반의 과학적 근거자료 마련

(3) 둥근성게 수정률 독성평가

- 등근성계 배아에 대한 국내 주상용 AFS처리 활성물질 위해영향 평가 지표 발굴 및 선별

(4) 동물플랑크톤 독성평가

- AFS 활성물질에 대한 국내 연안종의 기초적인 독성자료로 활용

3. 선박부착기인 생물 및 위해성 요인 탐색 및 판별시도

가. 선저부착생물 확보 및 판별 그리고 위해성요인 탐색

(1) 선저부착 미세규조류

- 선박방오도료 기질 특이적 선저부착미세규조 대상으로 위해성 탐색

(2) 선저부착 원생생물

- 미기록종 2종을 한국해양생물정보시스템(KoMBIS)에 등록하여 섬모충생물상 다양성 정보 업데이트 예정
- 미기록종 2종의 슬라이드 표본 및 유전자 정보 해양생물자원관 기증 예정

(3) 선저부착 대형저서동물

- 국내의 선박 부착생물에 대한 정량적 조사는 전무한 상태로 본 조사의 자료는 매우 가치가 있으며, 또한 조사 선박의 운항지역이 각각 다르기 때문에 매우 유용한 자료가 될 것으로 생각됨
- 향후 본 연구의 부착생물 조사를 통해 부착생물의 위해성과 위해성 판별 시도를 통해 국내의 부착생물 위해성 판별기준을 제시 할 수 있을 것으로 판단됨

나. 선박부착생물 모사실험 파생생물 판별

(1) 미세규조류

- 선박선체 cleaning시 파생실험 기법 개발

(2) 원생생물

- 모사실험에서 발굴한 *Diophrys appendiculata*와 *Euplotes parkei* 2종을 방오도료 독성실험 종으로 활용 예정

(3) 대형저서동물

- 향후 본 연구의 부착생물 모사실험을 통해 부착생물의 위해성과 파생생물의 생존율 분석 결과를 활용하여 국내 선박의 수중제거 시나리오 지표에 적용할 수 있을 것으로 판단됨

4. 수중제거관리 framework 제시

가. 수중제거 시나리오 탐색

- 선박부착생물의 위해성 평가를 통한 관리체계 확립
- 나. 관리 수준 대응 핵심 요소 도출
 - 선박부착생물의 체계적 관리를 통한 국가 생물자원 보호
- 다. 수중제거관리를 위한 위해성평가 기법 제시
 - 미래 국제해사기구 선박부착생물 국제협약에 대응한 관리기술 확보

S U M M A R Y

I. Title

Development of risk assessment for control technology to reduce transfer of ship's biofouling: In-water cleaning technique

II. Objectives and Necessities of the Study

1. Objectives of the Study

- Development of robust methods for risk assessment that can support the realistic setting of the future marine environment regulation level and can lead to the entry of the new paradigm of in-water cleaning technology into the market.
- Suggestion of integrated management process for in-water cleaning of ships' biofouling at national level to cope with requirements of International Maritime Organization

2. Necessities of the Study

- Entry into industrial market for in-water cleaning of ships' biofouling
 - Requirements for testing and evaluation of in-water cleaning techniques through risk assessment enable to cope with regulations from International Maritime Organization (IMO) in the future.
 - Suggestion of regulation which can satisfy environmentally friendly conditions of in-water cleaning techniques through risk assessment specified in '2011 guidelines for the control and management of ships' biofouling to minimize the transfer of invasive aquatic species'.
 - Rise of urgency and importance of development for risk assessment specified the '2011 guidelines for the control and management of ships' biofouling to minimize the transfer of invasive aquatic species' after notice of 'GloFouling Management Convention' from IMO in 2016.
 - The core of risk assessment specified in the '2011 ships' biofouling Guidelines' is mitigation of environmental pollution and transfer of alien species while in-water cleaning activities.

- In the near future, the Marine Environment Protection Committee of the IMO will discuss the risk assessment and recovery rate of wastes discharged during in-water cleaning activities.
- Systematization of on-site operation of in-water cleaning techniques to reduce environmental pollution and mitigate transfer of alien species caused by in-water cleaning activities specified in the '2011 ships' biofouling Guidelines'.
 - Enhanced requirements to systematization and use of integrated management process for in-water cleaning techniques which can be readily applicable to field operation in the marine environment.
 - Determination of application of in-water cleaning techniques based on biofouling record book, antifouling system and risk assessment of ships arrived in port.
- After notice before the work on 'GloFouling Management Convention', risk assessment to evaluate various in-water techniques can encourage future industrialization market and occupy the related market in preparation for paradigm change of allied industries.
 - Expectation of enlarged marketability of homemade devices through development of in-water techniques coping with the future regulation of ships' biofouling from IMO.
 - Establishment and operation of integrated port management process that reflects in-water cleaning techniques with environmentally friendly performance

III. Contents and Scopes of the Study

1. Research Period

January 1, 2017 – December 31, 2018

2. Contents and Scopes of the Study

- a. Development of analysis technique for active substances from antifouling system
 - (1) Establishment of analysis techniques and guidelines for active substances discharged from antifouling system
 - Selection of target active substances and establishment of mass library for LC/MS/MS analysis
 - Establishment of extraction, purification, and experimental conditions for the

- liquid chromatographic analysis
- Deriving standard methods and pilot guideline for the standardization of the analyses
 - Reviewing environmental standards and calculation of risk levels based on toxic database
- (2) Application of the analysis techniques to the wastes from haul-out or in-water cleaning activities
- Collection of wastes from the haul-out cleaning using high pressure water spray and understanding distribution characteristics of the active substances in the wastes
 - Simulation of in-water cleaning and characterization of active substance distributions in the wastes
 - Understanding the particle size distribution in the effluent from hull cleaning
- b. Simulated experiment, assessment and development of index for lab-scale effects on the wastes from ship's surface during in-water cleaning activities and active substances of antifouling systems
- (1) Assessment and development of index for lab-scale effects on the wastes from ship's surface during in-water cleaning activities
- (a) Evaluation of toxicity test for embryo development of flounder
- Characterization of developmental toxicity in embryonic flounder exposed to high-pressure cleaning effluent and methanol extract of R/V EARDO and ISABU
 - Investigation of molecular markers based on RNA-seq analysis
 - Identification of toxic pathway in embryonic flounder exposed to high-pressure cleaning effluent and methanol extract
- (b) Evaluation of toxicity test for mysids & amphipods
- Assessment of acute toxicity in amphipoda (*Monocorophium uenoi*), mysid (*Neomysis awatschensis*) exposed to high-pressure cleaning effluent and methanol extract of R/V EARDO
 - Assessment of acute toxicity in copepod (*Tigriopus japonicus*) and mysid (*Neomysis awatschensis*) exposed to high-pressure cleaning effluent and

methanol extract of R/V ISABU

- (c) Evaluation of toxicity test for fertilization of sea urchin
 - Toxic effects of the wastes from ship's surface during in-water cleaning activities were assessed by the fertilization rate of sea urchin embryos
- (d) Evaluation of toxicity test for zooplankton
 - Toxicity assessment for zooplankton using inorganic substances and organic fouling debris in the lab-scale experiment
- (2) Simulated experiment for ship's biofouling and lab-scale effects on the wastes from the simulated experiment
 - (a) Evaluation of toxicity test for embryo development of flounder
 - Evaluation of toxic effects in waste water from in-water cleaning simulation
 - (b) Evaluation of toxicity test for fertilization of sea urchin
 - Toxic effects of simulated experiment by-products were assessed by the fertilization rate of sea urchin embryos
 - (c) Evaluation of toxicity test for zooplankton
 - Toxicity assessment for zooplankton using AFS static panel
- (3) Assessment of active substances for principally used in domestic antifouling system
 - (a) Evaluation of toxicity test for embryo development of flounder
 - Assessment of developmental toxic effects from three booster biocide
 - Characterization of developmental toxicity in embryonic flounder exposed to five booster biocide
 - Investigation of molecular markers based on RNA-seq analysis
 - Identification of toxic pathway in embryonic flounder exposed to five booster biocide
 - (b) Evaluation of toxicity test for mysids & amphipods
 - Comparison of toxic parameters in amphipoda(*Monocorophium uenoii*) and mysids (*Neomysis awatschensis*) and their sensitivity based on toxicity Data base
 - (c) Evaluation of toxicity test for fertilization of sea urchin
 - Toxic effects of the AFS active substances were assessed by the fertilization rate of sea urchin embryos

- (d) Evaluation of toxicity test for zooplankton
 - Toxicity assessment for zooplankton using active substances that is mainly used in domestic antifouling system
- c. Identification and investigation of risk factors for biofouling debris from ship's surface during in-water cleaning activities
 - (1) Collection, identification and biological risk assessment of ship's biofouling
 - (a) Fouling of diatoms on the bottom of ship's surface
 - Identification of fouling diatom on the ship's surface
 - Establishment of substrate-specific fouling diatom on the ships surface
 - (b) Protozoa sampling and culture
 - Microfilm sampling from hull fouling and niche area of the research vessels of local classes (JANGMOK 1 and 2), coastal class (EARDO), ocean class (ONNURI) and global class (ISABU) and then culturing ciliate cells isolated from the microfilm samples.
 - Morphological and molecular analyses of the cultured ciliates.
 - (c) Fouling of macrozoobenthos on the bottom of ship's surface
 - Investigation of the distribution patterns and identification of fouling macrobenthos on five research vessels: R/V ONNURI and R/V ISABU (Ocean grade) which mainly conducts ocean survey, R/V EARDO (Coastal & Ocean grade) navigating coastal and offshore, R/V JANGMOK 2 (Coastal grade), which conducts coastal area of East Sea, R/V JANGMOK 1, which operates on the east/west/south coasts of Korea
 - Sampling of fouling species was at three hull areas with different depths of the upper, middle and flat bottoms, and niche areas with thrusters and propeller areas based on the waterline of the hull
 - (2) Identification of biological debris from simulated experiment
 - (a) Diatoms from simulated experiment
 - Identification of fouling diatom on the artificial plates
 - Establishment of viability test from micro-biological debris
 - (b) Weekly monitoring of protozoa
 - Tracking changes of the ciliate fauna on treatment and background plates

- Morphological and molecular analysis of the ciliates from the plates
- (c) Macrozoobenthos from simulated experiment
 - Analysis the fouling area of macrozoobenthos using biofouling index and the survival rate of derived macrobenthos from simulated experiment
 - Identification of attached macrobenthos and analysis recruitment rate of attachment type(background, treatment)
 - Analysis of survival rate of derived macrobenthos by sediment condition
- d. Selection of the key management factors and suggestion of framework for the in-water cleaning management
 - (1) Exploration of scenarios for in-water cleaning activities
 - Technology status in underwater hull cleaning to remove fouling organism
 - Review and limitation analysis of underwater hull cleaning to remove fouling organism by countries
 - (2) Derivation of key elements for the management level
 - Review of the in-water clearing scenarios by specific risk factors
 - Selection of key elements to reflect the management to acceptable levels of underwater hull cleaning
 - (3) Suggestion of risk assessment technique for the in-water cleaning management
 - In-water cleaning scenario and theoretical elements reflected by key factors
 - Sorting out of theoretical management framework reflected by risk assessment

IV. Results

- a. Development of analysis technique for active substances from antifouling system
 - (1) Establishment of analysis techniques and guidelines for active substances discharged from antifouling system

To establish analysis method for active substances discharged from antifouling systems, target analytes were first selected based on the international regulations, as well as international market share of antifouling paints. Copper pyrithione and zinc pyrithione were selected because they are most actively used in antifouling paints worldwide. Diuron, Irgarol, and DCOIT (Sea-Nine) were also included because they were highly used in the past and still persist in the environment. In addition, metallic

copper and zinc were included, which are one of the main ingredients in antifouling paint as active substances. Mass library of each biocides were obtained and Q1/Q3 ions were selected from the library for quantification of biocides using liquid chromatograph and mass spectrometer. The mass spectrometric conditions and liquid chromatographic separation were further optimized for more sensitive detection of the analytes. Based on the developed methods, a pilot guideline was prepared for the standardization of the analysis. It includes introduction, consideration for sampling, sampling and preservation methods, pre-treatment methods, QA/QC, and analytical methods in annex 1, 2, and 3.

(2) Application of the analysis techniques to the wastes from haul-out or in-water cleaning activities

Zinc pyrithione (172 - 260 ppb) and copper pyrithione (28.8 - 187 ppb) were detected in all wastewater collected during haul-out cleanings. Diuron was detected only in the wastewater from JANGMOK 2. Sea-Nine and Irgarol were not detected in all samples. The concentrations of zinc pyrithione and copper pyrithione were equivalent to the lethal concentrations for the 35 to 61% of the species reported in the ECOTOX database. Concentrations of copper and zinc in the wastewater from haul-out cleaning exceeded marine water quality standard and discharge criteria by 3,400 and 22 times, respectively. They were higher than the lethal concentrations for almost all species reported in the ECOTOX database. Iron (12-25%), zinc (16-21%), and copper (0.5-5%) were major components in the particle of the waste waters. Total suspended solid (TSS) in the wastewater was 1,570 mg/L, exceeding discharge criteria to 'clean' area and STP discharge criteria by 80 and 319 times, respectively. Particle size distribution in the wastewater and the relationship between particle size and cumulative particle weight was also obtained. Metal compositions in seaweeds collected from ship's hull were similar to that in the particles of wastewater, mostly consisting of zinc and copper. The concentrations in the seaweeds were up to 68 and 220 times higher than background concentrations of copper and zinc, respectively. In the paint chips and sediment collected at the shipyard, copper concentration was highest and followed by iron, zinc, and barium, which is unlike the composition in the wastewater or in seaweeds. Copper is the most frequently added component in

antifouling paint. TSS in seawater was 897 mg/L on average. After the release of the wastewater into adjacent seawater, the seawater TSS was increased by 10%. Copper, zinc, manganese, and barium, the major components in antifouling paints, were also higher in adjacent seawater. The concentrations were increased by about two times after cleaning activity, exceeding marine water quality standards by 39 and 9.4 times for copper and zinc, respectively. TSS in the wastewater from the in-water cleaning simulation exceeded discharge criteria to 'clean' area and STP discharge criteria by 55 and 218 times, respectively. Zinc (557 ppb), copper (359 ppb), and iron (103 ppb) were relatively higher in the wastewater from the plate covered with antifouling paint. The concentrations of copper and zinc exceeded the marine water quality standards by 120 and 17 times, respectively. Booster biocides were not detected in all wastewater from simulation plates. Copper (5,170 ppb) and zinc (1,070 ppb) were also relatively higher in the particles collected in the wastewater from the plate covered with antifouling paint. The removal of foulants is expected to increase the concentrations of dissolved active substances in seawater, as well as to continuously release active compounds into the water column as a large amount of particles move along the water circulation.

b. Simulated experiment, assessment and development of index for lab-scale effects on the wastes from ship's surface during in-water cleaning activities and active substances of antifouling systems

(1) Assessment and development of index for lab-scale effects on the wastes from ship's surface during in-water cleaning activities

(a) Evaluation of toxicity test for embryo development of flounder

Antifouling constituents enter the marine environment following the removal of spent residues during hull maintenance. Removal of antifouling paint by scraping, blasting or hosing usually takes place on the hard standings of marinas and harbours, and fine residues are readily transported into the marine environment where they become interspersed with sediments, creating 'hotspots' of contamination. Compared with leached biocides, those bound to particles of the paint matrix are considerably more persistent and are, therefore, likely to pose a longer-term threat to the local marine environment. The present study determined the developmental toxic effects of

the high-pressure cleaning effluent (R/V EARDO and ISABU) and methanol extract on the early developmental stages of flounder (*Paralichthys olivaceus*). At 48h after exposure, embryos were shown 100% of mortality in the exposure group of 100 dilution rate for high-pressure cleaning effluent (R/V EARDO) and methanol extract. Overall, two materials produced a largely overlapping suite of malformation defects, marked by the well-known effects including caudal fin fold defects, dorsal curvature, and pericardial edema. But, the embryonic flounder exposed to water jet effluent produced the higher malformation effects than those of methanol extract exposure group. We used high-throughput sequencing (RNA-seq) to characterize the developmental toxic effects from oil exposure. In gene ontology analysis, genes associated with cell morphogenesis, regulation of signal transduction, and sacomere significantly changed (cutoff $P < 0.01$) in embryonic flounder exposed to high-pressure cleaning effluent (R/V EARDO). Genes associated immune system, reproduction and development significantly changed in embryonic flounder exposed to high-pressure cleaning effluent (R/V ISABU) (cutoff $P < 0.01$).

(b) Evaluation of toxicity test for mysids & amphipods

Since antifouling is effected by the slow, controlled leaching of biocides from the painted surface, elevated environmental concentrations of these chemicals are most significant in semi-enclosed marine systems, such as harbours, marinas and estuaries, where the transport, berthing or docking of vessels is important. In most cases, previous risk assessment of these biocides has been inadequate so that their possible effects on aquatic ecosystems is a matter of great concern. The first-year study was determined the acute toxic effects of high-pressure cleaning effluent (R/V EARDO) and methanol extract on mysids and amphipod. The value of LC_{50} for amphipod exposed to high-pressure cleaning effluent and methanol extract were 0.642% and 2.798%, respectively. The value of LC_{50} were 0.412% and 2.680% in mysids exposed to water jet effluent and methanol extract. Regarding the toxic effects, the high-pressure cleaning effluent was more toxic than methanol extract in mysids and amphipod. The second-year of study was determined the acute toxic effects of high-pressure cleaning effluent and methanol extract from R/V ISABU on mysids and copepod. The value of LC_{50} for copepod exposed to high-pressure cleaning effluent and methanol extract were 0.006% and 0.056%, respectively. The value of

LC₅₀ were 0.232% and 0.084% in mysids exposed to high-pressure cleaning effluent and methanol extract from R/V ISABU.

(c) Evaluation of toxicity test for fertilization of sea urchin

To assess the adverse effects of the wastes on marine biota from ship's surface during in-water cleaning activities, we conducted the toxicity test for by-products using sea urchin embryos. The fertilization rate of sea urchin embryos exposed on the water samples from the water jet operation on the R/V EARDO was 79±5.8% at 1,000-fold diluted solution, and the fertilization rates exposed in 10-fold and 100-fold diluted solutions were 0.2±0.5% and 2.3±1.4%, respectively. The fertilization rate in the water jet samples from the R/V ISABU was 0.2% in 10-fold diluted solutions, but normal fertilization was found (>90%) in 100-fold diluted solution. The fertilization rate on the MeOH extracted solution of wastes from the R/V EARDO was 0% in both 30 and 300-fold diluted solutions. The fertilization rate was more than 90% in 3,000-fold diluted solutions. The fertilization rate on the MeOH extracted solution from the R/V ISABU was 0% in both 2.5 and 250-fold diluted solutions. The normal fertilization was found (>90%) in 2,500-fold diluted solutions. The highest toxicity on sea urchin embryos was found in the wastes from the water jet operation on the R/V EARDO, and the toxicity of MeOH extract was higher than wastes from the R/V ISABU.

(d) Evaluation of toxicity test for zooplankton

Effluents from ship bottom washing using a high pressure washer were used to determine the toxic effects of ships' biofouling during the ship repair in the R/V EARDO of Korea Institute of Ocean Science and Technology Research. Experiments on ships' biofouling have confirmed egg hatching rates and larval mortality rates of *Acartia omorii* and *Paracalanus parvus* s.l. for water-jet effluents and water-jet methanol extracts. In experiment section for each concentration, the pH was 8.04±0.03 and the saturation of dissolved oxygen(DO) was 98.38±0.37 which was almost saturated. The egg hatching rate of *P. parvus* s.l. in a water-jet methanol extract was slightly higher than that in a water-jet effluent, but it was difficult to compare clearly in the case of *A. omorii*. The larval mortality was higher a water-jet effluent than a water-jet methanol extract in both of the copepods, indicating that the toxicity of a water-jet effluent was stronger. Overall, *P. parvus* s.l. was more sensitive to

toxicity than *A. omorii*. The LC_{50} of *P. parvus* s.l. in 24h-toxicity test showed that the water-jet effluent (about 9,000 times dilution) was about 15 times higher than the water-jet methanol extract (about 650 times dilution).

(2) Simulated experiment for ship's biofouling and lab-scale effects on the wastes from the simulated experiment

(a) Evaluation of toxicity test for embryo development of flounder

In the second-year of study, we evaluated the toxic effects on embryonic flounder exposed to waste water from in-water cleaning simulation. Four experimental groups were divided including the Biocide, No-Biocide, Silicone and background (control) groups. After 70 days, they were washed by sterilized-filtered sea water and diluted to 1,000, 10,000, 100,000 times using sterilized-filtered sea water. Frequency percentage of tail-fin defects and spinal curvature increased in embryonic flounder exposed to cleaning water from silicone and background groups (dilution of 10,000 times group). Frequency percentage of pericardial edema increased in embryos exposed to cleaning water from Biocide, silicone and background groups (dilution of 10,000 times group).

(b) Evaluation of toxicity test for fertilization of sea urchin

The stock solution for the sea urchin embryo test was obtained by submerging four different kinds of simulated plates treated with different biocide in sea water for two months and wastes from the water jet operation and their MeOH extracted solution. As a result of fertilization rate for water jet samples, 'Biocide' treated plates showed more than 90% fertilization rate from 100-fold diluted solution. In the 'No-Biocide' and 'Background' treated plates, the fertilization rate was different from control in only undiluted solution, and 'Silicone' treated plates showed no difference from the control in the undiluted solution. In the 'No-Biocide' treatment, the fertilization rate after filtration was higher than 90%, and it is considered to be the effect of the particulate matter rather than the toxicity in the water jet. As a result of fertilization rate on MeOH extracts of each treatment and the 'Biocide' treatment showed more than 80% fertilization rate from 10-fold dilutions. 'No-Biocide' treatment showed more than 90% fertilization rate from 100-fold dilution. 'Silicone' treatment was $96.3 \pm 2.1\%$ in 10-fold dilution. In the 'Background' treatment, the fertilization rate

was 0% in both 10- and 100-fold diluted solutions.

(c) Evaluation of toxicity test for zooplankton

A static panel test was conducted to evaluate the toxic effects of zooplankton on AFS effluents. (EXP. 1: Background + Tie coat, EXP. 2: Background + Tie coat + Pain, EXP. 3: Background + Tie coat + Biocide, EXP. 4: Background + Tie coat + silicone). The three hatching rates for effluent dilution concentration were from 50% to 97% in the three test groups (EXP. 1, EXP. 2, EXP. 3) that were predicted to have a toxic gradient in the hatching rate test for AFS effluent. There was no statistically significant difference. These results imply that there is a need to verify the concentration of the antifouling paint active material and further experiments. These results should be verified through an analysis of the active substance concentration of the eluted simulated antifouling paints in the test water and additional toxicity tests. The test group of EXP. 4 shows a hatching rate of over 90% at all concentrations, indicating that there is no toxic effect in the effluent of a static panel test.

(3) Assessment of active substances for principally used in domestic antifouling system

(a) Evaluation of toxicity test for embryo development of flounder

The use of alternative biocides for antifouling application has increased since the restriction on the use of organotin compounds. However, there is the limited information of those biocides on the developmental toxicity to non-target marine organism. Assessment of the toxic effects associated with alternative biocides is also needed on resident species. The present study determined the developmental toxic effects of the alternative antifouling compounds including Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211, CuPT, ZnPT on the early developmental stages of flounder (*Paralichthys olivaceus*). At 48h after exposure, frequency percentage of mortality was <10% in all the exposure group of Irgarol 1051 and Diuron. But embryos were shown 100% of mortality in the exposure group of 100 $\mu\text{g/L}$ for Sea-Nine 211 and 1,000 $\mu\text{g/L}$ for CuPT. Overall, five biocides produced a largely overlapping suite of defects, marked by the well-known effects including caudal fin fold defects, dorsal curvature, and pericardial edema. Those biocides may be ranked in the following order from

highest malformation and mortality; Sea-Nine 211>Irgarol 1051> Diuron. Embryos exposed to CuPT were shown the higher frequency percentage of malformation than those of ZnPT. We used high-throughput sequencing (RNA-seq) to characterize the developmental toxicity of the five biocides. Embryos exposed to Diuron showed changes related to cellular protein localization, whereas genes associated with immune system processes were up-regulated significantly in embryos exposed to Irgarol 1051. Genes related to actin filament organization and embryonic morphogenesis were up-regulated in embryos exposed to Sea-Nine 211. The genes related to metabolism, immune, development were varied significantly. The genes associated with cancer immune, development were changed in embryos exposed to ZnPT, significantly.

(b) Evaluation of toxicity test for mysids & amphipods

After the definitive ban on tin-based antifouling substances, new organic compounds have recently been introduced in antifouling paint formulations, as either principal or booster biocides. In most cases, previous risk assessment of these biocides has been inadequate so that their possible effects on aquatic ecosystems is a matter of great concern. We studied the acute toxic effects of new organic biocides often associated in paint formulations, Sea-Nine 211 on mysids and amphipod. In the study, The LC_{50} for amphipod and mysids exposed to Sea-Nine 211 were $18.3 \mu\text{g/L}$ and $6.09 \mu\text{g/L}$. Reports regarding the toxic sensitivity from Sea-Nine 211 exposure, the mysid was more sensitivity than those of amphipod.

In second-year study, we calculated the HC_5 value (Hazardous concentration 5% based on SSD graph (Species Sensitivity Distribution graph) using the toxic data base. In results, fish tend to be more sensitive than crustaceans. The value of LC_{50} were $69.56 \mu\text{g/L}$ and $302.69 \mu\text{g/L}$ in biota exposed to CuPT and ZnPT and the value of HC_5 were $0.125 \mu\text{g/L}$ and $0.52 \mu\text{g/L}$, respectively.

(c) Evaluation of toxicity test for fertilization of sea urchin

As a result of the fertilization rate of sea urchin for 5 kinds of biocide, the value of EC_{50} of Sea-nine was $8.134 \mu\text{g/L}$, but those of Diuron and Irgarol were $10,777 \mu\text{g/L}$ and $4,476 \mu\text{g/L}$, respectively. The value of EC_{50} of CuPT and ZnPT were $3.423 \mu\text{g/L}$ and $6.488 \mu\text{g/L}$, respectively. Among 5 AFS active substances, the highest toxicity was found in CuPT.

(d) Evaluation of toxicity test for zooplankton

Experiments on ship's biofouling have confirmed egg hatching rates and larval mortality rates of *Acartia omorii* and *Paracalanus parvus* s.l. for active substances from antifouling system, such as Diuron, Irgarol 1501, Sea-Nine 211, CuPT, and ZnPT. Test organisms, which is commonly dominant in the coastal area, were directly collected in the situ. In experiment section for each concentration, the pH was 8.07 ± 0.02 and the saturation of dissolved oxygen(DO) was 98.30 ± 0.26 that was almost saturated. The eggs hatching rates of the two species of copepod were higher in order of Irgarol 1051, Diuron and Sea-Nine 211, respectively. The high mortality rate was Sea-Nine 211, Diuron and Irgarol 1051, respectively. *A. omorii* has a higher hatching rate and lower mortality rate than *P. parvus* s.l., indicating that *A. omorii* has a higher tolerance for the toxicity of biofouling debris from ships' surface. The LC_{50} of *P. parvus* s.l. in 24h-toxicity test was 2.17 ppm for Diuron, 1.24 ppm for Irgarol 1051, and 0.007 ppm for Sea-Nine 211, indicating that Sea-Nine 211 has considerably higher toxicity than other active substances. The LC_{50} values of *P. parvus* s.l. for CuPT and ZnPT are 6.16 ppb and 1.19 ppb, respectively, which is lower than the LC_{50} of CuPT and ZnPT. It means that CuPT and ZnPT is more toxic than CuPT and ZnPT.

c. Identification and investigation of risk factors for biofouling debris from ship's surface during in-water cleaning activities

(1) Collection, identification and biological risk assessment of ship's biofouling

(a) Fouling of diatoms on the bottom of ship's surface

Abundances of fouling diatoms on the ships' surfaces: Local(R/V JANGMOK 1 and 2) > Coastal(R/V EARDO) > Ocean(R/V ONNURI). Pre-dominant diatom was *Navicula muscatinei*.

(b) Occurrence of protozoa

A total of six ciliate species was detected from the four vessels; one species from JANGMOK 1 (*Loxophyllum rostratum*), two species from JANGMOK 2 (*Euplotes parkei*, *E. plicatum*), one species from EARDO (*Amphisiella annulata*), and two species from ONNURI (*Uronychia binucleata*, *Arcuseries petzi*). There was no ciliate occurrence from ISABU surface. *Euplotes parkei* and *E. plicatum* isolated from

JANGMOK 2 are unknown species in Korea. This result means that these species may be invasive ciliates originated from ship transportation. Further analyses should be added to confirm the invasive reality.

(c) Fouling of macrozoobenthos on the bottom of ship's surface

A total of 47 species was collected with a mean density of 10,297 indi./m² and a mean biomass of 2,381 gWWt/m², respectively. Crustaceans were the dominant taxon in terms of species richness (24 species, 51.1%), and followed by polychaetes (9 species, 19.1%) and molluscs (6 species, 13.2%). The mean density were highest in the crustaceans in which the *Balanus* species appeared in the most abundant species, but the highest in biomass in the molluscs. The number of species of macrobenthos on R/V EARDO was highest in 25 species, and 18 species and 19 species were found in R/V JANGMOK 2 and R/V JANGMOK 1, respectively. However, the number of species at R/V ONNURI and R/V ISABU decreased to 9 species and 8 species, respectively. Fouling of macrozoobenthos at R/V JANGMOK 1 and R/V EARDO appeared in higher density and biomass. Macrozoobenthos at R/V ONNURI showed the highest density and biomass in the flat bottom of the hull, which *Balanus improvisus* and *B. amphitrite* were the dominant species. Macrozoobenthos at R/V EARDO found in the most abundant species (17 species) on propeller shafts of niche areas and showed high biomass. The density at R/V EARDO was higher in the stern thruster. The dominant species were *B. amphitrite*, dominant on the hull side and bottom, and *B. trigonus*, dominant on the left thruster of the athlete of R/V EARDO. In R/V JANGMOK 2, 14 species were found in the upper part of the left side, and the high density was on the bottom area. Biomass was higher in the upper side of the ship and in the left propeller shaft. The dominant species were *B. trigonus* and *H. ezoensis*. In case of R/V JANGMOK 1, 9-12 species appeared on the side and bottom of the hull, showing high density. Biomass was higher in the propeller shaft. *B. amphitrite* showed dominant dominance and relatively high density distribution in the middle area of the side. R/V ISABU was found to have 2-4 species on the side and bottom of the hull, showing low density. Density and biomass was higher at the propeller shaft. The dominant species were *B. amphitrite* and *B. trigonus*.

(2) Identification of biological debris from simulated experiment

(a) Diatoms from simulated experiment

Abundances of attached fouling diatoms: control plate (Max. 283,533 cells cm⁻²) > treatment plate (Max. 45,130 cells cm⁻²). Fouling diatoms from simulated experiment (viability test): continuous increase in cell density of fouling diatoms (biological debris) in control and treatment groups.

(b) Species change of protozoa

Four ciliate species (*Aspidisca leptaspis*, *Diophrys appendiculata*, *Euplotes parkei*, and *Protogastrostyla pulchra*) were observed on the simulated plates. Species composition of ciliate fauna showed different patterns until 4 weeks between treatments and background plates. After 5 weeks, the fauna changed gradually to similar composition on both simulated plates. *D. appendiculata* and *E. parkei* appeared dominantly in the simulated plate respectively. These two species is sustained in culture strains.

(c) Macrozoobenthos from simulated experiment

Dominant macrozoobenthos on the background plate of simulated experiment were mainly *Ciona intestinalis*, *Ascidiella aspersa*, *Bugula neritina* and *Balanus trigonus*, which were mainly attached to the treatment plate. analyzing of biofouling index of attached macrobenthos, we found that stage III appeared in the background plate and stage I in the treatment plate after 1 month. After two months, stage V was in the background simulator and stage I in the treatment plate. After 3 months, stage V was showed in the background plate and 5 stage in the treatment plate. After 4 months, the background plate had 4 stage and the treatment plate had stage IV. In Secondary biofilm-1 experiments, many species, *Ciona intestinalis*, *Bugula neritina*, Sponges, attracted on two background plates (B1 and B2), but only the biofilm found on the two treatment plates (T1 and T2). Ascidiacea of B1 and B2 died more than 90% on the 2nd day after the experiment and survived until the 5th day. Sponges and Bryozoa died 100% on the 2nd and 3rd day, respectively. In case of Secondary biofilm-2 experiments, macrozoobenthos on two backbround plates (B1 and B2) appeared not only biofouling species such as *Ciona intestinalis*, *Ascidiella aspersa*, *Bugula neritina*, sponges but also mobile species such as amphipods, isopods, polychaetes. Only the biofilm was attached at the treatment plates (T1 and T2). All of mobile species died on the second day after the experiment, but Ascidiacea

survived until the 5th day after the experiment. All sponges died on the 2nd day and Bryozoa survived 50% until the 41st day of the experiment. In secondary biofilm-3 experiments, the background plates (B1 and B2) were attached not only biofouling species, *Ciona intestinalis*, *Asciidiella aspersa*, sponges, Actiniaria, and Bryozoa but also mobile species, amphipods, Isopods, and polychaetes. However, the 75% of density of barnacles appeared at the treatment plates (T1 and T2). All mobile species died on the 4th day after the experiment, but 30% of attached Ascidiacea continued to survive until 30 days. All sponges and Bryozoa died on the 4th day and the 9th day after the experiment, respectively. In treatment plates (T1 and T2), 50% of the damaged barnacles died on the first day, but small amount of species (2.5%) survived until the end of the experiment. In secondary biofilm-4 experiments, the background plates (B1 and B2) were attached not only biofouling species, *Ciona intestinalis*, *Asciidiella aspersa*, sponges, Actiniaria, Bryozoa, but also mobile species, amphipods, isopods and polychaetes. Actiniaria and barnacles appeared to more than 65% of total density on the treatment plates (T1 and T2). In this experiment, we added the washed sand into the two experiment baths (T1, B1) and sterilized mud into the other baths (B2 and T2). All the mobile species of B1 and B2 died on the 5th day of the experiment, but Ascidiacea survived until the 33rd day. There was no significant difference in the survival rate between two sediment conditions. The barnacles on the treatment plates (T1 and T2) died on the 34th day after the experiment, and the individuals buried in the sediments died within a short time after beginning the experiment. However, in all water tanks, breeding of Actiniaria showed active movement and survived until the end of the experiment.

d. Selection of the key management factors and suggestion of framework for the in-water cleaning management

(1) Exploration of scenarios for in-water cleaning activities

Australia and New Zealand carry out the most systematically and strictly performing the management of underwater hull cleaning. They enacted the Craft Risk Management Standard (CRMS) in 2014, and is being piloted for four years. It will be enforced in May 2018. Most other European countries did not have no specific regulation of the management of underwater hull cleaning. Some European countries

carry out underwater hull cleaning using a dry-dock in accordance with IMO's regulation for removing fouling organism. Removal techniques of biofouling organism are classified into manual removal, mechanical removal, surface treatment, and shrouding technique. In case of large commercial vessels moving between countries, mechanical removal and surface treatment methods are mainly used to remove biofouling organism. However, the majority of mechanical removal method, including electric brushes, can be to affect the marine environment by fragments or leached active substances of AFS, and furthermore there is no collection device for removing AFS derivatives.

(2) Derivation of key elements for the management level

The most important factors are systematically manage to the underwater hull cleaning and the present condition of arrival and departure in domestic port together in the comprehensive review of the documents reported by Australia and New Zealand related to remove biofouling organism. The selected main keys determining the management of underwater hull cleaning are biofouling origin, anti-fouling coating(AFC) type, biofouling type, cleaning method, and debris capture. We have created 40 scenarios to remove biofouling organism based on selected risk assessment/management key factors. Based on the prepared scenarios to remove biofouling organism, we plan to carry out biological and chemical risk assessment using assessment indicators.

(3) Suggestion of risk assessment technique for the in-water cleaning management

The International Maritime Organization (IMO) has recognized the risk of hull fouling and announced '2011 Guidelines for the control and management of ship's biofouling to minimize the transfer of invasive aquatic species' and is planning international regulations to enforce them in the future. In this study, to effectively respond to future international regulation, we introduce the case of leading countries related to management of hull fouling and also investigate environmental risk assessment techniques for in-water cleaning. Australia and New Zealand, the leading countries in hull fouling management, have established hull fouling regulations through biological and chemical risk assessment based on in-water cleaning scenarios. Most European countries without their government regulation have been found to perform in-water cleaning in accordance with the IMO's hull fouling regulations. In

the Republic of Korea, there is no domestic law for hull fouling organisms, and only approximately 17 species of marine ecological disturbance organisms, are designated and managed under the Marine Ecosystem Law. Since in-water cleaning is accompanied by diffusion of alien species and release of chemical substances into aquatic environments, results from biological as well as chemical risk assessment are performed separately, and then evaluation of in-water cleaning permission is judged by combining these two results. Biological risk assessment created 40 codes of in-water cleaning scenarios, and calculated Risk Priority Number (RPN) scores based on key factors that affect intrusion of alien species during in-water cleaning. Chemical risk assessment was performed using the MAMPEC (Marine Antifoulant Model to Predict Environmental Concentrations), to determine PEC and PNEC values based on copper concentration released during in-water cleaning. Finally, if the PEC/PNEC ratio is >1 , it means that chemical risk is high. Based on the assumption that the R/V EARDO ship performs in-water cleaning at Busan's Gamcheon Port, biological risk was estimated to be low due to the RPN value was $<10,000$, but the PEC/PNEC ratio was higher than 1, it was evaluated as impossible for in-water cleaning. Therefore, it will be necessary for the Republic of Korea to develop the in-water cleaning technology by referring to the case of leading countries and to establish suitable domestic law of ship's hull fouling management in domestic harbors.

V. Suggestions for application

- a. Development of analysis technique for active substances from antifouling system
 - (1) Establishment of analysis techniques and guidelines for active substances discharged from antifouling system
 - The analysis technique established in the study will be used to characterize the distribution of active substances and particles in the wastes released during various hull cleaning activities. It will be further used for the fate and release analysis of the substances for the risk assessment of hull cleaning techniques including haul-out or in-water cleanings.
 - Through standardization and dissemination of the technique, analytical ability of related organizations in the country will grow and thus international recognition on nation's analytical capability will also be improved.

(2) Application of the analysis techniques to the wastes from haul-out or in-water cleaning activities

- Based on the results on release characteristics and risk assessment of in-water cleaning, we can adequately correspond to the possible future international regulations by IMO on the application of in-water cleaning technique in the marine environment.
- The result may promote the in-water cleaning device industries by providing essential information needed to develop waste treatment techniques, such as physical and chemical characteristics of the waste from ship cleaning activities.

b. Simulated experiment, assessment and development of index for lab-scale effects on the wastes from ship's surface during in-water cleaning activities and active substances of antifouling systems

(1) Assessment and development of index for lab-scale effects on the wastes from ship's surface during in-water cleaning activities

(a) Evaluation of toxicity test for embryo development of flounder

- To apply as a toxicological data of antifouling system for costal management
- To provide a scientific results for preparation of international regulation

(b) Evaluation of toxicity test for mysids & amphipods

- To apply as a toxic parameter data of antifouling system for costal area management
- To provide a background information for preparation of international regulation

(c) Evaluation of toxicity test for fertilization of sea urchin

- A bioassay method using sea urchin embryos can be used, and sea urchins could be registered as one of an international standard test organisms for the wastes from ship's surface during in-water cleaning activities

(d) Evaluation of toxicity test for zooplankton

- Provide scientific evidence for biological risk assessment in biofouling organism

(2) Simulated experiment for ship's biofouling and lab-scale effects on the wastes from the simulated experiment

- (a) Evaluation of toxicity test for embryo development of flounder
 - To apply as a toxicological data of in-water cleaning effluent for costal management
 - To provide a scientific results for preparation of international regulation and costal management
- (b) Evaluation of toxicity test for fertilization of sea urchin
 - Provide a scientific basis for evaluating the toxicity of the simulated experiment for ship's biofouling
- (c) Evaluation of toxicity test for zooplankton
 - To apply as a toxicological data of coastal species for AFS active substances
- (3) Assessment of active substances for principally used in domestic antifouling system
 - (a) Evaluation of toxicity test for embryo development of flounder
 - Assessment of toxic effects of commercial booster antifouling system on costal habitant
 - (b) Evaluation of toxicity test for mysids & amphipods
 - Provide the toxic data base of alternative commercial booster biocide using test species
 - (c) Evaluation of toxicity test for fertilization of sea urchin
 - Development of an useful index for the impact assessment for AFS-treated active substances
 - (d) Evaluation of toxicity test for zooplankton
 - Support for biological risk assessment technology in response to IMO's future environmental regulations
- c. Identification and investigation of risk factors for biofouling debris from ship's surface during in-water cleaning activities
 - (1) Collection, identification and biological risk assessment of ship's biofouling
 - (a) Fouling of diatoms on the bottom of ship's surface
 - Development of bio-indicator against antifouling paints: Substrate-specific attached diatom, *Navicula muscatinei*
 - (b) Specimen contribution of protozoa

- For updating ciliate fauna data in Korea Marine Biodiversity Information System (KoMBIS), the taxonomical information of two unknown species found firstly via this study will provide.
- Specimen of two unknown ciliate cells in Korea and genetic information will be donated to Marine Biodiversity Institute of Korea.
- (c) Fouling of macrozoobenthos on the bottom of ship's surface
 - We analyzed quantitatively the abundance of fouling macrozoobenthos on the bottom of ship's surface, which will be given a valuable information to researcher and politician, and it is thought that it will be very useful data because of the limited information on vessels navigating various regions.
 - In the future, we will be able to present the criterion for the identification of the risk of fouling organisms through the risk assessment of fouling organisms.
- (2) Identification of biological debris from simulated experiment
 - (a) Diatoms from simulated experiment
 - Development of a viability test using attached fouling diatoms.
 - (b) Protozoans from simulated experiment
 - The cultured strains of two ciliate species (*Diophrys appendiculata* and *Euplotes parkei*) isolated from the simulated plates will be applied as experiment organisms for toxicity test.
 - (c) Macrozoobenthos from simulated experiment
 - In the future, it will be able to apply the factor of scenarios for in-water cleaning technique of domestic ship using the result of analysis of the adherent organisms risk and survival rate of derived organisms through the experiment of this study.
- d. Selection of the key management factors and suggestion of framework for the in-water cleaning management
 - (1) Exploration of scenarios for in-water cleaning activities
 - Establishment of management system for the biological risk assessment due to removal of biofouling organism.
 - (2) Derivation of key elements for the management level

- Protection of national biological resources through systemic management of biofouling organism.
- (3) Suggestion of risk assessment technique for the in-water cleaning management
 - Securing management technology to prepare for future IMO international convention related to remove biofouling organism.

Keywords : Active substances, Attached macrobenthos, Attached marine ciliates, Attached microalgae, Biocides, Biofouling, Developmental toxicity, Embryo bioassay, In-water cleaning, Metals, Risk assessment, Sea urchin

C O N T E N T S

Summary	i
Contents	xlii
List of Figures	xliii
List of Tables	liii
Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. Current State of Science and Technology in Korea and Foreign Countries	9
Section 1. Current State of Science and Technology in Korea	9
Section 2. Current State of Science and Technology in Foreign Countries	10
Chapter 3. Results of the Study	12
Section 1. Development of analysis technique for active substances from antifouling system ..	12
Section 2. Simulated experiment, assessment and development of index for lab-scale effects on the wastes from ship's surface during in-water cleaning activities and active substances of antifouling systems	46
Section 3. Identification and investigation of risk factors for biofouling debris from ship's surface and simulated experiment	129
Section 4. Selection of the key management factors for the in-water cleaning activities ...	215
Chapter 4. Achievement and Contribution of the Study	237
Section 1. Achievement of the Study	237
Section 2. Contribution of the Study	241
Chapter 5. Applications of the Results	243
Chapter 6. References	246

목 차

요약문	i
목차	xlii
그림목차	xliii
표 목차	liii
제 1 장 서론	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	9
제 1절 국내연구동향	9
제 2절 국외연구동향	10
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	12
제1절 AFS 처리활성물질 분석기술 개발	12
제2절 선박부착 파생물의 LAB-SCALE 영향평가, 지표 발굴, 모사실험 및 주상용 활성물질 평가	46
제3절 선박부착생물 및 모사실험 기인 생물 및 위해성 요인 탐색 및 판별시도	129
제4절 수중제거 핵심 관리요소 선정 및 수중제거관리 framework 제시	215
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	237
제1절 연구개발목표 달성도	237
제2절 대외기여도	241
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	243
제 6 장 참고문헌	246

Figure List

Fig. 3.1.1.1. Publication trends on (a) antifouling, (b) organotin compounds, and (c) alternative biocides.	15
Fig. 3.1.1.2. Trend of active substances being used in antifouling paints.	16
Fig. 3.1.1.3. Q1 and Q3 mass spectrum of Diuron, Irgarol, and Sea-Nine.	17
Fig. 3.1.1.4. Q1 and Q3 mass spectrum of ZnPT, CuPT, and tralopyril.	17
Fig. 3.1.1.5. Highly turbid hull cleaning wastewater (left) and schematic diagram for the establishment of pre-treatment and extraction method for the analysis of active substances (right).	20
Fig. 3.1.1.6. Q1/Q3 ion chromatogram of the target analytes.	22
Fig. 3.1.1.7. Cover and content pages of the guideline for the analysis of active substances in the wastes from hull cleaning.	23
Fig. 3.1.1.8. Species sensitivity distribution (SSD) to calculate 5% hazardous concentration (HC_5) and predicted no effect concentration (PNEC) calculated from the HC_5	25
Fig. 3.1.2.1. Hull cleaning with jet water spraying (left) and by scrapping (right).	29
Fig. 3.1.2.2. Schematic diagram for sampling and analysis of waste from ship's hull cleaning. ..	30
Fig. 3.1.2.3. Distribution of biocides in the wastewater from hull cleaning with high pressure water spray (top) and toxicity levels of zinc pyrithione and copper pyrithione in the wastewater compared with species sensitivity distribution constructed using the ECOTOX database (bottom).	31
Fig. 3.1.2.4. Concentrations of dissolved metals in the wastewater and comparisons with legal criteria.	32
Fig. 3.1.2.5. Toxic levels of copper (left) and zinc (right) in the wastewater compared with species sensitivity distribution from the ECOTOX database.	33
Fig. 3.1.2.6. Metal concentrations in the particle of the wastewater.	34
Fig. 3.1.2.7. Total suspended solid content in the wastewater and in the supernatant after centrifugation.	34
Fig. 3.1.2.8. Particle size distribution in the wastewater.	35
Fig. 3.1.2.9. Relationship between the particle size and cumulative distribution of particle in the wastewater.	36

Fig. 3.1.2.10. Metal concentrations in seaweeds collected from the ship's hull.	37
Fig. 3.1.2.11. Metal concentrations in the paint chips collected at the shipyard.	38
Fig. 3.1.2.12. Various paint chips collected at the shipyard and their EDS analysis results.	38
Fig. 3.1.2.13. Metal concentrations in sediment collected at the shipyard.	39
Fig. 3.1.2.14. Change of the total suspended solid concentrations in seawater after the jet-water cleaning to remove foulant on the ships' hull. Red line indicates the marine water quality standard which had been used until 2001.	40
Fig. 3.1.2.15. Seawater metal distributions near shipyards for hull cleaning (upper). Change of the metal concentrations in seawater before and after the hull cleaning using high pressure water spray (bottom).	41
Fig. 3.1.2.16. Retrieving plates placed for 2 months in the seawater (left) and simulating in-water cleaning using brush to remove biofouling on the plates (right).	43
Fig. 3.1.2.17. Biofouling biomass on each test plate for in-water cleaning simulation.	43
Fig. 3.1.2.18. Total suspended solid concentrations in the wastewater from the in-water cleaning simulation.	44
Fig. 3.1.2.19. Dissolved metal concentrations in the wastewater from the in-water cleaning simulation.	44
Fig. 3.1.2.20. Particulate metal concentrations in the wastewater from the in-water cleaning simulation.	45
Fig. 3.2.1.1. High-pressure cleaning waste water and MeOH extract.	47
Fig. 3.2.1.2. Frequency percentage of mortality and malformation in embryonic flounder exposed to HCW and MEW from RV/EARDO.	52
Fig. 3.2.1.3. Frequency percentage of mortality in embryonic flounder exposed to HCW and MEW from RV/ISABU.	53
Fig. 3.2.1.4. Frequency percentage of malformation in embryonic flounder exposed to HCW and MEW from RV/ISABU.	54
Fig. 3.2.1.5. qPCR results in embryonic flounder exposed to high-pressure cleaning waste water effluent and MeOH extract from RV/EARDO. (a). The heat map of gene expression variation in the embryonic flounder exposed to high-pressure cleaning waste water effluent (b). Genes related to heart formation, nkx2.5, NK2 transcription factor related 5; SOX6, SRY-box containing gene 6; robo1,	

Roundabout guidance receptor 1; bmp4, Bone morphogenetic protein 4, related to bone morphogenesis; Genes related to fin malformation; acvr1, Activin A receptor type 1; fgf13 Fibroblast growth factor 13; furin, furin; lef1, Lymphoid enhancer binding factor 1; pi4ka, Phosphatidylinositol 4-kinase alpha; plod2, Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2; sall2, Spalt like transcription factor 2; shha, Sonic hedgehog protein A precursor; sp8b, Sp8 transcription factor; wnt3a, Wnt family member 3a. 57

Fig. 3.2.1.6. qPCR results in embryonic flounder exposed to high-pressure cleaning waste water effluent and MeOH extract from RV/ISABU. (a) The heat map of gene expression variation in the embryonic flounder exposed to two biocide (b). Genes related to heart formation, nkx2.5, NK2 transcription factor related 5; SOX6, SRY-box containing gene 6; robo1, Roundabout guidance receptor 1; bmp4, Bone morphogenetic protein 4, related to bone morphogenesis; Genes related to fin malformation; furin, furin; plod2, Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2; wnt3a, Wnt family member 3a; TP73, Tumor protein73 related to immune system. 58

Fig. 3.2.1.7. Identification of differential expressed genes (DEGs) between embryos of embryonic flounder exposed to exposed to high-pressure cleaning waste water effluent and MeOH extract from RV/EARDO. 60

Fig. 3.2.1.8. Gene regulatory networks for DEGs associated with exposure to high-pressure cleaning waste water effluent and MeOH extract from RV/EARDO. 61

Fig. 3.2.1.9. up- and down-regulated DEG in flounder embryos exposed to HCW and MEW from RV/ISABU (a). Venn diagram of DEG (b). 62

Fig. 3.2.1.10. Acute toxicity test in amphipoda (*Monocorophium uenoi*) and Mysid (*Neomysis awatschensis*). 65

Fig. 3.2.1.11. Percentage of mortality in amphipoda (*Monocorophium uenoi*)(a and b) and mysid (*Neomysis awatschensis*) exposed to to WJE and WJME from RV/EARDO (c and d). 68

Fig. 3.2.1.12. Percentage of mortality in amphipoda (*Monocorophium uenoi*) and mysids (*Neomysis awatschensis*) exposed to WJE and WJME from RV/ISABU. 69

Fig. 3.2.1.13. The appearance of spawning male and female (left) and endpoint of fertilization test

(fertilized and non-fertilized egg) (right) of sea urchin, <i>Mesocentrotus nudus</i>	72
Fig. 3.2.1.14. A schematic diagram for the fertilization tests of sea urchin.	73
Fig. 3.2.1.15. The effects of sea urchin fertilization rate on the water jet and MeOH extraction of R/V EARDO.	74
Fig. 3.2.1.16. The effects of sea urchin fertilization rate on the water jet and MeOH extraction of R/V ISABU.	75
Fig. 3.2.1.17. Eggs hatching success rate and nauplii mortality for water-jet effluents and water-jet MeOH extract of <i>A. omorii</i> and <i>P. parvus</i> s.l.	79
Fig. 3.2.2.1. Simulation experiment of the in-water cleaning effluent.	81
Fig. 3.2.2.2. Malformation of embryonic flounder exposed to waste water from in-water cleaning simulation.	82
Fig. 3.2.2.3. Frequency percentage of malformation in embryonic flounder exposed to waste water from in-water cleaning simulation.	83
Fig. 3.2.2.4. The effects of sea urchin fertilization rate on the water jet of simulated experiment for ship's biofouling.	86
Fig. 3.2.2.5. The effects of sea urchin fertilization rate on the filtered water jet of simulated experiment for ship's biofouling.	87
Fig. 3.2.2.3. The effects of sea urchin fertilization rate on the MeOH extraction of simulated experiment for ship's biofouling.	88
Fig 3.2.2.7. Eggs Hatching success rate for AFS static panel test of <i>P. parvus</i> s.l.	91
Fig 3.2.2.8. Nauplii mortality for AFS static panel test of <i>P. parvus</i> s.l.	92
Fig. 3.2.3.1. Chemical structures used in this study.	99
Fig. 3.2.3.2. Frequency percentage of malformation and mortality in embryonic flounder exposed to Diuron, Irgarol 1051, and Sea-Nine 211.	101
Fig. 3.2.3.3. Frequency percentage of mortality in embryonic flounder exposed to Copper pyriithione and Zinc pyriithione.	102
Fig. 3.2.3.4. Frequency percentage of malformation in embryonic flounder exposed to Copper pyriithione and Zinc pyriithione.	103
Fig. 3.2.3.5. qPCR results in embryonic flounder exposed to Diuron, Irgarol 1051, and Sea-Nine 211 at 8 h after exposure. (a). The heat map of gene expression variation in the embryonic flounder exposed to three biocides (b). Genes related to heart	

formation, *nkx2.5*, NK2 transcription factor related 5; *SOX6*, SRY-box containing gene 6; *robo1*, Roundabout guidance receptor 1; *bmp4*, Bone morphogenetic protein 4, related to bone morphogenesis; Genes related to fin malformation; *acvr1*, Activin A receptor type 1; *fgf13* Fibroblast growth factor 13; *furin*, furin; *lef1*, Lymphoid enhancer binding factor 1; *pi4ka*, Phosphatidylinositol 4-kinase alpha; *plod2*, Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2; *sall2*, Spalt like transcription factor 2; *shha*, Sonic hedgehog protein A precursor; *sp8b*, Sp8 transcription factor; *wnt3a*, Wnt family member 3a. 106

- Fig. 3.2.3.6. qPCR results in embryonic flounder exposed to CuPT and ZnPT at 12 h after exposure. (a). The heat map of gene expression variation in the embryonic flounder exposed to two biocide (b). Genes related to heart formation, *nkx2.5*, NK2 transcription factor related 5; *SOX6*, SRY-box containing gene 6; *robo1*, Roundabout guidance receptor 1; *bmp4*, Bone morphogenetic protein 4, related to bone morphogenesis; Genes related to fin malformation; *furin*, furin; *plod2*, Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2; *wnt3a*, Wnt family member 3a; *TP73*, Tumor protein73 related to immune system. 107
- Fig. 3.2.3.7. DEG list in flounder embryos exposed to Diuron, Irgarol 1051, and Sea-Nine 211 and mode of toxicity. 110
- Fig. 3.2.3.8. Gene ontology of flounder embryos exposed to Diuron, Irgarol 1051, and Sea-Nine 211. 110
- Fig. 3.2.3.9. Up-and down-regulated DEG in flounder embryos exposed to CuPT and ZnPT (a). Venn diagram of DEG in flounder embryos treated with two biocide (b). ... 111
- Fig. 3.2.3.10. SSD graph of aquatic organism exposed to CuPT based on ToxDB. 114
- Fig. 3.2.3.11. SSD graph of aquatic organism exposed to ZnPT based on ToxDB. 114
- Fig. 3.2.2.12. Percentage of mortality in amphipoda (*Monocorophium uenoi*). 116
- Fig. 3.2.2.13. Percentage of mortality in mysids (*Neomysis awatschensis*). 117
- Fig. 3.2.3.14. The effects of Sea urchin fertilization rate on three kinds of biocide (Diuron, Irgarol, Sea-Nine). 120
- Fig. 3.2.3.15. The effects of Sea urchin fertilization rate on two kinds of biocide (CuPT, ZnPT). 120
- Fig 3.2.3.16. Eggs Hatching success rate and nauplii mortality for AFS active substances(Diuron,

Irgarol 1051, Sea-Nine 211) of <i>A. omorii</i> and <i>P. parvus</i> s.l.	127
Fig. 3.2.3.17. Eggs Hatching success rate and nauplii mortality for AFS active substances(Cu PT, ZnPT) of <i>P. parvus</i> s.l.	128
Fig. 3.3.1.1. Temporal structure of settlement of biofouling organisms.	129
Fig. 3.3.1.2. Bio-indicators of biofouling diatoms (Wustman et al., 1997).	129
Fig. 3.3.1.3. The goal of this study. G1, investigation of biofouling diatoms (focused on invasive species) and G2, investigation of specific diatoms by paint tolerance. ·	130
Fig. 3.3.1.4. The analyzed process of attached diatoms in ship-surface. 1) Sampling method: 30 × 30 cm quadrat method, 2) Sample preparation: concentrated and permount sample, 3) Analyses (light microscope, scanning electron microscope, element analysis, and NGS analysis).	131
Fig. 3.3.1.5. Changes in abundances of attached diatoms on investigated ships (R/V EARDO, JANGMOK 1 and 2, ONNURI).	132
Fig. 3.3.1.6. Common diatom species in investigated ships (R/V EARDO, JANGMOK 2, ONNURI).	133
Fig. 3.3.1.7. Reference study to transfer of the small naviculoid diatom <i>Navicula muscatinei</i> to the genus <i>Olifantiella muscatinei</i>	134
Fig. 3.3.1.8. Comparison of attached diatom assemblages between ship surface (R/V EARDO, JANGMOK 2, ONNURI) and natural substances (hard rock and macroalgae). ·	135
Fig. 3.3.1.9. Chemical composition by EDS analysis in ship surface of R/V EARDO, JANGMOK 2, and ONNURI.	136
Fig. 3.3.1.10. Comparison between EDS results diatom assemblages focused on predominant <i>Navicula muscatinei</i>	137
Fig. 3.3.1.11. Chemical composition by EDS analysis in ship surface of R/V ISABU.	137
Fig. 3.3.1.12. Analysis process of Next Generation Sequencing method.	138
Fig. 3.3.1.14. Sampling of ciliates attached to JANGMOK 1.	140
Fig. 3.3.1.15. Sampling of ciliates attached to JANGMOK 2.	141
Fig. 3.3.1.16. Sampling of ciliates attached to EARDO.	141
Fig. 3.3.1.17. Sampling of ciliates attached to ONNURI.	142
Fig. 3.3.1.18. Sampling of ciliates attached to ISABU.	142
Fig. 3.3.1.19. Photomicrographs of live and protargol-impregnated specimens. A, B.	

	<i>Loxophyllum rostratum</i> ; C, D. <i>Amphisiella annulata</i> ; E, F. <i>Arcuseries petzi</i> ; G, H. <i>Uronychia binucleata</i> ; I, J. <i>Euplotes parkei</i> ; K, L. <i>Euplotes plicatum</i>	144
Fig. 3.3.1.20.	Phylogeny tree of <i>Euplotes</i> inferred from 18S ribosomal RNA gene sequences.	145
Fig. 3.3.1.21.	Phylogeny tree of <i>Uronychia</i> inferred from 18S ribosomal RNA gene sequences.	146
Fig. 3.3.1.22.	Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI.	147
Fig. 3.3.1.23.	Sampling of fouling macrozoobenthos at starboard and propeller on the R/V EARDO.	149
Fig. 3.3.1.24.	Sampling of fouling macrozoobenthos at starboard, port and propeller on the R/V JANGMOK 2.	151
Fig. 3.3.1.25.	Sampling of fouling macrozoobenthos at starboard and propeller on the R/V JANGMOK 1.	152
Fig. 3.3.1.26.	Sampling of fouling macrozoobenthos at starboard and propeller on the R/V ISABU.	153
Fig. 3.3.1.27.	Number of species of fouling macrozoobenthic taxa during the study period.	156
Fig. 3.3.1.28.	Average density of fouling macrozoobenthic taxa during the study periods.	156
Fig. 3.3.1.29.	Biomass of fouling macrozoobenthic taxa during the study periods.	157
Fig. 3.3.1.30.	Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI, EARDO, JANGMOK 1, 2 and ISABU.	158
Fig. 3.3.1.31.	Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI, EARDO, JANGMOK 1, 2 and ISABU.	159
Fig. 3.3.1.32.	Pictures of dominant species at study areas on the R/V ONNURI, EARDO, JANGMOK 1, 2 and ISABU.	160
Fig. 3.3.1.33.	Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI.	162
Fig. 3.3.1.34.	Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at sites on the R/V ONNURI.	163
Fig. 3.3.1.35.	Distribution of dominant species of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI.	164
Fig. 3.3.1.36.	Distribution of <i>Balanus</i> spp. and Serpulidae (polychaete) on the R/V ONNURI.	165
Fig. 3.3.1.37.	Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI.	166
Fig. 3.3.1.38.	Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at sites in the R/V EARDO.	168

Fig. 3.3.1.39. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at sites on the R/V EARDO.	169
Fig. 3.3.1.40. Distribution of dominant species of fouling macrozoobenthos on the R/V EARDO. ·	170
Fig. 3.3.1.41. Pictures of dominant species at study areas on the R/V EARDO.	171
Fig. 3.3.1.42. Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V EARDO.	172
Fig. 3.3.1.43. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 2.	174
Fig. 3.3.1.44. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at study sites in the R/V JANGMOK 2.	175
Fig. 3.3.1.45. Distribution of dominant species of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 2.	176
Fig. 3.3.1.47. Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 2.	178
Fig. 3.3.1.48. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 1.	180
Fig. 3.3.1.49. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at study sites in the R/V JANGMOK 1.	181
Fig. 3.3.1.50. Distribution of dominant species of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 1.	182
Fig. 3.3.1.51. Distribution of <i>Balanus</i> spp. at the study sites on the R/V JANGMOK 1.	183
Fig. 3.3.1.52. Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 1.	184
Fig. 3.3.1.53. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos on the R/V ISABU.	186
Fig. 3.3.1.54. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at study sites on the R/V ISABU.	187
Fig. 3.3.1.55. Distribution of dominant species of fouling macrozoobenthos on the R/V ISABU. ·	188
Fig. 3.3.1.56. Distribution of <i>Balanus</i> spp. at the study sites on the R/V ISABU.	189
Fig. 3.3.1.57. Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V ISABU.	190
Fig. 3.3.2.1. Photograph of changes in attached organisms on artificial ship surface (control and treatment plates) and concept of viability test.	192

Fig. 3.3.2.2. Major chemical components of artificial ship surface plate (control and treatment plates).	193
Fig. 3.3.2.3. Time table of study plan.	194
Fig. 3.3.2.4. Experimental methods of investigation of microalgae on artificial ship surface plate and viability test.	195
Fig. 3.3.2.5. Changes in environmental factors in sea water.	196
Fig. 3.3.2.6. Changes in attached organisms on artificial ship surface plate.	197
Fig. 3.3.2.7. Variations of chemical components by EDS analysis on artificial ship surface plates.	198
Fig. 3.3.2.8. Changes in microorganisms (attached diatoms, heterotrophic flagellates and bacteria) and common attached diatom species (over 1% of total attached diatoms) on artificial ship surface plates.	199
Fig. 3.3.2.9. Changes in environmental factors in viability test.	200
Fig. 3.3.2.10. Changes in attached diatom community of viability test.	200
Fig. 3.3.2.11. Changes in bacteria community of viability test.	201
Fig. 3.3.2.12. Weekly ciliate sampling of simulated experiment.	202
Fig. 3.3.2.13. Photomicrographs of live and protargol-impregnated specimens. A, B. <i>Aspidisca leptaspis</i> ; C, D. <i>Diophrys appendiculata</i> ; E-H. <i>Euplotes parkei</i> (E, F: small form/G, H: large form); I, J. <i>Protogastrostyla pulchra</i>	203
Fig. 3.3.2.14. Tracking the ciliate fauna changes on the simulated plates. (S): small form, (L): large form.	204
Fig. 3.3.2.15. Cultivation of <i>Diophrys appendiculata</i> (orange arrows) and <i>Euplotes parkei</i> (small form: blue arrows; large form: red arrows).	205
Fig. 3.3.2.16. Sampling sites of the simulated experiment for identification of biological debris. ...	206
Fig. 3.3.2.17. Fouling macrozoobenthos on the simulated plate.	208
Fig. 3.3.2.18. Analysis of biofouling index of fouling macrozoobenthos.	209
Fig. 3.3.2.19. Survival rate of fouling macrozoobenthos on the secondary biofilm-1	210
Fig. 3.3.2.20. Survival rate of fouling macrozoobenthos on the secondary biofilm-2.	211
Fig. 3.3.2.21. Survival rate of fouling macrozoobenthos on the secondary biofilm-3.	212
Fig. 3.3.2.22. Survival rate of fouling macrozoobenthos on the secondary biofilm-4.	213
Fig. 3.4.1.1. Photographs of manual brushing (left and middle) and scrubbing (right) by diver. ·	218

Fig. 3.4.1.2. Photographs of mechanical removal technologies, a) Cart b) grinding c) ROV. ··	218
Fig. 3.4.1.3. Photographs of surface treatment, a) and b) Hot water box c) The Petrogen heat torch d) The heat treatment cone.	219
Fig. 3.4.1.4. Photographs of Shrouding technologies, a) floating dock b) Encapsulation.	219
Fig. 3.4.1.5. Timeline for establishment of biofouling regulation in Australia and New Zealand. ...	222
Fig. 3.4.2.1. Risk assessment of in-water cleaning in Australia and New Zealand.	225
Fig. 3.4.2.2. Key parameters for risk assessment of in-water cleaning.	226
Fig. 3.4.3.1. Variation of PEC and PEC/PNEC values by the number of vessels painted in Busan's Gamcheon Port per year.	233

Table List

Table 3.1.1.1. Selected Q1 and Q3 ions and their optimized analysis conditions.	19
Table 3.1.1.2. Liquid chromatographic separation and analysis conditions for target analytes.	21
Table 3.1.1.3. List of alternative biocides approved or registered in Europe, Japan, and New Zealand.	24
Table 3.1.1.4. Guidelines to regulate metal contamination in the environment.	26
Table 3.1.2.1. Analytical conditions for ICP/MS.	28
Table 3.1.2.2. Marine environmental quality criteria for metals in seawater.	33
Table 3.1.2.3. Environmental criteria for the discharge of metal and suspended solid into aquatic ecosystem.	33
Table 3.1.2.4. Total suspended solid concentrations in seawater and comparison with values reported in literatures.	39
Table 3.2.1.1. Primers used in this study for RT-qPCR.	50
Table 3.2.1.2. RNA-seq transcript assembly informations in flounder embryos exposed to water jet effluents and MeOH extract from RV/EARDO.	59
Table 3.2.1.3. RNA-seq transcript assembly informations of flounder embryos exposed to HCW and MEW from RV/ISABU.	61
Table 3.2.1.4. Function of top 12 up-regulated DEGs in flounder embryos exposed to HCW.	63
Table 3.2.1.5. Function of top 11 down-regulated DEGs in flounder embryos exposed to HCW.	63
Table 3.2.1.6. Function of top 12 up-regulated DEGs in flounder embryos exposed to MEW.	64
Table 3.2.1.7. Function of top 11 down-regulated DEGs in flounder embryos exposed to MEW.	64
Table 3.2.1.8. Test condition in amphipoda (<i>Monocorophium uenoï</i>) and mysid (<i>Neomysis awatschensis</i>).	66
Table 3.2.1.9. Acute toxic parameter of amphipoda (<i>Monocorophium uenoï</i>) and mysids (<i>Neomysis awatschensis</i>) exposed to WJE and WJME from RV/EARDO.	70
Table 3.2.1.10. Acute toxic parameter of mysids (<i>Neomysis awatschensis</i>) and copepod (<i>Tigriopus japonicus</i>) exposed to WJE and WJME from RV/ISABU.	70
Table 3.2.1.11. List for experiment concentration of water-jet effluents and water-jet MeOH extract.	77
Table 3.2.1.12. Result of pH and dissolved oxygen saturation of water-jet effluents and water-jet MeOH extract.	77

Table 3.2.1.13. LC ₅₀ values of Water-jet effluents and Water-jet MeOH extract to <i>P. parvus</i> s.l.	79
Table 3.2.2.1. Experiment concentration of AFS static panel test.	90
Table 3.2.3.1. Concentration of Irgarol 1051, Sea-Nine 211 and Diuron in Korean costal area.	94
Table 3.2.3.2. Primers used in this study for RT-qPCR.	100
Table 3.2.3.3. RNA-seq transcript assembly informations of flounder embryos exposed to Diuron, Irgarol 1051, and Sea-Nine 211 (heart development stage).	109
Table 3.2.3.4 RNA-seq transcript assembly informations of flounder embryos exposed to CuPT and ZnPT (heart development stage).	109
Table 3.2.3.5. Toxic data base on CuPT.	112
Table 3.2.3.6. Toxic data base on ZnPT.	113
Table 3.2.2.8. Acute toxic parameter of amphipoda (<i>Monocorophium uenoï</i>).	117
Table 3.2.2.9. Acute toxic parameter of mysids (<i>Neomysis awatschensis</i>).	117
Table 3.2.3.1. Comparison of EC ₁₀ and EC ₅₀ values of single antifouling biocide estimated for Echinoid.	121
Table 3.2.3.11. Comparison of EC ₅₀ and LC ₅₀ values of single antifouling biocide estimated for various marine organisms. (unit: µg/L)	122
Table 3.2.3.12. List for experiment concentration of AFS active substances.	124
Table 3.2.3.14. Result of pH and dissolved oxygen saturation of AFS active substances.	126
Table 3.2.3.14. LC ₅₀ values of AFS active substances to <i>P. parvus</i> s.l.	127
Table 3.3.1.1. Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI.	148
Table 3.3.1.2. Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V EARDO.	149
Table 3.3.1.3. Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 2.	150
Table 3.3.1.4. Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 1.	152
Table 3.3.1.5. Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V ISABU.	153
Table 3.3.2.1 Biofouling index (by Floerl et al 2005).	207
Table 3.4.1.1. Summary of in-water cleaning technologies.	217
Table 3.4.1.2. Examples of biofouling management in European countries.	221
Table 3.4.3.1 In-water cleaning scenarios of ship's hull fouling.	229
Table 3.4.3.2. IMEA component and scoring criteria for RPN value estimation.	230
Table 3.4.3.3. RPN values and biological risk assessment results for individual In-water	

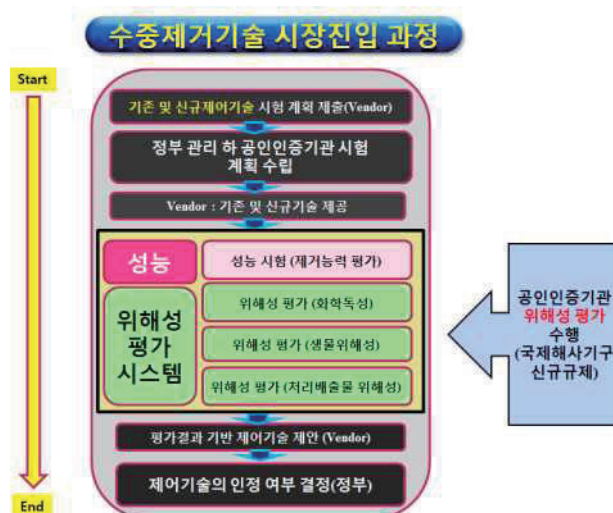
cleaning scenario.	231
Table 3.4.3.4. MAMPEC configuration and key determination factors.	232
Table 3.4.3.5. In-water cleaning scenario of R/V EARDO.	233
Table 3.4.3.6. Risk assessment of in-water cleaning of R/V EARDO.	234

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발 개요

- 선박부착생물 수중제거기술 산업시장 진입과정
 - 국제해사기구 미래규제 대응 ‘위해성 평가기법’을 통한 수중제거기술의 시험 및 평가
 - ‘선박부착생물 관리 가이드라인’에 명시된 ‘위해성 평가’를 통한 수중제거기술의 환경 친화적 조건 만족할 수 있는 기준 제시
 - 국제해사기구가 2016년 ‘선박부착생물 관리협약’ 작업 예고 후 가이드라인에 명시된 ‘위해성 평가기법’ 개발의 시급성과 중요성이 대두됨.
 - 위해성 평가기법의 핵심은 수중제거 파생물에 의한 환경오염 및 외래종 이동 저감임.
 - 가까운 미래에 국제해사기구의 ‘해양환경보호위원회’에서 ‘위해성 평가기법’과 ‘수중제거 파생물 회수율’ 기준 설정을 위한 논의 예정.



- ‘선박부착생물 관리 가이드라인’ 내 수중제거 기인 환경오염 및 외래종 이동저감을 위한 수중제거장비의 현장운용 체계화

- 항만 현장에서 적용가능한 수중제거기술 통합 관리프로세스 구축 및 운용 요구증대.
- 항만 도달 선박의 운용기록과 선박 유해성 평가를 통한 수중제거장비 적용 여부 결정
- ‘선박부착생물 관리협약’ 작업 예고 후, 선박부착생물 수중제거기술 산업화 시자의 패러다임 변화를 대비하여, 다양한 기술들의 성능 평가관리 시스템을 구축하여 미래 산업화 시장을 독려하고 시장을 점유하도록 적극진입 유도
- 미래규제 대응 수중제거기술 개발로 국산장비의 시장성 확장 기대
- 환경친화적 성능 갖춘 수중제거기술의 유입을 적극 반영한 항만 통합 관리프로세스 구축 및 운용

2. 연구개발의 중요성

- 공공분야 기술개발을 통한 기업개발품의 신규시장 도입지원
 - 기존 및 신규 수중제거기술의 신규규제 미달 혹은 달성여부를 사전대응 유도
 - 기존 주먹구구식의 선박부착생물 수중제거시장의 신규기술 도입시장 확장
 - 소규모의 국내 수중제거 시장을 벗어나 자동화 로봇 제거기술을 이용한 국제시장 활성화 가능
- 천문학적인 오염방제비용의 절감을 통한 경제성 증대
 - 현재 무분별한 선박부착생물 수중제거과정에 노출된 해양환경은 활성물질 오염과 외래종 유입 위험성에 그대로 노출되어 있음.
 - 국제해사기구에서 채택한 ‘선박부착생물 수중제거기술 운용요건’에 근거한 ‘수중제거 파생물을 환경위해성 없는 수준 내에서 제거 및 회수할 수 있는 수중제거기술 도입으로 해양환경 훼손을 미연에 방지 가능함.
 - 미래 국제환경규제에 대한 선제적 대응과 아국의 해양환경 보호를 위해 선박부착생물의 수중제거 파생물의 회수율을 고려한 수중제거장치의 표준화된 위해성 평가기법 필요성이 시급함.
- 기존 AFS (antifouling systems)시장과 달리 수중제거기술의 위해성 평가법 전무함
 - 선박기인 외래종 유입방지의 인식이 ‘선박평형수 관리협약’ 채택과 발표로 강화됨
 - 선박부착생물에 의한 외래종 유입이 무시못할 정도임이 보고되었고, AFS처리가 오랜 기간 적용되었음에도 여전히 문제임.
 - 궁극적으로 수중제거기술법이 시행되고 있으나 그 제거파생물의 위해성이 방조되어 왔으나 국제해사기구가 ‘환경친화적인 처리’라는 카드를 꺼냄.

- 위해성 평가기법을 통한 환경친화적 처리를 제시하였으나, 대응하는 평가기법이 전무함.

3. 기술적 측면

- 기존 및 향후 개발될 모든 종류의 선체부착생물을 제어하는 기술과 제거장비 및 장치의 상업화와 산업시장 진입은 과학적 위해성평가와 승인과정이 핵심기술로 필요하다.
- 선체부착생물을 제어 및 제거하는 현존 및 미래도출기술의 환경위해성 최소화를 반영한 성능(효능) 검증 및 승인 그리고 위해성 평가시스템 개념이 전무하므로 본 기술개발이 시급하고 중요하다.
- 미래 규제 대응에 필요한 AFS (Antifouling system)처리활성물질의 환경 내 분석기법 및 거동, 독성 평가기법 정립이 필요하다.
- AFS 처리활성물질의 환경 내 위해성 판단을 위한 근거자료인 국내 주요 항만 및 후속대응 처리 해역 주변의 처리활성물질 분포 자료 확보가 필요하다.
- 후속대응법 기인 선박부착 병원성 원생생물(Ship Fouling Pathogenic Protists: SFPP)의 수중 배출과 이들의 확산에 따른 해양생물 발병을 감시할 기술이 필요하다.
- 생태계 구성원에 대한 생태독성 평가기술 보유하여 실제 해양생태계에 미치는 위해성 평가가 필요하다.
- 실험생물의 생사(live or dead), 행동변화, 생식독성 파악 등을 포함하는 현재의 위해성 평가법은 화학물질에 대한 생물의 대사 및 생리변화수준을 파악하기가 어렵다. 이를 극복하기 위해 환경/생태유전체 연구기법을 다양한 먹이준위 (1차생산자, 1차소비자 및 2차소비자 등)의 생물에 적용하면 평가가 가능하다.
- 선박부착생물의 제어를 위해 사용된 화학물질들은 미량으로도 생태계를 교란시키며, 나아가 인간의 보건에 치명적인 위해를 가져올 수 있는데, 기존의 기기분석법을 통한 분석은 소요시간 및 비용이 크고 분석결과가 난해하여 생태계 위해성 및 영향을 판별하는데 한계가 있다.
- 이 부분을 극복하기 위해 환경오염 민감 생물종 지표 연구가 도입되고 있으나, 기존의 생물종을 이용한 생물 위해성평가기법은 생물종의 생사여부나 활성도를 이용하여 생물종별 독성물질별 단편적인 독성평가에 국한되어 심층적이고 복합적인 독성 평가기법의 도입이 절실하다.
- 바이오마커 유전자를 통한 위해성 평가는 이미 알려진 특정 위해성 효과의 정도를

측정하고 한 가지 유전자에 미치는 영향을 평가하는 점에서는 강점을 보이지만 생명체 내부에서의 독성의 전반적인 효과와 독성에 관계되는 유전자간의 복잡한 유연 관계를 설명하고 평가하는 데는 한계가 있다.

- 선진국에서는 환경변화에 높은 내인성을 지니지만 발암원, 돌연변이원, 기형유발원 등의 오염물질에 대해서는 높은 민감도를 지니는 송사리, 무당개구리 및 저서성 플랑크톤을 이용한 연구가 DNA chip 및 Real-time PCR 등의 독성유전체학 (Toxicogenomics) 기반의 첨단과학기술을 이용하여 이루어지고 있다.
- 생명체의 cDNA를 유리기판위에 고밀도로 침착시킨 유전자 칩과 정량적인 방법으로 개별 유전자 발현을 진단 가능한 Real-time PCR기법은 첨단 진단의학분야와 신약개발 분야에 활발히 도입되고 있는 실정이다 (Roger and Stephen, 2002).
- 이러한 독성유전체학 기반 신기술을 환경분야에 도입함으로써 기존 생물지표 연구를 통한 위해성평가에서 할 수 없었던 high through-put 분석을 가능하게 할 수 있으며, 광범위한 오염물질에 대한 독성효과를 분자 수준에서의 분석을 가능하게 해 주고, 특정 위해성물질에 대한 독성분석을 통한 독성영향 분류도 피할 수 있다.
- 선박표면에 부착생물 방지에 이용되는 해수 전기분해를 이용하는 물리적 방법이나, 도료를 이용하는 화학적 방법에서 발생하는 독성 물질이 해양으로 유입되면서 해양 생태계에 미치는 영향 평가에 대한 기술 개발이 필요하다.
- 선박에 부착된 생물을 제거하기 위해 사용하는 장비들은 선체의 표면 손상을 최소화하기 위해 다양한 방법으로 개발되고 있으나, 제거되는 생물을 회수하기 위한 기술 개발은 매우 제한적이다.
- 선박에서 제거된 생물이 해양으로 유입되면서 해양생태계 구조 및 기능 교란을 야기할 수 있어, IMO에서는 선저 부착에 의한 침해성 수중생물의 이동과 유입에 대한 위험을 줄이기 위하여 권고사항인 지침을 개발하였으나, 구체적인 실행방법은 제시되어있지 않아, 해양생태계의 안정성을 평가하고 유지하기 위한 구체적인 기술 개발이 필요하다.
- 2003년 IMO의 유기주석계 방오제 관련협약이 체결되면서, 신규 개발되고 있는 방오제의 살균 및 제초 성능/효능에 대한 독성자료나 생식독성 등의 자료가 요구되고 있는 실정이나 이에 대한 국내 현장 실정에 맞는 위해성평가기법이 구축되지 못하고 있다.

4. 경제·산업적 측면

- 선박부착생물 방지 규제안의 선제적 대응 및 신항 환경규제시장 개방에 대응한다.

- 기존 형성된 선박평형수 처리기술 및 평가시장에 맞먹는 기술 및 경제적 파급효과를 지닌다.
- 선체부착생물 제어기술 시장의 needs를 선제적으로 파악할 수 있어, 시장요구성 최적처리기술 생산모티브를 제공가능하다.
- 국내에서 개발된 선체부착생물 제어기술의 산업화 및 국제시장 진출을 주도하고, 시장성 높은 기술개발을 유도하는데 필요하다.
- 신규 AFS 또는 신규 처리활성물질 개발 기업을 위한 위해성 분야 기술 검토 및 지원이 필요하다.
- 항만이 위치한 연안 주변에 해안 양식산업이 발달해 있으므로 외래 유입종에 의한 피해를 최소화하기 위한 사전 차단이 필요하다.
- 환경/생태유전체 연구기법을 생태위해성 평가에 도입하여 저농도($\mu\text{g/L}$, ppb 수준) 노출에 대한 생물의 반응을 생리학적 수준에서 이해할 수 있다.
- 이에 따라 다양한 생물 위해요인 (내분비계 장애 유발, 신경장애 유발, 호흡장애 유발)을 내포하고 있을 것으로 예상되는 신규 선박방오도료에 대한 위해성을 제시하여, 시장 진입을 사전에 차단하여 해양생태계 교란을 방지할 수 있다.
- 또한 안전한 신규 선박방오도료의 선별에 활용되어 우리나라 화학산업 안전성에 이바지 할 수 있다.
- 독성유전체기법을 이용한 위해성평가법은 경제적 산업적 측면에서 보면 한 가지 유해화학물질에 대한 위해성 분석시, US \$2-4 million 정도의 비용이 소요되어 (Neumann and Galvez, 2002) 경제적인 부담이 컸으나, 다량의 유전정보를 포함하고 있는 유전자 칩을 활용한 방법의 적용시에는 특정 화학물질에 대한 생물체의 피해 정도를 신속하고 보다 저렴하게 분석할 수 있다.
- 경제발전예 따라 선박을 이용한 교역량이 증가되고 있으며, 이에 따라 선박 기인 오염 물질의 해양 환경오염 및 해양생태계에 미치는 영향이 증가하고 있다. 이에 따라 국제해사기구(IMO)는 선박 기인 오염 물질에 의한 해양환경 및 해양생태계 영향을 평가하기 위한 방법에 대해 논의하고 있어, 이를 선제적으로 대응하기 위한 기술개발이 필요하다.
- 신규 개발되는 고 성능의 비유기주석계 방오제 및 후속대응기술에 대한 안전성이 충분히 입증된다면, 해양환경 보호에 관심이 높은 각국에 대한 보급 및 확산에 크게 기여할 수 있다.

5. 사회·문화적 측면

- 선박부착생물 방지 관련기술을 확보하여, 정부의 미래 국제해사기구 협약 대응 및 법제화 지원이 가능하다.
- 생물자원은 바이오, 생물의학, 환경, 소재 산업에 다양한 소재를 제공하고 있어 국가 생물자원을 보호하기 위한 외래해양생물종 유입감시체제 구축에 활용 가능하다.
- 신흥 환경규제시장 확대를 통한 고용 창출 효과 가능성이 증가한다.
- 환경 위해성이 높은 처리활성물질의 사용 규제를 통한 해양환경 보호 및 보전이 필요하다.
- 대부분의 외래 유입종은 포식자의 부재로 광범위한 우점 현상을 보이므로 종 다양성을 감소시키고 경관을 해치는 것을 막을 필요가 있다.
- 일반 국민들에게 화학물질 안전에 대한 경각심을 높여 가습기 살균제 사태와 같은 참사를 미연에 방지할 수 있으며, 이에 따라 우리나라 국민의 유전자 풀을 건전한 상태로 유지할 수 있다.
- 독성유전체기법을 이용한 위해성평가법은 체계적인 독성유전체학 기반 생물지표연구를 통해 생태계의 위험을 예측하고 관리 할 수 있는 기초를 제공함으로써, 국가 기술지도(NRTM)에서 제시하고 있는 '건강한 생명사회 지향'과 '환경 에너지 프론티어 진흥'에 잘 부합되는 과제라 할 수 있다.
- 특히, 전략제품 기능의 포트폴리오 분석에서도 생체 진단기기 시약분야에서 2010년까지 1,590억 미 달러의 경제적 파급효과와 성공 가능성이 매우 높은 기술로 분류되어 있으며, 지속 가능한 자연 생태계 관리 측면에서도 자연환경과 조화되는 쾌적한 삶 유지에 필수가 되는 공공기반성이 강한 기술이라 할 수 있다 (2002 NTRM).
- 항구는 단순히 물건의 교역 뿐만 아니라 인간의 여가활동에 이용될 수 있는 공간으로 개념이 바뀌지고 있으며, 이를 위해 정부는 마리나 사업을 통해 항구의 이용을 극대화 시키려하고 있지만, 선박에서 유래되는 오염 물질의 증가로 인한 안정성이 위협받고 있다.
- 선제 및 후속대응법에 대한 보다 과학적인 위해성 검증작업을 통해 국내 해양생태계를 안전하게 지켜나가는 국가 정책결정에도 큰 도움 될 것이다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

구분	연차별 성과목표 및 연구내용	
	성과목표	연구내용
1차년도 (2017)	1. AFS 활성물질 분석기술 개발	1-1. AFS 활성물질 분석기술 정립 - 대상 활성물질 선정 및 LC/MS/MS 기반 mass 라이브러리 구축 - 대상 화합물 추출 및 정제 기법 탐색 및 실험 조건 정립 - 혼합표준물질을 이용한 최적의 크로마토그래피 분리 및 정량 분석조건 도출
		1-2. 선박부착 파생물 시험적용 - 활성물질 분석기술을 선거 또는 해상에서 회수된 선박부착 파생물에 시험 적용 - 회수된 선박부착 파생물 내 활성물질 잔존 특성 파악
	2. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE 영향평가 및 지표 발굴	2-1. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE 영향 및 지표 발굴 - 선박부착 제거 파생물 획득 - 선박부착 제거 파생물의 국제규격시험생물별 급성독성영향평가 - 연안서식 대상생물별 위해영향 평가 및 평가지표 선별
		2-2. 국내 주상용 AFS처리 활성물질 독성영향평가 - 국내 주상용 AFS처리 활성물질 선별 및 독성 DB 조사 - 연안서식생물 위해영향 평가 지표 발굴 및 선별
		3. 선박부착기인 생물 및 위해성 요인 탐색 및 판별시도
	4. 수중제거 핵심 관리요소 선정	3-1. 선저부착생물 확보 및 판별 그리고 위해성요인 탐색
		4-1. 수중제거 시나리오 탐색 - 기존 수중제거관리 사례 검토 및 한계성 분석 - 위해성 요소별 이론적 수중제거 시나리오 검토 4-2. 관리 수준 대응 핵심 요소 도출 - 수중제거 관리 수준을 반영할 수 있는 핵심 요소 선정
	5. 총괄분야	5-1. 수중제거기술 IMO사무국, 정부, 국내외 전문가 의견조율 및 방향점검, 탐색 5-2. 수중제거관련 시료획득을 위한 지원 5-3. 선박부착생물 관리 통합프로세스 기본 개념 설정지원 5-4. 국내 및 국외 전문가 초빙 세미나 개최

구분	연차별 성과목표 및 연구내용	
	성과목표	연구내용
2차년도 (2018)	1. AFS 활성물질 분석기술 개발	1-1. AFS 활성물질 분석기술 정립 및 공정시험기준안 도출 - 분석표준화를 위한 공정시험기준안 도출 및 시범지침서 작성 - 활성물질 국내외 환경기준 검토 및 독성DB 기반 위해농도 수준 산출
		1-2. 선박부착 및 수중제거 파생물 시험적용 - 글로벌급 선박 부착파생물 채취 및 활성물질 잔존특성 파악 - 수중제거 모사시험 실시 및 파생물 내 활성물질 잔존특성 파악 - 배출파생물의 입자 크기별 분포 특성 파악
	2. LAB-SCALE 모사실험 및 AFS활성물질 영향 평가	2-1. 선박부착생물 모사실험 및 LAB-SCALE 영향 평가
		2-2. 국내 주상용 Principal biocide AFS처리 활성물질에 대한 독성영향평가
	3. 선박부착기인 생물 및 위해성 요인 탐색 및 판별시도	3-1. 선저부착생물 확보 및 판별 그리고 위해성요인 탐색
		3-2. 선박부착생물 모사실험 파생생물 판별
	4. 수중제거관리 frame work 제시	4-1. 핵심요소 반영 수중제거 시나리오 도출 및 이론적 지표적용
		4-2. 위해성 평가지표 반영 이론적 관리 framework도출
	5. 총괄분야	5-1. 미래규제대응 선박부착생물 수중제거기술 관리프로세스 framework와 수중제거파생물에 대한 Lab-SCALE 분석 및 평가 기법제시
		5-2. 수중제거기술 IMO사무국, 정부, 국내외 전문가 의견조율 및 방향점검, 탐색
5-3. 선박부착생물 관리 통합프로세스 기본 개념 설정지원		
5-4. 국제해사기구 주도 'GloFouling Programme' 활동 대응		
5-5. 선박부착생물 모사실험 수행 시스템 디자인 및 셋업지원		

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 연구동향

- “친환경 양친매성 방오 코팅제 실용화 기반기술개발” (수행기관: KIOST, 참여연구원: 최진우 박사, 2015,08-12)과제에서 강재표면에 적용가능한 방오코팅제 실용화 기반연구를 수행함.
 - 신규 방오코팅제 성능평가의 일환으로 해양생물의 부착정도를 판단하는 실험 수행됨.
 - 장기간 노출실험으로 생물부착정도를 비교분석함.
 - 위해성 평가시험은 수행되지 않음.
 - 본 과제에서 제안한 내용과 직접적인 관련성이 없음.
- 연안 산란어류의 배아를 활용하여 유류오염 및 개별 PAHs 독성영향규명
 - 넙치배아에 다양한 원유, 원유추출분획, PAHs등 노출
 - 발생독성, 유전독성등의 위해영향을 정밀하게 평가함.
- ‘요각류 난 부화에 대한 산성화 영향 평가 연구’ (연구기관: KIOST)
 - 연안 동물플랑크톤의란(eggs)의 부화가능란, 휴면란 구분평가
 - 빈산소 조건하에서 부화구분 평가
- ‘폐기물 해양배출 종합관리시스템 구축(13차): 저서생물유해성 평가 (연구기관: KIOST, 발주처: 해수부)
 - 무척동 동물(성체) 수정과 발생 평가연구 수행함
- 국내 연관 과제들은 대부분 AFS (antifouling systems) 원천기술개발에 역점을 두었음.
 - 본 과제는 이들 과제와 유사성이 거의 없고 뚜렷한 차별성을 나타냄.
 - 수중제거 기술관련 과제는 국내에 전무하며, 수중제거 파생물 (AFS 활성물질, 부착생물)의 위해성 평가 기술개발에 관한 연구는 기존 과제들과 대비되는 뚜렷한 독창성을 가짐.

부처명	사업명	과제명	연구기관	연구책임자
중소기업청	산학연공동기술개발	선체 생물오손 방지 처리장치 개발	한국해양연구원	김은찬
중소기업청	중소기업사용화 기술개발지원	선박용 전해식 해양생물 부착방지장치(MGPS) 개발	(주)아메스	이영우
해양수산부	해양환경개선기술개발	차세대 친환경 방오제를 이용한 방오도료 개발	순천향대학교	신형용
해양수산부	미래해양산업기술개발	생물 착생 방지 해양 구조물 도포용 도료 개발	듀라케미(주)	강주열
산업통상자원부	산업소재원천기술개발	선박용 기능성 도료개발	부경대학교	박진환
지식경제부	산업소재산업원천기술개발	자기마모형 수지기반 마찰저항저감형 방오도료개발	부산대학교 산학협력단	전호환
미래창조과학부	해양극지기초원천기술개발	쌍각류의 오손·방오기작 이해 및 방오소재 디자인 연구	포항공과대학교	황동수
교육과학기술부	일반연구자지원	서남해 연안해역에서 신방오제물질의 분포특성에 관한연구	목포해양대학교	한상국

제 2 절 국외 연구동향

- 미국환경보호국(EPA)에서 따르면 구리가 150년간 주요 방오도료로 사용되어왔지만 구리가 자연적으로 필요한 수준의 농도를 초과할 경우, 구리의 장기적 영향에 대한 우려가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 생물적으로 활성적이고 구리를 제외한 방오 도료를 개발하고자 진행되었다(EPA, 2003).
- Southampton marine and maritime institute 연구 과제에 따르면 환경적으로 허용 가능하고 천연제품을 사용한 방오 시스템 개발을 했으며 해양의 자연 과정과 생체 모방이며 해조 추출물을 이용하여 화학적 방어 작용을 방오 도료 방법에 활용하였다.
- 환경 배출 시나리오 가늠자의 방오 제품에 관한 문서에서 전기를 이용한 방오 방법은 선체와 해수 사이의 전하 차이를 만들어 화학물질을 촉발시킨다. 전기를 이용한 방법은 주석을 제외한 방오도료보다 효능이 좋지만 비용이 많이 소요된다

(European commission, 2004).

- 호주와 뉴질랜드가 20년 전부터 상호 협력연구를 통해 선박부착생물의 위해성 평가 기법 및 수중제거관리 가이드라인을 완성하였고, 2018년 5월에 자국 규제를 강제화할 예정이다. 또한, 수중제거장치 개발을 주도하고 있으며, 국제해사기구의 국제협약에 자국의 가이드라인을 연계할 것으로 예상됨.

The image displays three documents related to anti-fouling and in-water cleaning guidelines. On the left is a New Zealand Government document titled 'In-water cleaning of vessels: Biosecurity and chemical contamination risks' (2013). In the middle is an Australian Government document titled 'ANTI-FOULING AND IN-WATER CLEANING GUIDELINES' (June 2013). On the right is a flowchart titled 'TYPES OF IN-WATER BIOFOULING TREATMENT' which details various treatment methods like anti-fouling coatings, in-water treatment, and emergency cleaning, and maps them to different biofouling types (Microfouling, Macrofouling, etc.) and regional/international requirements.

[호주와 뉴질랜드에서 개발한 가이드라인 및 수중제거관리 툴]

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 AFS 처리활성물질 분석기술개발

1. AFS 활성물질 분석기술 정립 및 공정시험기준안 도출

가. 서론

경제 및 산업 활동의 증가에 따라 선박을 이용한 교역량이 증가되고 있으며, 이에 따라 선박 기인 오염물질의 해양 유입으로 인한 해양 환경오염 및 해양생태계에 미치는 영향에 대한 우려도 함께 증가되고 있다. 특히 선체 표면에 생물부착을 방지하기 위해 칠해진 페인트 내 다양한 활성물질의 유출로 인한 환경위해성 또한 선박량 증가와 함께 높아지고 있다.

선박부착생물 제어기술은 크게 물리적, 화학적, 생물학적 기술로 나눌 수 있다. 이 중 화학적 제어기술은 생물을 직접 사멸시키거나 생물의 성장, 번식을 억제하는 활성물질로서 살생물제(biocides) 등을 사용한다. 방오도료에 포함된 이러한 활성물질이 제대로 처리되거나 관리되지 않는다면 선박이 정박, 운행하는 항만 등의 해양환경과 부착생물 수중제거 기술이 적용되는 해역의 해양환경 및 서식 생태계에 중대한 악영향을 미칠 수 있다.

가장 대표적인 방오도료용 활성물질인 tributyltin(TBT)은 따개비, 조류 등의 성장을 억제하여 선박의 마찰 저항을 감소시켜 적은 연료 소비를 가능케 함으로써 1960년대 처음 사용되어 2000년대 초반까지 활발하게 사용되어 왔다. 그러나 1970년 후반부터 굴 패각의 변형, 소라 등 복족류의 성 변화(imposex) 및 불임 현상, 그 외 다양한 연체동물, 갑각류, 어류 등 해양생물에 미치는 독성영향이 알려지면서 국제해사기구(IMO)에서는 TBT를 주성분으로 하는 선박용 방오도료의 사용을 2003년부터 금지하기 시작하여 2008년에는 완전히 금지하였다(Naufal and Hassan, 2016).

해양생태계 파괴를 막기 위한 국제 규제 법안이 발효됨에 따라 TBT의 사용이 제한되면서 다시 금속 구리 성분이 방오제에 포함되기 시작하였다. 가장 대표적인 형태로 copper(I) oxide (Cu_2O , cuprous oxide, dicopper oxide)와 copper(II) oxide (CuO , cupric oxide)가 주로 사용되고 있다(Yebra *et al.* 2004). 또한 구리에 대한 내성을 가지고 있는 생물을 제어하고 생물부착방지효과를 높이기 위해 유기 살균촉진제(booster biocides)로서 zinc pyrithione, SeaNine 211, Irgarol 1051, Diuron, dichlofluanid, chlorothalonil, Zineb 화합물 등을 혼합해 사용하였다(Lewis, 2001; Federal Environmental Agency of Germany, 2004). 방오도료에 포함된 활성물질은 해양환경으로 지속적으로 유출될 수 있

으며, 특히 부착생물 수중제거 작업 중에는 부착생물과 더불어 유해화학물질의 해양환경으로 유입이 더욱 가속화될 수 있다. 하지만 현재까지는 수중제거기술 적용에 따른 이들 활성물질의 환경 중 거동이나 해양생태계에 미치는 위해성에 대한 충분한 평가가 없이 부착생물제거를 위해 수중제거기술이 적용되고 있다. 따라서 수중제거작업을 통해 유입되는 활성물질이 해양환경에 미치는 위해성을 정확하게 평가할 수 있는 기술개발이 시급한 실정이다. 본 연구에서는 활성물질의 위해성평가에 필요한 핵심기술인 활성물질 분석기술을 정립하고자 하였으며, 이를 위해 대상 활성물질을 선정하고, 질량분석에 필요한 질량 라이브러리(mass library)를 구축하며, 액체크로마토그래피 분석조건을 최적화하였고, 이를 바탕으로 시범지침서를 작성하였다.

나. 재료 및 방법

주요 대상 살생물제(biocides)의 mass 라이브러리 구축을 위해 액체크로마토그래프 질량분석기를 이용하여 multiple reaction monitoring (MRM) mode로 분석하였다. Sea-Nine 211과 econea는 100 ppm 표준용액을 준비한 후 각각 2 ppm으로 희석하여 사용하였다. Diuron과 Irgarol 1051은 10 ppm 표준용액을 제조하여 사용하였다. Copper pyrrithione (CuPT)과 zinc pyrrithione (ZnPT)은 2 ppm 표준용액을 만들어 사용하였다. 준비된 표준용액을 각각 질량분석기에 주입하여 MRM 분석을 실시하였다.

살생물제의 MRM 분석은 Turbo V ionization source (SCIEX)가 장착된 API 3200 질량분석기(Applied Biosystem, Toronto)를 사용하였다. 이온화를 위해 electrospray ionization (ESI) mode with positive ionization를 사용하였으며, source는 curtain gas, 10 psi; collision gas, 11 psi; ion spray voltage, 5500 V; ion source nebulizer gas, 50 psi; turbo gas, 60 psi; source temperature, 500°C의 조건에서 작동되었다. m/z 50에서 350 범위의 Q1 이온과 각 이온에 상응하는 product ion (Q3)을 모니터링 하였다. ESI source에 표준용액과 이동상 용액을 직접 주입하여 첫 번째 사중극자(Q1)와 세 번째 사중극자(Q3)에서 각각 Q1 이온과 Q3 이온을 검출하였다. Q1 이온 클러스터 중 베이스 이온을 선정한 후 그 이온에 대한 fragmentation 패턴을 스캔하여 기록하였다. 이 중 product 이온(Q3)을 선정한 후 보다 높은 민감도 확보를 위해 MRM 조건을 최적화하였다. 이로부터 LC/MS/MS 분석을 위해 각 화합물에 대해 가장 특징적인 Q1/Q3 이온 조합을 추출하였다.

대상 살생물제의 분리, 분석 기법 정립을 위해 Agilent 1200 고성능 액체크로마토그래프(Agilent Technologies Inc., Germany)에 Turbo V ionization source (SCIEX)가 장착된 API 3200 질량분석기(Applied Biosystem, Toronto)를 연계하여 사용하였다. 이온화를

위해 electrospray ionization (ESI) mode with positive ionization를 사용하였다. 각 표준 용액 10 μ L를 주입하였으며, 이동상(A: water with trifluoroacetic acid; B: methanol with 0.1% formic acid and 2 mM ammonium acetate)의 flow rate는 0.5 mL/min으로 유지하였다. 이동상 B는 시료 주입 전 5분간 30%를 유지하였으며, 시료 주입 후부터 2분 동안 95%로 증가시킨 후 이후 분석 종료 시까지 같은 비율을 유지하였다. 각 화합물의 분리를 위해 역상의 C18 컬럼(Betasil C18, 5- μ m particle size, 50 \times 2.0 mm ID; Thermo Scientific)을 사용하였다. ESI source는 curtain gas, 10 psi; collision gas, 11 psi; ion spray voltage, 5500 V; ion source nebulizer gas, 50 psi; turbo gas, 60 psi; source temperature, 500°C의 조건에서 작동되었다. 각 화합물의 검출을 위해 다음의 Q1/Q3 이온을 모니터링 하였다. Diuron, m/z = 233+72; Irgarol 1051, m/z = 254+198; Sea-Nine 211, m/z = 282+169; Cu pyriithione, m/z = 315+251; Zn pyriithione, m/z = 317+78; Econeal, m/z= 349+81.

다. 결과 및 토의

(1) 국제규제에 기반한 대상 활성물질 선정

수중제거기술 위해성 평가에 필요한 대상 활성물질을 선정하고, 국제적인 활성물질 사용 동향을 파악하기 위해 관련 문헌 검색을 실시하였다. 2000년대 들어서 antifouling 관련 논문의 발표가 급격히 증가하였으나 AFS 협약 채택 및 발효 후 유기주석화합물(Organotins) 관련 논문은 감소 추세에 있다. 반면 TBT를 대체하는 alternative biocides 관련 논문은 2000년대 후반부터 증가하기 시작하였다(Fig. 3.1.1.1).

Alternative biocides로서 copper oxide, copper pyriithione, zinc pyriithione, chlorothalonil, CuSCN, DCOIT, Dichlofluanid, Diuron(DCMU), Irgarol, Maneb, TCMS pyridine, TCMTB, Thiram, TPBP, Tolyfluanid, Zineb, Ziram 등이 주로 사용되어 왔다. 하지만 높은 독성과 지속성을 보이는 유기주석화합물을 대체하기 위해 사용된 일부 방오 대체제(alternative biocides)에서조차 높은 독성과 지속성이 문제가 되어 추가로 규제되기 시작하였으며, 현재는 유럽연합의 살생물질규제(BPR)에 10개 화합물이 방오도료에 사용 가능한 것으로 등록되어 있다(Fig. 3.1.1.2).

본 연구에서는, BPR 등록 활성물질 중 가장 활발히 사용되고 있는 copper pyriithione(CuPT)과 zinc pyriithione(ZnPT), 그리고 과거에 많이 사용되어 현재까지 해양 환경 중에 상당히 잔존하는 것으로 알려져 있는 Diuron, Irgarol, DCOIT(Sea-Nine)을 대상 유기활성물질로 선정하였다. 또한 방오도료에 가장 핵심적으로 사용되는 무기 금속 활성물질인 구리와 아연을 대상물질에 포함하였다.

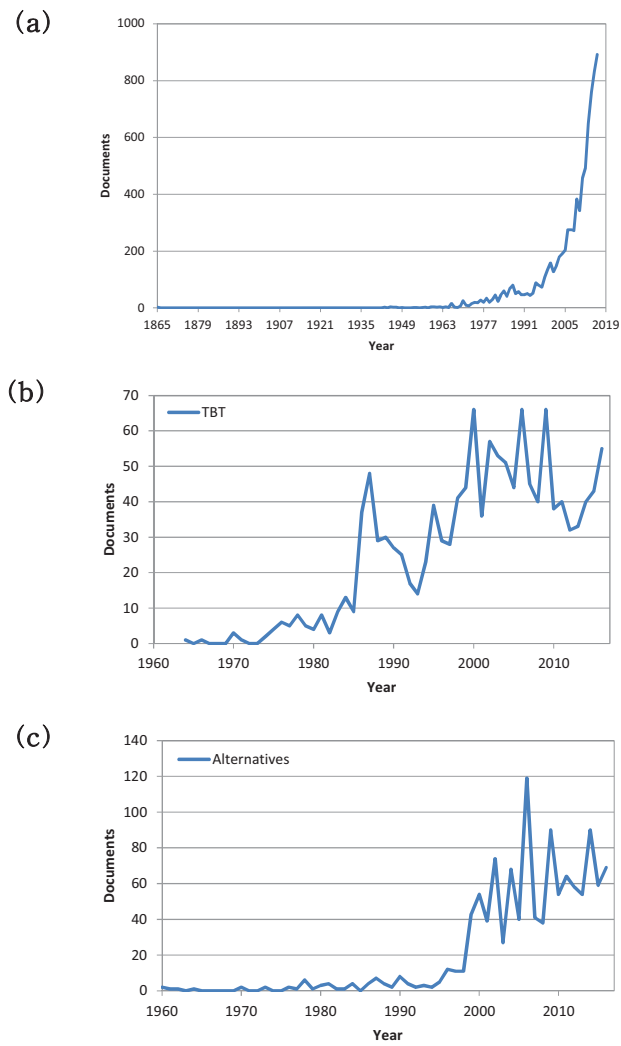


Fig. 3.1.1.1. Publication trends on (a) antifouling, (b) organotin compounds, and (c) alternative biocides.

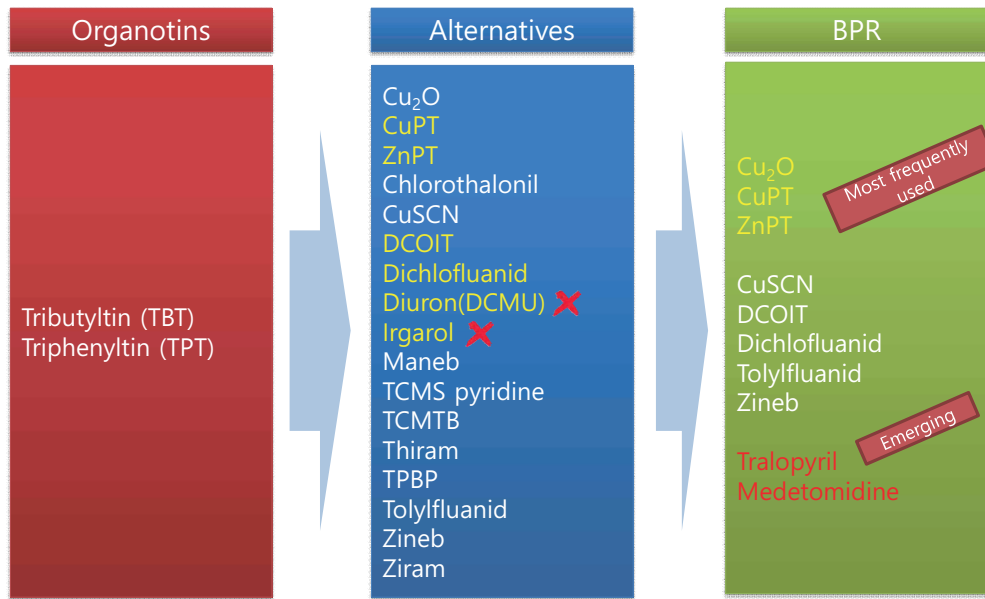


Fig. 3.1.1.2. Trend of active substances being used in antifouling paints.

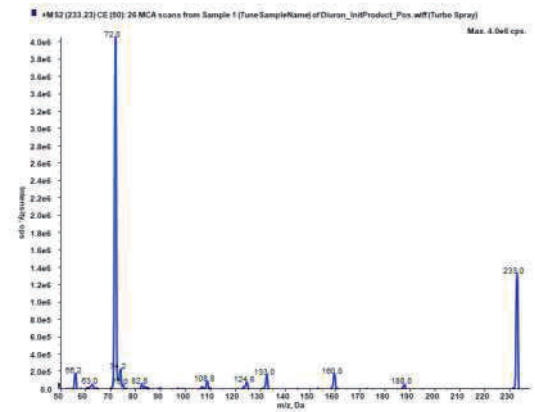
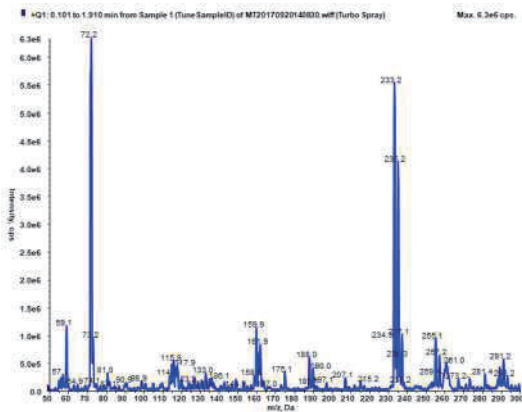
(2) 주요 대상 살생물제(biocides)에 대한 mass 라이브러리 구축

액체크로마토그래프 질량분석기를 이용하여 살생물제를 분석하기 위해서는 각 화합물의 mass 라이브러리를 구축하고 해당 이온을 최고 감도로 분석할 수 있도록 질량분석기 최적화 상수를 산출하는 것이 필요하다.

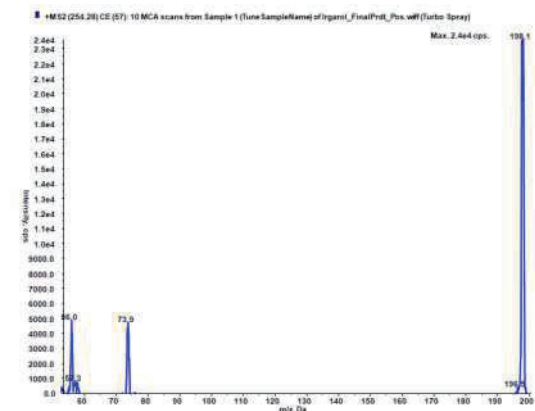
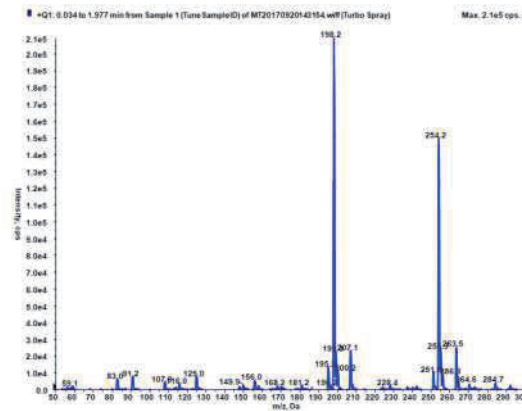
Multiple reaction monitoring (MRM) 방식으로 Q1과 Q3 스캔을 통해 분자이온 (parent ion)과 조각이온(fragment ion)의 질량스펙트럼을 파악하였다(Fig. 3.1.1.3-4). 또한 질량분석조건 최적화를 위해 Declustering Potential(DP), Entrance Potential(EP), Collision Energy Potential(CEP), Collision Energy(CE), Collision Cell Exit Potential(CXP)을 각각의 화합물에 대해 결정하였다(Table 3.1.1.1).

Q1 spectrum

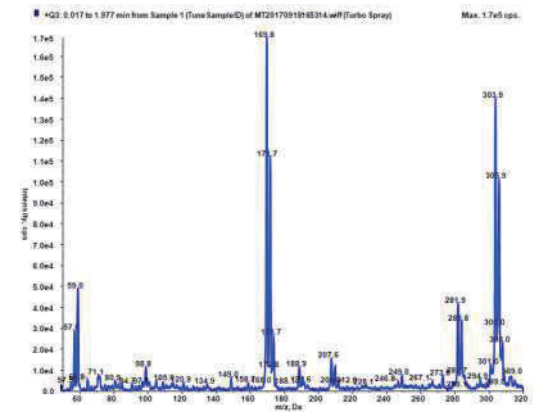
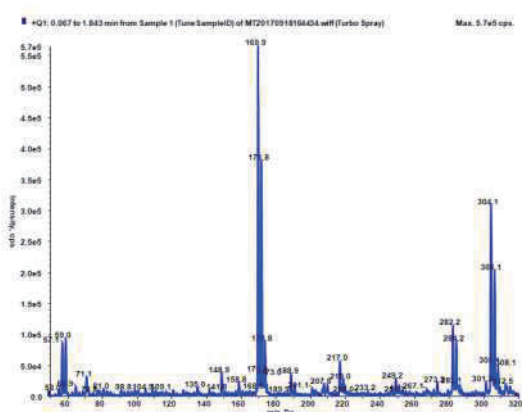
Q3 spectrum



Diuron



Irgarol

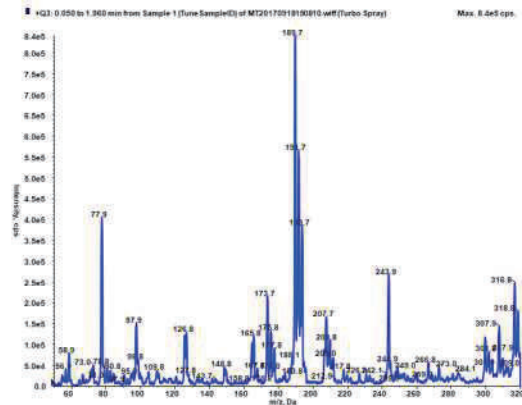
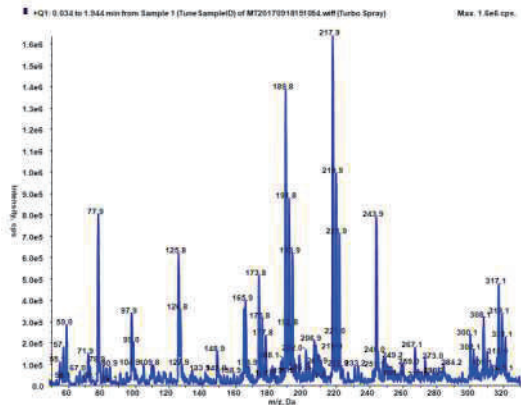


DCOIT(Sea-Nine)

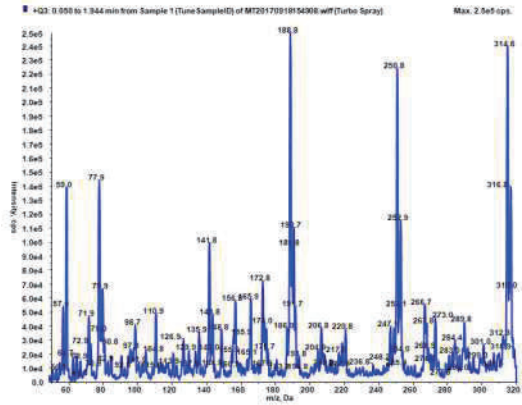
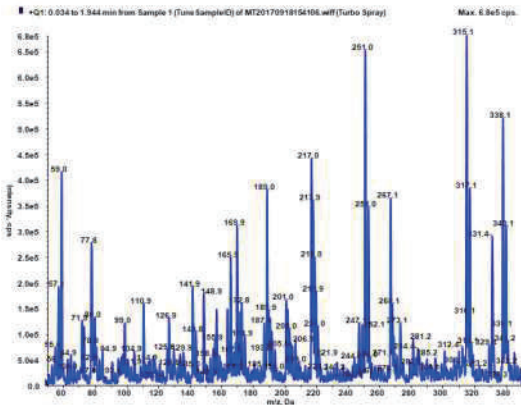
Fig. 3.1.1.3. Q1 and Q3 mass spectrum of Diuron, Irgarol, and Sea-Nine.

Q1 spectrum

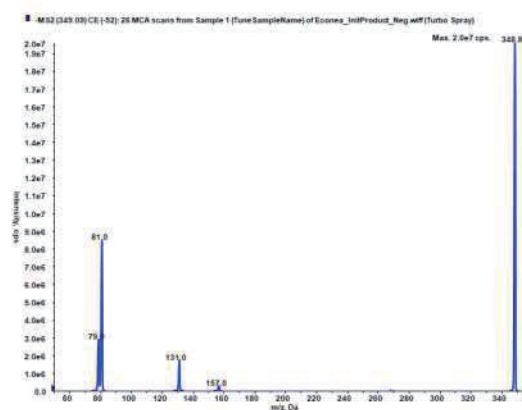
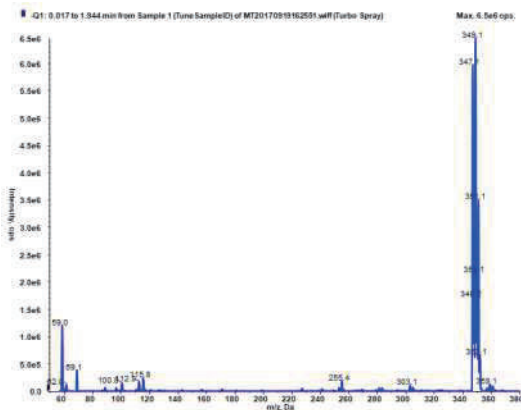
Q3 spectrum



Zinc pyrrhione



Copper pyrrhione



Tralopyril(Econea)

Fig. 3.1.1.4. Q1 and Q3 mass spectrum of ZnPT, CuPT, and tralopyril.

Table 3.1.1.1. Selected Q1 and Q3 ions and their optimized analysis conditions.

Compound	Q1	Q3	DP (volts)	EP (volts)	CEP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Diuron	233.228	72.1	46	8	14	35	6
	233.228	56	46	8	14	65	4
	233.228	74	46	8	14	105	6
Irgarol	254.283	198.1	31	10	12	31	22
	254.283	56	31	10	12	57	6
	254.283	73.9	31	10	12	57	6
DCOIT	282	169	29.51	5.73	20.72	23.35	16.45
ZnPT	317	78	31	7	20.3	74.4	1.2
	219.2	177	46	6.5	14.2	77	6
	217.9	78	67	6.5	14.2	46.8	6
	189.8	78	65	6.5	9.6	38.9	6
CuPT	315.29	251	96	8.5	9.80	21	8
	315	251	96	8.5	9.80	21	8
	251	77.9	44.47	10.58	9.79	48.75	5.96
	217	77.9	64.24	2.79	9.88	39.10	9.52
	189	77.9	77.87	5.68	24.69	48.82	7.47
Tralopyril	349.086	80.8	-90	-10	-14	-94	0
	349.086	131.0	-90	-10	-14	-54	-4
	349.086	78.8	-90	-10	-14	-54	0

(3) 추출 기법 정립

시료 내에 존재하는 활성물질의 농도를 정확히 분석하기 위해서는 앞서 언급된 질량 라이브러리구축과 질량분석최적화 조건 산정 외에도 시료 내에 존재하는 활성물질을 효율적으로 추출할 수 있는 추출기법을 정립해야 한다. 앞서 선정된 활성물질을 대상으로 최상의 회수율을 나타내는 추출기법을 정립하기 위하여 다양한 전처리 및 추출, 농축절차를 조합하여 추출효율 확인실험을 시행하였다(Fig. 3.1.1.5).

고압세척배출수 내에는 고농도의 유·무기 입자가 다량으로 존재하기 때문에(Fig. 3.1.1.5) 기존에 일반적으로 활용되는 액-액추출법으로는 대상화합물의 효율적인 추출이 어려울 것으로 보인다. 실제 고압세척배출수를 dichloromethane으로 직접 추출하였을 때, 시료 내의 높은 유기물 농도 때문에 많은 양의 에멀전이 형성되고, 이로 인해 시료와 유기용매간 뚜렷한 구분이 어려워 추출효율이 떨어지게 된다. 따라서 시료 내에 유기입자 제거가 중요하며, 이를 위해 원심분리와 여과기법을 병행 적용하였다. 1차적으로 입자가 걸러진 시료는 0.45 μm 필터를 통과한 시료와 통과시키지 않은 시료를 구분하여 액-액추출을 시행하였다. 추출된 유기용매는 에멀전의 존재 유무에 따라 초음파처리 유무를 결정하였다. 이와 같이 다양한 전처리 및 추출기법을 통해 얻어진 추출물에 대해 LC-MS 분석을 통하여 추출 효율을 확인한 후, 원심분리와 필터를 통해 입자가 제거된 시료를 다이

클로로메탄을 이용하여 액-액 추출하고 질소농축기를 이용하여 농축한 후 메탄올로 용매를 치환하여 다시 농축하는 전처리기법을 정립하였다.

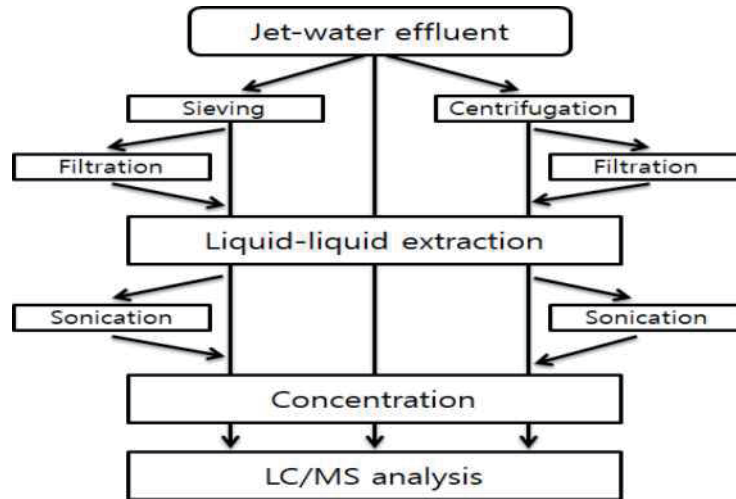


Fig. 3.1.1.5. Highly turbid hull cleaning wastewater (left) and schematic diagram for the establishment of pre-treatment and extraction method for the analysis of active substances (right).

(4) 대상 활성물질의 액체크로마토그래피 분리 조건 정립

대상 활성물질의 질량스펙트럼을 바탕으로 정량분석을 위한 Q1과 Q3 이온을 확정하고, 최적화된 질량분석 조건 하에서 대상 활성물질 혼합물의 액체크로마토그래피 상 분리능을 확인하기 위하여, 다양한 액체크로마토그래피 조건하에서 활성물질 주입 시험을 실시하여 최적의 액체크로마토그래피 질량분석 조건을 정립하였다(Table 3.1.1.2).

Diuron, Irgarol, Sea-Nine, ZnPT, CuPT는 positive ionization 방법으로 검출하였으며, tralopyril은 negative ionization 방법으로 이온화하여 각 화합물을 검출하였다. Q1, Q3 이온 크로마토그램 상 모든 화합물은 뚜렷이 구분되었으나, ZnPT는 표준혼합물 주입 시 반응강도가 낮아지므로 반응강도 향상을 위한 추가적인 최적화 조치가 필요한 것으로 판단된다(Fig. 3.1.1.6).

Table 3.1.1.2. Liquid chromatographic separation and analysis conditions for target analytes.

Mass spectrometry conditions							
Compound	Q1	Q3	DP (volts)	EP (volts)	CEP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
DCMU ¹	233.228	72.1	46	8	21.1	35	6
Triazine 화합물 ²	254.283	198.1	31	10	21.8	31	22
DCOIT ³	282.1	169.1	29.5	5.7	22.7	23.4	16.5
Zinc pyrethione	317.3	78.1	46	6.5	16	77	6
Copper pyrethione	315.29	251	96	8.5	16	21	8
Tralopyril	349.086	80.8	-90	-10	-14	-94	0

Source parameters

(Diuron, Irgarol, DCOIT, ZnPT, CuPT)		(Tralopyril)	
Mode	Electrospray Ionization (ESI)	Mode	Electrospray Ionization (ESI)
Ionization	Positive Ionization	Ionization	Negative Ionization
Curtain Gas (CUR)	20 psi	Collision Gas	11 psi
IonSpray Voltage (IS)	5500 volt	Curtain Gas (CUR)	10 psi
Source Temperature (TEM)	500°C	IonSpray Voltage (IS)	-4500 volt
Ion Source Nebulizer Gas (GS1)	50 psi	Temperature (TEM)	450°C
Ion Source Turbo Gas (GS2)	60 psi	Ion Source Nebulizer Gas (GS1)	12 psi
Interface Heater (ihe)	ON	Ion Source Turbo Gas (GS2)	0 psi
		Interface Heater (ihe)	ON

LC conditions

(Diuron, Irgarol, DCOIT, ZnPT, CuPT)				(Tralopyril)			
Column: betasil, C18 50×2.0 mm, 5 μm				Column: betasil, C18 50×2.0 mm, 5 μm			
Column temperature: room temperature				Column temperature: room temperature			
Injection volume: 10 μL				Injection volume: 10 μL			
LC flow:				LC flow:			
total time	flow rate (μL/min)	A	B	total time	flow rate (μL/min)	A	D
5	500	70	30	5	200	100	0
2	500	5	95	15	200	0	100
8	500	5	95	20	200	0	100
8.1	500	70	30	20.10	200	100	0
A	Water (0.1% trifluoro acetic acid)			A	Water (0.1% trifluoro acetic acid)		
B	MeOH (0.1% formic acid + 2mM Ammonium acetate)			B	MeOH (0.1% formic acid + 2mM Ammonium acetate)		

¹DCMU: 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; Diuron

²Triazine 화합물: 2-methylthio-4-tert-butylamine-6-cyclopropylamine-s-triazine; Irgarol

³DCOIT: 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one; Sea-Nine

*DP: declustering potential, EP: entrance potential, CEP: Cell entrance potential, CE: Collision energy, CXP: collision cell exit potential

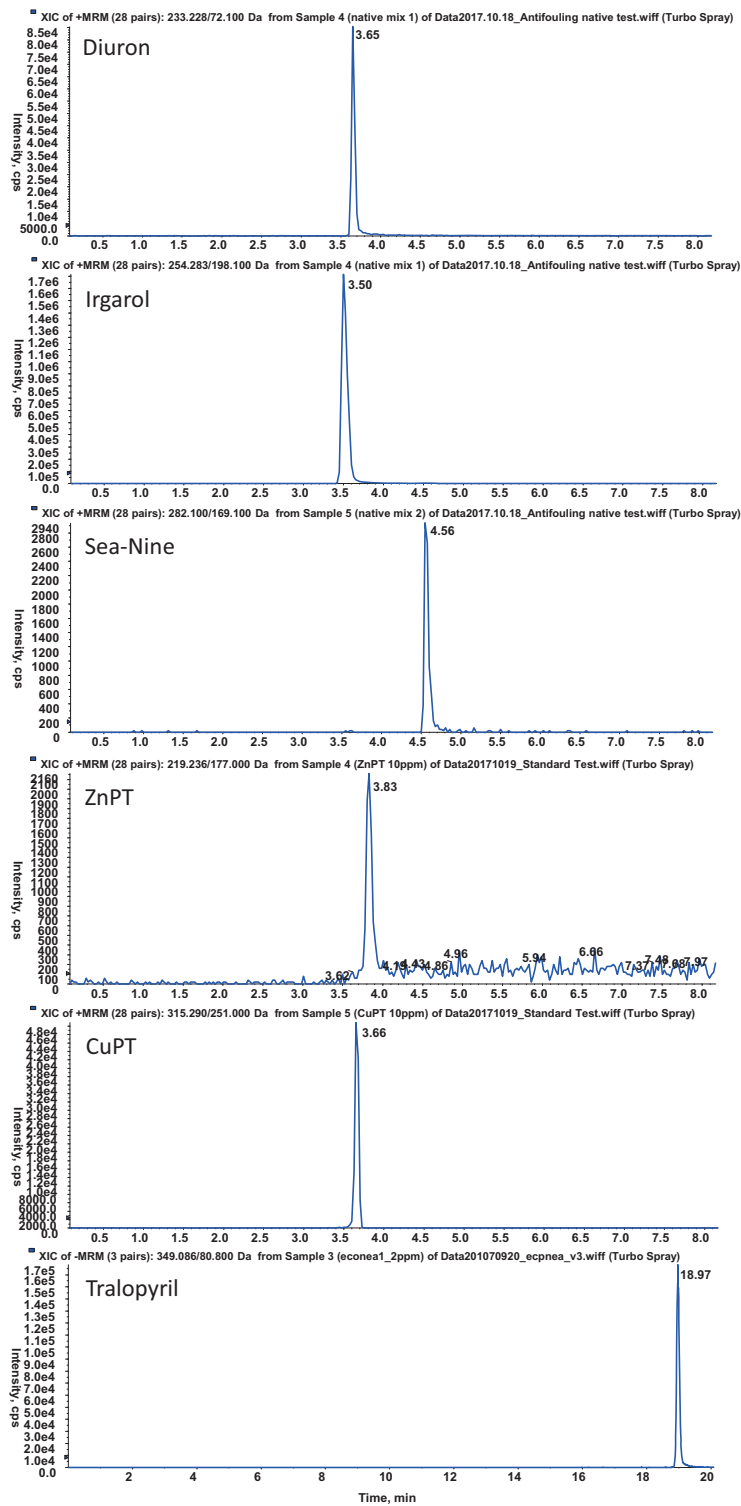


Fig. 3.1.1.6. Q1/Q3 ion chromatogram of the target analytes.

(5) AFS 활성물질 분석 공정시험기준안 도출 및 지침서 작성

국내외에서 발간된 환경분석 관련 지침서를 검토하고, 전처리 및 분석기법 개발 결과, 부착생물 제거 현장 및 모사시험 분석 수행 자료를 바탕으로 활성물질 분석 표준화를 위한 공정시험기준안을 도출하였으며 이를 이용하여 시범 지침서를 작성하였다. 본 지침서는, 선박의 방오도로 또는 선체에 부착된 오손생물을 육상 또는 수중에서 제거할 때 발생하는 복합파생물 또는 세척폐수 내 잔존하는 활성물질을 분석함에 있어서 측정결과의 정확도 및 정밀도를 높이고 분석방법의 일관성을 유지하기 위하여 관련 시료의 채취 및 분석에 필요한 가이드라인을 제시하는데 그 목적을 두고 작성하였다. 특히 국제해사기구의 가이드라인(Revised guidance on best management practices for removal of anti-fouling coatings from ships, including TBT hull paints (AFS.3/Circ.3/Rev.1 13 June 2016))에서 제시하는 기본 원칙을 준용하였고, 환경부의 수질오염공정시험기준(국립환경과학원고시 제2017-57호, 2017.12.22. 일부개정)과 토양오염공정시험기준(국립환경과학원고시 제2017-22호, 2017.08.11. 제정), 그리고 해양수산부의 해양환경공정시험기준(해양수산부고시 제2013-230호, 2013.10.8. 일부개정)을 참고하여 작성하였다.



Fig. 3.1.1.7. Cover and content pages of the guideline for the analysis of active substances in the wastes from hull cleaning.

선체 청소 시 발생하는 고농도의 복합과생물 분석을 위한 시료 채취 및 전처리, 분석 방법 및 절차 등에 대해 설명하였으며, 크게 서론, 시료채취 시 고려사항, 시료 채취 및 보존 방법, 전처리 방법, 정도보증 및 관리, 시료의 분석 부분으로 구성되었고, 시료 분석에 대한 자세한 내용을 담은 부속서 1, 2, 3을 포함하였다(Fig. 3.1.1.7).

Table 3.1.1.3. List of alternative biocides approved or registered in Europe, Japan, and New Zealand.

Alternative Biocide	유럽연합 ¹	일본 ²	뉴질랜드 ³
Chlorothalonil		+	-
Copper flakes	+		
Copper pyrithione	+	+	+
Copper thiocyanate	+	+	+
Copper (I) oxide	+	+	+
Densil S-100 (TCMS pyridine)		+	
Dichlofluanid	+		+
Diuron		+	-
Irgarol 1051	-	+	-
Mancozeb			+
Medetomidine	+		
Octhilinone			-
Pyridine-triphenylborane		+	
Sea-Nine 211 (DCOIT)	+	+	+
Thiram			+ ⁴
Tolyfluanid	+	+	+
Tralopyril	+	+	
Zinc pyrithione	+ ⁵	+	+
Zineb	+	+	+
Ziram		+	-

¹ Authorized by the Biocidal Products Regulation (European Chemical Agency), as of 08 June 2018.

² Registered under the Japan Paint Manufacturers Association (JPMA), as of 20 March 2018.

³ Approved under the Hazardous Substances and New Organisms Act (2013 reassessment).

⁴ Import or manufacture will be banned from June 2023 onward.

⁵ Under review for approval.

+ Agents approved or registered.

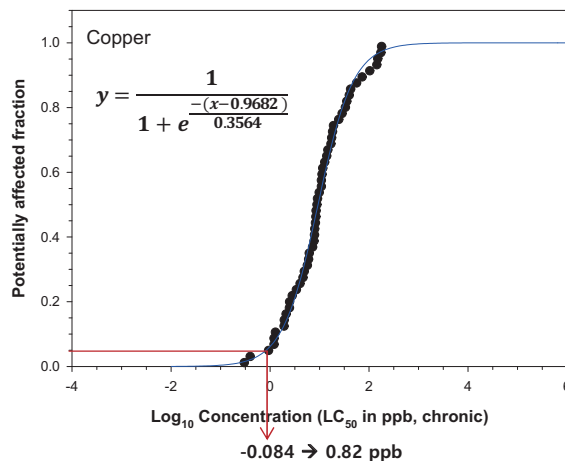
- Agents not approved.

(6) 국내외 관련 환경기준 검토 및 독성자료 기반 위해농도 수준 도출

향후 다양한 수중제거기술에 의해 배출되는 활성물질의 위해성평가 및 관리방안 도출을 위해 국내외 관련 환경기준 및 가이드라인을 수집하였다. 국가별로 다양한 규제 및 등록 제도를 운영하고 있으며 대표적인 방오도료 내 살생물질 관련 규제로 유럽연합의 Biocidal Products Regulation (2018.06.08. 기준), 일본의 Japan Paint Manufacturers

Association (2018.03.20.) 리스트, 뉴질랜드의 Hazardous Substances and New Organisms Act (2013 reassessment) 허용물질을 대상으로 비교 파악하였다(Table 3.1.1.3). 또한 방오도료에는 유기살생물질 외에도 다양한 종류의 중금속류가 포함되기 때문에 수중제거 및 육상 선박 청소 과정을 통해 다양한 종류의 중금속이 해양환경으로 배출될 수 있다. 이렇게 배출되는 세척폐수 내 중금속을 관리하기 위해 국내외 중금속 관련 다양한 가이드라인을 참고하였다(Table 3.1.1.4).

환경 및 배출 가이드라인이 현재까지 설정되지 않은 유기계 활성물질과 주요 중금속류 활성물질을 포함하여 독성 자료 기반 위해농도수준을 산출하였다. 산출된 위해농도수준은 향후 수중제거 작업에 따라 배출된 활성물질의 환경 내 예측농도와 비교를 통하여, 수중제거기술의 위해성평가 수행을 위해 필요하다. 독성평가 자료는 미국 EPA의 ECOTOX 데이터베이스에서 획득하였으며, 독성자료의 질 검정 후 각 항목별 최소 10개에서 최대 59개 종에 대한 급성 반수치사농도(LC₅₀)를 만성 LC₅₀로 전환(ACR=25)하여 분석에 사용하였다. 최대 민감종부터 최대 둔감종까지의 만성 LC₅₀값의 누적확률분포를 통해 구해진 종민감도 분포(species sensitivity distribution; SSD)로부터 5% 잠재영향농도(HC₅)를 시그모이드 곡선식을 이용하여 산출하였다(Fig. 3.1.1.8). 산출된 HC₅에 평가계수(assessment factor 1~5)를 적용하여 각 물질에 대한 예측무영향농도(predicted no effect concentration; PNEC)를 산출하였다.



화학물질	PNEC (ppb)
CuPT	0.054
ZnPT	0.074
DCMU	31
Irgarol	20
Cr	10
Ni	1.2
Cu	0.82
Zn	5.0
Cd	0.22

Fig. 3.1.1.8. Species sensitivity distribution (SSD) to calculate 5% hazardous concentration (HC₅) and predicted no effect concentration (PNEC) calculated from the HC₅.

Table 3.1.1.4. Guidelines to regulate metal contamination in the environment.

가이드라인	(ppb)												
	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Ba	Pb	
USEPA Freshwater Guidelines	16	-	-	-	470	13	120	340	-	2	-	65	
USEPA Saltwater Guidelines	1100	-	-	-	74	4.8	90	69	290	40	-	210	
WHO Drinking Water Guidelines	50	-	-	-	70	2000	-	10	40	3	700	10	
Korean Discharge Guidelines	2000	10000	10000	-	3000	3000	5000	250	1000	100	10000	500	
Korean Seawater Guidelines (Short Term)	200	-	-	-	11	3	34	-	-	19	-	7.6	
Korean Seawater Guidelines (Long Term)	2.8	-	-	-	1.8	1.2	11	-	-	2.2	-	1.2	
The EP Act 2002 - Effluent Discharge Standards, Mauritius	50	200	2000	50	100	500	2000	100	20	10	-	50	
Wastewater Discharge Standard, China	1500	-	-	-	1000	-	-	500	-	100	-	1000	
Food and Agriculture Organization Guidelines, Eastern Mediterranean	100	200	5000	50	200	200	2000	100	20	100	-	5000	
Wastewater Discharge Standard, Jordan	20	200	5000	50	200	200	5000	50	50	10	-	200	
Treated Wastewater for Reuse Guidelines, Kuwait	150	200	5000	200	200	200	2000	100	-	10	2000	500	
Regulations for wastewater reuse and discharge, Oman	50	100	1000	50	100	50	5000	100	20	10	1000	100	
Reclaimed water standards, Saudi Arabia	100	200	2000	50	200	400	2000	100	20	10	1000	100	
Tunisian Standards	100	-	500	100	200	500	500	100	50	10	-	1000	
Wastewater Guidelines, US Public Health and Safety Organization	200	-	-	50	200	1000	5000	50	-	1000	-	100	

2. 선박부착 및 수중제거 모사시험 파생물 시험적용

가. 서론

다양한 살균촉진 처리활성물질에 대한 분석법 구축이 어렵고, 이에 따라 항만 등 다양한 해양환경에서 실시된 모니터링 결과가 부족하며, 처리활성물질의 환경 내 거동과 독성에 대한 정보가 부족하기 때문에, 현재로서는 선박부착생물 제어기술에 사용되는 살균촉진제의 정확한 위해성 평가가 어려운 실정이다. 또한 부착생물 수중제거기술 적용 시 발생하는 유출수와 배출물질 내에 포함될 수 있는 다양한 활성물질의 위해성에 대한 개념조차 제대로 정립되어 있지 않아 부착생물 제거 시 발생하는 배출물은 그대로 해양환경으로 유입되어 해양생태계를 위협할 수 있는 잠재성을 가지고 있다. 이러한 기술적 취약성을 극복하기 위해서는 우선적으로 환경시료 내에 잔류하는 다양한 처리활성물질의 분

석기술의 정립이 시급하다. 이를 바탕으로 주요 해역에서의 처리활성물질 분포 특성 파악 및 수중제거기술 처리활성물질 유출평가기법 정립이 가능하다.

본 연구에서는 본격적인 부착생물 수중제거에 따른 활성물질 분석 및 유출평가에 앞서, 다양한 방식의 부착생물 제거 과정 중 발생하는 부착과생물 내 활성물질의 잔존 특성을 파악하고자 하였다. 이를 통해 활성물질 분석기술 개발을 지원 및 보완하고 향후 수중제거 관리기반을 구축하는 데 필요한 기초 자료를 축적할 수 있다.

나. 재료 및 방법

고압세척배출수 내 중금속 농도 측정은 용존상과 입자상으로 분리하여 실시하였다. 용존상 분석을 위하여 시료를 원심분리하여 상등액을 취한 후 1.2 μm pore size로 1차 여과한 후 다시 0.45 μm pore size로 2차 여과하였다. 약 10 g의 시료를 테플론 용기에 넣고 110°C에서 가열한 후, 용액이 증발된 용기에 질산(HNO_3 , EP grade) 용액 5 mL 첨가하고 뚜껑을 닫은 후 가열하여 반응시켰다. 반응이 끝나면 냉각 후 개봉하여 증류수를 첨가하고 가열하여 질산을 증발시켰다. 잔류 시료는 최종 1% 질산으로 일정량 무게를 맞춘 후 ICP/MS를 이용하여 분석하였다.

입자상 분석을 위해 고압세척배출수를 원심분리하여 상등액을 제거 한 후 침전물을 분리하였다. 침전물을 동결건조하여 수분을 제거하였다. 동결건조된 시료를 막자사발에서 곱게 분말로 만든 후, 분말 0.1 g을 테플론 용기에 담았다. 질산(HNO_3)과 불산(HF) 각각 3 mL씩을 첨가한 후 뚜껑을 닫고 가열하여 반응시켰다. 반응 후 냉각시키고 개봉하여 증류수를 첨가하면서 질산과 불산을 증발 시켰다. 잔류 시료는 유리 비이커에 옮긴 후 질산과 황산을 1:3(v:v) 비율로 4 mL를 첨가하였다. 시계접시를 덮고 가열하여 충분히 반응시킨 후 시계접시를 제거하고 산을 증발시켰다. 잔류물은 증류수로 용해시킨 후 일정량 무게를 맞추고 ICP/MS를 이용하여 분석하였다.

해조류 시료는 증류수로 충분히 세척하여 해수와 불순물을 제거 한 후 동결건조시켰다. 동결 건조 후 막자사발에서 곱게 분말로 만든 후, 분말 시료 약 0.2 g을 테플론 전처리 용기에 넣고, 질산 5 mL를 첨가하고 개봉상태로 상온에서 반응시켰다. 이후 개봉상태에서 갈색연기가 없어질 때까지 가열하여 반응시켰다. 질산이 증발되면 다시 질산과 과산화수소 2:1(v:v) 비율의 5 mL를 첨가하고 뚜껑을 닫고 가열하여 반응시켰다. 반응 후 개봉하여 증류수를 첨가하며 질산과 과산화수소를 2회 이상 증발시켰다. 증류수로 일정량 무게를 맞춘 후 ICP/MS를 이용하여 분석하였다.

조선소 바닥에서 획득한 페인트 칩은 불순물 제거를 위해 증류수로 세척하여 건조시킨 후 ball grinder를 이용하여 분말화 하였다. 이 때 시료의 균질성을 보장하기 위하여

충분한 개수와 양의 칩을 분말화 하였다. 분말화된 시료는 고압세척배출수 칩전물 시료 전처리 과정과 동일한 과정을 거친 후 ICP/MS를 활용하여 분석하였다.

퇴적물 시료는 시료 중의 페인트 칩과 불순물 등을 육안으로 제거하고 동결건조 시켰다. EPA method 3050B 방법에 따라 USS #10 sieve를 사용하여 걸러내었다. 시료 1 g을 conical 비이커에 담은 후 50%(v/v) 질산 10 mL를 첨가하였다. 시계접시를 덮고 $95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 10-15분 동안 가열하였다. 식힌 후 질산 5 mL를 추가하고 시계접시를 다시 덮은 후 30분 간 reflux 시켰다. 갈색연기가 없어질 때까지 반복 하였다. Watch glass를 덮고 가열하여 부피가 5 mL이 될 때까지 가열하였다. 충분히 식힌 후, 증류수로 100 mL를 만든 후 ICP/MS를 이용하여 분석하였다.

해수 시료 분석을 위해 Ag 카트리지(Dionex OnGuard II Ag)를 증류수 20 mL를 통과시켜 세척하였다. 증류수로 카트리지를 활성화시키고 마지막에 통과한 증류수를 바탕액으로 사용하였다. 해수 시료 1 mL를 통과시켜 해수 내 염소이온을 제거한 후 ICP/MS를 이용하여 분석하였다.

Table 3.1.2.1. Analytical conditions for ICP/MS.

RF Generator Power	1550W
Argon Gas Flow Rates	
Plasma Gas	15 L/min
Carrier Gas	0.82 L/min
Makeup Gas	0.32 L/min
Spray Chamber Temp.	2°C
Sample Depth	8.0 mm
Omega Lens	11.0 V
Octopole bias	-17 V
Energy Discrimination	5.0 V
Analysis Mode	No gas and KED
Replicates	3

전처리된 시료 내 금속 농도는 Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometer (ICP-MS, Agilent 7700, USA)를 이용하여 분석하였다. ICP-MS의 운용조건은 Table 3.1.2.1에 제시하였다. ICP-MS에 1% 질산용액을 약 30분간 흘려주어 기기를 안정화시키고 시료도입부분을 세척한 후, 기기의 분석 최적화를 확인하기 위하여 tuning solution(Li, Co, Y, Ce, Tl 각 1 ppb in 1% 질산용액)을 사용하여 performance를 확인하였다. 분석 검정선을 구하기 위하여 각 원소의 표준물질을 농도별로 측정된 후 correlation

coefficient(R) 값이 99.999이상의 검정선을 작성하였다. 전처리된 시료를 주입하여 각 원소의 세기(CPS, count per second)를 측정 후 측정된 세기를 검정선을 이용하여 농도로 변환시킨다. 이 때 희석하여 측정된 시료는 희석배율 등을 곱하여 최종 농도로 환산하여 사용하였다. 분석이 완료된 후 시료관에 1% 질산을 20분간 주입하여 시료도입부분을 세척하고 다시 증류수를 흘려주고 약 30분 동안 세척하였다.

다. 결과 및 토의

(1) 선박부착과생물 채취 및 활성물질 분석

향후 부착생물 수중제거 작업 시 발생하는 과생물 내 활성물질 잔존평가와 유출평가에 대비한 시험적용을 위하여 다양한 방식에 의해 제거되는 선박부착 과생물을 획득하여 과생물 내 활성물질 잔존특성을 파악하였다. 선박은 크게 Global급, Ocean급, Coastal급, Local급으로 구분하여, 연구원에서 운영하고 있는 연구선인 이사부호(Global급), 온누리호(Ocean급), 이어도호(Coastal급), 장목1호(Local급), 장목2호(Local급)의 정기적인 상가수리 기간 동안 각 선박 선체에 부착되어 있는 해조류 등의 부착물을 채취하였다. 부착물은 고압세척, 긁어내기, 문지르기 등의 방식으로 채취하였고(Fig. 3.1.2.1), 선체청소가 시행되는 수리조선소 주변의 해수, 퇴적물, 페인트파편 시료도 함께 채취하였다.



Fig. 3.1.2.1. Hull cleaning with jet water spraying (left) and by scrapping (right).

획득된 시료는 구체적으로, 고압세척배출수, 배출수 내 침전물, 부착해조류, 선체표면 slime, 해수, 퇴적물, 페인트파편을 포함하였다. 각 시료에 대해 중금속 분포 특성을 파악하고, 고압세척배출수 내 유기성 살생물제 성분을 예비적으로 분석하였으며, 부착생물 제거 과정 중 해양으로 직접 배출되는 고압세척배출수 및 주변 해수 내 부유물질 함량과 부유입자의 크기별 분포 특성을 파악하였다(Fig. 3.1.2.2).

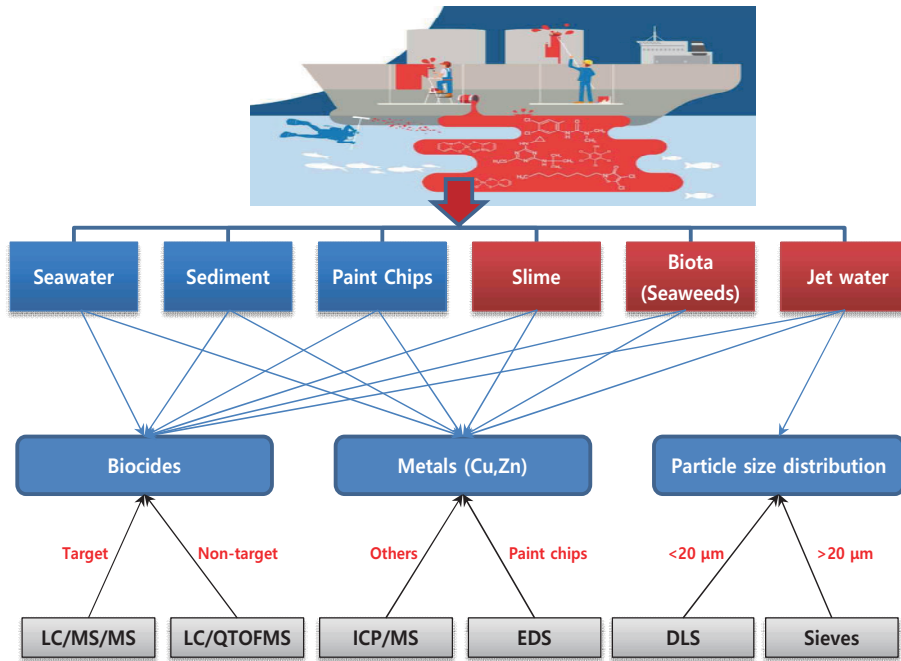


Fig. 3.1.2.2. Schematic diagram for sampling and analysis of waste from ship's hull cleaning.

(2) 선박부착과생물 내 활성물질 잔존 특성

방오도료에는 다양한 종류의 유기계 살생물질이 첨가되기도 한다. 따라서 부착생물을 제거하기 위해 고압세척 또는 수중제거 작업을 수행할 경우 발생하는 배출물은 이러한 살생물질에 의해 오염될 수 있다. 채취된 고압세척배출수에서는 zinc pyrithione, copper pyrithione이 모든 배의 세척수에서 검출되었으며, diuron은 장목2호에서만 검출되었다 (Fig. 3.1.2.3). Sea-Nine과 Irgarol은 모든 시료에서 검출되지 않았다.

검출된 zinc pyrithione과 copper pyrithione 농도는 각각 172-260 ppb, 28.8-187 ppb의 범위였다. 이농도 수준의 잠재적인 독성영향을 파악하기 위하여 미국 EPA의 ECOTOX 데이터베이스에 보고된 독성자료와 비교하였다(Fig. 3.1.2.3). 고압세척배출수 내 살생물질 농도는 ECOTOX 데이터베이스에 보고된 전체 독성시험생물종의 약 35 - 61% 생물종에 치사 영향을 미칠 수 있는 농도 수준으로 확인되었다. 이러한 고압세척배출수가 처리과정 없이 그대로 해양환경으로 유입된다면 유입원 근처의 해양환경과 서식생물에 직접적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상된다.

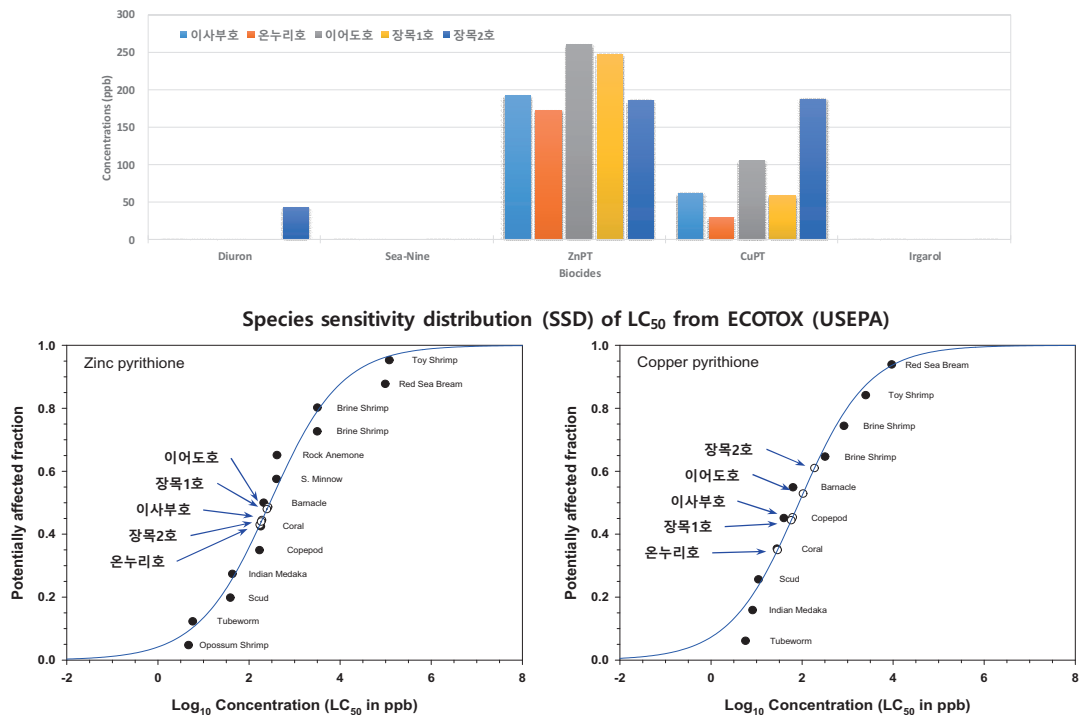
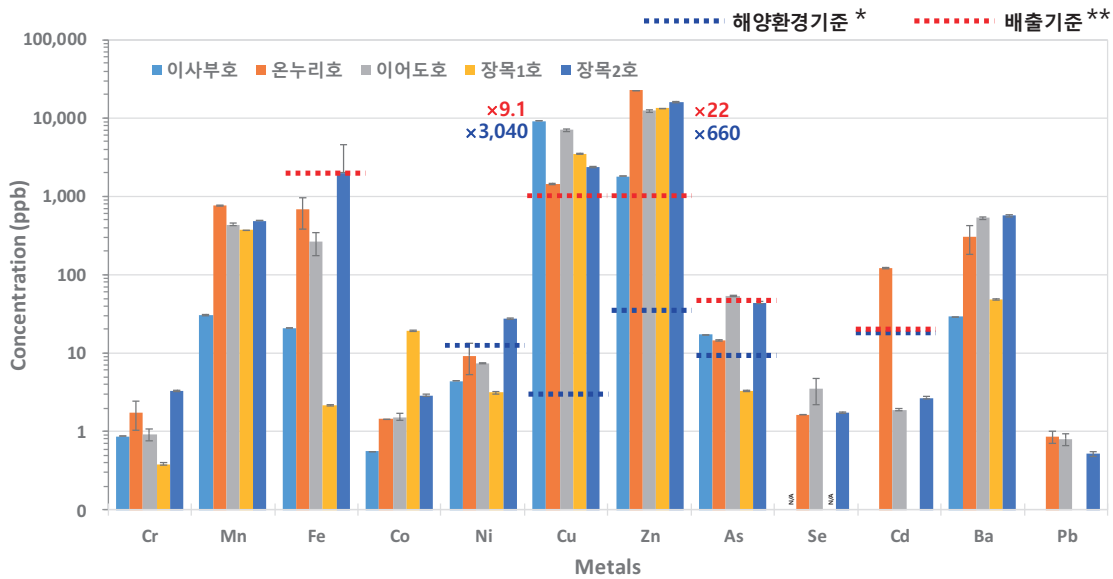


Fig. 3.1.2.3. Distribution of biocides in the wastewater from hull cleaning with high pressure water spray (top) and toxicity levels of zinc pyrrithione and copper pyrrithione in the wastewater compared with species sensitivity distribution constructed using the ECOTOX database (bottom).

고압세척배출수 내에는 다양한 종류의 금속성분도 검출되었으며, 특히 아연, 구리, 철, 망간, 바륨의 순으로 높은 농도로 검출되었다. 아연은 최소 1,800에서 22,600 ppb의 범위로 평균 13,000 ppb의 분포를 보였으며, 구리는 1,440에서 9,110 ppb, 평균 5,060 ppb의 분포를 보였다. 세 종류의 선박에서 모두 유사한 분포특성을 보였으며, 이사부호의 경우 일반적으로 구리가 가장 많이 함유되는 방오페인트 특성을 보였으며 나머지 선박은 아연을 주성분으로 하는 방오페인트가 주로 적용된 것으로 판단된다(Fig. 3.1.2.4). 고압세척배출수 내 용존금속 중 구리 농도는 해양환경기준(해양환경관리법 제8조, Table 3.1.2.2) 대비 최대 3,040배, 배출허용기준(수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 제32조, Table 3.1.2.3) 대비 최대 9.1배를 초과하였다. 한편 고압세척배출수 내 용존 아연 농도는 해양환경기준 대비 최대 660배, 배출허용기준 대비 최대 22배를 초과하였다(Fig. 3.1.2.4). 그 외에도 일부 시료에서 니켈, 비소, 카드뮴 농도가 해양환경기준을 초과하였으며, 비소, 카드뮴, 철 농도도 일부 시료에서 배출허용기준을 초과하였다. 현재 선박부착물 제거 시 발생하는 고압세척배출수는 대부분 아무런 처리과정을 거치지 않고 바다로 그대로 유입되고

있다.



* 해양환경관리법 제8조에 따른 해양환경기준(해양수산부 고시 제2016-207호) ** 수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 제32조제1항에 따른 배출허용기준

Fig. 3.1.2.4. Concentrations of dissolved metals in the wastewater and comparisons with legal criteria.

이와 같이 고압세척배출수 또는 수중제거 파생물이 그대로 해양환경으로 유입된다면 주변 해양환경 및 서식생물에 직접적인 영향을 미칠 수 있을 뿐만 아니라, 주변의 상업활동(어시장 수족관 용수 등)에 직·간접적인 영향을 통해 수산물을 섭취하는 인간에게도 유해한 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 판단된다. 미국환경보호국(EPA)에 따르면, 150년간 구리는 주요 방오도료의 주성분으로 사용되어왔지만 구리가 자연적으로 필요한 수준농도를 초과할 경우, 장기적 영향에 대한 우려가 있는 것으로 알려져 있다. 실제로 측정된 고압세척배출수 내 용존 구리와 아연의 농도를 미국 EPA ECOTOX 데이터베이스에 보고된 독성시험 자료와 비교한 결과 보고된 거의 모든 시험 생물에 치사영향을 미칠 수 있는 수준인 것으로 확인되었다(Fig. 3.1.2.5).

해양환경으로 배출되는 고압세척배출수 내에는 다량의 페인트 침전물이 함유되어 있다. 이 침전물 내에는 철(12-25%), 아연(16-21%), 구리(0.5-5%) 등의 금속성분이 고농도로 함유되어 있다(Fig. 3.1.2.6). 또한 비소, 카드뮴, 납 등 상대적으로 독성이 높은 것으로 알려진 물질도 침전물 내에 수 ppm에서 수십 ppm에 이르는 높은 농도로 잔존하고 있다. 고압세척배출수를 통해 해양으로 유입된 페인트 침전물은 미세 입자형태로 이동하면서

지속적으로 해수환경으로 금속성분을 용출시킬 수 있으며, 용출된 금속은 표영생태계에 직접적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상된다. 또한 이러한 침전물은 궁극적으로 퇴적물에 침적되어 저서생태계에도 직접적인 영향을 미칠 것으로 예상된다.

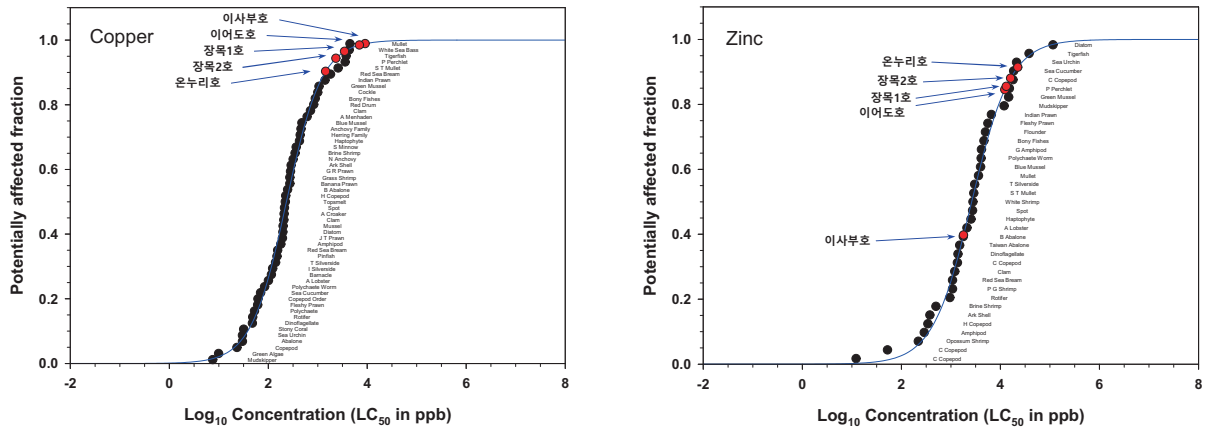


Fig. 3.1.2.5. Toxic levels of copper (left) and zinc (right) in the wastewater compared with species sensitivity distribution from the ECOTOX database.

Table 3.1.2.2. Marine environmental quality criteria for metals in seawater.

해양환경기준(ppb)		6가Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb	Hg
해양생태계	단기기준	200	11	3.0	34	9.4	19	7.6	1.8
	장기기준	2.8	1.8	1.2	11	3.4	2.2	1.2	1.0
사람의 건강 보호 기준		50	N/A	20	100	50	10	50	0.5

Table 3.1.2.3. Environmental criteria for the discharge of metal and suspended solid into aquatic ecosystem.

배출기준 (ppb)	부유물질 (mg/L)												
	Cr(6가)	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Ba	Pb	Hg	
청정지역	500(100)	2000	2000	100	1000	1000	50	100	20	1000	100	1	40
가지역	2000(500)	10000	10000	3000	3000	5000	250	1000	100	10000	500	5	80
나지역	2000(500)	10000	10000	3000	3000	5000	250	1000	100	10000	500	5	120
특례지역	2000(500)	10000	10000	3000	3000	5000	250	1000	100	10000	500	5	30

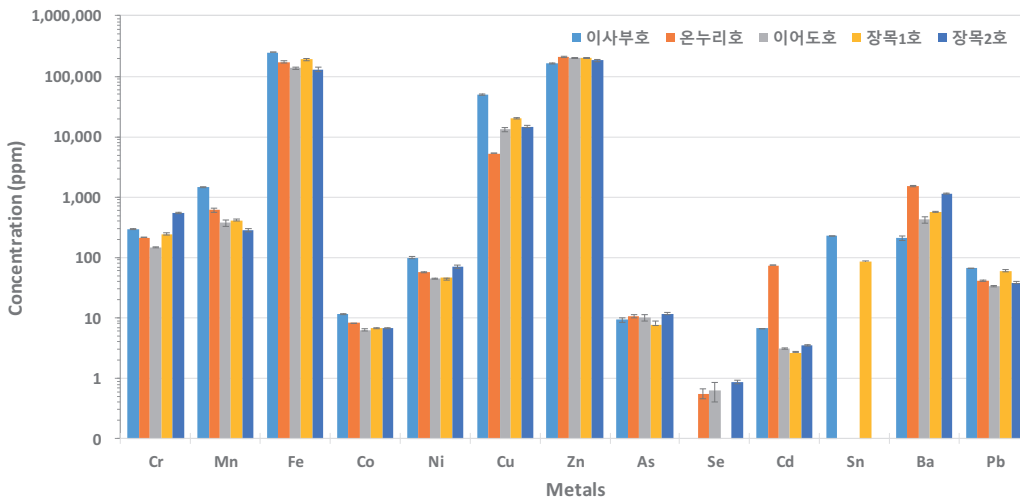


Fig. 3.1.2.6. Metal concentrations in the particle of the wastewater.

수중제거기술 적용 시 발생하는 부착파생물 입자의 환경 배출 기준 결정을 위한 기초 자료를 확보하기 위한 노력의 일환으로, 고압세척배출수 내 부유물질의 농도 및 입자 크기별 분포특성을 파악하였다. 고압세척배출수 내 총부유물질 농도는 279~3,190 mg/L의 범위로, 평균 1,570 mg/L이었다(Fig. 3.1.2.7).

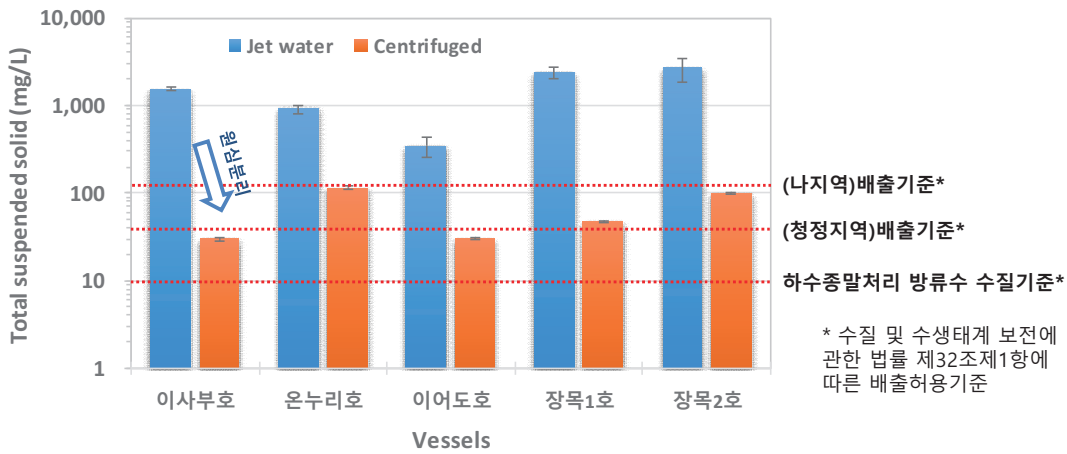


Fig. 3.1.2.7. Total suspended solid content in the wastewater and in the supernatant after centrifugation.

이는 청정지역 배출기준(수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 제32조제1항)에 비해 최대 80배, 하수종말처리장 방류수 수질기준 대비 최대 319배의 높은 수준이다. 따라서 현

재 해양으로 직접 배출할 수 없는 수준임에도 불구하고 고압세척배출수는 그대로 바다로 유입되고 있는 실정이며 이를 실효적으로 관리하기 위한 제도적 장치가 필요하다.

고압세척배출수를 원심분리하여 침전물을 제거한 후의 총부유물질 농도는, 평균 64.7 mg/L, 30에서 118 mg/L의 범위로서, 수질 및 수생태계 보전에 관한 법률에 따르면 '나지역'에서 배출 가능한 수준으로 감소되었다(Fig. 3.1.2.7).

고압세척배출수를 통해 배출되는 페인트 입자의 크기별 분포특성을 파악하기 위해 입자크기 구간별(20 μm 이하, 20-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300 μm)로 입자를 분리하여 채취하였다. 대부분의 경우 20 μm 이하의 페인트 입자가 가장 큰 무게 비중(20~81%)을 차지하였다(Fig. 3.1.2.8). 예외적으로 온누리호의 경우에는 50-100 μm 구간이 47%의 가장 큰 비중을 차지하였다. 이러한 자료는 향후 수중제거 파생물의 환경 배출 가능 입자크기를 결정하기 위한 기초 자료로 활용될 수 있다.

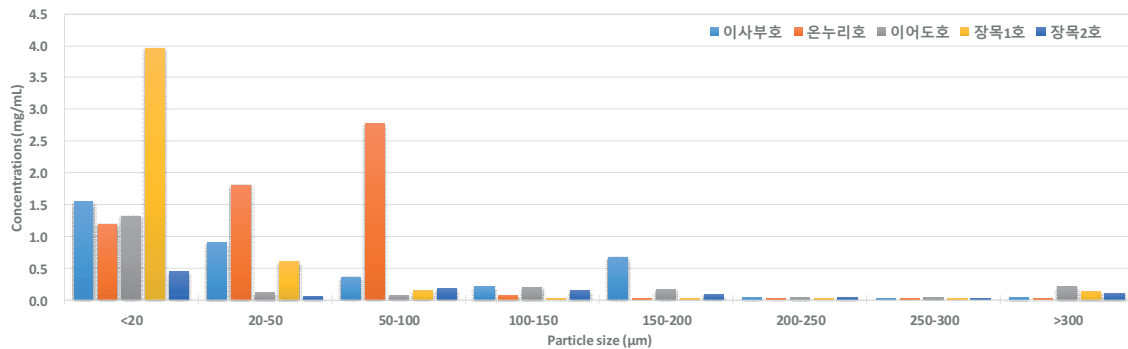


Fig. 3.1.2.8. Particle size distribution in the wastewater.

입자크기와 입자량 누적분포 관계를 이용하여, 수중제거 시 배출되는 입자제거를 위한 필터 공극크기와 입자제거율에 대한 예비 관계식을 아래와 같이 도출하였다(Fig. 3.1.2.9).

$$y = -16.31 \ln(x) + 96.024 \quad (r^2 = 0.8728)$$

$$y = 100 e^{-0.015x} \quad (r^2 = 0.5209)$$

y : 입자제거율(%)

x : mesh size(μm)

예비로 도출된 관계식에 따르면, 200 μm 의 필터를 사용할 경우 전체 페인트입자의 약 9.6%가 제거되며, 1 μm 필터를 사용하면 96.0%의 입자를 제거할 수 있다. 이러한 입자의 크기별 분포 자료는 향후 수중제거 파생물 수중 배출 가능 입자크기를 결정하기 위한 기

초 자료로 활용될 수 있다. 하지만 수중제어기술에 실제로 적용될 수 있는 관계식을 산출하기 위해서는 보다 많은 경우에 대한 입자분포 자료가 축적되어야 할 것이다.

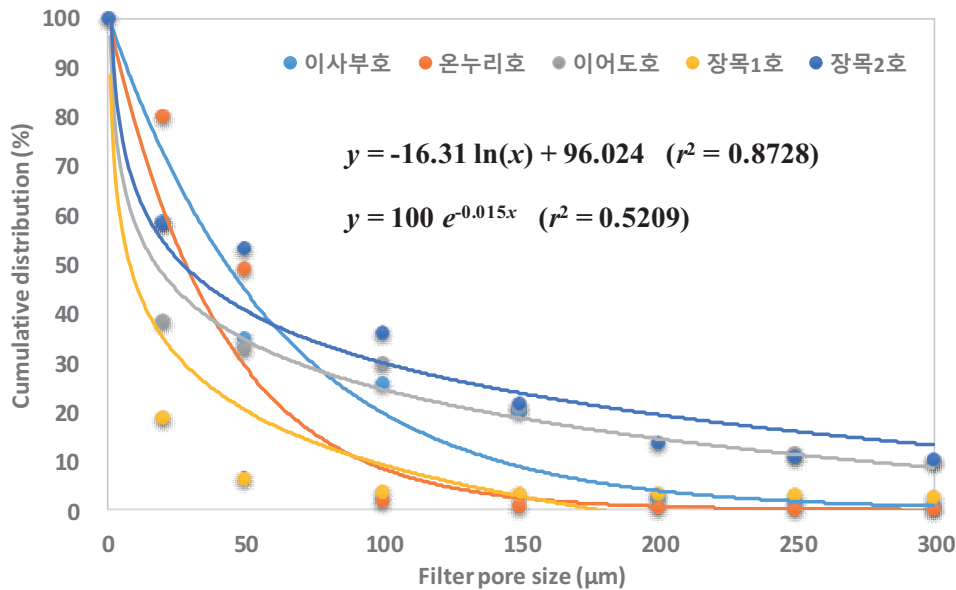
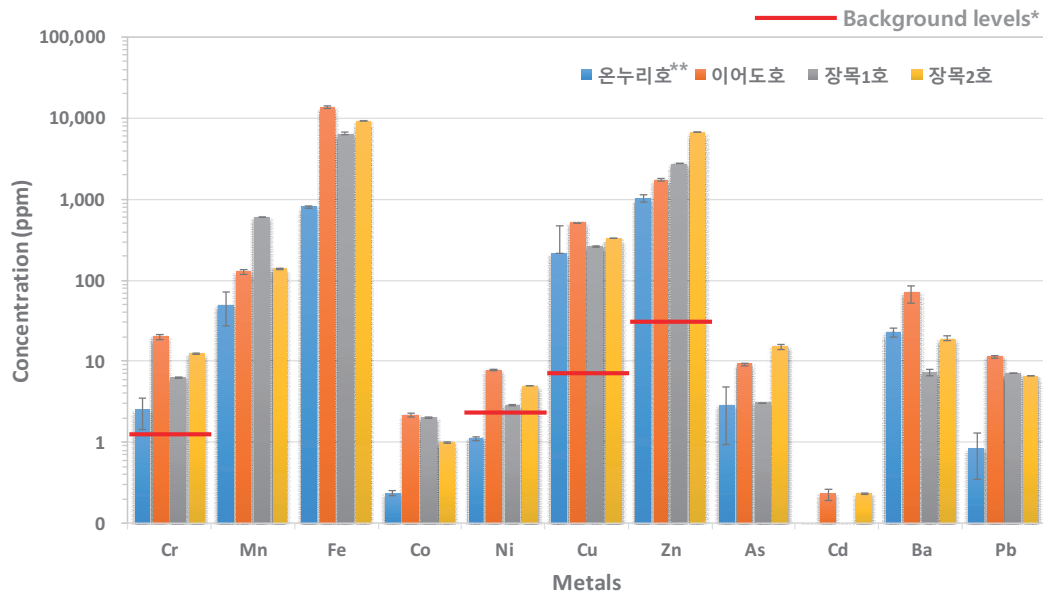


Fig. 3.1.2.9. Relationship between the particle size and cumulative distribution of particle in the wastewater.

선체표면에 붙어 있던 해조류 등 부착생물이 수중제거작업을 통해 선체로부터 탈락되어 해양환경으로 유입될 때, 부착생물 내에 축적되었던 활성물질도 함께 해양환경으로 유입될 수 있다. 이와 같은 가능성을 확인하기 위하여 선체표면에 부착되어 있던 해조류를 채취하여 해조류 내 중금속 농도를 측정하였다. 부착 해조류 내 금속 조성은 고압세척배출수 침전물 내 조성과 유사하게 철, 아연, 구리의 농도가 상대적으로 높았다(Fig. 3.1.2.10). 철은 459 ppm에서 14,000 ppm의 범위를 나타냈으며, 아연은 111 ppm에서 6,680 ppm, 구리는 36.6 ppm에서 603 ppm의 농도 범위를 보였다. 특히 건조상태에서 선체로부터 탈락된 해조류보다 젖은 상태로 탈락된 해조류에서 상대적으로 높은 농도 분포를 보였다. 이는 방오도료가 물에 젖을 경우 부풀어 올라 쉽게 탈락될 수 있는 성질 때문이며, 이를 통해 선박부착생물 수중제거 시에는 페인트 입자가 부착물과 함께 보다 쉽게 탈락될 수 있기 때문에 상대적으로 높은 농도의 활성물질이 부착과생물과 함께 방출될 가능성이 있음을 시사한다. 선박부착 해조류 내 구리, 아연 농도는 문헌을 통해 보고된 해조류 내 배경농도 대비 각각 최대 68배, 220배 높은 수준을 나타내어(Fig. 3.1.2.10), 먹이망을 통해 상위포식자 등 해양생태계에 위해한 영향을 미칠 가능성이 있음을 보여 준다.



* Villares et al. (2002) Environmental Pollution 119: 79-90.

** 온누리호 부착해조류는 건조된 상태에서 채취

Fig. 3.1.2.10. Metal concentrations in seaweeds collected from the ship's hull.

부착생물 제거 작업 시에는 부착파생물과 페인트 침전물을 포함한 고압세척배출수가 해양환경으로 직접 유입되는 것 외에도, 선체 표면의 페인트 파편이 직접 탈락되어 해양 환경으로 유입될 수 있다. 실제 부착생물 제거 현장에서 다양한 선박으로부터 탈락된 고형의 페인트 파편을 수거하여 페인트 파편 내 금속 성분을 분석하였다. 부착생물 제거 현장에서 수거된 페인트파편에서는 구리(~24%), 철(~3%), 아연(~3%), 바륨(~3%) 등이 고농도로 관찰되었다(Fig. 3.1.2.11). 앞서 분석된 고압세척배출수와 해조류는 대부분 아연을 주성분으로 하는 방오도료를 사용한 선박에서 채취되었기 때문에 아연 농도가 구리나 철 등에 비해 상대적으로 높았다. 반면 조선소에서 작업된 다양한 선박에서 탈락된 페인트칩을 분석한 결과에서는, 아연농도가 높았던 고압세척배출수 침전물, 해조류 등과는 달리 일반적으로 가장 많이 사용되는 활성물질인 구리의 농도가 가장 높게 검출되었다. 또한 조선소 주변에서 수거된 다양한 종류의 페인트파편에 대한 energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDS) 분석 결과에 따르면 방오도료 외에도 다양한 성분의 페인트파편이 확인되고 있다(Fig. 3.1.2.12). 수중제거작업 시 선체로부터 직접 탈락되는 페인트파편에 의해 주변 퇴적물이 오염되고 이에 따라 저서생태계에 위해 요소로 작용할 가능성이 있다. 또한 페인트파편으로부터 지속적인 중금속 용출로 인한 표영생태계 오염 및 영향 가능성도 있을 것으로 예상된다.

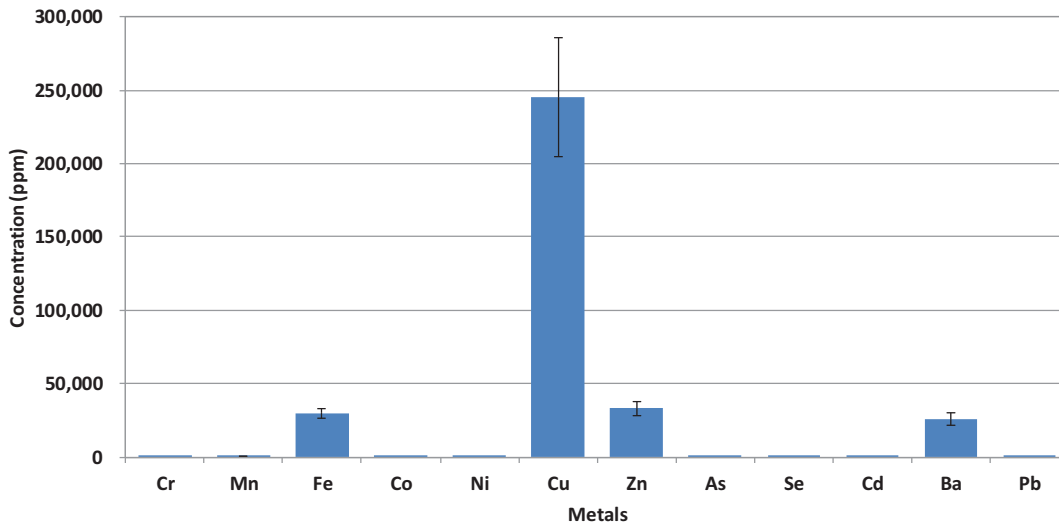


Fig. 3.1.2.11. Metal concentrations in the paint chips collected at the shipyard.

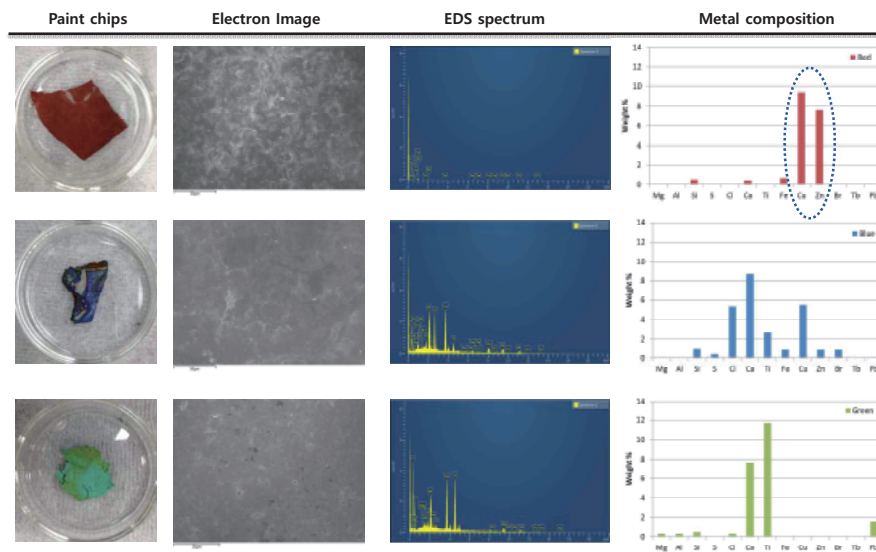


Fig. 3.1.2.12. Various paint chips collected at the shipyard and their EDS analysis results.

부착생물 제거현장 조선소 작업환경 내에서 채취된 퇴적물에서는 구리(~10%), 철(~9%), 아연(~4%), 바륨(~0.5%) 등이 고농도로 존재하였다(Fig. 3.1.2.13). 이러한 금속 조성 및 농도분포는 앞서 분석된 방오도료 페인트 파편과 매우 유사하였다. 따라서 조선소 퇴적물은 대부분 방오도료 페인트가루로 구성된 것으로 판단되며, 여기에 조선소 특성상

선체에서 직접 유래된 것으로 보이는 철 성분이 상당부분 기여한 것으로 판단된다. 빗물 또는 조선소 청소작업 등에 의해 바닥의 퇴적물이 해양으로 유입된다면 조선소 주변 해양 퇴적물을 오염시키고 저서생태계에 직접적인 영향을 미칠 수 있음은 물론 지속적인 중금속 용출로 인하여 해수 및 표영생태계에도 영향을 미칠 것으로 우려된다.

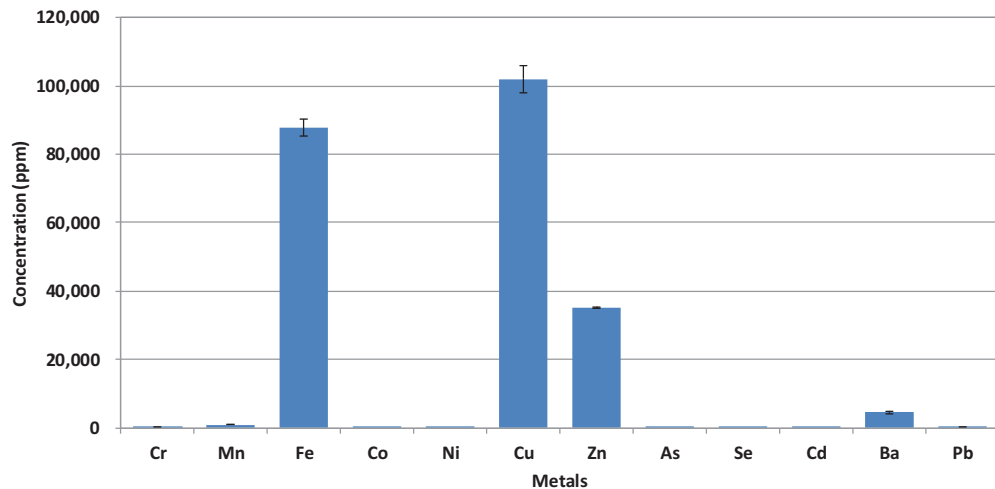


Fig. 3.1.2.13. Metal concentrations in sediment collected at the shipyard.

Table 3.1.2.4. Total suspended solid concentrations in seawater and comparison with values reported in literatures.

Location	SS (mg/L)	References
The Kuroshio current	0.3 - 0.4	Matsuike and Morinaga (1977)
Bearing Sea	0.5 - 1.1	Matsuike <i>et al.</i> (1979)
Persian Gulf	0.3 - 0.7	Arakawa <i>et al.</i> (1998)
태안반도	6.0 - 59.86	국립공원연구원(2012)
조선소 인근	870 - 1,040	이번 연구

위와 같이 선박부착생물 제거를 위한 고압세척배출수가 직접 배출되는 수리조선소 주변 해수 내 총부유물질 농도는 평균 897 mg/L로서 2001년 이전까지 사용되었던 해양환경 기준(25 mg/L) 대비 약 36배 높은 수준이며, 국내외 해수 내 부유물질 농도에 비해서도 월등히 높은 수준이었다(Table 3.1.2.4). 특히 선박부착생물 제거 과정 중 배출되는 고압 세척배출수에 의해 주변 해수 내 부유물질 농도는 평균 897 mg/L에서 988 mg/L로 약 10% 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3.1.2.14).

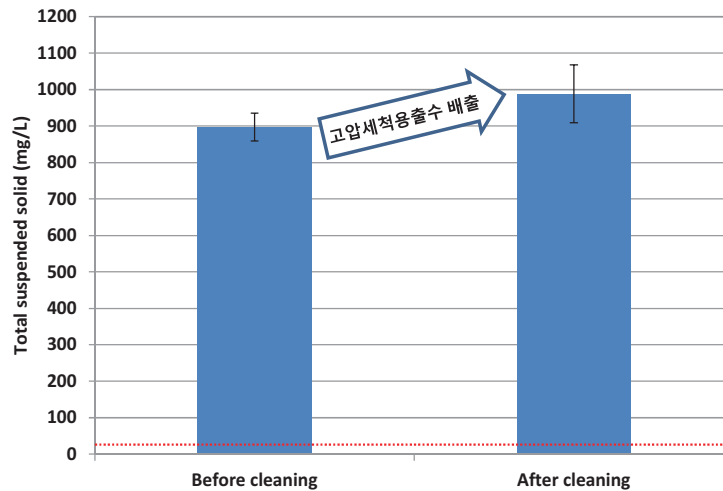


Fig. 3.1.2.14. Change of the total suspended solid concentrations in seawater after the jet-water cleaning to remove foulant on the ships' hull. Red line indicates the marine water quality standard which had been used until 2001.

선박부착생물 제거 작업이 활발히 이루어지는 조선소 인근 해수 내에서는 구리, 아연, 망간, 바륨 등 방오도료에 많이 포함되는 중금속이 높은 농도로 검출되었다. 중소형 선박의 수리가 활발히 이루어지는 부산남항의 경우 구리는 평균 46.6 ppb, 아연은 125 ppb로서 해양환경기준(단기)을 구리는 16배, 아연은 3.7배 초과하는 수준이었다(Fig. 3.1.2.15). 고압세척수를 이용한 부착생물 제거 작업 후에는 망간(16.8 → 25.4 ppb), 구리(68.2 → 117 ppb), 아연(178 → 320 ppb)의 농도가 약 2배 증가하였으며, 제거 작업 직후 해양환경기준(단기)을 구리의 경우 평균 39배, 아연은 9.4배를 초과하는 수준이었다(Fig. 3.1.2.15). 부착생물 제거 작업에 의해 해양 환경이 직접적으로 영향 받고 있음을 알 수 있다.

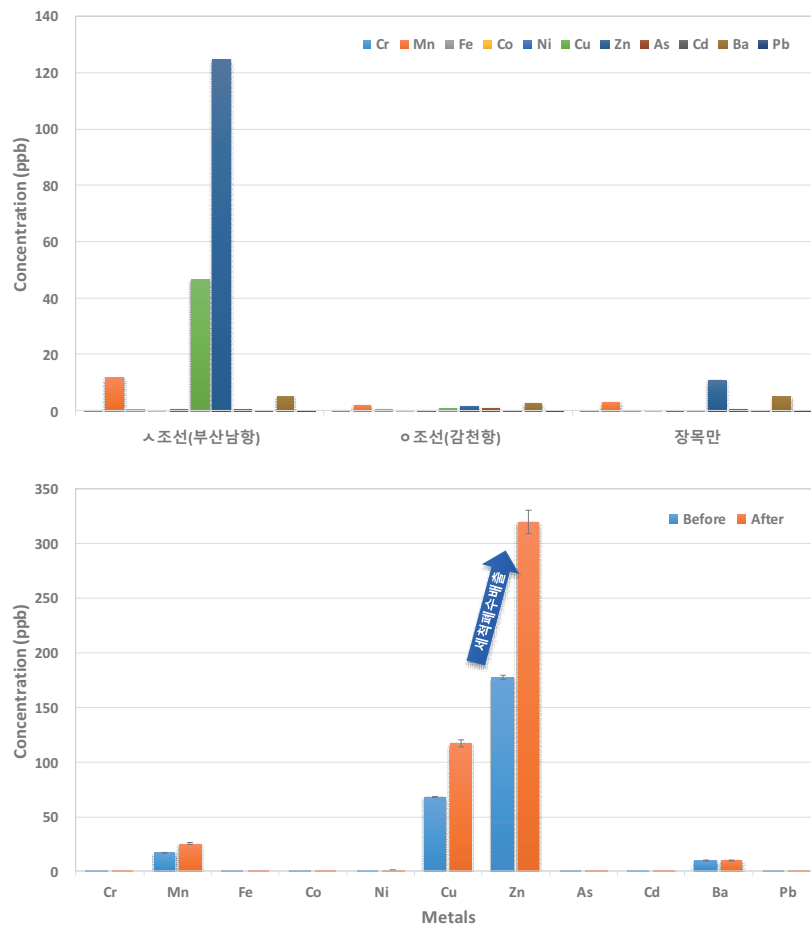


Fig. 3.1.2.15. Seawater metal distributions near shipyards for hull cleaning (upper). Change of the metal concentrations in seawater before and after the hull cleaning using high pressure water spray (bottom).

(3) 수중제거 모사시험 배출물의 물리화학적 특성

선박부착생물의 수중제거기술을 모사하기 위하여 20×30 cm² 시편에 각각 활성물질이 포함된 방오도료(exp. 1), 활성물질이 제외된 방오도료(exp. 2), 실리콘계열 방오도료(exp. 3), 방오도료가 칠해지지 않은 기본 코팅(exp. 4)을 입힌 후 바다 속 수심 약 1 m에 약 2개월간 노출 후 다시 회수하였다. 회수된 시편에 부착된 부착생물을 수중제거기술에 사용되는 솔을 이용하여 제거하고 이 때 발생된 파생물을 크기 2 mm 이상의 부착물과 2 mm 이하의 페수로 구분하여 채취하였다(Fig. 3.1.2.16). 각 시편에 대한 부착특성과 시료 내 중금속과 부유물질 분포 특성을 파악하였다.

시편에 부착된 크기 2 mm 이상의 총부착량은, 활성물질이 포함된 방오도료가 적용된 exp. 1이 단위 면적(m²) 당 1.90 g (습중량)으로 가장 낮았으며, 방오도료가 적용되지 않은 exp. 4에서 19,403 g/m²으로 가장 높았고 exp. 1에 비해 약 1만 배 이상 많은 양이 부착되었다(Fig. 3.1.2.17).

수중제거기술을 모사하기 위해 0.06 m²의 시편 5장을 7리터의 해수에 담가 솔을 이용하여 부착물을 제거하였다(1 m² 당 23.3 리터의 해수 사용). 이 때 발생된 세척폐수 내 부유물질(2 mm 이하) 농도는 499 - 2,180 mg/L 범위로 청정지역 배출기준(수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 제32조제1항) 대비 최대 55배, 하수종말처리장 방류수 배출기준 대비 최대 218배 초과하는 수준이었다(Fig. 3.1.2.18). 세척폐수를 1,800 g에서 20분 동안 원심분리한 후에는 212 - 489 mg/L 수준으로 감소하였으나 여전히 배출기준을 초과하였다. 여기에는 상대적으로 비중이 높은 페인트입자 외에도 미세한 크기의 생물잔해가 다량 포함되어 있기 때문에 원심분리에 의해서도 충분히 분리되지 않는 것으로 사료된다.

활성물질이 포함된 방오도료 시편(exp. 1)의 세척폐수에서는 아연(평균 557 ppb), 구리(359 ppb), 철(103 ppb)이 상대적으로 높은 농도로 검출되었다(Fig. 3.1.2.19). 구리와 아연이 상대적으로 높게 유출되었으며 방오도료에 일반적으로 많이 함유되는 바륨 또한 높은 농도로 유출되었다. 유출된 구리와 아연 농도는 해양환경기준(단기)을 각각 약 120배, 17배 초과하는 수준이었다. 유기계 살생물제는 모든 시편 시료에서 검출되지 않았다. 수중제거 모사시험 시 발생한 세척폐수 내 용존금속 농도 분포를 통해, 선박부착물의 수중제거작업을 통해 뚜렷이 높은 농도의 중금속이 해양으로 유출될 수 있다는 것을 확인하였다.

수중제거 모사시험 폐수 침전물 내 중금속 분포 또한 활성물질이 포함된 도료 시편에서 뚜렷이 높은 농도로 검출되었다(Fig. 3.1.2.20). 구리(5,170 ppb)와 아연(1,070 ppb)이 상대적으로 높은 농도로 검출되었으며, 방오도료에 함유되는 바륨(227 ppb)도 높은 수준으로 검출되었다. 부착생물의 수중제거 작업은 해수 내 용존 활성물질의 농도를 직접적으로 증가시킬 뿐만 아니라 발생된 많은 양의 입자성 파생물이 해수 유동을 따라 이동하면서 지속적으로 해수환경으로 활성성분을 용출시킬 수 있다. 용출된 성분은 표영생태계에 영향을 미칠 뿐만 아니라 또한 궁극적으로 퇴적물에 침적되어 저서생태계에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상된다.



Fig. 3.1.2.16. Retrieving plates placed for 2 months in the seawater (left) and simulated in-water cleaning using brush to remove biofouling on the plates (right).

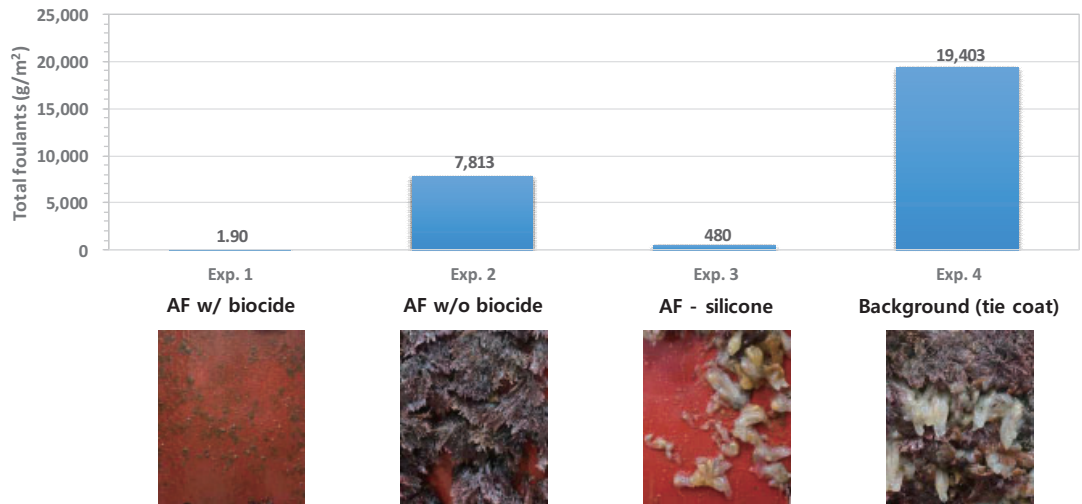


Fig. 3.1.2.17. Biofouling biomass on each test plate for in-water cleaning simulation.

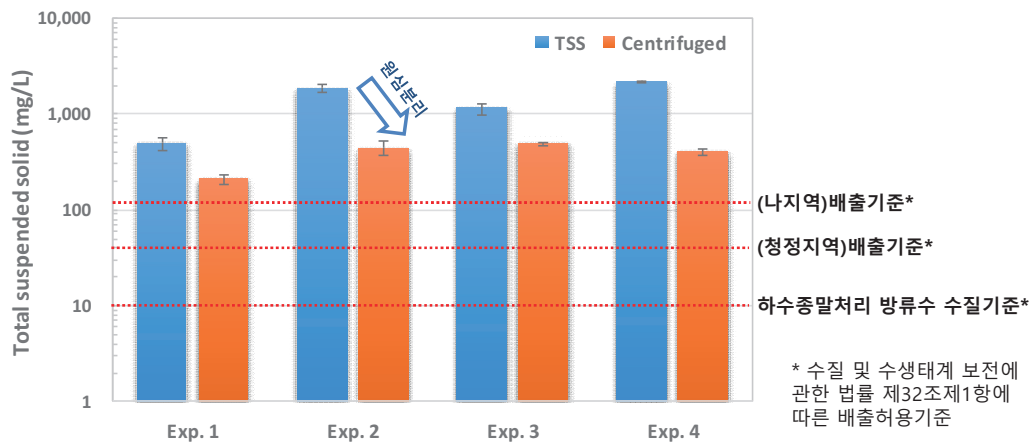


Fig. 3.1.2.18. Total suspended solid concentrations in the wastewater from the in-water cleaning simulation.

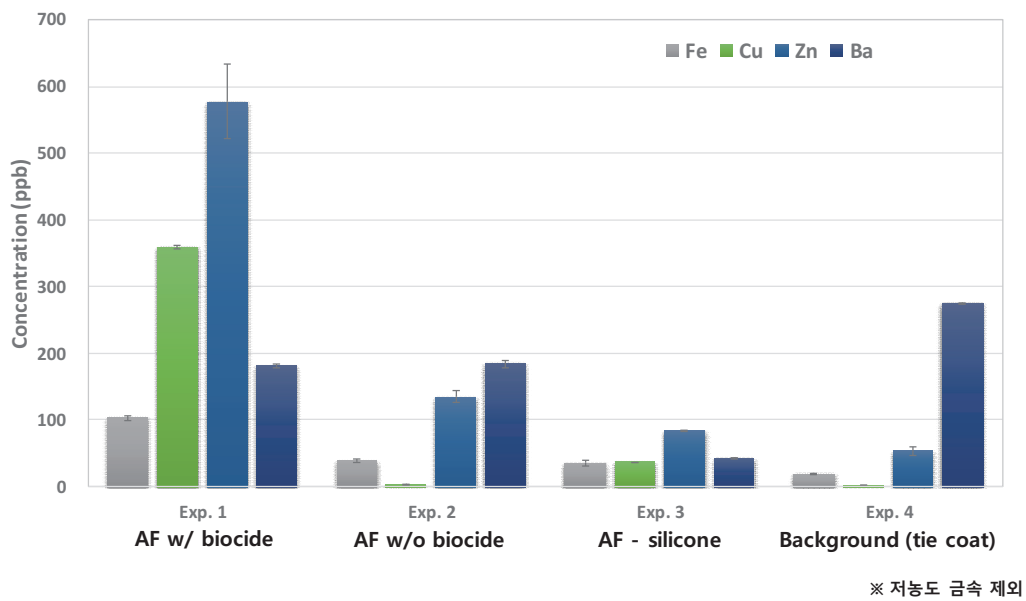


Fig. 3.1.2.19. Dissolved metal concentrations in the wastewater from the in-water cleaning simulation.

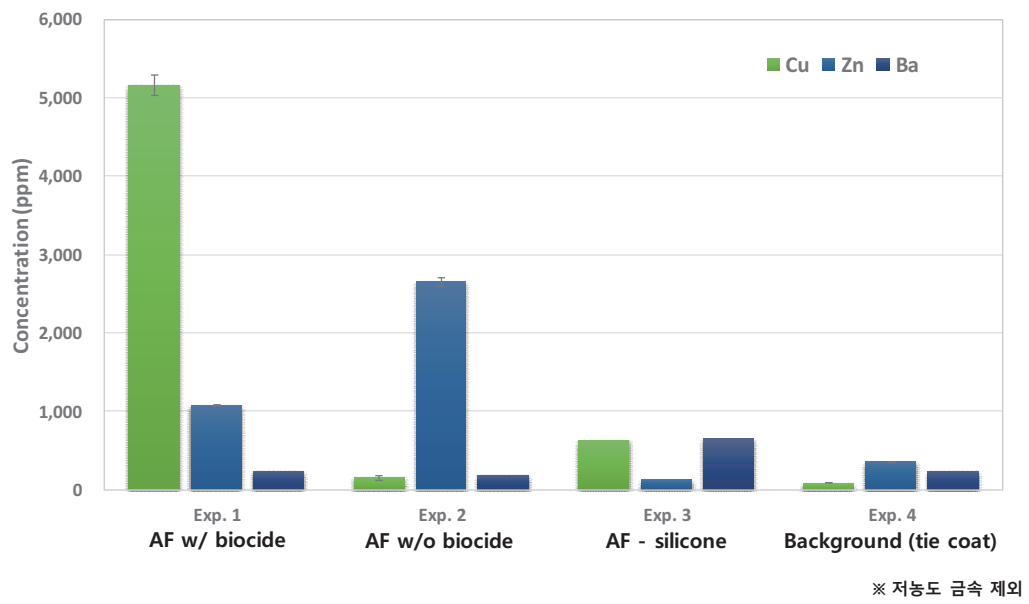


Fig. 3.1.2.20. Particulate metal concentrations in the wastewater from the in-water cleaning simulation.

제2절 선박부착 파생물의 LAB-SCALE영향평가, 지표발굴, 모사 실험 및 AFS활성물질 영향 평가

1. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE 영향 및 지표 발굴

가. 넙치배아 발생독성평가

(1) 서론

Antifouling paint는 다양한 살충효과를 가진 중금속을 포함한 화학제로 구성되어 있다. 이들은 선박표면에 부착하는 생물에 대하여 살충효과를 가지고 있으며, 선박 수리 (water jet cleaning, in water cleaning, sanding, sand blasting, scraping), 페인팅 작업, 정박 등의 선박활동으로 해양환경에 유출되면서 연안환경에도 영향을 미친다고 알려져 있다. 선박부착생물 수중 및 육상제거 작업 중 해양환경으로 유출되는 페인트 성분은 유해물질을 함유하고 있어, 연안생태계 서식생물에 먹이사슬을 통해 영향이 상위단계로 확장되거나, 민감도가 높은 생물의 경우 저 농도에서도 급성독성반응을 일으킬 수 있으므로, 선박부착 파생물에 대한 연안 생물의 독성자료는 매우 중요하다. 그러나, 선박부착파생물에 포함된 페인트성분은 단일 물질이 아닌 antifouling system 으로 Cu 나 Zn 등을 기반으로 다양한 booster biocide가 결합된 형태로서 다양한 화학물질의 조합으로 인해 이들에 대한 급성독성자료를 산정한 결과는 거의 찾아볼 수 없다. 따라서 본 연구에서는 천해환경에서 수정란 기간을 거쳐 자어까지 성장하는 넙치배아를 이용하여 1차년도에는 Ocean급 연구선 이어도호, 2차년도에는 Global 급 이사부호의 고압세척 배출수를 노출시켜 유발되는 형태발생단계의 독성영향을 평가하였고, 이어 RNA-seq분석을 통해 노출에 반응하는 모든 전사체를 정밀 분석하여 파생물내 독성물질의 노출로 인한 독성기작 및 지표를 발굴하고자 하였다. 본 연구에서는 고압세척배출수 자체를 노출 시켜 유기와 무기 오염물질에 대한 총체적 독성영향을 평가하였고, 동시에 메탄올로 유기물질만 선택 추출하여 중금속 성분의 독성을 제외한 유기 booster biocide 독성영향만 선택적으로 평가하고자 하였다. 넙치 배아는 다양한 해양오염물질에 민감하게 반응하는 생애주기이며, 실제 유출될 수 있는 연안환경에 서식하는 현장생물이기도 하다. 실제 넙치는 연안가까이에서 산란하며, 발생기간 동안 수층에 부유하는 부상란이므로 수층의 오염에 대해 직접적으로 영향을 받을 수 있는 생물이다. 따라서 Antifouling system의 비표적 생물인 넙치는 실제 수중제거작업의 오염으로부터 보호되어야 할 주요 수산자원이기도 하다. 지금까지, 고압 세척배출수의 독성영향에 대한 연구는 국내에서 거의 진행된 바 없으며, 국외 연구로도 Paint particle에 대한 위해성 연구에 대하여만 일부 보고되고 있다(Soroldoni et al.,

2017). 따라서, 본 연구에서는 국내 생태계 주요종인 넙치배아에 노출된 고압세척용출수의 발생독성영향을 평가하고, 이를 통한 연안서식생물의 보호를 위한 과학적 근거마련에 활용하고자 하였다.

(2) 재료 및 방법

(가) 대상 생물

본 독성영향평가에 사용된 생물은 연안 생물인 Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)의 수정란을 사용하였다. (주)해연 (Jeju, Korea) 으로부터 6 h post fertilization (hpf)된 수정란을 구입하여, 17°C의 필터 해수에 24시간 정치 후 사용하였다.

(나) 시험대상물질 및 제조

① 멸균 해수 제조

해수를 0.22mm filter (Corning® Top Vacuum Filter CA Membrane, Corning Co., NY)로 필터 후, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하여 사용하였다.

② 이어도호/이사부호 고압세척 용출수 샘플링 및 MeOH 추출물 제조

이어도호와 이사부호의 고압세척 작업과정 중 유출 되는 Antifouling paints가 첨가된 고압세척배출수 시료(High-pressure cleaning waste water (HCW))를 샘플링 하여 실험에 사용하였다. MeOH 추출물은 샘플링 시료를 dichloromethane (DCM) 100mL 씩 5번 첨가 후 liquid-liquid extraction을 통해 추출한 용액을 농축 후 methanol (MeOH)로 용매 치환하여 제조하였다 (Fig. 3.2.1.1).



Fig. 3.2.1.1. High-pressure cleaning waste water and MeOH extract.

(다) 형태발생독성영향평가

Optic vesicle 단계인 수정란을 멸균 해수 10mL이 담긴 각각의 well(Nunc™ Nunclon™ Vita 6-Well Multidish, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)에 약 30개 씩 분주하였다. 그 후 다양한 농도 고압세척배출수(1000, 500, 250, 100배 희석액), MeOH 추출물 (10000, 4000, 2000, 1000 배 희석액(40배 농축 환산 : 250, 100, 50, 25배 희석액) 시험물질에 수정란을 노출 시켰다. 노출 24시간 후, 노출 용액의 반을 새로 제조한 시험 물질과 멸균 해수로 교체 하였다. 노출 시킨 수정란은 17±1 °C에서 48시간 동안 배양하였다. 노출 후 24시간 마다 생존여부를 기록하였고, 48시간이 지난 후 형태학적 기형(심장 부종, 꼬리기형, 척추만곡)을 관찰하여 기록하였다. 모든 실험은 3 반복으로 진행하였다.

(라) RNA 추출 및 cDNA 합성

심장 발달 단계(heart development stage, 노출 후 약 12시간)의 넙치 배아를 이용하여 Total RNA를 추출하였다. 3 반복 개체를 각각 Isogen (Wako, Japan)과 균질기를 이용하여 RNA를 추출하였다. 그리고 추출된 RNA는 NANO DROP ONE (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)을 이용하여 260nm와 280nm 파장에서 농도를 측정하였다. 그리고 QuantiNova™ Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 Complementary DNA(cDNA)를 합성하였다.

(마) RNA sequencing

Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, CA)를 이용하여 추출한 RNA 농도 및 순도를 측정하였다. RNA-seq 분석을 위하여 TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA)를 이용하여 100 base 길이의 paired-end read들로 mRNA sequencing library를 구축하였다. 2µg의 Total RNA로부터 oligo(dT) magnetic beads를 이용하여 mRNA를 분리, 정제하였다. 분리된 mRNA는 random hexamer priming을 통하여 single-stranded cDNA로 합성되었고, double-stranded cDNA로 합성되었다. 합성된 double-stranded cDNA에 end repair, A-tailing, adapter ligation 진행 후 Polymerase chain reaction (PCR)을 통하여 증폭시킴으로써 cDNA library를 구축하였다. Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent)와 KAPA library quantification kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA)를 통하여 구축된 cDNA library의 정량 및 정성을 분석하였다. 변성된 주형의 cluster 증폭 후, Illumina HiSeq 2500 (Illumina)를 사용하여 flow cell을 paired-end reads(2×100bp)로 분석하였다.

(바) 생체정보 분석

1) Filtering 및 assembly

몇 가지 기준에 따라 low-quality read를 여과하였다. low-quality read란 N으로 나타나는 skipped 염기가 10% 이상이거나 퀄리티 점수와 각 가닥의 평균 퀄리티 점수가 20 이하이거나 50 base-pairs보다 짧은 염기가 20%이상인 가닥을 말한다. 전체 여과과정은 in house scripts를 이용하여 진행하였으며, 여과 후, 남은 read들은 Trinity software를 이용하여 transcript를 assembly하였다. 세 종의 소프트웨어 프로그램(Inchworm, Chrysalis, Butterfly)을 이용하여 assembly 과정을 진행하였다. strand-specific sequencing에서는 SS_lib_type 옵션을 사용하였으며, default 값은 다른 옵션을 사용하였다. CD-HOT-EST software(Fu et al., 2012)를 통하여 assembled transcripts로부터 94%의 유사성으로 최종 unigene을 선택하였다. RNA-seq assembly 과정에서 불완전하고 불필요한 assembled transcript들은 selecting representative sequences를 통하여 제거하였다.

2) Function annotation 과 enrichment analysis

Clean reads 는 *Paralichthys olivaceus* (Shao et al., 2017)의 게놈서열을 참고하여 TopHat (Kim et al., 2013)을 사용하여 정렬하였다. 유전자 발현은 Cufflinks (Trapnell et al., 2012)를 사용하여 정량화하였고, 샘플 그룹간 차등분석(Differential expression analysis) Cuffdiff(Trapnell et al., 2012)를 사용하여 통계 처리하여 유의한 유전자를 선별하였다($P < 0.05$ and ≥ 1.5 -fold change). module members에 대한 기능분석(Functional annotation)은 DAVID (Huang et al., 2009)를 이용하여 분석하였고, 유의하게 변화된 유전자의 gene ontology (GO)는 cutoff 값 $P < 0.05$ 기준으로 선별하였다. 선별된 유전자는 Euclidean distance 와 complete linkage method를 이용하여 Hierarchical clustering 이 작성하였다. Differentially expressed 유전자의 gene-interaction network 분석은 Cytoscape (<https://cytoscape.org/>)으로 작성하였다.

3) DEG의 유전자 발현 분석

유전자 발현 수준을 Expectation Maximization 이용한 RNA-seq을 통하여 측정하였다. R package DEGseq을 통하여 계산된 가닥 수 데이터(read count data)를 기초로하여 DEGs를 분석하였다. Lowess normalization method를 통해 나타난 unigene의 발현값을 Fragments per kb of exon model per million mapped (FPKM) read을 이용하여 표준화(normalization)하였다. Differentially expressed unigene은 P -value 0.05이하, Fold change값 2 이상을 기준으로 나타내었다. DEG 분석으로부터 분석된 gene들을 동정하기 위하여 P -value < 0.001 에서 Fisher's exact test (<http://www.GOseq>)을 이용하여

GO-based trend test를 진행하였다. RNA-seq을 분석은 TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA)를 사용하여 100 bases의 paired-end reads의 mRNA sequencing libraries를 제작하였다. cDNA libraries의 순도는 Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent) 와 KAPA library quantification kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA)를 사용하여 평가하였다. 변형시킨 주형은 cluster amplification을 거친 후, flow cells은 Illumina HiSeq 2500 (Illumina)을 사용하여 RNA를 분석하였다.

(사) RT-qPCR

Real-time quantitative Polymerase chain reaction (RT-qPCR)은 QuantiNova™ SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)와 Rotor-gene®Q (Qiagen)을 이용하여 진행하였다. Comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)를 이용하여 mRNA 발현 정도를 분석하였다.

Table 3.2.1.1. Primers used in this study for RT-qPCR.

Gene		Sequence
<i>nkx2.5</i>	Forward	5' TTCTCCCAGGCGCAGGTGTA 3'
	Reverse	5' GGAACCAGATCTTCACCTGG 3'
<i>TP73</i>	Forward	5' ATGCCAATGAAAGCACACAT 3'
	Reverse	5' TGCACTGTGAGACCAAACAA 3'
<i>robo1</i>	Forward	5' AGTGGCTCCCTCTTCTTCTTAC 3'
	Reverse	5' CTCGTAGAATGGCTACTTCCAG 3'
<i>SOX6</i>	Forward	5' GAAGAGTGCTGGAGAATGTGAC 3'
	Reverse	5' TCTCCTAGCTCTTGTTCACTCC 3'
<i>bmp4</i>	Forward	5' GTAGGCTGGAATGACTGGATAG 3'
	Reverse	5' GTTCACAGAGTTCACCAGTGTC 3'
<i>furin</i>	Forward	5' ACAGTAGTGAAGAGGTCGCTGT 3'
	Reverse	5' CTCTGAACTGGGATCTACAGG 3'
<i>plod2</i>	Forward	5' AGACTTGCTGACAAGTACCCCT 3'
	Reverse	5' GTGTAGAAGAGCTGGTCGTCAT 3'
<i>wnt3a</i>	Forward	5' AGCGAGGATGTGGAGTTTGG 3'
	Reverse	5' TACCCGAAAGACCATGGCAC 3'
<i>β-actin</i>	Forward	5' TTTCCCTCCATTGTTGGTCG 3'
	Reverse	5' GCGACTCTCAGCTCGTTGTA 3'

대조군과 실험군의 mRNA 발현 정도를 비교하기 위해 *β -actin*을 reference gene으로 사용하여 표준화 하였다. target 유전자의 Primer 서열은 Table 3.2.1.1과 같다.

(3) 결과 및 토의

(가) 형태발생독성평가

① 이어도호 고압세척배출수 노출구

이어도호 MeOH 추출물의 경우 추출 후, 각각의 희석액의 농도를 고압세척배출수 기준으로 계산하여 나타내었다. Fig. 3.2.1.2은 고압세척배출수와 MeOH 추출물에 48시간 동안 노출된 넙치의 사망률을 나타내었다. 고압세척배출수에 노출된 넙치의 경우 10^4 배 희석액에서 $13 \pm 8\%$, 10^3 배 희석액에서 $16 \pm 2\%$ 의 사망률을 보였다. 또한, 500, 250배 희석액에서는 각각 33 ± 9 , $34 \pm 27\%$ 로 나타났다. 즉, 농도가 높아질수록 사망률이 증가하였으며, 100배 희석액에서 100%의 사망률을 확인할 수 있었다. 또한, 500배 희석액 이상의 농도를 처리한 실험구에서도 통계적으로 유의하게 대조군과의 차이를 보였다. 넙치 배아의 사망률은 MeOH 추출물을 노출 시킨 경우, 2200배 희석액에서 $9 \pm 1\%$, 220배 희석액에서 $14 \pm 4\%$, 110배, 55배 희석액에서 각각 3 ± 3 , $5 \pm 1\%$ 였으며 대조군과의 차이는 없었다. 22배 희석액에서 개체가 모두 사망하여 통계적으로 유의한 대조군과의 차이를 확인할 수 있었다. 고압세척배출수를 노출 한 경우, 100배 희석액에서 개체가 모두 사망한 반면, MeOH 추출물을 노출 한 경우 110배 희석액에서 $3 \pm 3\%$ 의 사망률을 보였고, 22배 희석액에서 100%의 사망률을 보였다. 이러한 결과를 볼 때 MeOH 추출물이 고압세척용출수보다 상대적으로 낮은 것으로 생각된다. 고압세척배출수와 MeOH 추출물에 노출된 넙치의 경우 꼬리지느러미 기형(Tail-finfold defect), 척추 만곡 (Dorsal curvature) 두 기형 모두 처리 농도가 높아질수록 기형률이 높게 나타났다. 또한, 고압세척용출수에 노출된 넙치의 경우 10^4 배 희석액에서 $14 \pm 2\%$, 10^3 배 희석액에서 $25 \pm 4\%$ 꼬리지느러미 기형률을 나타내었다. 그리고 500배 희석액에서 $55 \pm 18\%$, 250배 희석액에서 $88 \pm 17\%$ 의 꼬리지느러미 기형률을 나타내며 유의한 대조군과의 차이를 확인할 수 있었다. MeOH 추출물에 노출된 경우에도 농도에 따라 110배, 55배 희석액 $37 \pm 38\%$, $77 \pm 15\%$ 의 기형률을 보이며 대조군과 차이를 보였다. 척추 만곡의 경우 10^4 , 10^3 , 500, 250 배 희석된 고압세척용출수에 노출된 후 각각 16 ± 4 , 21 ± 6 , 52 ± 3 , $59 \pm 26\%$ 기형률을 확인할 수 있었고, MeOH 추출물 110배, 55배에 노출된 후, $23 \pm 3\%$, $38 \pm 15\%$ 의 기형률을 보이며 대조군과의 차이를 나타내었다. 심장 부종(Pericardial edema) 기형의 경우, 500배 희석된 고압세척배출수와 110배 희석된 MeOH 추출물에서부터 나타나기 시작하였다. 심장 부종 또한 처리 농도가 높아질수록 기형률이 높아졌다. 250배 희석된 고압세척용출수에 노출된 경우 $64 \pm 31\%$ 의 심장 부종 기형률을 나타낸 반면, 55배 희석된 MeOH 추출물에서 $36 \pm 4\%$ 의 기형률을 보였다.

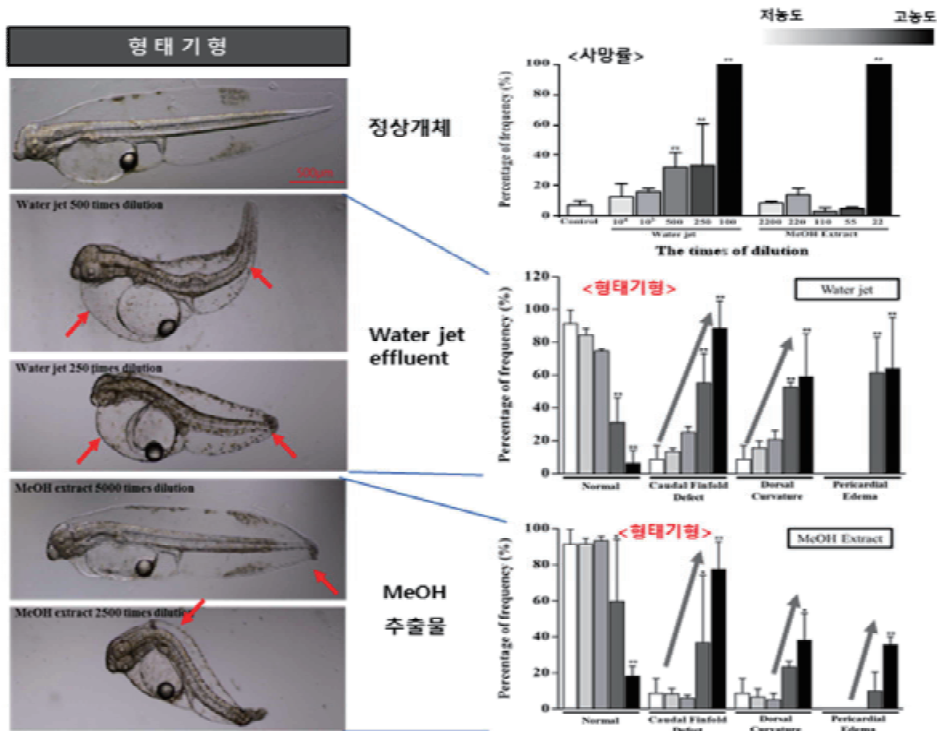


Fig. 3.2.1.2. Frequency percentage of mortality and malformation in embryonic flounder exposed to HCW and MEW from RV/EARDO.

상대적으로 더욱 높은 농도인 MeOH 추출물의 기형률이 고압세척용출수의 기형률보다 낮게 나타난 결과들을 토대로 이어도호의 고압세척용출수의 독성이 MeOH 추출물의 독성보다 높은 것을 확인할 수 있었다.

② 이사부호 고압세척배출수 노출구

이사부호 MeOH 추출물(MEW)의 경우 추출 후, 각각의 희석액의 농도를 고압세척배출수(HCW) 기준으로 환산, 계산하여 나타내었다. Fig.3.2.1.3은 고압세척배출수와 MeOH 노출구(MEW)의 넙치의 사망률을 나타내었다. HCW에 노출된 넙치의 경우 500배 희석액에서 $18 \pm 14\%$, 250배 희석액에서 $76 \pm 4\%$, 100배 희석액에서 $68 \pm 2\%$ 의 사망률을 보였다. MEW에 노출 시킨 넙치 배아는 250배 희석액에서 $3 \pm 1\%$, 100배 희석액에서 $87 \pm 5\%$, 50배, 25배 희석액에서 100%의 사망률을 보이며 대조군과의 차이를 보였다. 22배 희석액에서 개체가 모두 사망하여 통계적으로 유의한 대조군과의 차이를 확인할 수 있었다. HCW와 MEW에 48시간 동안 노출 시킨 넙치의 형태학적 기형을 통하여 발생 독성

을 평가하였다(Fig. 3.2.1.4). MEW 50, 25배 희석액은 100% 사망하여 발생 독성 평가가 불가능하였다. HCW에 노출된 넙치의 경우 500배, 250배 희석액 노출구간에서 각각 $24 \pm 15\%$, $82 \pm 8\%$ 의 심장 부종(Pericardial edema) 기형률 나타내며 유의한 대조군과의 차이를 확인할 수 있었다.

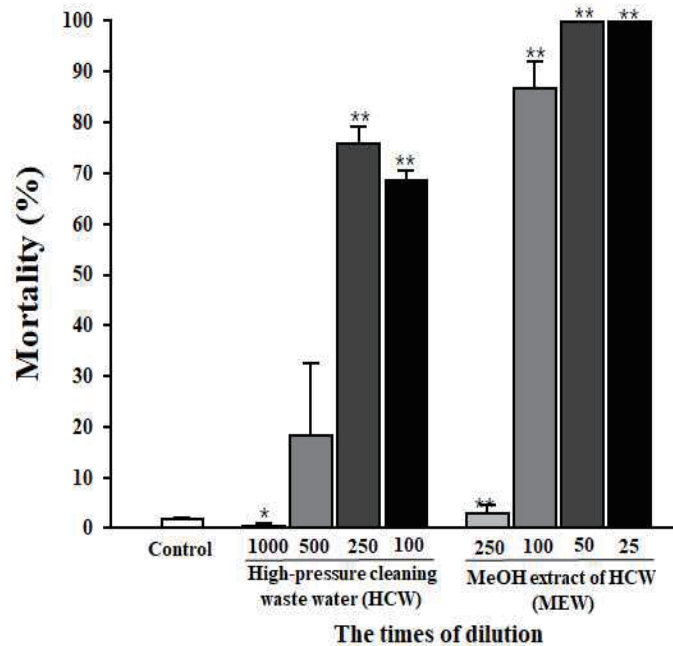


Fig. 3.2.1.3. Frequency percentage of mortality in embryonic flounder exposed to HCW and MEW from RV/ISABU.

또한, MEW를 노출 시킨 넙치는 250배 희석액에서 $6 \pm 5\%$, 100배 희석액에서 $30 \pm 6\%$ 의 심장 부종 기형률을 나타내었다. 척추 만곡 (Dorsal curvature) 기형은 HCW 500배 희석액 노출 넙치에서 $34 \pm 16\%$, MEW 250, 100배 희석액 노출 넙치에서 각각 $11 \pm 7\%$, $22 \pm 7\%$ 의 기형률을 나타내었다. 꼬리지느러미 기형(Tail-fin fold defect) 빈도는 HCW의 500배, 250배, 100배 희석구간에서 각각 $60 \pm 29\%$, $80 \pm 11\%$, $86 \pm 6\%$ 로 대조군과 차이를 보였다.

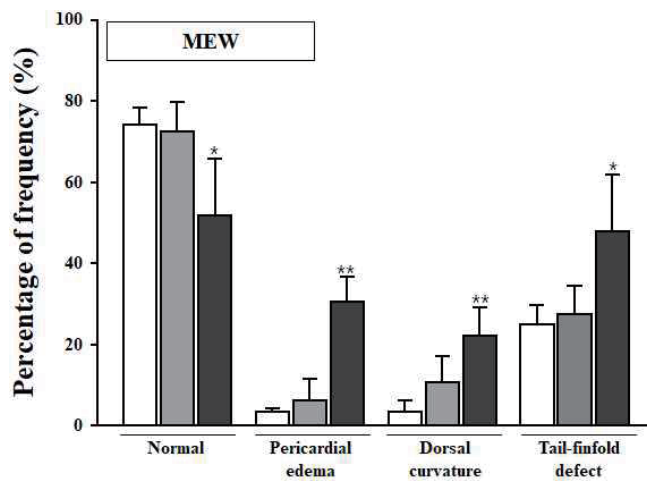
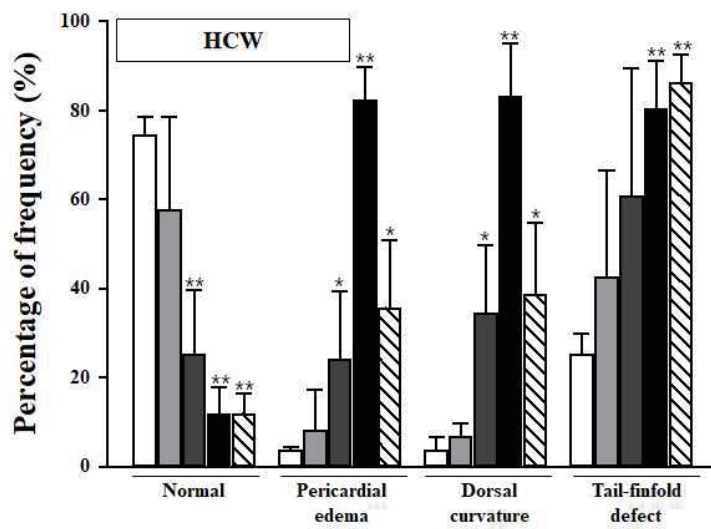
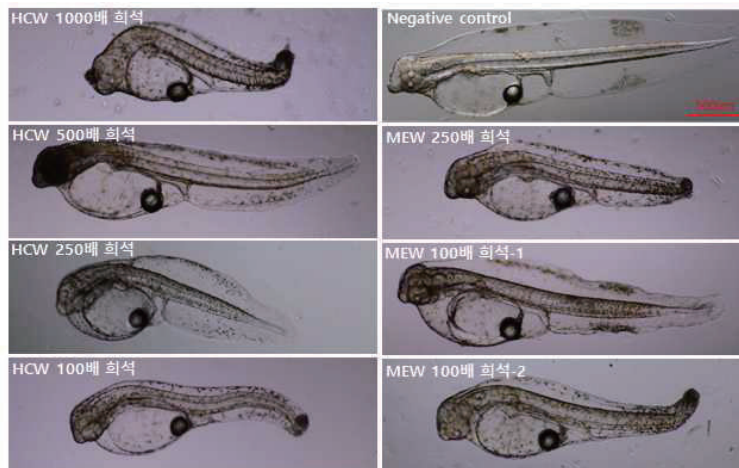


Fig. 3.2.1.4. Frequency percentage of malformation in embryonic flounder exposed to HCW and MEW from RV/ISABU.

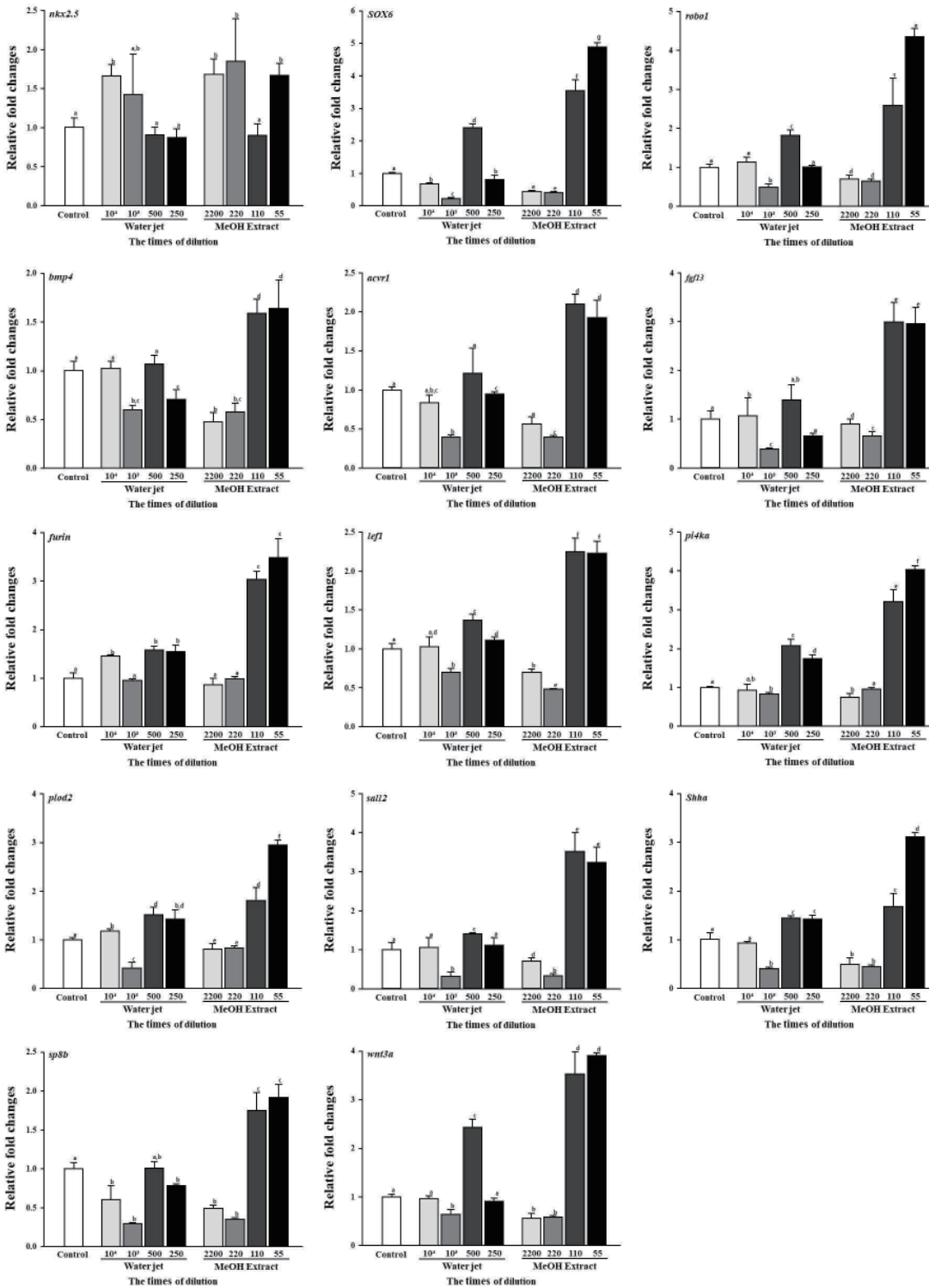
MEW 250배 희석액 노출 넙치는 $27 \pm 7\%$, 100배 희석액 노출 넙치는 $48 \pm 14\%$ 의 꼬리지느러미 기형률을 보이며, 농도가 높아질수록 기형률이 높게 나타났다. 같은 농도인 250배 희석액에서 HCW와 MEW에 노출된 넙치의 기형률 비교 시, HCW가 더욱 높은 기형률을 확인할 수 있었다.

(나) 형태 발생관련 유전자의 정량

① 이어도호 고압세척용출수 노출군

Fig. 3.2.1.5에 나타난 바와 같이 심장 부종이 나타나지 않은 농도에서 *nkx2.5*의 발현은 대조군과 차이가 없었으나, 심장 부종이 나타난 고압세척배출수 500배, 250배 희석액과 MeOH 추출물 110배, 55배 희석에 노출된 넙치의 경우 대조군에 비해 심장 형성과 관련되어 있는 유전자 *nkx2.5*가 발현이 높았다. *ORG* 유전자의 경우 고압세척배출수의 전체 농도에서 대조군보다 낮은 발현율을 보였고, MeOH 추출물에 노출된 넙치의 경우 55배 희석액 실험군이 대조군에 비해 높은 발현율을 보인 것을 제외하고 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이 결과는 넙치 수정란의 생식 발달과정에 있어서 고압세척용출수와 MeOH 추출물이 영향을 미칠 것으로 생각된다. 면역 관련 유전자인 *DEFBL1*, *TP73*의 경우 고압세척용출수에 노출된 넙치에서 대부분의 농도에서 대조군 보다 낮은 발현율을 보였으며, 55배 희석된 MeOH 추출물에 노출된 넙치의 경우 대조군 보다 약 2배의 발현율을 보이며 차이를 나타내었다. 이는 고압세척용출수와 MeOH 추출물이 넙치의 면역에 있어 영향을 끼친 것을 나타낸다. 심장 발달 단계의 넙치의 경우, 심장 형성 관련 유전자인 *SOX6*, *robo1*의 경우 MeOH extract에 노출된 넙치가 농도가 높아질수록 대조군에 비해 발현율이 높아지는 경향을 보이며, 심장 부종이 나타난 결과와 유사한 양상을 나타내었다. *bmp4*의 경우 뼈 형성과 관련 유전자로서 220배 희석된 농도보다 낮은 MeOH extract에 노출된 실험군에서 대조군보다 낮은 발현율을 보였으며, 110배 희석된 농도보다 높은 노출군에서 발현이 높았다. 꼬리 기형관련 유전자인 *acvr1*, *fgf3*, *furin*, *lefl*, *pi4ka*, *plod2*, *sall2*, *shha*, *sp8b*, *wnt3a* 또한, 고압세척배출수와 MeOH extract에 노출된 넙치에서 낮은 농도 구간에서 대조군 보다 낮은 발현율을 보이다 특정 농도 이상 일 때, 대조군 대비 유의하게 높은 발현율을 나타내는 등 110배 희석된 농도 이상 농도의 MeOH extract에 노출된 넙치에서는 대부분 대조군에 비해 높은 발현율을 보이는 것으로 나타났다.

(a)



(b)

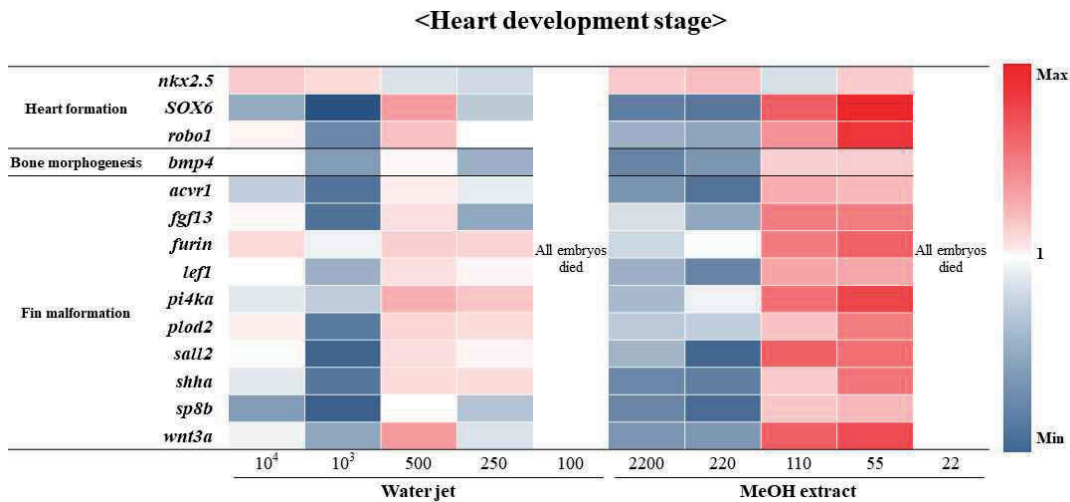
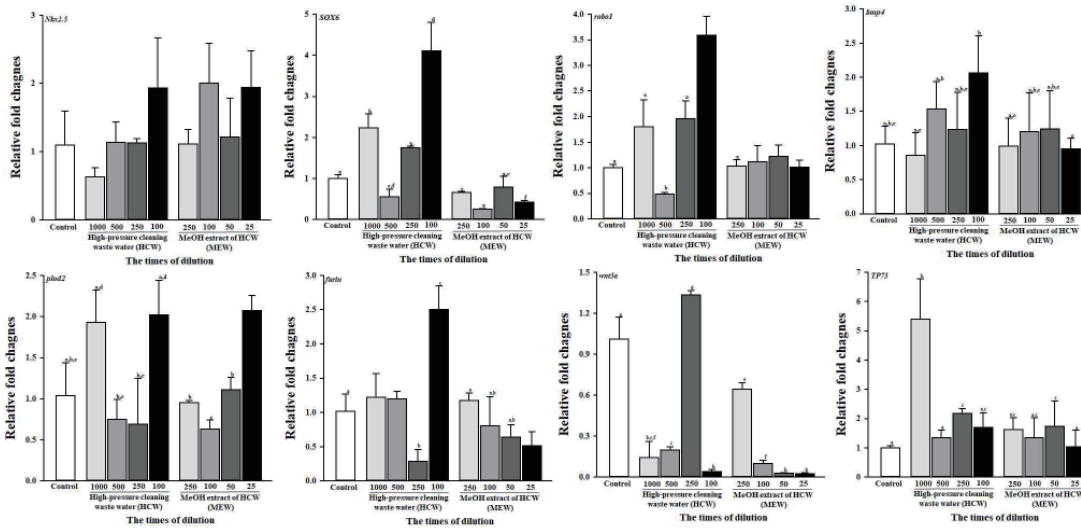


Fig. 3.2.1.5. qPCR results in embryonic flounder exposed to high-pressure cleaning waste water effluent and MeOH extract from RV/EARDO (a). The heat map of gene expression variation in the embryonic flounder exposed to high-pressure cleaning waste water effluent (b). Genes related to heart formation, *nkx2.5*, NK2 transcription factor related 5; *SOX6*, SRY-box containing gene 6; *robo1*, Roundabout guidance receptor 1; *bmp4*, Bone morphogenetic protein 4, related to bone morphogenesis; Genes related to fin malformation: *acvr1*, Activin A receptor type 1; *fgf13* Fibroblast growth factor 13; *furin*, furin; *lef1*, Lymphoid enhancer binding factor 1; *pi4ka*, Phosphatidylinositol 4-kinase alpha; *plod2*, Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2; *sall2*, Spalt like transcription factor 2; *shha*, Sonic hedgehog protein A precursor; *sp8b*, Sp8 transcription factor; *wnt3a*, Wnt family member 3a.

② 이사부로 고압세척용출수 노출구

Fig. 3.2.1.6에 나타난 바와 같이 HCW와 MEW에 노출된 심장발달단계의 넙치에서 심장 발달에 관여하는 유전자 *nkx2.5*, *SOX6*, *robo1*에서 전반적으로 노출 농도가 증가할수록 유전자의 발현이 증가되는 경향을 보였다. 이는 심장 부종이 나타난 결과와 유사한 양상을 나타내었다. 뼈 형성관련 유전자 *bmp4* 유전자 또한 특정 노출 농도에서 농도가 높아질수록 발현율이 높아지는 경향을 보이거나 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았다. 꼬리기형관련 유전자인 *furin*, *wnt3a*는 MEW 노출군에서 대조군과 유의한 차이를 보이며 발현율이 낮았으며, 노출 농도가 증가할수록 유전자 발현이 감소하는 경향을 보였다.

(a)



(b)

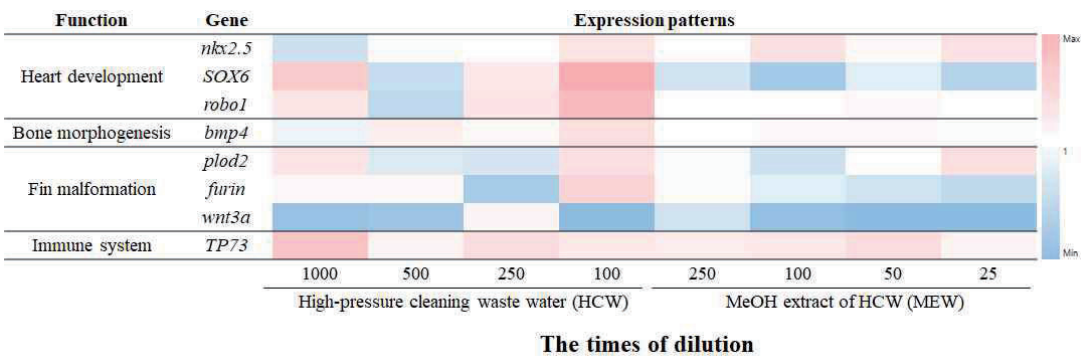


Fig. 3.2.1.6. qPCR results in embryonic flounder exposed to high-pressure cleaning waste water effluent and MeOH extract from RV/ISABU (a) The heat map of gene expression variation in the embryonic flounder exposed to two biocide (b). Genes related to heart formation, *nkx2.5*, NK2 transcription factor related 5; *SOX6*, SRY-box containing gene 6; *robo1*, Roundabout guidance receptor 1; *bmp4*, Bone morphogenetic protein 4, related to bone morphogenesis; Genes related to fin malformation: *furin*, furin; *plod2*, Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2; *wnt3a*, Wnt family member 3a; *TP73*, Tumor protein73 related to immune system.

또한, HCW와 MEW 노출 실험군에서 대부분의 농도에서 면역관련 유전자인 *TP73*의 발현이 대조군에 비해 증가하였다. 이 결과는 넙치 수정란의 면역에 있어 HCW와 MEW

이 영향을 끼친 것을 나타낸다. 전반적으로 같은 농도의 HCW와 MEW를 비교 시, HCW에 노출된 넙치에서 유전자의 발현율이 높은 경향을 나타내었다.

(다) 전사체 분석

① RNA-seq analysis

Table 3.2.1.2에 나타낸 바와 같이 이어도호의 고압세척배출수에 노출된 시료를 분석한 결과, 대조군의 경우 전체 75,675,926 reads 읽었고, 그 중 93.1%인 70,446,946의 clean reads를 얻었다. 고압세척배출수 노출군은 전체 77,271,058 reads 읽었으며, 그 중 71,232,480 (92.2%) clean reads를 얻었다. MeOH 추출물에 노출된 배아에서 64,136,816 reads를 읽었으며, 그 중 92.8%인 59,492,804의 clean reads를 얻었다. 전체 208,452개의 unigene을 분석하였으며, 총 길이는 178,793,979bp 이었다.

이사부호의 고압세척용출수에 노출된 실험에서 대조군의 경우 전체 44,858,970 reads 읽었고, 그 중 97.6%인 43,780,824의 clean reads를 얻었다. HCW 노출군은 전체 58,843,266 reads 읽었으며, 그 중 57,741,484 (98.1%) clean reads를 얻었다. MEW에 노출된 배아에서 66,407,920 reads를 읽었으며, 그 중 98.3%인 65,273,788의 clean reads를 얻었다.

Table 3.2.1.2. RNA-seq transcript assembly informations in flounder embryos exposed to water jet effluents and MeOH extract from RV/EARDO.

	Control	Water jet effluent	MeOH extraction
Number of reads	75,675,926	77,271,058	64,136,816
Number of clean reads	70,446,946 (93.1%)	71,232,480 (92.2%)	59,492,804 (92.8%)
Total length of reads	7,643,268,526	7,804,376,858	6,477,818,416
Length of unigenes (bp)	178,793,979		
Average length of unigenes (bp)	858		
Number of unigenes	208,452		

② GO Enrichment and Intergrated DEG analysis

이어도호의 고압세척용출수와 MeOH 추출물의 공통적인 up-regulated DEG는 123개이며, Down-regulated DEG는 88개 유전자이다. 또한, Fig. 3.2.1.7과 같이, 공통으로 관련된 DEG가 심장근육 조직 발생 및 근섬유 분절발생 기작에 유의한 영향을 받는 것으로

나타났다. Gene ontology 분석을 통해, 고압세척용출수와 MeOH 추출물에 노출된 배아가 세포 형태형성, 신호전달, 근질섬유 분절 유전자 등이 유의하게 영향을 받는 것으로 확인되었다(Fig. 3.2.1.8).

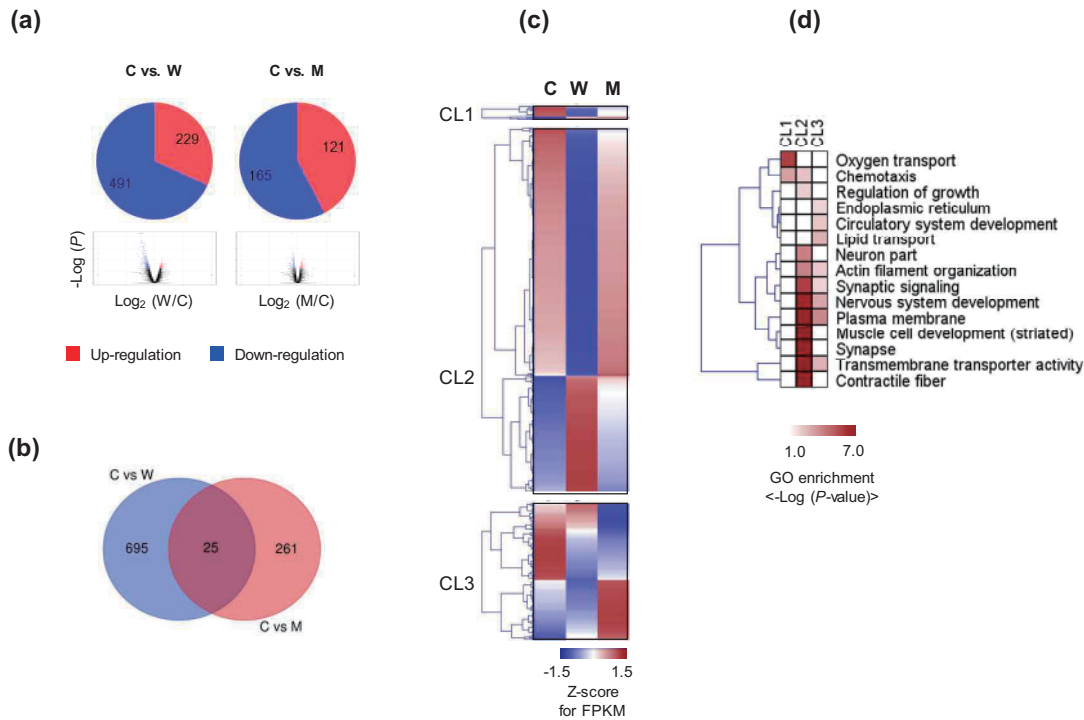


Fig. 3.2.1.7. Identification of differential expressed genes (DEGs) between embryos of embryonic flounder exposed to exposed to high-pressure cleaning waste water effluent and MeOH extract from RV/EARDO.

이사부호의 HCW와 MEW에 노출된 넙치 배아의 증가, 감소한 DEG 및 공통적, 독립적 DEG를 나타내었다(Fig.3.2.1.9). HWC 노출 후, 316종의 DEG가 증가하였으며, 174종의 DEG가 감소하였다(Table 3.2.1.3). 이때 증가한 주요 DEG로는 Fibroblast growth factor receptor 3, B-cell receptor-associated protein 29 등 면역, 생식 발생관련 유전자가 유의하게 증가하였으며, 감소한 유전자로는 Serine/threonine-protein kinase Sgk1, Monocarboxylate transporter 4 등과 같이 운반이나 환원반응등과 연관된 유전자들이 나타났다 (Table 3.2.1.4, Table 3.2.1.5). MEW에 노출된 경우, 증가 DEG가 788종 이었으며, 감소 DEG는 146종 이었다. Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 5등 생체 대사, 신호전달, 암이나 면역관련 유전자가 증가하였고, Transmembrane protein 87A,

Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8, Unconventional myosin-I α 등의 유전자가 유의하게 감소하였다 (Table 3.2.1.6, Table 3.2.1.7). 또한, HCW와 MEW 노출 군에서 공통적으로 나타난 DEG는 57종 이었으며, 독립적으로 나타난 DEG는 HCW의 경우 433종, MEW의 경우 544종 이었다.

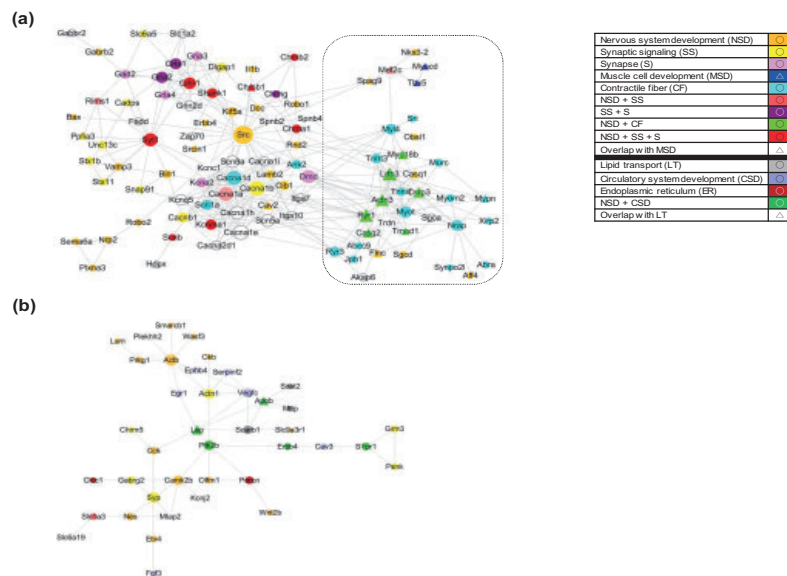
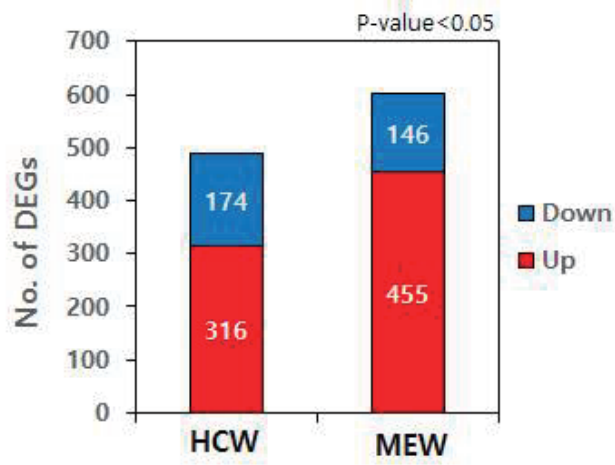


Fig. 3.2.1.8. Gene regulatory networks for DEGs associated with exposure to high-pressure cleaning waste water effluent and MeOH extract from RV/EARDO.

Table 3.2.1.3. RNA-seq transcript assembly informations of flounder embryos exposed to HCW and MEW from RV/ISABU.

	Control	High-pressure cleaning waste (HCW)	Methanol extract of HCW (MEW)
Number of reads	44,858,970	58,843,266	66,407,920
Number of clean reads	43,780,824 (97.6%)	57,741,484 (98.1%)	65,273,788 (98.3%)
Total length of reads	36,022,479 (82.3%)	48,009,757 (83.1%)	52,691,057 (80.7%)

(a)



(b)

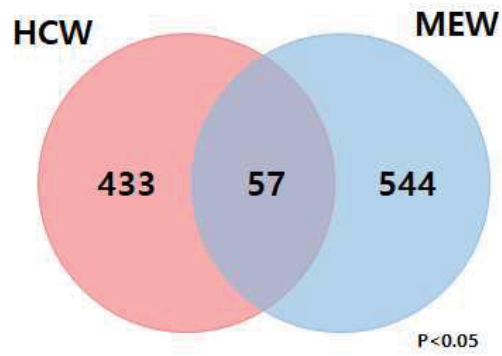


Fig. 3.2.1.9. up- and down-regulated DEG in flounder embryos exposed to HCW and MEW from RV/ISABU (a). Venn diagram of DEG (b).

Table 3.2.1.4. Function of top 12 up-regulated DEGs in flounder embryos exposed to HCW.

Gene ID	Gene Name	Description	log2fc	Function	Specific function
TBIG023168	<i>WDFY3</i>	WD repeat and FYVE domain-containing protein 3	2.78	Immune system	Autophagy
TBIG023974	<i>Ninl</i>	Ninein-like protein	2.36	Reproduction	Ovarian carcinogenesis
TBIG001636	<i>Ptchd3</i>	Patched domain-containing protein 3	2.29	Reproduction	Spermatid development
TBIG001118	<i>ST3GAL5</i>	Lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase	2.05	Development	Cell differentiation
TBIG024162	<i>EPHA7</i>	Ephrin type-A receptor 7	1.93	Development	Nervous development
TBIG019195	<i>Nrp2</i>	Neuropilin-2	1.78	Development, Cancer	Cardiovascular development
TBIG022016	<i>HERC1</i>	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1	1.78	Transport	Membrane transport
TBIG020760	<i>Plekhg5</i>	Pleckstrin homology domain-containing family G member 5	1.74	Signal transduction	Control of neuronal cell differentiation
TBIG023698	<i>KMT2C</i>	Histone-lysine N-methyltransferase 2C	1.74	Development	Nuclear protein
TBIG010222	<i>Podn</i>	Podocan	1.73	Development	Inhibition of cell proliferation and migration
TBIG021322	<i>fgfr3</i>	Fibroblast growth factor receptor 3	1.7	Development	transmembrane catalytic receptor
TBIG019019	<i>prom1a</i>	Prominin-1-A	1.6	Development, Immune system	Apoptosis, cell differentiation

Table 3.2.1.5. Function of top 11 down-regulated DEGs in flounder embryos exposed to HCW.

Gene ID	Gene Name	Description	log2fc	Function	Specific function
TBIG010606	<i>Sgk1</i>	Serine/threonine-protein kinase Sgk1	-3.27	Immune system	Cellular stress response
TBIG016744	<i>SLC16A3</i>	Monocarboxylate transporter 4	-2.9	Transport	Catalyzes the rapid transport across the plasma membrane
TBIG015863	<i>ldha</i>	L-lactate dehydrogenase A chain	-2.42	Metabolism	the conversion of L-lactate and NAD to pyruvate and NADH
TBIG014346	<i>ERO1L</i>	ERO1-like protein alpha	-2.05	Immune system	Apoptosis
TBIG013924	<i>Ppp1r3e</i>	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3E	-1.96		Insulin resistance
TBIG005050	<i>COX6B1</i>	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	-1.91	Metabolism	Electron transfer from reduced cytochrome c to oxygen
TBIG013535	<i>myc1</i>	Myc target protein 1 homolog	-1.83	Immune system	Apoptosis
TBIG019042	<i>PGAM1</i>	Phosphoglycerate mutase 1	-1.72	Cancer	Central carbon metabolism in cancer
TBIG019365	<i>FOX11</i>	Forkhead box protein 11	-1.71	Development	development of the endolymphatic system
TBIG020769	<i>RSBN1</i>	Round spermatid basic protein 1	-1.67	Gene expression	Histone demethylase
TBIG014551	<i>ldhba</i>	L-lactate dehydrogenase B-A chain	-1.61	Metabolism	interconversion of pyruvate and lactate with concomitant interconversion of NADH and NAD ⁺ in a post-glycolysis process

Table 3.2.1.6. Function of top 12 up-regulated DEGs in flounder embryos exposed to MEW.

Gene ID	Gene Name	Description	log2fc	Function	Specific function
TBIG001034	hmgcl1	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA lyase, cytoplasmic	2.85	Metabolism	Regulation of lipid metabolism
TBIG000662	GABRA2	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-2	2.39	Signal transduction	GABA receptor activation
TBIG024306	Rassf1	Ras association domain-containing protein 1	2.32	Cancer	tumor suppressor
TBIG015844	PTPN5	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 5	2.22	Signal transduction	MAPK signaling pathway
TBIG001964	SCHIP1	Schwannomin-interacting protein 1	2.19	Development	Ectoderm development
TBIG000434	Spon2	Spondin-2	2.17	Immune system	initiation of the innate immune response
TBIG010795	cnp-1	C-type natriuretic peptide 1	2.05	Signal transduction	cardiac conduction
TBIG005067	TUB	Tubby protein homolog	2	Signal transduction	obesity
TBIG019759	CHIA	Acidic mammalian chitinase	1.89	Immune system	protecting cells against apoptosis
TBIG006857	S100b	Protein S100-B	1.69	Development	cell cycle
TBIG002876	TNNI2	Troponin I, fast skeletal muscle	1.62	Cancer	tumor suppressor
TBIG006108	FOS	Proto-oncogene c-Fos	1.59	Immune system	apoptotic cell death

Table 3.2.1.7. Function of top 11 down-regulated DEGs in flounder embryos exposed to MEW.

Gene ID	Gene Name	Description	log2fc	Function	Specific function
TBIG006952	ErbB4	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4	-2.19	Development	Development of the heart
TBIG007119	SLC2A9	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 9	-2.05	Transport	Glucose transmembrane transporter activity
TBIG013657	TMEM87A	Transmembrane protein 87A	-1.97	Transport	retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network
TBIG000127	Btk	Tyrosine-protein kinase BTK	-1.78	Immune system	Apoptosis
TBIG013924	Ppp1r3e	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3E	-1.78		Insulin resistance
TBIG014551	ldhba	L-lactate dehydrogenase B-A chain	-1.73	Metabolism	interconversion of pyruvate and lactate with concomitant interconversion of NADH and NAD ⁺ in a post-glycolysis process
TBIG022624	Zp1	Zona pellucida sperm-binding protein 1	-1.73	Reproduction	induction of the acrosome reaction and prevents post-fertilization polyspermy
TBIG023928	EPSS	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	-1.69	Development, Cancer	Dendritic cell and Cancer cell migration
TBIG016744	SLC16A3	Monocarboxylate transporter 4	-1.66	Transport	Catalyzes the rapid transport across the plasma membrane
TBIG013790	MYO1F	Unconventional myosin-1f	-1.65	Movement	Intracellular movement
TBIG005050	COX6B1	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	-1.54	Metabolism	Electron transfer from reduced cytochrome c to oxygen

나. 곤쟁이/단각류 독성평가

(1) 서론

본 연구에서 독성평가물질인 선박부착파생물은 고압세척이나 수중 세척 등의 선체 cleaning작업 중 지속적으로 연안으로 유입될 수 있는 관심오염원이다. 그러나 이들의 다양한 화학물질이 결합된 형태로서 이들에 대한 급성독성자료를 산정한 사례는 매우 드물다. 따라서 본 연구에서는 이러한 선박부착파생물의 연안생물의 독성을 평가하기 위하여 비 표적생물인 까막곤쟁이 *Neomysis awatschensis*, 단각류, *Monocorophium uenoi* (350 μm -500 μm) 의 유생(<1-day old) 또는 *Neomysis awatschensis* 유생(<1-day old)을 Ocean급 연구선 이어도호와 Global급 연구선인 이사부호의 고압세척 용출수와 이를 메탄올로 추출한 추출액에 노출시켜 급성독성 영향을 평가하였다. 고압세척 용출수의 메탄올 추출액은 중금속의 독성을 배제하여 유기화합물 booster biocide의 선택적 독성을 확인하기 위하여 제작하여 실험에 투입되었다. 본 실험의 결과는 연안에서 선박의 다양한 작업 과정으로 인해 유출되는 페인트 성분으로 인한 해양생물의 급성독성실험의 결과로서, 향후 연안의 환경영향평가에 활용될 수 있는 기초적 독성결과로 생각되며, 나아가 수생태 보호를 위한 기준마련에도 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

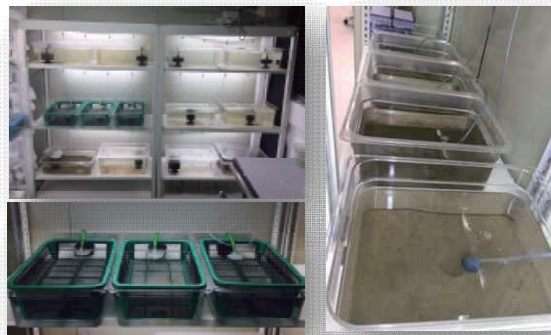


Fig. 3.2.1.10. Acute toxicity test in amphipoda (*Monocorophium uenoi*) and Mysid (*Neomysis awatschensis*),

(2) 재료 및 방법

이어도호와 이사부호의 고압세척시 채집한 고압세척 배출수(WJE)와 메탄올 추출액(WJME)을 일정량 취하여 액상 시료 원액을 100%로 시험을 실시하였고, 여과해수를 사

용하여 용액을 대상 농도로 희석하여 최종 시험구에 분주하였다(Fig. 3.2.1.10). 시험대상 종 및 시험조건은 아래 Table 3.2.1.8와 같다. 범위 찾기 시험 (range-finding test)은 시료를 100% 용액을 100배의 희석비율로 4 단계 희석 (100%, 1%, 0.01%, 0.001%)하였다. 독성값 결정 시험 (Definitive test)은 범위 찾기 시험의 결과로부터 시험생물이 모두 사망한 최저 농도부터 2 배, 혹은 3 배의 희석비율로 5 단계 희석한 후 노출농도를 결정하였다.

Table 3.2.1.8. Test condition in amphipoda (*Monocorophium uenoi*) and mysid (*Neomysis awatschensis*).

항목	시험 조건	
시험생물	<i>Neomysis awatschensis</i>	<i>Monocorophium uenoi</i>
시험 종류	지수식 시험방법	
시험 기간	4일	
온도	20℃	
염분	20psu	30psu
광주기	16:8(L:D)	0:24(L:D)
노출개체수	10	20
시험수부피	200 mL	500 mL
반복구	4	3
개체연령	24시간미만	350-500 μ m
먹이	알데미아	없음
물교환	2일에 1번	없음
최종측정치	생존율, LC ₅₀	생존율, LC ₅₀

(3) 결과 및 토의

(가) 이어도호 고압세척배출수 노출구

DMSO 0.1%는 시험생물의 사망에 영향을 주지 않는 농도임을 확인하였다. 본 실험 결과 생물 노출구에 투여된 시험물질의 농도가 높아짐에 따라 단각류와 곤쟁이의 생존율은 급격히 낮아진 것을 확인할 수 있었다. 고압세척배출수 시료에 노출된 단각류 유생과 곤쟁이는 1% 농도에서 생존하지 못하였으나 0.1% 농도에서 모두 생존한 결과를 나타냈다. 고압세척용출수 MeOH 추출물 시료에서는 4.55% 농도에서 전 개체가 사망하였으나 0.455% 농도에서는 모두 생존한 결과를 보였다(Fig. 3.2.1.11). 단각류에 대한 고압세척배출수 (WJE), 고압세척배출수 MeOH 배출수 (WJME)의 반수 치사농도(LC₅₀)는 각각

0.642%, 2.798% 였다(Table 3.2.1.9). 또한 까막곤쟁이에 대한 고압세척배출수(WJE), 고압세척배출수 MeOH 추출물 (WJME) 그리고 반수 치사농도(LC₅₀)는 각각 0.412%, 2.680% 였다(Table 3.2.1.9). 본 연구에서는 고압세척배출수(WJE)가 고압세척용출수 MeOH 추출물보다 단각류와 곤쟁이류에서 사망독성영향이 더 높은 것으로 확인되었으며, 이러한 결과는 중금속 독성영향까지 작용한 WJE가 유기booster biocide 독성영향만을 반영한 WJME보다 유해한 것을 확인시켜주는 결과이다. 따라서 고압세척배출수에 포함된 중금속독성영향이 전체독성의 강도를 약 4배에서 7배까지 높여주는 것으로 생각된다.

(나) 이사부호 고압세척배출수 노출구

곤쟁이를 대상으로 한 급성 생태독성 시험은 USEPA 2002, 'Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms' 가이드라인을 기반으로 국내 동일 시험종이 없어 일부조건을 수정하여 수행하였다. 각 시험물질에 대한 음성 대조군으로 여과해수, Methanol 0.1% 그리고 DMSO 1%를 두어 시험, 음성 대조군에 노출된 곤쟁이의 사망은 관찰할 수 없었다. 본 실험결과 생물 노출구에 투여된 시험물질의 농도가 높아짐에 따라 곤쟁이와 요각류의 생존율은 급격히 낮아진 것을 확인할 수 있었다. 고압세척배출수의 LC₅₀값은 곤쟁이의 경우 0.232% (48시간 노출) 이었고, 요각류는 0.006%(48시간 노출)로 나타났고, 고압세척용출수의 MeOH 추출물 시료에서는 곤쟁이의 LC₅₀ 값이 0.048%로 나타난 반면, 요각류에서는 0.056%로 확인되었다(Table 3.2.1.10, Fig. 3.2.1.12). 본 연구에서 고압세척용출수는 곤쟁이보다 요각류가 30배 민감한 결과를 보였으나, MeOH 추출물 시료에서는 곤쟁이와 요각류가 유사한 결과를 보여 오염물질의 구성에 따라 생물의 독성영향의 민감도가 다르게 나타나는 것으로 확인되었다. 곤쟁이는 MeOH 추출물에 노출되었을 때 독성영향이 더 크게 나타난 것으로 확인되었고, 요각류는 고압세척용출수에 노출된 실험구에서 더 민감한 독성반응을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 요각류가 중금속 독성영향에 매우 민감한 연구결과와 일치하며 향후 중간 독성민감도 연구에 유용한 자료가 될 수 있을 것으로 생각된다.

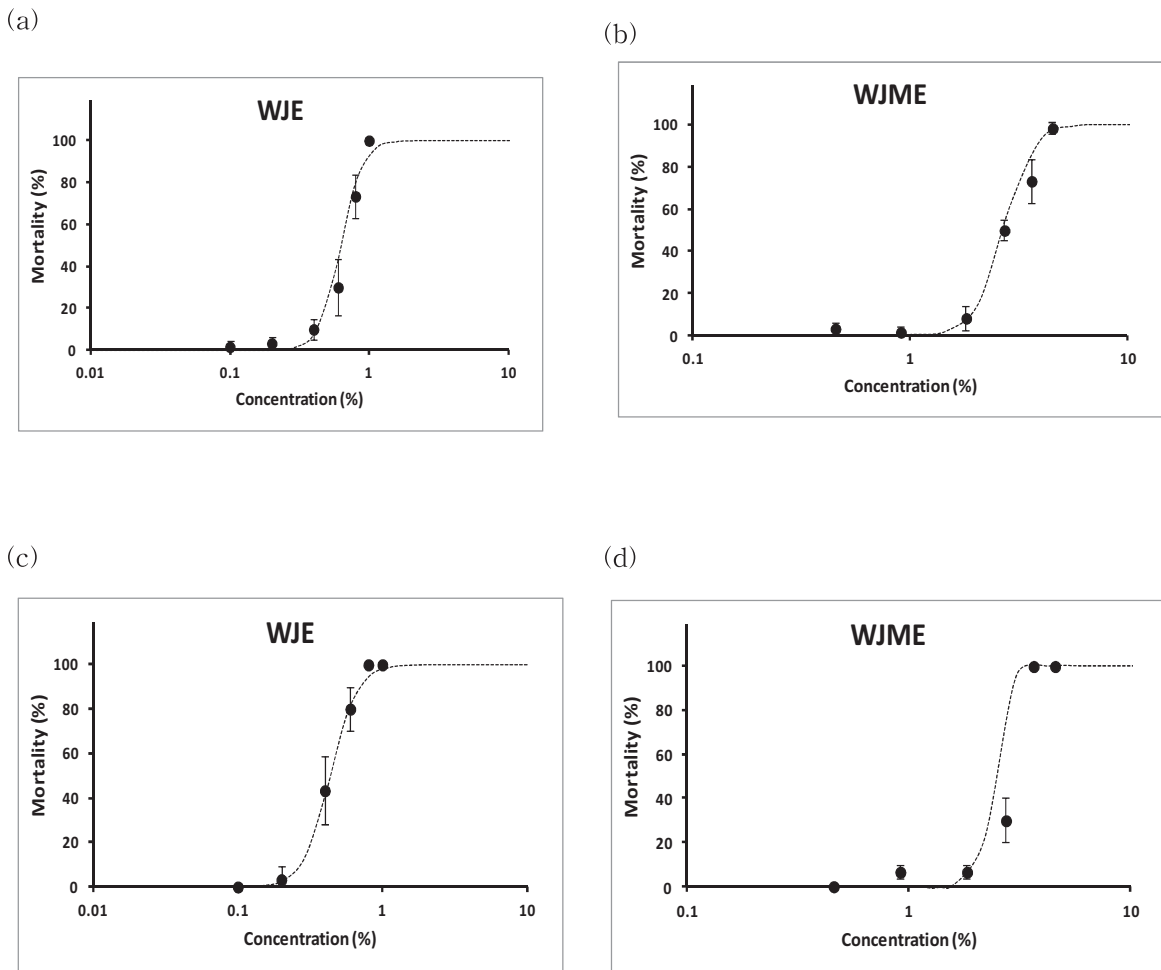


Fig. 3.2.1.11. Percentage of mortality in amphipoda (*Monocorophium uenoï*) (a and b) and mysid (*Neomysis awatschensis*) exposed to WJE and WJME from RV/EARDO (c and d).

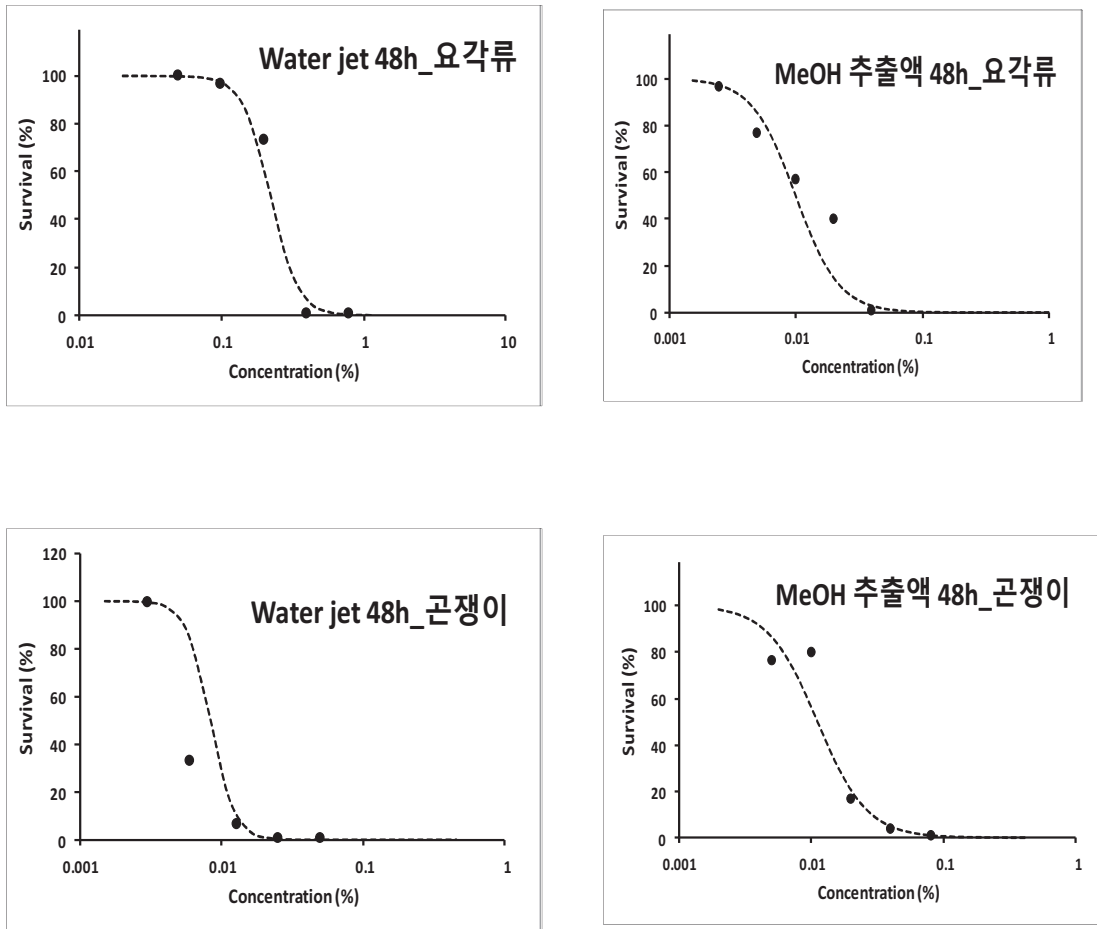


Fig. 3.2.1.12. Percentage of mortality in amphipoda (*Monocorophium uenoï*) and mysids (*Neomysis awatschensis*) exposed to WJE and WJME from RV/ISABU.

Table 3.2.1.9. Acute toxic parameter of amphipoda(*Monocorophium uenoi*) and mysids(*Neomysis awatschensis*) exposed to WJE and WJME from RV/EARDO.

sp.	Materials	LC ₅₀ (%)	95% CL	
			Lower limit	Upper limit
Amphipoda	Water jet extract	0.642	0.481	0.858
	Water jet MeOH extract	2.798	2.102	3.731
Mysids	Water jet extract	0.412	0.285	0.594
	Water jet MeOH extract	2.680	2.007	3.572

Table 3.2.1.10. Acute toxic parameter of mysids(*Neomysis awatschensis*) and copepod(*Tigriopus japonicus*) exposed to WJE and WJME from RV/ISABU.

sp.	Materials	LC ₅₀ (%)	95% CL	
			Lower limit	Upper limit
Copepod	Water jet extract	0.006	0.004	0.008
	Water jet MeOH extract	0.056	0.006	0.030
Mysids	Water jet extract	0.232	0.157	0.343
	Water jet MeOH extract	0.084	0.002	0.062

다. 둥근성게 수정률 독성평가

(1) 서론

성게는 민감도가 좋고 실험 방법이 간단하여 전 세계적으로 환경 평가 및 모니터링에 많이 이용되고 있다 (Nacci *et al.*, 1986; Dinnel *et al.*, 1987). 수정률 실험은 정자가 오염 물질에 어느 정도의 영향을 받는지를 파악하는 것으로, 건강한 정자를 일정시간 동안 오염물질에 노출시킨 후 알을 넣어서 수정률을 측정하는 방법이다 (Nacci *et al.*, 1986; Dinnel *et al.*, 1987; Carr *et al.*, 1996). 수정 실험은 절차가 간단하며, 한 쌍의 어미로부터 얻은 배우체를 이용하여 동시에 많은 양의 시료를 한꺼번에 분석할 수 있는 장점이

있다. 따라서 성게 배아를 이용한 수정과 발생 실험은 중금속에 대한 독성, 퇴적물의 오염평가 등에 많이 이용되고 있으며, 방오 페인트의 독성유무 및 살조제의 독성 평가에도 많이 이용되고 있다 (Carr *et al.*, 1996; Meador *et al.*, 1990; Bellas, 2006; Bellas, 2007; Rial *et al.*, 2016). 그러나 국내에서는 선박부착생물의 수중제거와 관련된 위해성 평가 및 관리기법 개발이 시도된 바 없으며, 특히 둥근성게의 배아를 이용한 연구 또한 전무한 실정이다.

성게는 ASTM, USEPA, OECD에서 모두 생물검정용으로 적합한 생물로 선정되어 있다. 본 연구의 대상종인 둥근성게는 표준시험종으로 규정되어 있지는 않으나 동일 속에 속하는 북극가시성게 (*Strongylocentrotus droebachiensis*)는 ASTM과 OECD, 성게 (*Strongylocentrotus purpuratus*)는 ASTM, USEPA, OECD 세 기관 모두에서 시험종으로 선정되었다. 그러나 둥근성게 (*Mesocentrotus nudus*)의 실험 방법은 국내에서 잘 개발되어 있고, 수정률 및 발생률 실험의 표준화가 이루어져 있다 (Lee, 2000; Won, 2000). 따라서 본 연구에서는 선박부착생물 수중제거 부산물에 대한 위해성 평가기법 개발을 목적으로 선박파생 부산물에 대한 위해성을 둥근성게 수정률 실험을 이용하여 평가해 보고자 한다.

(2) 재료 및 방법

실험에 사용된 둥근성게 (*Mesocentrotus nudus*)는 경남 거제도 주변해역에서 잠수작업을 통하여 채집하였다. 채집된 성게는 실험실로 옮겨 2 ton 용량의 수조에 실험이 실시되기 전까지 사육하였다. 사육하는 동안 먹이로는 건조된 다시마 (*Laminaria* sp.)를 공급하였고, 물은 2일에 1회 1/2씩 환수하였고, 사육수의 온도는 18°C로 조절하였다.

성게를 이용한 독성실험은 ASTM (1995)과 USEPA (1995)의 표준지침서를 Lee (2000) 및 Won (2000)에 의해 수정된 방법을 적용하여 수행되었다. 성게를 이용한 독성실험의 최종반응 (endpoint)으로는 수정률과 발생률의 두 가지가 있으며, 본 조사에서는 수정률을 최종반응으로 선택하였다. 수정률 실험은 정자를 시료에 노출시켜 정자의 활력이 얼마나 감소하는지를 알아보는 실험이다. 산란을 유도하기 위해 1N-KCl 용액을 성체의 입 주위로 주사하여 산란을 유도하였다. 정자의 경우 파스퇴르피펫을 이용하여 생식공으로부터 방출되는 정자를 직접 수집하여 1.5-ml 용량의 원심분리 튜브에 옮겨 담고 실험 전까지 5°C에서 보관하였다. 알의 경우 해수가 가득 담긴 비이커에 암컷을 거꾸로 뒤집어 놓아 방출된 알이 바닥으로 흘러내려 가라앉도록 하였다(Fig. 3.2.1.13). 수집된 알을 세척하기 위하여, 비이커를 흔들어 알이 떠오르게 한 후, 10분간 가라 앉혀 상등액을 버리는 작업을 3회 반복하였다. 이 과정을 통하여 크기가 작거나 성숙이 덜 된 알들을 제거

할 수 있었다.

시료를 각 농도 당 5 반복으로 well에 1ml씩 주입하고, 각 well마다 50 μl 의 정자 희석액을 첨가하였다. 20분 동안 노출시킨 후, 각 well마다 100 μl 의 알을 주입하였다. 정자와 알이 만나 수정이 이루어지도록 20 분간 더 기다린 후, 10% 완충포르말린을 100 μl 씩 주입하여 실험을 종료하였다. 실험이 종료된 수, 알의 바깥쪽에 투명한 막(수정막)이 형성되어 있는지 여부를 직접 관찰하여 수정란과 미수정란으로 구별하였다 (Fig. 3.2.1.14). 각 well별로 100개의 알을 전도현미경하에서 계수하였다. 수정률은 수정된 알의 백분율로 계산하였다.

실험은 한국해양과학기술원의 R/V 이어도호와 이사부호에서 채집한 선박 파생물 (Water jet)과 이를 MeOH로 추출한 용액을 대상으로 등근성계의 수정실험을 수행하였다. 실험 농도는 각 물질을 여과해수로 희석한 용액을 사용하였고, 농도는 이어도호의 선박 파생물 (water jet) 시료는 10~1000배 희석액을 사용하였고, 이사부호의 선박 파생물은 원액~1000배 희석액을 사용하였다. MeOH 추출액은 10~1,000,000배 희석액을 사용하였다. 이어도호의 경우 MeOH 추출액은 water jet 샘플을 35배, 이사부호는 40배 농축 시킨 용액으로 결과 산출 시 이를 환산하여 적용하였다.



Fig. 3.2.1.13. The appearance of spawning male and female (left) and endpoint of fertilization test (fertilized and non-fertilized egg) (right) of sea urchin, *Mesocentrotus nudus*.

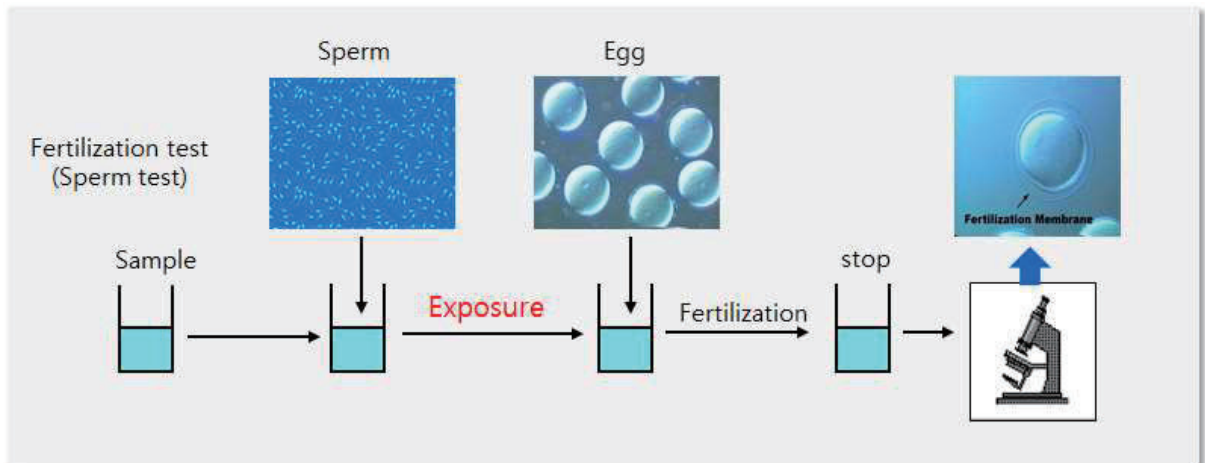


Fig. 3.2.1.14. A schematic diagram for the fertilization tests of sea urchin.

(3) 결과 및 토의

여과해수를 이용한 대조실험에서는 등근성계 수정률이 $97 \pm 0.4\%$ 였고, MeOH에 대한 실험 결과 10배 희석액에서는 수정률은 $4.1 \pm 8.1\%$ 였고, 100배 희석액에서의 수정률은 90% 이상으로 나타났다. 이어도호 파생 고압세척용출수 (water jet)에 대한 등근성계의 수정률을 측정된 결과, 10배와 100배 희석액에서는 각각 등근성계의 수정률이 $0.2 \pm 0.5\%$, $2.3 \pm 1.4\%$ 로 거의 수정이 진행되지 않았고, 1000배 희석액에서는 $79 \pm 5.8\%$ 였다. 실험 농도를 더욱 세분화 하여 100배, 200배, 400배, 800배 희석액에서 등근성계의 수정실험을 수행한 결과, 800배 희석액에서는 $45 \pm 3.1\%$, 400배 희석액에서는 $16 \pm 3.4\%$ 의 수정률을 보였고, 200배와 100배 희석액에서는 5% 미만의 낮은 수정률을 보였다(Fig. 3.2.1.15).

이사부호 고압세척용출수 (water jet)에 대한 등근성계 수정 실험 결과, 원액과 10배 희석액에서는 수정률이 각각 0%, 0.2%로 매우 낮았다. 100배 희석액에서는 수정률이 95.2%로 대조구와 통계적으로 차이를 보이지 않았다(Fig. 3.2.1.16). 이사부호의 water jet 샘플의 경우 원액을 실험에 사용하였기 때문에 시료 내 입자성 물질에 의한 영향을 파악하기 위해 시료를 여과하여 실험을 재 수행하였다. 그 결과, 여과 전과 동일하게 원액과 10배 희석액에서는 수정률이 거의 0%로 매우 낮았고, 100배 희석액에서부터 수정률이 90%이상으로 나타났다.

이어도호 고압세척용출수 (water jet)를 MeOH로 추출한 용액에 대한 등근성계 수정 실험을 수행한 결과, 3배와 30배 희석액에서는 수정률이 0%였고, 300배 희석액에서 수정률이 69%로 나타났다 (Fig. 3.2.1.15). 3,000배 이상 희석액에서는 수정률이 모두 90% 이상으로 나타났다. 이어도호의 water jet 샘플은 200배 희석액에서도 수정이 거의 진행되

지 않은 반면, MeOH 추출액에서는 300배 희석액에서도 60%이상의 수정이 진행되어 독성은 water jet 샘플이 MeOH 추출액에 비해 더 강한 것으로 나타났다.

이사부호의 고압세척용출수 (water jet)를 MeOH로 추출한 용액에 대한 수정률 실험 결과, 2.5~250배 희석액까지는 수정률이 거의 0%로 매우 낮았으며, 2,500배 이상의 희석액에서는 수정률이 90%이상으로 높게 나타났다 (Fig. 3.2.1.16). 이사부호의 경우 water jet은 100배 희석액에서도 수정률이 90%이상이었으나, MeOH 추출액은 250배 희석액에서도 수정률이 0%로 나타나 MeOH의 독성이 더 강한 것으로 나타났다. 이어도호의 MeOH 추출액의 경우 300배 희석액에 수정률이 60% 이상이었으나, 이사부호의 경우 250배 희석액에서도 수정률이 0%로 나타났다. 이처럼 둥근성게에 대한 독성은 water jet은 이어도호, MeOH 추출액은 이사부호의 독성이 강한 것으로 나타났다.

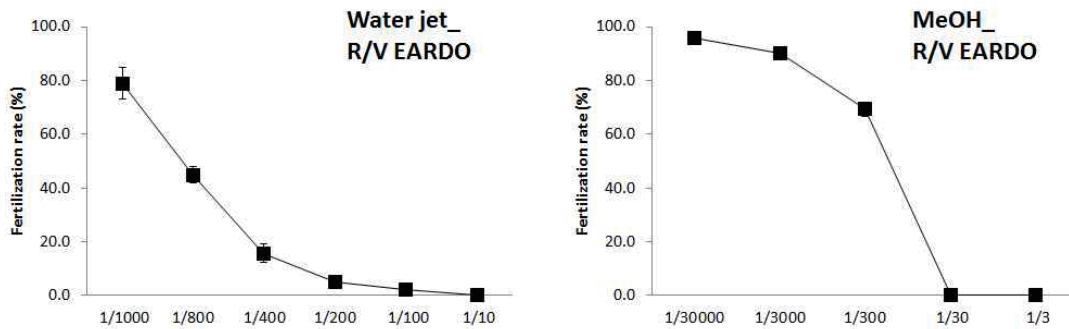


Fig. 3.2.1.15. The effects of sea urchin fertilization rate on the water jet and MeOH extraction of R/V EARDO.

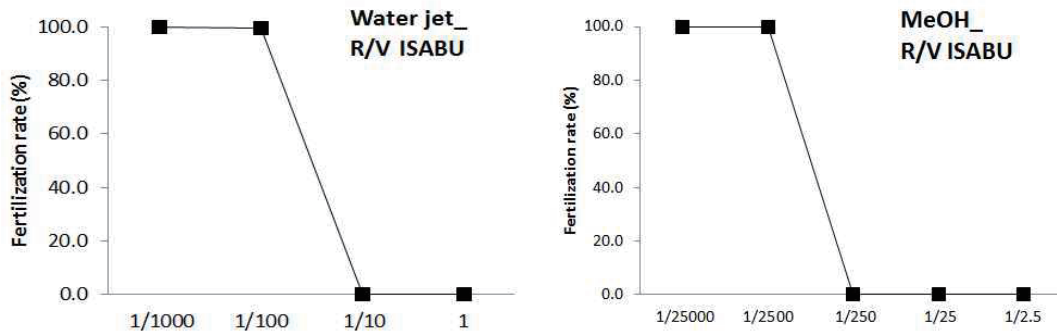


Fig. 3.2.1.16. The effects of sea urchin fertilization rate on the water jet and MeOH extraction of R/V ISABU.

라. 동물플랑크톤 독성평가

(1) 서론

해양 구조물과 선박의 수중에 잠기는 부분에는 다양한 부착생물들이 부착하게 되고 부착생물들이 증식된 구조물의 표면에서는 부식과 변형과 같은 산상을 입게 된다. 특히 선박 선저에 부착된 생물들은 선박운항 시 바닷물과의 마찰력을 증가시켜 연료효율을 나 빠지게 하여 경제적 손실을 야기 시킨다. 이러한 오손생물(Fouling organism)의 부착 및 성장을 억제하기 위해 각종 해양구조물과 선박에는 오래전부터 방오도료(Antifouling paint)를 사용해 왔다. 방오제로는 뛰어난 부착방지 효과를 가진 TBT (Tributyltin)계 도료를 널리 사용하였으나, 강한 독성으로 어패류의 폐사, 성장억제 및 임포섹스 등의 생태계 교란현상을 일으켜 점차 규제하고 있는 실정이다. 최근에는 TBT계 방오도료를 대체하기 위해 다양한 방오제들이 개발되어 사용되고 있다.

선박들은 정기적으로 선저에 부착된 생물들과 기능을 다한 방오도료를 제거한 뒤 새로 칠하게 되며, 이러한 작업은 일반적으로 선박을 육상의 Dry-dock에 상가하여 고압세척기(Water-jet)를 이용하여 물리적으로 제거하게 된다. 물리적으로 제거된 선박부착 파생물들은 별다른 관리 없이 조선소 근처 연안으로 흘러 들어가 해저에 축적되어 연안생태계에 영향을 미친다. 그러나 현재 국내에서 방오도료의 시판 이전의 성능평가는 있으나, 선박표면 도포 후 제거과정에서 발생하는 파생물에 대한 위해성에 대한 연구와 평가기준이 없는 실정이다.

본 연구는 해양생태계에서 기초생산자로부터 얻어진 에너지를 상위 소비자까지 연결하는 중간 고리 역할을 담당하는 동물플랑크톤에 대해 선박부착 파생물의 위해성을 파악

하고자 하였다. 이를 위해 실제 운항 중이던 선박의 선박부착 파생물을 이용하여 우리나라 연안에 우점하는 요각류 *Acartia omorii*와 *Paracalanus parvus* s.l.의 알(Egg)의 부화율과 유생 사망률에 미치는 영향에 대해 분석하였다.

(2) 재료 및 방법

동물플랑크톤에 대한 선박부착 파생물의 독성영향을 확인하기 위하여 한국해양과학기술원 소속 연구선인 이어도호(R/V EARDO) 상가수리 중 고압세척기(Water-jet)를 이용한 선박선저 세척 시 발생된 유출수(Effluents)를 취하여 실험에 사용하였다. 선박부착 파생물에 대한 실험은 Water-jet 유출수(Water-jet effluents)와 Water-jet 유출수의 메탄올 추출물(Water-jet MeOH extract)에 대한 요각류 알 부화율과 알에서 깨어난 유생의 사망률을 확인하였다. 실험 대상 생물은 우리나라 연안에 우점하는 요각류 *A. omorii*와 *P. parvus* s.l.를 채집하여 실험을 진행하였다. 대상 생물의 채집은 한국해양과학기술원이 위치한 경남 거제시 연안 및 장목에서 망구 42 cm, 망목 200 μ m의 원추형 네트를 이용하여 수 회 반복 채집하였으며, 생물 채집 장소에서 실험에 사용할 해수를 채수하였다. 채수해 온 해수는 이물질을 제거하기 위해 GF/F 여과지(47 mm, Whatman glass fiber filters)로 여과한 뒤 고압멸균기를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균 하여 실험에 사용하였다. 채집된 동물플랑크톤은 현미경 상에서 대상생물의 암컷 성체만을 골라내어 페트리 디쉬(Petridish)에 옮겨, 채집시 현장의 해수 수온으로 설정한 배양기에서 약 6시간 보관한 뒤 대상 생물의 알을 취하였다. 알은 멸균해수가 담긴 페트리 디쉬에 수 차례로 옮기면서 이물질을 제거하여 실험에 사용하였다. Water-jet 배출수와 Water-jet 메탄올 추출물은 멸균 해수로 희석하여 실험 농도 구간을 Table 3.2.1.11과 같이 6 well cell culture plate에 10 mL이 되도록 하여 4개의 반복구로 제조하였다. 농도별로 제조된 각 Cell에 요각류 알을 10개씩 투입하여 배양기에서 부화한 개체와 부화 후 유생의 생사를 확인하였다. 또한 각 실험구의 DO와 pH를 측정하여 실험 물질 외 다른 환경요인의 영향을 확인하였다.

Table 3.2.1.11. List for experiment concentration of water-jet effluents and water-jet MeOH extract.

Material	Water-jet effluents		Water-jet MeOH extract	
Species	<i>A. omorii</i>	<i>P. parvus</i> s.l.	<i>A. omorii</i>	<i>P. parvus</i> s.l.
Concentration (Dilution factor)	50	50	1	1
	100	100	2	2
	1000	1000	22	22
	5000	5000	110	110
		7500	220	155
		8000		220
		10000		1099

(3) 결과 및 토의

pH와 용존산소(DO)는 대조구와 모든 물질의 농도 구간에서 평균 8.04 ± 0.03 으로 비슷한 수준 이였으며, 용존산소의 포화도도 평균 98.38 ± 0.37 로 대부분 포화상태에 가깝게 나타났다(Table 3.2.1.12).

Table 3.2.1.12. Result of pH and dissolved oxygen saturation of water-jet effluents and water-jet MeOH extract.

	Concentration (Dilution factor)	pH	DO (%)
Water-jet effluents	Control	8.02	98.3
	50	7.99	98.9
	100	7.98	97.9
	500	8.08	98.5
	1000	8.05	98.3
Water-jet MeOH extract	Control	8.02	98.1
	2	8.05	97.8
	11	8.08	98.8
	22	8.08	98.7
	110	8.08	98.5

Water-jet 배출수에 대한 요각류 알의 부화율은 *A. omorii*의 경우 대조구에서

68.0±10.0%의 부화율을 보였으며, 5,000배 희석액에서 48.0±5.8%, 1,000배 희석액에서 35.0±10.0%, 100배 희석액에서 37.0±5.8%, 50배 희석액에서 33.0±5.8%의 부화율을 보였다 (Fig. 3.2.1.17). *P. parvus* s.l.는 대조구에서 96.7±5.8%의 부화율을 보였으며, 10,000배 희석액에서 86.7±5.8%, 8,000배 희석액에서 53.3±11.5%, 7,500배 희석액에서 30.0±0.0%, 5,000배 희석액에서 23.3±11.5%, 1,000배 희석액에서 17.0±6.8%의 부화율을 보였다. 100배와 50배 희석액에서는 모두 부화하지 않았다. Water-jet 배출수에 대한 24시간 후 요각류 유생 사망률은 *A. omorii*의 경우 대조구에서 12.5±10.0%의 사망률을 보였으며, 5,000배 희석액에서 48.0±5.8%, 1,000배 희석액에서 55.6±11.5%, 100배 희석액에서 83.3±5.8%, 50배 희석액에서 90.9±15.3%의 사망률을 보였다. *P. parvus* s.l.는 대조구에서 10.3±0.0%의 사망률을 보였으며, 10,000배 희석액에서 15.4±5.8%, 8,000배 희석액에서 53.3±11.5%, 7,500배 희석액에서 88.9±5.8%의 사망률을 보였다. 5,000배, 1,000배, 100배와 50배 희석액에서는 살아있는 유생이 발견되지 않았다.

Water-jet 메탄올 추출액에서는 *A. omorii*의 경우 대조구에서 87.0±8.1%의 부화율을 보였으며, 220배 희석액에서 40.0±10.0%, 110배 희석액에서 33.0±5.8%, 22배 희석액에서 30.0±10.0%, 2배 희석액에서 27.0±5.8%의 부화율을 보였다. 1배 희석액에서는 부화하지 않았다. *P. parvus* s.l.의 경우 대조구에서 96.7±5.8%의 부화율을 보였으며, 1099배 희석액에서 70.0±10.0%, 220배 희석액에서 33.3±5.8%, 165배 희석액에서 23.3±5.8%의 부화율을 보였다. 110배, 22배, 2배, 1배 희석액에서는 모두 부화하지 않았다. Water-jet 메탄올 추출액에서는 *A. omorii*의 경우 대조구에서 12.5±5.8%의 사망률을 보였으며, 110배 희석액에서 58.3±5.8%, 22배 희석액에서 70.0±11.5%, 2배 희석액에서 88.9±11.5%, 1배 희석액에서는 93.0±10.0%의 사망률을 보였다. *P. parvus* s.l.의 경우 대조구에서 10.3±0.0%의 부화율을 보였으며, 2,198배에서 11.5±5.8%, 1,099배 희석액에서 42.9±10.0%, 220배 희석액에서 90.03±10.0%의 사망률을 보였다. 110배, 22배, 2배, 1배 희석액에서는 모두 사망하여 살아있는 유생이 없었다.

24시간 후의 요각류 알 부화율은 *P. parvus* s.l.의 경우 Water jet 배출수보다 Water-jet 메탄올 추출물에서 다소 높았으나, *A. omorii*의 경우에는 두 물질 사이의 부화율을 명확하게 비교하기 어려웠다. 유생 사망률의 경우 두 종의 요각류 모두 Water-jet 배출수에서 더 높게 나타나, Water-jet 배출수의 독성이 더 강한 것으로 파악되었다. 두 종의 요각류는 전체적으로 물질의 농도가 높을수록 부화율이 낮아지고 유생의 사망률은 높아지는 경향을 보였으나, *A. omorii*의 경우 낮은 농도 구간에서의 부화율이 오차범위 안쪽으로 나타나 비교가 어려웠다. 두 종의 요각류 사이에서는 *A. omorii*가 *P. parvus* s.l.에 비해 높은 부화율과 낮은 유생 사망률을 보여 *A. omorii*가 선박부착 파생물의 독성

에 대해 더 높은 내성을 가지는 것으로 보인다. *P. parvus* s.l.의 24시간 후 반수치사농도 (LC₅₀) 결과에서도 Water-jet 배출수가 약 8,600배 희석액, Water-jet 메탄올 추출액이 약 650배 희석액으로 Water-jet 배출수가 더 높은 독성을 가지는 것으로 파악되었다(Table 3.2.1.13).

Table 3.2.1.13. LC₅₀ values of Water-jet effluents and Water-jet MeOH extract to *P. parvus* s.l.

Material	Water-jet effluents	Water-jet MeOH extract
24-h LC ₅₀ (Dilution factor)	8,652.7	654.0

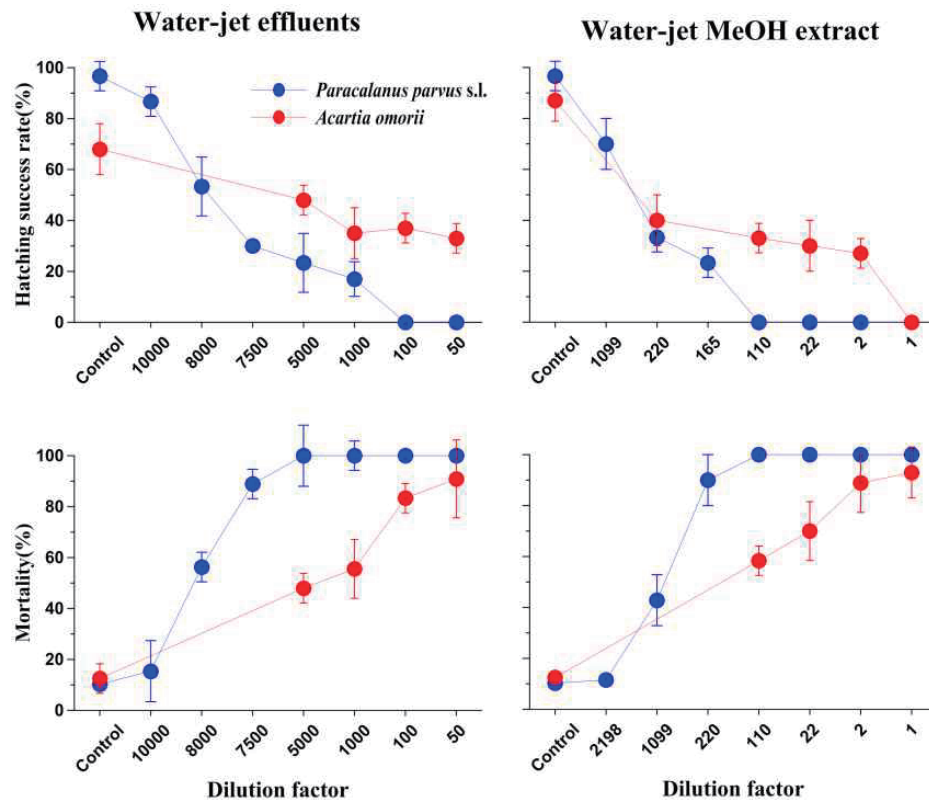


Fig. 3.2.1.17. Eggs hatching success rate and nauplii mortality for Water-jet effluents and Water-jet MeOH extract of *A. omorii* and *P. parvus* s.l.

2. 선박부착생물 모사실험 및 LAB-SCALE 영향 평가

가. 넘치배아 발생독성평가

(1) 서론

2차년도 연구에서는 선박표면 모사판을 한국해양과학기술원 남해연구소 해상가두리에 설치하여 70일간 부착한 후 표면을 세척하였고 용출수로 독성영향을 평가하였다. 시나리오별로 4개의 선박 표면 모사판 실험구 (Biocide, No-Biocide, Silicone, Background)를 디자인하였고 70일이 경과한 후 육상으로 끌어올려 멸균 해수로 세척한 후 용출수를 확보하였다. 채집된 용출수는 총 4개의 실험구에 따라 넘치배아에 노출시켜 48시간 동안 형태발생독성영향을 평가하였다. 4개의 실험구는 각각 1,000, 10,000, 1,000,000배 희석구로 나뉘어 노출하였고, 사망률과 형태기형의 빈도를 확인하여 비교분석 하였다. 본 실험을 통하여 현장의 수중제거과생물의 생물영향을 보다 현장에 가깝게 모사하고자 하였으나, 제한된 노출시간 등으로 본 연구결과를 해석함에 있어 실험조건등을 고려할 필요가 있다. 특히 일반적인 해양환경에서 수개월에서 년 단위로 수중에 머무르는 부착판의 표면 특성과 본 실험의 70일이라는 제한적인 시간에서 용출된 결과는 크게 차이날 수 있으며, 본 실험의 결과는 매우 제한적인 요소들이었음을 확인할 수 있었다.

(2) 재료 및 방법

(가) 대상 생물

본 독성영향평가에 사용된 생물은 연안 생물인 Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)의 수정란을 사용하였다. (주)해연 (Jeju, Korea) 으로부터 6 h post fertilization (hpf)된 수정란을 구입하여, 17°C의 필터 해수에 24시간 정치 후 사용하였다.

(나). 시험대상물질 및 제조

① 멸균 해수 제조

해수를 0.22mm filter (Corning® Top Vacuum Filter CA Membrane, Corning Co., NY) 로 필터 후, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하여 사용하였다.

② 선박표면 모사판 용출수 샘플링

선박표면 모사판을 실험실로 옮겨 플라스틱 솔로 부드럽게 세척하여 멸균해수에 용출시켰다(Fig. 3.2.2.1).

(다) 형태발생독성영향평가

Optic vesicle 단계인 수정란을 멸균 해수 10mL이 담긴 각각의 well(Nunc™ Nunclon™ Vita 6-Well Multidish, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)에 약 30개 씩 분주하였다. 그 후 다양한 농도 Background, 1,000배, 10,000배, 100,000로 희석시킨 후 노

출실험에 사용하였다. 시험물질에 수정란을 노출 시켰다. 노출 24시간 후, 노출 용액의 반을 새로 제조한 시험 물질과 멸균 해수로 교체 하였다. 노출 시킨 수정란은 17 ± 1 °C에서 48시간 동안 배양하였다. 노출 후 24시간 마다 생존여부를 기록하였고, 48시간이 지난 후 형태학적 기형 (심장부종, 꼬리기형, 척추만곡)을 관찰하여 기록하였다. 모든 실험은 3 반복으로 진행하였다.



Fig.3.2.2.1. Simulation experiment of the in-water cleaning effluent.

(3) 결과 및 토의

꼬리기형 빈도는 silicone, background 실험구의 10,000배 희석구간에서 유의한 증가를 보였고, 척추만곡 빈도는 silicone, background 실험구의 10,000배 희석구간에서 유의한 증가를 보임, 심장부종 빈도는 Biocide, silicone, background 실험구의 10,000배 희석구간에서만 유의한 증가를 확인하였다(Fig. 3.2.2.2, Fig. 3.2.2.3). 전체적으로 그러나 모든 실험구에서 독성영향은 매우 낮은 수준이었고, Background역시 시나리오상의 대조구이긴 하나 화학분석결과에서 Ba 농도가 상대적으로 다른 실험구보다 높게 나오는 등 부착판 코팅처리 물질이 일부 영향을 미친 것으로 예측된다.

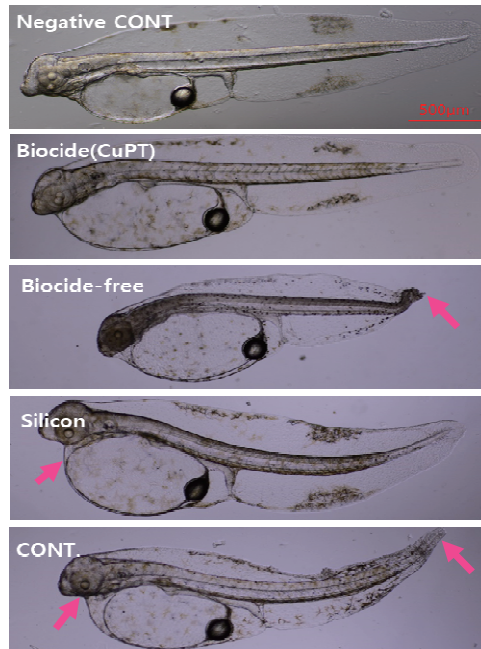


Fig. 3.2.2.2. Malformation of embryonic flounder exposed to waste water from in-water cleaning simulation.

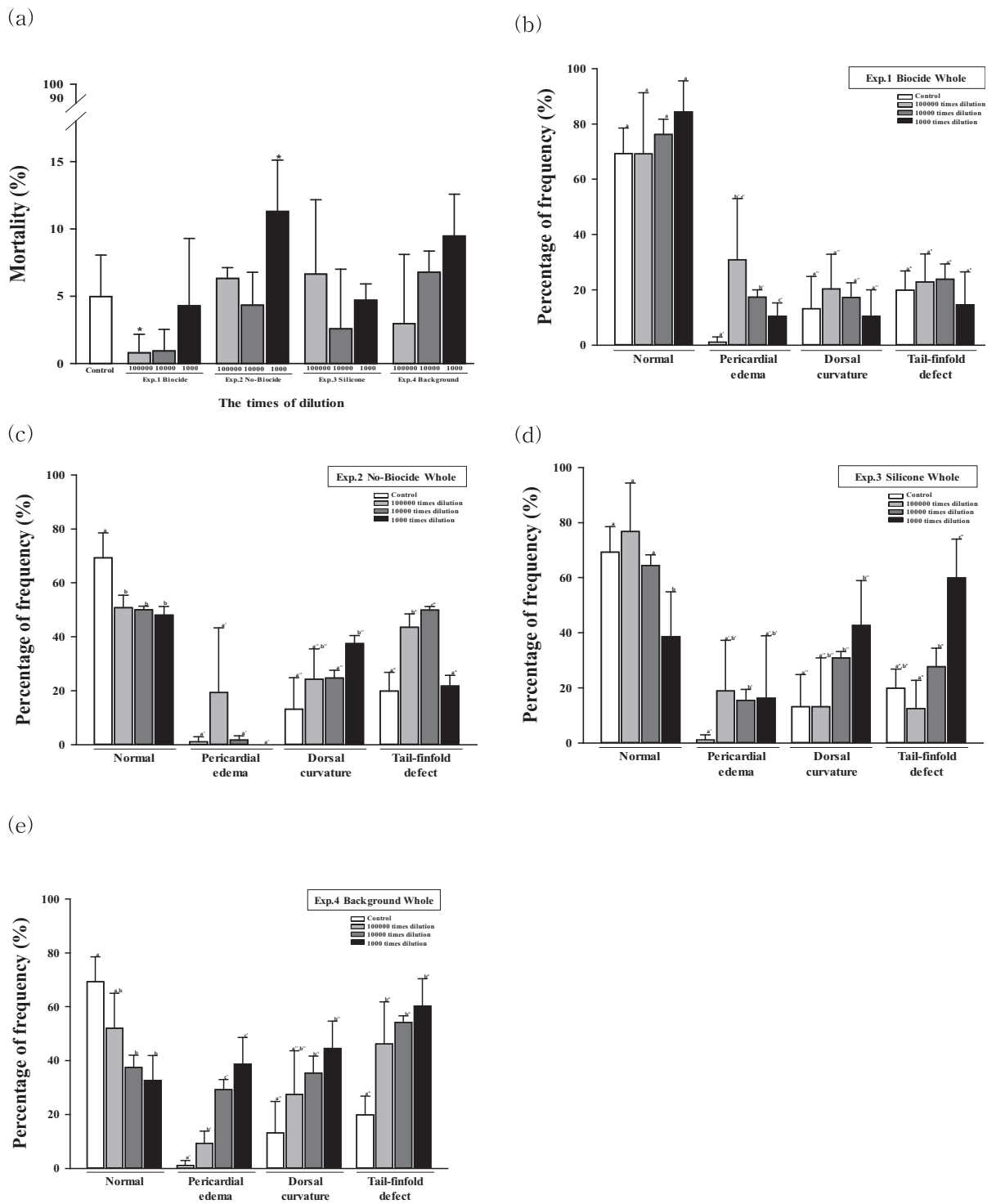


Fig. 3.2.2.3. Frequency percentage of malformation in embryonic flounder exposed to waste water from in-water cleaning simulation.

나. 등근성게 수정률 독성평가

(1) 서론

선박의 부착 생물을 제거하기 위해 고압세척법을 사용할 경우, 그로인해 파생되는 고압세척용출수 내에는 방오 페인트에 함유된 물질이 용출되어 나온다. 이러한 물질들이 해양으로 여과 없이 배출 될 경우 입자성 물질과 중금속 등으로 인해 해양에 서식하고 있는 다양한 생물들이 직, 간접적으로 영향을 받을 것이다. 실제 해양과학기술원의 글로벌 급 R/V 이사부호의 상가수리 시 발생된 용출수 내에는 용존상 구리, 아연 농도가 해양환경기준은 물론 배출허용기준을 상회하는 매우 높은 수준으로 검출되었고, 망간, 바륨, 철, 비소 등도 높은 수준으로 검출되었다. 또한 고압세척용출수 입자 내에는 구리, 아연, 철, 망간 등이 고농도로 함유되어 있었다.

중금속은 성게의 초기 배 발생과 성체의 성장에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 중금속은 성게의 정자 활성화와 운동성을 둔화시키고, 수정 과정에서 생리적인 현상에 영향을 미치며, 배 발생 시 소화대사경로 (respiratory metabolic pathway)에 영향을 주어 초기 배 발생을 저해한다 (유, 1998). 기존 연구결과, 비소와 크롬은 말뚝성게 (*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 초기 배 발생에 영향을 주어 발생률에도 영향을 미치는 것으로 나타났으며 (황 등, 2013), 납과 아연 역시 성게의 수정 및 발생에 영향을 주는 것으로 나타났다 (황 등, 2012). 북쪽말뚝성게 (*Strongylocentrotus intermedius*)는 중금속 중 Cu에 대한 민감도가 가장 높은 것으로 나타났고, Ni에 노출되었을 경우 기형을 유발하는 배아로 유전자 변화가 나타났다 (류, 2008).

고압세척용출수 및 입자성 물질은 해양 생태계에 노출될 경우 성게를 비롯한 다양한 해양 생물에 영향을 미칠 것으로 우려된다. 따라서 본 연구에서는 모사판 실험을 통해 발생하는 선박 파생물 및 이를 MeOH로 추출한 용액에 대한 위해성 평가를 등근성게 수정률 실험을 통해 파악해 보고자 한다.

(2) 재료 및 방법

모사판 실험은 4개의 처리구 (1) Biocide, (2) No-Biocide, (3) silicone, (4) Background로 구분하여 실험을 수행하였다. (1) Biocide 처리구는 구리와 CuPT가 함유된 방오도료를 사용한 시편, (2) No-Biocide 처리구는 구리와 CuPT가 제외된 방오도료를 사용하여 시편을 제작하였다. (3) silicone 처리구는 실리콘계열 방오도료를 사용하였고, (4) Background는 방오도료가 포함되지 않은 primer+tie 페인트가 칠해진 시편을 사용하였다. 이렇게 4가지의 처리를 한 시편을 해수 중에 약 2개월간 노출 후 수중제거 (brushing)를 모사하여 부착물을 제거하고 이때 발생하는 파생물을 채집하여 실험에 사

용하였으며 (water jet), 파생물을 MeOH로 추출한 물질도 실험에 사용하였다.

농도는 원액부터 10,000배 희석액을 사용하였다. 또한 water jet 샘플의 원액시료에는 방오 페인트 조각들과 함께 입자성 물질이 다수 포함되어 있어서 0.45 μm 필터로 여과한 후 여과액에 대한 실험도 동시에 수행하여 입자성 물질이 등근성계의 수정률이 미치는 영향도 살펴보았다. MeOH 추출액은 100, 1,000배, 그리고 10,000배 희석액을 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 희석액, 대조구 실험은 모두 거제 장목만에서 채수한 여과 해수를 사용하였다. MeOH 추출액은 water jet 샘플을 10배 농축 시킨 용액으로 결과 산출 시 이를 환산하여 적용하였다.

실험방법은 2절 1. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE 영향 및 지표 발굴의 다. 등근성계 수정률 독성실험의 (2) 재료 및 방법과 동일하게 수행하였다(Fig. 3.2.1.13).

(3) 결과 및 토의

여과 해수를 이용한 대조실험 결과 등근성계 수정률은 $97.3 \pm 1.6\%$ 였고, MeOH 1%에서의 수정률은 $99.3 \pm 1.2\%$ 였다. MeOH 10% 이상의 농도에서는 수정이 진행되지 않았다. 모사판 실험에 대한 등근성계 수정률은 처리구에 따라 다소 차이를 보였다. Biocide 처리한 모사판에서는 원액과 10배 희석액에서 등근성계의 수정률이 각각 0%, 35%로 대조구와 차이를 보였다(Fig. 3.2.2.4). No-Biocide, Background 처리한 모사판에서는 원액에서만 수정률이 대조구와 차이를 보였고, Silicone 처리한 모사판은 원액에서도 수정률이 대조구와 차이를 보이지 않았다. Water jet 내 입자성 물질에 의한 영향을 파악하기 위해 원액을 여과하여 수정률 실험을 수행한 결과, Biocide, Silicone, 그리고 Background 처리구에서는 여과하지 않은 실험구와 동일한 결과를 나타냈으나, No-Biocide 처리구에서는 여과하지 않은 원액에서는 수정률이 20% 미만으로 낮았으나, 여과 후에는 원액에서도 수정률이 90%이상으로 높게 나타났다(Fig. 3.2.2.5).

모사판 부산물을 MeOH로 추출한 물질의 경우, Biocide 처리구는 10배 희석액에서 80% 이상의 수정률을 보여 모든 실험구에서 수정률이 대조구와 차이를 보이지 않았다. No-Biocide 처리구의 MeOH 추출액은 10배 희석액에서 수정률이 52%로 대조구와 통계적으로 차이를 보였고, 100배 희석액부터 수정률이 90%이상으로 나타났다 (Fig. 3.2.2.6). Silicone 처리구는 10배 희석액에서 수정률이 $96.3 \pm 2.1\%$ 였으나, Background 처리구에서는 10배와 100배 희석액에서 모두 수정률이 0%로 나타났다.

모사판 실험에 의한 water jet 내 독성은 Biocide 처리구에서 가장 높았고, MeOH 추출액 중에서는 Background 처리구의 독성이 가장 강한 것으로 나타났다.

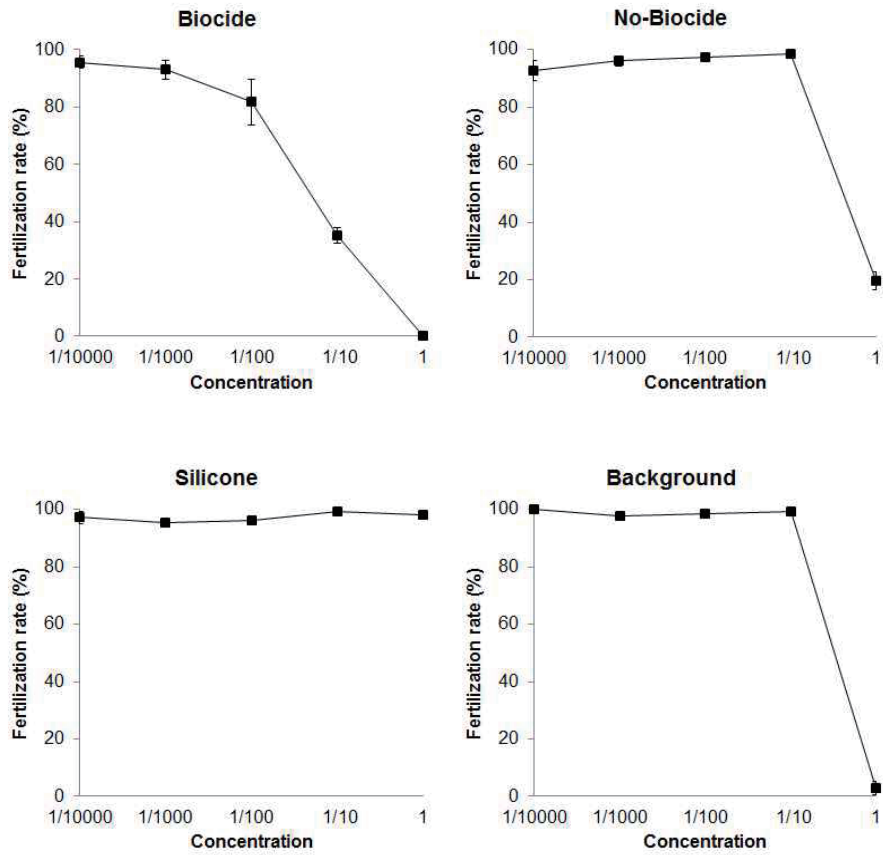


Fig. 3.2.2.4. The effects of sea urchin fertilization rate on the water jet of simulated experiment for ship's biofouling.

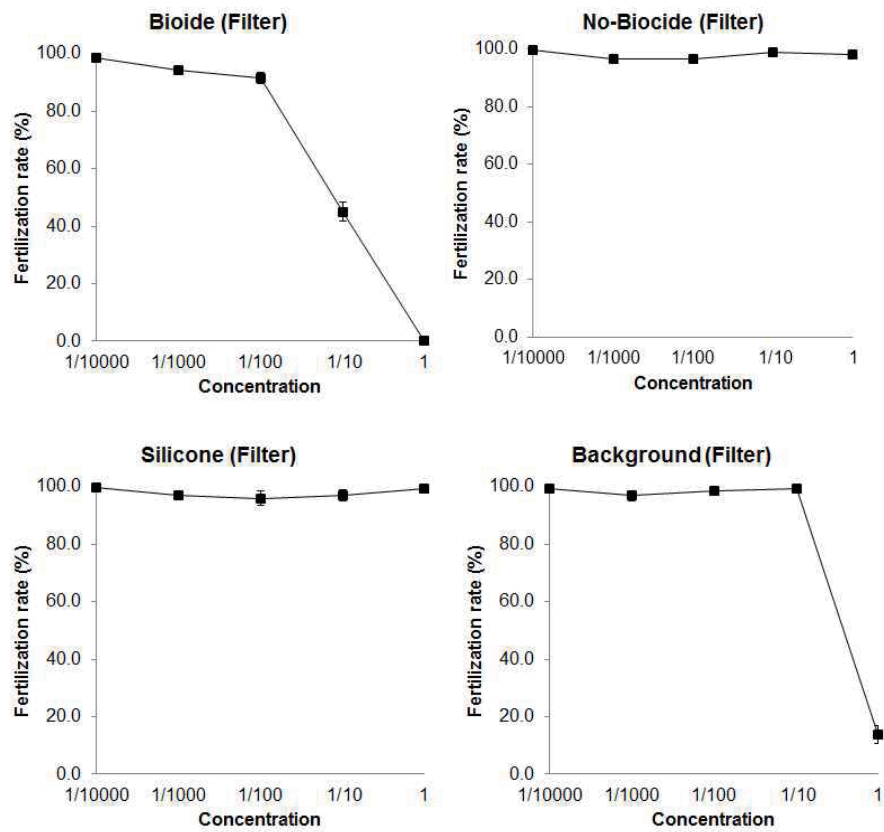


Fig. 3.2.2.5. The effects of sea urchin fertilization rate on the filtered water jet of simulated experiment for ship's biofouling.

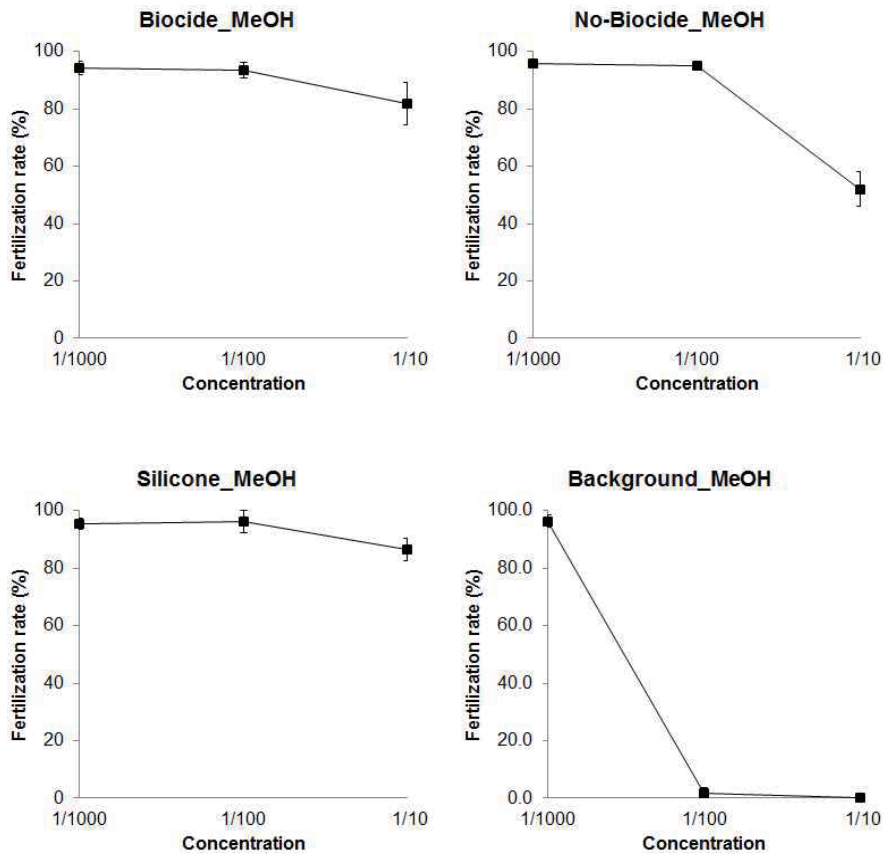


Fig. 3.2.2.3. The effects of sea urchin fertilization rate on the MeOH extraction of simulated experiment for ship's biofouling.

다. 동물플랑크톤 독성평가

(1) 서론

선체부착생물 수중 제거는 사용하는 수중 제거 기술의 종류, 부착생물과 함께 배출되는 방오도로 종류 및 살생물제 함량에 따라 서로 다른 수준의 해양 환경 위험을 야기 할 수 있다. 현재 사용 되고 있는 수중 제거 기술을 보면, 모터의 동력 힘을 이용하지 않고 브러쉬(Brush), 끌(Scraper) 등을 이용해서 제거하는 수동 제거(Manual removal) 방식, 모터 동력의 힘을 이용해서 부착생물을 제거하는 기계적 제거(Mechanical removal) 방식, 기계적 힘을 이용하지만 추가적으로 사멸된 생물을 분리·수거 하지 않아도 되는 표면처리(Surface treatment) 방식, 선체 표면을 감싸서 처리하는(Shrouding technologies) 방식 등이 있다. 일반적으로 수동 제거 및 감싸서 부착생물을 제거하는 방식은 낚시배, 요트 등과 같은 소형선박에 주로

적용되며, 상선에는 모터의 동력을 이용해서 부착생물을 제거하는 기계적 제거 및 표면 처리 방식이 주로 사용된다. 기계적 제거 방식은 다시 잠수부들의 차량(cart)을 직접 운용하는 방식과 원격제어차량(Remotely operated vehicle, ROV) 등을 조정하면서 처리하는 방식으로 구분된다 (Morrisey and Woods, 2015). 현재 전 세계적으로 가장 보편적으로 많이 사용하는 있는 수중제거기술은 기계적 제거방식인데, 대다수의 방법이 선체 방오도료에 영향을 줄 뿐만 아니라 제거된 과생물을 수거할 수 있는 시스템도 없이 운영되고 있다. 실례로 회전식 브러쉬(Rotary brush) 방식을 이용해서 선체 선박 표면에 부착된 생물 제거 시 매년 약 1,000,000톤 정도의 살생물제를 함유한 활성물질이 발생되며, 이는 작업을 수행하는 잠수사 및 해양환경에 심대한 영향을 미칠 수 있다. 또한, 선체부착생물에 대한 수중 제거(in-water cleaning)는 시간 및 비용적인 측면에서 장점을 가지지만 외래종 및 유해물질 유입등과 같은 환경적인 문제를 유발할 수 있다. 본 연구는 해양생태계에서 기초생산자로부터 얻어진 에너지를 상위 소비자까지 연결하는 중간 고리 역할을 담당하는 동물플랑크톤에 대해 선박부착 과생물의 위해성을 파악하고자 하였다. 이를 위해 다양한 선박 도료 모사판 조건하에서 수중제거 과생물에 대한 동물플랑크톤 독성 영향에 대해 분석하였다.

(2) 재료 및 방법

방오도료 모사실험에서 4 종류 시험구(**EXP. 1:** Background + Tie coat, **EXP. 2:** Background + Tie coat + Paint(Cu PT 제거), **EXP. 3:** Background + Tie coat + Biocide, **EXP. 4:** Background + Tie coat + silicone)의 모사판을 한국해양과학기술원 남해연구소 부두에 약 60일간 수심 1m에 설치하였다. 이후 생물이 부착된 모사판을 실험실로 옮긴 후 멸균 여과해수에서 브러시로 부착생물을 수중 제거하여 얻어진 모사판 과생물 유출수(Effluents)와 유출수 메탄올 추출물(MeOH extract)에 대한 동물플랑크톤 독성 시험을 진행하였다. 선박부착 과생물 유출수 및 메탄올 추출물의 실험 농도는 Table 3.2.2.1에 정리하였다.

Table 3.2.2.1. Experiment concentration of AFS static panel test.

	모사판 파생물 유출수(Effluents)				메탄올 추출물(MeOH extract)			
	EXP. 1	EXP. 2	EXP. 3	EXP. 4	EXP. 1	EXP. 2	EXP. 3	EXP. 4
희석농도 (Dilution)	5	5	5	5	5	5	5	5
	10	10	10	10	10	10	10	10
	100	100	100	100	50	50	50	50
	1,000	1,000	1,000	1,000	100	100	100	100
	10,000	10,000	10,000	10,000				

실험 대상 생물은 우리나라 연안에 우점하는 요각류 *Paracalanus. parvus* s.l.를 대상으로 실험을 진행하였다. 대상 생물의 채집은 한국해양과학기술원이 위치한 경남 거제시 연안 및 장목에서 망구 45 cm, 망목 200 μ m의 원추형 네트를 이용하여 수 회 반복 채집하였으며, 생물 채집 장소에서 실험에 사용할 해수를 채수하였다. 채수한 해수는 이물질을 제거하기 위해 GF/F 여과지(47 mm, Whatman glass fiber filters)로 여과한 뒤 고압멸균기를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균 하여 실험에 사용하였다. 채집된 동물플랑크톤은 현미경 상에서 대상생물의 암컷 성체만을 골라내어 페트리 디쉬(Petridish)에 옮겨, 채집 시 현장의 해수 수온으로 설정한 배양기에서 약 6시간 보관한 뒤 대상 생물의 알을 취하였다. 알은 멸균해수가 담긴 페트리 디쉬에 수 차례로 옮기면서 이물질을 제거하여 실험에 사용하였다. 모사판 파생물 유출수와 메탄올 추출물의 시험수를 6 well cell culture plate에 10 ml이 되도록 하여 3개의 반복구로 최종 실험 농도에 맞춰 제조하였다. 농도별로 제조된 각 Well에 알을 10개씩 투입하여 배양기에서 부화된 개체를 확인하여 부화율(hatching success rate)을 계산하였다. 또한 24시간 후 *P. parvus* s.l. 유생(nauplii)의 사망여부를 통해 사망률(mortality)을 확인하였다.

(3) 결과 및 토의

4 종류 시험구(**EXP. 1:** Background + Tie coat, **EXP. 2:** Background + Tie coat + Paint(Cu PT 제거), **EXP. 3:** Background + Tie coat + Biocide, **EXP. 4:** Background + Tie coat + silicone)의 모사판 파생물 유출수(Effluents) 및 유출수 메탄올 추출물(MeOH extract)에 대한 요각류 *P. parvus* s.l.의 부화율 독성시험 결과를 Fig. 3.2.2.7에 나타내었다. 모사판 파생물 유출수에 대한 부화율 시험에서 독성 구배가 있을 것으로 예측되었던 3종류 시험구(EXP. 1, EXP. 2, EXP. 3)에서 유출수 희석 농도에 대한 부화율이 50-97%로 3종류 모두 유사한 패턴으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 모사판 시험구 EXP.

4(Background + Tie coat + silicone)에서는 모든 농도 구간에서 90% 이상의 부화율을 보여 모사판의 독성 영향이 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 모사판 가장 외부에 도포된 silicone 코팅에 의해 Background + Tie coat에 포함된 독성 물질 용출이 차단한 결과로 판단된다. 모사판 유출수 메탄올 추출물에 대한 시험결과에 대해 살펴보면, 모사판 실험구(EXP. 1, EXP. 2, EXP. 3)에서는 파생물 유출수 결과와 마찬가지로 유의한 독성 구배가 나타나지 않았으며, 오히려 독성 정도 낮을 것으로 예측된 EXP. 1 (Background + Tie coat)의 희석농도 5배와 10배에서 20% 이하의 낮은 부화율을 보였다. 이러한 결과는 모사판 방오도로 활성물질 농도 분석 및 추가 실험을 통해 검증할 필요성이 있음을 암시한다. 시험구 EXP. 4(Background + Tie coat + silicone)에서는 모든 농도 구간에서 70% 이상의 부화율을 보여 파생물 유출수 결과와 유사하였다.

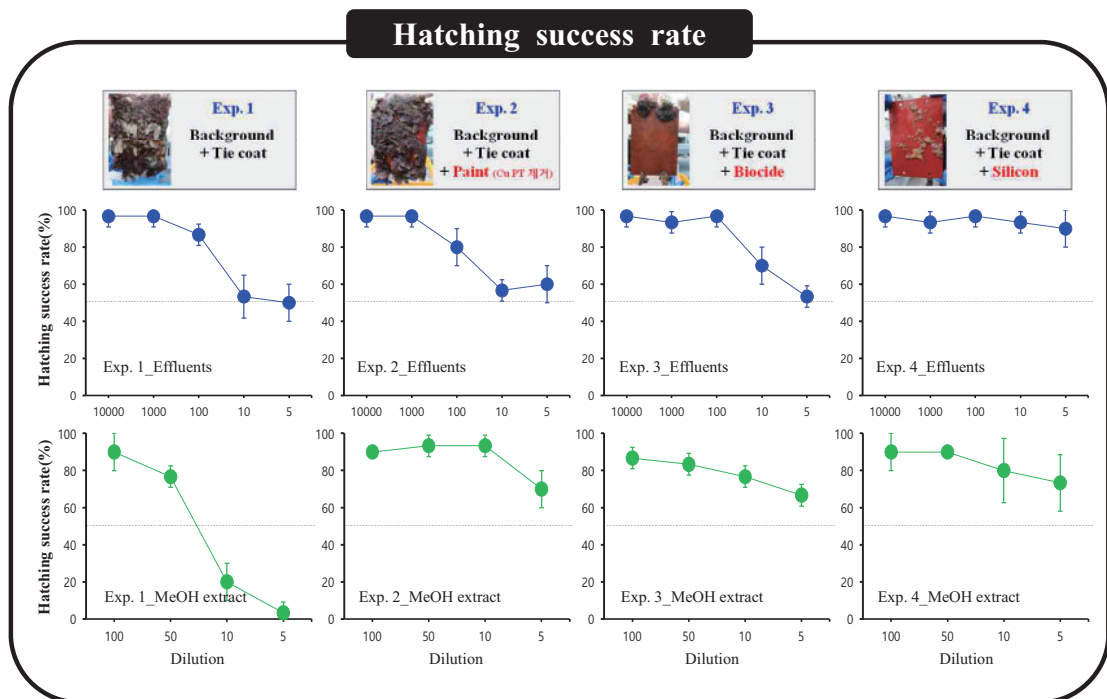


Fig 3.2.2.7. Eggs Hatching success rate for AFS static panel test of *P. parvus* s.l.

모사판 파생물 유출수 및 메탄올 추출물에 대한 요각류 *P. parvus* s.l.의 유생 사망률 독성시험 결과를 Fig. 3.2.2.8에 나타내었다. 파생물 유출수의 경우 모사판 시험구 EXP. 4(Background + Tie coat + silicone)에서의 유생 사망률은 모든 농도 구간에서 20% 이하로 모사판 시험구 가운데 독성 정도가 가장 낮았다. 생물 독성 구배가 있을 것으로 예

상된 모사판 시험구(EXP. 1, EXP. 2, EXP. 3)의 경우 10배 이하 희석농도에서는 30% 이하의 유생 사망률을, 10배 이상에서는 60% 이상의 사망률을 보이는 유사한 양상으로 3종류 모사판 시험구 간에 유의한 차이가 없었다. 메탄올 추출물에서는 시험구 EXP. 1(Background + Tie coat)에서 다른 시험구들 보다 높은 사망률을 보였다. 전반적으로 모사판 파생물 유출수 보다 메탄올 추출물의 독성이 강했으며, 메탄올 추출물에서 biocide 성분이 포함된 EXP. 3 보다 EXP. 1 시험구에서 대체로 더 높은 사망률을 나타냈다.

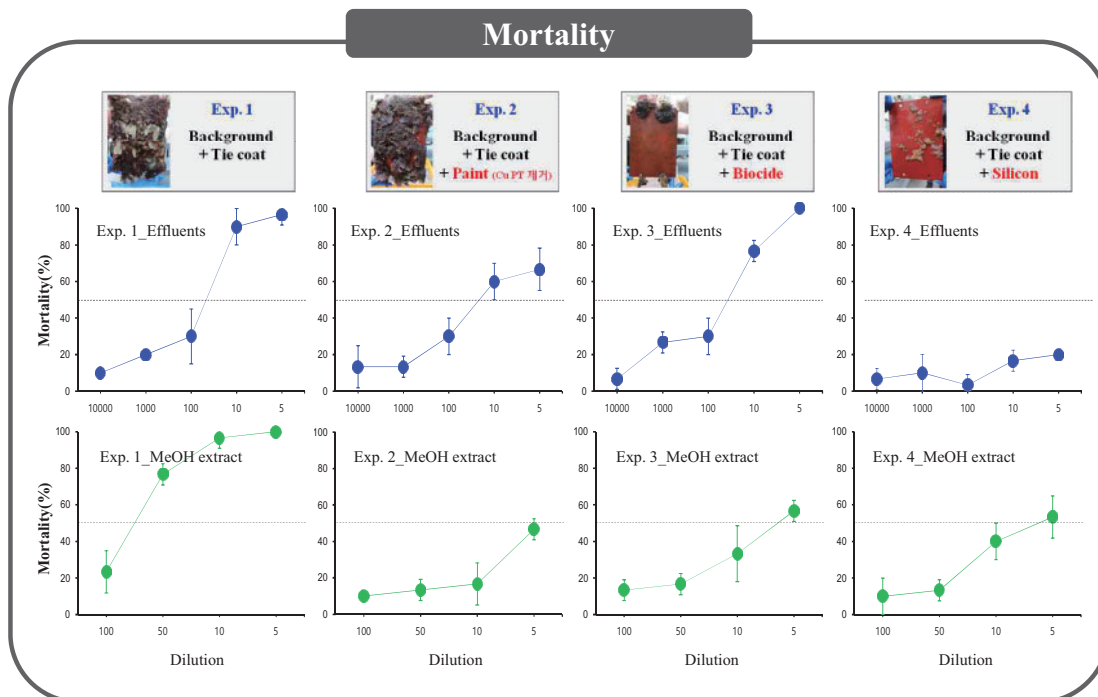


Fig 3.2.2.8. Nauplii mortality for AFS static panel test of *P. parvus* s.l.

3. 국내 주상용 Principal biocide AFS처리 활성물질에 대한 독성영향평가

가. 넙치배아 발생독성평가

(1) 서론

방오도료는 선박 운항에 대한 경제적 효과와 직결되는 중요한 관심물질 중 하나로서 유기 주석 화합물(Tributyltin; TBT)은 선박표면의 생물부착 방지에 가장 널리 사용되었던 대표적 방오활성 물질이었다. 그러나, 비표적 해양 생물에 대한 TBT의 심각한 독성영향이 규명되면서, 국제사회에서 심각한 환경오염물질로서 규제를 촉발하였고, 이에 1999년 11월 국제 해사 기구(International Maritime Organization)가 승인한 결의안은 2003년 1월부터 89개의 유기 주석 기반 코팅재 적용을 금지하고 2008년 1월 21일까지 전면사용 금지되었다.

TBT 사용이 제한되면서 사용단가가 저렴하면서, 친환경적인 도료에 대한 연구와 개발이 증가되었고, 1980년대부터 조류 부착제거에 대한 효능을 증가시키기 위해 오염 방지 용도로 사용된 유기 "booster biocides"와 결합한 대체 제제가 개발되었다. 본 연구에서 사용된 Irgarol 1051, Sea-Nine 211, Diuron 는 최근 가장 빈번하게 사용되는 대체 바이오사이드이다. 그러나, 이들이 환경중에 지속적으로 유출되면서 국내 연안환경에서 잔류 농도가 검출되고 있는데(Table 3-2-3-1), Diuron은 2010년 진해만에서 가장 높은 농도(N.D - 1,360 ng/L)로, Irgarol 1051은 2006 -2013년까지 N.D - 67.74 ng/L으로 검출되었다고 보고하고 있다. 김 등 (2016)은, 2013년 광양만에서의 Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211, Diuron이 다른 지역과 비교하여 높은 농도로 확인되어 오염유입특성에 따른 지역간 농도차이가 있음을 보여주었다. 그러나 지금까지 이러한 대체 booster biocides에 대한 국내 연안 환경 중 거동 연구나, 독성 영향평가 자료는 매우 제한 적이다. 더욱이 이러한 방오도료의 오염이 우려되는 국내연안에 서식하는 생물에 대한 독성영향평가 자료는 매우 드물다. 국외 연구사례로는, Cima(et al., 2008)은 Sea-Nine 211이 포식 세포 증식의 형태연구에서 세포 증식 및 세포 골격 형성에 영향을 미친다고 보고하였고, 성계에 서는 배아 발생 및 성장에 영향을 미친다는 것을 확인하였다 (Bellas, 2006). 또한 Sea-Nine 211에 노출된 어류(mummichog)는 세포분화에는 영향이 없으나, 정세포(spermatocyte)의 세포사멸이 유도되었다고 확인하였다(Ito et al., 2013). 그러나 대부분의 연구는 일부 독성영향에 대한 제한적인 연구 사례이며, 연안에 서식하는 유용 해양생물의 전사체(transcriptom)를 이용한 독성 메커니즘 규명 등에 대한 사례는 찾아볼 수 없다. 최근 해양환경 유해물질로 부터의 영향이 성체보다 배아의 민감도가 더 높다는 사실이 규명되면서 어류를 비롯한 다양한 생물계에서 배아(수정란)를 이용한 독성평가에 관심이 집중되고 있다. 특히 어류를 비롯한 일부 생물들은 배아로부터 치어기간을 연안환경에서

보내므로 연안오염물질로 부터 직접적인 영향을 받을 수 있는 현장 민감생물종에 속하기도 한다. 본 연구에서는 최종적으로 국내연안에 상용화되고 있는 “booster biocides”가 미치는 연안생물의 독성영향을 평가하여 향후 연안관리 및 국가 간 규제관리 등에 제시될 과학적 근거 자료를 마련하는 것을 목표로 하고 있다. 또한 연안에서 시행되고 있는 선박의 페인트작업을 통한 용출수 독성평가 자료에도 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

1차년도 연구에서는 넙치의 수정란에 Irgarol 1051, Sea-Nine 211, Diuron을 노출시켰고, 형태발생독성을 평가하였고, RNA-seq을 이용한 수정란 전사체(transcriptom)를 분석하여 독성기작과 전체 발현 유전독성을 정밀 조사하였다. 또한 넙치 형태발생과정에 관여하는 주요 유전자를 선별하여 노출이후 발현변동을 비교하였다.

2차년도 연구에서는 넙치의 수정란에 주상용 Antifouling biocide 물질 중 ZnPT와 CuPT를 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 배아에 노출시켜 발생독성 영향 평가 (사망률, 심장부종, 꼬리기형, 척추만곡)하였고, RNA-seq을 통한 주요 독성기작 도출하였다.

Table 3.2.3.1. Concentration of Irgarol 1051, Sea-Nine211 and Diuron in Korean costal area

물질	Location	ng/L	Date	Reference	
Diuron	Masan	104-202	08/2009	Nam sook Kim et al. (2014)	
	Haengam	123-363			
	Gohyun	180-416			
	Masan	65-119	12/2009		
	Haengam	29-83			
	Gohyun	80-116			
	Jinhea Bay	35-1360	08/2010		
	Major harbors of Korea	13-230	11/2010		
	Gwangyang bay	11.89-96.20	09~10/2013		김대진 (2016)
	Busan	N.D.-41.95			
Ulsan	2.41-26.10				
Irgarol 1051	Knghwa	N.D.	06/2006	Seongeon	

	Inchon	N.D.-12.48		Lee et al. (2008)
	Asan	N.D.		
	Kunsan	N.D.		
	Yosu	N.D.-10.32		
	Masan	N.D.		
	Pusan	N.D.-11.54		
	Ulsan	N.D.		
	Tonghae	N.D.-23.80		
	Sokcho	N.D.		
	Korean coastal area	N.D-67.74	2009	Seongeon Lee et al. (2010)
	Masan	0.4-1.2	08/2009	Nam sook Kim et al. (2014)
	Haengam	0.2-1.2		
	Gohyun	3.7-8.9		
	Masan	2.1-2.4	12/2009	
	Haengam	2.1-3.2		
	Gohyun	2.1-4.0		
	Jinhea Bay	0.8-14.1	08/2010	
	Major harbors of korea	N.D.-8.7	11/2010	
	Gwangyang bay	N.D.-2.05	09~10/2013	
	Busan	N.D.		
	Ulsan	N.D.		
Sea-Nine 211	Knghwa	N.D.	06/2006	Seongeon Lee et al. (2008)
	Inchon	N.D.		
	Asan	N.D.-13.24		
	Kunsan	N.D.		
	Yosu	N.D.-15.30		
	Masan	N.D.		
	Pusan	N.D.		
	Ulsan	N.D.-8.13		
	Tonghae	N.D.-11.018		

	Sokcho	N.D.-5.28		
	Gwangyang bay	N.D.-2.44	09~10/2013	김대진 (2016)
	Busan	N.D.		
	Ulsan	N.D.		

(2) 재료 및 방법

(가) 대상 생물

본 독성영향평가에 사용된 생물은 연안 생물인 Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)의 수정란을 사용하였다. (주)해연 (Jeju, Korea) 으로부터 6 hour post fertilization (hpf)된 수정란을 항공 운반하여, 한국해양과학기술원 남해연연구소 수조동에서 17°C의 필터 해수에 24시간 정치 후 사용하였다.

(나). 시험대상물질 및 제조

① 멸균 해수 제조

노출 해수는 0.22mm filter (Corning® Top Vacuum Filter CA Membrane, Corning Co., NY)로 필터 후, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하여 사용하였다.

② Antifouling system (AFS) 처리 활성물질 - booster biocides

1차년도에 사용한 booster biocides는 Diuron (3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, ≥98%), Irgarol 1051 (2-tert-Butylamino-4-cyclopropylamino-6-methylthio-s-triazine, PESTANAL®, analytical standard), Sea-Nine 211 (4,5-dichloro-2-octyl-isothiazolone, Aldrich^{CPR})으로 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다(Figure 3-2-2-1). 실험 시작 직전 Dimethylsulfoxide (DMSO, Aldrich)에 완전히 용해시킨 후 해수에 제조한 stock sol.을 사용하여 전체 spiking 양이 0.1% 미만이 되도록 투여하였다. 2차년도에 사용한 booster biocides는 Copper pyrithione (CuPT)는 ACROS Organics에서 구입하였으며, Zinc pyrithion (ZnPT)은 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다(Fig. 3.2.3.1). 실험 직전 Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)에 완전히 용해시켜 제조한 stock solution이 spiking 양이 전체 해수의 0.1% 미만이 되도록 투여하였다.

(다) 독성영향평가

Optic vesicle 단계인 수정란을 멸균 해수 10mL이 담긴 각각의 well(Nunc™ Nunclon™ Vita 6-Well Multidish, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)에 약 30개 씩

분주하였다. 그 후 다양한 농도 CuPT (10, 100 and 1,000 $\mu\text{g/L}$), ZnPT (10, 100 and 1000 $\mu\text{g/L}$)의 시험물질에 수정란을 노출 시켰다. 노출 24시간 후, 노출 용액의 반을 새로 제조한 시험 물질과 멸균 해수로 교체 하였다. 노출 시킨 수정란은 17 ± 1 °C에서 48시간 동안 배양하였다. 노출 후 24시간 마다 생존여부를 기록하였고, 48시간이 지난 후 형태학적 기형 (심장부종, 꼬리기형, 척추만곡)을 관찰하여 기록하였다. 모든 실험은 3-6 반복으로 진행하였다.

(라) RNA 추출 및 cDNA 합성

심장 발달 단계(Heart development stage, 노출 후 약 12시간)의 넙치 배아를 이용하여 Total RNA를 추출하였다. 3 반복 개체를 각각 Isogen (Wako, Japan)과 균질기를 이용하여 RNA를 추출하였다. 그리고 추출된 RNA는 NANO DROP ONE (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)을 이용하여 260nm와 280nm 파장에서 농도를 측정하였다. 그리고 QuantiNovaTM Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 Complementary DNA(cDNA)를 합성하였다.

(마) RNA sequencing

Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, CA)를 이용하여 추출한 RNA 농도 및 순도를 측정하였다. RNA-seq 분석을 위하여 TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA)를 이용하여 100 base 길이의 paired-end read들로 mRNA sequencing library를 구축하였다. 2 μg 의 Total RNA로부터 oligo(dT) magnetic beads를 이용하여 mRNA를 분리, 정제하였다. 분리된 mRNA는 random hexamer priming을 통하여 single-stranded cDNA로 합성되었고, double-stranded cDNA로 합성되었다. 합성된 double-stranded cDNA에 end repair, A-tailing, adapter ligation 진행 후 Polymerase chain reaction (PCR)을 통하여 증폭시킴으로써 cDNA library를 구축하였다. Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent)와 KAPA library quantification kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA)를 통하여 구축된 cDNA library의 정량 및 정성을 분석하였다. 변성된 주형의 cluster 증폭 후, Illumina HiSeq 2500 (Illumina)를 사용하여 flow cell을 paired-end reads(2 \times 100bp)로 분석하였다.

(바) 생체정보 분석

① Filtering 및 assembly

몇 가지 기준에 따라 low-quality read를 여과하였다. low-quality read란 N으로 나타

나는 skipped 염기가 10% 이상이거나 퀄리티 점수와 각 가닥의 평균 퀄리티점수가 20이하이거나 50 base-pairs보다 짧은 염기가 20%이상인 가닥을 말한다. 전체 여과과정은 inhouse scripts를 이용하여 진행하였으며, 여과 후, 남은 read들은 Trinity software을 이용하여 transcript를 assembly하였다. 세 종류의 소프트웨어 프로그램(Inchworm, Chrysalis, Butterfly)을 이용하여 assembly 과정을 진행하였다. strand-specific sequencing에서는 SS_lib_type 옵션을 사용하였으며, default 값은 다른 옵션을 사용하였다. CD-HOT-EST software를 통하여 assembled transcripts로부터 94%의 유사성으로 최종 unigene을 선택하였다. RNA-seq assembly 과정에서 불완전하고 불필요한 assembled transcript들은 selecting representative sequences를 통하여 제거하였다.

② Function annotation 과 enrichment analysis

Clean reads 는 *Paralichthys olivaceus* (Shao et al., 2017)의 게놈서열을 참고하여 TopHat (Kim et al., 2013)을 사용하여 정렬하였다. 유전자 발현은 Cufflinks (Trapnell et al., 2012)를 사용하여 정량화하였고, 샘플 그룹간 차등분석(Differential expression analysis) Cuffdiff(Trapnell et al., 2012)를 사용하여 통계처리하여 유의한 유전자를 선별하였다($P < 0.05$ and ≥ 1.5 -fold change). module members에 대한 기능분석(Functional annotation)은 DAVID(Huang et al., 2009)를 이용하여 분석하였고, 유의하게 변화된 유전자의 gene ontology(GO)는 cutoff 값 $P < 0.05$ 기준으로 선별하였다. 선별된 유전자는 Euclidean distance 와 complete linkage method를 이용하여 Hierarchical clustering 이 작성하였다. Differentially expressed 유전자의 gene-interaction network 분석은 Cytoscape (<https://cytoscape.org/>)으로 작성하였다.

③ DEG의 유전자 발현 분석

유전자 발현 수준을 Expectation Maximization 이용한 RNA-seq을 통하여 측정하였다. R package DEGseq을 통하여 계산된 가닥 수 데이터(read count data)를 기초로하여 DEGs를 분석하였다. Lowess normalization method를 통해 나타난 unigene의 발현값을 Fragments per kb of exon model per million mapped (FPKM) read을 이용하여 표준화(normalization)하였다. Differentially expressed unigene은 P -value 0.05이하, Fold change값 2 이상을 기준으로 나타내었다. DEG 분석으로부터 분석된 유전자들을 동정하기 위하여 P -value<0.001에서 Fisher's exact test(<http://www.GOseq>)을 이용하여 GO-based trend test를 진행하였다. RNA-seq을 분석하기 위하여 TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA)를 사용하여 100 bases의 paired-end reads의

mRNA sequencing libraries를 제작하였다. cDNA libraries의 순도는 Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent) 와 KAPA library quantification kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA)를 사용하여 평가하였다. 변형시킨 주형은 cluster amplification을 거친 후, flow cells은 Illumina HiSeq 2500 (Illumina)을 사용하여 RNA를 분석하였다.

(사) RT-qPCR

Real-time quantitative Polymerase chain reaction (RT-qPCR)은 QuantiNova™ SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)와 Rotor-gene®Q (Qiagen)을 이용하여 진행하였다. Comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)를 이용하여 mRNA 발현 정도를 분석하였다. 대조군과 실험군의 mRNA 발현 정도를 비교하기 위해 β -actin을 reference gene으로 사용하여 표준화 하였다. Primer는 제노텍에서 합성을 진행하였으며 사용한 target 유전자와 primer 서열은 Table 3.2.3.2와 같다.

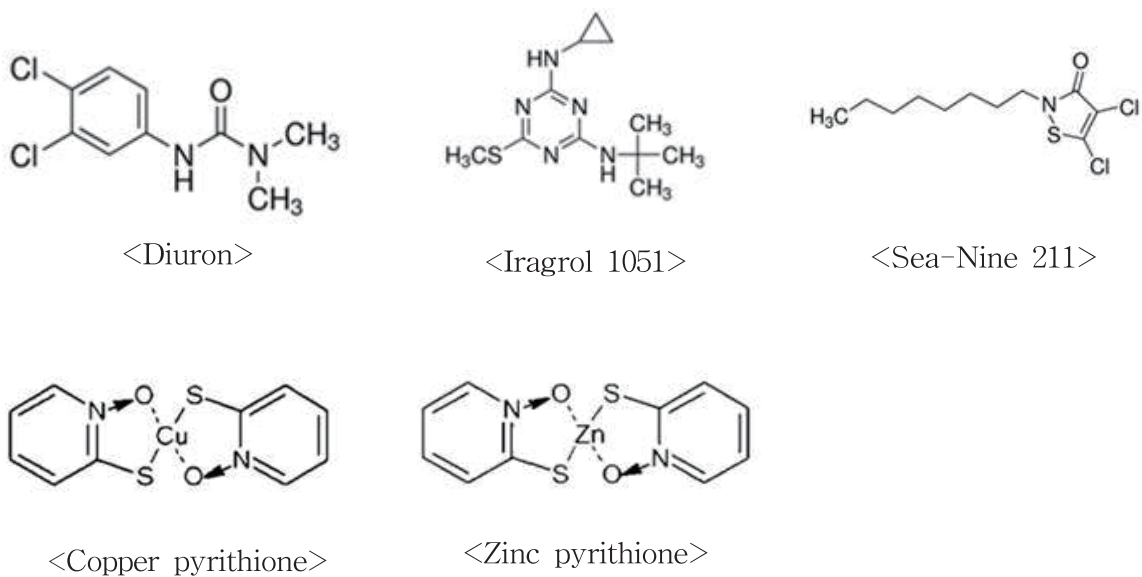


Fig. 3.2.3.1. Chemical structures used in this study.

Table 3.2.3.2. Primers used in this study for RT-qPCR.

Gene		Sequence
<i>nkx2.5</i>	Forward	5' TTCTCCCAGGCGCAGGTGTA 3'
	Reverse	5' GGAACCAGATCTTCACCTGG 3'
<i>TP73</i>	Forward	5' ATGCCAATGAAAGCACACAT 3'
	Reverse	5' TGCACTGTGAGACCAAACAA 3'
<i>robo1</i>	Forward	5' AGTGGCTCCCTCTTCTTCTTAC 3'
	Reverse	5' CTCGTAGAATGGCTACTTCCAG 3'
<i>SOX6</i>	Forward	5' GAAGAGTGCTGGAGAATGTGAC 3'
	Reverse	5' TCTCCTAGCTCTTGTTCACTCC 3'
<i>bmp4</i>	Forward	5' GTAGGCTGGAATGACTGGATAG 3'
	Reverse	5' GTTCACAGAGTTCACCAGTGTC 3'
<i>furin</i>	Forward	5' ACAGTAGTGAAGAGGTCGCTGT 3'
	Reverse	5' CTCTGAACTTGGGATCTACAGG 3'
<i>plod2</i>	Forward	5' AGACTTGCTGACAAGTACCCCT 3'
	Reverse	5' GTGTAGAAGAGCTGGTCGTCAT 3'
<i>wnt3a</i>	Forward	5' AGCGAGGATGTGGAGTTTGG 3'
	Reverse	5' TACCCGAAAGACCATGGCAC 3'
<i>β-actin</i>	Forward	5' TTTCCCTCCATTGTTGGTCG 3'
	Reverse	5' GCGACTCTCAGCTCGTTGTA 3'

(3) 결과 및 토의

(가) 형태발생독성평가

3종의 AFS 활성물질(Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211 (Fig. 3.2.3.2)에 넙치 수정란을 48시간 동안 노출 시킨 결과, Diuron에 노출된 넙치는 10, 100, 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도에서 각각 10 ± 3 , 11 ± 8 , $8 \pm 5\%$ 의 사망률을 보였다. Irgarol 1051 노출 시, 모든 농도에서 10% 이하의 사망률을 나타내었다. 대조군이 $8 \pm 3\%$ 의 사망률을 보이며 Diuron과 Irgarol 1051에 노출된 실험구와 큰 차이를 보이지 않았다. Sea-Nine 211에 노출된 넙치의 경우, 1, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 사망률이 20% 이하였으나, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도에서 개체가 모두 사망하였다(Fig. 3.2.3.3). 3종의 AFS 활성물질에 노출된 넙치에서 동일하게 꼬리지느러미 기형(Tail-finfold defect), 척추만곡 (Dorsal curvature)순으로 기형을 나타낸 개체가 많았으며, 대다수의 개체가 두 현상을 동시에 나타내었다. 심장부종(Pericardial edema) 기형은 Diuron에 노출된 넙치에서는 거의 나타나지 않았으며, Irgarol 1051 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도에 노출된 넙치에서 $11 \pm 5\%$ 의 기형률을 나타냈다. Sea-Nine 211에

노출된 넙치는 Diuron과 Irgarol 1051 노출된 개체들과 비교하였을 때 현저히 낮은 농도인 1, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 노출 농도에서 $28 \pm 15\%$, $27 \pm 16\%$ 의 심장 부종 기형률이 관찰되었다. 위 결과를 통해, Sea-Nine 211, Irgarol 1051, Diuron 순으로 형태발생독성이 높은 것으로 나타났다.

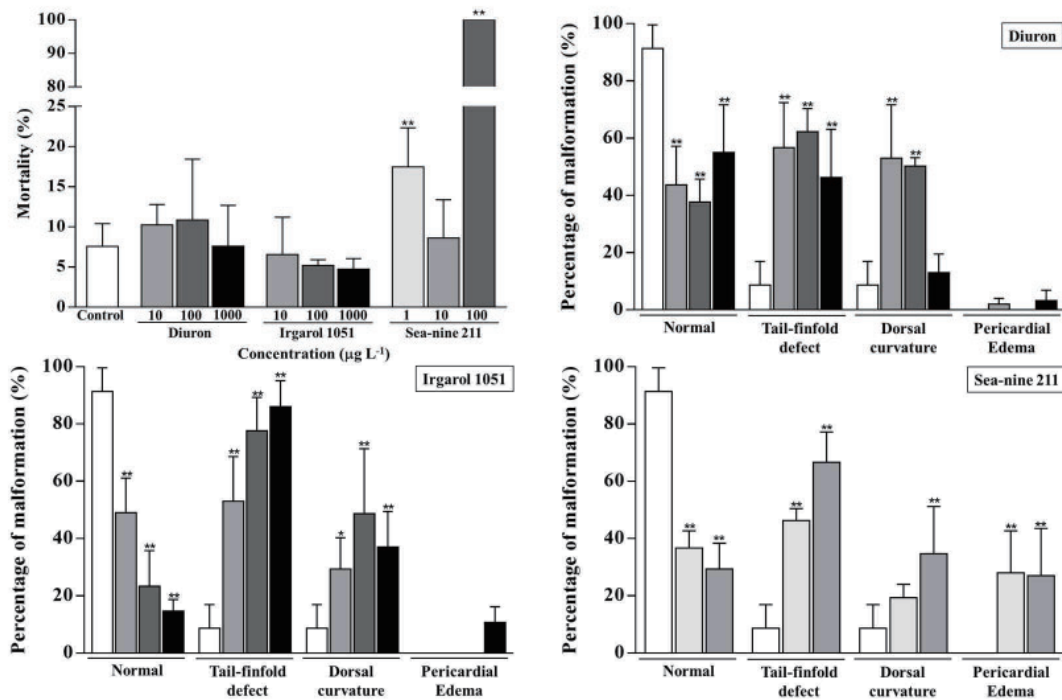


Fig. 3.2.3.2. Frequency percentage of malformation and mortality in embryonic flounder exposed to Diuron, Irgarol 1051, and Sea-Nine 211.

2차년도 선별한 주상용 Antifouling biocide 2종 CuPT, ZnPT에 넙치 수정란을 48시간 동안 노출 시킨 결과, CuPT에 노출된 넙치는 10, 100, 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도에서 각각 4 ± 1 , 68 ± 22 , 100%의 사망률을 보였다. ZnPT 노출 시, 1, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 사망률이 5% 이하였으나, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도에 노출된 개체는 $75 \pm 35\%$ 의 사망률을 보였다 (Fig. 3.2.3.3). CuPT와 ZnPT에 노출된 넙치의 형태학적 기형을 Fig. 3.2.3.4에 나타내었다. 심장부종기형의 경우, CuPT 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도에 노출된 넙치 배아에서 $90 \pm 14\%$ 로 나타났으며, ZnPT의 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 와 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 노출구에서 각각 $26 \pm 24\%$, 100%로 나타났다. 척추만곡기형은 CuPT 10, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 노출구에서 각각 $21 \pm 13\%$, $88 \pm 17\%$

로 나타났고, ZnPT의 10, 100, 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 노출구의 경우, 각각 4 ± 4 , $16 \pm 13\%$, 100%로 노출 농도가 높아질수록 척추만곡의 기형률이 높았다. CuPT 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 노출구에서 $90 \pm 14\%$, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ZnPT 노출구에서 $17 \pm 19\%$, 그리고 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ZnPT 노출구에서 100%의 꼬리지느러미 기형이 나타났다. 같은 농도에서 CuPT 노출 개체가 ZnPT 노출 개체보다 높은 사망률 및 기형률을 보이며 CuPT가 ZnPT에 비해 독성이 높은 것으로 나타났다.

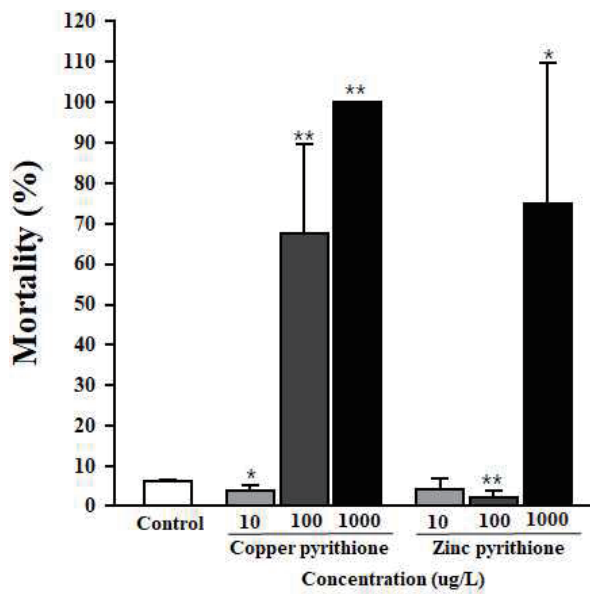


Fig. 3.2.3.3. Frequency percentage of mortality in embryonic flounder exposed to Copper pyrithione and Zinc pyrithione.

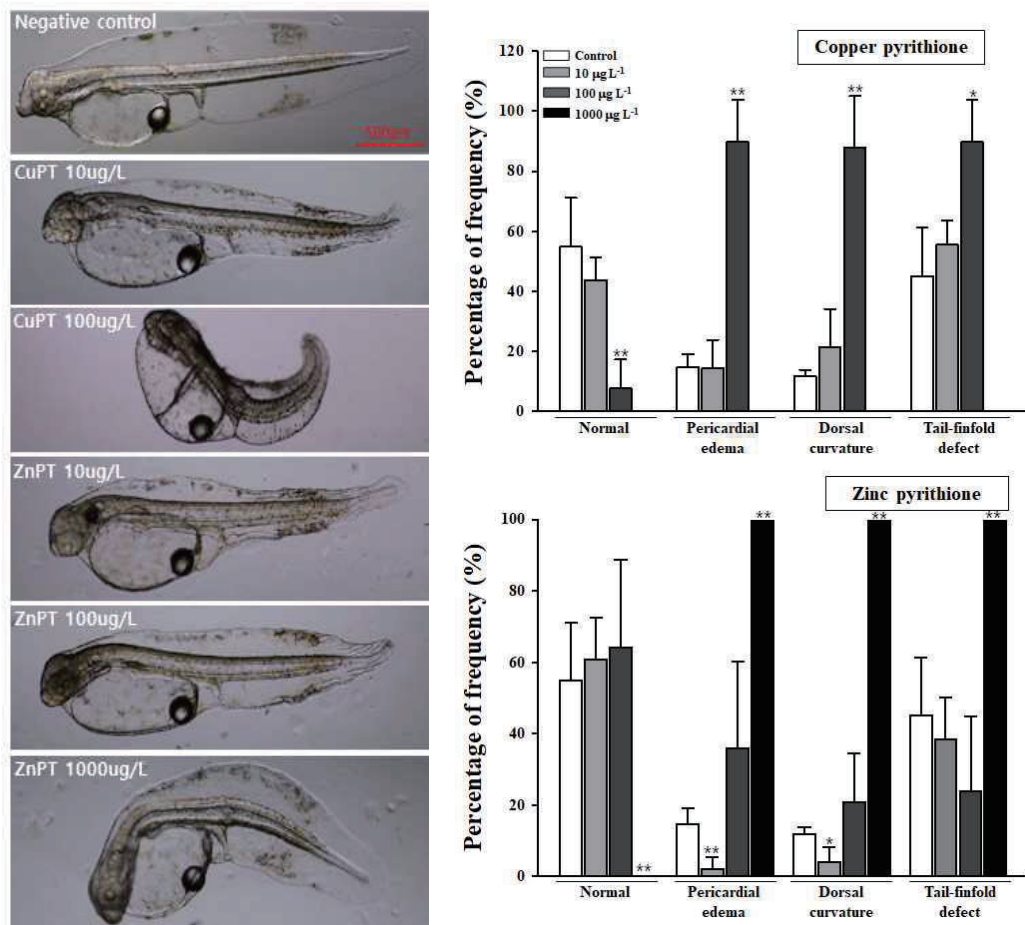


Fig. 3.2.3.4. Frequency percentage of malformation in embryonic flounder exposed to Copper pyrithione and Zinc pyrithione.

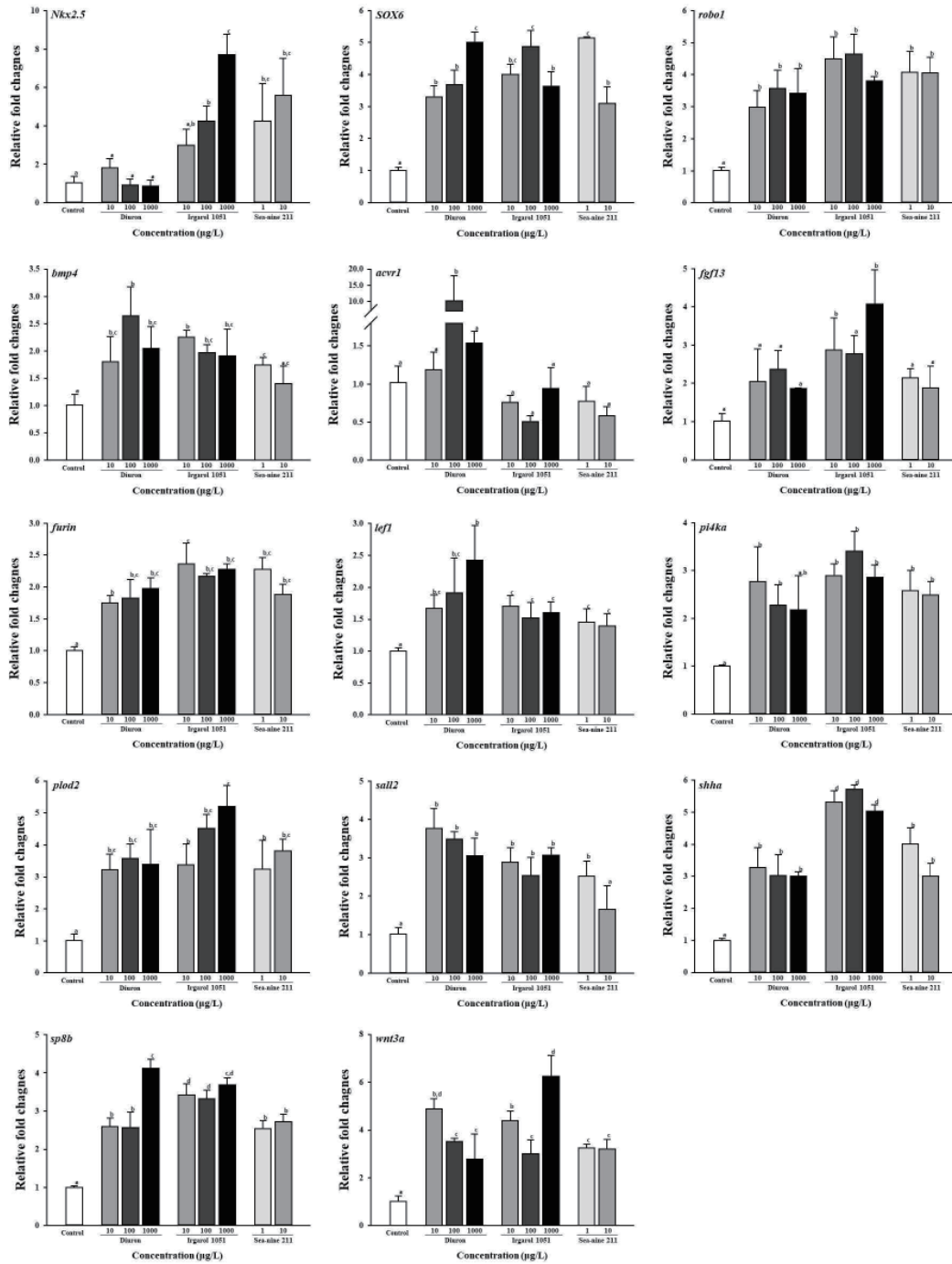
(나) RT-qPCR

1차년도 선별된 booster biocide 세 종 Diuron, Iragrol 1051, Sea-Nine 211에 48시간 동안 노출된 넙치의 경우(Fig. 3.2.3.5), 심장 형성 관련 유전자인 *nkx2.5*이 Diuron에서는 대조군과 차이를 보이지 않았으나, Iragrol 1051과 Sea-Nine 211에 노출된 넙치에게서만 대조군보다 높은 발현량을 보였다. 생식 관련 유전자인 *ORG*는 처리농도가 높아질수록 발현율이 높아지는 경향을 나타내었다. 이전 결과에서 Tumor suppressor로 알려져 있는 *TP73* 유전자의 경우 세 물질에 노출된 넙치에서 대조군에 비해 발현율이 낮았다. 또한, 처리 농도가 높아질수록 발현율이 낮아지는 경향을 띄었다. 심장 발달 단계의 넙치의 경우, 심장 형성 관련 유전자인 *nkx2.5*이 48시간 노출된 넙치와 마찬가지로 Diuron에서는 대조군과 차이를 보이지 않았으며, Iragrol 1051과 Sea-Nine 211에 노출된 넙치에게서만

대조군보다 높은 발현량을 보였다. 또한, 농도가 높아질수록 발현율이 높아지는 경향을 보였다. 이는 심장 부종이 나타난 결과와 유사한 결과를 나타내었다. *SOX6*, *robo1* 또한 각각의 실험군은 대조군보다 높은 발현량을 보였고, 실험군 간의 차이는 나타나지 않았다. *bmp4* 는 뼈 형성과 관련 유전자로서 대조군보다 각각의 물질을 노출한 실험군에서 높은 발현율을 나타내며 척추 만곡과 유사한 양상을 보였다. 꼬리 기형관련 유전자인 *fgf3*는 Iragrol 1051에 노출된 넙치에게서만 대조군 보다 높은 발현율을 보였으며, *shha* 와 *sp8b*의 경우 각 실험군이 대조군보다 높았고, 전반적으로 Iragrol 1051에 노출된 넙치의 발현율이 다른 실험군 보다 높게 나타났다(Fig. 3.2.3.6). 이는 다른 실험군과 같은 농도의 Iragrol 1051에 노출 된 넙치의 꼬리 기형률이 높은 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 뿐만 아니라, 꼬리 기형관련 유전자 *lef1*, *furin*, *pi4ka*, *plod2*, *sall2*, *wnt3a* 또한 각각의 실험군은 대조군보다 높은 발현량을 보였고, *lef1*의 유전자만이 Diuron에 노출된 실험군이 발현율이 다른 실험군에 비해 높은 결과를 보였다. 기형과 관련된 유전자들은 전반적으로 물질을 노출한 실험군에서 대조군보다 높은 발현율을 보였고, 심장부종, 척추만곡, 꼬리기형과 같은 형태학적 기형과 유사한 결과를 나타내었다.

2차년도 선별된 booster biocide 두 종 CuPT, ZnPT에 노출된 심장 발달 단계의 넙치의 경우(Fig. 3.2.3.7), 심장 형성 관련 유전자인 *nkx2.5*은 $100 \mu\text{g L}^{-1}$ CuPT에 노출된 넙치에서 대조군 보다 높은 발현율을 보이며 이는 심장 부종이 나타난 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 또한, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ZnPT 노출구에서 대조군과 차이를 보이며, 낮은 발현율을 보였다. 유전자 *SOX6*는 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 CuPT, ZnPT 노출구에서 각각 대조군과 차이를 보이며 낮은 발현율을 보였다. *bmp4* 는 뼈 형성과 관련 유전자로서 $100 \mu\text{g L}^{-1}$ CuPT 노출군을 제외한 노출군에서 대조군보다 낮은 발현율을 유의하게 나타내었다. 꼬리 기형관련 유전자인 *furin*, *plod2*은 전반적으로 대조군에 비해 노출군에서 발현율이 낮게 나타났다. 또한, *wnt3a*의 경우, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ CuPT 노출군에서만 대조군보다 유의한 높은 발현율을 보였으며, 다른 노출군에서는 대조군보다 낮은 발현율을 보였다. 또한, ZnPT 노출군에서 노출 농도가 높아질수록 발현율이 높아지는 경향을 보였다. Tumor suppressor로 알려져 있는 *TP73* 유전자의 경우 두 물질에 노출 된 넙치에서 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 ZnPT 노출군에서 노출 농도가 높아질수록 *TP73* 유전자의 발현율이 낮아지는 경향을 보였다.

(a)



(b)

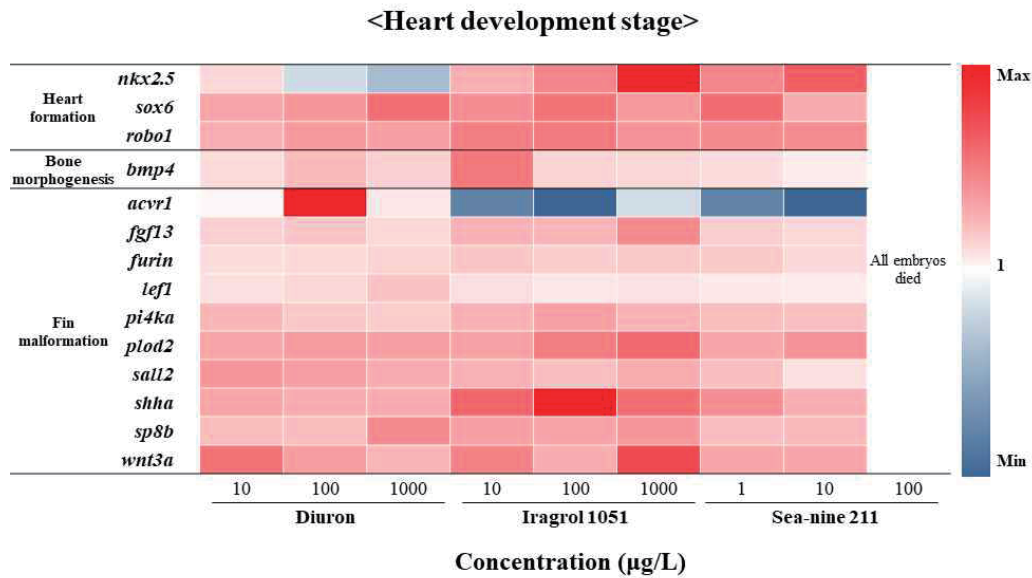


Fig. 3.2.3.5. qPCR results in embryonic flounder exposed to Diuron, Iragrol 1051, and Sea-Nine 211 at 8 h after exposure. (a). The heat map of gene expression variation in the embryonic flounder exposed to three biocides (b). Genes related to heart formation, *nkx2.5*, NK2 transcription factor related 5; *SOX6*, SRY-box containing gene 6; *robo1*, Roundabout guidance receptor 1; *bmp4*, Bone morphogenetic protein 4, related to bone morphogenesis; Genes related to fin malformation; *acvr1*, Activin A receptor type 1; *fgf13* Fibroblast growth factor 13; *furin*, furin; *lef1*, Lymphoid enhancer binding factor 1; *pi4ka*, Phosphatidylinositol 4-kinase alpha; *plod2*, Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2; *sall2*, Spalt like transcription factor 2; *shha*, Sonic hedgehog protein A precursor; *sp8b*, Sp8 transcription factor; *wnt3a*, Wnt family member 3a.

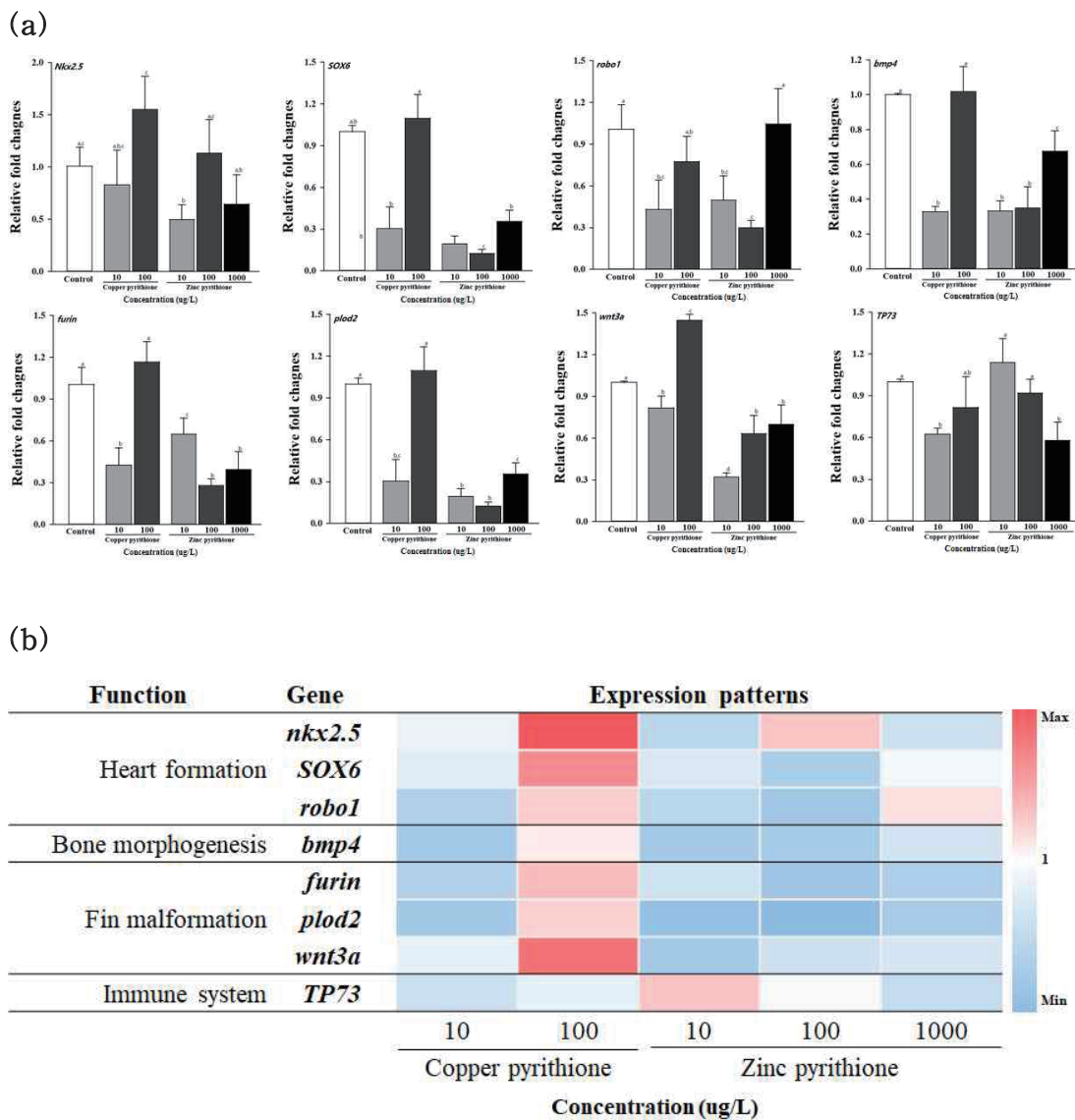


Fig. 3.2.3.6. qPCR results in embryonic flounder exposed to CuPT and ZnPT at 12 h after exposure. (a). The heat map of gene expression variation in the embryonic flounder exposed to two biocide (b). Genes related to heart formation, *nkx2.5*, NK2 transcription factor related 5; *SOX6*, SRY-box containing gene 6; *robo1*, Roundabout guidance receptor 1; *bmp4*, Bone morphogenetic protein 4, related to bone morphogenesis; Genes related to fin malformation; *furin*, furin; *plod2*, Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2; *wnt3a*, Wnt family member 3a; *TP73*, Tumor protein73 related to immune system.

(다) RNA sequencing

① RNA-seq analysis

1차년도 3종의 biocides에 노출실험에서 대조군의 경우 전체 63,081,414 reads 읽었으며 그 중 93.4%인 58,891,262의 clean reads를 얻었다. Diuron, Iragrol 1051 노출군은 각각 전체 67,933,546 reads, 64,193,642 reads를 읽었다. 그 중 Diuron의 경우 62,801,224 (92.4%), Iragrol 1051은 58,258,870 (90.8%)의 clean reads를 얻었다. Sea-Nine 211 노출군은 70,801,570 reads를 읽었으며, 93.1%의 65,956,838의 clean reads를 얻었다. 전체 208,452개의 unigene을 분석하였으며, 총 길이는 178,793,979bp 였다(Table 3.2.3.3).

2차년도 CuPT 와 ZnPT 의 노출군을 분석한 결과, 대조군의 경우 전체 66,269,164 reads 읽었으며 그 중 98.3%인 65,158,988의 clean reads를 얻었다. 10, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ CuPT 노출군은 각각 전체 52,620,174 reads, 52,169,006 reads를 읽었다. 그 중 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ CuPT 노출군의 경우 51,126,242 (97.2%), 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ CuPT 노출군은 50,597,820 (97.0%)의 clean reads를 얻었다. 10, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ZnPT 노출군 노출군은 각각 61,707,398 reads, 56,556,062 reads를 읽었으며, 97.3%의 60,058,302, 97.9%의 55,348,644의 clean reads를 얻었다(Table 3.2.3.4).

② GO Enrichment and Intergrated DEG analysis

Fig. 3.2.3.7에서는 3종의 booster biocide (Diuron, Iragrol 1051, Sea-Nine 211)에 노출된 배아의 공통적, 독립적 DEG를 나타내었다. 세 종 모두에게 공통적으로 나타난 Up-regulated DEG는 124종 이었으며, Down-regulated DEG는 36종 이었다. 이는 생체 내 신호전달 이상 및 고분자 대사과정 억제 기작에 공통적으로 유의한 영향을 받는 것으로 확인되었다. 또한, Gene ontology 분석을 통해, 3 종의 booster biocide에 배아가 노출되었을 때, 치골형성, 신호전달, 중추신경뉴런발달 기능을 가진 유전자 등이 유의하게 영향을 받는 것으로 확인 되었다(Fig. 3.2.3.8).

Fig. 3.2.3.9에서는 2종의 booster biocide (CuPT and ZnPT)에 노출된 넙치 배아의 증가, 감소 DEG 및 공통적, 독립적 DEG를 나타내었다. CuPT의 경우 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도에 노출된 넙치 배아에서 517종의 DEG가 증가하였으며, 234종의 DEG가 감소하였다. metabolism, 면역, 발생, 눈 발달에 관련된 유전자가 유의하게 증가된 것으로 나타났다 (Table 3.2.3.4). 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도에 노출된 경우, 증가 DEG가 240종 이었으며, 감소 DEG는 252종 이었다. ZnPT 10, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에 노출된 배아는 각각 113종, 159종의 증가 DEG와 447종, 485종의 감소 DEG를 나타내었다. 이때, 암, 면역계, 발생 등에 연관된 유전자가 증가된 것으로 나타났다. 두 종의 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도 노출군에서 공통적으로 나타난 DEG는 130종 이었으며, 독립적으로 DEG는 CuPT의 경우 621종, ZnPT의 경우 430종

이었다. $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도 노출군의 경우 공통 DEG는 62종 이었으며, 독립 DEG는 CuPT, ZnPT 각각 430, 582종 이었다.

Table 3.2.3.3. RNA-seq transcript assembly informations of flounder embryos exposed to Diuron, Irgarol 1051, and Sea-Nine 211 (heart development stage).

	Control	Diuron	Irgarol 1051	Sea-Nine 211
Number of reads	63,081,414	67,933,546	64,193,642	70,814,570
Number of clean reads	58,891,262 (93.4%)	62,801,224 (92.4%)	58,258,870 (90.8%)	65,956,838 (93.1%)
Total length of reads	5,920,077,947	6,312,523,084	5,857,331,234	6,630,631,999
Length of unigenes (bp)	178,793,979			
Average length of unigenes (bp)	858			
Number of unigenes	208,452			

Table 3.2.3.4 RNA-seq transcript assembly informations of flounder embryos exposed to CuPT and ZnPT (heart development stage).

	Control	CuPT 10 $\mu\text{g/L}$	CuPT 100 $\mu\text{g/L}$	ZnPT 10 $\mu\text{g/L}$	ZnPT 100 $\mu\text{g/L}$
Number of reads	66,269,164	52,620,174	52,169,006	61,707,398	56,556,062
Number of clean reads	65,158,988 (98.3%)	51,126,242 (97.2%)	50,597,820 (97.0%)	60,058,302 (97.3%)	55,348,644 (97.9%)
Total length of reads	55,534,102 (85.2%)	42,316,240 (82.8%)	41,555,442 (82.1%)	49,790,717 (82.9%)	45,110,774 (81.5%)

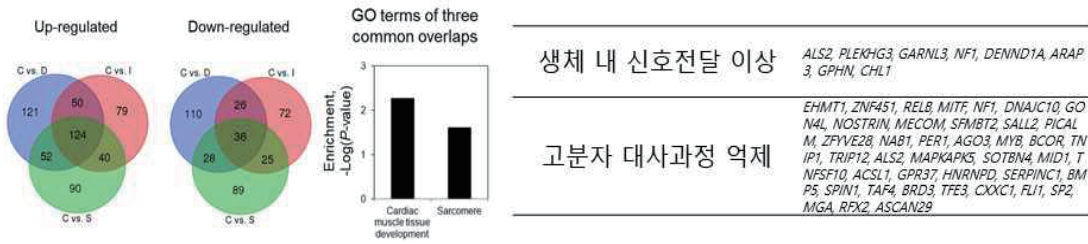


Fig. 3.2.3.7. DEG list in flounder embryos exposed to Diuron, Irgarol 1051, and Sea-Nine 211 and mode of toxicity.

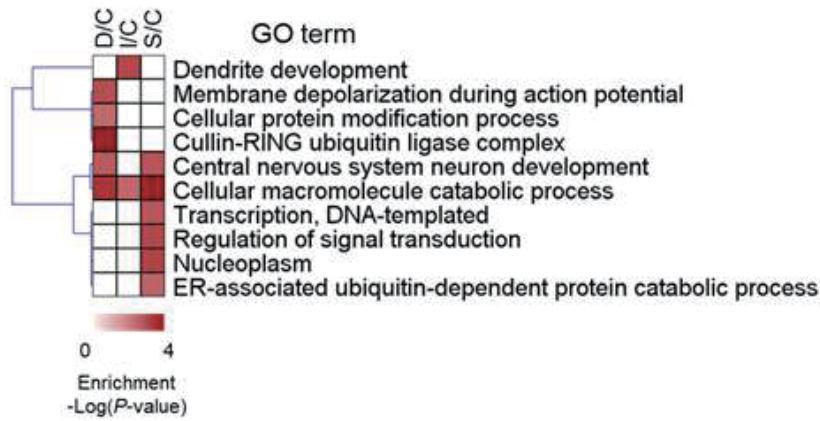
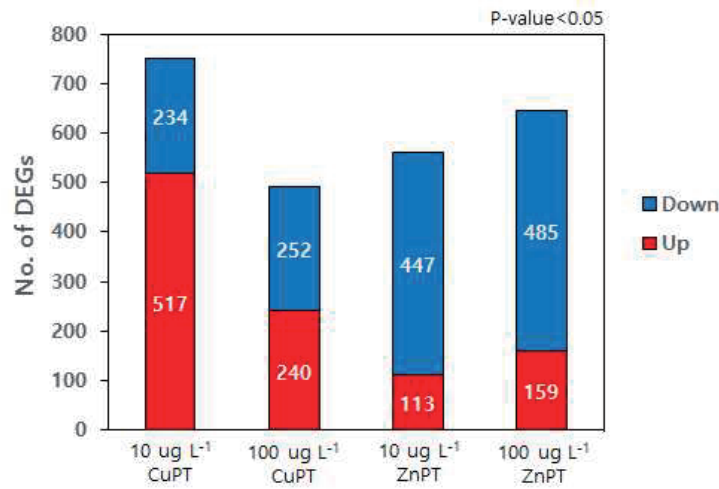


Fig. 3.2.3.8. Gene ontology of flounder embryos exposed to Diuron, Irgarol 1051, and Sea-Nine 211.

(a)



(b)

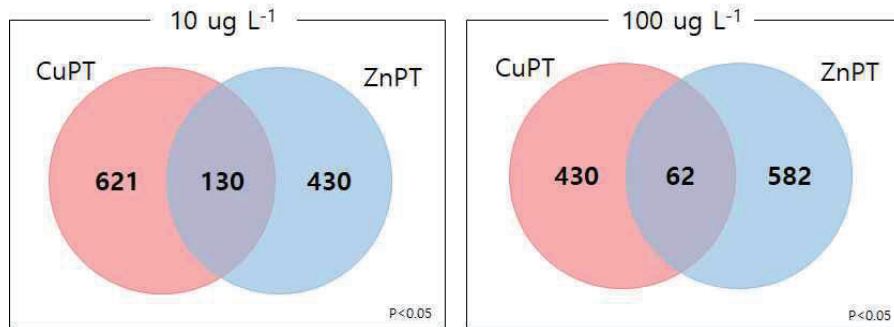


Fig. 3.2.3.9. Up- and down-regulated DEG in flounder embryos exposed to CuPT and ZnPT (a). Venn diagram of DEG in flounder embryos treated with two biocides (b).

(라) 국제 시험종 독성자료 조사

현재 가용한 독성 DB의 대부분은 담수산, 국외 서식종이며 연안생태계보호기준의 산출 불가하였다 (Table 3.2.3.5, Table 3.2.3.6). 독성 DB를 이용하여 독성 데이터베이스를 이용하여 SSD (Species Sensitivity Distribution) 그래프를 작성하였다 (Fig. 3.2.3.10, Fig. 3.2.3.11). 또한, 민감도 비교를 위하여 HC₅ (Hazardous concentration 5%) 값을 산정하였는데 이는 환경 내 화합물 농도가 HC₅보다 낮으면 생물 종의 95%가 그 물질에 영향을 받지 않으므로 environmental quality objectives를 제공하기 위해 사용되고 있다. SSD 그래프를 통하여, CuPT 노출 되었을 경우 어류가 갑각류보다 민감한 경향을 보였고, 이들의 HC₅ 값은 0.112 ppb로 산출되었다. ZnPT 노출 되었을 경우 또한 어류가 갑각

류보다 민감한 경향을 보였으며, HC₅ 값은 0.7 ppb로 산출되었다. 이는 CuPT가 독성 영향은 CuPT가 ZnPT보다 높은 독성 민감도를 보임을 나타낸다.

Table 3.2.3.5. Toxic data base on CuPT.

Test Organisms	Toxicity Index	Effect	Values ($\mu\text{g/L}$)	Reference
Crustacean				
<i>Tigriopus japonicus</i>	24-h LC ₅₀	Mortality	38.8 - >80	Bao et al. (2008)
	96-h LC ₅₀	Mortality	9 - 73.8	
<i>Elasmopus rapax</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	11	Bao et al. (2011)
<i>Artemia Salina</i>	24-h LC ₅₀	Mortality	830	Jung et al. (2017)
<i>Artemia</i> sp.	48-h LC ₅₀	Mortality	319	Koutsftis and aoyama (2006)
<i>Heptacarpus futuhirostris</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	2500	Mochida et al. (2006)
Fish				
<i>Pagrus major</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	9300	Mochida et al. (2006)
<i>Oryzias melastigma</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	8.2	Bao et al. (2011)
<i>Pimephales promelas</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	4.3	Yamada (2007)
<i>Fundulus heteroclitus</i> (Larvae)	96-h LC ₅₀	Mortality	2.4-11	Mochida et al. (2009)
<i>Fundulus heteroclitus</i> (juvenile)	96-h LC ₅₀	Mortality	4.3-20.1	
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Juvenile)	7-day LC ₅₀	Mortality	7.6 (5.2-14)	Kobayashi and Okamura (2002)
	14-day LC ₅₀	Mortality	3.0 (2.0-4.2)	
	21-day LC ₅₀	Mortality	1.7 (1.0-2.4)	
	28-day LC ₅₀	Mortality	1.3 (0.3-1.7)	

Table 3.2.3.6. Toxic data base on ZnPT.

Test Organisms	Toxicity Index	Effect	Values ($\mu\text{g/L}$)	Reference
Crustacean				
<i>Cyprretta seuratti</i>	24-h LC ₅₀	Mortality	2415 (1298-4495)	Sánchez-Bayo and Goka (2006)
	48-h LC ₅₀	Mortality	524 (167-1643)	
<i>Daphnia magna</i>	24-h LC ₅₀	Mortality	145 (2-11151)	
	48-h LC ₅₀	Mortality	98 (1-9602)	
<i>Balanus Amphitrite</i> (larvae)	24-h LC ₅₀	Mortality	210 (200-230)	Bao et al. (2011)
<i>Elasmopus rapax</i> (juvenile)	96-h LC ₅₀	Mortality	29 (19-44)	
<i>Tigriopus japonicas</i> (adult)	96-h LC ₅₀	Mortality	170 (150-190)	
<i>Hep t a c a r p u s futi li ro str is</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	120 (92.3-157)	Mochida et al. (2006)
<i>Elasmopus rapax</i>	4-day LC ₅₀	Mortality	21.5 (14.3-32.5)	Bao et al. (2012)
	7-day LC ₅₀	Mortality	11.2 (8.3-15.1)	
<i>Tigriopus japonicus</i>	24-h LC ₅₀	Mortality	>500	Yamada (2007)
<i>Mysid shrimp</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	6.3	
<i>Penaeus japonicus</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	1780	
Fish				
<i>Oryzias melastigma</i> (larvae)	96-h LC ₅₀	Mortality	43 (32-57)	Bao et al. (2011)
<i>Pagrus major</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	98.2 (60.5-159)	Mochida et al. (2006)
<i>Pimephales promelas</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	2.6	Yamada (2007)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	3.2	
<i>C y p r i n o d o n variegatus</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	400	
<i>Pagrus major</i>	96-h LC ₅₀	Mortality	273	
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Juvenile)	7-day LC ₅₀	Mortality	8.4 (6.6-11)	Kobayashi and Okamura (2002)
	14-day LC ₅₀	Mortality	5.6 (4.5-7)	
	21-day LC ₅₀	Mortality	4.9 (4.0-6.0)	
	28-day LC ₅₀	Mortality	4.6 (3.6-5.7)	

CuPT

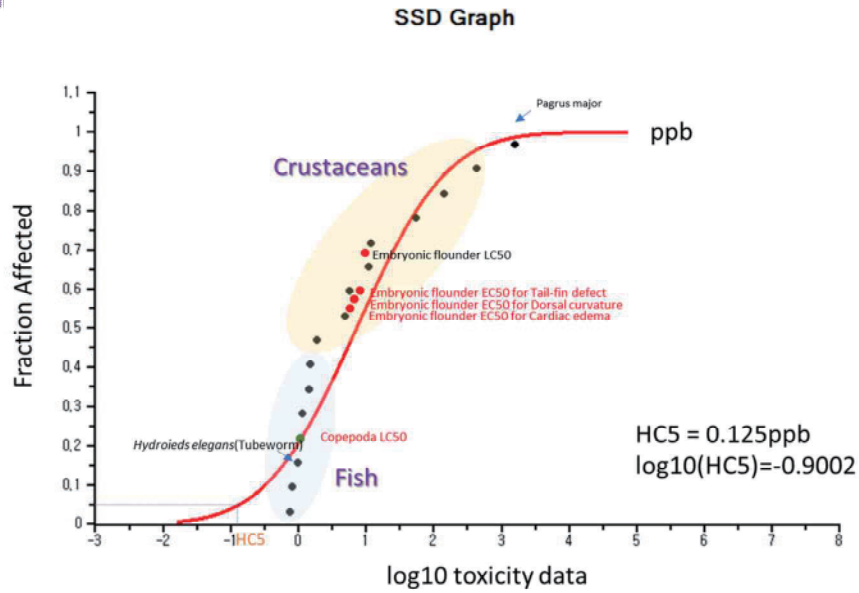


Fig. 3.2.3.10. SSD graph of aquatic organism exposed to CuPT based on ToxDB.

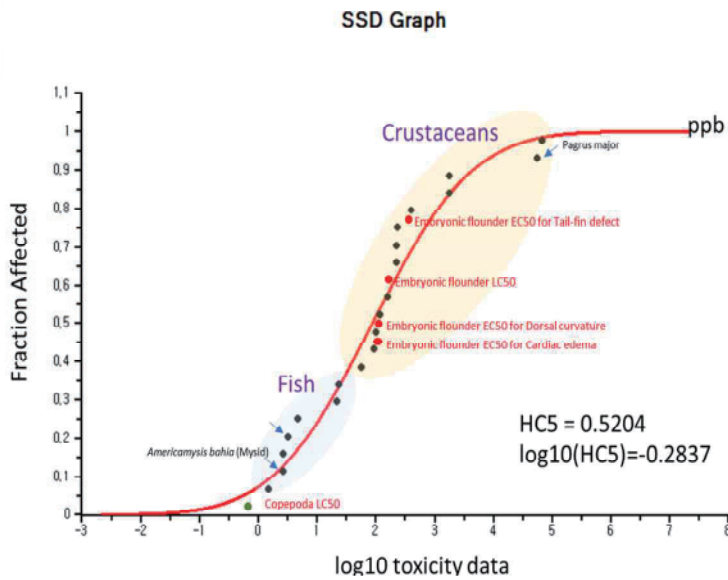


Fig. 3.2.3.11. SSD graph of aquatic organism exposed to ZnPT based on ToxDB.

나. 곤쟁이/단각류 독성평가

(1) 서론

3종의 주상용 booster biocide 에 노출된 넙치배아 발생독성 실험결과를 바탕으로 분해에 빠르지만, 급성독성영향이 가장 높은 Sea-Nine 211을 선정하여 비 표적생물인 까막곤쟁이 *Neomysis awatschensis*, 단각류 *Monocorophium uenoi* (350 μm -500 μm) 의 유생(<1-day old)에 노출시켜 급성독성 영향을 평가하였다. 특히 Diuron과 Irgarol 1051은 유럽등의 국가에서 이미 규제되어 생산이나 사용이 금지된 biocide이나 Sea-Nine 211은 2017년 현재 국내를 포함한 대부분의 국가에서 미규제 대상물질일 분 아니라, 연안중에 대한 일반적인 생태독성자료가 부족한 실정이다. 본 연구에서는 해수독성 평가를 위한 대표적인 시험종인 까막곤쟁이와 단각류에 대한 Sea-Nine 211의 급성독성영향을 평가하였다.

(2) 재료 및 방법

Sea-Nine 211(4,5-dichloro-2-octyl-isothiazolone, CAS No. 64359-81-5 SEA-NINETM 211N marine antifouling agent)을 일정량 취하여 최종농도시료를 일정량 취하여 최종 농도 10 mg/L 가 되도록 DMSO(dimethylsulfoxide) 사용하여 조제하였다. 노출농도가 되게 여과해수 (32 psu)를 이용하여 노출실험을 실시하였다. 시험대상종 및 적용시험법은 아래 Table 3.2.2.7과 같다. 범위 찾기 시험 (range-finding test) 시료를 5 단계 희석 (100, 10, 1, 0.1, 0.01) 최저 농도에서도 독성이 0으로 나타날 경우 더 낮은 농도까지 희석 시험을 실시하였다. 독성값 결정 시험(Definitive test)은 시험생물이 모두 사망한 최저 농도부터 2 배, 혹은 3 배의 희석비율로 5 단계 희석하였다. 시료마다 독성의 변화 범위는 다를 수 있으므로, 희석 비율과 단계는 조정하여 결정하였다.

Table 3.2.2.7. Test species and test methods.

분류군	시험종	관찰값	노출기간	시험법
단각류	<i>Monocorophium uenoi</i>	사망	4 일	해양수산부 2013
곤쟁이	<i>Neomysis awatschensis</i>	사망	4 일	EPA/821/R-02/012

(3) 결과 및 토의

DMSO 0.1%는 시험생물의 사망에 영향을 주지 않는 농도임을 확인하였다. Sea-Nine 211 시료 100 $\mu\text{g/L}$ 에서 전 개체가 사망, 10 $\mu\text{g/L}$ 에서 일부 개체가 사망하였고 1 $\mu\text{g/L}$ 에

서 모두 생존한 결과를 보였다. 실험결과로 결정된 시험농도구간을 세분화하여 급성독성 시험을 수행한 결과는 Fig. 3.2.2.12와 Fig. 3.2.2.13과 같이 나타났고, 방오물질에 대한 두 시험생물의 생태독성 파라미터는 Table 3.2.2.8과 Table 3.2.2.9와 같다. Sea-Nine 211 에 노출된 단각류의 LC_{50} 농도는 $18.3 \mu\text{g/L}$ 였고, 곤쟁이는 $6.09 \mu\text{g/L}$ 로 나타나 곤쟁이가 단각류보다 3배 가량 민감한 반수치사율을 보였다. 따라서 Sea-Nine 211 시료 $60 \mu\text{g/L}$ 이상 농도에서는 단각류가 생존하지 못하였고 노출 농도가 낮아짐에 따라 사망률 또한 낮아졌으며 노출농도 $5 \mu\text{g/L}$ 이하에서는 대조구와 유사한 사망률을 나타내었다. Sea-Nine 211 시료 $40 \mu\text{g/L}$ 이상 농도에서는 곤쟁이가 생존하지 못하였고 노출 농도가 낮아짐에 따라 사망률 또한 낮아졌으며 노출농도 $1 \mu\text{g/L}$ 이하에서는 대조구와 유사한 사망률을 나타내었다.

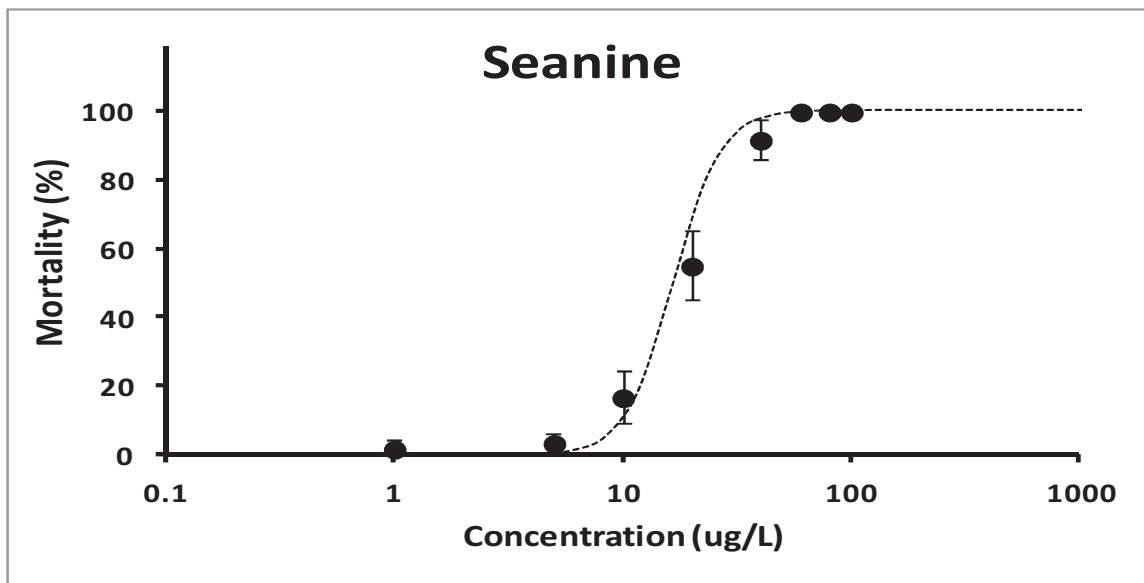


Fig. 3.2.2.12. Percentage of mortality in amphipoda (*Monocorophium uenoi*).

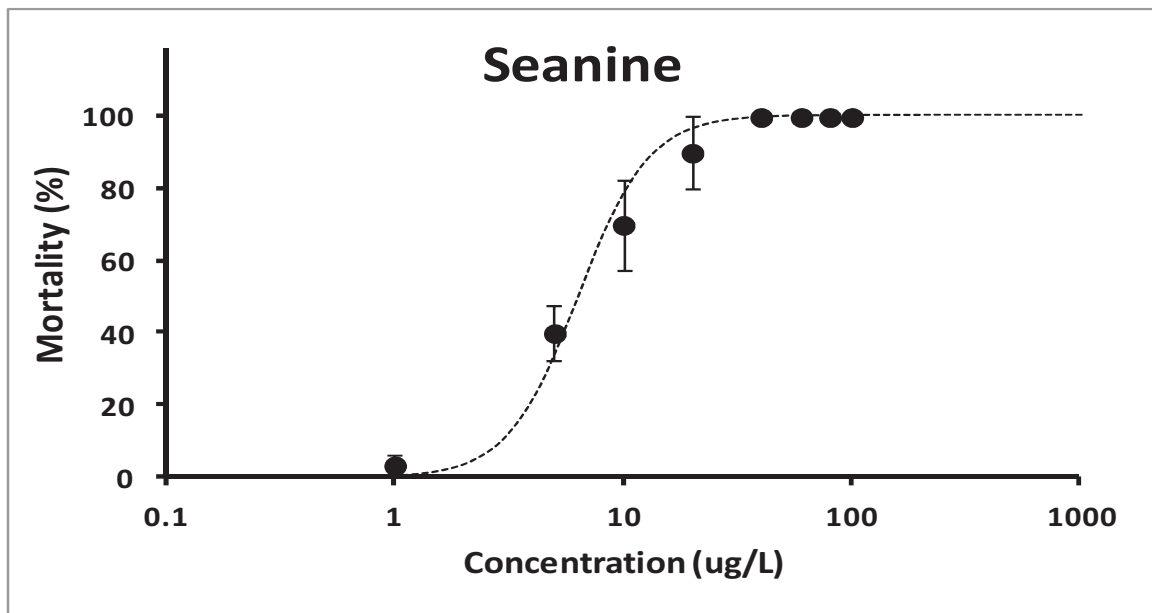


Fig. 3.2.2.13. Percentage of mortality in mysids (*Neomysis awatschensis*).

Table 3.2.2.8. Acute toxic parameter of amphipoda(*Monocorophium uenoi*)

ID	LC ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)	95% CL	
Sea-Nine 211	18.3	10.7	31.1

LC₅₀: 반수치사농도 (50% lethal concentration)

Table 3.2.2.9. Acute toxic parameter of mysids(*Neomysis awatschensis*)

ID	LC ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)	95% CL	
Sea-Nine 211	6.09	2.78	13.3

LC₅₀: 반수치사농도 (50% lethal concentration)

다. 등근성계 수정률 독성평가

(1) 서론

선박의 생물 부착을 막기 위해 방오 도료가 개발되어 사용되어왔고, 페인트 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 사용되어져 왔으나, 해양환경 및 생물에 미치는 악영

향이 알려지면서 1990년대 초반에 전면 사용이 금지되었고, 그 이후 TBT를 대체하기 위한 다양한 방오도료들이 개발되어왔다 (Alzieu, 2000). 현재 방오 도료에 대한 새로운 대안은 산화 구리 (Cu_2O) 및 구리 티오시아네이트 (CuSCN)와 같은 구리 화합물을 기반으로 한다 (Guardiola *et al.*, 2012; Voulvoulis, 1999). Irganol 1051, Sea-Nine 211, Diuron, Chlorothalonil 및 아연 피리 티온 (ZnPT)과 구리 피리 티온 (CuPT)과 같은 기타 금속 화합물이 가장 일반적으로 사용되는 biocide 물질이다 (Konstantinou and Albanis, 2004). 이 살조물질들은 유기주석 살조물질과 비교할 때 환경적으로 덜 해롭다. 그러나 몇몇 해양 생물에 대한 독성의 문제는 여전히 남아있다 (Braithwaite and Fletcher, 2005; Jacobson and Willingham, 2000; Mochida *et al.*, 2010; Sherrard *et al.*, 2003). 국내에서도 TBT, Sea-Nine, Cu-pyrithione과 Zn-pyrithione가 조피블락과 단각류에 미치는 영향에 대한 연구가 수행되었고 (박 등, 2006), TBT와 Sea-Nine 211가 rotifer 생존에 미치는 영향 (이 등, 2004)가 일부 수행되었으나, 성게 배아를 이용한 biocide 위해성 평가에 대한 연구는 국내에서는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 현재 국내외에서 많이 사용되고 있는 biocide 5종에 대한 위해성 여부를 둥근성게 수정률 실험을 통해 평가해 보고자 한다.

(2) 재료 및 방법

Biocide (Diuron, Irganol 1051, Sea-Nine 211, Copper pyrithione, Zinc pyrithion)에 대한 둥근성게의 수정률 실험을 수행하였다. 대조구 실험 및 실험구 회석을 위한 해수는 거제도 장목만 채수하여 여과 후 사용하였다. 여과해수와 함께 용매로 사용한 DMSO에 대한 대조구 실험도 수행하였다. 1차 실험에서는 Diuron, Irganol 1051, Sea-Nine 211에 대한 수정률 실험을 수행하였고, 2차 실험에서는 Copper pyrithione (CuPT), Zinc pyrithion (ZnPT)에 대한 독성 실험을 수행하였다. Diuron, Irganol 1051, Sea-Nine 211의 실험 농도는 $1 \mu\text{g/L}$ 부터 10배 단위로 농도를 증가하여 실험을 수행하였다. CuPT와 ZnPT는 각각 $0.001 \mu\text{g/L}$, $0.1 \mu\text{g/L}$ 에서부터 10배 단위로 농도를 증가하여 실험을 수행하였다. 실험방법은 2절 1. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE 영향 및 지표 발굴의 다. 둥근성게 수정률 독성실험의 (2) 재료 및 방법과 동일하게 수행하였다(Fig. 3.2.1.13).

(3) 결과 및 토의

여과해수를 이용한 대조실험에서는 둥근성게 수정률이 1차 실험에서는 $97 \pm 0.4\%$, 2차 실험에서는 $99 \pm 1.8\%$ 였다. DMSO 1% 용액에서의 수정률은 1차와 2차 실험에서 각각 $97 \pm 1.4\%$, $100 \pm 0\%$ 로 나타났다. Biocide에 대한 둥근성게 수정률 실험을 실시한 결과,

Irgarol 1051은 1~1,000 $\mu\text{g/L}$ 에서는 95%이상의 수정률을 보였고, 10,000 $\mu\text{g/L}$ 와 100,000 $\mu\text{g/L}$ 에서는 각각 15.7%, 0%의 수정률을 보여 대조구와 통계적으로 차이를 보였다(Fig. 3.2.3.1). Irgarol 1051의 EC_{50} 은 4,476 $\mu\text{g/L}$ 였다. Diuron은 1~1,000 $\mu\text{g/L}$ 에서는 97%이상의 수정률을 보여 대조구와 통계적으로 차이를 보이지 않았다. 10,000 $\mu\text{g/L}$ 에서도 70 \pm 16%의 수정률을 보였으나, 100,000 $\mu\text{g/L}$ 에서는 0%로 나타났다. Diuron의 EC_{50} 은 10,777 $\mu\text{g/L}$ 였다. Sea-Nine 211은 1 $\mu\text{g/L}$ 에서만 수정률이 90% 이상이었고, 10 $\mu\text{g/L}$ 에서도 15 \pm 11%로 수정률이 매우 낮았다. 100 $\mu\text{g/L}$ 이상의 농도에서는 모두 0%의 수정률을 보였다. Sea-Nine 211의 EC_{50} 은 8.134 $\mu\text{g/L}$ 였다. CuPT는 0.001~1 $\mu\text{g/L}$ 까지의 농도에서는 수정률이 모두 9%이상으로 나타나 통계적으로 대조구와 차이를 보이지 않았다(Fig. 3.2.3.14). 그러나 10 $\mu\text{g/L}$ 에서는 수정률이 5.1%까지 떨어졌고, 100 $\mu\text{g/L}$ 이상에서는 거의 수정률이 0%로 나타났다. CuPT의 EC_{50} 은 3.423 $\mu\text{g/L}$ 였다. ZnPT는 0.1~1 $\mu\text{g/L}$ 에서는 수정률이 90%이상으로 대조구와 통계적으로 차이를 보이지 않았으나, 10 $\mu\text{g/L}$ 에서는 수정률이 34%로 크게 감소하였고, 100 $\mu\text{g/L}$ 이상에서는 수정률이 0%로 나타났다. ZnPT의 EC_{50} 은 6.488 $\mu\text{g/L}$ 였다. 따라서 biocide 5종이 둥근성게 수정률에 미치는 영향은 CuPT > ZnPT > Sea-Nine 211 > Irgarol 1051 > Diuron의 순으로 나타났다.

살조물질이 포함된 화합물들이 해양 생태계에 미치는 영향에 대한 정보가 다소 부족한 실정이지만, 현재까지 보고된 연구 결과들을 살펴보면, Diuron과 Irgarol 1051은 위해성이 다소 덜한 것으로 나타났고, Sea-Nine 211의 독성이 더 강한 것으로 나타났다(Amara *et al.*, 2018). 동일종은 아니지만 성게 (*Paracentrotus lividus*)를 대상으로 발생 실험 (EC_{50})을 수행한 결과와 비교해 보면, Sea-Nine의 독성이 Irgarol에 비해 1,000배 이상 높은 것으로 나타났고, EC_{10} 은 2,000배 가량 높게 나타났다(Table 3.2.3.10). 본 연구에서도 Sea-Nine 211이 둥근성게 수정률에 미치는 영향이 다른 두 종류의 살조물질에 비해 500배 이상, 심지어 Diuron에 비해서는 1,000배 이상 독성이 강한 것으로 나타나 사용에 주의가 필요 할 것으로 판단된다.

성게 외 다른 생물군들을 Biocide (Diuron, Irgarol, ZnPT, 그리고 CuPT)에 대한 독성 정도를 비교해 보면(Table 3.2.3.11), Cyanobacteria는 Diuron, ZnPT, CuPT의 EC_{50} 이 상대적으로 낮았고, Microalgae는 Irgarol, 다모류 (Polychaete)와 갑각류 (Crustacea)는 CuPT의 EC_{50} 이 상대적으로 낮았다 (Bao *et al.*, 2011). CuPT와 ZnPT의 독성을 비교해 본 연구에서는 Marine algae, 갑각류 (*Tigriopus japonicus*), 어류 (*Pagrus major*)는 ZnPT, 어류 (*Oryzias melastigma*)는 CuPT의 EC_{50} (or LC_{50})이 낮아 종에 따라 영향을 미치는 biocide의 종류도 다른 것으로 나타났다.

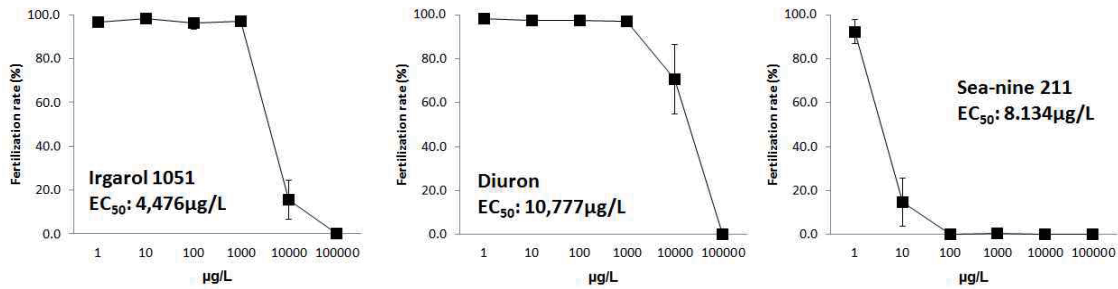


Fig. 3.2.3.14. The effects of Sea urchin fertilization rate on three kinds of biocide (Diuron, Irgarol, Sea-Nine).

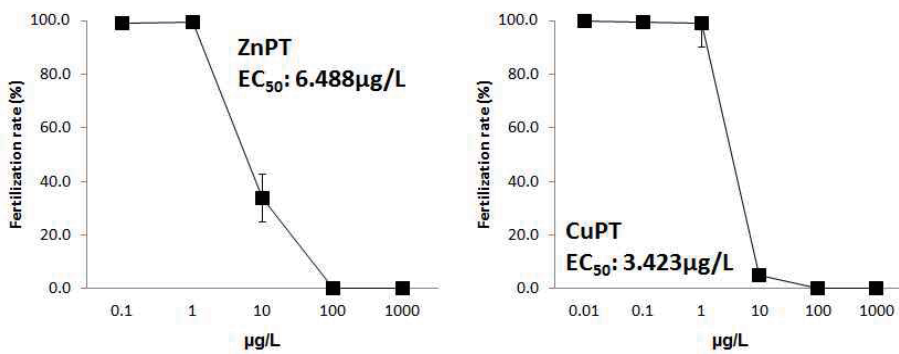


Fig. 3.2.3.15. The effects of Sea urchin fertilization rate on two kinds of biocide (CuPT, ZnPT).

Table 3.2.3.1. Comparison of EC₁₀ and EC₅₀ values of single antifouling biocide estimated for Echinoid.

Species name	End Point	Sea-Nine	Irgarol	Diuron	CuPT	ZnPT	Reference
Echinoid <i>Paracentrotus lividus</i>	EC ₁₀ (Development)	5.9 µg/L	11,463 µg/L	-	-	-	Bellas, 2006
	EC ₅₀ (Development)	12.1 µg/L	15,871 µg/L	-	-	-	
	EC ₁₀ (Development)	2.4 µg/L	-	-	-	-	Bellas, 2007
<i>Anthocidaris crassispina</i>	No effect (Development)	1 fg/L	10 µg/L	1 mg/L	1 pg/L	0.01 fg/L	Kobayashi and Okamura, 2002

Table 3.2.3.11. Comparison of EC₅₀ and LC₅₀ values of single antifouling biocide estimated for various marine organisms (unit: µg/L).

Species	End Point	Biocide					References
		Sea-Nine	Irgarol	Diuron	ZnPT (Zinc pyriithione)	CuPT (Copper pyriithione)	
Cyanobacteria							Bao <i>et al.</i> , 2011
<i>Chroococcus minor</i>	7-d EC ₅₀	-	5.7	4.7	51	50	
<i>Synechococcus</i> sp.	96-h EC ₅₀	-	23	110	22	22	
Microalgae							Bao <i>et al.</i> , 2011
<i>Skeletonema costatum</i>	96-h EC ₅₀	-	0.57	5.9	1.7	1.8	
<i>Thalassiosira pseudonana</i>		-	0.38	4.3	0.51	0.7	
<i>Pyrocystis lunula</i>	24-h EC ₅₀	-	>15,000	43,000	44	23	
Marine algae							Ontuka <i>et al.</i> , 2010
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	72-h EC ₅₀	-	-	-	7.3 (6.7 - 8.0)	8.0 (7.1 - 9.4)	
<i>Skeletonema costatum</i>		-	-	-	1.5 (1.4 - 1.9)	1.6 (1.3 - 2.7)	
<i>Chaetoceros calcitrans</i>		-	-	-	3.2 (2.6 - 4.2)	4.5 (3.6 - 8.1)	
<i>Tetraselmis tetraathele</i>		-	-	-	12 (10 - 19)	19 (13 - 45)	
Sea anemone							Bao <i>et al.</i> , 2011
<i>Aiptasia</i> sp.	96-h LC ₅₀	-	-	19,000	410	2,000	
Polychaete							Bao <i>et al.</i> , 2011
<i>Hydroides elegans</i> (Larvae)	48-h LC ₅₀	-	2,600	16,000	7.6	5.7	
Crustacean							Bao <i>et al.</i> , 2011
<i>Balanus amphitrite</i> (Larvae)	24-h LC ₅₀	-	2,200	21,000	210	63	
<i>Elasmopus rapax</i> (Juvenile)	96-h LC ₅₀	-	1,000	>3,000	29	11	
<i>Tigriopus japonicus</i> (Adult)		-	2,400	11,000	170	30	
<i>Tigriopus japonicus</i>	72-h EC ₅₀	-	-	-	23 (20 - 26)	280 (190 - 450)	Ontuka <i>et al.</i> , 2010
Fish							Bao <i>et al.</i> , 2011
<i>Oryzias melastigma</i> (Larvae)	96-h LC ₅₀	-	1,000	7,800	43	8.2	
<i>Pagrus major</i>	72-h EC ₅₀	-	-	-	9.3 (8.1 - 10.7)	98.2 (60.5 - 159)	Ontuka <i>et al.</i> , 2010

라. 동물플랑크톤 독성평가

(1) 서론

해양 구조물과 선박선저의 수중에 잠기는 부분에는 다양한 부착생물들이 부착하게 되고 부착생물들이 증식된 구조물의 표면에서는 부식과 변형과 같은 산상을 입게 된다. 특히 선박 선저에 부착된 생물들은 선박운항 시 바닷물과의 마찰력을 증가시켜 연료효율을 나빠지게 하여 경제적 손실을 야기 시킨다. 이러한 오손생물(Fouling organism)의 부착 및 성장을 억제하기 위해 각종 해양구조물과 선박에는 오래전부터 방오도료(Antifouling paint)를 사용해 왔다. AFS (Antifouling system) 처리활성물질로는 뛰어난 부착방지 효과를 가진 TBT (Tributyltin)계 도료를 널리 사용하였으나, 강한 독성으로 어폐류의 폐사, 성장억제 및 임포섹스 등의 생태계 교란현상을 일으켜 점차 규제하고 있는 실정이다. 최근에는 TBT계 방오도료를 대체하기 위해 다양한 종류의 AFS 처리활성물질의 개발이 이루어지고 있다. 그러나 아직 국내에서 AFS 처리활성물질의 독성 영향에 대한 자료가 부족하며, 연안서식 생물들에 대한 위해성에 대한 분석 기법 및 평가 기준이 없는 실정이다.

본 연구에서는 해양생태계에서 기초생산자로부터 얻어진 에너지를 상위 소비자까지 연결하는 중간 고리 역할을 담당하는 동물플랑크톤에 대해 AFS 활성물질의 독성영향을 파악하고자 하였다. 이를 위해 최근 널리 사용되고 있는 AFS 활성물질인 Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211, CuPT, ZnPT 등이 우리나라 연안에 우점하는 요각류 *Acartia omorii*와 *Paracalanus parvus* s.l.의 알(Egg)의 부화율과 유생 사망률에 미치는 영향에 대해 분석하였다.

(2) 재료 및 방법

동물플랑크톤에 대한 AFS처리 활성물질의 독성영향을 확인하기 위해 최근 널리 사용되고 있는 AFS처리 활성물질인 Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211, CuPT, ZnPT에 대한 요각류 알 부화율과 알에서 깨어난 유생의 사망률을 확인하였다. 실험 대상 생물은 우리나라 연안에 우점하는 요각류 *A. omorii*와 *P. parvus* s.l.를 채집하여 실험을 진행하였다. 대상 생물의 채집은 한국해양과학기술원이 위치한 경남 거제시 연안 및 장목에서 망구 42 cm, 망목 200 μm 의 원추형 네트를 이용하여 수 회 반복 채집하였으며, 생물 채집 장소에서 실험에 사용할 해수를 채수하였다. 채수해온 해수는 이물질 제거하기 위해 GF/F 여과지(47 mm, Whatman glass fiber filters)로 여과한 뒤 고압멸균기를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균 하여 실험에 사용하였다. 채집된 동물플랑크톤은 현미경 상에서 대상생물의 암컷 성체만을 골라내어 페트리디쉬 (Petridish)에 옮겨, 채집 시 현장의 해수

수온으로 설정한 배양기에서 약 6시간 보관한 뒤 대상 생물의 알을 취하였다. 알은 멸균 해수가 담긴 페트리디쉬에 수 차례 옮기면서 이물질을 제거하여 실험에 사용하였다.

분말 형태의 AFS처리 활성물질들은 DMSO에 용해 시켜 제조하였으며, 용매로 사용된 DMSO에 대한 영향을 최소화하기 위해 투입 물질이 전체 배양액의 0.1%가 되도록 하였다. 또한 DMSO이 요각류 알과 유생에 미치는 영향을 확인하기 위해서 DMSO 0%와 0.1%의 대조구를 제조하였다. 실험 농도 구간은 Table 3.2.3.12과 같이 6 well cell culture plate에 각각 10 mL이 되도록 하여 4개의 반복구로 제조하였다. 농도별로 제조된 각 cell에 요각류 알을 10개씩 투입하여 배양기에서 부화한 개체와 부화 후 유생의 생사를 확인하였다. 또한 각 실험구의 DO와 pH를 측정하여 실험 물질 외 다른 환경요인의 영향을 확인하였다.

Table 3.2.3.12. List for experiment concentration of AFS active substances.

Material	Diuron		Irgarol 1051		Sea-Nine 211		CuPT	ZnPT
Species	<i>A. omorii</i>	<i>P. parvus</i>	<i>A. omorii</i>	<i>P. parvus</i>	<i>A. omorii</i>	<i>P. parvus</i>	<i>P. parvus</i>	<i>P. parvus</i>
Unit	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹
Concentration	15	15	15	15	1	1	100	100
	10	10	10	10	0.5	0.5	10	10
	7.5	7.5	7.5	7.5	0.1	0.1	1	1
	1	5	1	5	0.01	0.01	0.1	0.1
	0.1	2	0.1	2.5		0.005	0.01	0.01
		1		1		0.001		0.001
		0.1	0.1		0.0001			

(3) 결과 및 토의

pH와 용존산소(DO)는 대조구와 모든 물질의 농도 구간에서 평균 8.07 ± 0.02 로 비슷한 수준이었고, 용존산소의 포화도도 평균 98.30 ± 0.26 로 대부분 포화상태에 가깝게 나타났다 (Table 3.2.2.13). 용매로 사용된 DMSO의 영향을 알아보기 위해 DMSO 0%와 0.1%의 알 부화율을 확인해본 결과 *A. omorii*는 각각 $86.7 \pm 12.6\%$ 와 $80.0 \pm 8.2\%$, *P. parvus* s.l.는 각각 $92.5 \pm 5.0\%$ 와 $93.3 \pm 5.8\%$ 로 모두 오차 범위 안으로 차이가 없어 DMSO가 0.1% 포함된 실험구를 대조구로 사용하였다.

Diuron에 대한 요각류 알의 부화율은 *A. omorii*의 경우 대조구에서 $83.0 \pm 5.8\%$ 의 부화율을 보였으며, 0.1 ppm(mg L^{-1})에서 $70.0 \pm 8.2\%$, 1 ppm에서 $67.5 \pm 0.0\%$, 7.5 ppm에서

57.5±8.2%, 10 ppm에서 33.0±5.8%. 15 ppm에서 30.0±5.8%의 부화율을 보였다(Fig. 3.2.3.16). *P. parvus* s.l.의 경우 대조구에서 7.7±5.8%의 부화율을 보였으며, 0.1 ppm에서 80.0±0.0%, 1 ppm에서 73.3±0.0%, 2 ppm에서 66.7±5.8%, 5 ppm에서 26.7±5.8%, 7.5 ppm에서 10.0±0.0%, 10 ppm에서 6.7±5.8%. 15 ppm에서는 모두 부화하지 않았다. Diuron에 대한 24시간 후 요각류 유생 사망률은 *A. omorii*의 경우 대조구에서 7.1±5.8%의 사망률을 보였으며, 0.1 ppm에서 10.0±5.8%, 1 ppm에서 36.4±0.0%, 10 ppm에서 77.0±5.8%, 15 ppm에서 80.0±5.8%의 사망률을 보였다. *P. parvus* s.l.의 경우 7.7±5.8%의 사망률을 보였으며, 0.1 ppm에서 8.3±5.8%, 1 ppm에서 8.3±5.8%, 2 ppm에서 45.0±10.0%, 2.5 ppm에서 88.9±5.8%의 사망률을 보였다. 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm에서는 살아있는 유생이 발견되지 않았다.

Irgarol 1051에 대한 요각류 알의 부화율은 *A. omorii*의 경우 대조구에서 83.0±12.6%의 부화율을 보였으며, 0.1 ppm에서 83.0±5.0%, 1 ppm에서 78.0±5.0%, 7.5 ppm에서 53.0±15.3%, 10 ppm에서 43.3±5.8%. 15 ppm에서 43.0±6.0%의 부화율을 보였다(Fig. 3.2.3.16). *P. parvus* s.l.의 경우 대조구에서 86.7±6.0%의 부화율을 보였으며, 0.1 ppm에서 83.3±6.0%, 1 ppm에서 76.7±6.0%, 2.5 ppm에서 66.7±5.8%, 5 ppm에서 43.3±5.8%, 7.5 ppm에서 33.3±6.0%, 10 ppm에서 33.3±6.0%. 15 ppm에서 25.0±6.0%의 부화율을 보였다. Irgarol 1051에 대한 24시간 후 요각류 유생 사망률은 *A. omorii*의 경우 대조구에서 7.1±5.8%의 사망률을 보였으며, 0.1 ppm에서 10.0±5.8%, 1 ppm에서 25.0±10.0%, 7.5 ppm에서 38.5±5.8%, 10 ppm에서 46.2±10.0%, 15 ppm에서 69.2±0.0%의 사망률을 보였다. *P. parvus* s.l.의 경우 대조구에서 11.5±10.0%의 사망률을 보였으며, 0.1 ppm에서 20.0±5.8%, 1 ppm에서 39.1±10.0%, 2.5 ppm에서 60.0±10.0%, 5 ppm에서 84.6±5.8%의 사망률을 보였다. 7.5 ppm, 10 ppm, 15 ppm에서는 살아있는 유생이 발견되지 않았다.

Sea-Nine 211에 대한 요각류 알의 부화율은 *A. omorii*의 경우 대조구에서 87.0±5.8%의 부화율을 보였으며, 0.01 ppm에서 73.0±5.8%, 0.1 ppm에서 43.0±5.8%, 0.5 ppm에서 33.0±5.8%의 부화율을 보였다. 1 ppm에서는 모두 부화하지 않았다(Fig. 3.2.3.16). *P. parvus* s.l.의 경우 대조구에서 90.0±10.0%의 부화율을 보였으며, 0.0001 ppm에서 73.3±5.8%, 0.001 ppm에서 43.3±11.5%, 0.005 ppm에서 16.7±11.5%, 0.01 ppm에서 3.3±2.8%의 부화율을 보였다. 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm에서는 모두 부화하지 않았다. Sea-Nine 211에 대한 24시간 후 요각류 유생 사망률은 *A. omorii*의 경우 대조구에서 13.0±5.8%의 사망률을 보였으며, 0.01 ppm에서 90.0±5.8%, 0.1 ppm에서 92.3±10.0%, 0.5 ppm에서 90.0±10.0%, 1 ppm에서 90.9±5.8%의 사망률을 보였다. *P. parvus* s.l.의 경우 대조구에서 7.4±5.8%의 사망률을 보였으며, 0.0001 ppm에서 22.7±5.8%, 0.001 ppm에서

61.5±12.0%, 0.003 ppm에서 85.7±10.0%의 사망률을 보였다. 0.01 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm에서는 살아있는 유생이 발견되지 않았다.

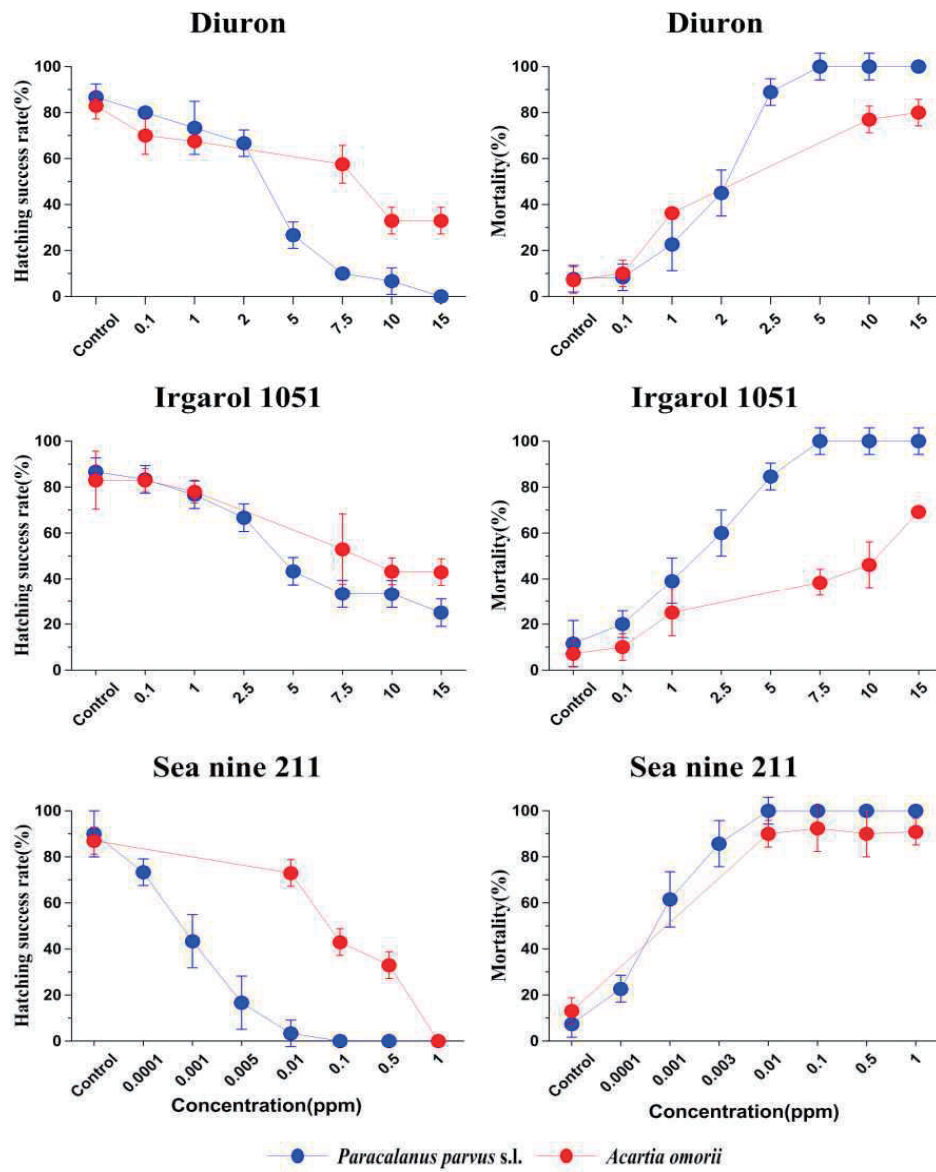
P. parvus s.l.의 24시간 후 반수치사농도(LC₅₀)는 Diuron이 2.17 ppm, Irgarol 1051이 1.24 ppm, Sea-Nine 211이 0.007 ppm 순으로 높게 나타나 Sea-Nine 211이 다른 물질에 비해 상당히 강한 독성을 가지는 것으로 나타났다(Table 3.2.3.14). 각 물질별로 요각류 알 부화율은 두 종 모두 Irgarol 1051, Diuron, Sea-Nine 211 순으로 높게 나타났으며, 요각류 유생 사망률에서는 Sea-Nine 211, Diuron, Irgarol 1051 순으로 높게 나타나 Sea-Nine 211의 독성이 가장 강했고 Irgarol 1051이 가장 약한 것으로 확인되었다. 두 종의 요각류 사이에서는 전체적으로 *A. omorii*가 *P. parvus* s.l.에 비해 높은 부화율과 낮은 유생 사망률을 보여 *A. omorii*가 선박부착 파생물의 독성에 대해 더 높은 내성을 가지는 것으로 보인다.

Table 3.2.3.14. Result of pH and dissolved oxygen saturation of AFS active substances.

	Concentration (mg L ⁻¹)	pH	DO (%)
Diuron	Control	8.06	98.1
	Control(DMSO 0.1%)	8.10	98.2
	20	8.08	98.5
	15	8.08	97.9
	10	8.08	98.7
	1	8.08	98.7
	0.1	8.10	98.8
Irgarol 1051	Control	8.08	98.1
	Control(DMSO 0.1%)	8.10	98.4
	20	8.10	98.1
	15	8.08	98.2
	10	8.08	98.5
	1	8.08	98.5
Sea-Nine 211	Control	8.06	98.0
	Control(DMSO 0.1%)	8.02	98.2
	1	8.02	97.9
	0.75	8.02	98.3
	0.5	8.04	98.1
	0.1	8.06	98.4
	0.01	8.06	98.5

Table 3.2.3.14. LC₅₀ values of AFS active substances to *P. parvus* s.l.

Material	Diuron	Irgarol 1051	Sea-Nine 211
24-h LC ₅₀ (mg L ⁻¹)	2.17	1.24	0.0007

Fig 3.2.3.16. Eggs Hatching success rate and nauplii mortality for AFS active substances(Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211) of *A. omorii* and *P. parvus* s.l.

AFS 활성물질인 CuPT와 ZnPT에 대한 요각류 *P. parvus* s.l에 대한 독성평가 결과를 살펴보면, $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도($10, 100 \mu\text{g L}^{-1}$)에서의 부화율은 CuPT와 ZnPT 모두 0%의 부화율을 보여 독성정도가 매우 강했으며, $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 이하 농도($0.1, 0.01, 0.001 \mu\text{g L}^{-1}$)에서는 CuPT가 80% 이상의 부화율을 보인 반면에 ZnPT는 40-83%로 CuPT의 부화율이 전반적으로 높았다(Fig. 3.2.3.17). 유생 사망률은 두 물질 모두 $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상 농도에서는 80% 이상으로 독성정도가 높았으며, $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 이하에서는 27-50% 범위로 유사하였다. 유생의 반수치사농도(LC₅₀)는 CuPT와 ZnPT에서 각각 $6.16 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $1.19 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 CuPT보다 ZnPT의 독성정도가 더 민감한 것으로 분석되었다(Fig. 3.2.3.17).

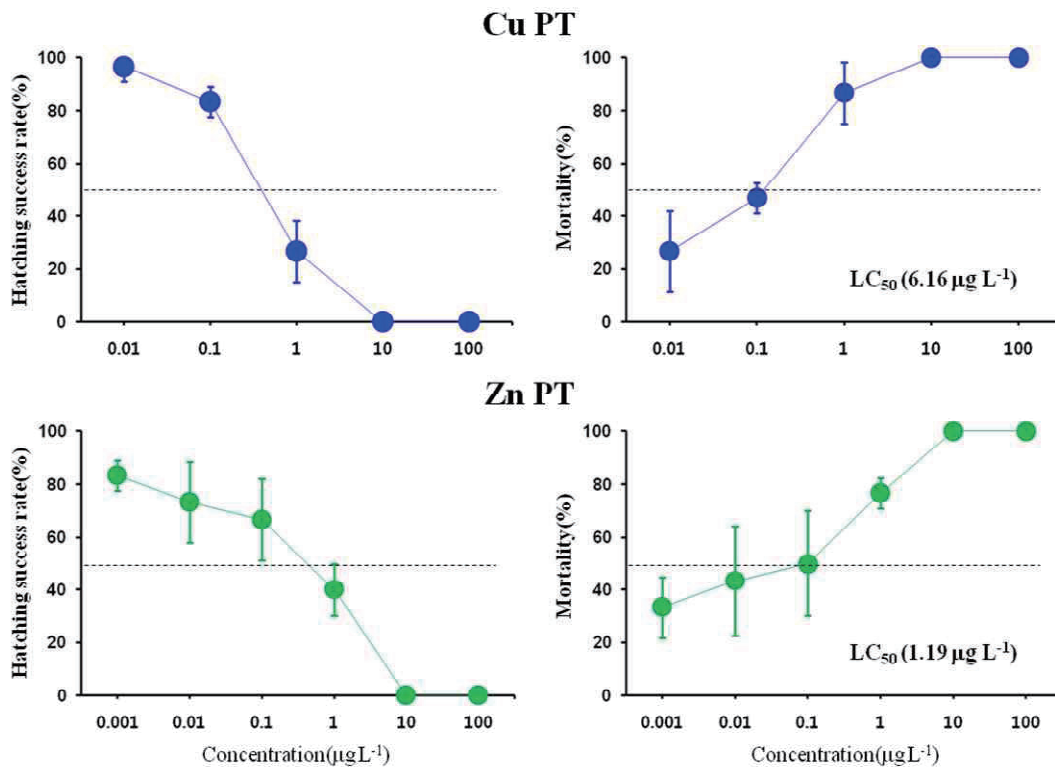


Fig. 3.2.3.17. Eggs hatching success rate and nauplii mortality for AFS active substances(CuPT, ZnPT) of *P. parvus* s.l.

제3절 선박부착기인 생물 및 위해성 요인탐색 및 판별시도

1. 선저부착생물 확보 및 판별 그리고 위해성요인 탐색

가. 선저부착 미세구조류

(1) 서론

부착 미세구조류는 박테리아와 함께 기질에 가장 먼저 부착하는 생물로 부착미세구조류는 EPS (Extracellular polymeric substances)를 분비하여 기질에 부착하여 서식한다(Fig. 3.3.1.1).

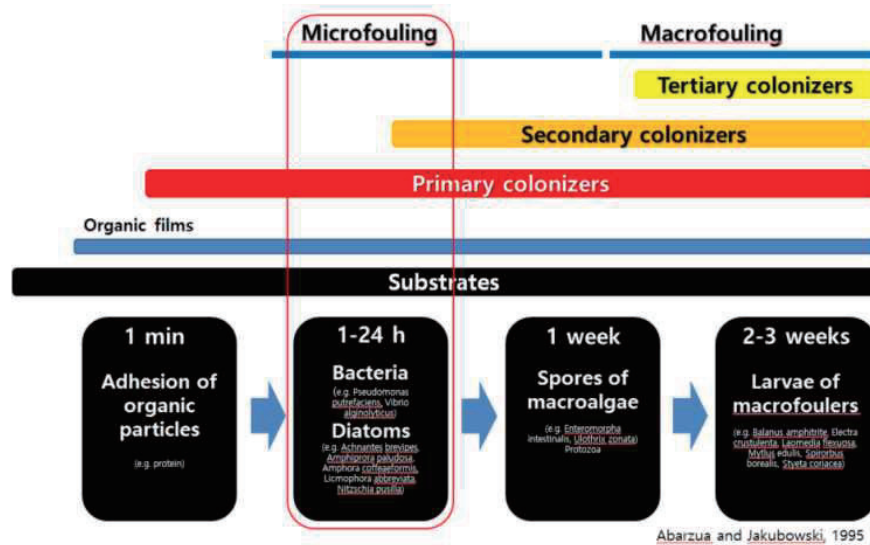


Fig. 3.3.1.1. Temporal structure of settlement of biofouling organisms.

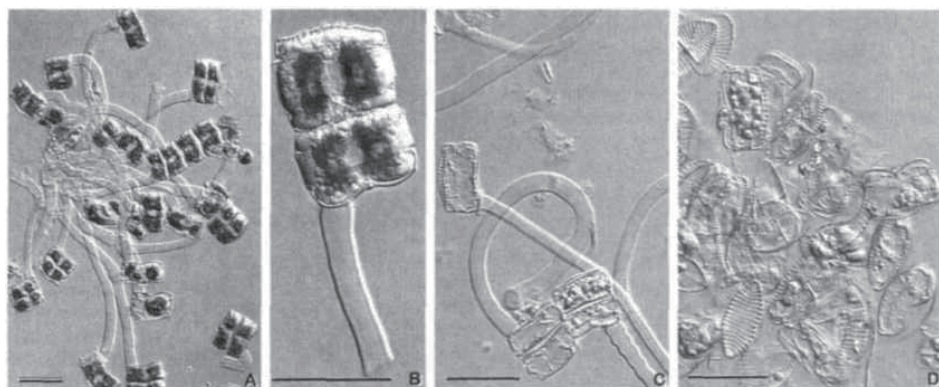


Fig. 3.3.1.2. Bio-indicators of biofouling diatoms (Wustman *et al.*, 1997).

선박 부착 미세 규조류는 선박 기질 특이성에 의해 선택적으로 부착되므로, 선박 도료 (방오제)의 위해성 평가의 지시종으로 사용할 수 있다(Fig. 3.3.1.2). 선박의 수중 표면은 외래기인 침입종 (비토착생물)이 이동할 수 있는 매체로 활용되고 있다. 즉 특정해역의 생물이 선박에 부착하여 타 해역으로 이송되어 그 해역의 환경과 생태계를 교란시킬 수 있다. 국제해사기구 미래 해양환경규제 수준의 현실적 설정을 지원하고, 그에 따른 수중 제거기술의 신규패러다임 시장진입을 견인할 수 있는 위해성 평가방법의 개발이 필요하며, 국제해사기구에 상정할 국가차원 선박부착생물 수중제거관리 통합프로세스 제시해야 한다. 따라서 본 연구개발은 선박 부착기인 미세규조류 판별 및 위해성 요인 탐색을 위하여 1)선박 부착 외래기인 침입 미세규조류 판별하고, 2)선박 도료 (방오제)의 기질 특이적 부착미세규조류 개발을 목표로 한다(Fig. 3.3.1.3).



Fig. 3.3.1.3. The goal of this study. G1, investigation of biofouling diatoms (focused on invasive species) and G2, investigation of specific diatoms by paint tolerance.

(2) 재료 및 방법

한국해양과학기술원 (이하 우리 원) 해양 조사선인 이어도호, 장목 1, 2호, 온누리호, 이사

부호를 대상으로 선박 표면 부착 미세조류를 조사하였다. 조사는 정기 상가수리를 위해 2017년 3월 (장목 2호, 이어도호, 온누리호)과 2017년 9월 (장목 1호) 그리고 2018년 1월 (이사부호) 육상 이동 후 각 선박 당 5-7개 채집 정점을 선정하여 30 cm × 30 cm 면적의 부착미세조류를 채집 후 시료는 50 mL로 농축하였다. 농축된 시료는 광학현미경 관찰을 위하여 부착미세조류의 세포 내 유기물을 제거 후 영구프레파라아트 제작하여 광학현미경으로 검정하였으며, 크기가 작아 종을 분류하기 힘든 시료는 주사전자현미경으로 초미세구조를 파악하여 종을 분류하였다. 채집된 시료 (방오제)의 화학성분을 파악하기 위하여 일정량 (건중량 기준 5 g)을 건조 후 EDS (Energy Dispersive Spectrometer)로 시료의 원소 분석을 실시하였다(Fig. 3.3.1.4, Fig. 3.3.1.5). 채집된 부착미세조류의 metagenomics 분석을 위하여 Mi-Seq을 이용한 NGS (Next generation Sequencing) 분석을 실시하였다(Fig. 3.3.1.4).

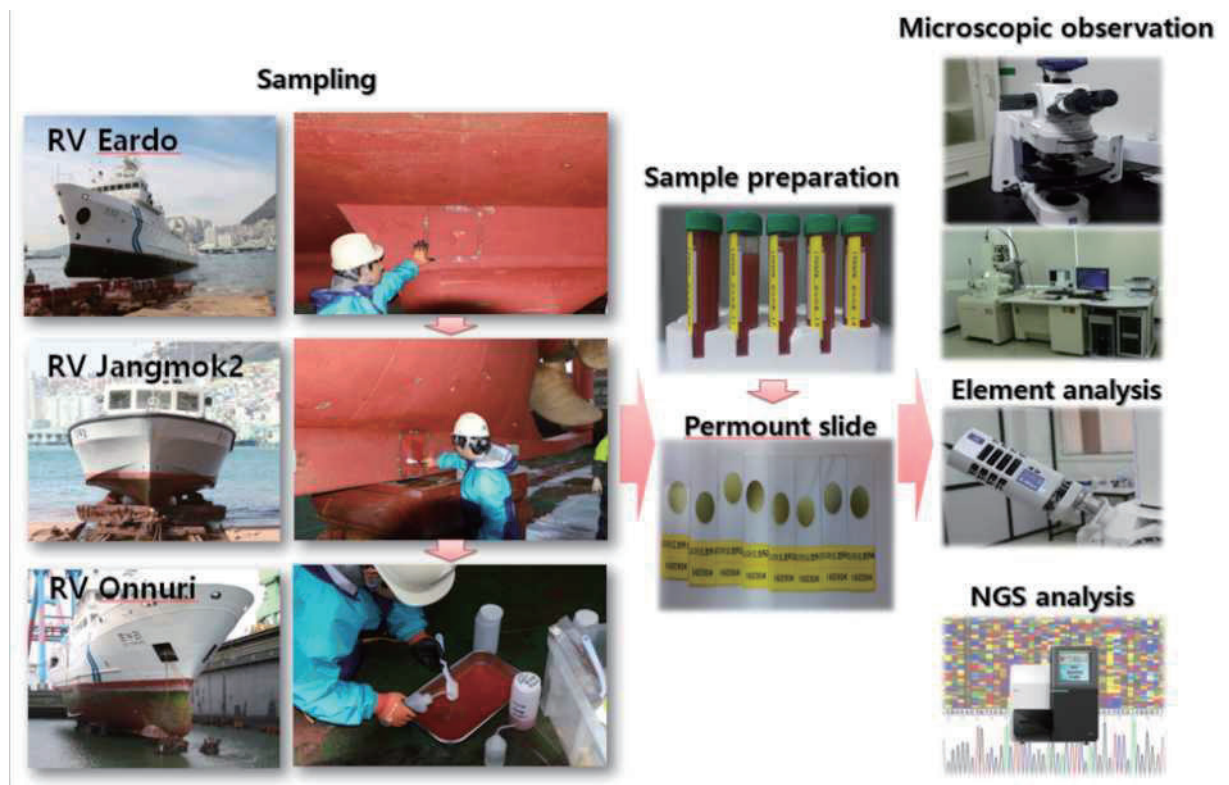


Fig. 3.3.1.4. The analyzed process of attached diatoms in ship-surface. 1) Sampling method: 30 × 30 cm quadrat method, 2) Sample preparation: concentrated and permount sample, 3) Analyses (light microscope, scanning electron microscope, element analysis, and NGS analysis).

(3) 결과 및 토의

(가) 선박 부착 미세조류 출현량

2017년 3월 조사를 했던 Local급 선박 (장목 2호)의 평균 출현량은 $39.63 \pm 16.89 \times 10^5$ cells cm^{-2} 로 가장 높았으며, Coastal급 선박 (이어도)이 $10.06 \pm 11.07 \times 10^5$ cells cm^{-2} , Ocean급 선박 (온누리호)은 $4.34 \pm 0.97 \times 10^4$ cells cm^{-2} 를 나타냈다(Fig. 3.3.1.6). 2017년 9월 조사를 수행했던 Local급 선박 (장목 1호)의 평균 출현량은 $63.44 \pm 10.58 \times 10^5$ cells cm^{-2} 개체수를 보였다. 따라서 출현량은 Local급 (장목 1호, 2호) > Coastal급 (이어도호) > Ocean급 (온누리호)의 순으로 나타났다. (Fig. 3.3.1.5)

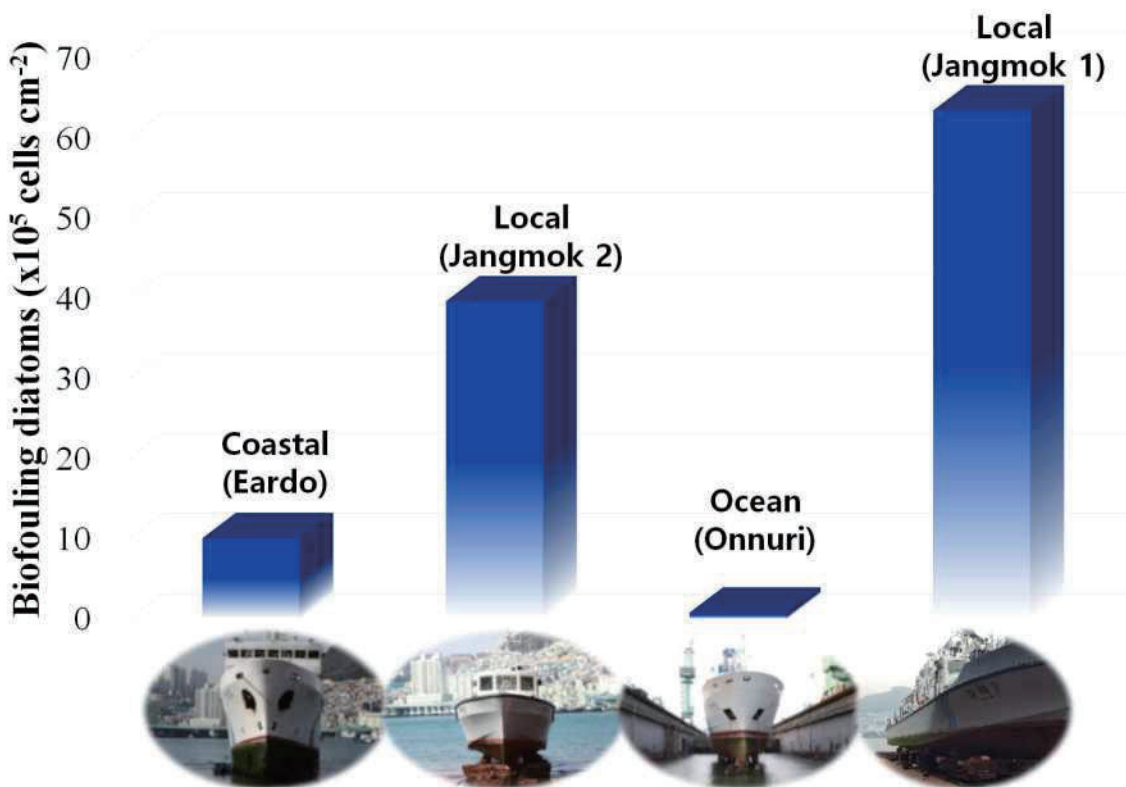


Fig. 3.3.1.5. Changes in abundances of attached diatoms on investigated ships (R/V EARDO, JANGMOK 1 and 2, ONNURI).

(나) 출현종 및 주요 우점종

Local 급 (장목 2호) 및 Coastal 급 (이어도 호)에서는 각각 12과 16종이 출현하였으며, Ocean 급 (온누리 호)는 9종이 출현하여 다른 조사선의 출현종에 비해 낮은 출현종을 보였다(Fig. 3.3.1.7). 주요 우점종은 장목 2호와 이어도호에서는 *Navicula muscatinei* 가 각각 97.89%와 94.94%로 절대적인 우점을 보인 반면, 온누리호에서는 동종 (*Navicula*

muscatinei)이 54.50%로 제 1우점을 차지하였으나, 다른 조사선의 우점율에 비해 상대적으로 낮았다. 2017년 9월에 조사를 했던 Local급 (장목 1호)는 *Navicula* 속의 종들이 가장 우점하였다. (Figure 3.3.1.6)

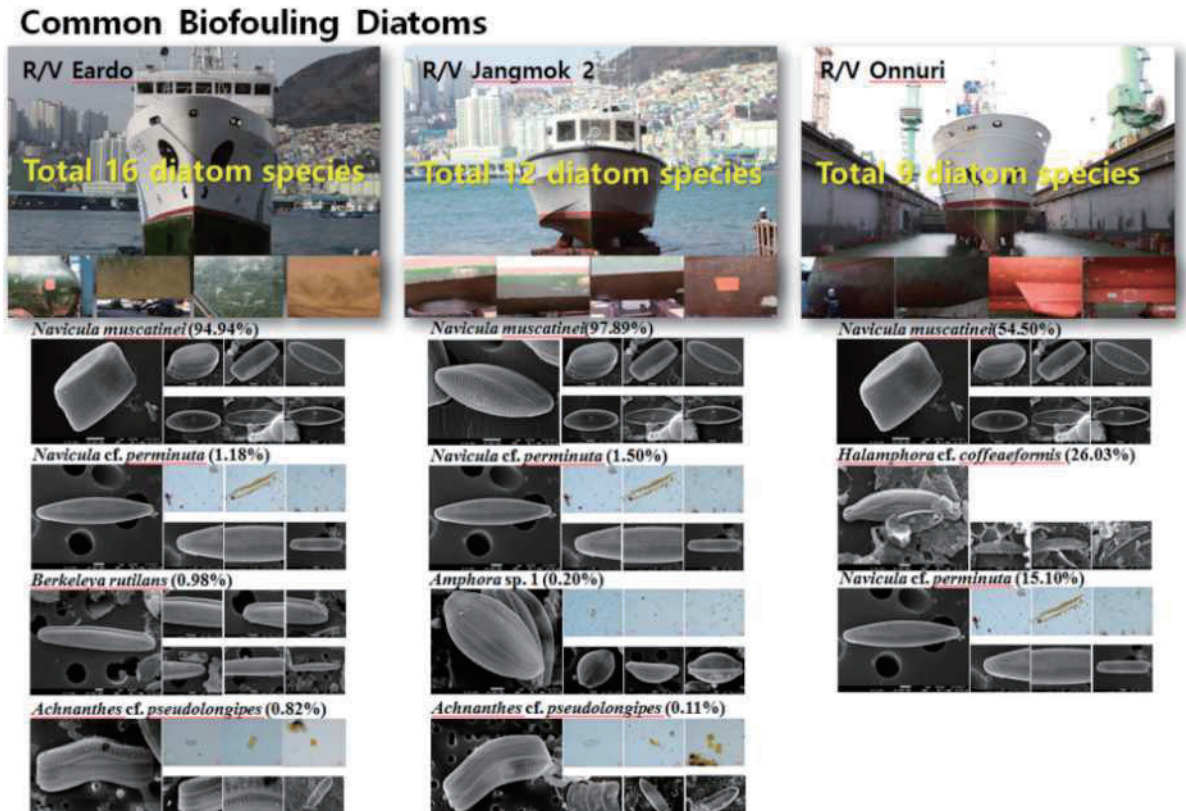
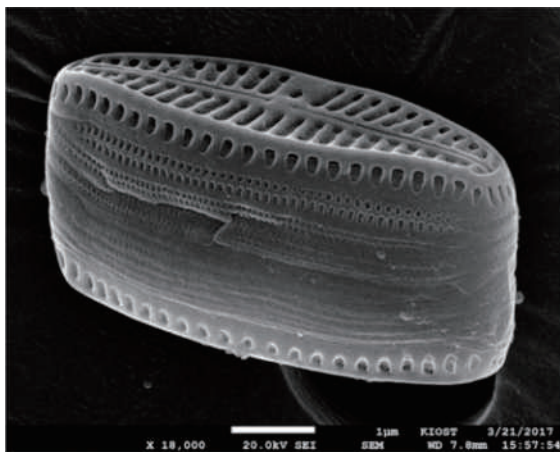


Fig. 3.3.1.6. Common diatom species in investigated ships (R/V EARDO, JANGMOK 2, ONNURI).

(다) *Navicula muscatinei* (First dominant diatom)

장목 2호, 이어도호, 온누리호에서 제 1 우점종인 *Navicula muscatinei*는 우리나라의 미기록종이며, 현재 본종의 분류학적 key는 *Navicula* 속을 따르는 것보다 신 속 (New genus)인 *Olifantiella* 속으로 이속되는 것이 타당한 것으로 판단된다(Fig. 3.3.1.7).



Transfer of the small naviculoid diatom *Navicula muscatinei* to the genus *Olifantiella*

Olifantiella elisabethiana, a new raphid diatom species (Bacillariophyta) observed in the Port of Antwerp (Belgium)

BART VAN DE VUYVER^{1,2*}, ADRIENNE MERTENS³ & HERMAN VAN DAM⁴
¹Botanische Garden Middel, Department of Bryophytes & Phaeophytes, Nieuwelaan 18, B-2000 Melle, Belgium
²University of Antwerp, Department of Biology, ECODI, Universiteitsplein 1, B-2610 Wilrijk, Belgium
³Greening, Nieuwland B.V., PO Box 91231, 1098 BC Amsterdam, The Netherlands
⁴Consultancy for Water and Nature, PO Box 17777, 1019 BJ Amsterdam, The Netherlands
 *Corresponding author (E-mail: bart.vandevuyver@plantensciences.be)

THE UNUSUAL LIFE CYCLE OF NAVICULA MUSCATINEI

John J. Lee* and Xenophon Xenophontes

Department of Biology, City College of CUNY,
 Convent Ave. at 138 Street, New York, N.Y. 10031, U.S.A.

Navicula muscatinei was isolated from foraminifera growing near the southern end of the Great Barrier Reef. This diatom, which grows as a naked zooxanthella in its foraminiferan hosts, can form normal frustules in culture, but it often gives rise to frustules with distorted raphe systems and striation, and can also form large spherical or dumb-bell-shaped cells. Some at least of the large cells are multinucleate. They bear scales, in which an abnormal raphe is usually visible, subtending a somewhat irregular system of ribs. The significance of the large cells remains unclear but it is suggested that they may be autosporangia.

Olifantiella mascarenica gen. & sp. nov., a new genus of pennate diatom from Réunion Island, exhibiting a remarkable internal process

Catherine Riaux-Gobin^{1*} and Pierre Compiègne²
¹Laboratoire d'Océanographie Biologique, UMR7621, Avenue du Fortaillé, F-66650, Banyuls-sur-Mer, France, and
²Jardin Botanique National de Belgique, Domaine de Bouchoit, B-1360 Melle, Belgium

New species in the marine diatom genus *Olifantiella* (Bacillariophyta, Biraphidinea) from Rodrigues Island (Western Indian Ocean)

Catherine RIAUX-GOBIN^{*1} & Adil YOUSIF AL-HANDAL²

¹ENR 1278 CNRS-EPHE, CRIOBE-Université de Perpignan, FR-66600, France; *Corresponding author e-mail: catherine.gobin@univ-perp.fr

²Göteborgs Universitet, Institutionen för Marin Ekologi, Box 462, SE-403 30 Göteborg, Sweden
 (present address: Dept. of Marine Biology, Marine Science Centre, Basra, Iraq)

Fig. 3.3.1.7. Reference study to transfer of the small naviculoid diatom *Navicula muscatinei* to the genus *Olifantiella muscatinei*.

미기록종인 *Navicula muscatinei*는 외래 기인 침입종인가? 아니면 토착종인가? 를 파악해야 한다. *Navicula muscatinei*가 가장 높은 출현한 장목 2호 및 이어도호의 조사해역은 우리나라 연안 및 연근해 해역이며, 따라서, 비록 미기록종이나 우리나라 연안에서 출현할 가능성이 높다. 또한 *Navicula muscatinei*가 우리나라 연안에서 출현하는 것을 파악하기 위해 우리원 조사선의 모항인 장목만에서 바위 및 해조류를 채집하여 부착 미세조류를 파악한 결과, 장목만에서는 출현한 주요 우점종은 *Navicula diabolica*이며 선박 부착 주요 미세규조류인 *Navicula muscatinei*는 출현하지 않았다(Fig. 3.3.1.8). 이는 일반적인 바위나 해조류에 부착하는 기질 특이성을 가지고 있지 않고, 선박 도료 등의 특정 기질에 부착하는 기질 특이성을 가지고 있을 가능성이 높다고 판단된다.

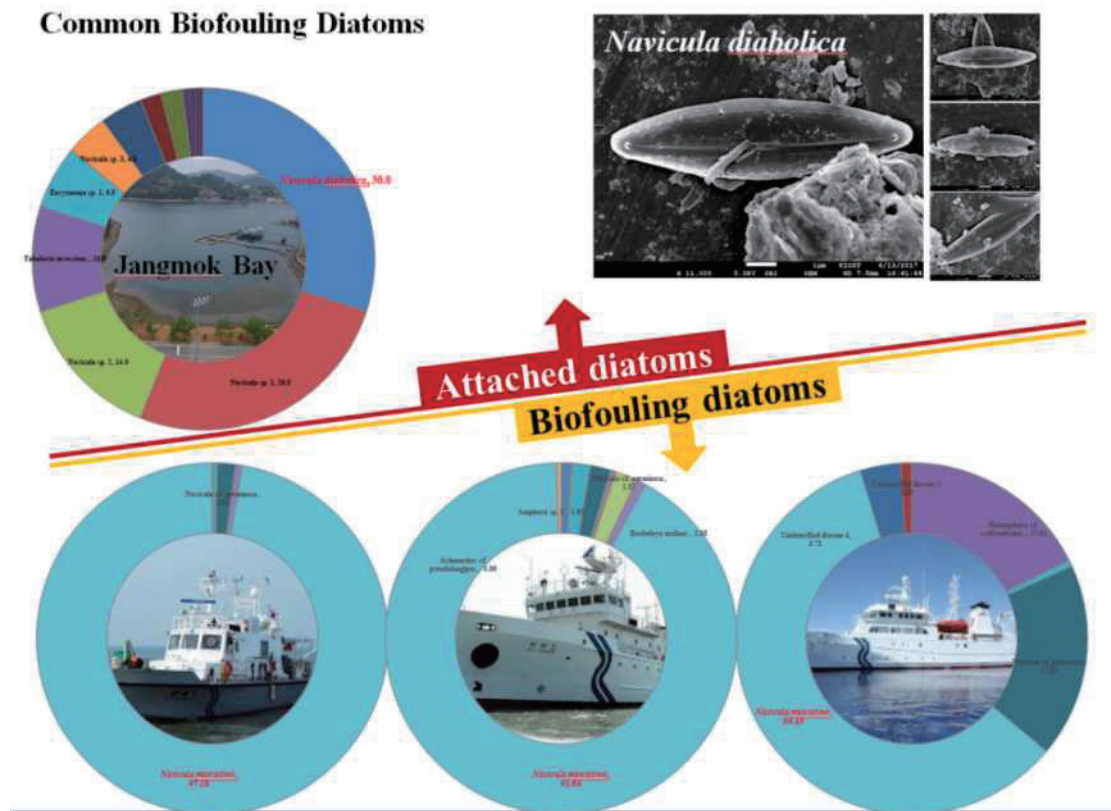


Fig. 3.3.1.8. Comparison of attached diatom assemblages between ship surface (R/V EARDO, JANGMOK 2, ONNURI) and natural substances (hard rock and macroalgae).

(라) EDS 분석을 통한 선박도료 (방오제)의 성분

장목 2호, 이어도호, 온누리호의 선박 도료의 화학성분을 분석한 결과, 탄소 및 산소가 가장 높은 조성으로 큰 차이는 없었으며, 중금속 성분은 아연이 평균 7.11%로 가장 높았다. 특히 온누리호에서는 14.40%의 아연 성분이 검출되었다(Fig. 3.3.1.9). 그 외 알루미늄, 황, 구리, 망간 성분이 1% 이하로 검출되었다. 이는 각 조사선별 유사한 화학성분과 부착 미세조류의 개체수와 비교 시 어떤 특정 화학성분의 기질 특이성으로 출현량의 변동을 파악할 수 없다고 판단되며, 조사지역과의 연관성이 더 크다고 판단된다.

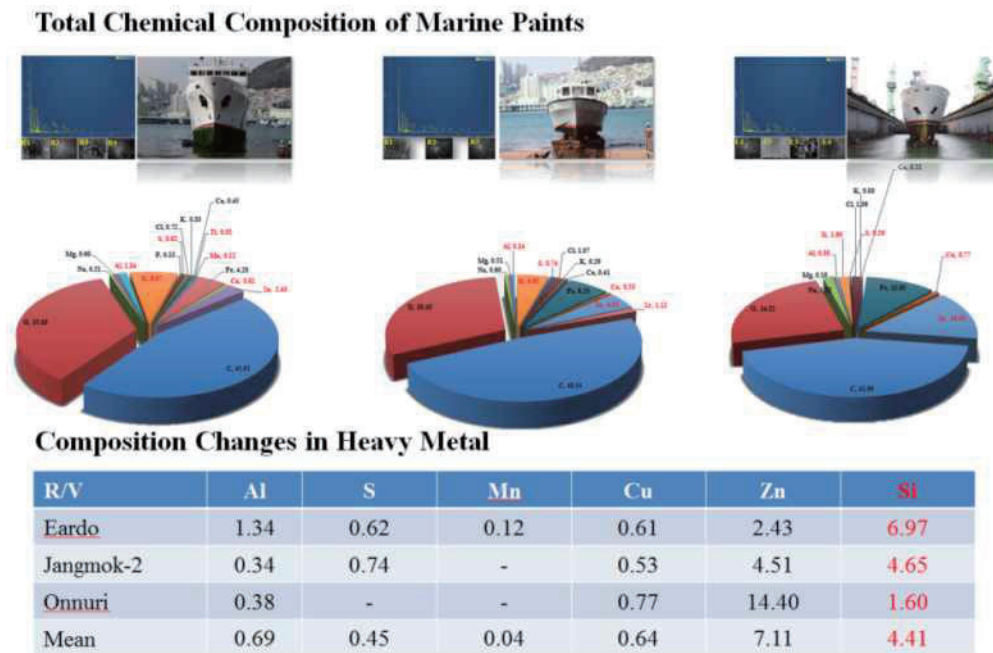


Fig. 3.3.1.9. Chemical composition by EDS analysis in ship surface of R/V EARDO, JANGMOK 2, and ONNURI.

장목 2호 및 이어도에서 가장 높은 우점율을 차지한 *Navicula muscatinei*는 자연상태에서는 관찰되지 않았으나(Fig. 3.3.1.10), 모든 조사 선박에서 높은 우점으로 관찰된 점을 고려하여 향후 본 종에 대해 부착 기질 특이성 연구가 수행해야 한다.

Substrate Specificity of Biofouling Diatom?

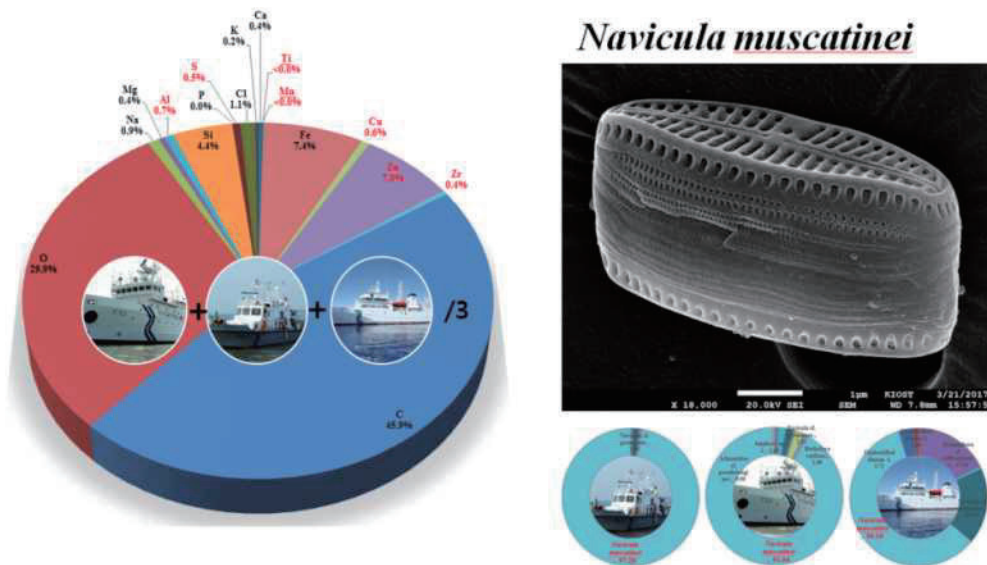


Fig. 3.3.1.10. Comparison between EDS results diatom assemblages focused on predominant *Navicula muscatinei*.

이사부호의 선저에 부착된 미세조류와 방오도료의 관계를 파악하고자 EDS 분석을 실시 하였으며, 그 결과 Zn 9.78%, Cu 1.72%, S 1.30%, Al 1.33%의 중금속 성분이 검출되었다. 이사부호에서 5개 채집 시료 중 1개 채집시료에서만 부착 미세조류가 관찰되었으며, 종은 *Amphidinum* sp.로 1 cm² 당 3,954 cells로 2017년 장목 1, 2호, 이어도호 및 온누리호에 서 채집된 부착 미세조류의 개체수 및 종 다양성에 비해 매우 낮은 수준이었다(Fig. 3.3.1.11).

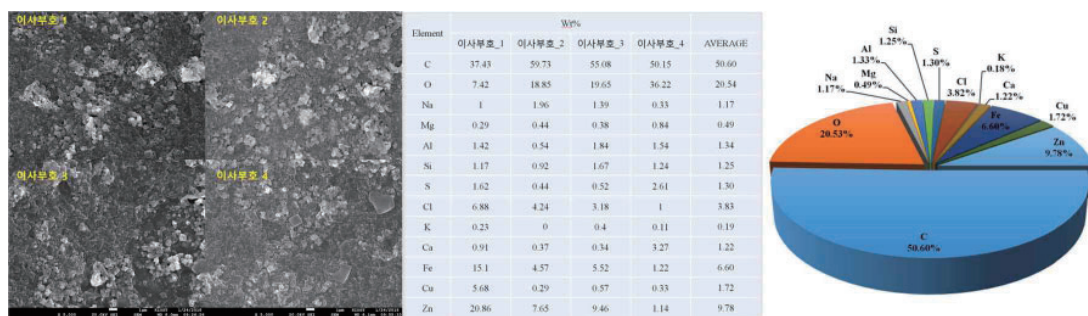


Fig. 3.3.1.11. Chemical composition by EDS analysis in ship surface of R/V ISABU.

(마) Next Generation Sequencing 분석을 통한 선저부착미세조류 군집 분석
 차세대 염기서열 분석을 통한 선저부착미세조류의 분포를 확인하였다(Fig. 3.3.1.12).

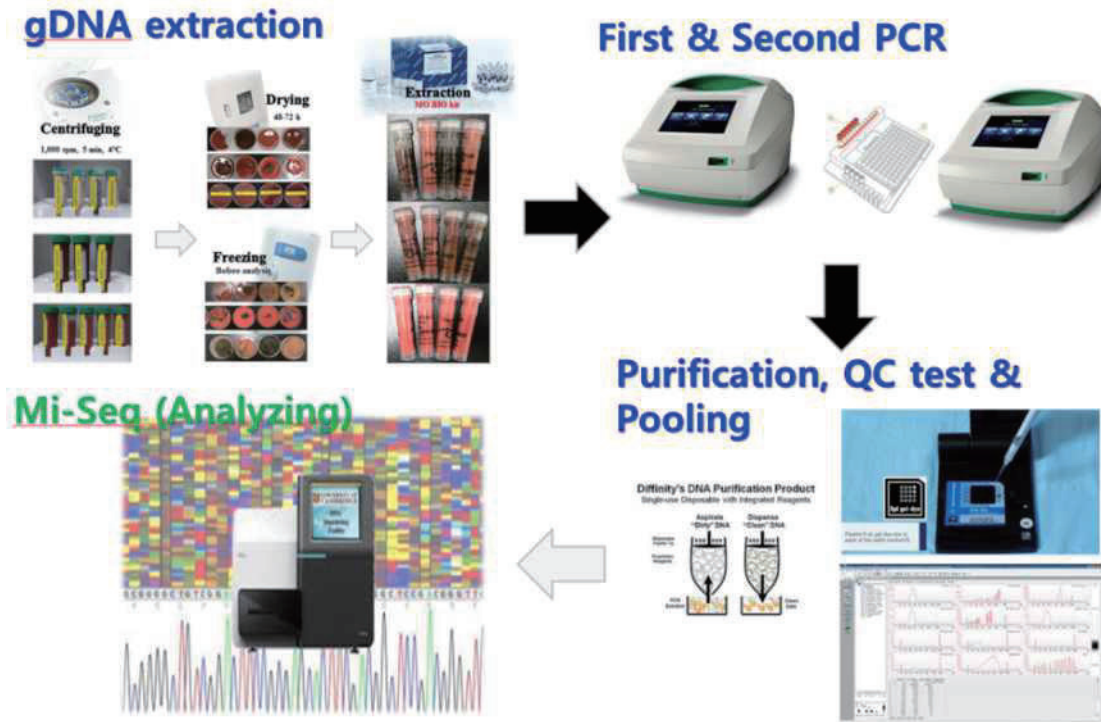


Fig. 3.3.1.12. Analysis process of Next Generation Sequencing method.

각 조사선박별 부착생물 군집은 Coastal급 (이어도호)와 Ocean급 (온누리호)는 갈조류 (Brown algae)가 각각 63.0% 및 40.1%로 가장 높게 검출되었으며, Local급은 섬모충이 37.2%로 가장 높게 출현하였다(Fig. 3.3.1.13). 선저 부착 미세 규조류는 Coastal 급과 Local급에서 *Navicula* 속내 분류군들이 가장 높게 출현한 반면, Ocean급에서는 *Chaetoceros*속내 분류군이 가장 높게 출현하였다(Fig. 3.3.1.13).

각 선박별 평균치를 산정한 결과, 선박부착생물 (Division level)은 갈조류가 가장 높게 출현하였다. 선박 부착 미세 규조류는 *Navicula*가 가장 높게 출현하였고, 이는 현미경 관찰에서 주요 출현속과 유사하였다(Fig. 3.3.1.13).

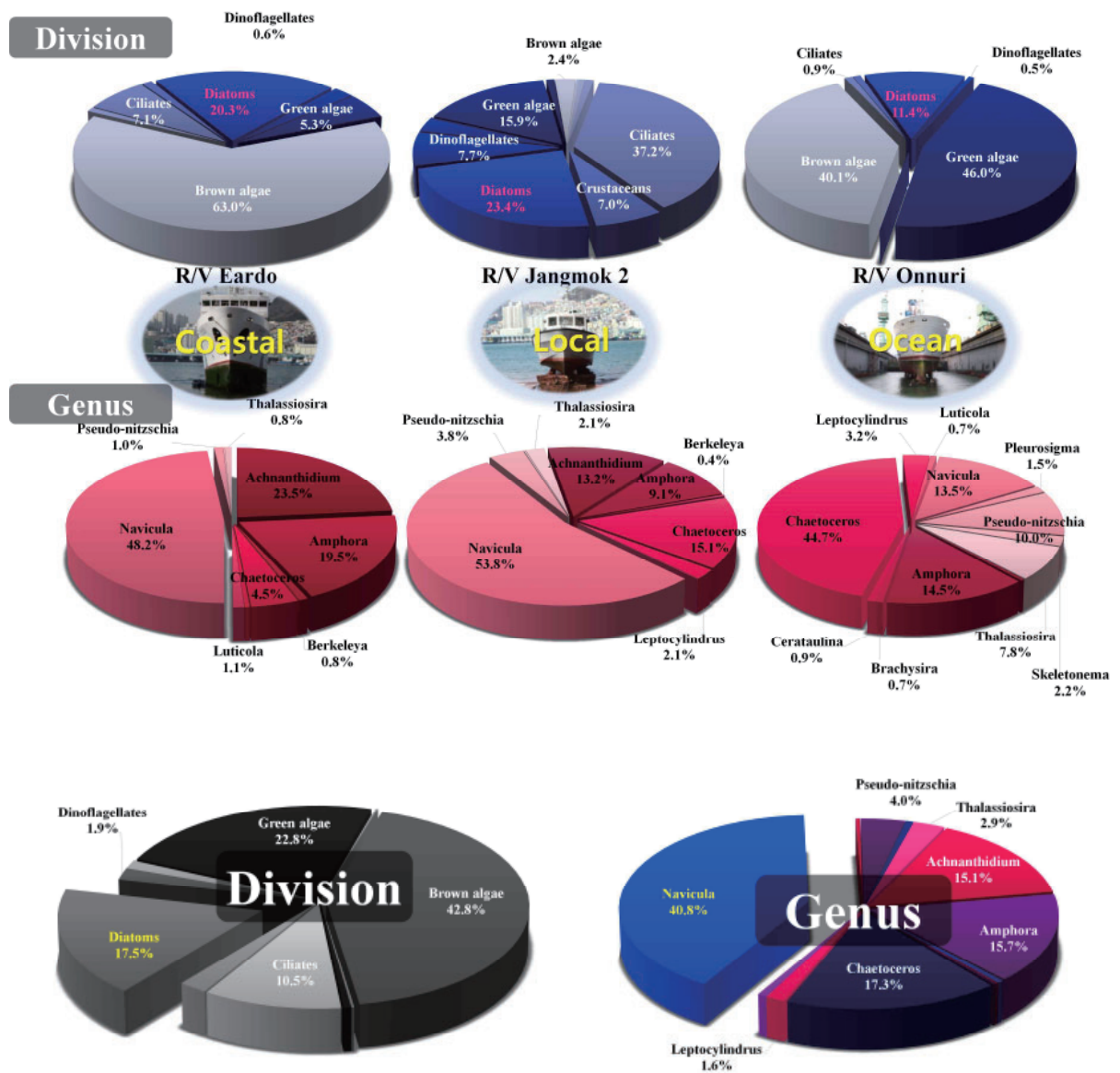


Fig. 3.3.1.13. The results of next generation sequencing analysis.

나. 선저부착 원생생물

(1) 서론

섬모충류는 모든 수권에서 서식하며, 서식특성에 따라 자유유영형과 저서부착형으로 구분된다. 저서부착형 섬모충은 복극모가 발달되어 퇴적물 표층과 암반, 인공구조물, 선체 표면과 같은 다양한 기질에 부착한다. 선저에 부착하는 섬모충류는 주로 정박시 선체표면에 기회적 부착 후, 운항시 외부저항이 적은 niche areas에서 잔존하여 운반되리라 판단된다. 특히 외해 운항 선박의 경우 외래성 섬모충이 부착되어 국내연안에 유입될 수 있으

며, 병원성/기생성 종류의 유입 시 잠재적 위해성이 매우 클 것으로 보인다. 본 연구는 국내선박에 부착하는 섬모충 생물상을 판별하고 선박부착물 제거 시 주변수역에 가입되는 외래성 섬모충류의 존재 여부를 조사하였다.

(2) 재료 및 방법

조사 선박은 local급 장목호(1호와 2호), coastal급 이어도호, ocean급 온누리호와 이사부호를 대상으로 하였고, 상가수리를 위해 입항한 선박을 육상에 거치시켜 시료채취를 진행하였다. 해조류 또는 따개비류가 부착되어 습윤상태가 잘 유지되어 섬모충류 잔존가능성이 높은 부위에서 부착시료를 채취하였다. 멸균여과해수가 담긴 광구병에 부착물을 깔, 브러쉬 등을 사용하여 직접 수거 후 실험실 상온에서 배양을 실시하였다. 배양된 시료로부터 섬모충을 분리하여 생체 관찰과 프로타골 염색을 수행하여 형태 중 동정을 하였다. 형태적으로 동정이 어려운 종들은 유전자 분석(SSU rDNA)을 추가로 분석하여 정확한 종 식별을 수행하였다.



Fig. 3.3.1.14. Sampling of ciliates attached to JANGMOK 1.

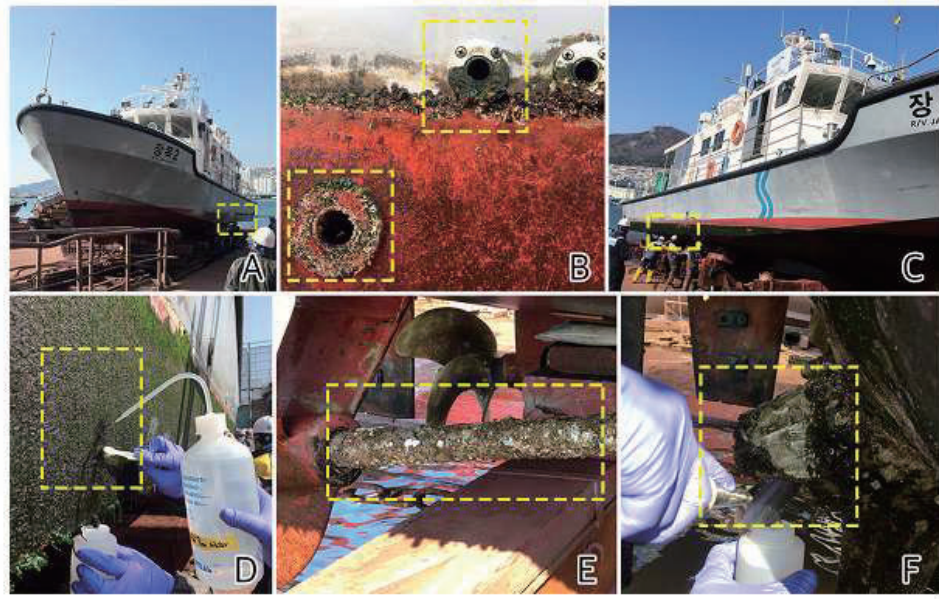


Fig. 3.3.1.15. Sampling of ciliates attached to JANGMOK 2.



Fig. 3.3.1.16. Sampling of ciliates attached to EARDO.

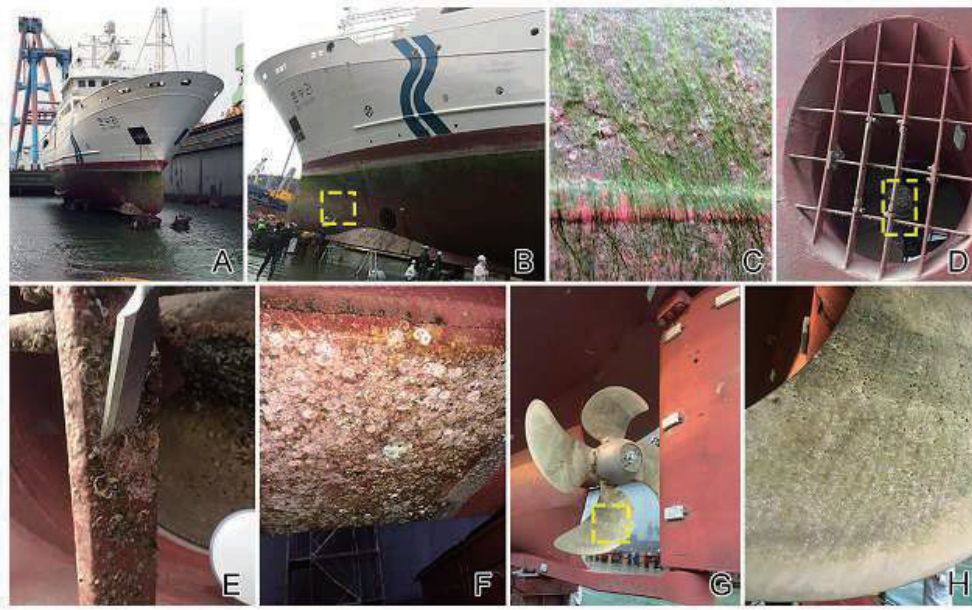


Fig. 3.3.1.17. Sampling of ciliates attached to ONNURI.

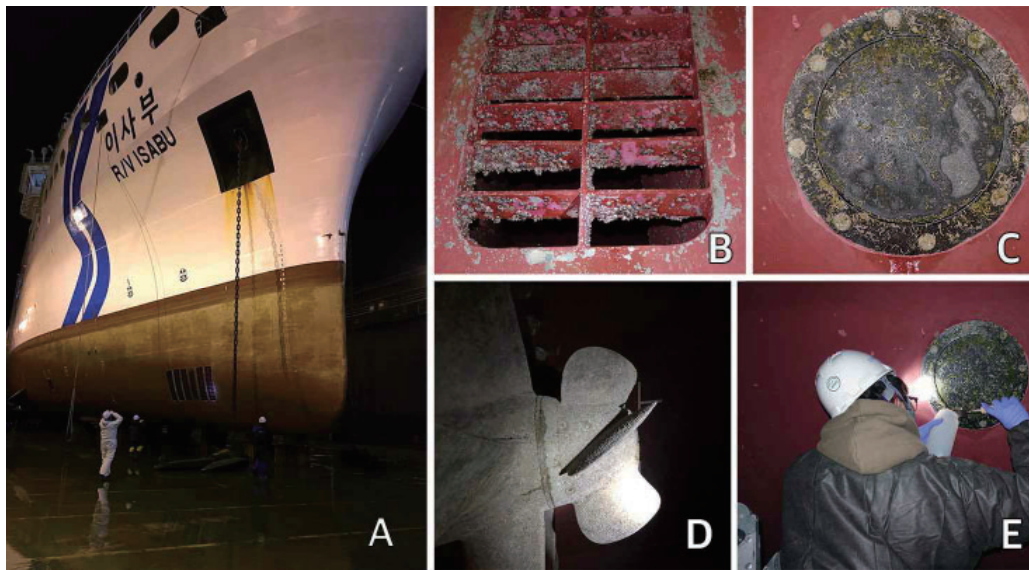


Fig. 3.3.1.18. Sampling of ciliates attached to ISABU.

(3) 결과 및 토의

Local급 2척과 연안급 1척, 대양급 1척 그리고 주변수 조사 결과 총 6종의 섬모충이 발견되었고 모두 위해성은 없는 종으로 판단된다. 선박별로 발견된 부착 섬모충 생물상은 아래와 같다. 국내 미기록종 2종이 모두 장목 2호에서 발견되었다. 이 두 미기록종,

*Euplotes plicatum*은 뉴질랜드 Lyttelton 항에서, *Euplotes parkei*는 베네수엘라 Margarita 연안에서 출현이 보고된 종으로 그 후 전 세계 타해역에서 보고되지 않았기에 매우 드문 종으로 판단된다(Valbonesi, 1997; Petroni et al., 2002). 본 두 미기록종은 외항선박에 의해 국내에 연안에 유입된 후 국내에 정박하는 선체에 부착하여 서식하고 있는 종으로 추정된다. 즉, 선박에 의해 국내에 운반된 외래종일 가능성이 높으며, 차후 이에 관한 면밀한 조사가 추가되어야 한다.

(가) Local급: 장목 1호

선체우현부(Hull Fouling:HF)와 프로펠러(Niche Areas; NA)에서는 섬모충이 발견되지 않았으며 선미부표면(HF)의 해조류(Fig. 3.3.1.14D)에서 채집한 시료에서 *Loxophyllum rostratum* 1종이 발견되었다(Fig. 3.3.1.19A, B). 본 종은 국내 기록종으로 동해에서 출현이 보고된 바 있다(Kim and Min, 2015).

(나) Local급: 장목 2호

선체좌현부(HF) 배출구 부근 따개비 채집시료에서는 섬모충이 발견되지 않았으나, 선체표면(HF) 해조류에서 채집한 시료(Fig. 3.3.1.15C, D)에서 *Euplotes parkei* (Fig. 3.3.1.19I, J), 선미부 프로펠러 추진축(NA)에 따개비류가 부착한 시료(Fig. 3.3.1.15E, F)에서는 *Euplotes plicatum* (Fig. 3.3.1.19K, L) 종이 발견되었다. 18 rDNA 유전자 염기서열을 Genbank database에 비교한 결과, *E. parkei* 는 99.8%, *E. plicatum* 는 99.9% 일치하였다(Fig. 3.3.1.20). 두 종 모두 국내에 보고된 바가 없는 미기록종으로 확인되었다.

(다) Coastal급: 이어도호

선수부(HF)와 트러스터(NA)에서는 섬모충이 발견되지 않았으며, 선미부 프로펠러 추진축(NA)에 붙어있는 따개비류 시료(Fig. 3.3.1.16I, J)에서 *Amphisiella annulata* 종이 발견되었다(Fig. 3.3.1.19C, D). 18 rDNA 유전자 분석결과 이어도호에 부착한 *A. annulata*는 황해에서 출현한 *A. annulata*와 100.0% 일치함이 확인되었다. 본 종은 국내 흔히 출현하는 자생종이다(Jung and Min, 2009).

(라) Ocean급: 온누리호

트러스터(NA)와 프로펠러(NA)에서는 섬모충이 발견되지 않았으나 선수부표면(HF) 해조류에서 채집한 시료(Fig. 3.3.1.17B-C)에서 *Uronychia binucleata*와 *Arcuseries petzi* 종이 발견되었다(Fig. 3.3.1.19C, D). 18 rDNA 유전자 분석결과 온누리호에 부착한 *U. binucleata*는 국내에 보고된 *U. binucleata* 와 99.9% / *U. setigera*와 99.8%의 높은 유사성을 보였다(Fig. 3.3.1.21). 등쪽섬모열 형질을 확인하여 최종 *U. binucleata*로 동정하였고, *A. petzi*는 중국 *A. petzi*와 99.9%의 유사성을 보였다. *U. binucleata*는 국내연안에 흔히 출현하는 자생종이며(Kim and Min, 2011), *A. petzi*는 황해에서 출현이 보고되었다

(Kim et al., 2013; Huang et al., 2014).

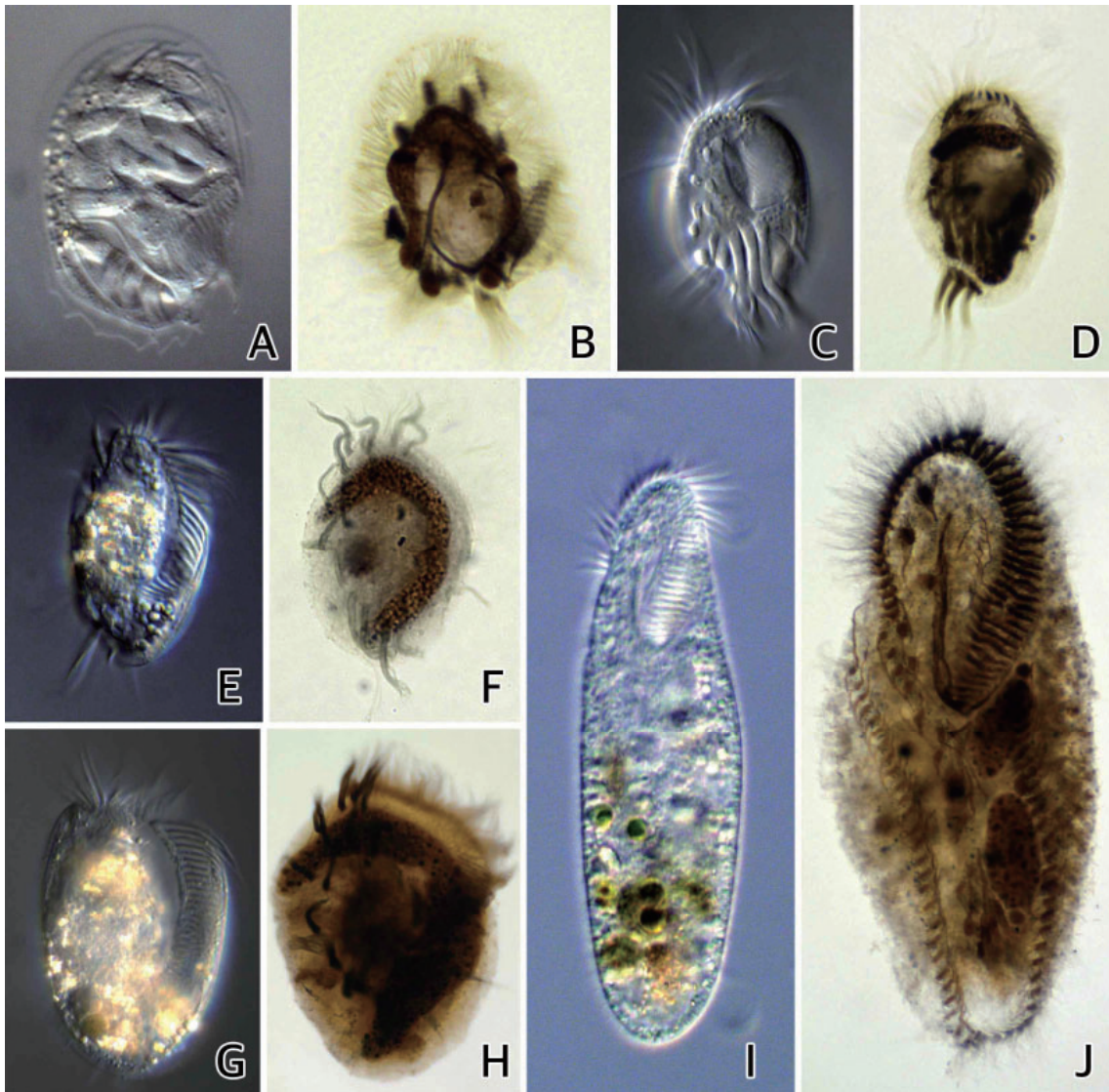


Fig. 3.3.1.19. Photomicrographs of live and protargol-impregnated specimens. A, B. *Loxophyllum rostratum*; C, D. *Amphisiella annulata*; E, F. *Arcuseries petzi*; G, H. *Uronychia binucleata*; I, J. *Euplotes parkei*; K, L. *Euplotes plicatum*.

(마) Ocean급: 이사부호

선수부(HF), 트러스터(NA), 프로펠러(NA)를 포함하는 모든 표면에서 섬모충은 발견되지 않았다(Fig. 3.3.1.18A-D). 채집당시 선체 표면에 따개비, 해조류와 같은 부착생물량 부족으로 인해 운항 시 발생하는 외부 저항으로부터 섬모충이 회피할 공간이 부족했을

것으로 보인다. 또한 일부 선박에 부착 중 이던 섬모충은 선박 도킹 작업시간 동안 낮은 기온에 장시간 노출되어 세포사멸 후 용해되었을 것으로 추정된다. 무각섬모충류는 세포 용해가 시작되면 흔적이 거의 남지 않아 추적에 어려움이 있음.

(바) 상가수리소 주변해역 조사

상가수리 주변해역에 서식하는 원생생물이 채집 시 선박에 부착할 가능성을 판단하기 위해 추가 조사하였다(Fig. 3.3.1.14E F). 조사결과, 상가수리 주변해역과 선박부착성 원생생물들은 각기 다른 생물상이 확인되었다. 따라서 선박에 부착된 원생생물이 상가수리 주변해역으로부터 기인했을 확률은 낮은 것으로 판단된다.

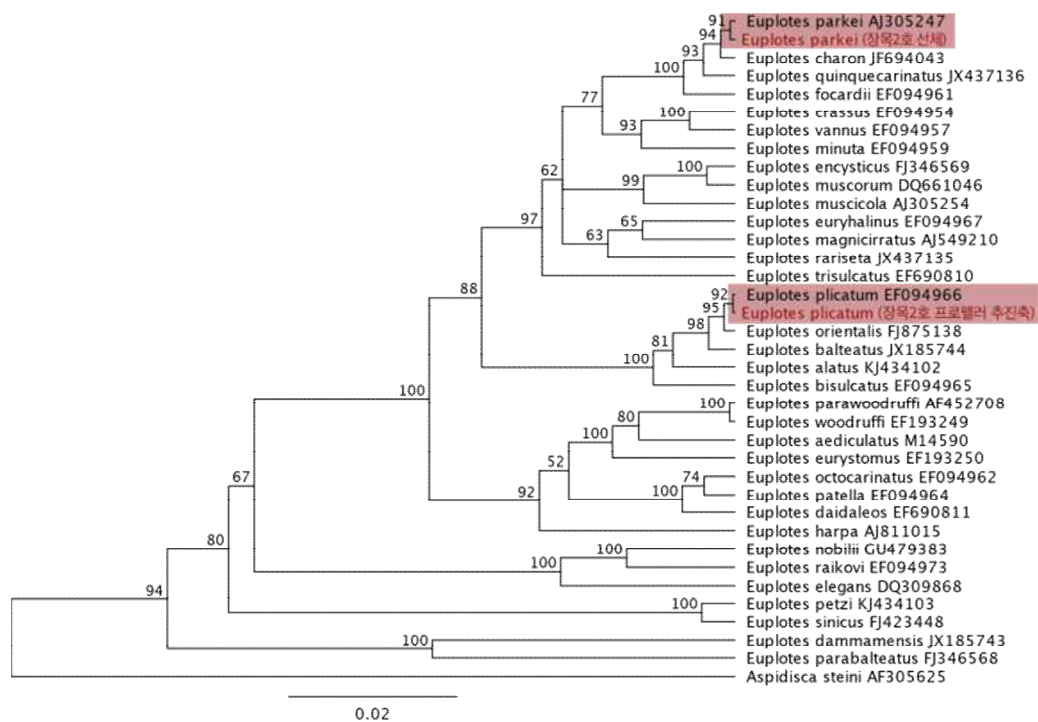


Fig. 3.3.1.20. Phylogeny tree of *Euplotes* inferred from 18S ribosomal RNA gene sequences.

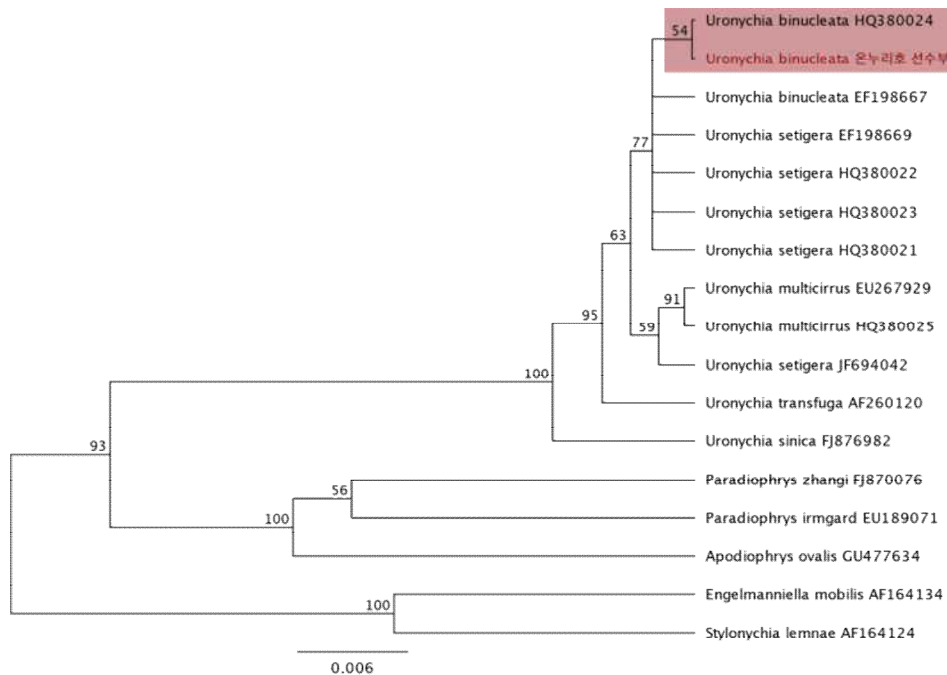


Fig. 3.3.1.21. Phylogeny tree of *Uronychia* inferred from 18S ribosomal RNA gene sequences.

다. 선저부착 대형저서동물

(1) 서론

해상을 이용한 이동은 인간의 활동과 관련성이 높아 과거부터 다양한 이동수단을 이용하여 왔으며, 바다로부터 인간의 먹이원을 찾기 위해 다양한 방식의 도구와 방법이 개발되어 왔다. 이들 이동 수단과 수중 도구들의 활용에 있어 피해를 입히는 다양한 해양생물이 존재한다. 특히, 국제간의 무역이 활발한 선박이나 수중구조물 등에 부착하여 성능을 저하시키거나 안정에 영향을 미쳐 경제적, 환경적으로 피해를 입히는 이들 해양생물을 오손생물 (biofouling)로 분류하고 있다. 향후에는 국제간의 무역에서 평형수 (ballast water) 뿐만 아니라, 선박 부착생물의 유무로 위해성을 판단하는 입항 기준이 될 수 있으며, 각 국은 부착생물방지를 위해 다양한 방오 도료와 신물질 개발을 통해 선박이나 양식장 그물 재료 등에 사용하고 있다.

해양생물 중 선박이나 수중구조물에 부착하는 부착생물은 해조류, 무척추동물을 포함하여 해양에서 약 2,500 여종으로 알려져 있으며, 이 중 선박이나 수중구조물에 부착하여 피해를 입히는 종은 일부 몇 종이 가장 많은 영향을 미친다(Yebra et al 2004). 과거에는 나무로 제작된 목선에 배좁벌레(ship worm)가 침입하여 배의 수명을 단축시키고 항해에 심각한 피해를 입히기도 하였으나, 최근에는 철선이나 FPR선으로 대체되었음에도 여전히

따개비류나 담치류, 석회관갯지렁이 등이 부착하여 선박의 속도나 부식을 촉진시키고 있다. 또한 이들 부착생물은 양식장 그물에 부착하여 수류의 흐름과 부력을 방해하고, 유용수산자원생물의 표면에 부착하여 양식대상종의 성장을 방해하고 있다.

따라서 본 조사는 국내의 해양연구 조사에 이용되고 있는 해양과학기술원의 연구조사선을 대상으로 조사선에 부착하는 대형저서동물의 종류와 이들 부착생물의 위해성, 부착생물 제거 시 유출되는 환경오염물질 등을 확인하고 위해성을 평가하기 위한 연구의 일환으로 운항 해역이 다른 5척의 연구조사선을 대상으로 1 mm 이상의 부착 대형저서동물을 조사하였다. 본 연구의 목표는 선박부착 대형저서동물의 종류를 분류하고 파악하여 유해성 요인을 탐색하는데 있으며, 향후에는 이들 부착 대형저서동물의 위해성평가를 시도하고자 한다.

(2) 재료 및 방법

(가) 온누리호 (ONNURI)

외양 해역과 심해저 탐사 (Ocean areas)를 주로 수행하는 온누리호 부착생물 채집은 2017년 3월 28일에 조사하였으며, 조사선의 채집위치는 좌현의 흡수선을 상부 지역으로 하여 상부, 중부, 하부(선저), 선저의 해수유입부, 프로펠러 (샤프트 포함) 등 총 5 지역을 조사하였으며(Table 3.3.1.1), 추가로 각 지역의 부착동물이 분포하는 지역을 대상으로 정성채집을 수행하였다(Fig. 3.3.1.22).



Fig. 3.3.1.22. Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI.

조사는 방형구 (15×15 cm)를 사용하여 각 위치에서 2-3회 반복 정량 채집하였으며, 채집 전 영상분석을 위해 사진 촬영을 수행하였다. 채집된 시료는 실험실에서 각 분류군별로 선별하였으며, 분류된 각 동물군은 해부현미경을 통해 동정하고 계수하여 최종적으로 database sheets를 작성하였다. 작성된 자료를 이용하여 출현 종수와 서식밀도, 생체량, 다양도 지수, 균등도 지수 등을 산출하고, 다변량 군집분석을 위해 Primer 6을 이용하여 분석하였다.

Table 3.3.1.1. Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI.

정점		채집위치	비 고
1	1	Just below waterline	배의 좌현 상부
2	2	Mid depth	배의 좌현 중부
3	3-1	Flat bottom	배의 좌현 하부 (선저)
	3-2	Flat bottom	선저 해수유입부 및 중간 돌출부
4	4	Niche areas (propeller & shaft)	프로펠러 및 샤프트

(나) 이어도호 (EARDO)

연안과 외양해역(Coastal & Ocean areas)을 주로 항해하는 이어도호 부착생물 채집은 2017년 3월 4일에 조사하였으며, 조사선의 채집위치는 우현의 흘수선을 상부 지역으로 하여 상부, 중부, 선저의 해수유입부, 선미의 우현 프로펠러 (샤프트 포함), 선수의 좌현 스크러스트 등 총 5 지역을 조사하였으며(Table 3.3.1.2), 추가로 각 지역의 부착동물이 분포하는 지역을 대상으로 정성채집을 수행하였다(Fig. 3.3.1.23). 조사는 방형구 (15×15 cm)를 사용하여 각 부위에서 2-3회 반복 정량 채집하였으며, 채집 전 영상분석을 위해 사진 촬영을 수행하였다. 채집된 시료는 실험실에서 각 분류군별로 선별하였으며, 분류된 각 동물군은 해부현미경을 통해 동정하고 계수하여 최종적으로 database sheets를 작성하였다. 작성된 자료를 이용하여 출현 종수와 서식밀도, 생체량, 다양도 지수, 균등도 지수 등을 산출하고, 다변량 군집분석을 위해 Primer 6을 이용하여 분석하였다.

Table 3.3.1.2. Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V EARDO.

정점	채집위치	비고
1	Just below waterline	조사선의 우현 상부
2	Mid depth	조사선의 우현 중부
3	Flat bottom	선저 해수유입부 및 중간 돌출부
4	Niche areas (propeller shaft)	배의 선미 우현 프로펠러 샤프트
5	Niche areas (thruster)	배의 선수 좌현 스러스트 (thrust)



Fig. 3.3.1.23. Sampling of fouling macrozoobenthos at starboard and propeller on the R/V EARDO.

(다) 장목 2호 (JANGMOK 2)

국내 동해 연안 연구(Local area grade)를 주로 수행하는 장목 2호 부착생물 채집은

2017년 3월 15일에 조사하였으며, 조사선의 채집위치는 좌현의 흘수선을 상부 지역으로 하여 상부 2지역, 중부, 선저의 해수유입부 2지역, 선미의 좌현 프로펠러 (샤프트 포함) 등 총 6 지역을 조사하였으며(Table 3.3.1.3), 추가로 각 지역의 부착동물이 분포하는 지역을 대상으로 정성채집을 수행하였다(Fig. 3.3.1.24). 조사는 방형구 (15×15 cm)를 사용하여 각 부위에서 2-3회 반복 정량 채집하였으며, 채집 전 영상분석을 위해 사진 촬영을 수행하였다. 채집된 시료는 실험실에서 각 분류군별로 선별하였으며, 분류된 각 동물군은 해부현미경을 통해 동정하고 계수하여 최종적으로 database sheets를 작성하였다. 작성된 자료를 이용하여 출현 종수와 서식밀도, 생체량, 다양도 지수, 균등도 지수 등을 산출하고, 다변량 군집분석을 위해 Primer 6을 이용하여 분석하였다.

Table 3.3.1.3. Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 2.

정점	채집위치	비 고
1	1-1 Just below waterline	조사선의 좌현 상부 (배의 중앙부)
	1-2 Just below waterline	조사선의 좌현 상부 (배의 선수부)
2	2 Mid depth	조사선의 좌현 중부
3	3-1 Flat bottom	좌현 선저 해수유입부 및 중간 돌출부
	3-2 Flat bottom	우현 선저 해수유입부 및 중간 돌출부
4	4 Niche areas (propeller shaft)	배의 선미 좌현 프로펠러 샤프트



Fig. 3.3.1.24. Sampling of fouling macrozoobenthos at starboard, port and propeller on the R/V JANGMOK 2.

(라) 장목 1호 (JANGMOK 1)

국내 동·서·남해 연안(Local areas)의 해양 특성 연구를 주로 수행하는 장목 1호 부착 생물 채집은 2017년 9월 19일에 조사하였으며, 조사선의 채집위치는 우현의 흘수선을 상부 지역으로 하여 상부, 중부, 선저의 해수유입부, 선미의 우현 프로펠러 (샤프트 포함) 등 총 4 지역을 조사하였으며(Table 3.3.1.4), 추가로 각 지역의 부착동물이 분포하는 지역을 대상으로 정성채집을 수행하였다(Fig. 3.3.1.25). 조사는 방형구 (15x15 cm)를 사용하여 각 부위에서 2-3회 반복 정량 채집하였으며, 채집 전 영상분석을 위해 사진 촬영을 수행하였다. 채집된 시료는 실험실에서 각 분류군별로 선별하였으며, 분류된 각 동물군은 해부현미경을 통해 동정하고 계수하여 최종적으로 database sheets를 작성하였다. 작성된 자료를 이용하여 출현 종수와 서식밀도, 생체량, 다양도 지수, 균등도 지수 등을 산출하고, 군집분석을 위해 Primer 6을 이용하여 분석하였다.

Table 3.3.1.4. Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 1.

정점	채집위치	비고
1	Just below waterline	조사선의 우현 상부 (배의 중앙부)
2	Mid depth	조사선의 우현 중부
3	Flat bottom	우현 선저 해수유입부 및 중간 돌출부
4	Niche areas (propeller & shaft)	선미 우현 프로펠러 및 샤프트



Fig. 3.3.1.25. Sampling of fouling macrozoobenthos at starboard and propeller on the R/V JANGMOK 1.

(마) 이사부호 (ISABU)

외양 해역과 심해저 탐사 (Ocean areas)를 주로 수행하는 이사부호 부착생물 채집은 2018년 1월 12일에 조사하였으며, 조사선의 채집위치는 좌현의 흡수선을 상부 지역으로 하여 상부, 중부, 하부(선저), 프로펠러 (샤프트 포함), 스러스트 등 총 5 지역을 조사하였으며(Table 3.3.1.5), 추가로 각 지역의 부착동물이 분포하는 지역을 대상으로 정성채집을 수행하였다(Fig. 3.3.1.26). 조사는 방형구 (15x15 cm)를 사용하여 각 부위에서 2-3회 반복 정량 채집하였으며, 채집 전 영상분석을 위해 사진 촬영을 수행하였다. 채집된 시료는 실험실에서 각 분류군별로 선별하였으며, 분류된 각 동물군은 해부현미경을 통해 동정하고 계수하여 최종적으로 database sheets를 작성하였다. 작성된 자료를 이용하여 출현 종수

와 서식밀도, 생체량, 다양도 지수, 균등도 지수 등을 산출하고, 군집분석을 위해 Primer 6을 이용하여 분석하였다.

Table 3.3.1.5. Sampling sites of fouling macrozoobenthos on the R/V ISABU.

정점	채집위치	비고
1	Just below waterline	조사선의 좌현 상부
2	Mid depth	조사선의 좌현 중부
3	Flat bottom	조사선의 좌현 하부(선저)
4	Niche areas (propeller & shaft)	조사선의 프로펠러 및 샤프트
5	Niche areas (thruster)	조사선의 스러스트 (thrust)



Fig. 3.3.1.26. Sampling of fouling macrozoobenthos at starboard and propeller on the R/V ISABU.

(3) 결과 및 토의

해양과학기술원에서 운영하는 연구 조사선 온누리호, 이어도호, 장목 1호, 장목 2호, 이사부호 총 5척의 선박 위해성 부착생물 조사에서 출현한 대형저서동물은 총 47종, 10,297 개체/m², 생체량 2,381 gWWt/m²이 출현하였다. 출현 종수는 갑각류가 24종 (51.1%), 다모류가 9종 (19.1%), 태형동물을 포함한 기타 분류군이 8종 (17%), 연체동물이 6종 (12.8%) 순으로 출현하였다(Fig. 3.3.1.27). 평균서식밀도는 많은 출현 종수를 보인 갑각류가 9,030 개체/m² (87.7%), 다음으로 연체동물이 690 개체/m² (6.7%), 다모류가 507 개체/m² (4.9%), 기타 동물군이 69 개체/m² (0.7%) 순으로 출현하였다(Fig. 3.3.1.28).

습중량 기준의 생체량은 연체동물이 1,291.7 gWWt/m² (54.3%)으로 가장 많은 부분을 차지하였으며, 다음으로 만각아강 (Cirripedia)에 속하는 따개비류 (Balanus)가 다수 포함된 절지동물의 갑각류가 880.7 gWWt/m² (37.0%), 기타 분류군이 197.6 gWWt/m² (8.3%), 다모류가 가장 낮은 11.1 gWWt/m² (0.5%) 순으로 나타났다(Fig. 3.3.1.29). 따라서 조사기간 동안 연구 조사선의 위해성 부착 대형저서동물은 종수와 평균서식밀도는 갑각류가 가장 우점하였으며, 생체량은 패각을 형성하는 연체동물이 가장 높게 나타나는 출현 양상을 보였다.

각 조사선을 비교해 보면, 연안과 외해를 번갈아 운항하는 이어도호에 부착하는 대형저서동물의 출현 종수가 총 25종으로 가장 많은 종이 부착하여 서식하고 있는 것으로 나타났다. 또한, 국내 동해 연안을 주로 조사하는 장목 2호와 동·서·남해 연안 조사에 이용되는 장목 1호에서 각각 18종과 19종이 출현하였다. 주로 대양을 항해하는 온누리호와 이사부호의 부착 대형저서동물은 각각 9종과 8종으로 연안을 주로 조사하는 조사선보다 낮은 출현 종수를 보였다(Fig. 3.3.1.30). 부착 대형저서동물의 서식밀도는 연안을 운항하는 장목 1호에서 19,939 개체/m²로 가장 높은 밀도분포를 보였으며, 다음은 이어도호가 14,171 개체/m², 장목 2호가 9,221 개체/m², 온누리호는 3,016 개체/m²의 밀도를 나타냈다. 이사부호는 2,935 개체/m²로 가장 낮은 서식밀도를 보였다. 생체량은 밀도분포와 유사한 패턴으로 장목 1호와 이어도호에서 각각 4,724.0 gWWt/m²과 3,736.2 gWWt/m²으로 높게 나타났으며, 장목 2호도 2,291.9 gWWt/m²으로 비교적 높은 값을 보였다. 반면, 대양을 운항하는 이사부호는 256.9 gWWt/m², 온누리호는 51.0 gWWt/m²으로 낮은 생체량을 보였다. 즉, 연안과 외해를 운항하는 이어도호가 가장 많은 출현 종수를 보이고, 서식밀도와 생체량은 연안지역을 조사하는 장목 1호에서 가장 높게 나타났다.

각 조사선의 종다양도지수는 연안과 동해지역 연구조사를 주로 수행하는 장목 1호와 장목 2호에서 각각 0.74와 1.13으로 대체로 높게 나타났으며, 연안과 외해를 번갈아 운항하는 이사부호는 0.12로 낮은 지수 값을 보였다(Fig. 3.3.1.31). 반면, 균등도 지수는 대양을 항해하는 온누리호가 0.61로 가장 높은 값을 보였으며, 이어도는 0.12로 가장 낮은 균

등도지수를 나타냈다.

연구 조사선 총 5척의 부착생물 우점종은 만각류에 속하는 주걱따개비(51.1%), 삼각따개비(28.7%), 흰따개비(6.0%)와 복족류 굴(5.1%), 다모류 우산석회관갯지렁이(4.6%), 복족류인 지중해담치(1.5%), 단각류인 *Jassa slatteryi*(1.0%) 순으로 나타났다(Fig. 3.3.1.32). 그 중 주걱따개비가 평균서식밀도 5,257 개체/m² 로 가장 우점하여 나타났으며 뒤이어 삼각따개비가 2,957 개체/m², 흰따개비가 622 개체/m²로 출현하였다.

본 부착 대형저서동물 조사에서 가장 우점하는 절지동물의 갑각강 만각아강에 속하는 따개비류는 일부 자웅이체도 있으나 대부분 자웅동체로 난소와 정소를 함께 가지고 있다. 따개비류의 분포는 인간의 생활과 밀접한 관련성이 있으며, 부착성이 좋아 선박, 부표, 수중 시설물 등에 잘 부착하여 부표의 부력을 저하시키거나 선박의 항해속도를 떨어뜨리고 수중 시설물인 그물이나 목재, 철재, 콘크리트 등에 부착하여 표면을 부식시켜 시설물의 사용 수명을 단축시키는 위해성 생물이다. 그래서 과거부터 이들의 탈거를 위해 육상으로 선박이나 그물, 각종 시설물을 인양하여 햇빛에 말리거나 화기를 이용하여 그을리거나 태워서 탈거하여왔다. 본 조사에서 출현한 주걱따개비 (*B. Amphitrite*)와 흰따개비 (*Balanus improvisus*)는 과거 국내에서 발견되지 않았으나, 국제 무역 등으로 선박의 평형수 (ballast water) 등으로 국내에 유입된 외래 유입종으로 알려져 있다. 특히, 국내 기수지역을 포함한 전 연안에서 발견되고 있는 주걱따개비는 1970년대 후반 가장 먼저 발견된 외래 유입종으로 현재 가장 폭넓게 확산된 종중의 하나이다. 또한, 주로 국내 동해안 항구와 기수구역, 남해안 동부 지역에서 주로 발견되는 흰따개비 (*B. improvisus*)는 1980년대 중반 동해안 주문진에서 처음 대량 발견된 외래 유입종으로 염분 8 psu의 저염분인 기수호 지역에서도 유생이 발견되기도 하며, 수심 50m까지 분포하는 것으로 알려져 있다. 주로 목재, 선박, 항구 구조물, 어패류의 표면, 해조류 등에서 발견되고 있다. 또한 본 조사선에서 출현하는 지중해담치 (*M. galloprovincialis*)는 외래 유입종으로 잘 알려져 있으며, 원산지는 지중해 지역으로 알려져 국명도 지중해담치로 명명하였다. 이 종은 국내 전 연안에서 발견되고 있으며, 국내의 전 연안의 암반지역에서 발견되고 있고, 대부분의 양식장 그물에 부착하여 해류의 흐름 등 양식장 운영에 피해를 주고 있다. 단각류에 속하는 *Jassa slatteryi*는 한진해운의 국제무역선 propeller에서 발견하여 기존의 *Jassa falcata*와 구분되었으며, 외래 유입종으로 알려져 있다. 다모류의 석회관갯지렁이과 (Serpulidae)에 속하는 우산석회관갯지렁이 (*H. ezoensis*)는 본 조사선이나 선박, 그물, 교각이나 해양구조물 등에 부착하여 피해를 입혀 안정에 영향을 미치는 오손생물로 알려져 있다.

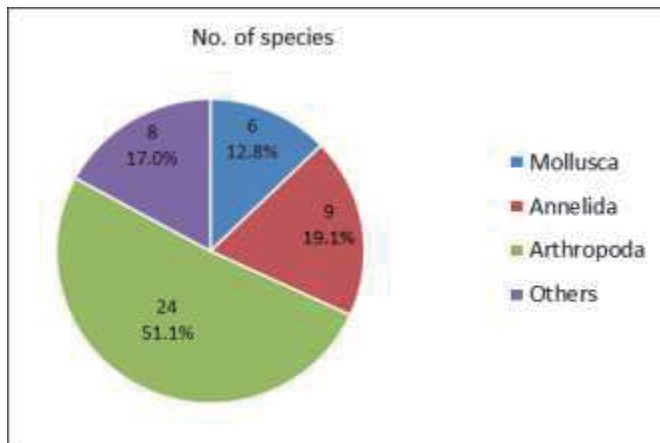


Fig. 3.3.1.27. Number of species of fouling macrozoobenthic taxa during the study period.

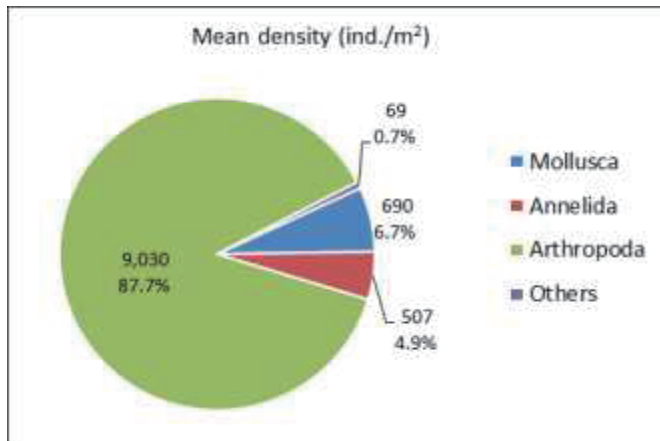


Fig. 3.3.1.28. Average density of fouling macrozoobenthic taxa during the study periods.

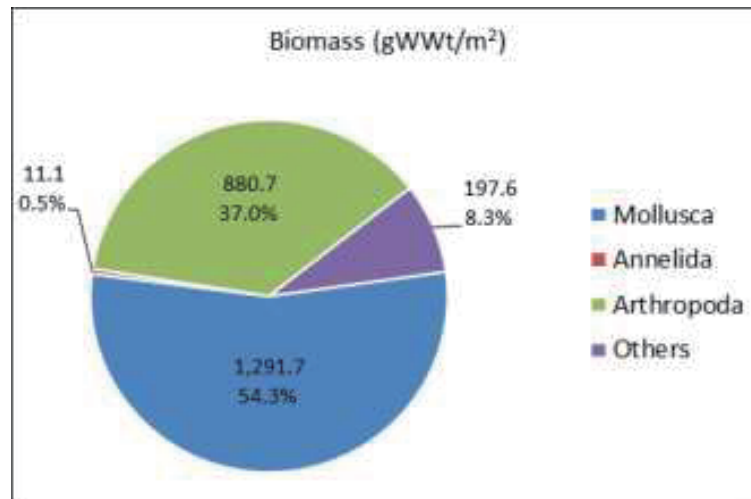


Fig. 3.3.1.29. Biomass of fouling macrozoobenthic taxa during the study periods.

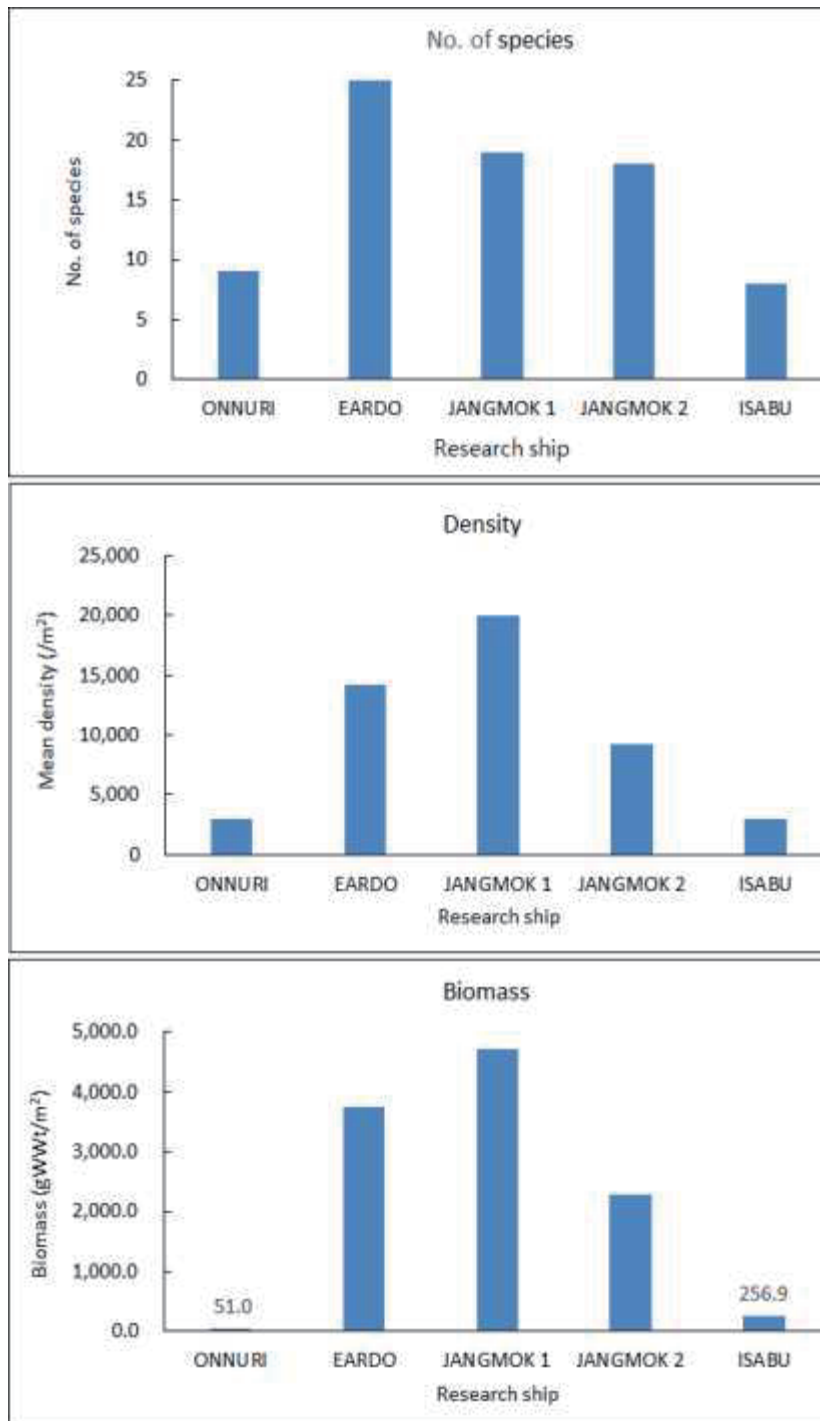


Fig. 3.3.1.30. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI, EARDO, JANGMOK 1, 2 and ISABU.

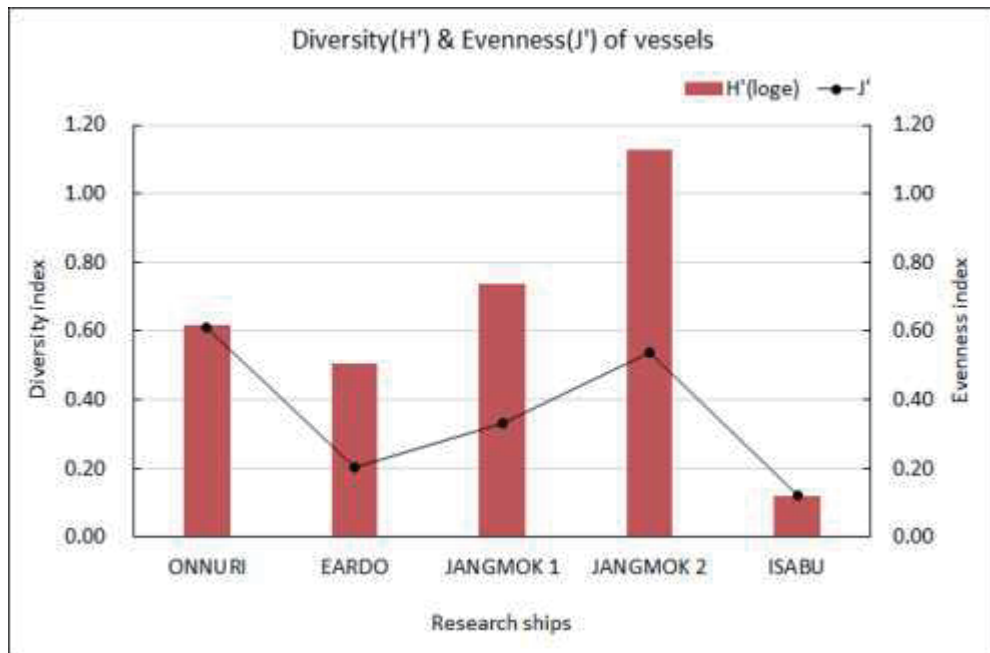


Fig. 3.3.1.31. Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI, EARDO, JANGMOK 1, 2 and ISABU.



주걱따개비 (*Balanus amphitrite*)



삼각따개비 (*Balanus trigonus*)



흰따개비 (*Balanus improvisus*)



굴 (*Crassostrea gigas*)



우산석회관갯지렁이 (*Hydroides ezoensis*)



지중해담치 (*Mytilus galloprovincialis*)

Fig. 3.3.1.32. Pictures of dominant species at study areas on the R/V ONNURI, EARDO, JANGMOK 1, 2 and ISABU.

(가) 온누리호 (ONNURI)

대양 (Ocean areas)을 주로 항해하는 온누리호에 부착하는 위해성 대형저서동물은 총 9종이 출현하였으며, 평균서식밀도는 3,016 개체/m², 생체량은 51.0 gWWt/m²으로 나타났다(Fig. 3.3.1.33). 출현하는 동물군은 갑각류가 가장 많은 5종, 연체동물이 3종, 다모류가 1종순으로 나타났다. 평균서식밀도는 절지동물의 갑각강에 속하는 만각아강인 따개비류가 3,016 개체/m² (96.2%)로 가장 많이 출현하는 부착동물군으로 나타났다. 그 외 연체동물이 71 개체/m² (2.3%), 다모류가 43 개체/m² (1.4%) 순으로 출현하였으며, 기타 동물군은 출현하지 않았다. 생체량은 가장 높은 서식밀도를 보인 절지동물이 47.8 gWWt/m² (93.7%)으로 대부분을 차지하였다.

선체 구역별 조사에서 선저(flat bottom)에 해당하는 정점 3에서 가장 많은 9종이 출현하였으며, 그 외 선측의 중부(mid depth) 정점 2와 Niche areas인 프로펠러 및 샤프트 구역의 정점 4에서 각각 2종이 출현하였다(Fig. 3.3.1.34). 평균서식밀도는 선저의 정점 3에서 5,913 개체/m², 선측 중부 정점 2와 프로펠러 구역의 정점 4에서 각각 87 개체/m²와 130 개체/m²로 상대적으로 매우 낮은 서식밀도를 보였다. 생체량은 선저의 정점 3에서 101.5 gWWt/m²으로 가장 높게 나타났으며, 선측의 중부 정점 2와 프로펠러 구역의 정점 4에서 각각 0.3 gWWt/m²과 0.5 gWWt/m²의 낮은 값을 보였다.

대양 조사를 주로 수행하는 온누리호의 부착생물 중 가장 우점하는 대형저서동물은 만각류에 속하는 흰따개비(*Balanus improvisus*)와 주걱따개비(*Balanus amphitrite*)로 나타났으며, 평균서식밀도는 각각 1,413 개체/m² (46.9%)와 1,190 개체/m² (39.5%)를 차지하였다(Fig. 3.3.1.35). 그 외 삼각따개비(*Balanus trigonus*)가 288 개체/m², 연체동물의 이매패 (Bivalvia)에 속하는 지중해담치(*Mytilus galloprovincialis*)가 43 개체/m², 다모류 (Polychaeta)의 석회관갯지렁이과(Serpulidae)에 속하는 우산석회관갯지렁이(*Hydroides ezoensis*)가 43 개체/m²로 우점하였다. 이들은 선체의 바닥인 선저 지역인 정점 3에서 주로 높은 서식밀도로 우점하였다(Fig. 3.3.1.36).

대형저서동물의 종다양성을 나타내는 종다양도지수는 평균 0.62로 비교적 낮은 지수 값을 나타냈으며, 선체의 선저 구역인 정점 3에서 1.13으로 가장 높은 값을 보였다(Fig. 3.3.1.37). 선측의 중부 지역인 정점 2에서는 0.69, 프로펠러 부분인 정점 4에서는 0.64로 유사한 값을 나타냈다. 균등도 지수 평균 0.61로 다른 조사선의 지수값 보다 상대적으로 높은 0.61을 보였다. 다양도지수와 반대로 균등도 지수 정점 2와 4에서 각각 1.00과 0.92의 값을 보였으며, 정점 3에서는 상대적으로 0.52의 낮은 값을 나타냈다.

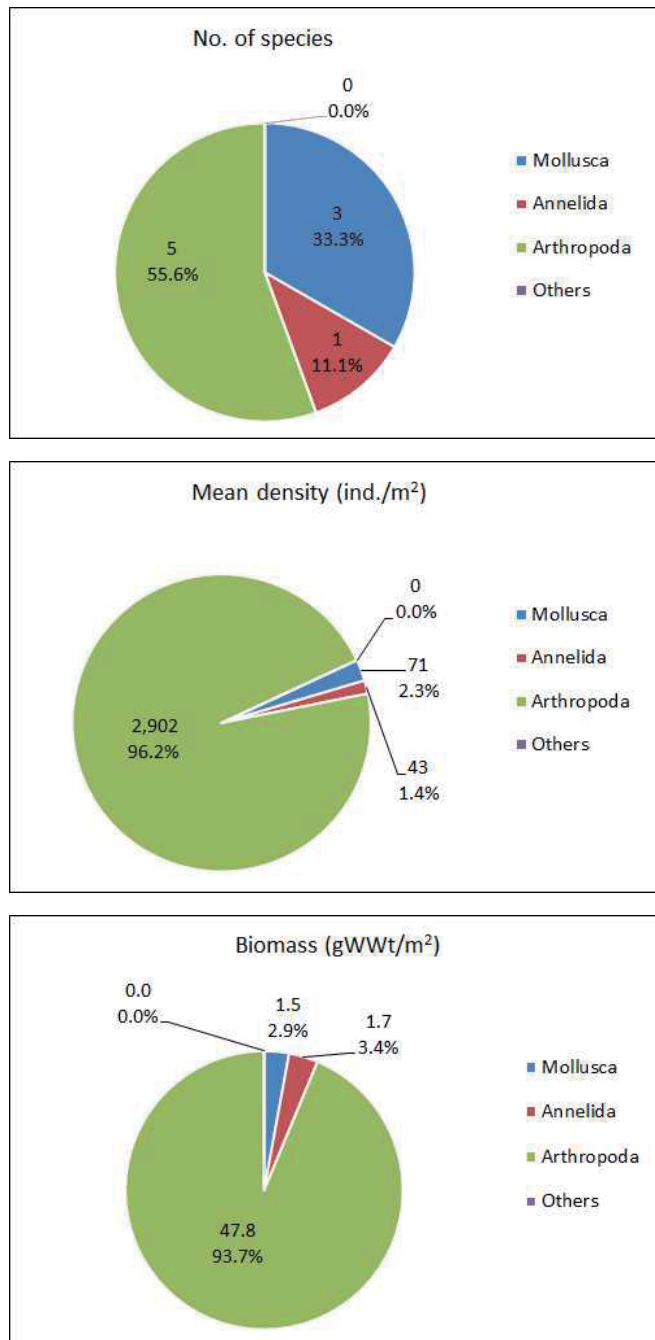


Fig. 3.3.1.33. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI.

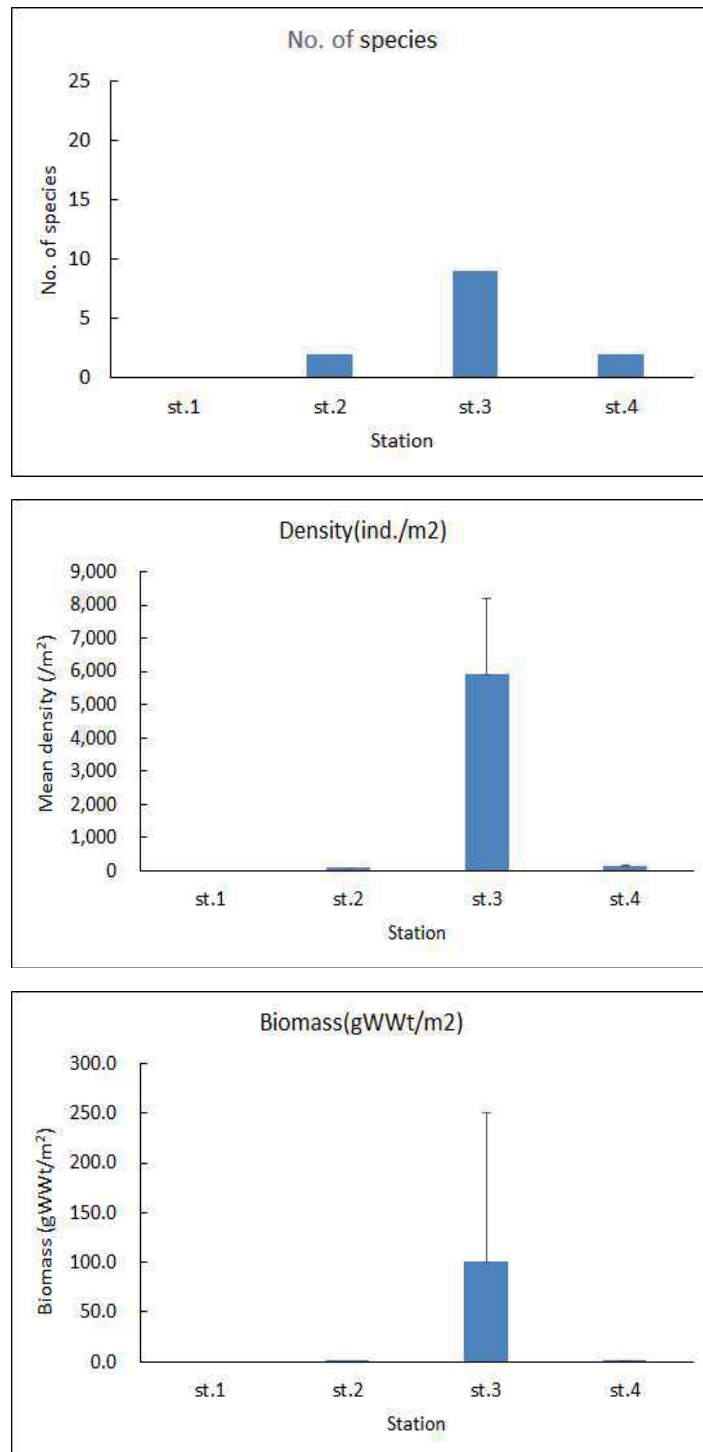


Fig. 3.3.1.34. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at sites on the R/V ONNURI.

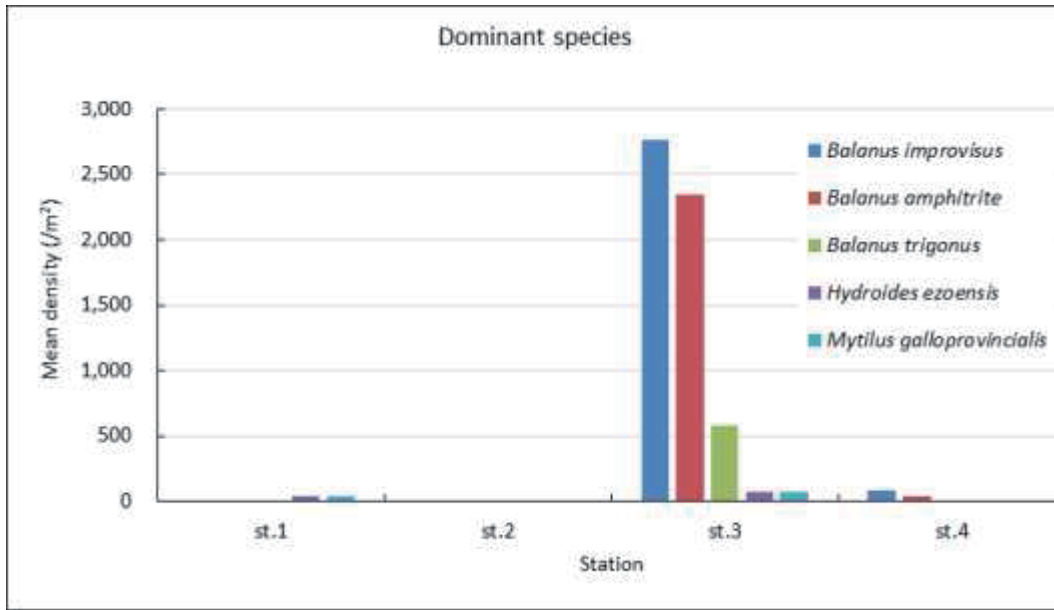
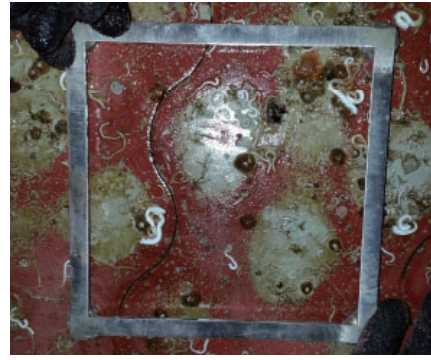


Fig. 3.3.1.35. Distribution of dominant species of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI.



선체 중부의 선저 (flat bottom)



선체 중부의 선저 (flat bottom)



선수 부분의 선저 (flat bottom)



프로펠러 날개 (Propeller blade)



선미의 스러스트 (side thruster)



프로펠러 축 (Propeller shaft)

Fig. 3.3.1.36. Distribution of *Balanus* spp. and Serpulidae (polychaete) on the R/V ONNURI.

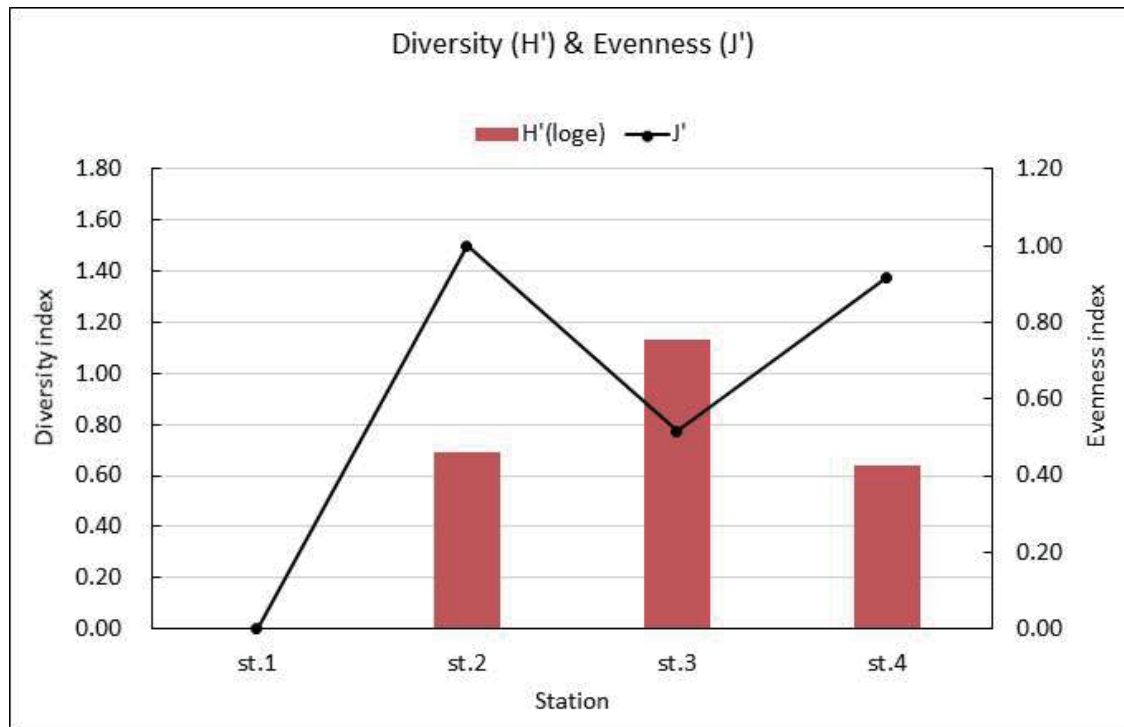


Fig. 3.3.1.37. Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V ONNURI.

(나) 이어도호 (EARDO)

연안과 외양해역(Coastal & Ocean areas)을 교대로 조사하는 연구지역이 넓은 이어도호에 부착하는 위해성 대형저서동물은 총 25종이 출현하였으며, 평균서식밀도는 14,171 개체/m², 생체량은 3,736.2 gWWt/m²으로 나타났다(Fig. 3.3.1.38). 출현하는 동물군은 갑각류가 가장 많은 11종, 연체동물이 6종, 다모류와 기타 분류군이 각각 4종순으로 출현하였다. 평균서식밀도는 갑각강에 속하는 만각아강인 따개비류가 높은 서식밀도를 보이는 절지동물이 12,408 개체/m² (87.6%)로 가장 많이 출현하는 부착동물군으로 나타났다. 다음으로 연체동물이 1,424 개체/m² (10.0%), 다모류가 220 개체/m² (1.4%), 기타 분류군이 120 개체/m² (0.8%)순으로 출현하였다. 생체량은 체중의 대부분을 차지하는 이매패의 출현으로 연체동물이 2,603.3 gWWt/m² (69.7%)을 차지하였으며, 다음으로 절지동물이 1,115 gWWt/m² (29.9%)으로 두 동물군이 대부분을 차지하였다. 그 외 다모류와 기타 분류군이 각각 5.6 gWWt/m² (0.1%)과 11.7 gWWt/m² (0.3%)의 낮은 생체량을 보였다.

선체 구역별 조사에서 선미 (aft side)의 우현 프로펠러 샤프트 (propeller shaft)에 해당하는 정점 4에서 가장 많은 17종이 출현하였으며, 다음으로 선측의 우현 상부 (waterline)에 위치한 정점 1과 선미의 좌현 스러스트 정점 5에서 각각 12종과 11종이 출

현하였다. 그 외 선측의 중부 (mid depth) 지역 정점 2와 선저 정점 3에서는 각각 6종과 2종의 낮은 출현 종수를 보였다(Fig. 3.3.1.39). 평균서식밀도는 선미측 좌현 스러스트 정점 5에서 삼각따개비(*Balanus trigonus*)의 영향으로 55,435 개체/m²의 높은 출현 밀도를 보였으며, 다음으로 선측 중부 정점 2에서 주걱따개비 (*Balanus amphitrite*)의 높은 출현으로 16,598 개체/m², 선미 프로펠러 샤프트 정점 4는 삼각따개비로 인해 14,261 개체/m²의 밀도를 보였다. 그 외 선측 상부 정점 1과 선저 정점 3에서 각각 8,402 개체/m²와 4,754 개체/m²로 상대적 낮은 서식밀도 분포를 나타냈다. 생체량은 굴과 지중해담치가 동시에 출현하는 두 정점 4와 5에서 각각 13,362.3 gWWt/m²과 9,448.3 gWWt/m²의 높은 생물량을 나타냈다. 나머지 선측 정점 1, 2, 3은 각각 1,732.0 gWWt/m², 184.8 gWWt/m², 318.5 gWWt/m²으로 상대적으로 매우 낮은 생체량 값을 보였다.

연안과 대양조사를 번갈아 수행하는 이어도호의 부착생물 중 가장 우점하는 대형저서동물은 만각류에 속하는 주걱따개비 (*Balanus amphitrite*)와 삼각따개비 (*Balanus trigonus*)로 나타났으며, 이들의 평균서식밀도는 각각 6,704 개체/m² (47.3%)와 5,266 개체/m² (37.2%)를 차지하였다(Fig. 3.3.1.40). 그 외 연체동물의 이매패 (*Bivalvia*)에 속하는 굴과 지중해담치가 각각 1,065 개체/m²와 342 개체/m²를 보였으며, 다음으로 절지동물의 단각류인 *Jassa slatteryi*가 269 개체/m², 다모류의 우산석회관갯지렁이가 190 개체/m² 순으로 우점하였다. 가장 우점한 주걱따개비는 이어도호 선측 중부 정점 2에서 16,478 개체/m²로 가장 우점하였으며, 상부 정점 1과 선저 정점 3에서도 각각 6,793 개체/m²와 4,725 개체/m²로 비교적 높은 밀도를 보였다. 두 번째로 우점한 삼각따개비는 선수의 좌현 스러스트 정점 5에서 46,522 개체/m²로 극우점하는 양상을 보였으며, 선미의 프로펠러 샤프트 정점 4에서도 9,435 개체/m²로 비교적 높은 밀도분포를 보였다. 그 외 굴은 정점 4와 5에서 각각 3,261 개체/m²와 3,957 개체/m², 지중해담치는 정점 5에서 1,478 개체/m², 단각류인 *J. slatteryi*는 선측 상부 정점 1에서 1,022 개체/m²로 우점하였다(Fig. 3.3.1.41).

대형저서동물의 종다양성을 나타내는 이어도호의 종다양도지수는 평균 0.51로 비교적 낮은 지수값을 나타냈으며, 선체의 선미 우현 프로펠러 샤프트 지역인 정점 4에서 1.02로 가장 높은 값을 보였다(Fig. 3.3.1.42). 반면에 선측의 중부 지역 정점 2와 선저 지역인 정점 3에서 각각 0.05와 0.04로 가장 낮은 지수값을 나타냈다. 선측 상부 정점 1과 선수의 좌현 스러스트 정점 5는 각각 0.73과 0.69로 유사한 값을 보였다. 균등도 지수 다양도지수와 유사한 패턴을 보였으며, 평균 0.20로 매우 낮은 지수값을 나타냈다. 정점 4에서 0.36으로 가장 높고 정점 1과 5는 모두 0.29의 값을 보였으며, 정점 2와 3은 각각 0.03과 0.05로 가장 낮은 균등도지수를 나타냈다.

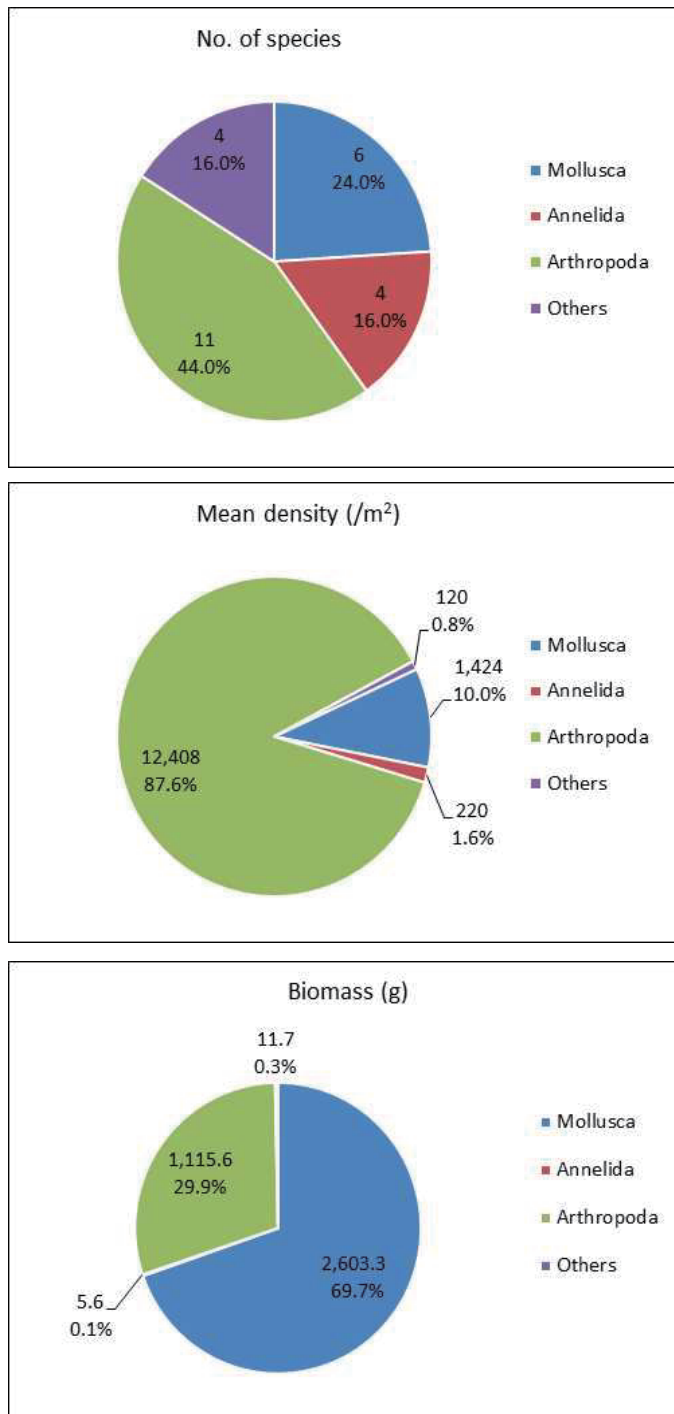


Fig. 3.3.1.38. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at sites in the R/V EARDO.

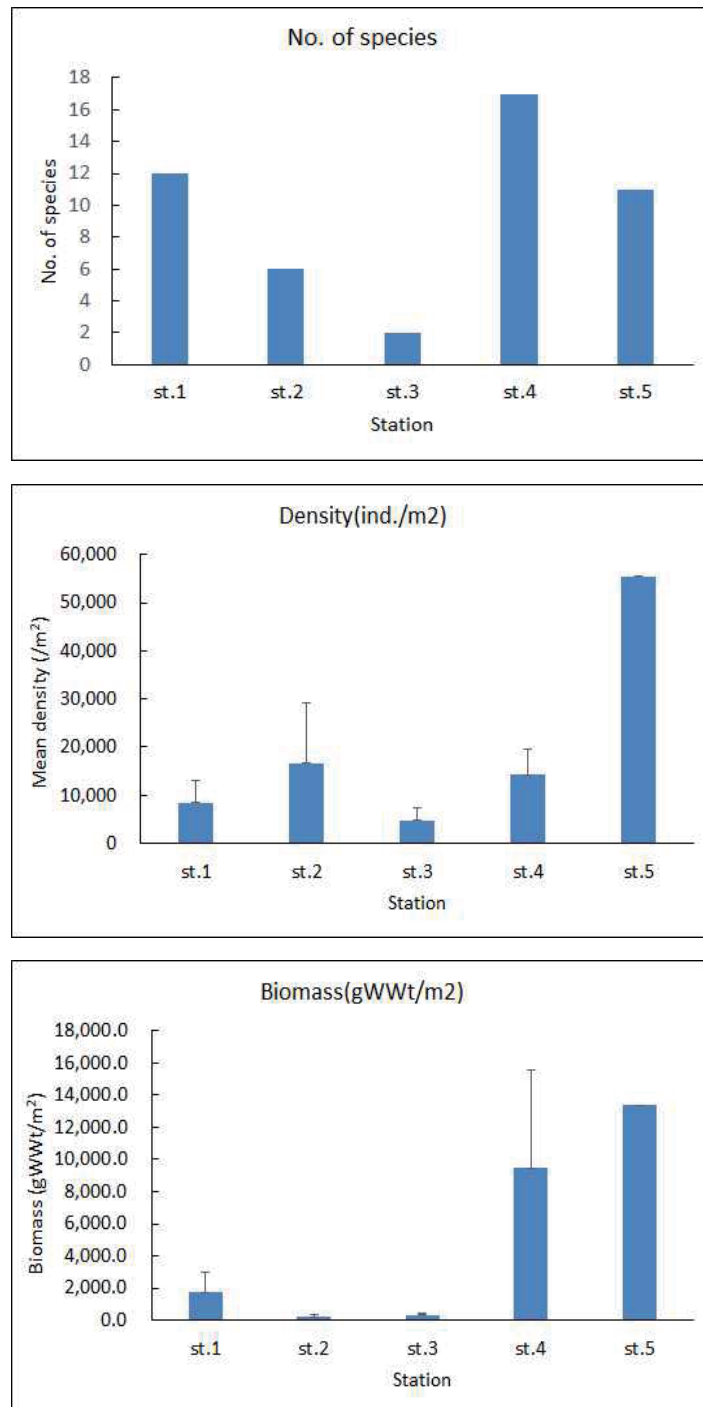


Fig. 3.3.1.39. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at sites on the R/V EARDO.

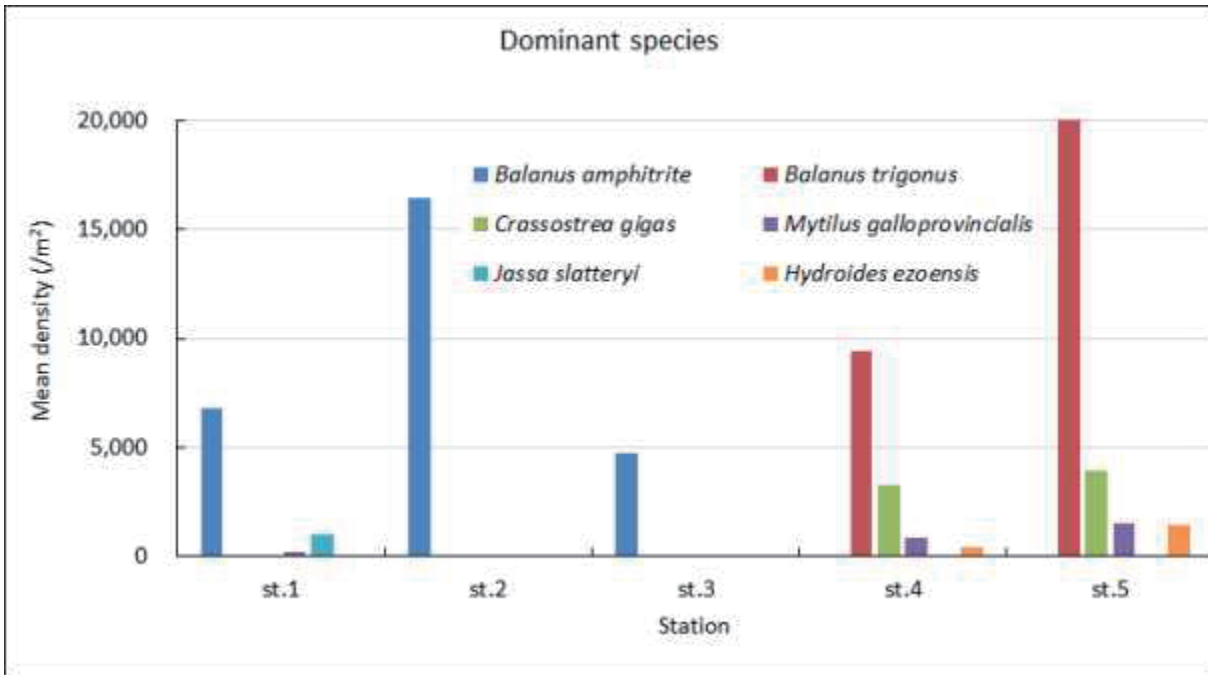


Fig. 3.3.1.40. Distribution of dominant species of fouling macrozoobenthos on the R/V EARDO.



주걱따개비 (*Balanus amphitrite*)



삼각따개비 (*Balanus trigonus*)



굴 (*Crassostrea gigas*)



지중해담치 (*Mytilus galloprovincialis*)



우산석회관갯지렁이 (*Hydroides ezoensis*)



단각류 (*Jassa slatteryi*)

Fig. 3.3.1.41. Pictures of dominant species at study areas on the R/V EARDO.

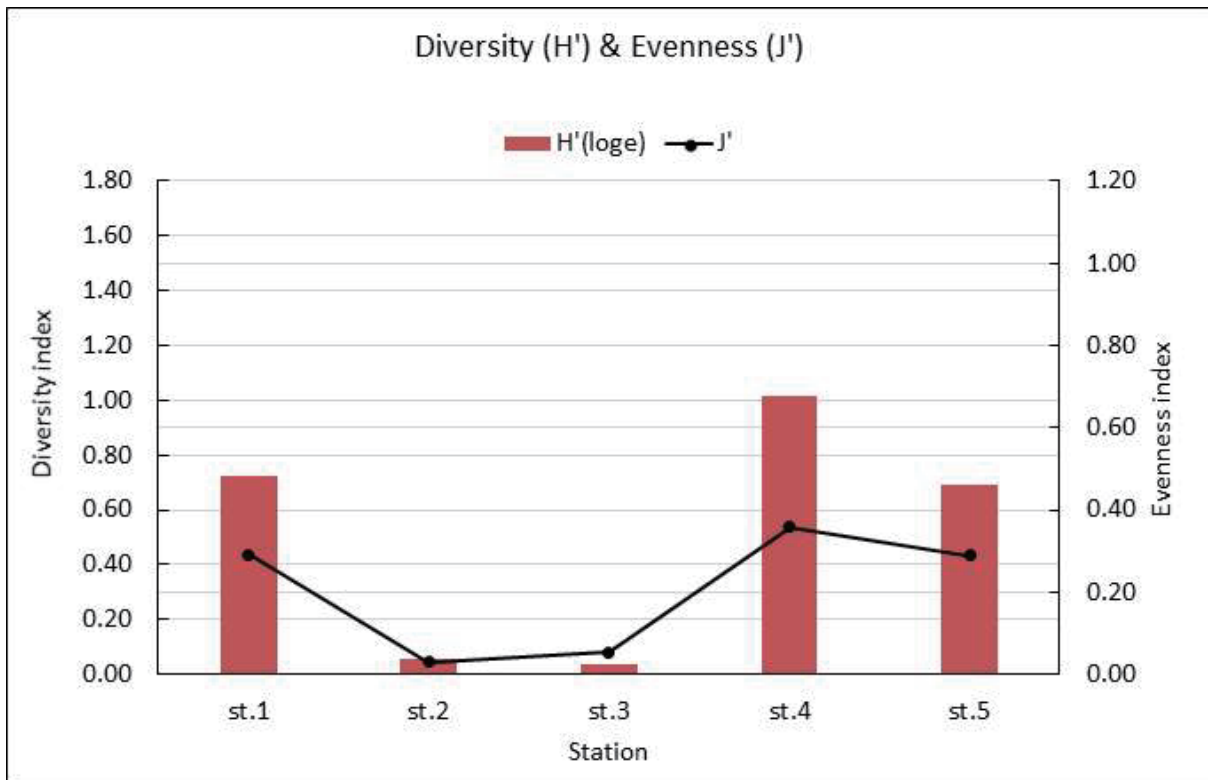


Fig. 3.3.1.42. Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V EARDO.

(다) 장목 2호 (JANGMOK 2)

연안지역(Local areas)과 동해 조사를 주로 수행하는 장목 2호에 부착하는 위해성 대형저서동물은 총 18종이 출현하였으며, 평균서식밀도는 9,221 개체/m², 생체량은 2,291.9 gWWt/m²으로 나타났다(Fig. 3.3.1.22). 출현하는 동물군은 절지동물의 갑각류가 가장 많은 7종, 기타 분류군이 5종, 다모류가 4종, 연체동물이 2종순으로 출현하였다. 평균서식밀도는 갑각강에 속하는 만각아강인 따개비류가 높은 서식밀도를 보이는 절지동물이 5,696 개체/m² (61.8%)로 가장 많이 출현하는 부착동물군으로 나타났다. 다음으로 석회관갯지렁이과(Serpulidae)에 속하는 우산석회관갯지렁이(*Hydroides ezoensis*)가 대량 출현하는 다모류가 2,190 개체/m² (23.7%), 이매패에 속하는 굴(*Crassostrea gigas*)이 대량 출현하는 연체동물이 1,261 개체/m² (13.7%), 기타 분류군이 75 개체/m² (0.8%) 순으로 출현하였다. 생체량은 패각을 형성하는 이매패의 출현으로 연체동물이 17,27.9 gWWt/m² (75.4%)을 차지하였으며, 다음으로 따개비류가 출현한 절지동물이 459.8 gWWt/m² (20.1%)으로 두 동물군이 대부분을 차지하였다. 그 외 다모류와 기타 분류군이 각각 45.8 gWWt/m² (2.0%)과 58.4 gWWt/m² (2.5%)의 낮은 생체량을 보였다.

선체 구역별 조사에서 선측의 좌현 상부(waterline)에 위치한 정점 1에서 가장 많은 14종이 출현하였으며, 다음으로 선측의 좌현 중부(mid depth) 지역 정점 2와 선저 (flat bottom) 정점 3에서는 각각 7종과 9종이 출현하였다. 선미 (aft side)의 좌현 프로펠러 샤프트 (propeller shaft)에 해당하는 정점 4에서는 4종으로 가장 낮은 출현 종수를 보였다 (Fig. 3.3.1.44). 평균서식밀도는 삼각따개비와 우산석회관갯지렁이의 영향으로 선저의 정점 3에서 21,580 개체/m²의 높은 출현 밀도를 보였으며, 다음으로 굴과 따개비류가 출현한 프로펠러 샤프트 정점 4에서 5,333 개체/m², 그리고 굴, 따개비, 석회관갯지렁이가 출현한 선측 상부 정점 1에서 4,946 개체/m²로 비교적 유사한 밀도 분포를 나타냈다. 선측 중부 정점 2는 913 개체/m²로 가장 낮은 서식밀도를 보였다. 생체량은 폐각을 형성하는 굴과 따개비, 석회관갯지렁이 등이 출현하는 정점 1과 4에서 각각 2,736.6 gWWt/m²과 2,814.4 gWWt/m²의 가장 높은 생물량을 나타냈으며, 정점 2와 3은 각각 1,297.3 gWWt/m²과 1,507.9 gWWt/m²으로 상대적으로 낮은 유사한 생물량을 보였다. 특히, 정점 3은 상대적으로 폐각이 가벼운 우산석회관갯지렁이의 출현으로 높은 서식밀도에도 불구하고 낮은 생체량을 나타냈다.

연안지역과 독도를 비롯한 동해지역 조사를 수행하는 장목 2호의 부착생물 중 가장 우점하는 대형저서동물은 만각류에 속하는 삼각따개비 (*Balanus trigonus*)로 나타났으며, 이종의 평균서식밀도는 5,490 개체/m² (59.5%)를 차지하였다(Fig. 3.3.1.45). 다음으로 다모류의 우산석회관갯지렁이가 2,150 개체/m² (23.3%), 연체동물의 굴과 지중해담치가 각각 992 개체/m² (10.8%)와 269 개체/m² (2.9%), 단각류인 *Jassa slatteryi*가 150 개체/m² 순으로 우점하였다. 가장 우점한 삼각따개비는 장목 2호 선체의 선저에 위치한 해수유입 부분의 정점 3에서 13,174 개체/m²로 가장 우점하였으며, 또한 선미 좌현 프로펠러 샤프트 정점 4에서도 4,449 개체/m²로 비교적 높은 밀도를 보였다. 두 번째로 우점한 우산석회관갯지렁이는 정점 3에서 7,232 개체/m²로 우점하는 양상을 보였다. 다음으로 굴과 지중해담치는 좌현 선측 상부 정점 1에서 각각 1,587 개체/m²와 728 개체/m²로 높은 밀도를 보였으며, 단각류인 *J. slatteryi*는 선저 정점 3에서 333 개체/m²로 우점하였다(Fig. 3.3.1.46).

대형저서동물의 종다양성을 나타내는 장목 2호의 종다양도지수는 평균 1.13으로 다른 조사선보다 비교적 높은 지수값을 나타냈으며, 선측의 좌현 상부와 중부 정점 1과 2에서 각각 1.60과 1.53으로 가장 높은 값을 보였다(Fig. 3.3.1.47). 반면에 선저와 프로펠러 샤프트 정점 3과 4는 각각 0.89와 0.50으로 상대적 낮은 지수값을 나타냈다. 균등도 지수 다양도지수와 유사한 패턴을 보였으며, 평균 0.54로 상대적 높은 지수값을 나타냈다. 특히, 정점 1과 2에서 각각 0.60과 0.78로 비교적 높고, 정점 3과 4는 각각 0.41과 0.36으로 낮은 균등도지수를 나타냈다.

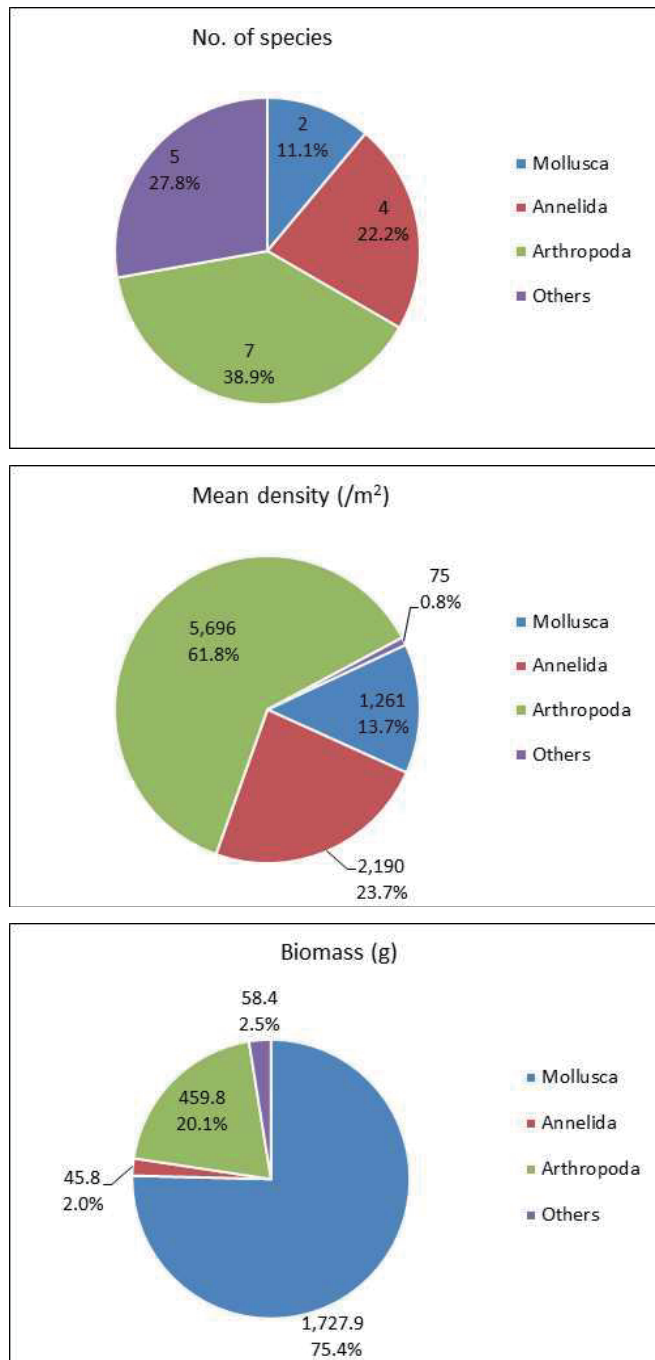


Fig. 3.3.1.43. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 2.

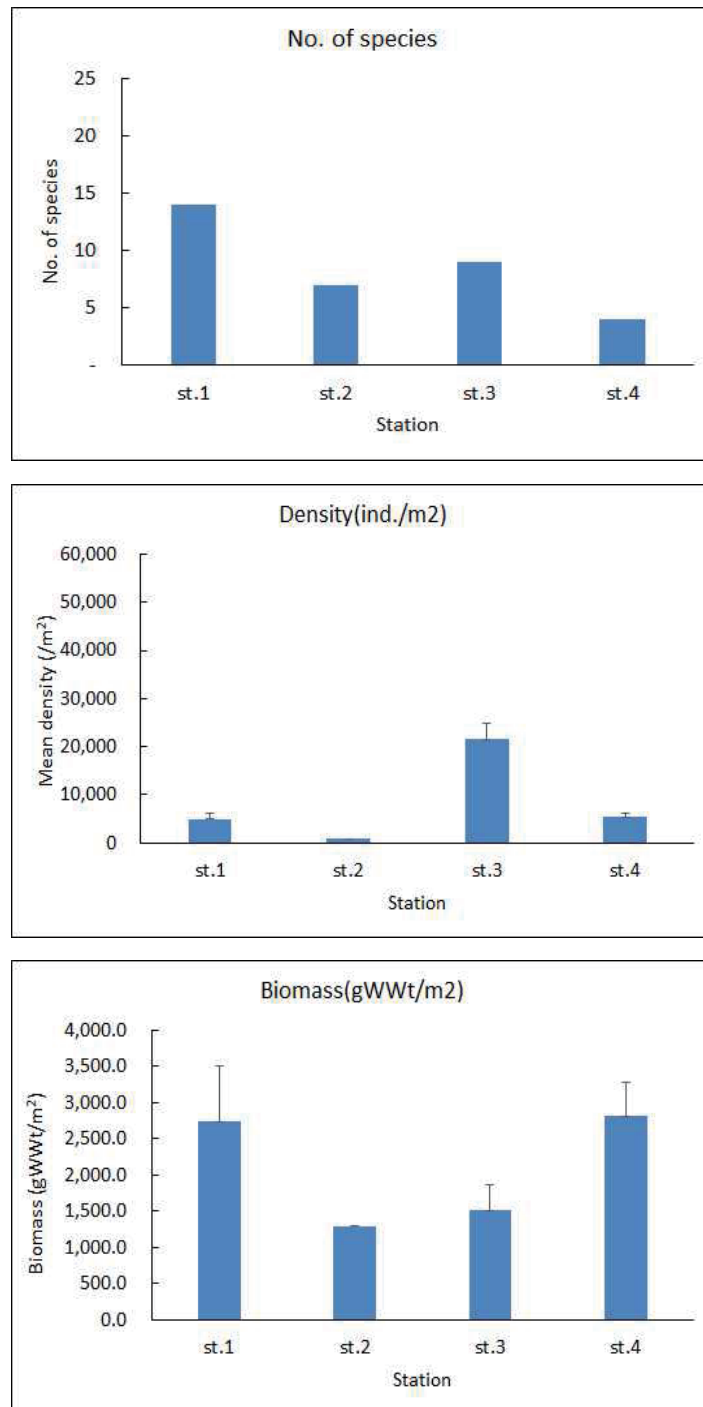


Fig. 3.3.1.44. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at study sites in the R/V JANGMOK 2.

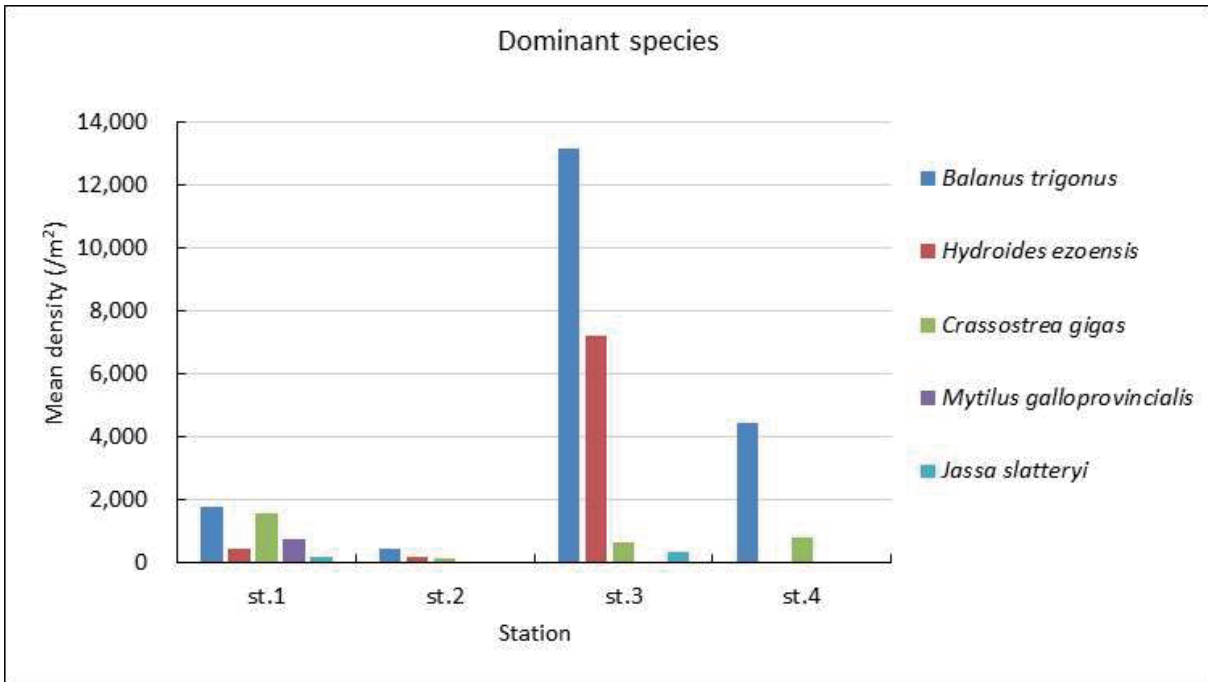
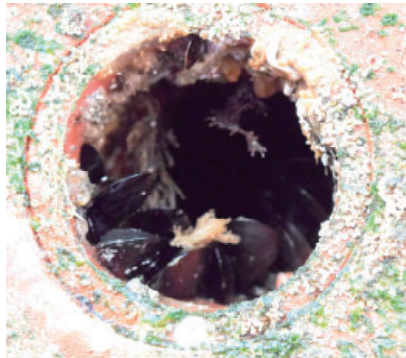


Fig. 3.3.1.45. Distribution of dominant species of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 2.



선측 좌현 상부 (굴, 조개삿갓, 지중해담치)



선측 좌현 중부 (지중해담치)



우현 선저 (우산석회관갯지렁이)



우현 선저 (우산석회관갯지렁이)



선측 좌현 프로펠러 축 (굴, 따개비)



좌현 선저 (우산석회관갯지렁이)

Fig. 3.3.1.46. Pictures of dominant species at study areas in the R/V JANGMOK 2.

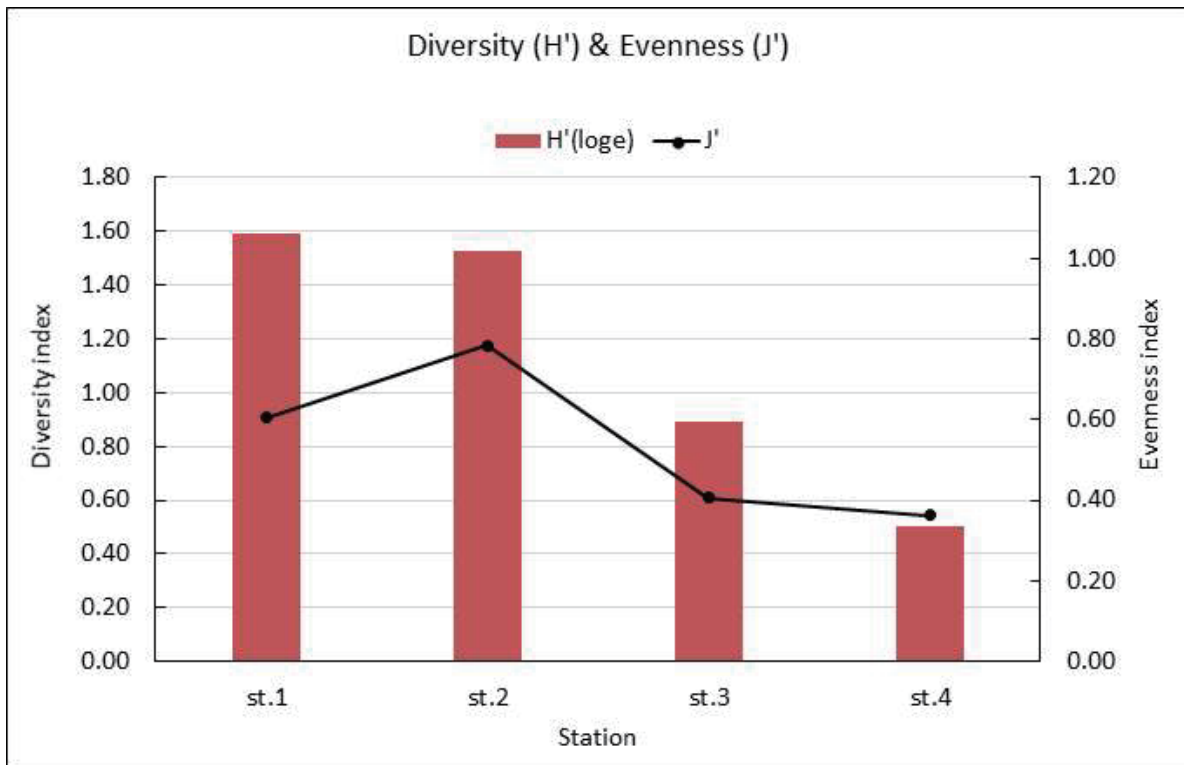


Fig. 3.3.1.47. Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 2.

(라) 장목 1호 (JANGMOK 1)

연안지역 (Local areas) 조사를 주로 수행하는 장목 1호에 부착하는 위해성 대형저서 동물은 총 19종이 출현하였으며, 평균서식밀도는 19,939 개체/m², 생체량은 4,724.0 gWWt/m²으로 나타났다(Fig. 3.3.1.48). 출현하는 동물군은 절지동물의 갑각류가 가장 많은 11종, 다모류 5종, 기타 분류군이 2종, 연체동물이 1종순으로 출현하였다. 평균서식밀도는 갑각강에 속하는 만각아강인 따개비류가 높은 서식밀도를 보이는 절지동물이 19,509 개체/m² (97.8%)로 가장 많이 출현하는 부착동물군으로 나타났다. 다음으로 이매패에 속하는 굴 (*Crassostrea gigas*)이 출현하는 연체동물이 213 개체/m² (1.1%), 기타 분류군이 122 개체/m² (0.6%) 순으로 출현하였다. 생체량은 패각을 형성하는 따개비류가 출현한 절지동물이 2,382.5 gWWt/m² (50.4%)으로 가장 높은 값을 보였으며, 다음으로 연체동물이 1,295.6 gWWt/m² (27.4%), 기타 분류군이 1,043.3 gWWt/m² (22.1%)을 보였다. 다모류는 2.5 gWWt/m² (0.1%)의 매우 낮은 생체량을 보였다.

선체 구역별 조사에서 대체로 정점별 큰 차이를 보이지 않고 유사한 출현 종수를 보였으며, 선측의 우현 상부 (waterline)에 위치한 정점 1은 9종, 중부 정점 2는 11종, 선저

정점 3은 12종, 선미의 우현 프로펠러 샤프트 (propeller shaft)에 해당하는 정점 4에서는 다소 낮은 7종이 출현하였다(Fig. 3.3.1.49). 평균서식밀도는 따개비류가 다량 출현한 선측의 중부 정점 2와 선저 정점 3에서 각각 34,870 개체/m²와 30,370 개체/m²의 높은 출현 밀도를 보였으며, 다음으로 따개비류가 다소 적게 출현한 선측 상부 정점 1과 프로펠러 샤프트 정점 4에서 각각 10,942 개체/m²와 12,029 개체/m²의 다소 낮은 서식밀도를 나타냈다. 생체량은 서식밀도 분포와 다르게 이매패인 굴이 다량 출현한 프로펠러 샤프트 정점 4에서 7,646.7 gWWt/m²으로 가장 높은 생물량을 나타냈다. 다음으로 따개비류가 다량 출현한 정점 2와 3에서 각각 5,372.7 gWWt/m²과 4,232.8 gWWt/m²의 비교적 높은 생물량을 보였으며, 따개비류가 다소 적게 출현한 정점 1은 상대적으로 다소 낮은 1,696.1 gWWt/m²의 생체량을 나타냈다.

연안지역 조사를 주로 수행하는 장목 1호의 부착생물 중 가장 우점하는 대형저서동물은 만각류에 속하는 주걱따개비 (*Balanus amphitrite*)가 15,374 개체/m² (77.1%)의 서식밀도로 대량 출현하여 가장 우점하였다. 다음으로 흰따개비 (*Balanus improvisus*)가 2,383 개체/m² (11.9%), 삼각따개비 (*Balanus trigonus*)가 1,657 개체/m² (8.3%)의 순으로 우점하였다(Fig. 3.3.1.50). 또한, 프로펠러와 샤프트에서 다량 발견된 굴(*Crassostrea gigas*)도 213 개체/m² (1.1%)의 밀도로 우점종에 포함되었다. 가장 우점한 주걱따개비는 선측의 중부 정점 2에서 28,087 개체/m²로 가장 높은 서식밀도를 보였으며 장목 1호 선체의 선저에 위치한 해수유입 부분의 정점 3에서도 비교적 많은 28,087 개체/m²의 서식밀도를 나타냈다. 두 번째로 우점한 흰따개비는 선측의 중부 정점 2와 선미의 프로펠러와 샤프트 정점 4에서도 각각 4,587 개체/m²와 3,290 개체/m²로 비교적 높은 밀도분포를 보였다. 세 번째로 우점한 삼각따개비는 선저 정점 3에서 4,043 개체/m², 선측 상부 정점 1과 중부 정점 2에서 각각 1,391 개체/m²와 1,739 개체/m²의 밀도분포를 나타냈다. 이매패에 속하는 굴은 선미 정점 4에서 464 개체/m², 선저 정점 3에서 152 개체/m²의 밀도분포로 우점하였다(Fig. 3.3.1.51).

대형저서동물의 종다양성을 나타내는 장목 1호의 종다양도지수는 평균 0.74로 다른 조사선보다 상대적으로 높은 값을 나타냈으며, 선미 구역 정점 4에서 0.97, 선저 정점 3에서 0.79의 높은 값을 보였다(Fig. 3.3.1.52). 반면에 선측의 상부와 중부 정점 1과 2에서 각각 0.50과 0.68로 상대적 낮은 지수값을 나타냈다. 균등도 지수 다양도지수와 유사한 패턴을 보였으며, 평균 0.33으로 다른 조사선보다 상대적 낮은 지수값을 나타냈다. 선미 정점 4에서 가장 높은 0.50의 값을 보였으며, 선측 상부 정점 1에서 가장 낮은 0.23의 균등도지수를 나타냈다.

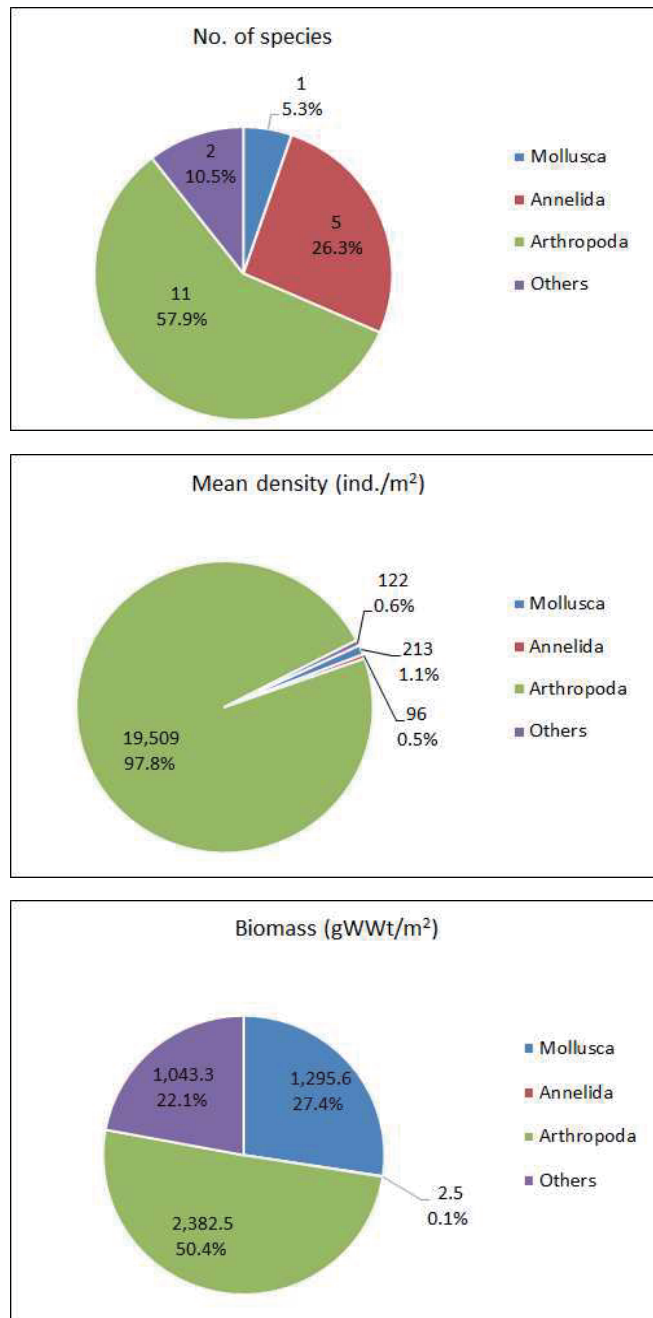


Fig. 3.3.1.48. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 1.

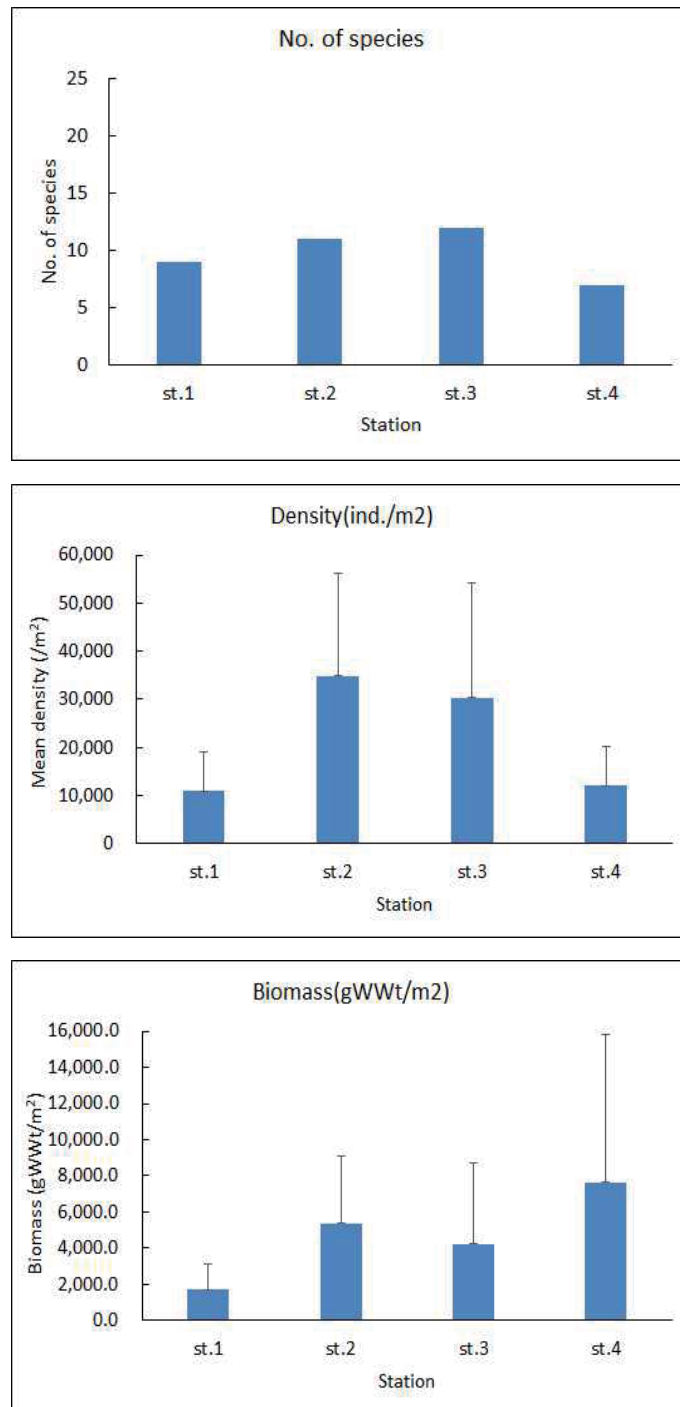


Fig. 3.3.1.49. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at study sites in the R/V JANGMOK 1.

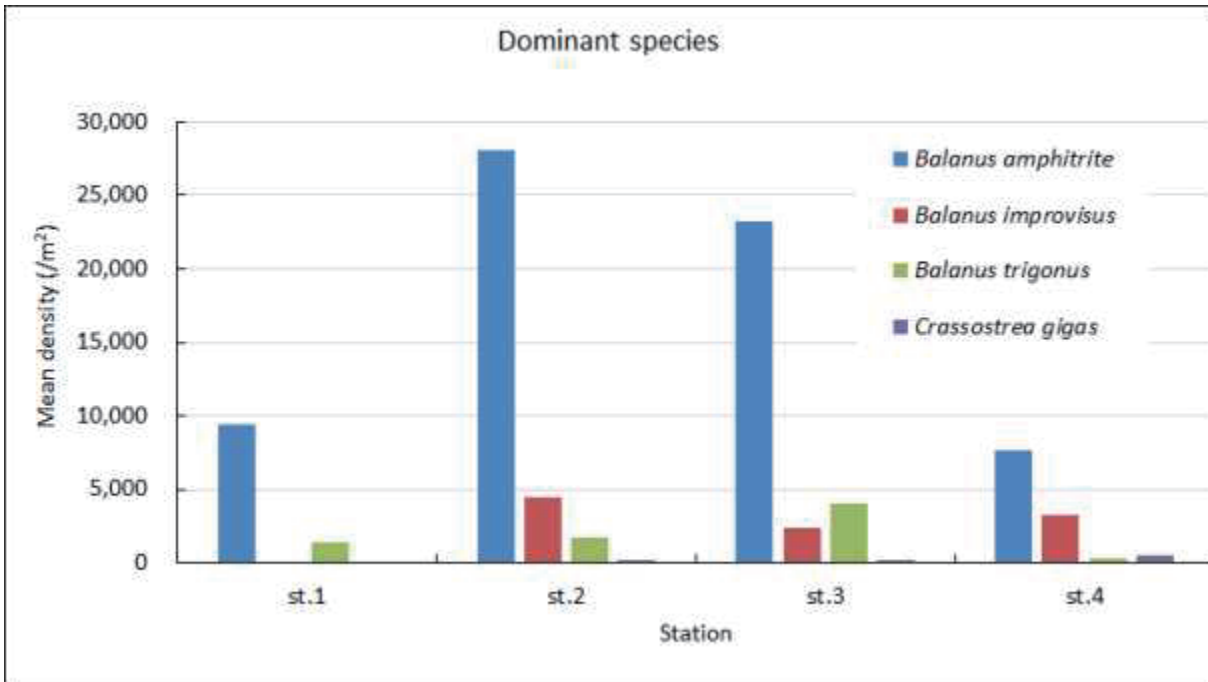


Fig. 3.3.1.50. Distribution of dominant species of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 1.



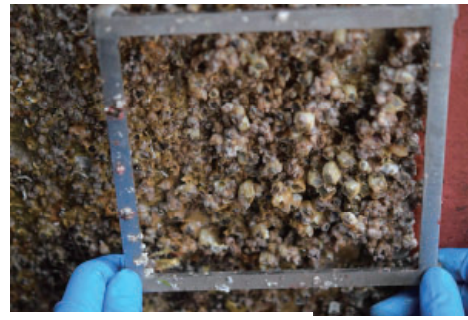
장목 1호 세척



선측 상부



선측 중부



선저 해수유입부



선측 선수



선저 해수유입부



선미 우현 프로펠러



선미 프로펠러

Fig. 3.3.1.51. Distribution of *Balanus* spp. at the study sites on the R/V JANGMOK 1.

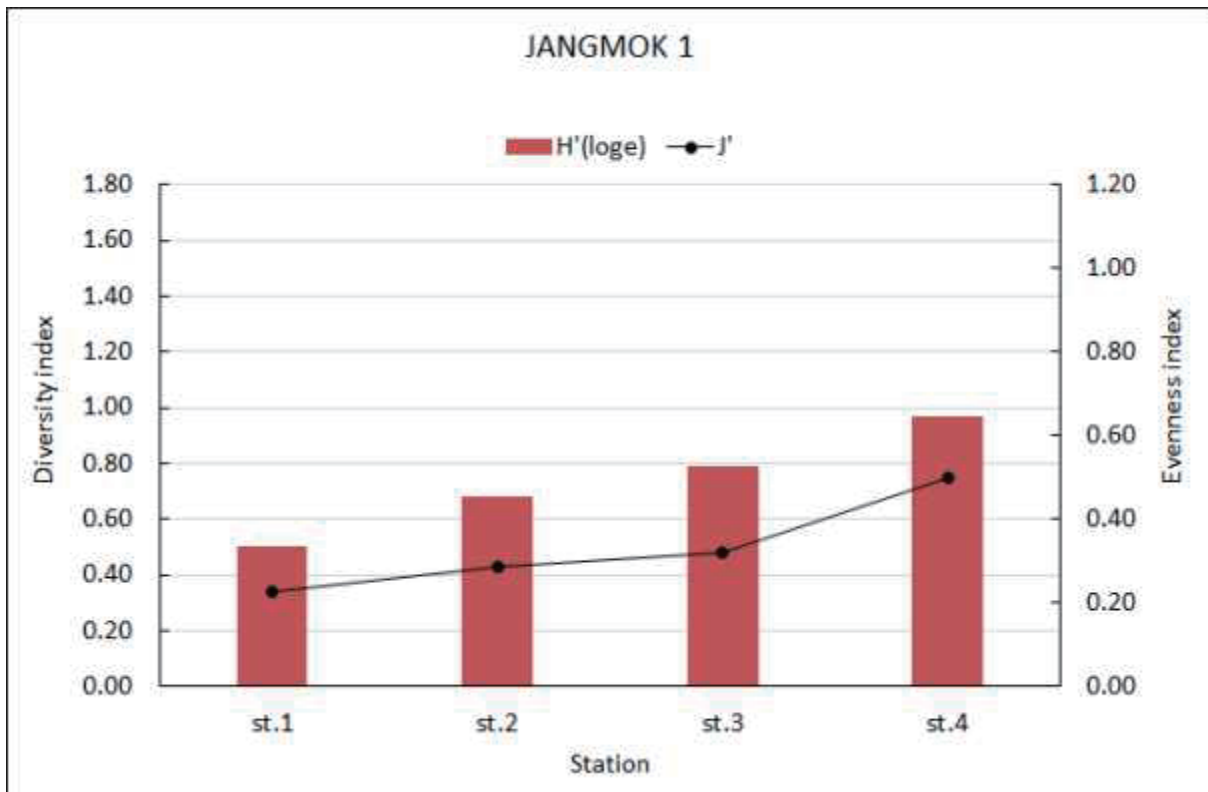


Fig. 3.3.152. Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V JANGMOK 1.

(마) 이사부호 (ISABU)

대양 (Ocean areas)을 주로 항해하는 온누리호에 부착하는 위해성 대형저서동물은 총 8종이 출현하였으며, 평균서식밀도는 2,935 개체/m², 생체량은 256.9 gWWt/m²으로 나타났다(Fig. 3.3.153). 출현하는 동물군은 전체 분류군 중 절지동물 갑각류가 8종으로 나타났으며 다른 분류군은 출현하지 않았다. 평균서식밀도는 갑각강에 속하는 만각아강인 따개비류가 높은 서식밀도를 보이는 절지동물이 2,935 개체/m² (100%)로 나타났으며 생체량은 유일하게 출현한 분류군인 절지동물이 256.98 gWWt/m² (100%)으로 나타났다.

선체 구역별 조사에서 선저(flat bottom)에 해당하는 정점 3에서 가장 많은 4종이 출현하였으며, 그 외 선측의 중부(mid depth) 정점 2와 선측의 상부(water line)에 위치한 정점1, Niche areas인 프로펠러 및 샤프트 구역의 정점 4에서 각각 2종이 출현하였다(Fig. 3.3.154). 평균서식밀도는 삼각따개비류가 다량 출현한 프로펠러 및 샤프트 구역의 정점 4에서 5,261 개체/m²의 높은 출현 밀도를 보였으며 선측의 상부 정점1, 중부 정점2, 선저 정점 3에서 각각 3,087 개체/m², 3,580 개체/m², 2,120 개체/m²의 서식 밀도는 보였다.

생체량은 프로펠러 및 샤프트 구역의 정점 4에서 427.7 gWWt/m²으로 가장 높게 나타났으며, 정점 1, 정점 3에서 각각 234.4 gWWt/m²과 352.7 gWWt/m²의 생물량을 보였고 서식밀도 분포와 다르게 선측의 중부 정점 2에서 101.0 gWWt/m²의 가장 낮은 값을 보였다.

대양 조사를 주로 수행하는 이사부호의 부착생물 중 가장 우점하는 대형저서동물은 만각류에 속하는 주걱따개비(*Balanus amphitrite*)와 삼각따개비(*Balanus trigonus*), 주머니조개삿갓류(*Conchoderma auritum*)로 나타났으며, 평균서식밀도는 각각 2,4283 개체/m² (82.7%)와 417 개체/m² (14.2%), 54 개체/m² (1.99%)를 차지하였다(Fig. 3.3.1.55). 가장 우점한 주걱따개비(*Balanus amphitrite*)는 프로펠러와 샤프트가 위치한 정점 4를 제외한 정점에서 모두 출현하였으며 선측의 상부 정점1, 중부 정점 2에서 3.072 개체/m², 3,565 개체/m²로 높은 서식밀도를 보였다. 두 번째로 우점한 삼각따개비(*Balanus trigonus*)는 프로펠러와 샤프트 정점 4, 스러스트가 위치한 정점 5에서만 출현하였으며 각각 5,000 개체/m², 2,500 개체/m²의 밀도분포를 보였다. 세 번째로 우점한 주머니조개삿갓류(*Conchoderma auritum*)는 선저 정점3에서만 163 개체/m²의 밀도분포로 우점하였다(Fig. 3.3.1.56).

대형저서동물의 종다양성을 나타내는 이사부호의 종다양도지수는 평균 0.12로 다른 조사선보다 상대적으로 낮은 값을 나타냈으며, 선체의 선저 구역인 정점 3에서 0.33으로 가장 높은 값을 보였다(Fig. 3.3.1.57). 정점 4에서 0.20의 값을 나타냈으며 선측의 상부 정점 1과 2에서 각각 0.03으로 낮은 지수값을 나타냈다. 균등도 지수 또한 평균 0.12로 다른 조사선의 지수값보다 상대적으로 낮은 값을 나타냈다. 다양도 지수와 비슷하게 균등도 지수는 정점 3, 정점4에서 각각 0.24와 0.28의 값을 보였으며 상부 정점1, 중부 정점 2에서 0.03의 낮은 균등도 지수를 나타냈다.

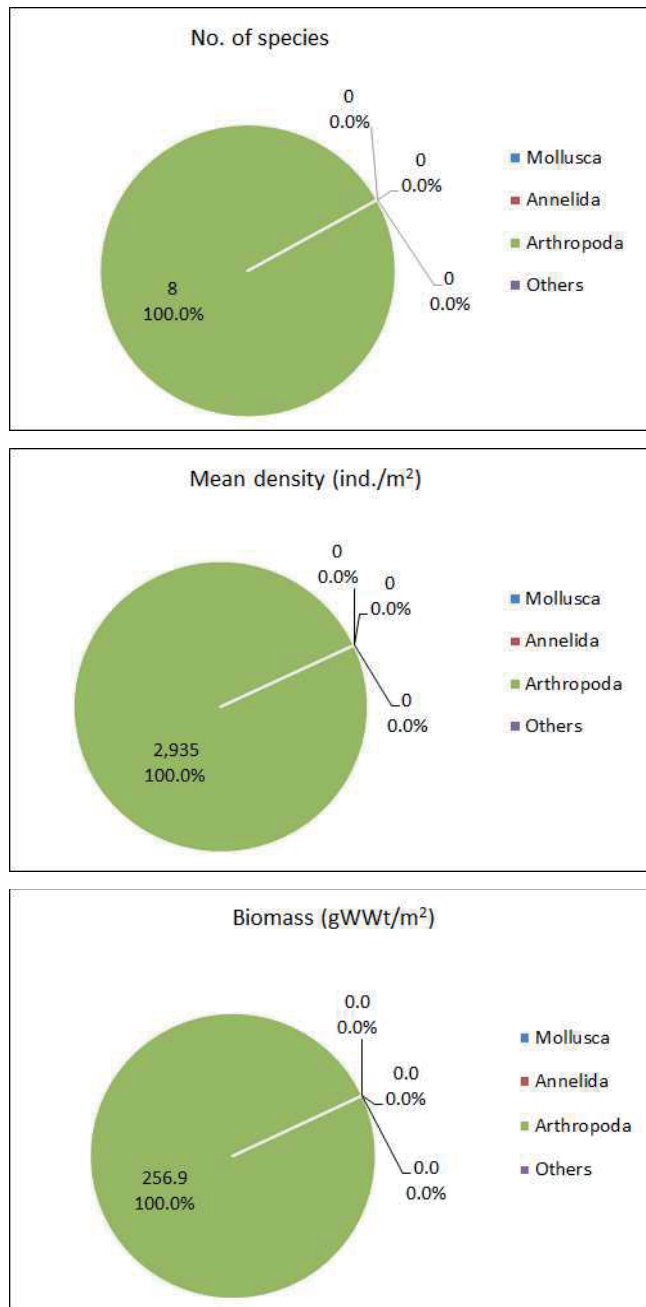


Fig. 3.3.1.53. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos on the R/V ISABU.

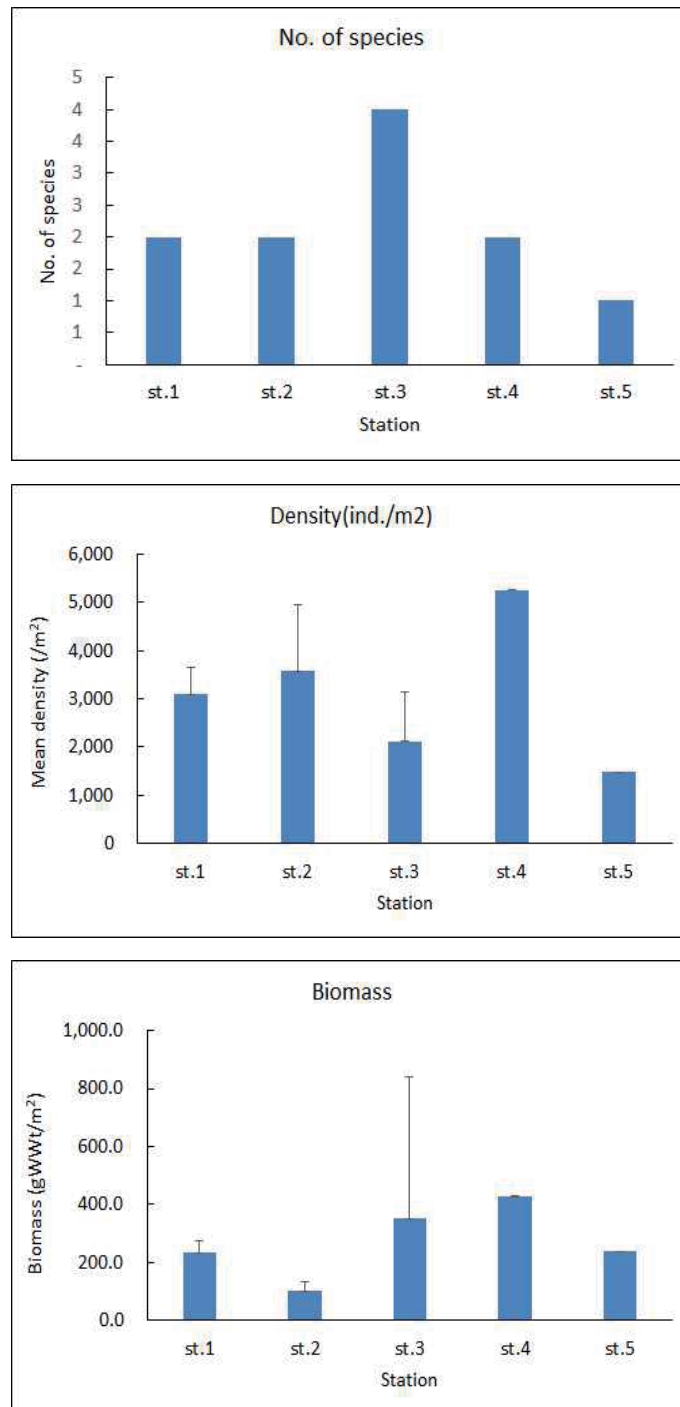


Fig. 3.3.1.54. Number of species, density and biomass of fouling macrozoobenthos at study sites on the R/V ISABU.

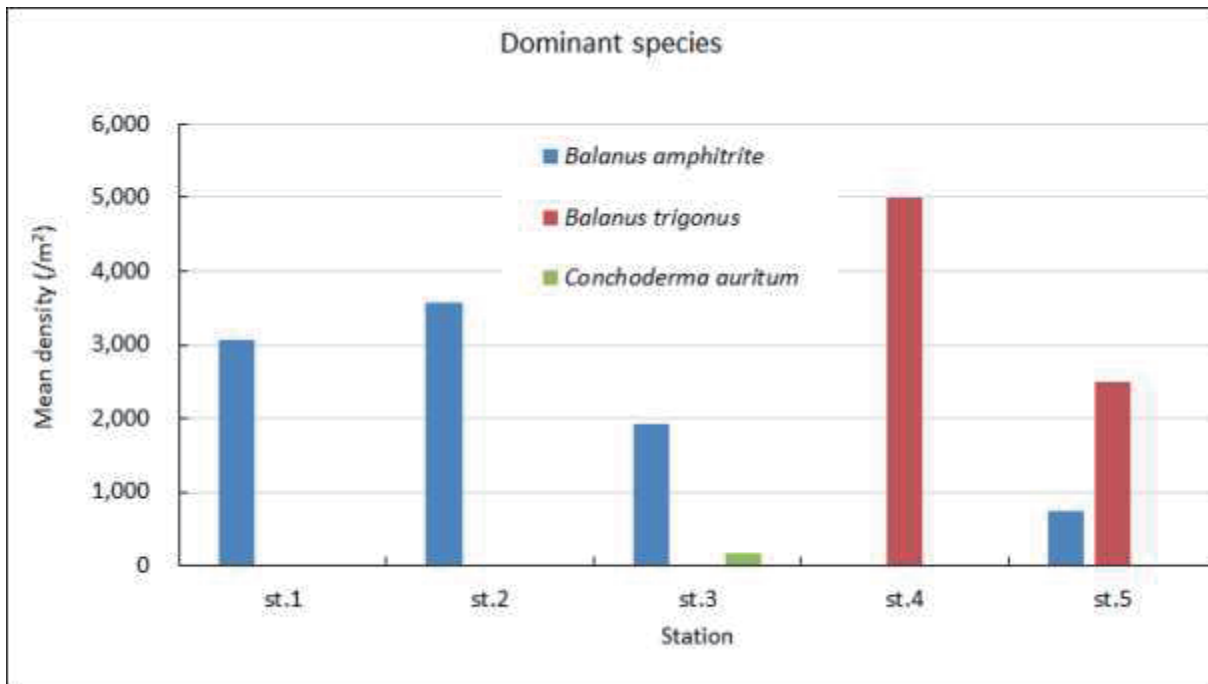
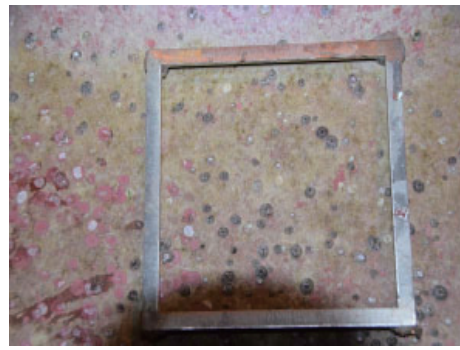


Fig. 3.3.1.55. Distribution of dominant species of fouling macrozoobenthos on the R/V ISABU.



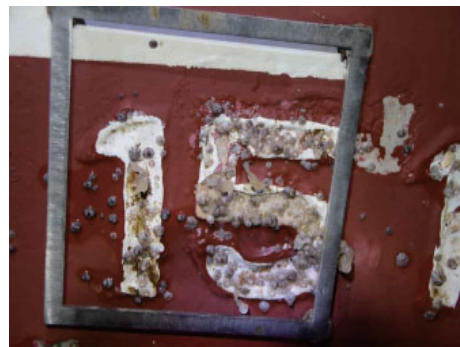
R/V 이사부호 좌현



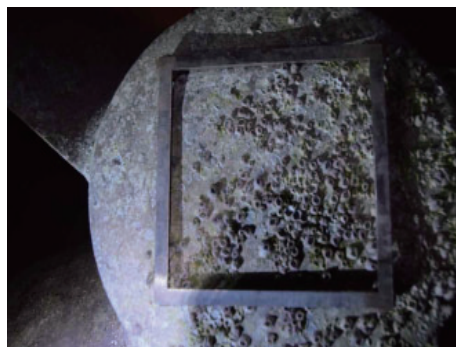
선측 상부



선측 중부



선측 좌현 선저



프로펠러 및 샤프트

Fig. 3.3.1.56. Distribution of *Balanus* spp. at the study sites on the R/V ISABU.

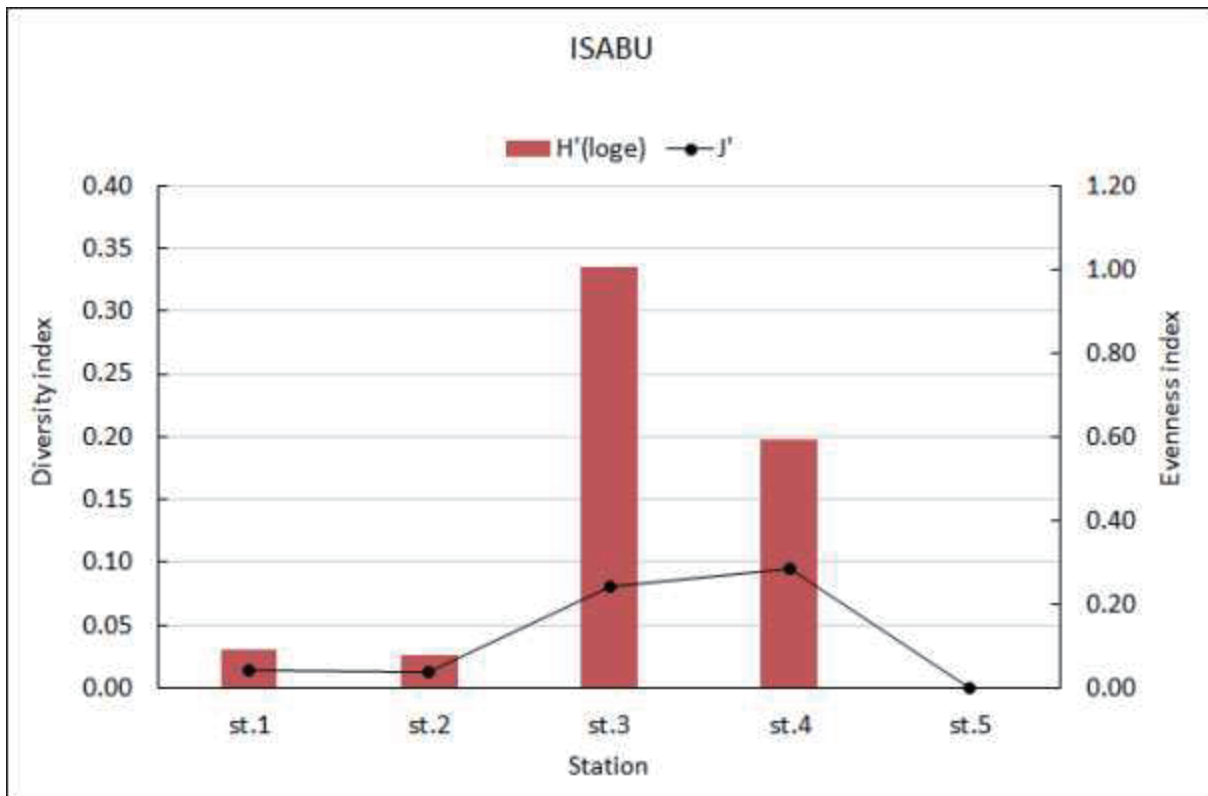


Fig. 3.3.1.57. Diversity and evenness index of fouling macrozoobenthos on the R/V ISABU.

(4) 결론

조사에서 출현한 대형저서동물은 총 47종, 10,297 개체/m², 생체량 2,381 gWWt/m²이 출현하였다. 출현 종수는 갑각류가 24종(51.1%)으로 가장 높았으며, 다모류(9.1%), 연체동물(12.8%) 순으로 출현하였다. 종수와 평균서식밀도는 만각아강의 따개비류가 대량 출현한 갑각류가 가장 우점하였으며, 생체량은 패각을 형성한 연체동물이 가장 높게 나타났다. 부착대형저서동물의 출현 종수는 연안과 외해를 번갈아 운항하는 이어도호에서 가장 많은 종(25종)이 나타났으며, 장목 1호(19종)와 장목 2호(18종) 순으로 출현하였다. 그러나 주로 대양을 항해하는 온누리호와 이사부호의 부착 대형저서동물은 10종 미만으로 낮은 출현 종수를 보였다. 반면에 부착대형저서동물의 서식밀도와 생체량은 연안지역을 조사하는 장목 1호와 연안과 외해를 오가는 이어도호에서 가장 높게 나타났다. 선저 부위 별 대형부착동물의 종수와 서식밀도를 분석한 결과, 온누리호는 선체의 선저 (flat bottom)에서 가장 많은 종과 높은 서식밀도 및 생체량을 보였으며, 만각류에 속하는 흰따개비 (*B. improvisus*)와 주걱따개비 (*B. amphitrite*)가 가장 우점하였다. 이어도호는 niche areas인

선미측 우현 프로펠러 샤프트 (propeller shaft)에서 가장 많은 종과 높은 생체량을 보였으며, 서식밀도는 선미측 좌현 스러스트에서 높게 나타났다. 우점종은 주걱따개비 (*B. amphitrite*)와 삼각따개비 (*B. trigonus*)로 나타났으며, 주걱따개비는 선체의 측면과 선저에서 우점하고, 삼각따개비는 선수 좌현 스러스트에서 극우점하였다. 장목 2호는 좌현 상부에서 가장 많은 종이 출현하였고 선저에서 높은 서식밀도를 보였으며, 생체량은 선측 상부와 좌현 프로펠러 샤프트에서 높게 나타났다. 우점종은 삼각따개비 (*B. trigonus*)와 우산석회관갯지렁이 (*H. ezoensis*)로 선저에서 가장 우점하였다. 장목 1호는 선체의 측면과 선저에서 높은 종수를 보였으며 서식밀도는 선체의 중부 정점에서, 생체량은 프로펠러 샤프트에서 높게 나타났다. 우점종은 주걱따개비 (*B. amphitrite*)가 선저에서 극우점하고 선측의 중부지역에서도 비교적 높은 밀도의 분포양상을 보였다. 이사부호는 선체의 측면과 선저에서 2-4종의 낮은 종수를 보였으며 서식밀도와 생체량은 프로펠러 및 샤프트 정점에서 높게 나타났다. 우점종은 주걱따개비 (*B. amphitrite*)가 선체의 측면 및 선저에서 극우점 하였으며 삼각따개비 (*B. trigonus*)가 niche areas인 프로펠러 및 샤프트, 스러스트 구역에서 우점하였다. 각 조사선의 종다양도지수는 연안과 동해지역 연구조사를 주로 수행하는 장목 2호에서 가장 높게 나타났으며, 연안과 외해를 번갈아 운항하는 이사부호는 낮게 나타났다. 반면, 균등도 지수 대양을 항해하는 온누리호가 가장 높은 값을 보였으며, 이어도는 가장 낮은 균등도지수를 나타냈다.

2. 선박부착생물 모사실험 파생생물 판별

가. 선저부착 미세구조류

(1) 서론

선박 방오도료에 의한 선택적 부착 미세구조 군집의 특성 파악 및 해양생태계에 파생시 성장 유무 판단하기 위하여 선박 생물부착 방오도료 기반 모사판 실험을 수행하였다 (Fig. 3.3.2.1)

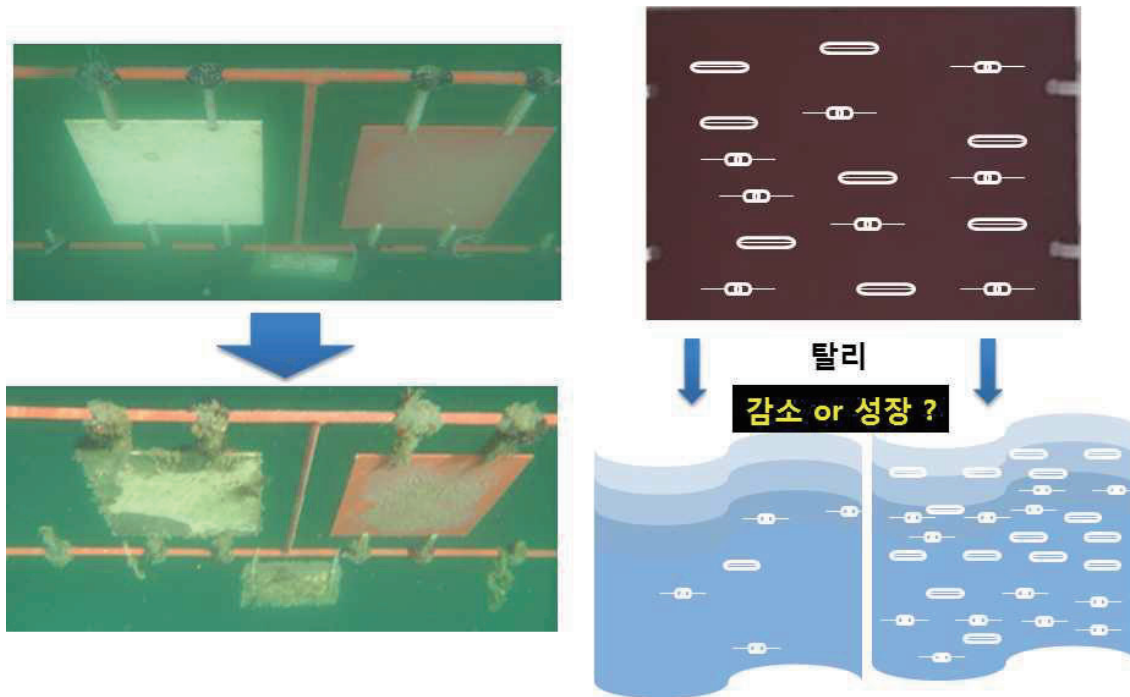


Fig. 3.3.2.1. Photograph of changes in attached organisms on artificial ship surface (control and treatment plates) and concept of viability test.

(2) 재료 및 방법

Control plate는 방오도료를 입히지 않은 부착판으로 주요 성분은 tie coat+primer이다. 이는 후속도장에 이용되는 페인트로, 상도 도장 시 발생하는 기포에 의해 부착판이 녹이 스는 것을 방지 한다. Treatment plate는 방오도료를 입힌 부착판으로 주요 성분은 tie coat primer와 intersmooth 7475Si이다. Intersmooth 7475Si은 방오도료로, 해수에 노출된 부착판에 해양생물들이 부착되는 것을 막는다. (Fig. 3.3.2.2).

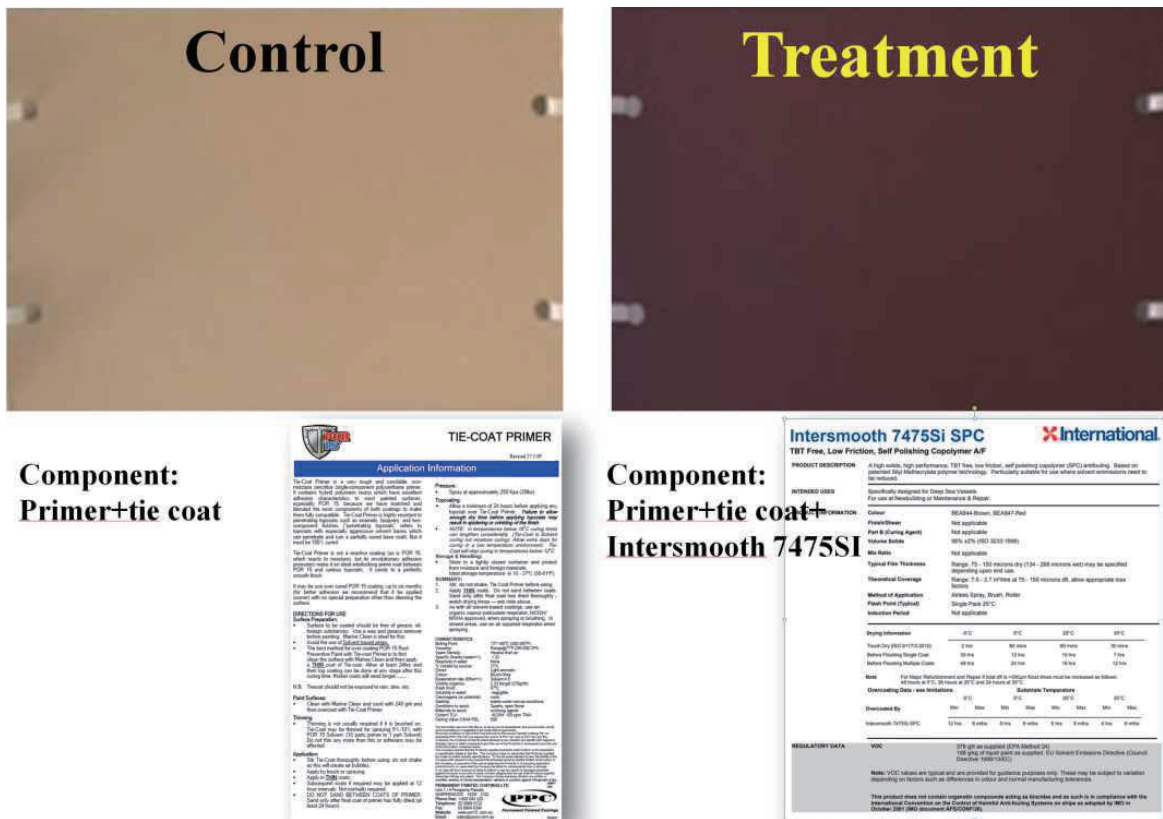


Fig. 3.3.2.2. Major chemical components of artificial ship surface plate (control and treatment plates).

2018년 5월 8일부터 약 일주일 주기로 8회에 걸쳐 부착판을 설치한 현장의 해양 생태계를 파악하여, 부착판에 서식하는 미소생물의 기원을 추정하고, 부착판 내 미소생태계와 해양생태계의 차이점을 파악하기 위하여 해양 환경의 모니터링을 수행하였다.

선박표면을 모사한 control plate와 treatment plate를 제작 후, 2018년 5월 8일에 현장(장목 연안 KIOST 남해연구소)에 설치하였다. 부착판 설치 후 8일 후인 2018년 5월 16일부터 약 일주일 주기로 6월 26일까지 7회 동안 부착판 미소 생물 군집의 변화를 파악하였다 (Fig. 3.3.2.3).

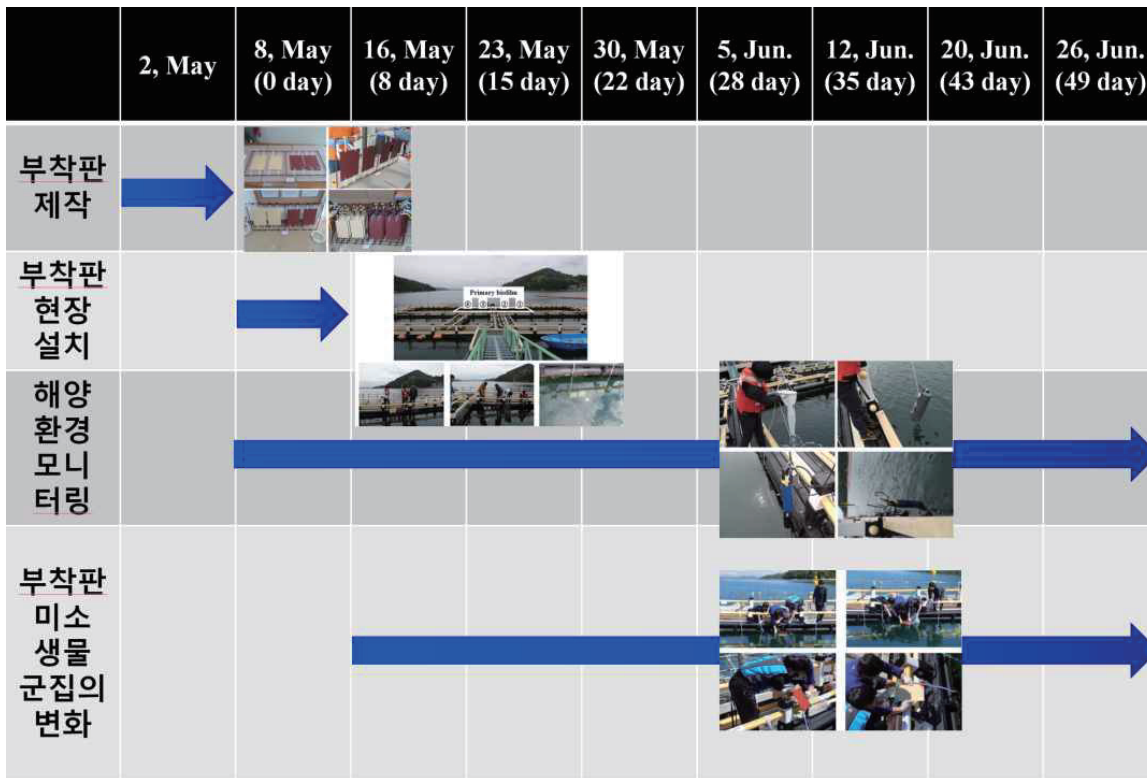


Fig. 3.3.2.3. Time table of study plan.

선박 부착 미세규조류의 해양생태계 유입 시 성장 여부를 파악하기 위하여 부착모사판에서 탈리 후 박테리아 및 부착 미세규조류의 군집의 변화를 파악하였다(Fig. 3.3.2.4). 부착 미세규조류는 control plate와 treatment plate에서 각각 부착성 미소생물을 탈리시킨 후 현장의 해수와 멸균여과 된 해수에 접종하여 이들의 성장여부를 in vivo fluorescence (10-AU)를 통해 측정하였으며, 광학현미경과 주사전자현미경을 이용하여 종을 동정하였고, 모든 실험은 3배수 실험을 수행하였다. 박테리아는 control plate와 treatment plate에서 각각 부착성 미소생물을 탈리시킨 후 현장의 해수와 멸균여과 된 해수 (f/2 medium)에 접종하여, 접종 직후인 0일부터 접종 후 12일까지 격일주기로 총 13일간 박테리아 군집을 분석함. 모든 분석은 3배수로 진행하였으며, 형광현미경을 이용하여 박테리아의 개체수를 파악하고 NGS를 통해 박테리아 군집을 분석하였다(Fig. 3.3.2.4).



Fig. 3.3.2.4. Experimental methods of investigation of microalgae on artificial ship surface plate and viability test.

(3) 결과 및 토의

선박표면 모사판을 설치한 해역의 수온은 각각 15.6 - 23.5 °C, 염분은 32.6 - 33.3으로 수온과 염분은 점차 증가하는 경향을 보였다. 용존 산소는 현장 관측 8일 후 10.0 mg/L의 최고값을 보였으며, 이후 점차 감소하여 현장 관측 종료 시인 49일 후에는 7.4 mg/L이었다. pH는 시간 경과에 따라 전반적으로 감소하는 경향을 보였다. DOC는 현장 관측 8일 후에 3.58 mg/L의 최고값을 보였으며, 이후 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보였다. DOC의 최저값은 28일에 1.50 mg/L으로 나타났다. 용존무기질소는 시간에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 관측시작일과 관측종료일에 각각 10.65 μM , 3.13 μM 의 농도를 보였다. 용존무기인은 관측 시작일로부터 감소하였다가 28일차부터 증가하여 35일차부터는 일정한 농도를 보였다. 최소농도와 최대농도는 각각 0.16 μM , 0.24 μM 로 나타남. 용존 규소는 일시적으로 감소하였다가 증가 후 다시 감소하는 경향을 보였으며, 35일차에는 0.24 μM 의 낮은 농도를 보였다. 최대값은 15일차에 확인되었으며, 당시 15.93 μM 의 농도로 나타났다(Fig. 3.3.2.5).

식물플랑크톤 현존량은 관측시작일로부터 점차 증가하여 22일차에 33,040 cells mL⁻¹를 보인 후, 감소하여 43일차에는 3,000 cells mL⁻¹를 나타냈다. 현장관측 시작 일에 식물플랑크톤의 대부분은 와편모조류 및 기타 식물플랑크톤이 차지하였으나, 8일차부터는 규조류가 점차 증가하였으며, 특히 깃털형 규조류가 높은 비율을 차지하였다. 43일차에 깃털형 규조류의 구성비율은 급감하였고, 중심형 규조류가 높은 비율을 차지하였다(Fig. 3.3.2.5).

박테리아 개체수는 시작일에 12.60 $\times 10^6$ cells mL⁻¹의 개체수를 보였으며, 점차 증가하여 43일차에는 25.17 $\times 10^6$ cells mL⁻¹의 최고값을 보였다. 이후 점차 감소하였다. 종속

영양 편모조류는 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 관측 시작일과 종료일에는 각각 40.20×10^3 cells mL⁻¹, 15.20×10^3 cells mL⁻¹의 개체수를 보였다(Fig. 3.3.2.5).

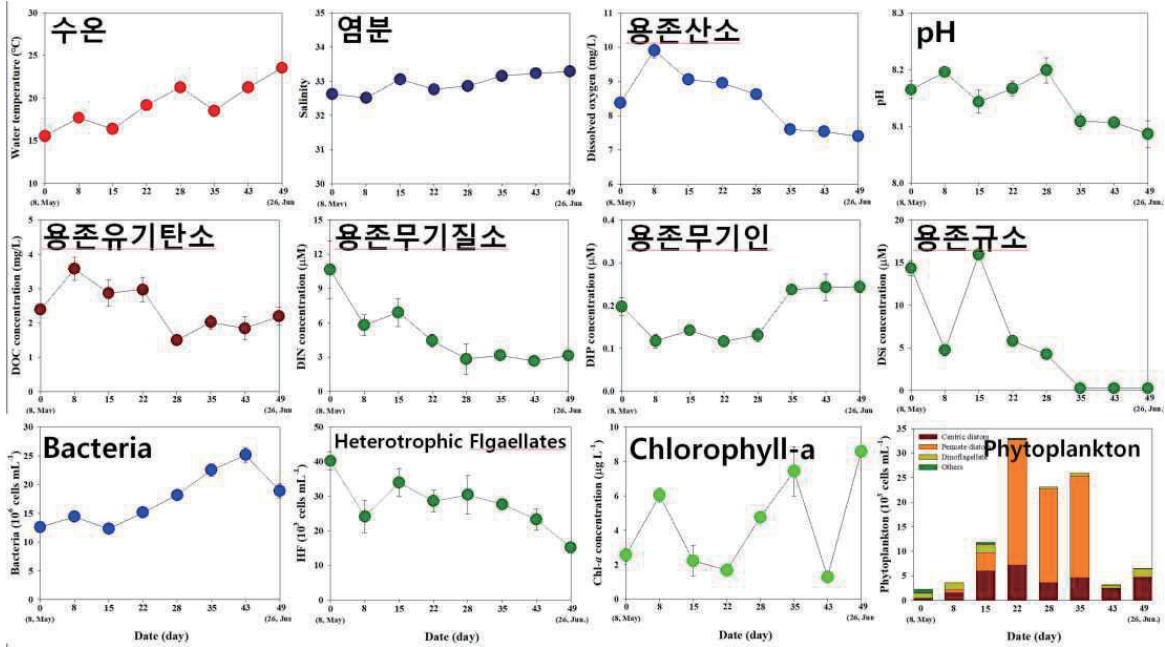


Fig. 3.3.2.5. Changes in environmental factors in sea water.

선박표면 모사판 내 부착 생물상을 육안으로 관측시 control plate는 8일 동안 해수에 노출된 부착판에서 점액질로 둘러싸인 유령명계 폴립이 발견되었다. 이후 갯수 및 크기는 점차 증가하였으며, 또한 22일부터는 석회조류, 홍조류 및 갈조류와 같은 해조류가 함께 부착됨. 28일 부터는 유령명계 성체가 관찰되었으며, 시간이 지날수록 유령명계의 개수 및 크기가 점차 증가하였다. 49일 후에는 해조류 및 유령명계가 부착판을 가득 메워, 부착판 제작 당시의 모습을 추정하기 어려웠다. 반면, treatment plate는 해수에 노출된 지 8일 후부터 일부 유령명계 폴립이 일부 관찰되었으나, 시간이 지남에 따라 그 크기와 개수는 증가하였다. Control plate와 달리 육안으로 뚜렷이 확인되는 해조류 및 유령명계는 발견되지 않았다(Fig. 3.3.2.6).

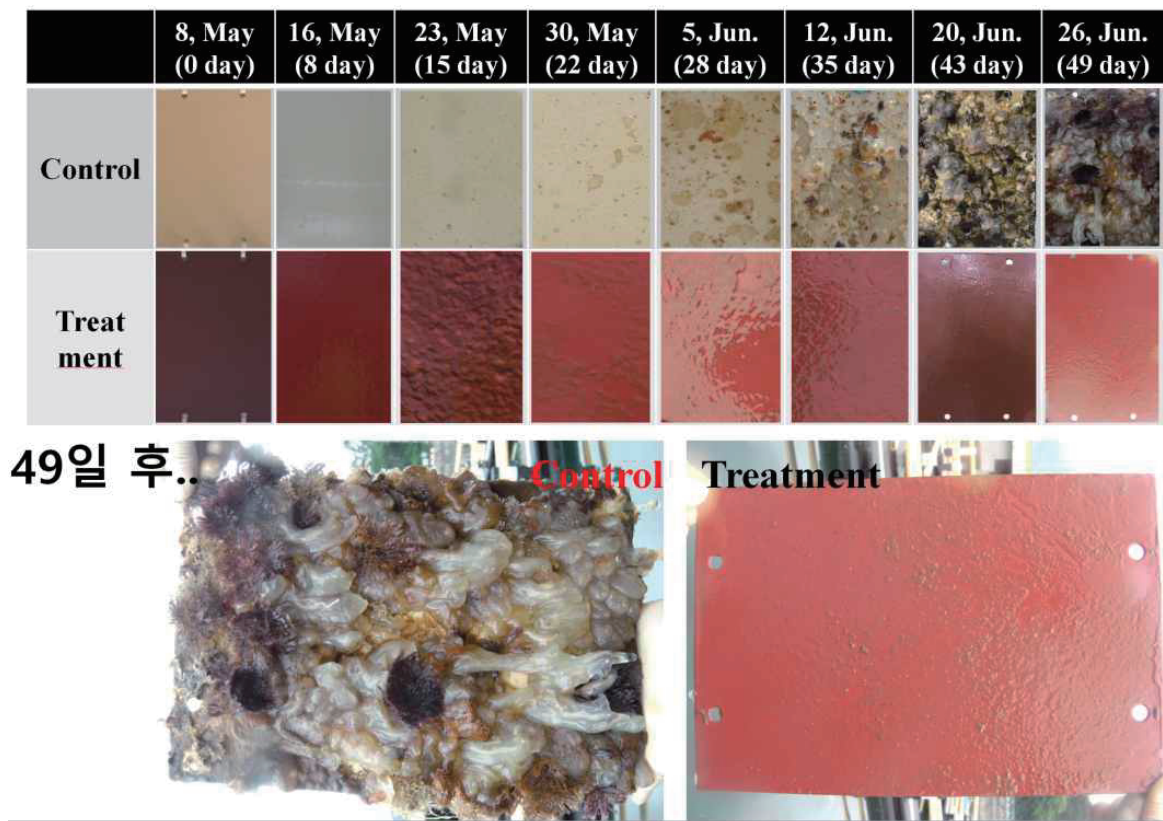


Fig. 3.3.2.6. Changes in attached organisms on artificial ship surface plate.

선박표면 모사판의 화학성분 변화 중(EDS 분석) 알루미늄 (Al)은 두 부착판 모두 해수에 노출된 시간이 길어짐에 따라 알루미늄의 구성비율이 증가하였다(Fig. 3.3.2.7). Treatment plate의 알루미늄의 비율이 control plate보다 높았으며, 약 10% 이내의 구성비율을 차지하였다. 크롬 (Cr)은 두 부착판 모두에서 크롬성분은 2회 확인 되었으며, control plate와 treatment plate에서 각각 0.5%, 2% 이내의 구성비율을 차지하였다. 구리 (Cu)는 control plate에서 구리성분은 28일차까지 감소하였다가 이후 다시 증가와 감소를 반복하는 경향을 보였다. treatment plate 또한 22일차까지 감소하였다가 35일차까지 증가, 이후 다시 감소하는 경향을 보였다. Control plate와 treatment plate는 각각 2%, 3% 이내의 구성비율을 보였다. 황 (S)은 control plate에서 15일 차에 급증하였다가 이후 감소하는 경향을 보였다. 15일차의 구성비율은 약 18%였으며, 이후 2% 이내를 차지하였다. Treatment plate에서는 22일차까지 증가하였다가 감소하는 경향을 보였으며, 1% 이내의 구성비율을 보였다. 티타늄 (Ti)은 control plate에서 티타늄은 일정한 변동 양상을 보이지 않았으며, 0.5% 이내의 구성비율을 보였다. Treatment plate에서는 비교적 일정하게 0.2% 이내의 구성비율을 보였다. 아연 (Zn)은 두 부착판에서 아연은 1.5%

이내의 비교적 일정한 구성비율을 나타냈다.

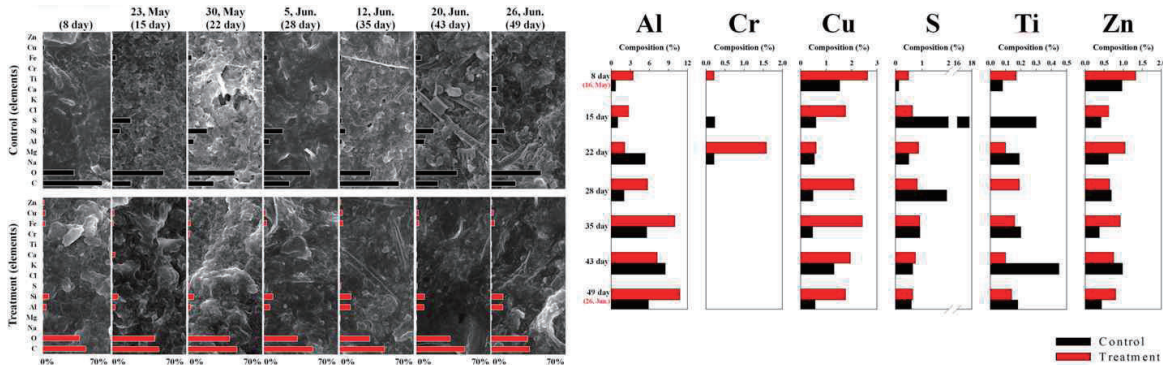


Fig. 3.3.2.7. Variations of chemical components by EDS analysis on artificial ship surface plates.

선박표면 모사판 미소생태계 변화 중 부착 미세조류의 현존량은 control plate에서 식물플랑크톤은 해수 노출 43일차에 급증하여 49일차에 최대 $283,533 \text{ cells cm}^{-2}$ 를 나타냈고, 부착 미세조류의 대부분은 부착성 규조류로 구성되어 있었다. Treatment plate에서는 해수 노출 35일차까지 점차 증가하였으며 최대 $45,130 \text{ cells cm}^{-2}$ 로 개체수를 보였으며, control plate와 비교하여 약 6배 낮았다. 또한 control plate의 대부분은 부착성 규조류로 구성되어 있었다(Fig. 3.3.2.8).

1% 이상의 우점 부착성 규조류는 5속 11종으로 나타났다. 최우점 규조류는 약 40%, 차우점 규조류는 20%의 높은 우점율을 보였으며, 그 외 규조류는 6% 이하를 차지하였다. Control plate의 규조류는 시간이 지남에 따라 증가하는 양상을 보인 반면, treatment plate의 규조류는 세포밀도가 낮고 증가폭이 미미하였다. *Pseudonitzschia delicatissima*는 control plate보다 treatment plate에서 높은 세포 밀도를 보였다. *Nitzschia* sp. 3과 *Nitzschia* sp. 5는 다른 규조류종과 달리 증가하였다가 감소 후 다시 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3.3.2.8).

종속영양 편모조류는 두 부착판 모두 부착 미세조류와 동일한 변화양상을 보였다. control plate와 treatment plate에서 최대 세포밀도는 각각 $218 \times 10^3 \text{ cells cm}^{-2}$, $36 \times 10^3 \text{ cells cm}^{-2}$ 로, 부착미세조류와 마찬가지로 treatment plate에서 약 6배 낮은 개체수를 보였다(Fig. 3.3.2.8).

박테리아는 두 부착판에서 박테리아는 점차 증가하는 경향을 보였다. Control plate에서는 점차 증가하여 해수 노출 49일차에 $39 \times 10^6 \text{ cells cm}^{-2}$ 의 개체수를 보였으며, treatment plate에서는 49일차에 $53 \times 10^6 \text{ cells cm}^{-2}$ 로 나타났다. 박테리아의

개체수는 평균적으로 control plate보다 treatment plate에서 높았다(Fig. 3.3.2.8).

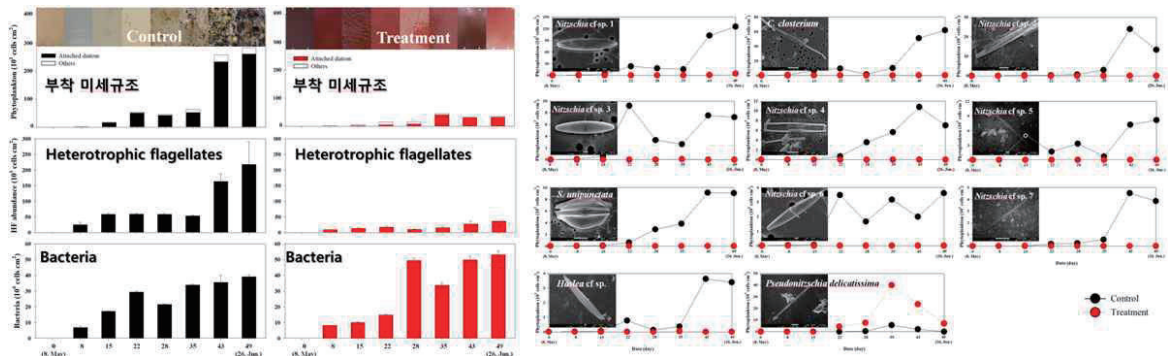


Fig. 3.3.2.8. Changes in microorganisms (attached diatoms, heterotrophic flagellates and bacteria) and common attached diatom species (over 1% of total attached diatoms) on artificial ship surface plates.

선박표면 모사판에서 파생된 이후 viability test에서 환경요인 중 용존유기탄소는 F/2 medium의 control plate에서 탈리된 부착미소생물을 접종 후 가장 낮은 농도를 보였으며, F/2 medium의 treatment plate에서 탈리된 부착미소생물을 접종 후 가장 높은 농도를 보여, 부착모사판의 부착미소생물상의 농도와 유사한 양상을 보였다. 용존무기질소는 해수 내 treatment plate에서 탈리된 부착미소생물 접종 후 용존무기질소의 농도를 보이지 않았으나, control plate에서는 증가 후 감소를 보인 것으로 보아, 자체 분해되어 용존무기질소의 생성 및 이에 따른 감소로 보인다. 용존무기인 및 용존규소 농도는 용존무기질소의 변화와 유사한 경향을 보였다(Fig. 3.3.2.9).

부착 규조류 군집은 F/2 medium 대조구에서 감소하다가 증가하는 경향을 보였으며, 처리구에서는 지속적인 증가 후에 감소하였다. 해수에서는 부착미세규조의 성장이 F/2 medium 보다 낮은 농도를 보였으나, 변화 경향은 유사하였다. (Fig. 3.3.2.10)

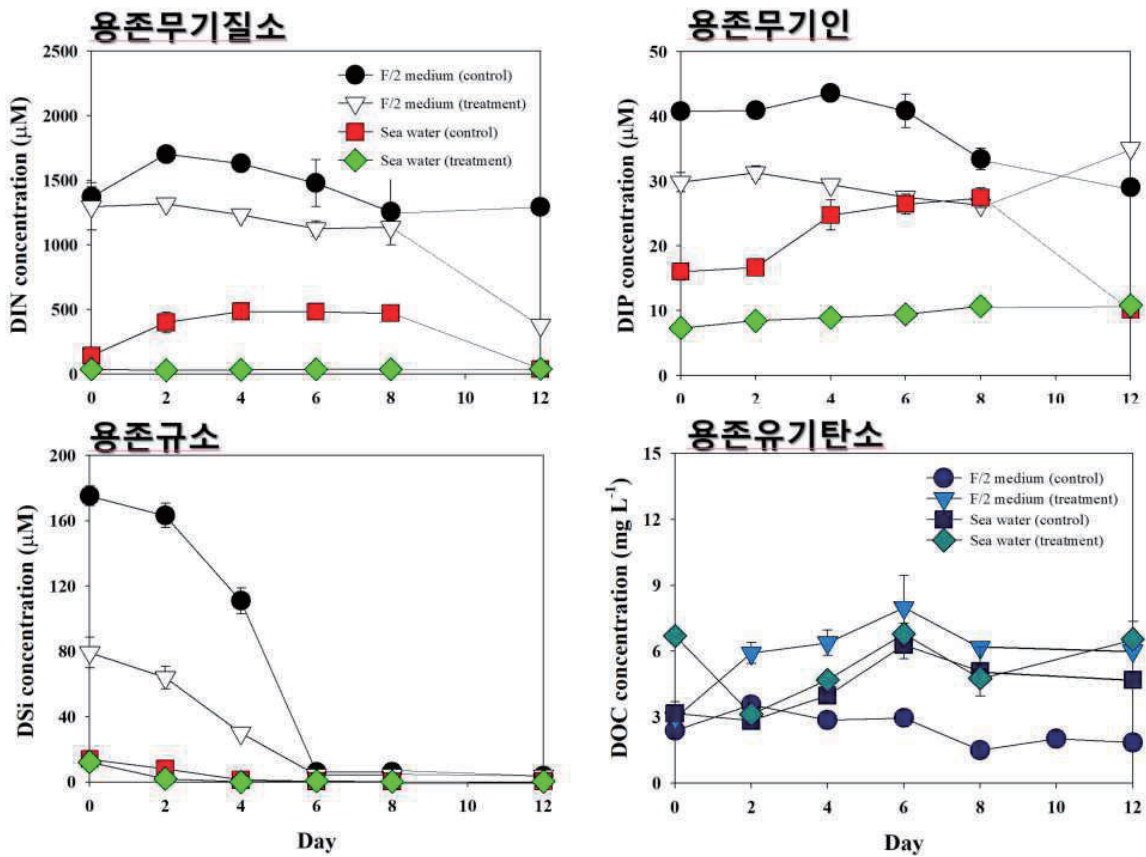


Fig. 3.3.2.9. Changes in environmental factors in viability test.

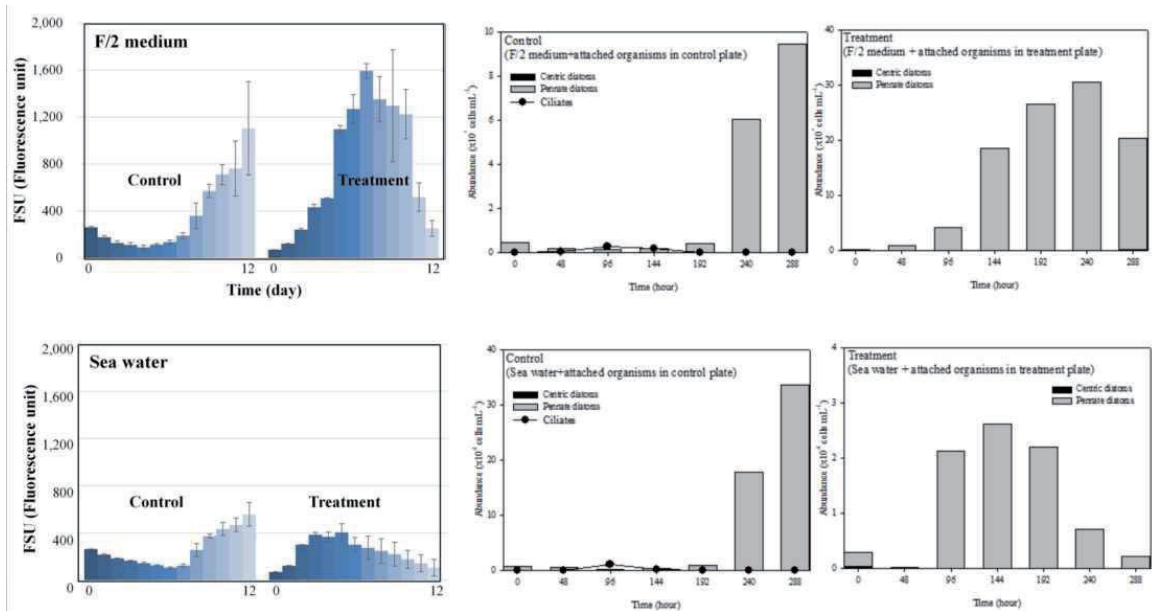


Fig. 3.3.2.10. Changes in attached diatom community of viability test.

박테리아 군집은 F/2 medium 및 해수의 대조구에서 접종 후에 증가하였다가 감소하는 경향을 보였다. 반면 처리구는 접종 후 감소하다가 8일차부터 약간 증가하였다. 박테리아의 개체수는 대조구보다 처리구에서 높게 나타났다. NGS를 이용한 박테리아 군집의 종 변화는 현재 분석 중에 있다(Fig. 3.3.2.11).

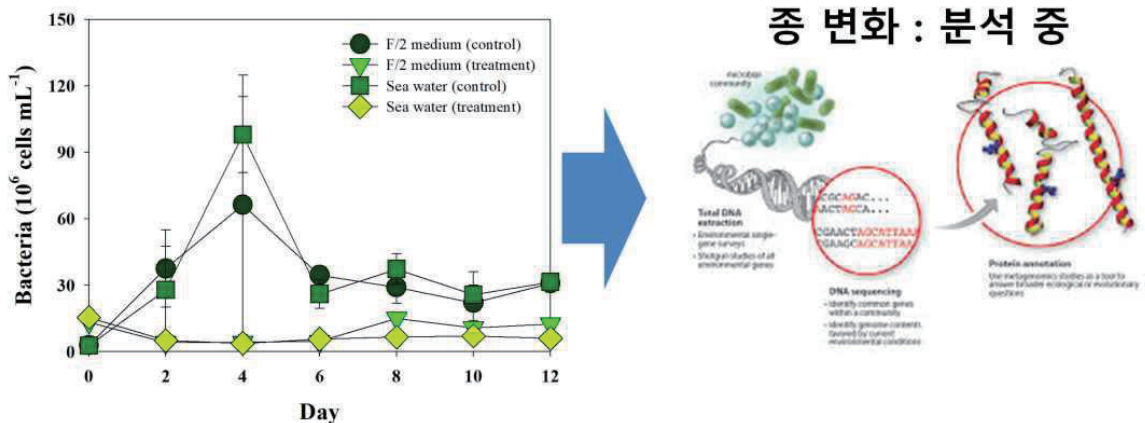


Fig. 3.3.2.11. Changes in bacteria community of viability test.

나. 선저부착 원생생물

(1) 서론

선저에 부착하는 따개비, 해조류와 같은 해양 오손생물(biofouling)은 선박운행 시 선체의 저항을 높여 에너지 및 경제적 손실을 일으킨다. 이러한 문제를 해결하기 위해 대부분의 선박들이 독성화합물 방오도료를 선체 표면에 도포하여 오손생물이 부착되는 것을 억제하고 있는 실정이다. 오손생물의 발달과정은 최초 표면에 유기물 입자의 흡착이 일어나고, 이를 먹이원으로 하는 박테리아의 증식으로 생물막(biofilm)이 형성된다. 생성된 생물막 위로 원생생물 미소오손생물(micro biofouling) 군집이 등장하고 이후 따개비와 같은 대형저서생물이 부착하는 대형오손생물(macro biofouling) 군집이 발달한다. 본 연구는 오손 초기단계에 관여하는 원생생물 중 섬모충을 대상으로 방오도료처리 또는 비처리한 모사판에 부착하는 섬모충 생물상을 조사하고 방오도료 독성 노출시간에 따른 군집 변화를 비교·추적하였다.

(2) 재료 및 방법

부착성 원생생물 모사실험은 방오도료(Intersmooth 7475 SI)를 처리한 treatment 7장

과 방오도료를 처리 하지 않은 background 7장을 장목만 해수에 노출시킨 후 모사판을 일주일 간격으로 회수하여 부착섬모충을 채집하였다. 해수 중에 노출시킨 모사판의 표면을 브러시로 부착물을 분리하여 시료를 확보하였다. 획득된 시료는 각각 Bouin's 고정시료, Lugol 고정시료, 생시료로 나누어 형태 및 분자학적 분석에 사용하였다. 특히 획득한 생시료의 경우, 실험실 내에서 세포를 분리·배양하였다.

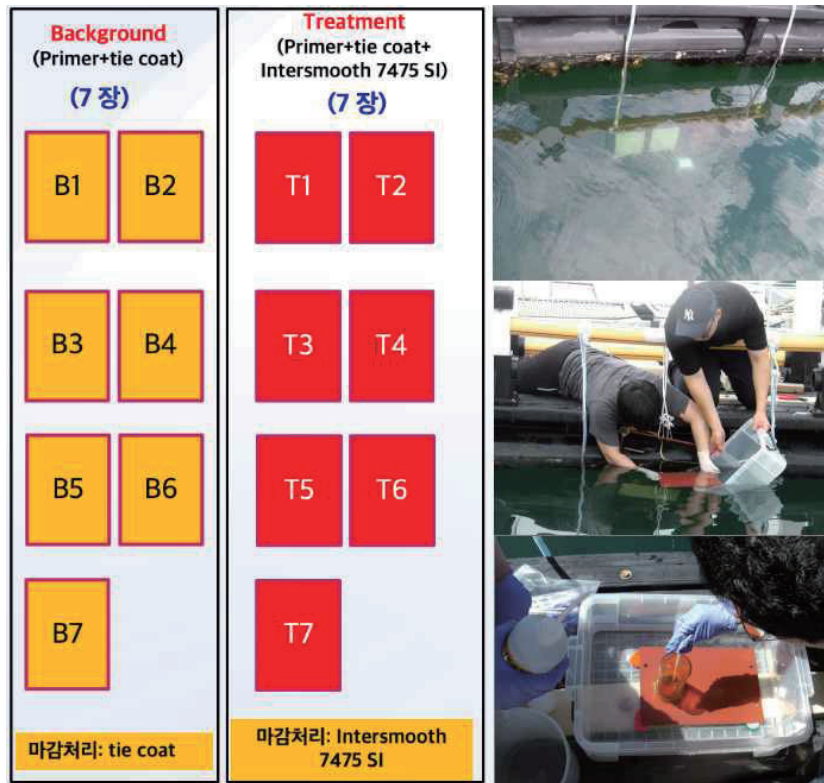


Fig. 3.3.2.12. Weekly ciliate sampling of simulated experiment.

(3) 결과 및 토의

부착 원생생물 모사실험에서 7주간 총 4종(*Aspidisca leptaspis*, *Diophrys appendiculata*, *Euplotes parkei*, *Protogastrostyla pulchra*)의 섬모충 부착이 확인되었다 (Curds and Wu, 1983; Song and Wilbert, 1997; Chen and Song, 2001; Gong et al., 2007; Kwon et al., 2008)(Fig. 3.3.2.10). 특히, 모사판에서 분리한 *E. parkei*는 국내에서 보고 기록이 없는 미기록종으로 본 연구를 통해 장목 2호 선박에서 부착이 확인된 바 있다. 모사판에서 분리한 개체와 장목 2호에서 분리한 개체의 rDNA 염기서열 [SSU-ITS-LSU (D1-D2)]은 99.97% (2876/2877bp) 일치함. 이는 모사실험 수행 장소와

선박 장목2호가 정박하는 해역이 인접함을 고려할 때, *E. parkei* 는 현재 장목만에 정착 중 것으로 추정된다.

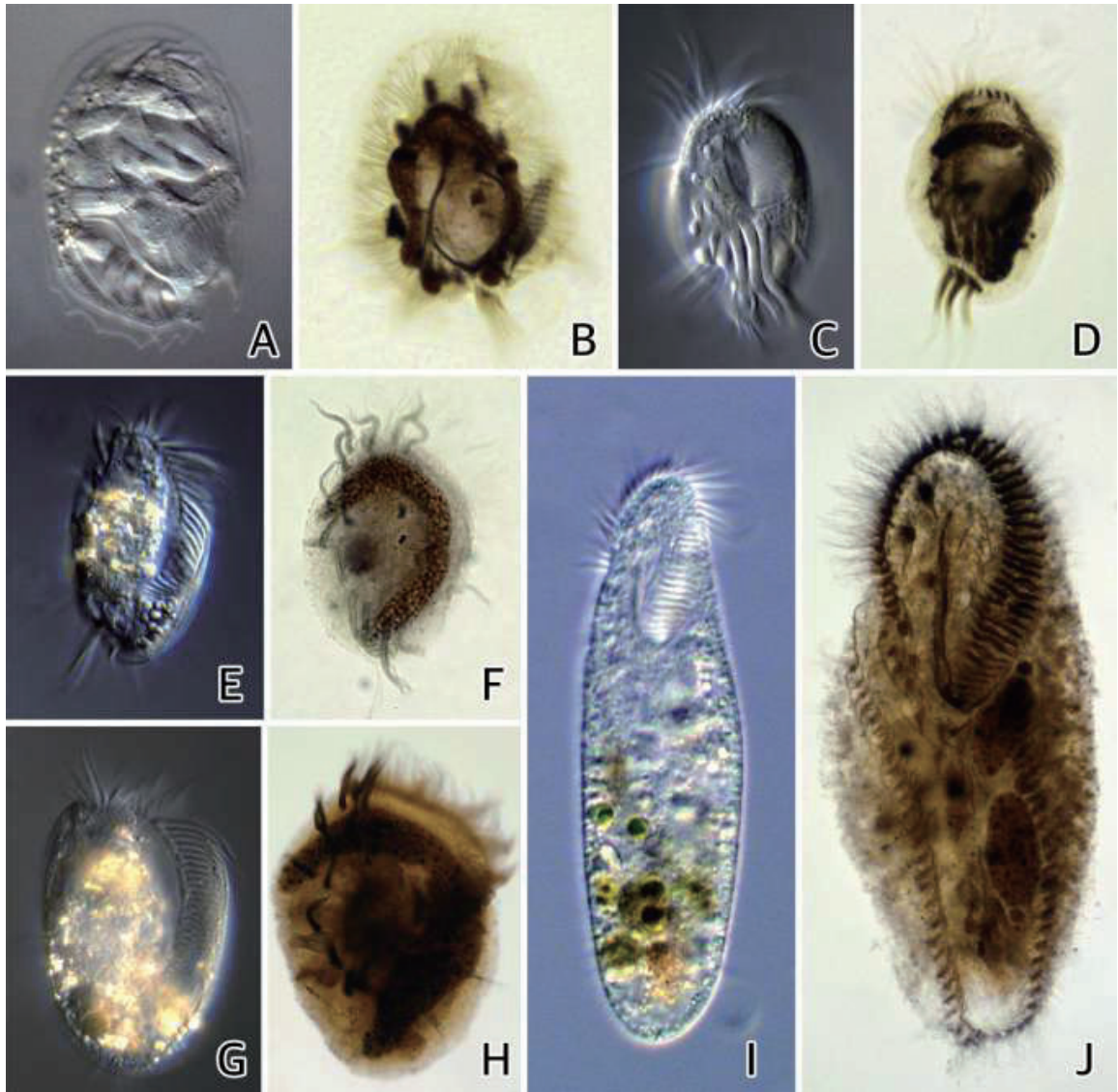


Fig. 3.3.2.13. Photomicrographs of live and protargol-impregnated specimens. A, B. *Aspidisca leptaspis*; C, D. *Diophrys appendiculata*; E-H. *Euplotes parkei* (E, F: small form/G, H: large form); I, J. *Protogastrostyla pulchra*.

방오도료 미처리 background와 Intersmooth 7475 SI 방오도료 처리 treatment 모사판의 해수 노출 초기에는 서로 다른 생물상을 보였다. Treatment의 경우 1- 2주간 섬모충이 미 출현하였으나, 3-4주차에 *E. parkei* small form (Fig. 3.3.2.13E, F)이 지속적으로

출현하였고, Background에서는 1-6주차 까지 *D. appendiculata*가 우점하였다. 4주차 이후 *A. leptaspis* 종이 background에 새로 가입되었고, 7주차에는 *P. pulchra*가 추가 가입하였다. 5주차 이후 background에 출현한 *A. leptaspis*와 *D. appendiculata*가 treatment에도 가입하여 두 모사판간 생물상 차이는 점차 감소하였으며, 세포 크기가 증가하고 형태도 변형된 *E. parkei* large form(Fig. 3.3.2.13G, H)이 등장하였다.

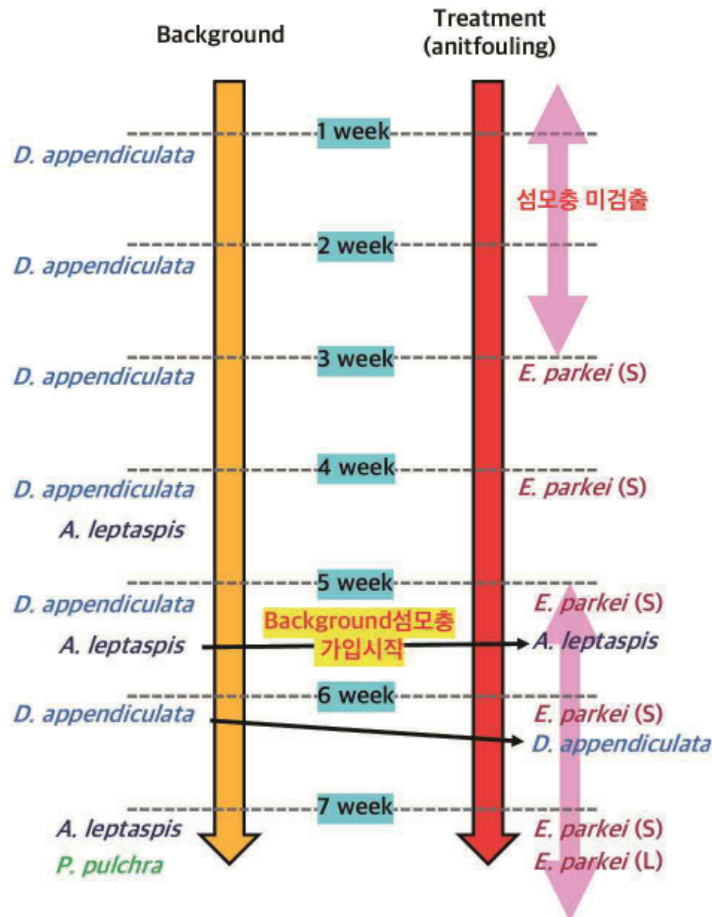


Fig. 3.3.2.14. Tracking the ciliate fauna changes on the simulated plates. (S): small form, (L): large form.

해수 중 노출시간이 증가함에 따라 treatment 표면의 biofilm 층도 점차 두꺼워짐이 관찰되었다. 두꺼워진 biofilm은 수중으로 용출되는 방오도료 독성효력을 감소시켜 background에만 존재하던 종들이 treatment에도 가입한 후 생존이 가능해진 것으로 추정된다. 또한, 독성약화로 인한 먹이 다양성 증가로 *E. parkei*의 영양상태가 호전되어

small form에서 large form으로 세포 변형이 일어났을 것으로 보인다. Treatment와 background 모사판에서 우점적으로 출현한 2종 *E. parkei* 와 *D. appendiculata* 는 방오도료 독성내성 실험을 위해 현재 실험실에서 배양 중이며, 향후 독성 연구에 그 활용을 검토 예정이다(Fig. 3.3.2.12.).

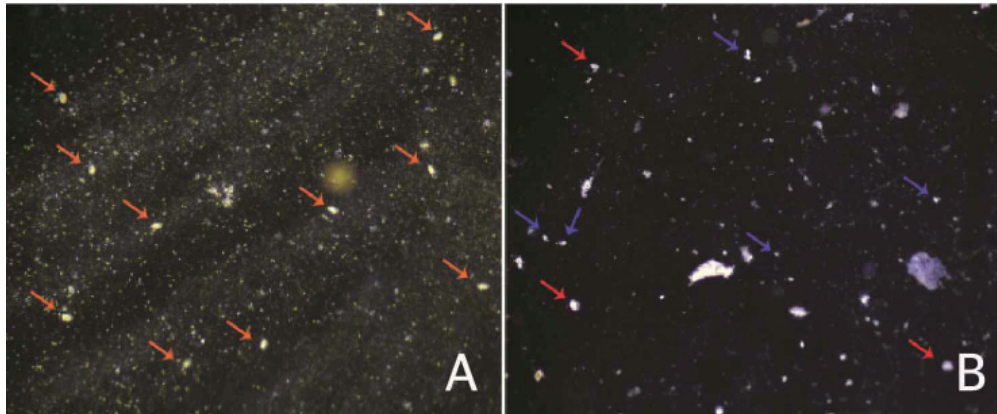


Fig. 3.3.2.15. Cultivation of *Diophrys appendiculata* (orange arrows) and *Euplotes parkei* (small form: blue arrows; large form: red arrows).

다. 선저부착 대형저서동물

(1) 서론

해양생물 중 선박이나 수중구조물에 부착하는 부착생물은 해조류, 무척추동물을 포함하여 해양에서 약 4,000 여종 이상으로 알려져 있으며, 이 중 선박이나 수중구조물에 부착하여 피해를 입히는 종은 일부 몇 종이 가장 많은 영향을 미친다(Yebra et al 2004). 부착생물은 유생 가입시기, 중간 경쟁력, 부착 기질에 따라 다양한 양상을 보인다. 이들 부착생물은 양식장 그물에 부착하여 수류의 흐름과 부력을 방해하고, 유용수산자원생물의 표면에 부착하여 양식대상종의 성장을 방해하고 있다. 또한 국제간 운항하는 선박에서의 외래 생물 유입에 따라 전 세계 해양생태계 구역의 84%가 교란을 받고 있는 것으로 알려지고 있다(GISP 2008). 선박의 부착생물을 제거하기 위해 사용하는 방법에는 선체에 표면에 방오도료를 입히는 것과 수중제거기술이 있다(현 외 2018). 방오도료는 생물부착을 방지하는데 있어서는 효율성이 높지만 환경적인 측면에서 환경오염 및 생물독성 등 해양 생태계에 유해하다는 연구 결과가 있어 최근 친환경 방오도료 등 다양한 연구가 진행되고 있다. 수중제거기술은 수동제거방식과 기계적 제거방식 등이 있으며 제거할 시 떨어져 나간 방오도료 성분의 오염과 제거된 파생물을 수거하는데 어려움이 있는 문제점이

있다.

본 연구는 부착판에 부착한 대형저서동물의 종류, 가입시기 등을 파악하여 위해성 요인을 탐색하고, 부착판에서 생물을 제거 후 실험실에서 부착생물의 생존을 분석을 통해 향후 착생물의 수중제거 위해성 평가를 위한 기초 자료를 수집하고자 한다.

(2) 재료 및 방법

노출시간에 따른 부착저서생물(Secondary biofilm)의 생물 위해성 평가를 하기 위해 한국해양과학기술원 남해연구소 앞바다에서 2018년 5월 8일 크기 20×30 cm의 background (Primer + tie coat)와 treatment (Primer + tie coat + Intersmooth 7475SI) 부착판을 각각 2장(T1, T2, B1, B1)씩 4개의 실험구를 수심 1m에 설치하였다(Fig. 3.3.2.16).

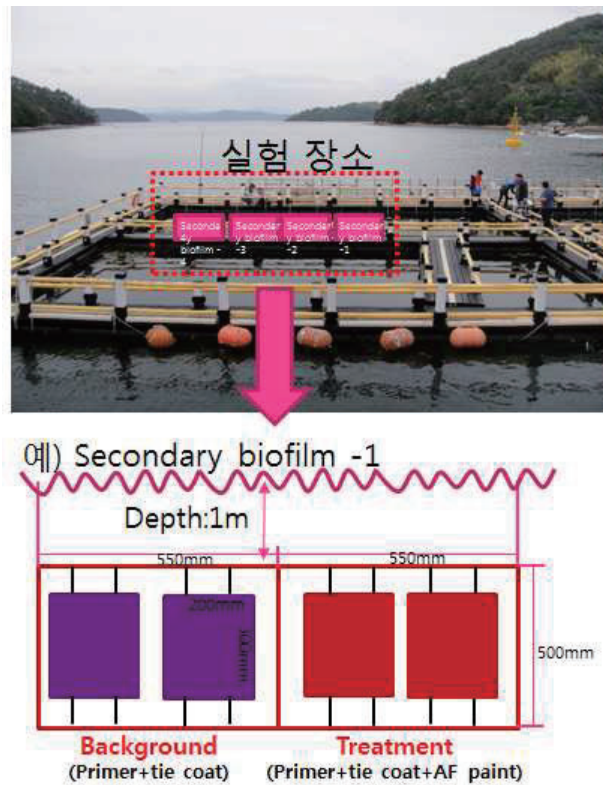


Fig. 3.3.2.16. Sampling sites of the simulated experiment for identification of biological debris.

설치 이후 1개월 간격으로 4개월간 부착판을 수거하여 분석하였으며 부착생물을 제거

하기 전 부착판 종류에 따른 biofouling index(0, 1, 2, 3, 4, 5)를 분석한 후 설치 장소의 환경 분석, 시기에 따른 부착생물 가입률을 분석하였다. 그 후 실험실에서 각 부착판에서 제거된 부착생물의 종류 별 생존율을 분석하였다(Table 3.3.2.1).

Table 3.3.2.1 Biofouling index (by Floerl et al 2005)

Rank	Description	Visual estimate of fouling cover
0	No visible fouling. Hull entirely clean, no biofilm on visible submerged parts of the hull	Nil
1	Slime fouling only. Submerged hull areas partially or entirely covered in biofilm, but absence of any macrofouling	Nil
2	Light fouling. Hull covered in biofilm and 1 - 2 very small patches of macrofouling (only one taxon)	1-5% of visible submerged surfaces
3	Considerable fouling. Presence of biofilm, and macrofouling still patchy but clearly visible and comprised of either one single or several different taxa	Macrofouling clearly visible (>1 species) 6-15% of visible submerged surfaces
4	Extensive fouling. Presence of biofilm and abundant fouling assemblages consisting of more than one taxon	16-40% of visible submerged surfaces
5	Very heavy fouling. Diverse assemblages covering most of visible hull surfaces	41-100% of visible submerged surfaces

(가) 실험1(Secondary biofilm-1)

부착판 설치 후 1개월 이후인 2018년 6월 11일 부착판을 수거하여 부착판 4개에 각각 공기를 공급한 상태로 실험실로 가져온 뒤, 부착판에 붙어있는 부착생물을 분리 후 수조 4개에 각각 배양하였다. 배양 실험은 해수의 교환 없이 공기만 공급하였으며 바닥에 퇴적물 없이 부착생물만 넣어 진행하였다.

(나) 실험2(Secondary biofilm-2)

부착판 설치 후 2개월 이후인 2018년 7월 10일 부착판을 수거하여 부착판 4개에 각각 공기를 공급한 상태로 실험실로 가져온 뒤, 부착판에 붙어있는 부착생물을 분리 후 수조 4개에 각각 배양하였다. 배양 실험은 실험 시작 후 48시간까지 해수의 교환 없이 공기만 공급하였으며 실험 시작 후 48시간이 지난 시점부터 해수교환을 해주었고, 바닥에 퇴적물 없이 부착생물만 넣어 진행하였다.

(다) 실험3(Secondary biofilm-3)

부착판 설치 후 3개월 이후인 2018년 8월 9일 부착판을 수거하여 부착판 4개에 각각 공기를 공급한 상태로 실험실로 가져온 뒤, 부착판에 붙어있는 부착생물을 분리 후 수조

4개에 각각 배양하였다. 배양 실험은 실험 시작 후 해수 교환 및 공기를 공급하였으며 바닥에 퇴적물 없이 부착생물만 넣어 진행하였다.

(라) 실험4(Secondary biofilm-4)

부착판 설치 후 4개월 이후인 2018년 9월 12일 부착판을 수거하여 부착판 4개에 각각 공기를 공급한 상태로 실험실로 가져온 뒤, 부착판에 붙어있는 부착생물을 분리 후 수조 4개에 각각 배양하였다. 배양 실험은 실험 시작 후 해수 교환 및 공기를 공급하였으며 T1 (treatment-1), B1 (background-1) 수조에는 세척 모래를 바닥에 넣어주었고 T2 (treatment-2), B2 (background-2) 수조에는 멸균시킨 펄을 바닥에 넣어주어 진행하였다.

(3) 결과 및 토의

대형부착생물은 background 모사판이 treatment 모사판보다 다양한 생물이 부착되었으며 background 모사판에는 주로 유령멍게(*Ciona intestinalis*) 거친대추멍게(*Asciidiella aspersa*), 큰다발이끼벌레(*Bugula neritina*)가 부착되었으며, treatment 모사판에는 주로 삼각따개비(*Balanus trigonus*)가 부착되었다(Fig. 3.3.2.17).

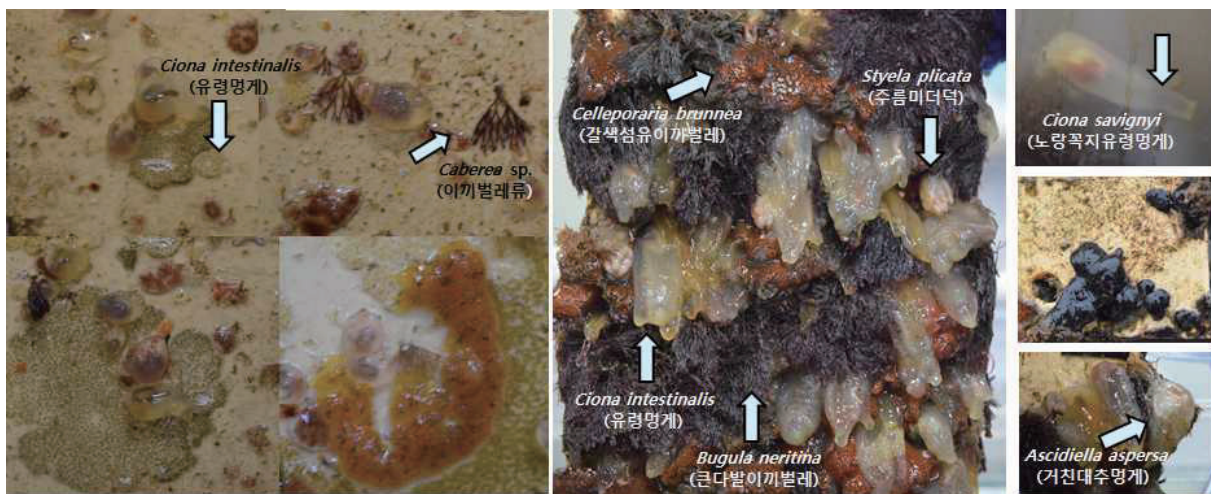


Fig. 3.3.2.17. Fouling macrozoobenthos on the simulated plate.

부착판에 가입되는 대형부착생물의 biofouling index를 분석한 결과, 설치 1개월 후에는 background 모사판에는 3단계, treatment 모사판에는 1단계로 나타났으며, 설치 2개월 후에는 background 모사판에는 5단계, treatment 모사판에는 1단계가 나타났다(Fig. 3.3.2.18). 설치 3개월 후에는 background 모사판에는 5단계, treatment 모사판에도 5단계

가 나타났으며 설치 4개월 후에는 background 모사판에는 4단계, treatment 모사판에는 4단계가 나타났다.









분석시기		background		treatment
2018. 6	3		1	
2018. 7	5		1	
2018. 8	5		5	
2018. 9	4		4	

Fig. 3.3.2.18. Analysis of biofouling index of fouling macrozoobenthos.

(가) 실험1(Secondary biofilm-1)

B1, B2 모사판에는 유령멍게, 딸기멍게, 해면류, 태형동물 등이 부착되어 있었으며 T1 과 T2 모사판에는 생물이 거의 부착되지 않았고 표면에 biofilm만 붙어있었다. 모사실험 결과 B1, B2 모사판에 부착하였던 멍게류 등은 실험 2일째 90%이상 사망하였으며, 최대 실험5일째 까지 생존하였다. 반면에, 해면류와 태형류는 각각 실험 2일째와 3일째에 100%이상 사망하였다(Fig. 3.3.2.19).

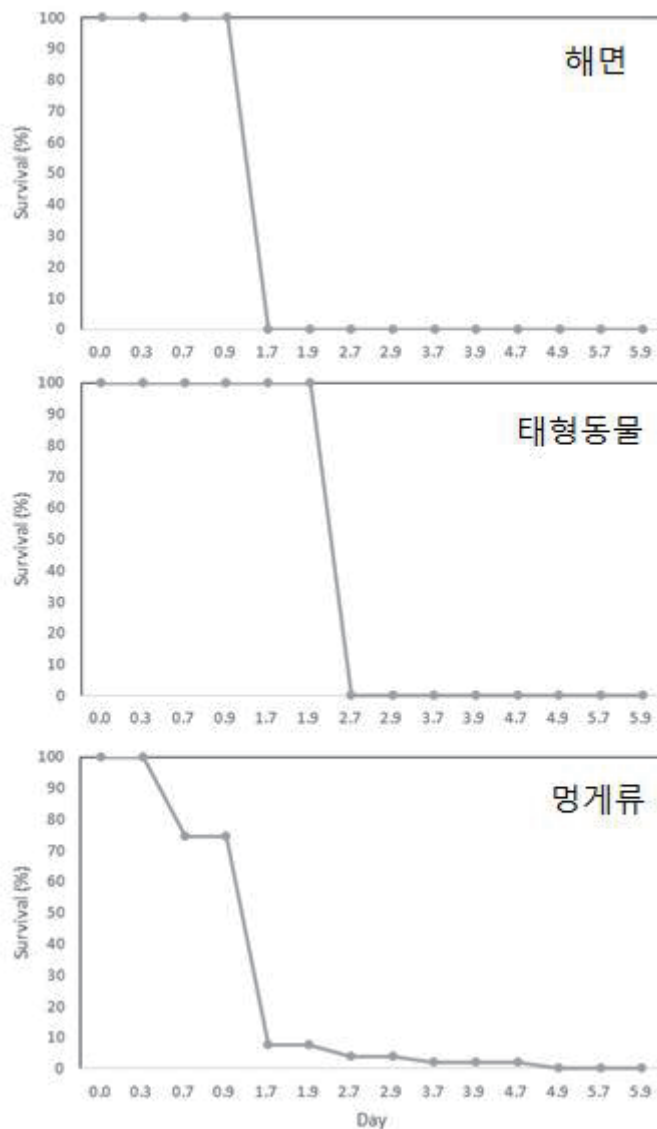


Fig. 3.3.2.19. Survival rate of fouling macrozoobenthos on the secondary biofilm-1

(나) 실험2(Secondary biofilm-2)

B1, B2 모사판에는 부착생물인 유령멍게, 거친대추멍게, 해면류, 대형동물 등과 이동능력을 가진 단각류, 등각류, 다모류 등이 부착되어 있었으며 T1과 T2 모사판에는 생물이 거의 부착되지 않았고 표면에 biofilm만 붙어있었다. 모사실험 결과 B1, B2 모사판에서 이동능력이 있는 단각류 등은 실험 2일째 전부 사망하였으며, 멍게류 등은 실험 3일째 90%이상이 사망하였으며, 최대 실험5일째 까지 생존하였다. 반면에, 해면류는 실험 2일째

100%이상 사망하였으며, 태형동물(이끼벌레)은 실험 41일째까지도 50%가 생존하였다 (Fig. 3.3.2.20).

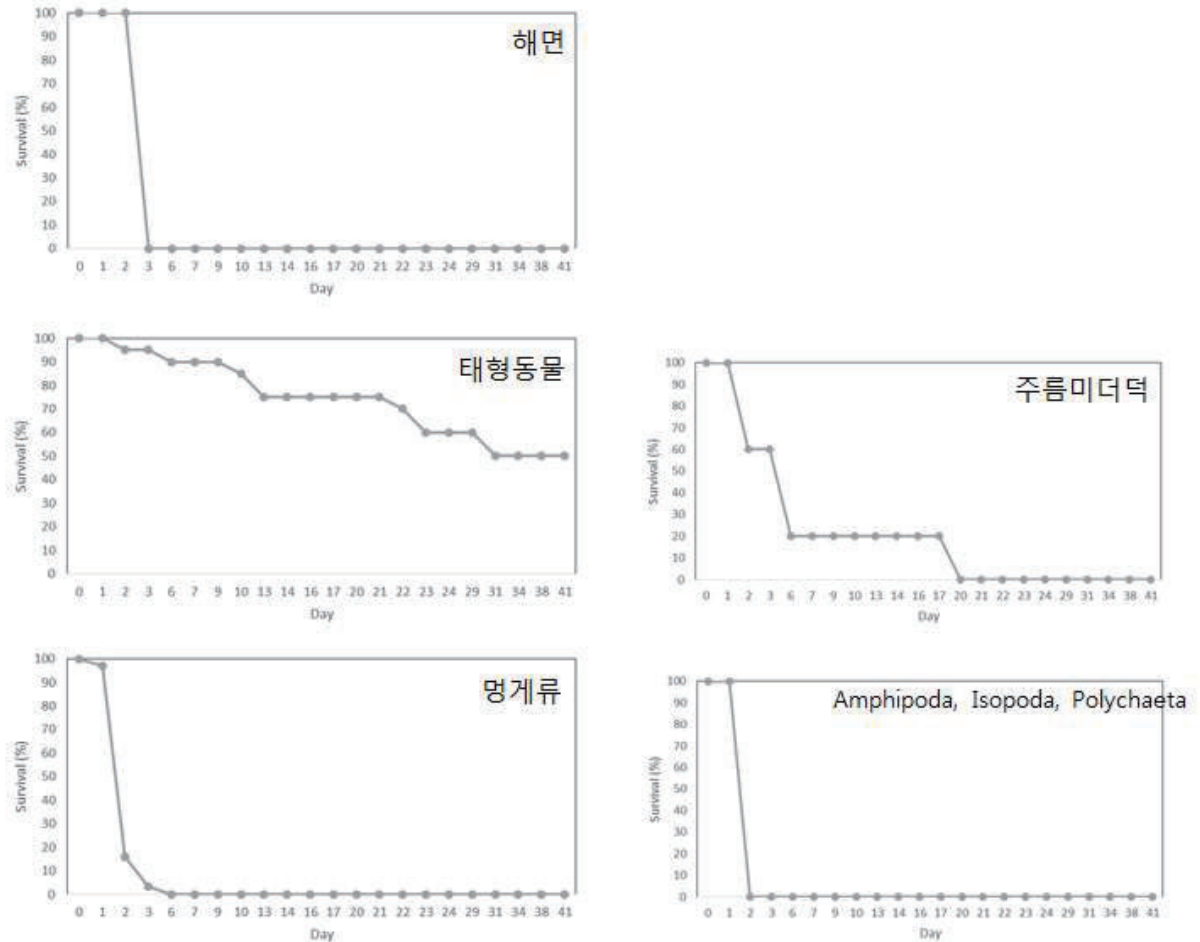


Fig. 3.3.2.20. Survival rate of fouling macrozoobenthos on the secondary biofilm-2.

(다) 실험3(Secondary biofilm-3)

B1, B2 모사판에는 부착생물인 유령멍게, 거친대추멍게, 해면류, 말미잘류, 태형동물 등과 이동능력을 가진 단각류, 등각류, 다모류 등이 부착되어 있었으며 T1과 T2 모사판에는 삼각따개비 등 따개비류가 모사판의 3/4이상 부착되어 있었다. 모사실험 결과 B1, B2 모사판에서 이동능력을 가진 단각류, 다모류 등은 실험 4일째 전부 사망하였으며, 멍게류 등은 실험 30일째 까지도 약 30%이상이 생존하였다. 주름미더덕도 실험 종료일까지 약 33%생존하였으며 해면류는 실험 4일째 100%이상 사망하였고, 태형동물(이끼벌레)은 실험 19일째 모두 사망하였다. T1, T2는 실험1, 2와 달리 부착판에 따개비가 3/4이상 부

착되었으며 실험 1일째 부착생물 분리 과정 중 손상된 개체 50%가 사망하였으며 실험 종료일까지도 2.5% 생존하였다(Fig. 3.3.2.21).

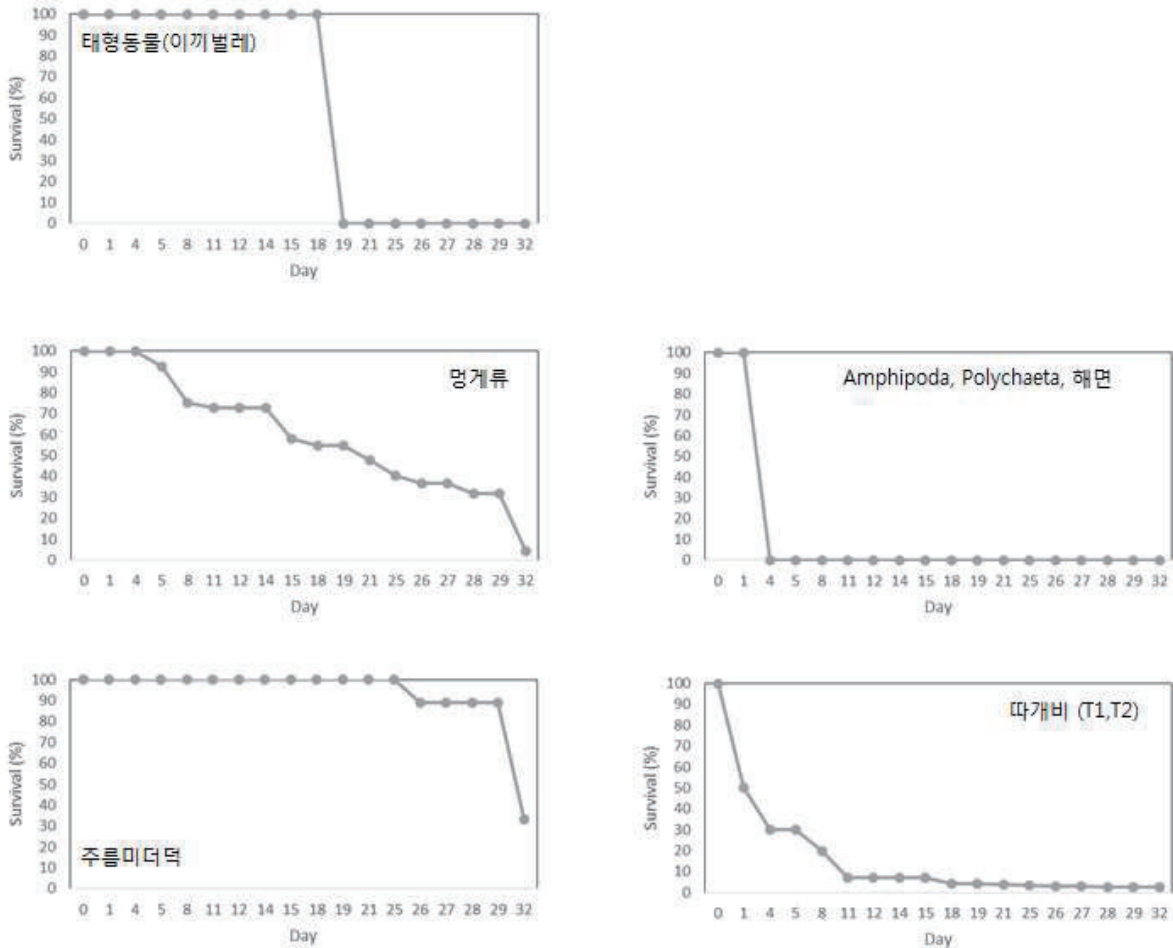


Fig. 3.3.2.21. Survival rate of fouling macrozoobenthos on the secondary biofilm-3.

(라) 실험4(Secondary biofilm-4)

B1, B2 모사판에는 부착생물인 유령멍게, 거친대추멍게, 해면류, 말미잘류, 태형동물 등과 이동능력을 가진 단각류, 등각류, 다모류 등이 부착되어 있었으며 T1과 T2 모사판에는 삼각따개비 등 따개비류와 말미잘류가 모사판의 3/4이상 부착되어 있었다. 실험4의 모사실험은 각각 T1, B1 수조에는 세척모래를 T2, B2 수조에는 멸균한 펄 퇴적물을 넣어진 수조 실험을 진행하였으며 B1, B2 모사판에서 이동능력을 가진 단각류, 다모류 등은 실험 5일째 전부 사망하였으며 멍게류는 실험 16일째 약 33%가 생존하였으며 실험 33일째 모두 사망하였다. 주름미더덕도 실험 33일째 모든 개체가 사망하였으며 퇴적물에

따른 차이는 크게 나타나지 않았다. T1, T2 모사판에 부착한 모든 따개비는 실험 34일째에 사망하였으며, 퇴적물에 따른 차이는 크게 나타나지 않았으나 퇴적물에 파묻힌 개체는 실험 시작 후 빠른 시간 내에 모두 사망하였다. 모든 수조에서 말미잘 번식이 왕성하였으며 개체수가 크게 증가하여 실험 종료시까지 생존하였다(Fig. 3.3.2.22).

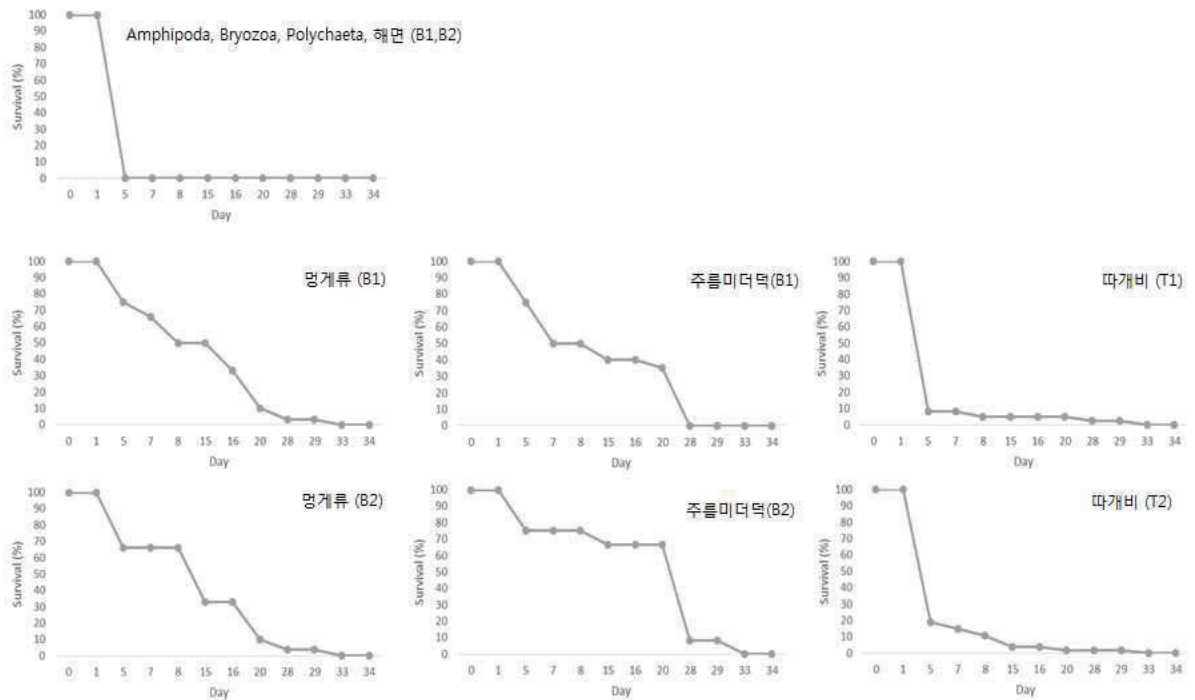


Fig. 3.3.2.22. Survival rate of fouling macrozoobenthos on the secondary biofilm-4.

부착판에 가입되는 대형부착생물을 분석한 결과 background 모사판에는 주로 척삭동물 해초강에 속하는 멍게류, 미더덕류와 태형동물 이끼벌레가 부착하였으며 이동능력이 있는 단각류, 등각류, 다모류 등도 출현하였다. 반면에 treatment 모사판에는 주로 따개비류가 부착되었다. 국내 전 연안에서 발견되는 대표적인 부착생물인 외래유입종 지중해담치(*Mytilus galloprovincialis*)는 두 모사판에서 모두 크게 출현하지 않았는데 지중해담치의 주 가입시기인 4월이 지나 5월 부착판을 설치하였기 때문으로 보여진다. 유령멍게는 5월에 가입하였으며, 6월에는 유령멍게와 이끼벌레류가 가입되었고, 7월에는 주걱따개비(*B. amphitrite*)와 삼각따개비(*B. trigonus*)가, 8월이 되면서 말미잘류가 우점하여 부착하였다.

(4) 결론

부착판에 가입되는 대형부착생물은 유령멍게(*Ciona intestinalis*), 거친대추멍게(*Asciidiella aspersa*), 큰다발이끼벌레(*Bugula neritina*), 갈색섬유이끼벌레(*Celleporaria brunnea*), 노랑꼭지유령멍게(*Ciona savignyi*), 주름미더덕(*Styela plicata*), 삼각따개비(*Balanus trigonus*) 등 이었다. 대부분의 부착생물은 방오도로 처리가 되지 않는 부착판에만 나타났으나, 삼각따개비의 경우, 방오도로 처리 부착판에만 출현하였다. 부착판에 가입되는 부착생물의 부착 정도를 biofouling index를 이용하여 평가한 결과, 실험 후 1개월에 방오도로 미처리 부착판에 3등급, 2개월 이후에는 5등급으로 나타났다. 반면에, 방오도로 처리 부착판의 경우, 실험 후 2개월 동안 생물이 거의 부착하지 않았으나, 3개월 이후부터 햇볕의 영향이 없는 부착판 뒤에 삼각따개비 1종이 급격히 증가하여 5등급을 보였다. 실험실에서 부착판에서 부착생물을 탈락시킨 후, 부착생물의 생존율을 분석한 결과, 해면류와 이동성이 있는 단각류, 다모류 등은 실험 후 5일째 모두 사망하였다. 반면에, 태형동물류, 멍게류, 따개비 등은 탈락 동안 개체의 손상으로 약 50%가 사망하였으나, 손상되지 않는 생물은 30일 이상 생존하였다. 퇴적물의 종류(모래와 펄)에 따른 탈락된 부착생물의 생존율은 차이가 없었다.

제4절 수중제거 핵심 관리요소 선정 및 관리 framework 제시

1. 수중제거 시나리오 탐색

가. 서론

선박의 선체 표면에 홍합, 따개비, 해조류 등 다양한 해양 생물이 부착을 하게 되면, 저항이 증가해서 선속이 줄어들고 연료가 많이 들 뿐만 아니라, 외래 생물 이동 수단이 되어서 해당 해역의 해양 생태계를 교란시키고 생물 종 다양성을 저해한다고 보고되고 있다(Lengyel *et al.*, 2009; Kincaid, 2016). 이에 미국 캘리포니아 주에서는 자체적으로 2017년 10월 1일 이후 캘리포니아 주 항구에 접안하는 총톤수 300톤 이상이 모든 선박은 ‘Marine Invasive Species Program Annual Vessel Reporting Form (New)’을 작성해서 캘리포니아 주에 제출해야 하며(California State Lands Commission, 2017), 2018년 1월 1일 이후 건조되는 총톤수 300톤 이상이 선박은 선박부착생물 관리 계획을 수립·작성을 의무화해서 해당 지역의 해양 생태계 관리·보전을 위해 노력하고 있다.

국제해사기구(IMO)에서는 ‘환경 친화적인 처리’에 근거해서 수중제거 파생물을 환경 위해성이 없는 수준 내에서 제거 및 회수할 수 있는 수중제거기술 사용을 권고 하고 있다. 호주, 뉴질랜드, 미국은 IMO 규정보다 강화한 자체 규정하에 관리하고 있으며, 몇몇 유럽국가들은 자국의 규정이 존재하지 않기에 선박부착생물관리 관련해서 IMO의 규정을 권장하고 있는 실정이다. 하지만 국가 마다 서로 다른 선박부착생물 관리 규정은 선박을 운영하는 선주 및 운행 주체인 선원들에게 혼란을 야기 시킬 수 있을 뿐만 아니라, 규제 규정이 존재하지 않는 국가에서 집중적으로 선체부착생물 제거가 진행되어 해당 지역의 해양 환경을 심각하게 오염 시킬 수도 있을 것으로 예측된다. 또한 아직까지 국제해사기구 및 자국의 규정을 가지고 관리하는 국가가 상대적으로 많지 않기 때문에, 효율적인 선박부착생물 관리를 위해서는 선박평형수 배출수 관련 규제 (IMO G8)처럼 전 세계 대다수의 국가가 참여하는 체계적인 국제법이 필요한 것으로 판단된다. 이에 IMO에서는 선박부착생물 (Hull fouling)을 방지하고 제거를 강제화 하는 국제협약제정을 계획하고 있으며(IMO, 2011), 협약이 제정되면 선박 제조사뿐만 아니라 선주, 항만당국, 선박 청소 및 정비 기술자등 이해관계자들에게도 심대한 영향을 미칠 것으로 예측된다. 따라서 IMO 규제 발효 전 선제적인 대응 차원에서 선박부착생물의 부착방지기술과 부착생물 제거 기술개발이 필요할 것으로 예상된다.

현재까지 개발된 방오도료를 포함한 선박부착생물의 부착방지기술을 사용해도 해양에 존재하는 수천종의 해양 생물은 선박의 일부 혹은 광범위한 면적에 부착이 되고 있으며,

부착된 생물은 도크 및 수중 제거를 통해서 제거되어지고 있는 실정이다. 도크를 이용하는 방법은 시간 및 비용이 많이 발생해서 선박을 운항하는 해운 회사 측에서 선호하지 않기 때문에, 부착생물 관련 규정이 없는 항구에서는 정박 시 수중에서 선박부착생물을 제거하는 방식을 많이 사용하고 있다. 하지만 수중제거를 할 경우에는 도크를 활용 했을 때의 반대적인 입장에 놓이게 돼, 시간 및 비용적인 측면에서 장점을 가지지만 외래종 및 유해물질이 해당 해역 유입등과 같은 환경적인 측면에서는 단점을 가지고 있다. 따라서 선박부착생물관련 IMO 규제가 발효된다면 수중에서 선박부착생물을 제거하기 위해서는 해당 해역의 해양 환경에 큰 영향을 미치지 않고, 국제법 및 항만 규정에 위배가 되지 않아야만 수중 제거를 수행 할 수 있을 것으로 예측이 되며, 이를 위해서는 청소 시 발생하는 유해물질을 수거할 수 있는 시스템 개발이 필요한 실정이다.

현재까지 수중제거관리관련 국내 규정 및 국산화된 기술이 전무하기 때문에, 규제를 수행하는 국가에서 수중제거관련 문서 요구 시 관련 규정 미비로 수중검사항목의 문서를 제출하고 수중제거 작업을 진행하는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 향후 발효될 것으로 예측되는 IMO 선박부착생물 규제에 대한 선제적 대응 차원에서 가장 기초적인 단계인 수중제거기술의 현황 파악 및 선박 부착생물관련 국가별 관리 사례를 문헌조사를 통해서 살펴보고자 하였다.

나. 재료 및 방법

수중제거기술 및 국가별 선박부착생물 국가별 관리 사례는 Floerl *et al.* (2010), Morrissey and Woods (2015), Burrows and Aitken (2015) 등의 보고서 내용을 참고해서 작성하였다.

다. 결과 및 토의

(1) 선박부착생물 수중제거 기술 현황

수중제거기술은 선박부착생물 관리의 핵심적인 부분이며, 사용되어지는 수중 제거 기술의 종류와 부착생물 및 함께 배출되어지는 방오도료 양과 방오도료 내 살생물제(biocide)의 함량에 따라 서로 다른 수준의 해양 환경 위험을 야기 시킬 수 있다. 현재 사용되고 있는 수중제거기술을 보면(Table 3.4.1.1), 모터의 동력 힘을 이용하지 않고 브러쉬 (brush), 끌 등을 이용해서 제거하는 manual removal 방식(Fig. 3.4.1.1), 모터 동력의 힘을 이용하는 mechanical removal 방식(Fig. 3.4.1.2), 기계적 힘을 이용하지만 추가적으로 사멸된 생물을 분리·수거 하지 않아도 되는 surface treatment 방식(Fig. 3.4.1.3), 선체 표면을 감싸서 처리하는 shrouding technologies 방식 등으로 구분되어 진다(Fig. 3.4.1.4).

일반적으로 manual removal, shrouding technologies 등은 낚시배, 요트등과 같은 소형선박에 주로 적용되며, 상선에는 모터의 동력을 이용해서 부착생물을 제거하는 mechanical removal, surface treatment 방식이 주로 사용되고 있다(Table 3.4.1.1). Mechanical removal은 дай버들의 직접 운용하는 방식과 ROV, Cart 등을 원격으로 조정하면서 처리하는 방식으로 구분되어 진다. 현재 전 세계적으로 가장 보편적으로 많이 사용되어지고 있는 수중제거기술은 Cart 등을 이용하는 mechanical removal 방식이지만, 사용되어지는 대다수의 방법이 선저 방오도로에 영향을 줄 뿐만 아니라 제거 되어진 과생물을 수거할 수 있는 추가적인 수거 시스템도 없이 운영되고 있는 실정이다(Morrissey and Woods, 2015). 실례로, 로터리 브러쉬(rotary brush) 방식을 이용해서 전체 선박 표면에 부착된 생물 제거 시 매년 약 1,000,000톤 정도의 살생물제를 함유한 활성물질이 발생이 되며, 이는 작업을 수행하는 잠수사 및 해양환경에 심대한 영향을 미친다고 보고되고 있다. 또한 Cart 및 ROV등과 같은 기계 장비를 사용하기 때문에 선저의 평평한 면에는 적합하지만 굴곡이 있는 프로펠러 부분 및 안쪽 들어가거나 혹은 바깥쪽으로 튀어나온 부분의 청소에도 부적합 한 것으로 확인되고 있다. 따라서 선저에 부착된 생물의 종류와 선저 부착 범위 등을 고려해서 적합한 방법을 선별해서 사용해야 할 것으로 판단되며, 한 가지 방법으로 전체 면적에 대한 청소를 원활하게 수행할 수 없을 경우 2가지 이상이 방법을 적절하게 혼용해서 사용해야 효율적으로 선박부착생물을 제거할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3.4.1.1. Summary of in-water cleaning technologies.

	Manual removal		Mechanical removal					Surface treatment		Shrouding technologies	
Treatment method	Hand-removal with brushes, scrapers and pads	Rotary brush/pad: hand-held devices	Rotary brush/pad: diver-operated brush carts	Contactless mechanical system	High-pressure water jet: hand tools	High-pressure water jet: cart/ROV	Cavitational jet	Hot water/heat/steam	Encapsulation	Encapsulation with biocide	Shrouding with manual or mechanical cleaning
Suitable for vessel	*RL	S	M	M	RL	M	M	M	RL	RL	RL
Target application	Isolated patches of fouling	Continuous sections of hull	Continuous sections of hull	All hull surfaces including niche areas	Hull sections, sea chests	Continuous sections of hull	Continuous sections of hull	Hull sections, sea chests if gratings removed, isolated patches of fouling	All hull surfaces including niche areas	All hull surfaces including niche areas	All hull surfaces including niche areas
Effect on anti-fouling coating	Potential	High potential	High potential	None	Potential	Potential	None	None	None	None	Depends on the tools used by divers
Ability to capture	Generally no.	Generally no.	Generally no.	Generally no.	Generally no.	ROV: Yes, Cart: generally no	Generally no.	Not required	Yes	Yes	Yes

* RL (Recreational and light commercial vessels), S (Small commercial vessels), M (Merchant shipping vessels)



Fig. 3.4.1.1. Photographs of manual brushing (left and middle) and scrubbing (right) by diver.

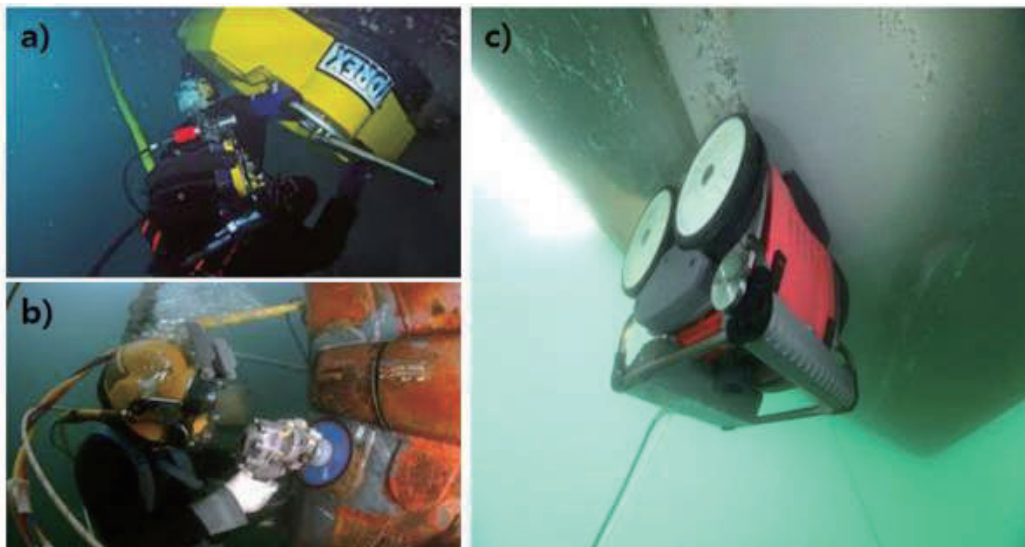


Fig. 3.4.1.2. Photographs of mechanical removal technologies, a) Cart b) grinding c) ROV.

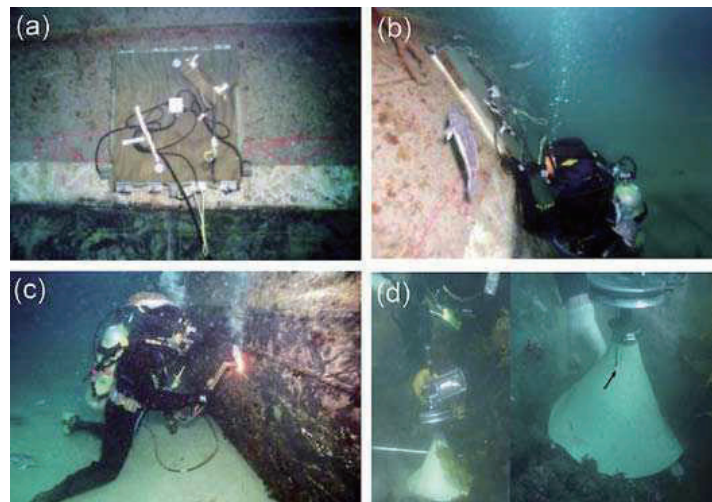


Fig. 3.4.1.3. Photographs of surface treatment, a) and b) Hot water box c) The Petrogen heat torch d) The heat treatment cone.

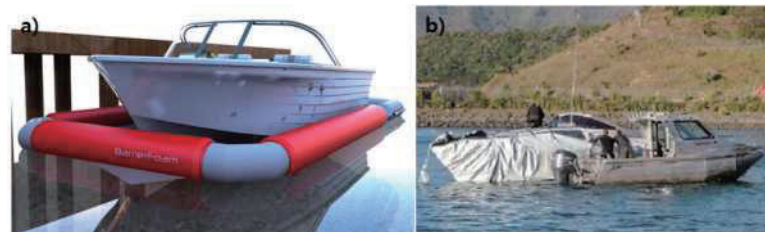


Fig. 3.4.1.4. Photographs of shrouding technologies, a) floating dock b) Encapsulation.

(2) 선박부착생물의 국가별 수중제거 관리 사례

국제해사기구에서는 현재까지 선박부착생물관리 협약을 제정·발효하지 않았지만, ‘환경 친화적인 처리’에 근거해서 수중 제거 파생물을 환경위해성이 없는 수준 내에서 제거 및 회수할 수 있는 수중제거기술 사용을 권고하고 있다. 이에 몇몇 국가에서는 국제해사기구 및 아국의 규정을 근거로 적용 가능한 선체 부착생물 처리 기술 및 방법에 대한 관리를 수행하고 있다(Møller and Stuer-Lauridsen, 2012). 유럽 국가들의 사례를 살펴보면, 조사된 대부분의 유럽 국가들은 선박부착생물 제거에 대한 아국 정부의 특별한 규정이 존재하지 않을 경우 IMO의 선박부착생물 규정에 따라 수중 제거가 가능한 dry-dock을 이용해서 부착생물을 제거를 하는 것으로 확인되었다(Table 3.4.1.2). 유럽 국가들 중에서 호주와 뉴질랜드는 약 20년 전부터 관련 연구 결과, 규정, 가이드라인, 수중제거 장비 개

발 등을 보유하면서 가장 체계적으로 부착생물의 수중제거 관리를 실행하고 있는 국가로 알려져 있다. 이 두 국가는 2014년 5월부터 '선박 위해관리 기준(Craft Risk Management Standard: CRMS)'을 제정하여 4년간 시범 적용 중이며, 2018년 5월부터 강제화 될 예정에 있다(Fig. 3.4.1.5). 또한 2015년에는 부착생물 관련 수중 제거 가이드라인을 완성하였다. 스코틀랜드와 스웨덴은 사전에 지정된 장소의 dry-dock 을 이용해서만 부착생물 제거가 가능하며, 네덜란드 또한 조선소 내 dry-dock 사용을 기본으로 하지만 ROV를 이용한 수중 제거 관련 계획도 언급되고 있는 실정이다. 선체 부착생물 제거 주기도 국가마다 상이한데, 덴마크, 노르웨이, 폴란드는 수리 및 정비를 받을 때 부착생물을 제거 하면 되는 반면에, 스코틀랜드는 선박의 종류, 스웨덴은 선체에 부착된 생물량에 따라서 주기가 다르게 적용되는 것을 확인 할 수 있었다(Table 3.4.1.2).

(3) 요약

효율적인 선체부착생물 관리를 위해서는 선박평형수 배출수 관련 규제 (IMO G8)처럼 전 세계 대다수의 국가가 참여하는 체계적인 국제법이 필요한 것으로 판단되며, 국제법 제정과 같이해서 수중제거기술 개발이 병행되어야 효율적으로 선박부착생물관리가 이루어 질 수 있을 것으로 판단된다. 현재 부착생물 관련 수중제거기술 개발은 수중제거 시 발생하는 파생물을 100% 수집할 수 있는 ROV 형태의 장비로 진행되고 있으며, 이러한 장비 개발에는 많은 시행착오와 함께 상당한 비용이 필요 할 것으로 예측된다. 따라서 수중제거기술 개발에는 국가적 차원의 지원이 절대적으로 필요한 것으로 판단되며, 수중제거기술 개발이 성공리에 진행된다면 고용 창출 효과뿐만 아니라 아국 선박의 타국 출입 시 부착생물로 인한 불이익을 해소 시켜줄 것으로 판단된다.

Table 3.4.1.2. Examples of biofouling management in European countries.

	Hull cleaning locations	Required facilities	Methods employed	Frequency	Guidelines
Denmark	Mainly shipyards. In-water cleaning in ports and anchorage.	Dry-docks, robot/divers in-water.	Sandblasting and water jet streams in ship yards. Under-water ROVs apply brushes or jet streams. One Finnish company	Parallel with repairs or servicing, i.e. variations between 0.5-5 year intervals.	Promotes the IMO guidelines. Harbour permissions given locally.
Finland	-	Divers for in-water cleaning.	offers in-water cleaning by divers using brushes and residue collection.	When needed.	No national guidelines
Germany	Large Dockyards	Dry-docks.	Sand blasting	-	International guidelines.
Netherlands	Dockyards. However, an initiative involving in-water ROVs in one port is mentioned.	Dry-docks with high-pressure jet streams	Removed fouling material is sampled for toxic levels of inorganics, then discarded as waste and thus not returned into the water.	No information available.	Promotes the IMO guidelines.
Norway	Shipyards.	Dry-dock	-	Parallel with repairs or servicing.	Promotes the IMO guidelines. Harbour permissions given locally.
Poland	Repair shipyards	Dry-dock	The mechanical methods like sandblasting, washing under high pressure by means of hydro monitors are used in the shipyards.	Parallel with repairs or servicing.	No national guidelines
Scotland	Dry-docks in e.g. Aberdeen, Edinburgh and Garval Clyde.	Dry-docks.	Power wash with dock hoses to remove fouling and the current paint, then re-coating with new antifoulant. In some cases a couple of layers can be applied, with a primer being used as a base.	Generally every 1-3 year. Ferries typically have yearly turnarounds. Oil and gas vessels every 2-3 year.	Pollution Prevention and Control Regulations. MEPC's biofouling guidelines are recommended.
Sweden	Dry-docks, in port at designated quays or in designated areas. Hull cleaning is performed (at least) in Helsing-borg, Göteborg, and Stockholm	Dry-docks, robots/divers in-water.	In general, divers use brushes and hull cleaning robots use water jet technique. One company uses cleaning robots, and another company uses brushes and residue collection.	When ships are to be repainted every 3-5 years they dry-dock but in-water hull cleaning takes place in between those intervals. Dependent on the grade of fouling, some ship-operators performs hull cleaning every 6th month.	No national guidelines.
Australia/New Zealand	-	Dry-docks, robot/divers in-water	In general, divers use brushes and hull cleaning robots use water jet technique.	6-12 month interval	Australia and New Zealand rule (joint policy document).

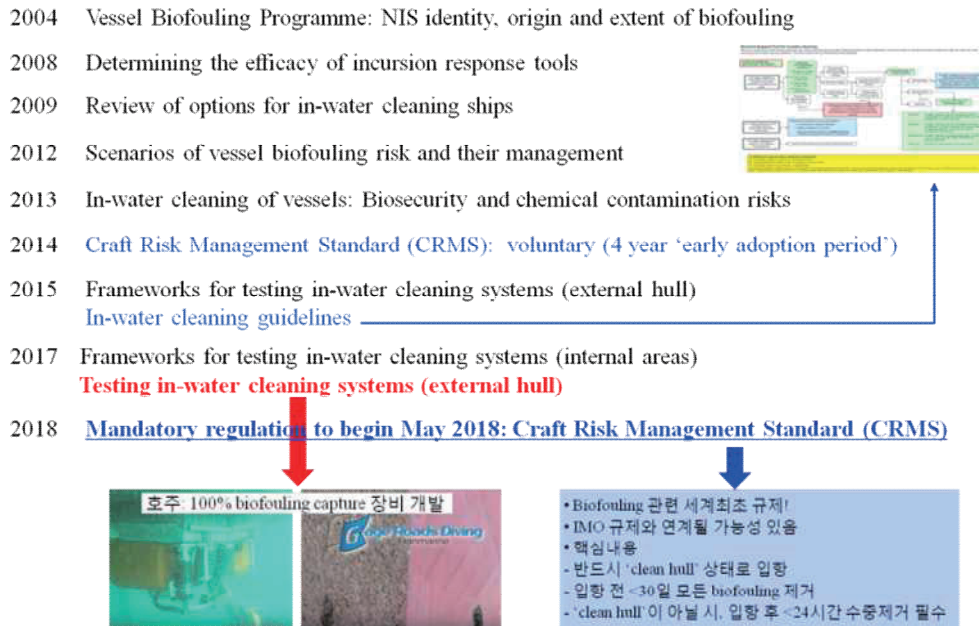


Fig. 3.4.1.5. Timeline for establishment of biofouling regulation in Australia and New Zealand.

2. 관리수준 대응 핵심 요소 도출

가. 서론

선박 선체의 수중 청소는 위협 생물의 확산 및 수생 환경으로의 화학 물질 방출에 대한 위협 요인으로 이미 1990년대에 심각성이 확인되었다. 이에 대응하기 위하여 국제해사기구(IMO)는 수서 외래생물의 이동을 최소화하기 위한 선박 부착생물의 관리 가이드라인을 2011년에 발표하였다(IMO, 2011). 이러한 IMO 가이드라인은 강제화된 규정이 아닌 회원국에 대한 권고 조항으로서, 다음과 같은 형태로 수중 청소의 위험성을 평가하는 것이 적절할 수 있다고 제안하고 있다.

- 선체에서 제거된 생물체의 생물학적 안전 위험(물질의 생존력 및 포획 능력)
- 부착생물의 지리학적인 근원
- 수중 청소 동안의 방오 화합물의 방출과 관련된 독성 영향

호주와 뉴질랜드는 선박 부착생물의 수중제거 위험성에 가장 체계적으로 대응하고 있다. 예로서, 호주 및 뉴질랜드 환경 및 보존 협회(ANZECC)는 방오 및 수중 선체청소 및 유지 관리에 관한 실무 강령(ANZECC, 1997)을 시발점으로, 특히 뉴질랜드는 세계최초의

선박부착생물관련 규제인 ‘선박 위해관리 기준(Craft Risk Management Standard: CRMS)’을 4년간의 시범 적용을 거쳐 2018년 5월에 강제화하였다. CRMS 핵심내용은 아래와 같다.

- 반드시 ‘clean hull’ 상태(주로 slime 상태를 의미)로 입항
- 입항 전 30일 이내에 모든 biofouling 제거 증명
- ‘Clean hull’이 아닐 시, 입항 24시간 이내에 자국의 가이드라인에 의한 수중제거 필수

호주와 뉴질랜드의 CRMS 시행은 선박부착생물의 수중제거 시나리오에 근거한 생물학적 위해성 평가와 구리(copper) 용출물에 근거한 화학적 위해성 평가에 기초하였다 (Morrisey *et al.*, 2013).

따라서 본 연구에서는 선박부착생물 수중 청소의 위해성 평가를 위한 기초 작업으로 수중제거 시나리오 작성을 위한 핵심 관리요소를 선정하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

선박부착생물 수중청소의 위해성 평가를 위한 핵심관리 요소는 선박부착생물의 수중 청소를 가장 체계적으로 관리하고 있는 호주와 뉴질랜드의 문건검토 및 국내 선박 입출항 현황 등을 종합적으로 고려하여 선정하였다(Ingilis *et al.*, 2012; Morrisey *et al.*, 2013).

다. 결과 및 토의

(1) 수중제거 관리요소 및 위해성 평가 검토: 호주 & 뉴질랜드

호주와 뉴질랜드는 선박부착생물의 수중제거 위해성에 영향을 미칠 수 있는 요소를 선정하였고, 각 요소가 반영된 46개의 수중제거 시나리오를 만들어 시나리오별로 부착생물의 수중제거 시 발생하는 파생물의 생물·화학 위해성을 평가하여 최종적으로 수중제거 가능 여부를 판단하였다. 호주와 뉴질랜드가 고려한 수중제거 위해성평가 요소는 아래와 같다.

- 선박의 기원(국제선/국내선)
- 선박의 형태(상업용/레저용)
- 선박의 크기
- 방오도료의 코팅 형태(biocide/biocide-free)
- 부착생물의 형태(slime layer/spot fouling/soft fouling/hard fouling)
- 제거(Cleaning) 방법(부드러운 천/손 제거/브러시)
- 하루에 제거하는 선박의 수

- 수중제거가 이루어지는 항구나 선착장 환경
- 폐기물 포집기술 사용 여부

생물 위해성(biological risk) 평가는 문헌 리뷰를 통한 전문가 집단에 의해서 정성적인 방법으로 산출되었다. 이러한 방법 중 하나로 Infection Modes and Effects Analysis (IMEA)가 선택되었다. IMEA는 정량화된 값을 나타내지는 않지만, 여러 가지 시나리오를 식별하고 이에 대한 정성적인 평가를 통해서 생물 위해성 정도를 평가할 수 있다. IMEA를 이용한 외래종(non-indigenous species)의 전반적인 위해성은 아래와 같은 요인들로 평가되었다.

[수중제거 생물 위해성평가 반영 요소]

- 새로운 종의 도착 확률
- 제거되는 fouling 양
- 제거되는 물질의 구성비
- 포집되지 않은 종의 정착 가능성
- 제거에 의해서 번식체가 자극될 가능성
- 번식체의 잔류 가능성

위의 수중제거 생물 위해성 요소를 반영하여 46개의 수중제거 시나리오에 대한 위험성 순위(Risk Priority Number, RPN)를 결정한다. RPN은 각 시나리오의 개별요소에 점수(1-10점)를 부여하고, 개별요소에서 얻은 전문가 집단의 점수들을 곱하여 계산한다. 그 다음은 선박의 입항 기간을 <48시간, 2-10일, 10-21일, >21일 등으로 구분하여 평가한다. 48시간 이내인 경우는 대부분 수중 제거를 하지 않으며, 21일 이상인 경우는 최대한 빠른 시일 내에 부착생물 제거를 권고한다. 입항기간이 2-21일 사이에 있는 선박에 대해서는 생물 부착수준(level of fouling, LOF)을 결합하여 생물 위해성 관점의 수중제거 수용여부를 결정한다(Fig. 3.4.2.1).

화학 위해성(chemical risk) 평가는 수중제거 과정에서 발생되어 배출되는 Copper(Cu) 농도로 결정하였다. 이미 다른 위해성 평가에서도 Cu의 농도 기준을 가지고 평가하고 있기 때문에 이에 대한 기준을 선박부착생물 수중제거의 대한 화학적인 평가 기준으로 이용하였다. 또한 대부분 도료에 Cu가 포함되어져있기 때문에 충분한 가능성이 있다고 판단하였다. Cu 농도를 이용한 평가는 IMO에서 제안하는 Marine Antifoulant Model to Predict Environmental Concentrations (MAMPEC) 모델을 사용하여 화학 위해

성 관점의 수중제거 수용여부를 평가하였다.

선박부착생물의 수중제거 여부를 최종 결정하는 단계는 Part I과 Part II로 나누어서 평가를 한다. Part I은 선박입항기간이 <48h과 >21d에 대해 평가를 하며, Part II에서는 입항기간이 2-21d 사이의 선박을 대상으로 생물 부착수준을 결합하여 최종 평가를 실시한다. Part I과 Part II에서는 각 시나리오에 대한 ‘생물 위해성 관점의 수중제거 수용여부 결정(biosecurity decision)’ 및 ‘화학 위해성 관점의 수중제거 수용여부 결정(chemical decision)’을 각각 판단한 후, 두 관점을 통합한 최종적인 수중제거 수용여부를 판단하였다.

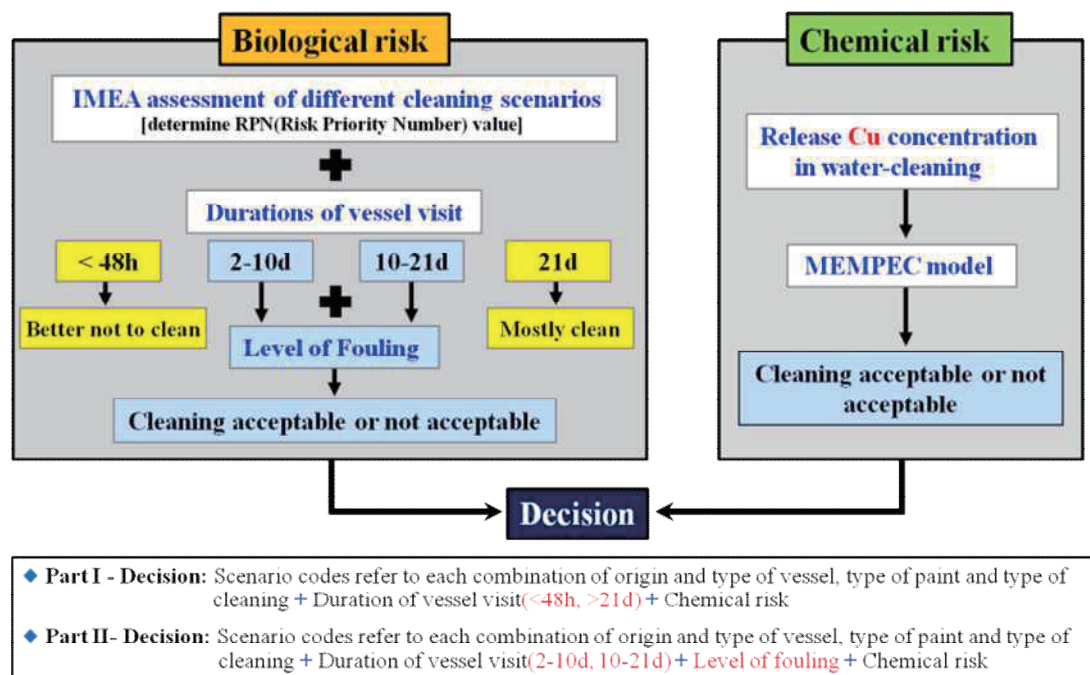


Fig. 3.4.2.1. Risk assessment of in-water cleaning in Australia and New Zealand.

(2) 수중제거 위해성 평가를 위한 핵심요소 선정

선박부착생물 수중제거의 위해성 평가를 위한 요소 선정은 수중제거 시나리오 작성을 위한 필수 항목이며, 수중제거관리 통합프로세스 구축을 위한 첫 단계라 할 수 있다. 선박부착생물의 수중제거를 가장 체계적으로 관리하고 있는 호주와 뉴질랜드의 문건 검토 및 국내 선박 입출항 현황 등을 종합적으로 고려하여, 가장 핵심요소라 판단되는 Biofouling origin, Anti-Fouling Coating (AFC) type, Biofouling type, Cleaning method, Debris capture 적용여부 등을 선정하였다(Fig. 3.4.2.2).

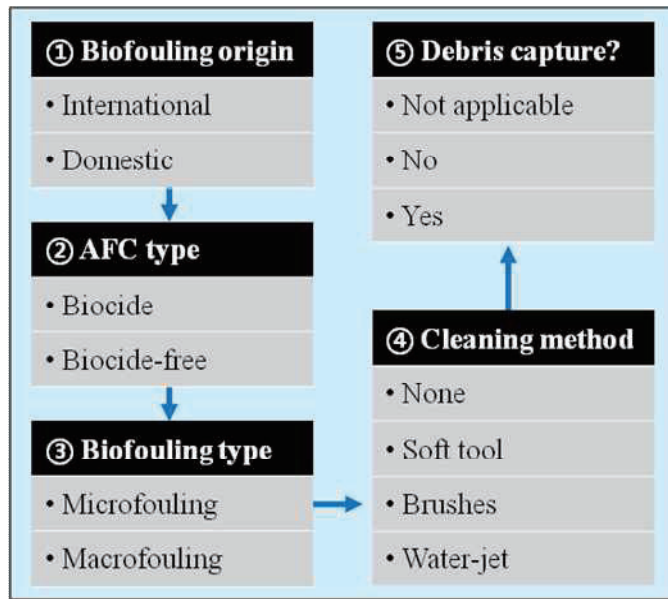


Fig. 3.4.2.2. Key parameters for risk assessment of in-water cleaning.

추가적으로 Cleaning location, Vessel type, Duration of vessel visit, Level of fouling, Cleaning of niche area 등은 문헌 검토, 수중제거 파생물 시험 결과, 전문가 자문 등을 통해 위해성 평가 과정에서 세부 요소로서의 반영여부를 판단할 예정이다.

3. 수중제거관리를 위한 위해성평가 기법 제시

가. 서론

선박의 표면에 홍합, 따개비, 해조류 등 다양한 해양생물이 부착하게 되면 저항이 증가해서 연료가 많이 소비되는 것 외에, 더욱 심각한 문제는 외래 생물 이동 수단이 되어서 해당 해역의 해양 생태계를 교란시키고 생물 종 다양성을 저해하는 것이다(Kincaid, 2016). 국가 간 외래생물 이동을 최소화 하기 위해, 국제해사기구(IMO)에서는 2017년 9월에 발효된 ‘선박평형수관리협약’에 이어 선박부착생물(biofouling)을 방지하고 제거를 강제화 하는 국제협약 제정을 계획하고 있다(IMO, 2011).

현재까지 개발된 방오 도료를 포함한 선박부착생물의 부착방지기술을 사용해도 해양에 존재하는 수천종의 해양 생물은 선박의 일부 혹은 광범위한 면적에 부착이 되고 있으며, 부착된 생물은 대부분 잠수부나 제거 로봇에 의해 수중에서 제거되고 있는 실정이다. 이러한 수중 제거(in-water cleaning)는 시간 및 비용적인 측면에서 장점을 가지지만 외래종 및 유해물질이 해당 해역 유입등과 같은 환경적인 문제를 유발할 수 있다.

호주와 뉴질랜드는 선박부착생물의 수중제거 관리를 가장 체계적으로 수행해 오고 있는 국가이다. 특히, 뉴질랜드는 2018년 5월에 선박부착생물관련 규제인 ‘선박 위해관리 기준 (Craft Risk Management Standard, CRMS)’을 강제화하였다. CRMS의 핵심 내용은 i) 반드시 ‘clean hull’ 상태로 입항 ii) 입항 전 30일 이내에 모든 오손생물 제거 증명 iii) ‘clean hull’ 상태가 아닐 경우, 입항 24시간 이내에 자국의 가이드라인에 의한 수중제거 필수로 되어있다. 뉴질랜드의 선박부착생물관리 규제안은 수중제거 시나리오를 바탕으로 수행한 생물위해성 평가와 화학위해성 평가를 근간으로 제정되었다(Morrissey *et al*, 2013). 우리나라도 선도국 사례를 참조해서 우리나라 주요 항구에 도착하는 선박의 입출항 및 선저부착생물오손의 현황, 수중제거 과생물 실험 결과, 전문가 자문 등을 종합적으로 고려한 위해성 평가를 수행하고 이를 토대로 국내 항만 현실에 맞는 선박부착생물규제 국내법을 제정해야 할 필요성이 제기된다.

본 연구에서는 향후 발효 될 IMO 선박부착생물 국제규제에 대응하기 위한 수중제거 통합관리 프로세스 구축 작업의 일환으로 선박부착생물의 수중제거에 대한 위해성 평가 기법에 대해 알아보았다.

나. 재료 및 방법

선박 선체에 대한 수중제거는 생물 확산 및 수생 환경으로의 화학 물질 방출을 수반하므로, 생물학적 위해성평가와 화학적 위해성평가를 별개로 수행한 후 이들의 평가를 종합하여 수중제거 수용 여부를 판단한다.

생물학적 위해성평가를 위해 수중제거 시 생물학적 위해성에 영향을 미치는 핵심요소를 선정한 후 이를 기반으로 수중제거 시나리오를 작성하였다. 두 번째로, 작성된 수중제거 시나리오에 각각에 대해 IMEA(Infection Modes and Effects Analysis, 감염유형 및 영향분석)를 실시한다. IMEA는 수중제거 과정에서 생물유입을 유발하는 요소를 선정한 후 각각의 수중제거 시나리오에 대해 개별 요소에 점수(1-10점)를 부여하고, 개별요소들의 점수를 곱하여 RPN(Risk Priority Number, 위해성 순위)를 산정한다. RPN이 높을수록 생물학적 위해성이 높음을 의미한다.

화학적 위해성평가는 수중제거 과정에서 발생되어 배출되는 Copper(Cu) 농도로 결정하였다. Cu는 대부분의 선박 도료에 포함되어 있으며, 또한 생물 독성물질로 널리 알려져 있다. Cu 농도를 이용한 평가는 IMO에서 제안하는 MAMPEC(Marine Antifoulant Model to Predict Environmental Concentrations) 모델 프로그램을 사용하여 화학적 위해성 관점의 수중제거 수용여부를 평가하였다. MAMPEC 프로그램을 구동하게 되면 최종적으로 PEC(Predict Environmental Concentration, 예측환경농도) 값이 산정되고, PEC 값에 문

현을 통해 산출한 Toxicity values와 Assessemnt factor를 반영한 PNEC(Predict No Effect Concentration, 예측무영향농도) 값을 산출한다. 최종적으로 PEC/PNEC 비의 값이 1 이상이면 화학적 위해성이 높다고 판단한다.

R/V 이어도호가 부산 감천항에서 water jet 방식으로 수중제거를 한다고 가정 하에 생물적·화학적 위해성평가를 시범 적용하여 선박부착생물의 수중제거 수용 여부를 실시하였다.

다. 결과 및 토의

(1) 핵심요소 반영 수중제거 시나리오 도출 및 이론적 지표적용

선정된 위해성 평가/관리 대응 핵심요소(Biofouling origin, anti-fouling coating type, biofouling type, cleaning method, debris capture)를 기반으로 40 가지의 수중제거 시나리오를 작성하였다(Table 3.4.3.1). 작성된 시나리오는 현재 운항하는 선박의 도료정보, 생물부착형태, 수중제거 방법 등을 포괄적으로 반영하였다. 요소 가운데 cleaning method에서 soft tool은 biofouling type이 macrofouling인 경우에는 현실적으로 적용되는 않는다는 점에서 microfouling에만 포함되었으며, cleaning method에서 water-jet은 이와 반대로 macrofouling인 경우에만 적용되었다. 작성된 수중제거 시나리오를 기반으로 평가지표를 적용한 생물 및 화학 위해성 평가를 실시할 계획이다.

Table 3.4.3.1. In-water cleaning scenarios of ship's hull fouling.

Code	Biofouling origin	Anti-fouling coating type	Biofouling type	Cleaning method	Debris capture
1	International	Biocide	Microfouling	None	Not applicable
2				Soft tool	No
3				Brushes	No
4				Soft tool	Yes
5				Brushes	Yes
6			Macrofouling	None	Not applicable
7				Brushes	No
8				Water-jet	No
9				Brushes	Yes
10				Water-jet	Yes
11		Biocide-free	Microfouling	None	Not applicable
12				Soft tool	No
13				Brushes	No
14				Soft tool	Yes
15				Brushes	Yes
16			Macrofouling	None	Not applicable
17				Brushes	No
18				Water-jet	No
19				Brushes	Yes
20				Water-jet	Yes
21	Domestic	Biocide	Microfouling	None	Not applicable
22				Soft tool	No
23				Brushes	No
24				Soft tool	Yes
25				Brushes	Yes
26			Macrofouling	None	Not applicable
27				Brushes	No
28				Water-jet	No
29				Brushes	Yes
30				Water-jet	Yes
31		Biocide-free	Microfouling	None	Not applicable
32				Soft tool	No
33				Brushes	No
34				Soft tool	Yes
35				Brushes	Yes
36			Macrofouling	None	Not applicable
37				Brushes	No
38				Water-jet	No
39				Brushes	Yes
40				Water-jet	Yes

작성된 수중제거 시나리오에 대해 RPN산정을 위한 IMEA를 실시하였다. IMEA는 주로 산업체에서 설계의 불안정성이나 잠재적 결함을 분석하는 기법인 FMEA(Failure

modes and effects analysis, 고장유형영향분석)에서 유래되었으며, 선박에 의한 생물이동에 의한 영향분석은 2002년 Hayes에 의해 적용되어 일반화 되었다(Hayes, 2012). IMEA를 위해 우선 선박 선체에 대한 수중제거 시 외해생물 유입이나 정착을 유발할 수 있는 6개의 핵심구성인자를 규정하였고, 개별 구성인자에 대해 생물 유입관점의 1점(저위험)에서 10점(고위험) 사이의 위해도 점수 산정을 위한 이론적 지표를 적용하였다(Table 3.4.3.2).

Table 3.4.3.2. IMEA component and scoring criteria for RPN value estimation.

Score	Component 1	Component 2	Component 3	Component 4	Component 5	Component 6
1 (Lowest risk)	Highly unlikely	0-10%	0-10%	Highly unlikely	Highly unlikely	Highly unlikely
2	Unlikely	10-20%	10-20%	Unlikely	Unlikely	Unlikely
3	Slight chance	20-30%	20-30%	Slight chance	Slight chance	Slight chance
4	Small chance	30-40%	30-40%	Small chance	Small chance	Small chance
5	Occasional	40-50%	40-50%	Occasional	Occasional	Occasional
6	Moderate chance	50-60%	50-60%	Moderate chance	Moderate chance	Moderate chance
7	Frequent	60-70%	60-70%	Frequent	Frequent	Frequent
8	Highly likely	70-80%	70-80%	Highly likely	Highly likely	Highly likely
9	Very likely	80-90%	80-90%	Very likely	Very likely	Very likely
10 (Highest risk)	Certain	90-100%	90-100%	Certain	Certain	Certain
Component 1	(Likelihood of arrival): The likelihood that a non-indigenous species novel to the port of arrival is present on the incoming vessel under this scenario relative to other scenarios.					
Component 2	The percentage of material originally present on the hull that remains after cleaning under this scenario relative to other scenarios, Score "no action" option as 10.					
Component 3	The percentage of material removed during cleaning that is NOT captured under this scenario relative to other scenarios, Score "no action" option as 1 and the "no capture" option as 10.					
Component 4	The likelihood that material not captured is viable and capable of establishing in the receiving environment under this scenario relative to other scenarios, Score "no action" option as 1.					
Component 5	The likelihood that cleaning will enhance the release of propagules from the hull under this scenario relative to other scenarios, Score "no action" option as 1. Score same for "capture" and "no-capture" since this material may be released after cleaning tool has passed, and will then not be captured.					
Component 6	The likelihood of infection from residual material on the hull after cleaning (or from an uncleaned hull) under this scenario relative to other scenarios, Score "capture" and "no-capture" options the same, since this sheet relates to material left on the hull.					

(2) 위해성 평가지표 반영 이론적 관리 framework 도출

(가) 수중제거 위해성평가 기법

생물학적 위해성평가를 위해 Table 3.4.3.2의 산정기준 기준에 의해 개별 구성인자에 대한 점수를 구한 후 IMEA 구성인자의 개별점수를 곱하여 40개 code의 수중제거 시나리오에 대한 RPN을 산정하였다. 산정결과, 국제선이며 수중제거 과정에서 발생하는 부산물을 포집하는 시나리오 code에서는 10,000점 이하로 상대적으로 낮은 RPN을 보였다 (Table 3.4.3.3). 수중제거 시나리오에 대한 RPN을 분석하여 >20,000점을 고위험, 10,000-20,000점을 중위험, <10,000점을 저위험 시나리오로 구분하였다. 고위험 및 중위험 시나리오는 외래생물 유입의 가능성이 높아 수중제거가 불가능한 것으로 판단하였다. 반면에 저위험은 수중제거가 가능함을 의미한다. 본 연구는 수중제거 위해성평가의 절차와 기법을 이해하는데 목적이 두어 시범적으로 RPN이 산정되었는데, 향후 적용 가능한 RPN을 위해서는 많은 전문가들에 의해 산정된 평균값을 사용하는 것이 바람직하다.

Table 3.4.3.3. RPN values and biological risk assessment results for individual in-water cleaning scenario.

Code	RPN	Risk	In-water cleaning ?	Code	RPN	Risk	In-water cleaning ?
17	78,400	High		20	3,024	Low	Yes
7	39,200			39	2,940		
12	36,000			29	1,568		
13	33,600			4	1,500		
18	30,240			34	1,350		
37	29,400			10	1,350		
27	15,680	Medium	No	35	1,260		
2	15,000			40	1,134		
32	13,500			5	1,050		
8	12,600			24	600		
33	12,600			16	560		
38	11,340			30	504		
3	10,500	Low	Yes	25	420		
28	8,400			11	400		
19	7,840			6	350		
22	6,000			1	250		
23	4,200			36	210		
9	3,920			31	150		
14	3,600			26	140		
15	3,360			21	100		

화학적 위해성평가를 위한 Cu 농도 기준의 MAMPEC 프로그램을 구동하기 위해서는 아래와 같은 구성요소의 결정인자에 대한 값을 입력해야 한다(Table 3.4.3.4).

MEPMPEC 프로그램의 주요 입력값은 해양수산부의 Port-MIS 자료, 기존 문헌자료, 프로그램 자체 제공 자료를 이용하였으며, Cu의 용출률은 한국해양과학기술원의 R/V 이어도호가 도크 수리시 water jet 방식으로 부착생물을 제거한 시료를 취득하여 직접 분석한 값을 적용하였다.

Table 3.4.3.4. MAMPEC configuration and key determination factors.

MAMPEC component	Main Factors
1. Environment	dimensions of the harbour, hydrodynamics, and properties of the environment
2. Compound	property data determining the chemical fate
3. Emission	
3.1 Service life	length class, Surface area, ships at berth, ships moving, application factor, leaching rate
3.2 Maintenance & Repair	painting period, painting frequency per year, number of ships treated per period, concentration of active ingredient(a.i) in the paint, average hull surface of ship, theoretical coverage of the paint, number of coats applied on the hull, fraction to surface water
3.3 Removal	removal period, number of days for the treatment of one boat, number of ships treated per period, fraction of a.i. of the paint that is to be removed from hull by HPW and abrasion, average hull surface of ship, theoretical coverage of the paint, number of coats applied on the hull, ratio reblasting/ spot blasting, fraction to surface water
4. Run model	PEC estimation

*HPW: High Pressure Water

대상 항만은 시범적으로 부산 감천항을 대상으로 항만의 지리적 및 수질환경 특성, 입항하는 선박정보 등을 입력하였다. 다만, maintenance & repair의 감천항에서 일년에 페인팅되는 선박의 수(Painting frequency per year)에 대한 정보가 부재하여 여러 가지 경우의 수를 입력하여 PEC 및 PEC/PNEC의 변화를 살펴보았다(Fig. 3.4.3.1) 결정인자의 값을 입력한 후 MAMPEC 프로그램을 구동하여 PEC 값을 구한결과, PEC 및 PEC/PNEC 값이 일년에 페인팅되는 선박의 수에 의해 영향을 받는 것으로 확인되었다. 즉, 감천항에서 일년에 25척이상의 선박이 페인팅 되면 PEC/PNEC 값이 1 이상으로 화학적 위해성이 높아지는 것으로 분석되었다.

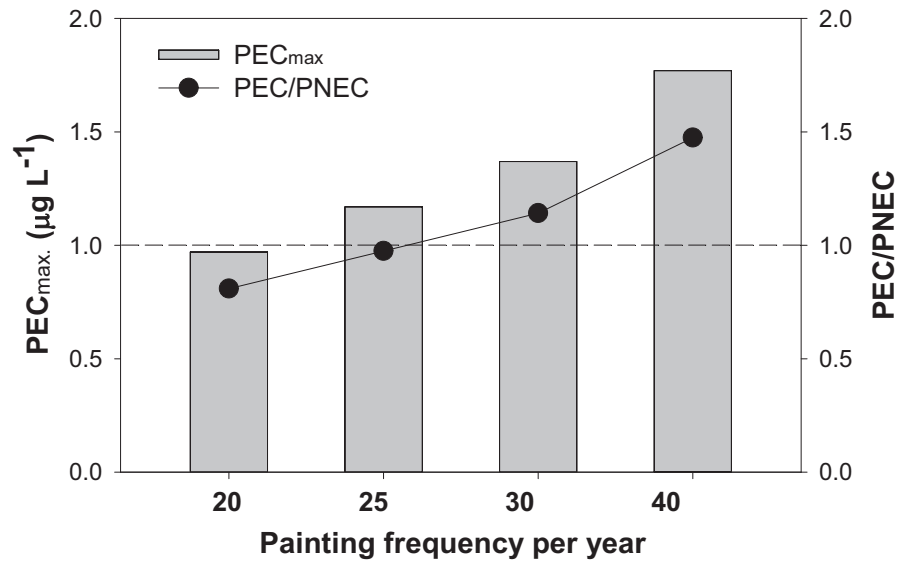


Fig. 3.4.3.1. Variation of PEC and PEC/PNEC values by the number of vessels painted in Busan's Gamcheon Port per year.

(나) 수중제거 위해성평가 시범 적용

한국해양과학기술원의 연구선 R/V 이어도호가 감천항에 수중제거를 수행한다는 가정 하에 위에서 기술된 위해성평가 방법을 적용하여 수중제거 수용여부를 평가하였다. 이어도호의 선박 페인팅 정보, 생물부착형태, 수중제거 형태 등은 선박 문서와 선박수리 시 현장방문 및 시료채취를 통해 확인하였다. 확인결과, 이어도호는 작성된 수중제거 시나리오의 28번 code에 해당되었고(Table 3.4.3.5), code 28번의 RPN은 8,400점으로 외해생물의 유입의 가능성이 적은 저위험에 해당되었다. 즉, 생물학적 위해성 평가에서 이어도호는 감천항에서 수중제거가 가능한 것으로 평가되었다(Table 3.4.3.6).

Table 3.4.3.5. In-water cleaning scenario of R/V EARDO.

Scenario code	Biofouling origin	Anti-fouling coating type	Biofouling type	Cleaning method	Debris capture
28	Domestic	Biocide	Macrofouling	Water-jet	No

이어도호의 보다 명확한 화학적 위해성평가를 위해 감천항의 선박수리 업체 확인결과, 최소한 감천항에서 일년에 최소한 50척 이상의 선박이 페인팅되는 것으로 확인되었다. 즉, MAMPEC 프로그램 구동에 의한 화학적 위해성평가에서 PEC/PNEC 값이 1 이상으

로 이어도호의 수중제거는 수용 불가능한 것으로 평가되었다(Table 3.4.3.6). 최종적인 이어도호의 위해성평가는 화학적 위해성평가의 결과가 반영되어 수중제거가 불가능한 것으로 평가되었다(Table 3.4.3.6).

Table 3.4.3.6. Risk assessment of in-water cleaning of R/V EARDO.

Biosecurity decision	Chemistry decision	Overall decision
Yes (RPN: 8,400, Low risk)	No (PEC/PNEC: >1)	No

(다) 선박부착생물 국내 대응 방안

선체부착생물관리규정 내 생물 및 화학적 위해성 평가는 수중제거기술발달에 많은 영향을 받는다. 따라서 수중 제거 시 선체로부터 분리되는 생물 및 부산물 포집 효율(Capture efficiency)에 따라 선체부착생물관리규정이 변경될 수 있다. 친환경적이면서 선체에 부착된 생물을 제거하는 기술은 크게 ‘친환경적인 수중제거(In-water cleaning and capture)’와 생물오손을 부드러운 재질의 도구를 이용해서 자주 (e.g., 일주일 간격) 제거해 주는 ‘선체표면관리(Grooming)’ 방식으로 구분된다. 친환경적인 수중 제거는 일반적으로 브러쉬 등을 장착해서 수중 제거를 수행하는 ROV 형태의 본체와 파생물을 수거하는 흡입 및 여과 시스템 부분으로 나누어지며, 굴, 담치, 따개비 등 생물오손이 많이 진행된 선박에 주로 적용된다. 현재 다수의 개발업체에서 친환경적인 수중 제거 시스템을 개발 하였으나, 운영비용 및 규제 조항 등을 포함한 여러 가지 문제로 인해 널리 활용되고 있지 않다. 하지만 몇몇 개발업체 제품은 곧 선체부착생물제거기술 시장에 진출할 것으로 예상된다. 선체표면관리 기술은 방오도료의 훼손이 발생하지 않는 수준에서 생물막(Biofilm) 형태의 부착 생물을 짧은 기간 내에 정기적으로 제거하는 방식으로, 현재 다양한 제거 방법과 기간에 대해서 연구가 진행중에 있다. Hearin et al. (2015)의 연구에 따르면 1주 혹은 2주 간격으로 선체표면관리를 수행할 경우 방오도료의 손상을 최소화하면서 생물의 부착을 효과적으로 방지할 수 있고, 선체 청소를 위한 건조식 도크 비용 및 선박의 연료 절감 효과도 기대할 수 있다고 보고 하였다. 하지만 선체표면관리 작업도 수중 제거처럼 ROV와 같은 장비가 이용되기 때문에, 너무 잦은 선체표면관리는 비용적인 측면에서 건조식 도크 방법을 상회할 수 있다. 따라서 적합한 관리 규정을 세운 후 작업을 수행해야 할 것으로 판단된다.

현재 우리나라는 각 항만 현실에 맞는 선체부착생물관리규정이 없다. 이로 인해 무분별한 선체부착생물 수중제거과정에 노출된 우리나라 주요 항만 환경은 활성물질 오염과 외래

중 유입 위협성에 그대로 노출되어 있어서, 해당 해양 생태계 뿐만 아니라 국민의 건강에도 심대한 영향을 미치고 있다. 그래서 본 연구에서는 국내 주요항으로 입항하는 선박의 선체 부착생물을 효과적으로 관리하기 위해서 친환경적인 수중제거기술개발 및 국가적 차원에서 선체부착생물 관련 국내법 제정 필요성에 대해서 강조하였다. 또한 뉴질랜드 사례를 참고해서 감천항에서 가상의 생물 및 화학적 위해성 시범 평가도 수행하였다. 하지만 언급된 내용 중 상당 부분이 선도국에서 수행한 연구결과 소개에 머물렀고, 국내 연구진에 의해 도출된 연구 결과 소개내용은 없었다. 이는 국내에서 수행한 선체부착생물 수중제거기술 및 선체부착생물 수중 제거에 따른 항만 환경 위해성 평가 연구가 전무해서 소개할 내용이 없었기 때문이다. 많은 사람들이 오염된 해양 환경을 복원 하는 것보다 오염원을 사전에 확인해서 차단하는 게 가장 효과적이고 경제적인 방법이라는 사실을 알고 있다. 따라서 선체부착생물 수중제거 시 발생하는 파생물로부터 항만 환경을 보호하기 위해서는 최우선적으로 파생물이 환경 노출을 차단하는 기술개발과 강제력을 가지는 국내법이 제정되어야 한다. 수중 제거 시 파생물이 환경 노출을 차단하는 기술 개발 연구로는 친환경적인 방오도료 개발 및 포집효율이 우수한 수중 제거 기술 개발 등이 있다. 세계 방오도료 시장은 2018년 기준 60억달러/년 이상이고, 매년 연평균 8% 이상으로 성장하고 있지만, 일부 메이저 해외 기업들이 대부분을 차지하는 과점 구조여서 국내 기업들이 생존 및 성장하기 위해서는 기술 경쟁력 강화가 무엇보다 요구된다. 선체부착생물 수중제거기술 관련해서는 아직 시장이 개방되기 전이며, 현재까지 개발된 대다수의 장비도 파생물을 포집할 수 없는 형태이다. 국내에서는 2014년에 삼성중공업에서 브러쉬를 이용해서 선체표면에 부착된 유기물을 제거 및 흡입 한 후 장비 내부에 있는 필터를 통해 유기물을 회수할 수 있는 친환경적인 수중청소로봇을 개발하였다(<http://blog.samsungshi.com/489>). 위의 사례와 같이 국내 기업들이 경쟁력 있는 기술을 개발할 수 있다면 충분히 세계 시장 선도국 위치를 선점할 수 있을 것으로 판단된다. 우리나라 항만 환경을 보호하기 위한 다른 하나의 방법은 선체부착생물 수중제거 관련 강제력을 가진 국내법 제정이다. 현재까지 국내에서 수행된 대부분의 연구는 우리나라 항만 환경에 대해서 해양 생물의 분포 및 해양생태계 변화 양상을 모니터링결과가 대부분이다. 이들 자료를 통해서 외래종 유입 사실은 확인이 가능하나, 외래종 유입 경로, 확산 및 생태계 교란 정도를 확인하기는 어렵다. 따라서 항만 환경 내 외래종의 분포와 생태계 교란 양상 그리고 활성물질의 종류 및 농도 등을 포함하는 종합적인 모니터링 연구가 필요하다. 또한 위해성 평가 부분에서도 국제 규격 시험종 외 해당 해역의 부유 및 저서 대표종을 활용해서 수중 제거 시 발생하는 파생물과의 독성실험을 다양한 규모(실험실, 메조코즘, 현장등)에서 진행한 후 위해성의 수준을 파악 할 필요가 있다. 이러한 연구를 통해서 얻어지는 결과들은 항만 내 위해성을 파악하고 정책을 입안하고 시행하는 과정에서 가장 기초적이고

중요한 정보를 제공할 것이다.

현재 우리나라는 선제적 대응을 통해 선박평형수처리장치 시장 선도국의 위치를 유지하고 있으며, 이로 인해 많은 경제적 효과를 창출하였고 또한 기대가 되고 있는 실정이다. 하지만 선체부착생물 관련해서는 아직까지 개발된 친환경적인 수중 제거 장비 및 환경 위해성 평가 기준이 없다. 선체부착생물관리협약이 발효가 되면, 부착생물 분야도 선박평형수와 마찬가지로 선체부착생물방지기술 개발, 수중제거기술개발, 부착생물 모니터링 및 관리·감독 분야 등 새로운 산업이 창출될 것이다. 한 예로 향후 개발될 수중제거기술은 대부분 원격으로 개발되는 장비에 항만 환경 위해성을 낮추기 위해 파생물 및 방오도료를 수거할 수 있는 시스템을 갖출 것이며, 또한 선체표면관리법령이 강화되면 선체표면을 관리하기 위해 해당 장비를 보다 빈번하게 사용되기 때문에 보다 큰 시장이 열릴 수도 있다. 이에 우리나라는 수중제거기술 및 항만 환경 위해성 평가기술 개발을 위한 노력을 기울여야 할 것이다.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 목표 달성도

총 연구기간 내 년차별 연구내용 대비 달성율(%)						
년차	연구성과		진척율		성취도 (정상, 부진)	특기사항 (우수성 및 부진사유)
			년차별 계획대비	총연구 기간대비		
1차 년도 (2017)	1. AFS 활성물질 분석기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ AFS 활성물질 분석기술 개발을 위한 대상활성물질 선정 및 mass 라이브러리 구축(유기성 살생물제 대상) 완료 ○ 부착파생물 시료에 적용하기 위한 추출 및 정제기법 개발과 액체크로마토그래피 분리 조건 정립연구 수행 ○ 다양한 선종의 선체에서 수거된 고압세척배출수, 침전물, 부착해조류 등 파생물과 주변 환경시료 내 금속 활성물질 잔존특성 파악 ○ 배출 파생물의 입자 크기별 분포 특성 파악 	100	50	정상	
	2. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE 영향평가 및 지표 발굴	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선박부착파생물(이에도호 고압세척배출수)에 대한 넘치/곤쟁이/단각류 발생독성평가 및 지표발굴 완료 ○ 국내 주상용 AFS(Irgarol 1051, Diuron, Sea-Nine 211) 처리 활성물질에 대한 넘치/곤쟁이/단각류 발생독성평가 및 지표발굴 완료 ○ 선체 부산물이나 방오물질이 가지는 독성에 대한 실험실 수준의 평가를 수행한 결과 각 방오물질의 독성을 성계 수정률로 평가하고, 반수영향 농도(EC₅₀)를 산정 ○ 선박부착 파생물 및 국내 주상용 AFS에 대한 	100	20	정상	

		동물플랑크톤의 독성영향 평가				
3. 선박부착기인 생물 및 위해성 요인 탐색 및 판별시도		<ul style="list-style-type: none"> ○ 선저부착미세규조류의 출현 밀도 및 주요 출현종 판별 ○ 선박방오도료에 따른 선저부착미세규조류 내성 ○ 차세대염기서열 분석을 통한 선저부착생물 군집 분석 	100	100	정상	선저부착 특이적 미세규조류 탐색
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 선저부착섬모충 6종 판별 및 잠정적 외래종 2종 발굴 	100	50	정상	잠정적 외래종 2종류 발굴
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 조사 선박의 hull fouling & niche areas의 출현 부착 대형저서동물 확인 및 현존량 분석 ○ 선체 구역별 출현생물의 확인 및 탐색 ○ 부착생물의 위해성 정도 및 여부 파악 ○ 부착생물의 외래 유입성과 고유성 파악 ○ 부착생물 이동가능성 파악 ○ 부착생물의 미기록종 여부 판단 	100	50	정상	
4. 수중제거 핵심 관리요소 선정		<ul style="list-style-type: none"> ○ 선박부착생물의 수중제거 기술 현황 및 국가별 관리사례 파악 ○ 호주와 뉴질랜드의 수중제거 시나리오 탐색 및 분석 ○ 선박부착생물의 위해성평가를 위한 핵심 관리요소 선정 	100	100	정상	

총 연구기간 내 년차별 연구내용 대비 달성율(%)						
년차	연구성과	진척율		성취도 (정상, 부진)	특기사항 (우수성 및 부진사유)	
		년차별 계획대비	총연구 기간대비			
2차 년도 (2018)	1. AFS 활성물질 분석기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ AFS 활성물질 분석표준화를 위한 공정시험기준안 도출 및 시험지침서 작성 완료 ○ 활성물질 관련 국내외 환경 기준 검토 및 독성데이터베이스 기반 위해농도 수준 산출 ○ 글로벌급 선박 부착파생물 채취 및 파생물 내 활성물질 잔존특성과 입자 크기별 분포특성 파악 ○ 수중제거 모사시험 실시 및 파생물 내 활성물질 잔존특성 분석 완료 	100	100	정상	
	2. 선박부착 파생물의 LAB- SCALE 영향평가 및 지표 발굴	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선박부착파생물(이사부호 고압세척파생물)에 대한 넘치/곤쟁이/단각류 발생독성평가 및 지표발굴 완료 ○ 수중제거파생물 모이실험 완료 및 넘치발생독성 평가 ○ 국내 주상용 AFS 처리(ZnPT, CuPT) 활성물질에 대한 넘치/곤쟁이/요각류 발생독성평가 및 지표발굴 완료 ○ 선체 부산 파생물과 AFS 처리 활성물질에 대한 동근성계의 독성영향 평가 및 각각의 반수영향 농도(EC₅₀)를 산정 ○ AFS 모사판 파생물 유출수에 대한 동물플랑크톤의 독성영향 평가 	100	100	정상	
	3. 선박부착기인 생물 및 위해성 요인 탐색 및 판별시도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 이사부호 선저 선저부착미세규조류의 주요 출현종 판별, 방오도로 내성, 염기서열기반 군집분석 ○ 선박도로 모사판에서 <i>in-situ</i> 부착 미세조류 부착양상 판별 ○ 선박도로 모사판에서 탈리된 부착미세조류 해양생태계 성장 여부 파악 	100	100	정상	부착 모사판 생사판별기법 개발시도
	○ Treatment / background에서 총 4종 판별, 모사판 우점 2종 배양 중	100	100	정상	모사판출현 2종 배양	

		<ul style="list-style-type: none"> ○ 모사실험을 통한 부착생물의 위해성 정도 및 여부 파악 ○ 모사실험을 통한 과생물의 생존율 분석 	100	100	정상	
	4. 수중제거 핵심 관리요소 선정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 핵심관리요소가 반영된 수중제거 시나리오 작성 ○ 수중제거시나리오의 RPN 산정 및 MAMPEC 모델 구동을 통한 위해성평가 절차 확립 ○ 확립된 수중제거 위해성평가 절차의 시범적용 평가 	100	100	정상	

제 2 절 대외 기여도

1. AFS 활성물질 분석기술 개발

- 부착과생물 내 활성물질의 잔존특성 규명을 통해, 선체부착과생물 무단 배출에 대한 환경위해성 인식 제고 및 국내 해양환경 보호에 기여
- 부착과생물 제거 과정 중 배출되는 활성물질에 대한 위해성 인식 제고를 통해, 방오도료 생산기업의 친환경 페인트 개발 유도에 기여

2. 선박부착 과생물의 LAB-SCALE영향평가, 지표발굴, 모사실험 및 AFS활성물질 영향 평가

2-1. 넙치, 곤쟁이, 단각류

- 본 연구의 결과는 부착과생물의 위해성 규명에 활용될 수 있을 뿐 아니라 향후 국내 및 국제사회 오염관리 및 규제에 활용 및 대응할 수 있는 과학적 평가기법과 기초자료로 제시될 수 있음.

2-2. 둥근성게

- 둥근성게의 배아를 이용한 실험으로 선박부착 과생물 및 AFS 처리 활성물질의 독성영향을 규명하여 국내연안 관리를 위한 기초자료 제시함.

2-3. 동물플랑크톤

- 선박부착생물 수중제거 과생물의 위해성평가를 위한 과학적 근거자료를 제시함

3. 선박부착기인 생물 및 위해성 요인 탐색 및 판별시도

3-1. 미세규조류

- 선박방오도료 기질 특이적 선저부착미세규조인 신종 *Navicula muscatinei* 분류 확보 및 이속화 계기마련.
- 선박부착생물 생사판별 기법 개발 및 NGS 분석 기법 도입

3-2. 원생생물

- 국내 최초로 선박 부착 섬모충 생물상 탐색하여 발굴한 6종류 분류학적 정보 타 기관과 공유
- 선박에 의한 외래종 국내연안 유입 및 정착 가능성 확인
- 방오도료처리에 따른 원생생물(섬모충류)의 오손 발달과정 추적

3-3. 대형부착저서생물

- 선박 부착생물의 종 분석을 통해 국내 연안 부착생물의 유입 현황 파악 가능
- 국내 양식장 부착생물의 유입 확인 및 방지 방안 제시
- Antifouling을 위한 근거 자료 제시
- 주요 부착생물의 생리, 생태 파악을 통한 생물학적 제거방안 마련을 위한 자료 제시
- 파생물 모사실험을 통한 부착생물의 수중 제거 방안 제시

4. 수중제거 핵심 관리요소 선정 및 관리 framework 제시

- 선박부착생물의 위해성평가를 통한 수중제거관리체계 확립을 위한 기초자료를 제시함
- 미래 국제해사기구 선박부착생물 국제협약에 대응한 수중제거 위해성평가의 기초기술을 확보함.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. AFS 처리활성물질 분석기술 개발

- 본 과제를 통해 정립된 AFS 활성물질 분석기술을 활용하여 수중제거 등 다양한 형태로 배출되는 부착파생물 내 활성물질 잔존특성 및 입자분포 특성을 규명하고, 잔존특성과 입자분포특성을 결합한 거동 및 유출평가를 바탕으로 부착생물 제거기술의 위해성 평가 수행에 활용
- 정립된 활성물질 분석기술의 표준화 및 기술확산을 통해 국내 유관 분석기관의 분석능력을 향상시키고 국가 분석능력 향상을 통한 AFS 관련 국가 정책 및 제안에 대한 국제적 신인도 향상
- 수중제거에 따른 활성물질 배출 특성 및 위해성 평가 결과를 바탕으로 수중제거 기술 관련 IMO 미래 규제에 선제적 대응 또는 관련 국제규제 설정 선도
- 선박부착파생물의 물리·화학적 특성을 바탕으로 향후 수중제거 배출물 최적처리 기술 등 미래 국제규제에 상응하는 친환경적 수중제거관리 및 수중제거장비 기술개발 유도 및 지원

2. 선박부착 파생물의 LAB-SCALE영향평가, 지표발굴, 모사실험 및 AFS활성물질 영향 평가

2-1. 넙치, 곤쟁이, 단각류

- 본 연구에서는 연안의 현장생물 및 국제규격의 시험종의 독성민감도에 따른 선박부착파생물의 독성영향을 평가하여 연안에 유입되는 부착파생물의 위해성을 규명.
- 따라서 향후 국내 연안 해역, 항구 뿐 아니라 국제사회 오염관리 및 규제에 활용 및 대응할 수 있는 과학적 평가기법과 기초자료 마련.

2-2. 둥근성게

- 선박 부착 파생물이 해양생물에 미치는 잠재적인 독성을 평가하고 예측할 생물 검정시험법을 제시하고, 생태계 위해성을 평가할 자료생산에 활용할 수 있음.

2-3. 동물플랑크톤

- 선박부착생물 수중제거 파생물에 대한 생물위해성평가를 위한 과학적 근거자료 제공

3. 선박부착기인 생물 및 위해성 요인 탐색 및 판별시도

3-1. 미세규조류

- 최 우점한 선저부착미세규조 *Navicula muscatinei*의 방오도로 기질 특이성 연구를 통한 방오도로 지표생물 개발

3-2. 원생생물

- 미기록종 2종을 한국해양생물정보시스템(KoMBIS)에 등록하여 섬모충생물상 다양성 정보 업데이트 예정
- 미기록종 2종의 슬라이드 표본 및 유전자 정보 해양생물자원관 기증 예정
- 모사실험에서 발굴한 *Diophrys appendiculata*와 *Euplotes parkei* 2종 배양주를 방오도로 독성실험 중으로 활용 예정

3-3. 대형부착저서생물

- 대양연구 조사선은 국내 출항 이후 대양에서 조사 후 바로 국내로 입항하여 국외의 다른 여러 항구에 정박하지 않기 때문에 부착생물의 양이나 종류가 적을 수 있음. 따라서 외국 항구에 입항하는 대형 무역선을 조사할 필요가 있음
- 연구선을 비롯한 다양한 연안지역 (서해, 남해, 동해)의 선박을 조사할 필요성이 있음
- 부착생물의 정량화로 선박의 추진력과 프로펠러 회전속도 저하 원인을 파악
- 부착생물 제거 시 파생물질의 유출방지를 위한 법적 근거자료 제시
- 부착생물 제거 시 파생물질의 환경오염 기준 제시 근거 마련
- 국내의 선박 부착생물에 대한 정량적 조사는 전무한 상태로 본 조사의 자료는 매우 가치가 있으며, 또한 조사 선박의 운항지역이 각각 다르기 때문에 매우 유용한 자료가 될 것으로 생각된다. 향후 본 연구의 부착생물 조사를 통해 부착생물의 위해성과 위해성 판별 시도를 통해 국내의 부착생물 위해성 판별 기준을 제시 할 수 있을 것으로 판단됨

4. 수중제거 핵심 관리요소 선정 및 관리 framework 제시

- 선박부착생물의 수중제거 위해성 평가를 위해 선정된 핵심관리요소를 기반으로 수중제거 시나리오를 작성하였고, 생물학적 위해성평가를 위해 각각의 시나리오에 따른 위험우선순위(RPN) 스코어를 산정함. 또한 MAMPEC 모델을 통해 PEC 값을 산출하고 설정한 PNEC 값을 통해 화학적 위해도(PEC/PNEC) 값을 산정하였음. 이를 토대로 선박 체류기간, 부착강도 등에 대한 추가 연구가 진행된다면 국내 현실에 부합하는 수중제거관리를 위한 위해성평가 framework 구축이 가능할 것으로 판단됨

제 6 장 참고문헌

- 국립공원연구원. 2012. 허베이스피리트호 유류유출 사고에 따른 생태계 영향 장기 모니터링, 926.
- 김대진. 2016. 한국 주요 항만 해수 및 해저퇴적물 중의 대체 방오제의 분포 특성. 전남대학교 환경해양학과 석사학위논문.
- 류태권. 2008. 북쪽말뚝성게 배아의 니켈 독성평가를 위한 새로운 바이오마커 개발. 인제대학교, 박사학위 논문.
- 박건호, 이규태, 이정성, 한경남. 2006. 방오도료(TBT, Sea-Nine, Cu-pyrithione과 Zn-pyrithione)의 조피볼락 *Sebastes schlegeli*과 단각류 *Monocorophium acherusicum*에 대한 급성독성 비교. 한국해양환경공학회지, 9, 21-28.
- 유준만. 1998. 중금속이 성게의 배아형성에 미치는 영향에 대한 연구. 한국환경위생학회지, 24, 6-10.
- 이지선, 전중균, 권오남, 박흥기, 심원준, 2004, TBTC와 Sea-Nine 211의 rotifer (*Brachionus rotundiformis*) 생존에 미치는 독성. 수산관련학회 공동학술대회 발표요지집. 268-269.
- 황운기, 류향미, 유준, 강한승. 2013. 말뚝성게 (*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 수정 및 배아 발생률에 대한 비소와 크롬의 독성영향. 한국환경생물학회지, 31, 69-77.
- 황운기, 허승, 박종수, 강한승. 2012. 납과 아연이 말뚝성게 (*Hemicentrotus pulcherrimus*) 수정 및 배아 발생이 미치는 영향. 환경생물학회지, 30, 128-135.
- Alzieu, C. 2000. Environmental impact of TBT: the french experience. Sci. Total Environ. 258, 99 - 102. Guardiola, F.A., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2012. Risks of using antifouling biocides in aquaculture. Int. J. Mol. Sci., 13, 1541 - 1560.
- ANZECC 1997. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council. Code of Practice for Antifouling and In-water Hull Cleaning and Maintenance.
- Arakawa, H., T. Hirawake and T. Morinaga. 1998. Distribution of turbidity in the ROPME sea area. In: Offshore Environment of the ROPME Sea Area after the Water-Related Oil Spil., 49-63 p.
- Bao, V.W.W., K.M.Y. Leung, J.-W. Qiu, M.H.W. Lam. 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and

- cosmopolitan marine species. *Mar. Poll. Bull.*, 62, 1147-1151.
- Bao, V.W.W., Koutsaftis, A., Leung, K.M.Y. 2008. Temperature-dependent Toxicities of Chlorothalonil and Copper Pyrithione to the Marine Copepod '*Tigriopus Japonicus*' and Dinoflagellate '*Pyrocystis Lunula*'. *Aust. J. Ecotox.*, 14(2/3), 45-54.
- Bao, V.W.W., Leung, K.M.Y., Qiu, J.W., Lam, M.H.W. 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Mar. Pollut. Bull.*, 62, 1147-1151.
- Bao, V.W.W., Yeung, J.W.Y., Leung, K.M.Y. 2012. Acute and Sub-lethal Toxicities of Two Common Pyrithione Antifouling Biocides to the Marine Amphipod *Elasmopus rapax*. *Toxicol. Environ. Health Sci.*, 4(3), 194-202.
- 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.
- Bellas, J., 2006. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Sci. Total Environ.*, 367, 573-585.
- Boxall, A., S. Comber, A. Conrad, J. Howcroft and N. Zaman. 2000. Inputs, monitoring and fate modelling of antifouling biocides in UK estuaries. *Mar. Poll. Bull.*, 40, 898-905.
- Braithwaite, R.A. and R.L. 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.
- Burrows R, Aitken V. 2015. Guidance Statement: In-water treatment of vessels in Western Australian waters. Government of Western Australia Department of Fisheries.
- California State Lands Commission. 2017. Marine Invasive Species Program Annual Vessel Reporting Form.
- Carr, R.S. E.R. Long, H.L. Windom, D.C. Chapman, G. Thursby, G. Sloane, and D.A. Wolfe. 1996. Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 1218-1231.
- Chen, Z. and W. Song. 2001. Phylogenetic positions of *Uronychia transfuga* and

- Diophrys appendiculata* (Euplotida, Hypotrichia, Ciliophora) within hypotrichous ciliates inferred from the small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Eur. J. Protistol.*, 37, 291–301.
- Cima, F., Bragadin, M., Ballarin, L., 2008. Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes I. Sea-Nine 211 TM and chlorothalonil. *Aquat. Toxicol.*, 86, 299–312.
- Dinnel, P.A., J.M. Link, and Q.J. Stober. 1987. Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16, 23–32.
- Federal Environmental Agency of Germany, Feasibility Study for New Eco-labels according to DIN EN ISO 14024 for Select Product Groups, Sub-project 3: biocide-free Antifouling (AF) Products, December 2004.
- Floerl O, Peacock L, Seaward K, Inglis G. 2010. Review of biosecurity and contaminant risks associated with in-water cleaning. The National Institute of Water and Atmospheric Research Limited, Commonwealth of Australia, 136.
- Gong, J., Kim S.-J., Kim S.Y., Min G.-S., Roberts D.M. 2007. Taxonomic redescriptions of two ciliates, *Protogastrostyla pulchra* n. g., n. comb. and *Hemigastrostyla enigmatica* (ciliophora: spirotrichea, stichotrichia), with phylogenetic analyses based on 18S and 28S rRNA gene sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 54, 468–478.
- Guardiola, F.A., A. Cuesta, J. Meseguer and M.A. Esteban. 2012. Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 1541 - 1560.
- Hayes K. 2002. Identifying hazards in complex ecological systems. Part 2: infestation modes and effects analysis for biological invasions, *Biological Invasions*, 4, 251–261.
- Hearin, J., K. Z. Hunsucker, G. Swain, A. Stephens, H. Gardner, K. Lieberman and M. Harper. 2015. Analysis of long-term mechanical grooming on large-scale test panels coated with an antifouling and a fouling-release coating, *Biofouling*, 31(8), 625–638.
- Huang da, W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.*, 4, 44–57.
- Huang, J., Z. Chen, W. Song and H. Berger. 2014. Three-gene based phylogeny of

the Urostyloidea (Protista, Ciliophora, Hypotricha), with notes on classification of some core taxa. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 70, 337 - 347.

IMO(International Maritime Organization). 2011. Guidelines for the control and management of ships' biofouling to minimize the transfer of invasive aquatic species, MEPC Resolution 207(62) MEPC., 62, 24-Add-1.

Inglis G, Floerl O, Woods C. 2012. Scenarios of Vessel Biofouling Risk and their Management. MAF Research Project RFP11832, Ministry of Agriculture and Forestry, Wellington, pp. 41-93.

International Maritime Organization(IMO). 2011. Guidelines for the control and management of ships' biofouling to minimize the transfer of invasive aquatic species. MEPC Resolution 207(62) MEPC., 62, 24-Add-1.

Ito, M., Mochida, K., Ito, K., Onduka, T., Fujii, K. 2013. Induction of apoptosis in testis of the marine teleost mummichog *Fundulus heteroclitus* after in vivo exposure to the antifouling biocide 4,5-dichloro-2-n-octyl-3(2H)-isothiazolone (Sea-Nine 211). *Chemosphere* 90, 1053 - 1060.

Jacobson, A.H. and G.L. Willingham. 2000. Sea-Nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. *Sci. Total Environ.* 258, 103 - 110.

Jung, J.-H. and G.-S. Min. 2009. New record of two species in *Stichotrichous* ciliates (Ciliophora: Stichotrichia) from Korea. *Korean. J. Syst. Zool.* 25, 227-236.

Jung, S.M., Bae, J.S., Kang, S.G., Son, J.S., Jeon, J.H., Lee, H.J., Jeon, J.Y., Sidharthan, M., Ryu, S.H., Shin, H.W., 2017. Acute toxicity of organic antifouling biocides to phytoplankton *Nitzschia pungens* and zooplankton *Artemia* larvae. *Mar. Pollut. Bull.*, 124(2), 811-818.

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.*, 14(4), R36.

Kim, K.-S., J.-H. Jung and G.-S. Min. 2013. New record of two marine ciliates (Ciliophora: Spirotrichea) in South Korea. *Anim. Syst. Evol. Divers.*, 29, 144 - 151.

Kim, N. S., Shim, W. J., Yim, U. H., Hong, S. H., Ha, S. Y., Han, G. M., and Shin, K.-H. 2014. Assessment of TBT and organic booster biocide contamination in seawater from coastal areas of South Korea. *Mar. Pollut. Bull.*, 78(1 - 2),

- 201-208.
- Kim, S.-J. and G.-S. Min. 2011. First record of three *Uronychia* species (Ciliophora: Spirotrichea: Euplotida) from Korea. Korean. J. Syst. Zool., 27, 25-33.
- Kim, S.-J. and G.-S. Min. 2015. Taxonomic redescription of *Loxophyllum perihoplophorum* and *L. rostratum* (Ciliophora: Pleurostomatida) from Korea. Anim. Syst. Evol. Divers. ,31, 277-283.
- Kincaid E.S. 2016. Biofouling management in the Pacific Northwest and predation on native versus non-native Ascidiaceans, Portland State University.
- Kobayashi N. and H, Okamura. 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. Mar. Poll. Bull., 44, 748 - 751.
- Kobayashi, N., Okamura, H., 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. Mar. Pollut. Bull., 44(8), 748-751.
- Konstantinou, I.K. and T.A. Albanis. 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. Environ. Int., 30, 235 - 248.
- Koutsaftis, A., Aoyama, I., 2006. The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. Environ. Toxicol., 21(4), 432-439.
- Kwon, C.B., Lee E.S., M.K. Shin. 2008. Redescription of *Diophrys appendiculata* and *D. scutum* (Ciliophora: Spirotrichea: Uronychiidae) New to Korea. Kor. J. Syst. Zool., 24, 191-197.
- Lee, C.-H. 2000. A study on the sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) bioassay: Sperm and fertilized egg tests. Ph.D. Thesis. Seoul National University, 185 pp.
- Lee, S. E., Won, H. S., Lee, Y.-W., and Lee, D. S. 2010. Study on the New Antifouling Compounds in Korean Coasts. B. Environ. Contam. Tox., 85(5), 538-543.
- Lee, S., Won. H. and Lee, D. 2008. Determination of new antifouling agents in seacoasts in Korea by gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Sci. Technol., 21(6), 459-473.
- Lengyel, N., J.S. Collie and P.C. Valentine. 2009. The invasive colonial ascidian *Didemnum vexillum* on Georges Bank-Ecological effects and genetic identification. Aquatic Invasions 4, 143-152.

- Lewis, J. 2001. Ship Anti-Foulants - Tributyltin and Substitutes. National Shipping Industry Conference, March 2001.
- Matsuike, K., Y. Nakamura and M. Haga. 1979. Aerial and submarine spectral solar energy distribution and optical characteristics of the waters in the Bearing Sea during the summer. *La Mer*, 17, 1-10.
- Matsuike, K. and T. Morinaga. 1977. Beam attenuation and particle-size distribution in the Kuroshio area. *La Mer*, 15, 82-93.
- Meador, J.P., B.D. Ross, P.A. Dinnel, and S.J. 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.
- 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.
- Mochida, K., Ito, K., Harino, H., Kakuno, A., Fujii, K., 2006. Acute toxicity of pyrithione antifouling biocides and joint toxicity with copper to red sea bream (*Pagrus major*) and toy shrimp (*Heptacarpus futilirostris*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 25(11), 3058-3064.
- Mochida, K., Ito, K., Harino, H., Tanaka, H., Onduka, T., Kakuno, A., Fujii, K., 2009. Inhibition of acetylcholinesterase by metabolites of copper pyrithione (CuPT) and its possible involvement in vertebral deformity of a CuPT-exposed marine teleostean fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 149(4), 624-630.
- Møller JK, Stuer-Lauridsen F. 2012. Non-indigenous species from hull fouling in Danish marine water.
- Morrisey D, Gadd J, Page M, Floerl O, Woods C, Lewis JA, Bell A, Georgiades E. 2013. In-Water Cleaning of Vessels: Biosecurity and Chemical Contamination Risks, New Zealand Government Ministry for Primary Industries, MPI Technical Paper No: 2013/11.
- Morrisey D, Woods C. 2015. In-water cleaning technologies: Review of information. MPI Technical Paper No:2015/38. Ministry for Primary industries in New Zealand.
- Nacci, D.E., 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. In: Aquatic Toxicology Testing Manual. USEPA Environmental Res Lab, Narragansett, 34 pp.
- Naufal, A.S.H. and M.H.N. Hassan. 2016. The Impact of Implementing the International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems in Ships (AFS Convention) on the Marine Environment. *Journal of Shipping and Ocean Engineering*, 6, 57-63.
- Onduka, T., K. Mochida, H. Harino, K. Ito, A. Kakuno and K. Fujii. 2010. Toxicity of Metal Pyrithione Photodegradation Products to Marine Organisms with Indirect Evidence for Their Presence in Seawater. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 991-997.
- Petroni, G., F. Dini, F. Verni and G. Rosati. 2002. A Molecular Approach to the Tangled Intrageneric Relationships Underlying Phylogeny in *Euplotes* (Ciliophora, Spirotrichea). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 22, 118-30.
- Rial D., J. Santos-Echeandia, X.A. 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.
- Sánchez-Bayo, F., Goka, K., 2006. Influence of light in acute toxicity bioassays of imidacloprid and zinc pyrithione to zooplankton crustaceans. *Aquat. Toxicol.*, 78(3), 262-271.
- Shao, C., Bao, B., Xie, Z., Chen, X., Li, B., Jia, X., Yao, Q., Ortí, G., Li, W., Li, X., Hamre, K., Xu, J., Wang, L., Chen, F., Tian, Y., Schreiber, A.M., Wang, N., Wei, F., Zhang, J., Dong, Z., Gao, L., Gai, J., Sakamoto, T., Mo, S., Chen, W., Shi, Q., Li, H., Xiu, Y., Li, Y., Xu, W., Shi, Z., Zhang, G., Power, D.M., Wang, Q., Schartl, M., Chen, S., 2017. The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. *Nat. Genet.*, 49(1), 119-124.
- Sherrard, R.M., C.L. Murray-Gulde, J.H. Rodgers and Y.T. Shah. 2003. Comparative toxicity of Chlorothalonil: *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56, 327 - 333.
- Song, W. and N. Wilbert. 1997. Morphological investigations on some free living ciliates (Protozoa, Ciliophora) from China Sea with description of a new hypotrichous genus, *Hemigastrostyla* nov. gen. *Arch. Protistenkd.*, 148, 413 - 444.

- Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, I.B., Duarte, F.A and G.L. Pinho., 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? *J. Hazard. Mater.*, 15(330), 76-82.
- 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.
- Trapnell, C, Roberts A, Goff L, Perteau G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L., 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* 7(3), 562.
- Valbonesi, A., F. Apone and P. Luporini. 1997. Morphology and biology of a new species of *Euplotes*, *Euplotes plicatum* sp. n. (Ciliophora: Euplotidae). *Acta Protozool.*, 36, 287-294.
- Villares, R., X. Puente and A. Carballeira. 2002. Seasonal variation and background levels of heavy metals in two green seaweeds. *Environ. Pollut.*, 119, 79-90.
- Voulvoulis, N., M.D. Scrimshaw and J.N. Lester. 1999. Alternative antifouling biocides. *Appl. Organomet. Chem.*, 13, 135 - 143.
- Won, N.-I. 2000. Sea urchin bioassay using Korean purple sea urchin *Strongylocentrotus nudus*: Standardization of well plate method. MS Thesis. Seoul National University, 106 pp.
- Wu, I.C.H. and C.R. Curds. 1979. A guide to the species of the genus *Aspidisca*. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)* 36, 1 - 34.
- 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.
- Yeber, D.M., S. Kiil and K. Dam-Johansen. 2004. Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coat.*, 50, 75-104.

Appendix. 1-1. Information of research vessels and sampling data

Classification of ship	Name of Research Vessels	Building year	Tonnage (ton)	Length (m)	Sampling date	Sampling site
Global	ISABU	2016.11	5,894	99.8	12 th - 13 th Jan. 2018	ORIENT shipyard
Ocean	ONNURI	1992.3	1,370	63.8	28 th - 29 th Mar. 2017	ORIENT shipyard
Costal	EARDO	1992.2	357	49.0	15 th Mar. 2017	SUNJIN shipbuilding
Local	JANGMOK 1	2005.1	41	24.2	19 th Sep. 2017	SUNJIN shipbuilding
	JANGMOK 2	2012.3	35	24.0	15 th Mar. 2017	SUNJIN shipbuilding

Appendix. 1-2. Sampling procedures of AFS debris for R/V ISABU

R/V ISABU

Docking process of R/V ISABU (floating dock)



R/V ISABU


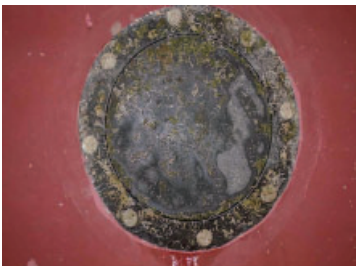




Sampling of ship's hull

Sampling of niche areas









Appendix. 1-2. continued.

R/V ISABU	
Water-jet cleaning	Collecting of water-jet effluent samples
	
	
	
	

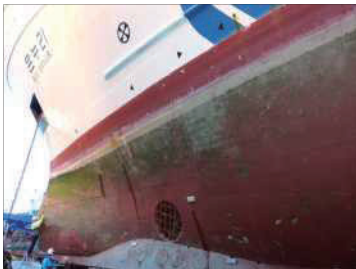



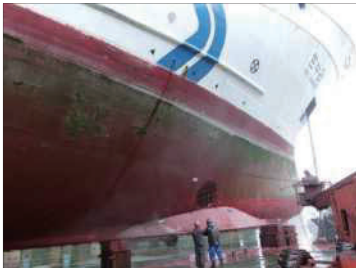
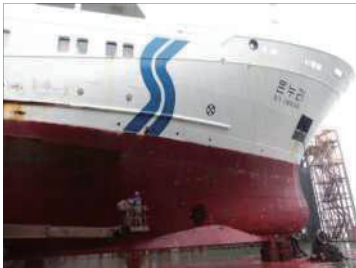
R/V ISABU		
Before sampling	After sampling	After water-jet cleaning
		<p style="text-align: center;">port side of ISABU</p>  <p style="text-align: center;">starboard side of ISABU</p> 
		

Appendix. 1-3. Sampling procedures of AFS debris for R/V ONNURI













R/V ONNURI		
Docking process of R/V ONNURI (floating dock)		
		
		
R/V ONNURI		
Sampling of ambient water	Sampling of ship's hull	Sampling of niche areas
		
		

Appendix. 1-3. continued.













R/V ONNURI	
Water-jet cleaning	Collecting of water-jet effluent samples
	
	
	

R/V ONNURI		
Before sampling	After sampling	After water-jet cleaning
port side of ONNURI	port side of ONNURI	port side of ONNURI
		
starboard side of ONNURI	starboard side of ONNURI	starboard side of ONNURI
		

Appendix. 1-4. Sampling procedures of AFS debris for R/V EARDO

R/V EARDO		
Docking process of R/V EARDO		
		
		
R/V EARDO		
Collecting of paint particles	Sampling of ship's hull	Sampling of niche areas
		
		

Appendix. 1-4. continued.

R/V EARDO		
Water-jet cleaning	Collecting of water-jet effluent samples	
		
		
R/V EARDO		
Before sampling	After sampling	After water-jet cleaning
starboard side of EARDO 	starboard side of EARDO 	starboard side of EARDO 
Niche area of EARDO 	Niche area of EARDO 	Niche area of EARDO 

Appendix. 1-5. Sampling procedures of AFS debris for R/V JANGMOK 1

JANGMOK 1

Docking process of R/V JANGMOK 1









JANGMOK 1

Sampling of ambient waters	Sampling of ship's hull	Sampling of niche areas

Appendix. 1-5. continued.

JANGMOK 1	
Water-jet cleaning	Collecting of water-jet effluent samples
	
	
	

JANGMOK 1		
Before sampling	After sampling	After water-jet cleaning
port side of JANGMOK 1	port side of JANGMOK 1	starboard side of JANGMOK 1
		
port side of JANGMOK 1	port side of JANGMOK 1	starboard side of JANGMOK 1
		

Appendix. 1-6. Sampling procedures of AFS debris for R/V JANGMOK 2

JANGMOK 2

Docking process of R/V JANGMOK 2



JANGMOK 2

Sampling of ship's hull

Sampling of niche areas



Appendix. 1-6. continued.

JANGMOK 2

Collecting of water-jet effluent samples



JANGMOK 2

Before sampling

After sampling

After water-jet cleaning

starboard side of JANGMOK 2



starboard side of JANGMOK 2



starboard side of JANGMOK 2



port side of JANGMOK 2



port side of JANGMOK 2



port side of JANGMOK 2



Appendix. 2-1. GEF-UNDP-IMO GloFouling Partnerships Project



Prof. Gi-Hoon Hong, President
Korea Institute of Ocean Science and Technology
355 HaeYang-ro, YonDo-gu, Busan 49111, Rep. of KOREA
T 051.664.3001, www.kiost.ac.kr

26 October 2017

Mr. Andrew Hudson
Head, Water & Ocean Governance Programme
Global Environmental Finance Unit
Bureau for Policy & Programme Support, UNDP
FF-9100, 1 UN Plaza, New York, NY 10017
United States

Dear Mr. Hudson,

Endorsement of the GEF-UNDP-IMO GloFouling Project

Korea Institute of Ocean Science & Technology (KIOST) is pleased to confirm its strong support for the GEF-UNDP-IMO GloFouling Partnerships Project, an initiative funded by the Global Environment Facility (GEF), implemented by the United Nations Development Programme (UNDP) and executed by the International Maritime Organization (IMO).

We believe that this project is a timely initiative which will build on the solid foundation of the GEF-UNDP-IMO GloBallast Partnerships Programme to enable developing countries to address the risks posed by Harmful Aquatic Organisms and Pathogens (HAOP) transferred via ship's biofouling, which is considered to be another vector for transfer of HAOP as important as ballast water.

KIOST has continued its efforts to develop scientific knowledge and technological solutions in response to the emerging marine environmental problems. In relation to the IMO 2011 Guidelines for the control and management of ships' biofouling to minimize the transfer of invasive aquatic species (Biofouling Guidelines), KIOST has recently embarked a research project to develop a robust methodology to assess risk arising from the discharge of wastes during in-water hull cleaning activities, to develop biofouling resistant hull surface coating material, and to draft regulatory guidelines on the surface of ship hull and other potential areas of transferring HAOP for vessels used for international shipping for the upcoming 5 years.

KIOST will endeavour to actively contribute and participate in the work of the GEF-UNDP-IMO GloFouling Partnerships Project.

We are confident that the GEF-UNDP-IMO GloFouling Partnerships Project will make a positive contribution to the global effort to protect the marine environment, including global effort to achieve UN SDG 14 (Conserve and sustainably use the oceans, seas and marine resources for sustainable development).

Yours faithfully,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gi-Hoon Hong'.

Gi-Hoon Hong, President of KIOST
cc. Dr. Kyoungsoon Shin, KIOST ksshin@kiost.ac.kr

주의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 기관고유사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 기관고유사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.