

Original Article

해양산업시설에서 배출되는 화학물질의 생물학적 독성평가 연구

석형주¹ · 김태원^{2,†} · 김동건¹ · 이수진¹ · 최 훈³ · 이문진⁴

¹해양생태기술연구소 생태평가실 책임연구원

²해양생태기술연구소 연구기획실 책임연구원

³선박해양플랜트연구소 해양안전환경연구본부 연구원

⁴선박해양플랜트연구소 해양안전환경연구본부 영년직연구원

A Study on Biological Toxicity Assessment for Chemical Substances from Marine Industrial Facilities

Hyeong Ju Seok¹, Tae Won Kim^{2,†}, Dong geon Kim¹, Su jin Lee¹, Hoon Choi³, and Moonjin Lee⁴

¹Principal researcher, Ecological Assessment Team, Marine Eco-technology Institute (MEI), Busan 48520, Korea

²Principal researcher, Research Planning Division, Marine Eco-technology Institute (MEI), Busan 48520, Korea

³Researcher, Maritime Safety and Environmental Research Division,

Korea Research Institute of Ships & Ocean Engineering (KRISO), Daejeon 34103, Korea

⁴Tenured researcher, Maritime Safety and Environmental Research Division,

Korea Research Institute of Ships & Ocean Engineering (KRISO), Daejeon 34103, Korea

요 약

본 연구에서는 해양산업시설에서 배출되는 화학물질을 대상으로 국내 서식종을 기반으로 한 생물학적 독성평가를 수행하였다. 시험물질은 유해도, 물리적 거동, 해양산업시설 실태조사 출현물질 등을 기준으로 하여 Copper, Nickel, 2-propanol, Phenol을 선정하였다. 시험생물은 국내에 서식하며, 표준 시험방법이 존재하고, 실내 사육이 가능하며, 독성 민감도가 높은 종을 우선하여 식물플랑크톤 2종, 무척추동물 4종, 해조류 2종, 어류 2종(총 10종)을 선정하였다. 독성시험 결과를 활용하여 종민감도분포곡선(Species Sensitivity Distribution curve, SSD) 기반 HC5 (Hazardous Concentration of 5%)를 추정하였으며, 안전계수를 적용하여 예측무영향농도(Predicted No Effect Concentration, PNEC)를 산출하였다. 확률론적 방법으로 산출한 PNEC는 0.008 mg/L (Copper), 0.33 mg/L (Nickel), 554 mg/L (2-propanol), 2.4 mg/L (Phenol)로 나타났다. 국외종을 기반으로 한 PNEC와 비교하여 차이를 나타냈다. 현재 국내 수질 준거치는 미국 및 유럽의 환경기준 등을 적용하고 있어 국내 수생태계의 특성을 반영하지 못하고 있다. 따라서, 국내 해양 서식종을 기반으로 한 독성시험과 종민감도분포곡선을 활용한 위해성 평가를 수행하여 도출된 준거치를 해양산업시설 배출허용기준 설정 시 활용할 필요가 있다.

Abstract – In this study, the Biological Toxicity Assessment based on Domestic marine organisms was conducted for Chemical substances from marine industrial facilities. Copper, Nickel, 2-propanol, and Phenol were selected based on hazard, physical behavior, and Detection substance in survey of marine industrial facilities. Two plant plankton, four invertebrates, two algae, and two fish (10 species in total) were selected in preference to species that live in Korea, have standard test methods, can be raised laboratory, and have high toxicity sensitivity. The results of the toxicity test were used to estimate HC5 (Hazardous Concentration of 5%) based on the Species Sensitivity Distribution (SSD), and the Predicted No Effect Concentration (PNEC) was calculated by applying the Assessment Factor. The PNEC calculated by the probabilistic method was 0.008 mg/L (Copper), 0.33 mg/L (Nickel), 554 mg/L (2-propanol), and 2.4 mg/L (Phenol), showing some differences compared to PNEC based on foreign species. Currently, domestic the water quality standards does not reflect the characteristics of the marine ecosystem as it applies environmental standards in the United States and Europe. Therefore, it is necessary to use the derived ref-

[†]Corresponding author: twkim@marine-eco.co.kr

erence value when establishing emission acceptance standards by performing toxicity tests based on marine organisms in Korea and risk assessment using species sensitivity distribution curves.

Keywords: Marine Industrial Facilities(해양산업시설), Ecological Risk assessment(해양생태위해성평가), Species Sensitivity Distribution (SSD)(종민감도분포), Toxicity test(독성평가)

1. 서 론

해양은 세계 대부분의 국가들이 공유하는 열린 공간이며 해양오염 문제는 특정 국가만의 문제가 아닌 국제적인 관심과 대책을 요구하는 문제로 인식될 필요가 있다(MOF[2015a]). 2016년 이후 해양환경관리법(제22조 제1항)에서는 일부 항목을 제외하고 모든 위험·유해물질의 해양배출을 금지하고 있으나, 해양배출의 현실적인 위험성을 반영한 효과적인 규제가 적용되지 못하고 있는 실정이다.

해양환경관리법의 적용을 받는 해양산업시설은 2017년 기준 약 106만 7천여 개소에 달하고 있으며(Kim *et al.*[2018a]), 해양산업시설의 유해액체물질 보관 및 취급시설에서 배출되는 위험·유해물질의 1년간 환경배출량은 약 4만여톤에 이르는 것으로 파악되었고, 이중 수계배출량은 약 86톤에 이르고 있는 것으로 알려졌다. 또한 이들 위험·유해물질의 이동량 또한 약 13만톤에 이르는 것으로 파악되고 있다(Lee *et al.*[2021]). 뿐만 아니라 발전소 냉각수에 사용되는 소포제 및 조전소 선박 건조 과정에서 배출되는 물질 등 다양한 위험·유해물질이 상시적으로 배출되고 있는 실정이다. 공공처리시설로 유입되어 처리·배출되는 경우에는 물환경보전법 등에 따라 관리되고 있으나, 해양으로 직접 배출되는 시설에 대한 규제나 관리는 미흡하다(Jang *et al.*[2021]).

따라서, 해양산업시설 위험·유해물질 관리 및 해양배출의 규제 및 관리방안의 필요성에 대한 요구가 커지고 있고, 정책적 관심의 대상이 되고 있다.

국내 환경보전법 시행령 제 11조에 따르면 환경유해인자에 대한 위해성 평가를 수행하도록 하고 있으나, 현실적이지 해양생태계 및 수생생물 보호에 대한 위해성 관련 지침이나 기준이 도출되어 활용되고 있지 않으며, 국내 해양 특성에 맞는 위해성 모니터링 자료와 종민감도분포(Species Sensitivity Distribution, SSD) 기법을 활용한 체계적인 수질 근거치 도출 절차가 필요하다.

국내 하천의 배출허용기준은 수질 근거 배출허용기준(Water Quality-Based Effluent Limits, WQBEL)과 기술 근거 배출허용기준(Technology-Based Effluent Limits, TBEL)을 비교 검토하여 설정하고 있고 국내 수질 근거 준거치는 미국 수생생물보호 수질환경기준(Criterion Maximum Concentration, CMC) 및 유럽환경기준 등을 적용하여 국내 수계의 특성을 반영하지 못하고 있는 실정이다(Kim *et al.*[2011]).

이에 본 연구에서는 국내 해양생태계의 특성을 반영할 수 있는 국내 서식종을 선정하여 독성시험을 수행하였으며, 도출된 자료를 바탕으로 종민감도분포곡선을 활용한 예측무영향농도(Predicted No Effect Concentration, PNEC)를 산출하여, 향후 해양산업시설에서 배출되는 위험·유해물질의 배출허용기준 설정 시 수질 근거치 산정과 배출관리를 위한 과학적 근거자료 제공을 목표로 하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 시험물질

시험물질은 해양생물에 대한 높은 독성 민감도, 물리적 거동, 해양산업시설 배출수 내 검출빈도 등을 기준으로, 중금속, VOCs, 기타물질 중 각 우선순위를 정하여 선정하였다. 중금속인 Copper, Nickel은 해양생물에서 높은 독성 민감도를 나타냈으며(Hwang *et al.*[2014]), 휘발성 물질인 2-propanol은 해수에서 용존형태를 띠는 특성을 나타내었고, Phenol과 함께 실태조사 결과 높은 출현빈도를 나타내 Copper, Nickel, 2-propanol, Phenol을 시험물질로 선정하였다(KRISO[2021]).

Phenol, 2-propanol은 고농도의 해수 stock solution을 제조하였으며, 중금속인 Copper, Nickel의 경우 Nitric acid에 녹여 1,000 mg/L 농도의 표준용액을 사용하였다. 시험에 사용된 물질은 99 % 이상의 고순도 표준물질(Sigma-Aldrich, Merck, USA)을 이용하였으며, 멸균여과 해수(1µm membrane filter, Chisso Filter, Japan) 또는 인공해수(Synthetic seawater; ISO 10253)에 희석하여 시험농도를 제조하였다. 농도 구간 설정을 위해 Dilution factor의 기준을 0.5로 설정하였으며, 농도 범위 설정시험(Range finding test; EPA[2002])을 수행하여 본 시험에 적합한 농도 구간을 설정하였다.

2.2 해양생태독성시험

시험 대상종은 국내에서 서식하고 있으며, 국내·외 표준시험법의 표준 시험종이거나 대상종에 대한 생태·생리학적 연구가 많이 진행되고, 쉽게 확보할 수 있으며 실내 사육이 용이하고, 독성 민감도가 높은 해양생물 10종을 선정하였다. 식물플랑크톤 시험종은 국제표준인 ISO 10253[2016]와 ASTM E1218-04[2012]에서 제시하는 *Skeletonema sp.*(해산 규조류), *Dunaliella tertiolecta*(해산 녹조류)를 선정하였고, 무척추동물 및 해조류는 ASTM E1440-91[2012], Snell *et al.*[1991]과 해양환경공정시험기준(MOF[2021a])에서 제시하는 *Brachionus plicatilis*(해산 로티퍼), *Monocorophium acherusicum*(저서성 단각류), *Crassostrea gigas*(참굴), *Strongylocentrotus nudus*(등근성게), *Saccharina japonica*(다시마), *Undaria pinnatifida*(미역)을 선정하였다. 어류는 경제적 가치가 높고, 인공산란이 가능한 *Epinephelus akaara*(붉바리), *Paralichthys olivaceus*(넙치)를 선정하였으며, 표준시험법이 존재하지 않아 OECD 212[1998]를 참고하여 시험하였다. 시험표준에서 제시하는 유효기준(Validation of criteria) 설정하였으며, 충족하지 못할 경우 재시험을 수행하였다(Table 1).

시험용액은 시험시작과 종료 시를 포함하여 매 24시간마다 pH-DO 측정기(STAR A126, Thermo Fisher Scientific, USA)와 염분측정기(Pro30, YSI, USA)를 이용하여 pH, DO, 수온 및 염분 등을 측정하였다.

Table 1. Test validation of criteria and standard methods in this study

Test organism	End point (Standard method)	Test acceptability (in the control)
Algae	<i>Skeletonema</i> sp. 72h-growth inhibition (ISO 10253:2016)	- Specific growth rate: $\geq 0.9/\text{day}$ - The variation coefficient of the specific growth rates: $\leq 7\%$ - The pH change: < 1.0 - Mean ¹ C.V. of section-by-section specific growth rates: $< 35\%$
	<i>Dunaliella tertiolecta</i> 72h-growth inhibition (ASTM E1218-04:2012)	- Specific growth rate: $\geq 0.9/\text{day}$ - The variation coefficient of the specific growth rates: $\leq 7\%$ - The pH change: < 1.5 - Mean C.V. of section-by-section specific growth rates: $< 35\%$
Invertebrate	<i>Brachionus plicatilis</i> 96h-survival (ASTM E1440-91:2012, Snell et al.:1991)	- Population growth rates: $\geq 0.55\%$
	<i>Monocorophium acherusicum</i> 96h-survival (² MOF, 2021a)	- D-shaped larva development rates: $\geq 80\%$
	<i>Crassostrea gigas</i> 30h-D-shaped larva development (³ MOF, 2021b)	- Developmental stage of D-shaped: $\geq 80\%$
	<i>Strongylocentrotus nudus</i> 64h-Normal larva development (MOF, 2021b)	- Normal larva development rates: $\geq 80\%$
Macroalgae	<i>Saccharina japonica</i> 24h-germination (MOF, 2021b)	- Germination rate: $\geq 90\%$
	<i>Undaria pinnatifida</i> 21d-young sporophytes growth (MOF, 2021b)	- Average of young sporophytes length: $\geq 300 \mu\text{m}$
Fish	<i>Epinephelus akaara</i> 96h-survival OECD 212(1998)	- Survival of all organisms: $\geq 80\%$
	<i>Paralichthys olivaceus</i> 96h-survival OECD 212(1998)	- Survival of all organisms: $\geq 80\%$

¹C.V.: coefficient variation, ²Korean Standard Method for Marine Wastes [MOF, 2021a], ³Korean Standard Method for Marine Organisms (MOF [2021b]), ⁴Not applicable

2.2.1 식물플랑크톤 성장저해시험

식물플랑크톤 성장저해시험은 국제표준인 ISO 10253[2016], ASTM E1218-04[2012]를 따라 수행하였다. 시험생물은 CCAP (Culture Collection of Algae & Protozoa, UK)에서 분양받아 이용하였으며, 시험 수행 전 2~4주 동안 지속적인 계대배양을 수행하였고, 지수성장기의 식물플랑크톤을 시험에 이용하기 위해 시험 시작 96 시간 전 본 시험과 동일한 염분, 수온 조건에서 전 배양(Pre-culture)을 실시하였다. 표준에서 요구하는 인공해수와 영양배지를 포함한 시험용액을 농도별로 제조한 후 membrane filter (0.2 μm , WhatmanTM, UK)로 여과하여 250 mL 삼각플라스크에 100 mL씩 분주하였으며 4 반복구로 수행하였다. 접종밀도는 약 5,000 cells/mL (*Skeletonema* sp.), 10,000 cells/mL (*D. tertiolecta*)가 되도록 하였고, 20 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$, 6,000~10,000 lx의 연속 조명하에, 회전율 100 rpm으로 진탕배양기(DS-SI220R, Dongseo Science Co., Ltd, Korea)를 이용하여 72 시간 동안 배양하였다. 세포밀도는 24시간마다 각 시험용기에서 1 mL씩 추출한 후 Sedgewick-Rafter chamber (Marienfeld superior, Germany)를 이용하여 도립현미경(CKX 31, Olympus, Japan) 하에서 계수하였다.

2.2.2 무척추동물 독성시험

*B. plicatilis*는 ASTM E1440-91[2012]의 국제표준에 따라 수행되었다. 시험생물은 cyst (MicroBioTests Inc., Belgium)의 부화유생 (Neonate)을 이용하였으며, 표준에서 요구하는 ASPM 배지와 인공해수를 포함한 시험용액을 농도별로 제조하여 24 hole well plate에 1 mL씩 분주하였다. 각 well에 5마리 개체를 수용하였으며 5 반복구로 수행하였다. 시험생물의 투입이 완료된 24 well plate는 parafilm

으로 밀봉한 후 25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$, 연속 암조건으로 유지되는 인큐베이터 (JSCC-150, JSR Co., Ltd, Korea)에서 배양하였다. 24시간마다 개체수를 입체현미경(SZ51, Olympus, Japan) 하에서 계수하였다.

M. acherusicum, *C. gigas*, *S. nudus*는 해양환경공정시험기준[2021]에 따라 수행하였다. *M. acherusicum*는 Neoenbiz (Korea)에서 분양받아 이용하였으며, 지수식으로 4개의 반복구를 두었으며, 무독성 멸균 여과해수에 희석하여 시험용액을 농도별로 250 mL 유리비이커에 200 mL 분주하여 300~500 μm 크기의 저서성단각류 10개체를 투입한 뒤, 20 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$, 연속 암조건 하에서 96시간 배양하였다. 시험기간 중 24시간마다 활동성 여부를 확인하여 생존 개체를 계수하였다.

*C. gigas*는 자연에서 채취한 성숙한 성체의 수정란을 이용하였으며, 지수식으로 4 반복구로 수행하였다. 시험용액을 농도별로 제조하여 6 well plate에 10 mL 분주한 뒤 수정란 100~150개체를 투입하였다. 25 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 16:8 명암주기 하에서 26~30시간 배양하였으며, 시험 종료 후 도립현미경 하에서 정상 D형 유생을 계수하였다.

*S. nudus*는 자연에서 채취한 성숙한 성체의 정자와 난자를 이용하였으며, 지수식으로 4 반복구로 수행하였다. 농도별로 제조하여 6 well plate에 10 mL 분주한 뒤, 정자 1 μL 와 난자 100~150개를 투입하였다. 20 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 8:16 명암주기 하에서 48시간 배양하였으며, 시험 종료 후 도립현미경 하에서 정상 수정란을 계수하였다.

2.2.3 해조류 독성시험

해조류 독성시험은 해양환경공정시험기준[2021]에 따라 수행하였다. PESI 영양배지와 무독성 멸균 여과해수를 포함한 시험용액을 농도별로 제조한 후 membrane filter (0.45 μm , whatmanTM, UK)로 여과하여 6 well plate (*S. japonica*)와 25 mL Petri dish (*U. pinnatifida*)에

각각 10 mL, 20 mL씩 분주하였으며 4 반복구로 수행하였다.

*S. japonica*는 15±0.5°C, 연속 암조건 하에서 24시간, *U. pinnatifida*는 20±0.5°C, 12:12 명암 주기하에서 21일 배양하였다. 시험 종료 후 도립현미경 하에서 발아한 유주자를 계수(*S. japonica*) 하였으며 및 아포체의 길이(*U. pinnatifida*)를 측정하였다. *S. japonica*를 이용한 발아율 시험은 생물 수급의 어려움으로 Copper만 수행하였다.

2.2.3 어류 독성시험

어류 독성시험은 OECD 212[1998]을 참고하여 수행하였다. 수정 후 24시간 이내의 수정란을 이용하였으며, 무독성 멸균 여과해수에 희석하여 농도별로 제조하여 300 mL 유리비이커에 200 mL 분주한 뒤, 시험생물을 반복구 당 20개체씩 수용하였으며 4 반복구로 수행하였다. 23±1°C (*E. akaara*), 18±1°C (*P. olivaceus*), 550~1,000 lx 16:8의 명암주기 하에서 96시간 배양하였고 사망 개체는 24시간마다 육안으로 관찰하였다.

2.3 통계 분석

무영향관찰농도(No Observed Effect Concentration, NOEC), 최소 영향관찰농도(Lowest Observed Effect Concentration, LOEC)의 산출을 위해서 식물플랑크톤의 성장저해율, 무척추동물의 생존율, 해조류의 발아율, 어류의 생존율 결과를 이용하였다. 대조구와 시험구들 사이에 유의한 차이의 유무를 확인하기 위하여 ANOVA (Analysis of variance)를 이용하였고 정규성 검정(Shapiro Wilk's test), 분산의 동질성 평가(Bartlett's test) 후 유의수준 5%에서 분석하였다. 사후검정으로 Dunnett's test를 수행하였으며, 비모수의 경우 Steel's many-one rank test를 이용하여 분석하였다.

반수영향농도(50% Effect Concentration, EC₅₀)와 반수치사농도(50% Lethal Concentration, LC₅₀)는 선형보간법(Linear interpolation)과 Maximum Likelihood-Probit을 이용하여 산출하였다. 모든 가설검정(Hypothesis test) 및 점추정(Point estimate)의 통계분석은 TOXCALC 5.0 program (Tidepool scientific software, USA)를 이용하였다.

2.4 해양생태위해성 분석

2.4.1 HC₅ (Hazardous Concentration of 5%) 산출

생물종간 독성값(EC₅₀, LC₅₀, NOEC)의 누적확률분포 함수를 종민감도분포(Species Sensitivity Distribution, SSD)로 표현하였으며 (Wheeler et al.[2002]), 종민감도분포곡선을 통해 수생태계에 서식하는 전체 생물종의 95% 이상 보호할 수 있는 수준인 HC₅ (Hazardous Concentration of 5%)를 추정하였다. 본 연구에서는 국내중 10종의 독성값과 분류군별 국외종의 독성값을 수집하여 L(E)C₅₀을 기반으로 추정하였다. 종민감도분포곡선의 정규성 검정은 Anderson-Darling, Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises test, 적합모델의 선정은 Akaike's Information Criterion corrected for sample size (aicc)로 평가하였으며, 모든 통계분석은 The R package ssdtools (Thorley and Schwarz[2018])를 이용하였다.

2.4.2 PNEC (Predicted No Effect Concentration) 산출

PNEC는 해당 농도 이하로 노출될 경우 수생태가 안전할 것으로 예상되는 농도를 의미하며 PNEC 산출에는 결정론적 접근법과 확률론적 접근법이 있다. 결정론적 방법은 물질의 생태독성 자료가 충분하지 못한 경우 독성값 중 가장 민감한 값을 적용하며, 확률론적 방법은 충분한 독성자료 상황에서 SSD를 산출하며 많은 가능성의 시나리오를 포함한다. 본 연구에서는 결정론적 방법과 확률론적 방법을 모두 적용하여 비교하였으며, 불확실성을 고려하여 안전계수(AF, Assessment Factor)를 적용하여 PNEC를 산출하였다 (IMO[2017]; European Commission[2003]).

$$PNEC = \frac{\text{Lowest toxicity concentration (EC}_{50}\text{) or HC}_5}{AF}$$

3. 결과 및 고찰

3.1 해양생태독성시험

Copper, Nickel, 2-propanol, Phenol을 대상으로 독성시험을 수행한 결과, Copper>Nickel>Phenol>2-propanol 순으로 민감한 영향을 나타냈다(Table 2). 국외종을 대상으로 한 선행 독성시험에서도 동일한 물질순으로 독성 민감도를 나타내 본 연구결과와 부합하였다(Table 3). 독성시험 결과 가장 민감한 영향을 나타낸 시험은 Copper의 *U. pinnatifida* 아포체 성장률 시험으로 NOEC, LOEC 및 EC₅₀ 값이 각각 0.02, 0.03 및 0.1 mg/L로 나타났으며, 2-propanol의 *P. olivaceus* 수정란 생존율 시험은 NOEC, LOEC 및 LC₅₀ 값이 각각 1,000, 2,000 및 6,216 mg/L로 나타나 가장 낮은 민감도를 나타냈다. 96시간의 수정란 생존율 시험보다 96시간의 개체군 성장률을 시험 종말점으로 설정한 만성독성시험이 더욱 민감한 영향을 나타낸 것으로 판단된다.

표준에서 제시하는 유효기준은 모두 만족하여, 시험 노출 초기 및 종료시 pH 변화는 최대 1을 초과하지 않았으며 온도는 ± 2°C, 염분은 ± 1 PSU 범위를 나타내 시험조건의 높은 안정도 내에서 시험이 수행되었다.

Copper의 독성시험 결과, 전체 시험종에서 반수영향농도가 가장 높으며 낮은 민감도를 나타낸 생물은 식물플랑크톤 *D. tertiolecta* 및 *Skeletonema* sp.로 NOEC, LOEC 및 EC₅₀₍₁₀₎ 값이 각각 1.3, 2.5 및 4.2(2.7) mg/L와 0.4, 0.8 및 1.5(0.9) mg/L로 나타났다(Table 2). 식물플랑크톤은 어류, 무척추동물 개체군에 비해 일반적으로 민감한 반응을 나타내는 생물로 알려져 있으나(Kim et al.[2018b]; Frampton et al.[2006]), Copper를 이용한 본 시험에서는 가장 낮은 민감도를 나타냈다. Copper의 경우 식물플랑크톤의 필수 미량원소로 이용되며(Hwang et al.[2014]), 무척추동물(두족류, 복족류 등)의 호흡색소인 헤모시아닌에 매우 높은 농도로 존재하여(MOF[2015b]) 흡수율 또한 높아, 식물플랑크톤에서 낮은 민감도와 무척추동물에서 높은 민감도를 나타낸 것으로 판단된다.

Nickel의 NOEC, LOEC 및 EC₅₀₍₁₀₎ 값의 범위는 각각 0.1~1.0, 0.2~5.0 및 1.0~7.1(0.2~4.2) mg/L로 나타났다. 식물플랑크톤 성장 저해시험 결과 EC₅₀값이 1.0~3.0 mg/L로 나타났으며, 해산 식물플

Table 2. Values of NOEC, LOEC and E(L)C₅₀ calculated from end point of each test for Copper, Nickel, 2-propanol and Phenol

Test organism	Substance	End point		NOEC	LOEC	E(L)C ₅₀	E(L)C ₁₀
		Duration	Effect measurement				
<i>Skeletonema</i> sp.	Copper	72h	Growth inhibition	0.4	0.8	1.5	0.9
	Nickel			0.1	0.2	1.0	0.2
	2-propanol			2,000	4,000	5,261	2,384
	Phenol			6.25	12.5	22.8	13.8
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Copper	72h	Growth inhibition	1.3	2.5	4.2	2.7
	Nickel			1.0	2.0	3.0	2.5
	2-propanol			1,000	2,000	5,839	2,906
	Phenol			6.25	12.5	21.3	10.1
<i>Brachionus plicatilis</i>	Copper	96h	Population growth	0.05	0.1	0.09	0.05
	Nickel			1.0	2.0	4.5	1.6
	2-propanol			2,000	4,000	5,796	2,864
	Phenol			12.5	25.0	78.1	19.7
<i>Monocorophium acherusicum</i>	Copper	96h	Survival	0.1	0.2	0.2	0.1
	Nickel			1.0	2.0	3.6	1.0
	2-propanol			2,000	4,000	5,755	2,590
	Phenol			6.25	12.5	51.9	23.0
<i>Crassostrea gigas</i>	Copper	30h	Development	0.05	0.1	0.1	0.05
	Nickel			1.0	2.0	5.4	1.0
	2-propanol			500	1,000	6,679	2,188
	Phenol			6.25	12.5	57.2	12.1
<i>Strongylocentrotus nudus</i>	Copper	64h	Development	0.1	0.2	0.2	0.1
	Nickel			1.0	5.0	5.8	1.8
	2-propanol			100	500	7,014	3,591
	Phenol			6.25	12.5	54.1	10.2
<i>Saccharina japonica</i>	Copper	24h	Germination	0.1	0.2	0.3	0.1
	Nickel			-	-	-	-
	2-propanol			-	-	-	-
	Phenol			-	-	-	-
<i>Undaria pinnatifida</i>	Copper	21d	Sporophytes growth	0.02	0.03	0.1	0.02
	Nickel			0.5	1.0	3.2	1.5
	2-propanol			100	500	3,018	676
	Phenol			6.25	12.5	20.8	4.5
<i>Epinephelus akaara</i>	Copper	96h	Survival	0.5	0.6	0.6	0.4
	Nickel			1.0	5.0	6.5	2.8
	2-propanol			2,000	4,000	7,710	2,763
	Phenol			12.5	25.0	86.4	31.3
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Copper	96h	Survival	0.5	0.7	0.7	0.5
	Nickel			1.0	2.0	7.1	4.2
	2-propanol			1,000	2,000	6,216	2,744
	Phenol			25.0	50.0	125.5	52.7

랑크톤 *Thalassiosira* sp.를 이용한 선행연구 결과 0.1~10 mg/L로 나타났다(Wilson and Freeberg[1980]). 이러한 차이는 시험종의 민감도 및 시험기간, 방법 등의 차이로 판단된다.

2-propanol의 NOEC, LOEC 및 EC₅₀₍₁₀₎ 값의 범위는 각각 100~2,000, 500~4,000 및 3,018~7,710(676~3,591) mg/L로 나타났다. ECHA (The European Chemicals Agency)의 독성 정보(Ecotoxicological information)에서도 급·만성 NOEC값을 1,000 mg/L 초과로 평가하고 있으며, 수중 독성에 대한 영향은 매우 낮은 것으로 판단된다.

Phenol의 NOEC, LOEC 및 EC₅₀₍₁₀₎ 값의 범위는 각각 6.25~25.0, 12.5~50.0 및 20.8~125.5(4.5~52.7) mg/L로 나타났다.

Copper를 제외한 모든 물질에서 식물플랑크톤 또는 해조류 독성 시험이 가장 민감한 반응을 나타냈으며, 어류 독성시험에서 가장 둔감한 반응을 나타냈다. 화학물질의 독성은 일반적으로 식물플랑크톤, 해조류>무척추동물>어류 개체군 순으로 민감한 영향을 나타내지만, 물질에 반응하는 생물종의 특성과 시험조건, 방법에 따라 다르게 나타나기도 한다(Lee *et al.*[2008]; Wu *et al.*[2016]).

Table 3. Result of estimate of the 5% hazard concentration (HC₅) and PNEC (Predicted No Effect Concentration) to marine organisms in Korea and ECOTOX database toxicity value

Substance	Data No.	HC ₅		PNEC		
		Estimated concentration (95% confidence limits)	Deterministic risk assessment	³ AF	Probabilistic risk assessment	AF
Concentration (mg/L)						
¹ K	Copper	10	0.04 (0.01~0.16)	0.0009	0.008	
	Nickel	9	1.66 (0.9~3.2)	0.01	0.33	
	2-propanol	9	3,981 (3,155~5,193)	30.2	554	
	Phenol	9	16.3 (8.2~35.0)	0.21	2.4	5
² E	Copper	15	0.02 (0.01~0.05)	0.0006	0.004	
	Nickel	15	0.38 (0.07~3.5)	0.008	0.076	
	Phenol	15	8.9 (4.2~20.6)	0.13	1.8	

¹Marine organisms in Korea, ²ECOTOX database (EPA[2022b]), ³Assessment factor

만성독성시험의 기준은 종말점과 시험기간, 종의 민감도 등으로 평가하고 있으며(EPA[2001]), 본 시험에서는 *B. plicatilis*의 96시간 개체군 성장률 시험, *U. pinnatifida*의 21일 아포체 성장률시험, 식물플랑크톤의 72시간 성장저해시험이 만성시험으로 고려된다. 식물플랑크톤 성장저해시험은 다른 시험종과 비교하여 시험기간이 짧지만, 생애 전 단계를 모두 포함하는 지수성장기를 거치고, 민감하고 취약한 종말점을 포함하여 만성으로 허용되고 있다(IMO [2017]).

식물플랑크톤에서 낮은 민감도를 나타낸 Copper를 제외한 급성 및 만성 평균 독성값(E(L)C₅₀)은 Nickel에서 각각 5.7 및 2.9 mg/L, 2-propanol에서 6,674 및 4,978 mg/L, Phenol에서 75.0 및 35.8 mg/L로 나타나 만성시험에서 급성시험 보다 높은 민감도를 나타냈다(t-test, 1-tail, <0.05). 만성독성은 생물의 가장 취약한 단계의 독성영향을 검출할 수 있으며, 만성독성 데이터의 확보는 독성값의 불확실성을 줄이고, 신뢰성을 높일 수 있다. 그러나 만성독성시험은 시험기간이 비교적 길고, 시험조건 및 유효성을 확보하기 어려워 국내·외 해수종 만성 독성자료값이 매우 부족한 실정이며 물질에 따라 자료에 부재시 기본값 또는 추정치가 적용되고 있다. 따라서, 민감도가 높고 만성적인 시험이 가능한 국내 해양 독성 시험종 확

보와 다양한 노출기간 등을 고려한 독성시험 수행이 필요할 것으로 판단된다.

3.1 해양생태위해성 분석

시험물질의 독성시험결과를 바탕으로 중민감도분포와 HC₅를 산출하였다. 국립환경과학원의 화학물질 위해성평가의 구체적 방법 등에 관한 규정에 따르면 최소 4개의 분류군과 5종 이상의 독성자료가 충족되어야 한다(NIER[2020]). 본 시험에서는 4개의 분류군과 10종의 국내중 독성시험을 수행하였다. 국외중 독성자료는 ECOTOX database (EPA[2022b])에서 식물플랑크톤, 무척추동물, 연체동물, 어류별로 종말점(생존, 성장, 부화 등)과 독성값이 명확하고, 만성값을 우선하여 신뢰할 수 있는 15종 이상의 독성값 자료를 확보하였으나, 2-propanol의 독성자료는 무척추동물 3종의 독성값만 존재하여 SSD 산출은 수행할 수 없었다(Table 4).

중민감도분포곡선의 정규성검정(Anderson-Darling, Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises test)은 모두 적합하였으며($p > 0.05$), 적합모델은 Anderson and Burnham[2002]에 따라 Akaike's Information Criterion corrected for sample size (aicc) value가 가장 작고, Delta value가 0에 수렴하는 모델인 log-normal distribution (Copper),

Table 4. Statistical summary of normality test and selection best predictive model for Species Sensitivity Distribution

Substance	¹ Dist	² AD	³ KS	⁴ CVM	Nomality	Sign. level	⁵ AIC	⁶ Delta
Copper	Log-logis	0.347	0.154	0.0474	Accepted	0.05	15.8	0.481
	Log-normal	0.384	0.179	0.0563	Accepted	0.05	15.3	0
	Gamma	0.678	0.220	0.113	Accepted	0.05	18.8	3.48
Nickel	Log-logis	0.365	0.149	0.034	Accepted	0.05	42.9	1.05
	Log-normal	0.517	0.198	0.068	Accepted	0.05	43.6	1.74
	Gamma	0.359	0.162	0.045	Accepted	0.05	41.9	0
2-propanol	Log-logis	0.496	0.194	0.051	Accepted	0.05	159	0
	Log-normal	0.765	0.277	0.122	Accepted	0.05	161	1.55
	Gamma	0.643	0.261	0.099	Accepted	0.05	160	0.449
Phenol	Log-logis	0.466	0.219	0.070	Accepted	0.05	91.5	0.954
	Log-normal	0.493	0.219	0.077	Accepted	0.05	90.7	0.096
	Gamma	0.406	0.212	0.059	Accepted	0.05	90.6	0

¹Distribution, ²Anderson-Darling test, ³Kolmogorov-Smirnov test, ⁴Cramer-von Mises, ⁵Akaike's Information Criterion, ⁶Delta value

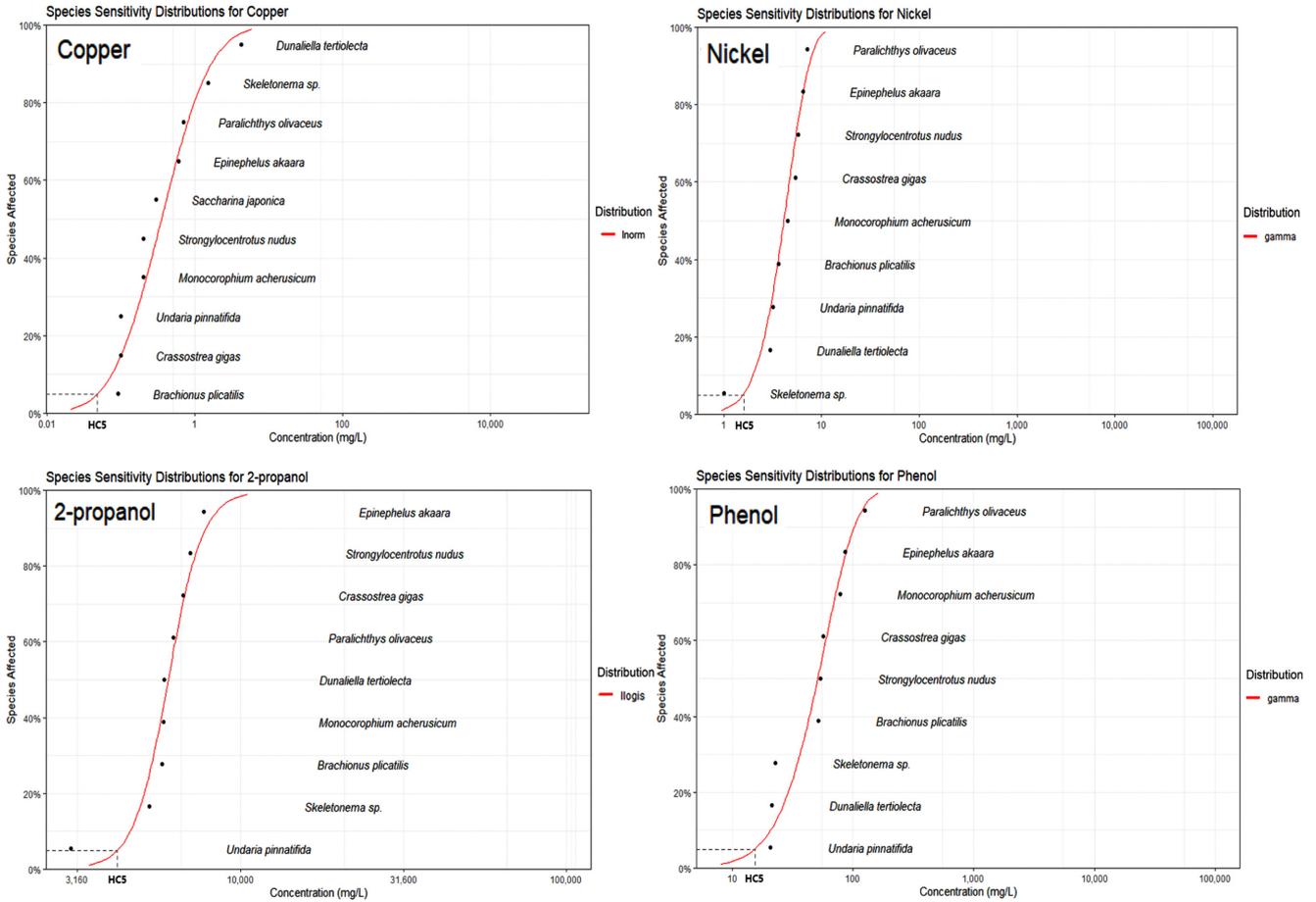


Fig. 1. Illustration of SSDs derived from three approaches (Log-logis, Log-normal, Gamma).

gamma distribution (Nickel, Phenol) 및 log-logis (2-propanol)을 선택하였다(Table 4).

국내종을 이용한 독성시험 결과를 토대로 Copper의 HC₅는 0.04(0.01~0.16) mg/L이며, Nickel은 1.66(0.9~3.2) mg/L, 2-propanol은 3,981(3,155~5,193) mg/L, Phenol은 16.3(8.2~35.0) mg/L로 나타났다(Fig. 1). 국외종 독성자료의 결과를 토대로 Copper의 HC₅ 값은 0.02(0.01~0.05) mg/L이며, Nickel은 0.38(0.07~3.5) mg/L, Phenol은 8.9(4.2~20.6) mg/L로 나타나 국내종 HC₅ 결과와 다소 차이를 나타냈다(Table 3). 미국의 해양생물 만성 독성값을 적용한 수생생물 보호 준거치 CCC (Criterion Continuous Concentration)는 Copper의 경우 0.0031 mg/L, Nickel은 0.0082 mg/L로 본 연구에서 제시한 확률론적 PNEC 보다 엄격한 기준으로 나타났으며 생물의 민감도 차이, 만성 독성값의 부족 등으로 인한 것으로 판단된다. Phenol과 2-propanol은 독성자료의 부족과 인체 위해성의 중요성 등으로 인체 준거치만 제시되어 있다(EPA [2022d]).

Skeletonema sp. (Cowgill et al.[1989]), *D. tertiolecta* (Peterson and Stauber[1996]), *B. plicatilis* (Snell et al.[1991])은 국내종과 같은 종을 사용했음에도 시험기간, 시험실 조건, 배양환경 등의 영향으로 결과에 차이가 나타난 것으로 판단된다. 시험종의 민감도 및 신뢰성

확보를 위해 수행하는 물질별 참조물질독성시험(Reference toxicant test) 데이터 구축과 시험소 간 비교시험 등이 국내종 대상으로는 수행되고 있지 않지만, EPA의 국외종(*Americamysis bahia*, *Cyprinodon variegatus*, *Menidia beryllina* 등)의 경우 최소 20개 기관이 참여하여 종별 민감도와 변동성을 확인하고 데이터를 구축하고 있다(EPA[2001]). 국내종 독성값의 신뢰성을 확보하기 위해 국외에서 시행되고 있는 민감도시험 및 시험소 간 비교 시험 등이 수행되어야 할 것이다.

해양생물에게 영향이 미치지 않는 안전한 농도의 한계치인 예측 무영향농도(PNEC)를 산출하였다. 결정론적 방법은 독성자료 중 가장 민감한 값을 선정하였고, 확률론적 방법은 HC₅를 활용하였다. 불확실성을 고려하여 보수적인 안전계수(Assessment factor)를 활용하였으며 결정론적 방법에는 100, 확률론적 방법에는 5를 적용하였다(IMO[2017]; EC[2003]).

본 연구에서 결정론적 방법을 통해 도출된 PNEC 값이 Copper에서 0.0009 mg/L, Nickel에서 0.01 mg/L로 해양환경기준의 해양생태계 보호 단기기준인 0.003 mg/L (Copper), 0.011 mg/L (Nickel)과 비교하여도 유사하거나 낮은 수준으로 도출되었으며, 확률론적 방법에 비해 모두 10배 이상 낮은 값이 도출되었다. 결정론적 방법은

단일 생물종과 제한된 자료로 인하여 불확실성이 높아 독성기준 및 배출기준 준거치로 활용하기에 제한적이며, 확률론적 방법에서는 신뢰성이 높고 충분한 독성자료가 필요할 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 해양시설에서 배출되는 물질로 예상되는 Copper, Nickel, 2-propanol, Phenol을 대상으로 해양생물에 미치는 영향을 알아보기 위해 국내종 독성시험을 수행하였으며, HC₅, PNEC 산출을 통해 해양생태위해성을 분석하였다.

독성시험결과, 가장 민감한 영향을 나타낸 시험은 Copper의 *U. pinnatifida* 아포체 성장률 시험으로 NOEC, LOEC 및 EC₅₀ 값은 각각 0.02, 0.03 및 0.1 mg/L로 나타났다. 식물플랑크톤 성장저해 시험과 만성독성시험에서 급성독성시험보다 민감한 영향을 보였으며 (t-test, 1-tail, <0.05), 물질별로는 Copper>Nickel>Phenol>2-propanol 순으로 독성영향이 나타났다.

중민감도분포곡선을 활용하여 HC₅를 산출하였다. 국외종의 독성값을 확보하여 국내종 결과와 비교하였으며, 중별 민감도와 시험 조건 등의 영향으로 HC₅ 결과값의 차이가 나타났다. 결정론적 방법과 확률론적 방법을 이용하여 예측무영향농도(PNEC)를 산출하였으며, 결정론적 방법은 단일 생물종의 결과값으로 인하여 불확실성이 높은 것으로 판단되며, 확률론적 방법을 활용하여 독성기준 및 배출기준 준거치로 활용하기 위해서는 신뢰성 높은 독성자료와 충분한 독성자료가 필요할 것으로 판단된다.

따라서, 해양산업시설 배출물질의 관리 및 배출기준 설정을 위한 수질 근거 준거치 및 독성 기준치 도출을 위하여 국내 해양 생물종의 특성에 맞는 생태독성평가와 위해성평가가 필요할 것이며, 향후 중민감도분포곡선과 환경농도곡선(ECD)을 이용한 결합확률곡선 도출 및 점원 배출량 등을 확보하여 필요에 따라 지역 특이적 위해성평가도 수행되어야 할 것이다.

또한, 배출 후보물질 및 중점관리물질을 대상으로 추가적인 국내종 독성자료구축이 필요하며, 민감도가 높고 만성독성시험에 유용한 국내 해양 독성시험종 개발이 필요할 것으로 판단된다.

후 기

이 논문은 2022년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구입니다(20210660, 해양산업시설 배출 위험유해물질 영향평가 및 관리기술 개발).

References

[1] Anderson, D.R. and Burnham, K.P., 2002, Model selection and multi-model inference: a practical information-theoretic approach, Springer, New York, 2nd Ed, 488.
 [2] ASTM (American Society for Testing and Materials), 2012, Standard Guide for Acute Toxicity Test with the Rotifer *Bra-*

chionus, USA, 1440-91(E), 8.
 [3] ASTM (American Society for Testing and Materials), 2012, Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae, USA, 1218-04(E), 14.
 [4] Cowgill, U.M., Milazzo, D.P. and Landenberger, B.D., 1989, Toxicity of nine benchmark chemicals to *Skeletonema costatum*, a marine diatom, Environ. Toxicol. Chem., 8(5), 451-455.
 [5] ECHA (European Chemicals Agency, ECHA substance information, <https://echa.europa.eu/>, 2022 (accessed 2022.09.20).
 [6] EPA (Environmental Protection Agency), 2001, Interlaboratory Variability Study of EPA Short-term Chronic and Acute Whole Effluent Toxicity Test Methods, 1200 Pennsylvania Avenue NW Washington, DC 20460, EPA 821-B-01-004, 153.
 [7] EPA (Environmental Protection Agency), 2002, Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 1200 Pennsylvania Avenue NW Washington, DC 20460, EPA 821-R-02-012, 43.
 [8] EPA (Environmental Protection Agency), CompTox Chemicals Dashboard, <https://comptox.epa.gov/dashboard/>, 2022a (accessed 2022.09.20.)
 [9] EPA (Environmental Protection Agency), The ECOTOX (ECOTOXicology) database, http://www.epa.gov/ecotox/ecotox_home.htm, 2022b (accessed 2022.09.20.)
 [10] EPA (Environmental Protection Agency), 2022c, Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v 4.11. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
 [11] EPA (Environmental Protection Agency), 2022d, National Recommended Water Quality Criteria, <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table>, 2022d (accessed 2022.10.24.).
 [12] EC (European Commission), 2003, Technical Guidance Document on Risk Assessment, Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substance, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substance, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market Part II, 328.
 [13] Frampton, G.K., Jänsch, S., Scott-Fordsmand, J.J., Römbke, J. and Van den Brink, P.J., 2006, Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: a review and analysis using species sensitivity distributions, Environ. Toxicol. Chem., 25(9), 2480-2489.
 [14] Hwang, U.K., Ryu, H.M., Lee, J.W., Lee, S.M. and Kang, H.S., 2014, Toxic effects of heavy metal (Cd, Cu, Zn) on population growth rate of the marine diatom (*Skeletonema costatum*), Korean J. Environ. Biol., 32(3), 243-249.
 [15] IMO (International Maritime Organization), 2017, International convention for the control and management of sheep's ballast water and sediment, 2004, Methodology for information gathering and conduct of work of the GESAMP-BWWG, BWM.2/Circ.13/Rev.4, 97.

- [16] IMO (International Maritime Organization), 2016, Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*, Geneva Switzerland, ISO10253, 19.
- [17] Jang, W.K., Mok, J.Y., Lee, J.H., Han, K.W., Choi, S.B. and Kang, W.S., 2021, The Implications to upgrade the HNS Discharge Control Policy from Coastal Plants based on Domestic and Foreign Experiences and Cases, Korean Soc. Mar. Environ. Saf., 114-118.
- [18] Kim, J.H., Shin, J.S., Kim, S.J., Lee, J.Y., Lee, Y.S. and Yu, S.J., 2011, Manual of Standard Technological Assessment for Establishment of Individual Wastewater Limitations on each Industrial Facility, National Institute Of Environmental Research, 53.
- [19] Kim, K.W., Ryu, K.W., Lee, M.J. and Kang, W.S., 2018a, A study on the necessity of strengthening HNS discharge regulation at offshore facilities and amendment of regulation law, J. Korean Soc. Mar. Environ. Energy, 37-48.
- [20] Kim, T.W., Moon, C.H., Park, M.O., Jeon, M.H. and Son, M.H., 2018b, A Study on Marine Ecological Risk Assessment of Ballast Water Management Technology Using the Sodium Dichloroisocyanurate (NaDCC) Injection Method, Korean Soc. Mar. Environ. Saf., 24(2), 203-214.
- [21] KRISO (Korea Research Institute of Ships and Ocean Engineering), 2021, A Study on the Distribution Characteristics of HNS Substances in the Sea Area around Marine Industrial Facilities, 253.
- [22] Lee, M.J., Kim, K.W. and Kang, W.S., 2021, A Study on the Necessity and Direction of Regulations on the Emission of Hazardous and Noxious Substances from Marine Industrial Facilities, Korean Soc. Mar. Environ. Saf., 27(6), 737-743.
- [23] Lee, S.M., Park, G.S., An, K.H., Park, S.Y. and Lee, S.H., 2008, Application of the Ecotoxicological Standard Method using Population Growth Inhibition of Marine Phytoplankton, The Sea, 13, 112-120.
- [24] MOF (Ministry of Oceans and Fisheries), 2015a, Establishment of a comprehensive management system for marine discharge of waste (XI), Final report, Ministry of oceans and fisheries, 752.
- [25] MOF (Ministry of Oceans and Fisheries), 2015b, White Paper on Marine Environment Standards, 128.
- [26] MOF (Ministry of Oceans and Fisheries), 2021a, Korean Standard Method for Marine Environment, Korean Standard Method for marine wastes, National Institute of Fisheries Science, 2021-7, 20210715, 102.
- [27] MOF (Ministry of Oceans and Fisheries), 2021b, Korean Standard Method for Marine Environment, Korean Standard Method for marine organisms, National Institute of Fisheries Science, 2021-6, 20210518, 188.
- [28] OECD (The Organization for Economic Co-operation and Development), 1998, Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sacrify Stages, Paris France, OECD/OCDE212, 20.
- [29] Peterson, S.M. and Stauber, J.L., 1996, New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 56(5), 750-757.
- [30] Rader, N.E., Cossman, J.S. and Porter, J.R., 2012, Fear of crime and vulnerability: Using a national sample of Americans to examine two competing paradigms, 40(2), 134-141.
- [31] Snell, T.W., Moffat, B.D., Janssen, C. and Persoone, G., 1991, Acute toxicity tests using rotifers. III. Effects of temperature, strain, and exposure time on the sensitivity of *Brachionus plicatilis*, Environ. Toxicol. Water. Qual., 6(1), 63-75.
- [32] Thorley, J. and Schwarz, C., 2018, ssdtools: An R package to fit species sensitivity distributions, J. Open Source Softw., 3(31), 2.
- [33] Wheeler, J.R., Grist, E.P.M., Leung, K.M.Y., Morritt, D. and Crane, M., 2002, Species sensitivity distributions: data and model choice. Mar. Pollut. Bull., 45, 192-202.
- [34] Wilson, W.B. and Freeberg, L.R., 1980, Toxicity of metals to marine phytoplankton cultures. Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, EPA-600/3-80-025, 92.
- [35] Wu, J., Yan, Z., Yi, X., Lin, Y., Ni, J., Gao, X., Liu, Z., Shi, X., 2016, Comparison of species sensitivity distributions constructed with predicted acute toxicity data from interspecies correlation estimation models and measured acute data for Benzo [a] pyrene, Chemosphere, 144, 2183-2188.

Received 21 September 2022

1st Revised 17 October 2022, 2nd Revised 24 October 2022

Accepted 26 October 2022