

## 몇가지 인공토양에서 사육한 *Lumbricus rubellus*와 *Eisenia foetida*의 성장인자의 차이

이성규

### A Comparison of Growth and Reproduction of *Lumbricus rubellus* and *Eisenia foetida* Cultured in Three Kinds of Artificial Soil Substrates

Sung-Kyu Lee

#### Abstract

The standardization of test procedures and reproducibility of the toxicity data are prerequisite for the toxicity testing with the earthworm culturing in the laboratory. No in-depth study on culturing conditions of earthworms has been conducted in Korea, even of massive cultural practice is common for composting and production of biochemicals. The earthworms, *Lumbricus rubellus* and *Eisenia foetida*, were cultured in three kinds of artificial soil substrates (I, II and III) based on the OECD Guideline, which consist of different ratios of components (sand, sphagnum peat and kaolinite), and fed with a mixture of grain powders. During the period of culturing, the body weight and reproduction parameters were measured. *L. rubellus* showed the best results for increasing body weight and cocoon production in the artificial soil substrate(I) compared with *E. foetida*. The cocoon production was significantly high in both species cultured in the artificial soil substrate(I) among the three kinds of soil substrates, but the cumulative cocoon production of *L. rubellus* was 11 cocoon per worm compared with 3.7 cocoons per worm of *E. foetida*. *L. rubellus*, therefore, was more prolific than *E. foetida* in these culture schemes. The cumulative mortality in both species was less than 10%, and the number of juvenile worms per cocoon ranged from 1.5 to 2.3 and thus did not show any relationships with soil substrates or species. From these data, the culture of *L. rubellus* in the laboratory could be standardized, but for *E. foetida*, further study would be necessary to establish the optimal growth conditions in the laboratory.

## 서론

농약 및 산업용 화학물질들은 직접 살포, 사고에 의한 유출, 폐기물 및 폐수 등을 통해서, 환경계에 유입되어 최종적으로 물과 토양에 이르게 된다. 그런데 토양의 경우는 서식하는 생물량이 다른 생물계에 비하여 크게 반하여, 유입된 오염물질의 회색 능력은 낮고, 오염물질의 처리장(sink)으로서의 역할은 매우 크다<sup>1)</sup>. 따라서 토양오염이 점차 심화, 확대되어 토양생태계가 가지고 있던 생산성과 건강성이 많이 훼손됨에 따라, 1980년 초부터 EEC와 OECD를 중심으로 하여 농약과 화학물질을 사용하기 이전에, 토양생물에 대한 독성을 평가하도록 하고, 대표적 지표생물로서 지렁이(earthworm)를 선정하였으며<sup>2)</sup>, 미국에서는 폐기물 특히, 산업용 폐기물에 의한 토양오염의 정도를 평가하고, 관리하는 총체적 지표로서, 지렁이를 활용하고 있는 실정이다<sup>3,4)</sup>. 지표생물로서 지렁이는 토양생물중에서 생물량이 가장 많고, 유기물의 분해, 토양물리력의 향상, 영양물질의 순환 등에서 중요한 역할을 담당하기 때문에, 화학물질의 지렁이에 대한 독성평가는, 지렁이 군집에 대한 영향뿐만 아니라, 토양생태계의 건강성(healthness)을 확보하고, 지렁이를 먹이로 하는 야생조류를 보호한다는 면에서 중요하다고 하겠다.

그런데 지렁이 독성시험방법에 대해서는 OECD에서 표준적인 시험방법이 제안되고 있으나<sup>1)</sup>, 시험종의 사육에 대해서는 명시되어 있지 않고, 다만 OECD Guideline에서 가축분과 peat를 1:1로 섞어 사용토록 하고 있으나, 항생물질에 의한 오염문제 및 다루기 어려운 문제 때문에 Shell이나 Zeneca에서는 원예용 부엽을 배지로 하고, 아침식사용 cereal을 먹이로 하여, 실험실에서 재현성 있게 사육하고 있다. 그러나 국내에서는 독성시험용으로 지렁이가 사육된 예가 없고, 사육과정은 결과의 재현성과 신뢰성에 밀접한 관계가 있기 때문에, 지렁이의 사육과정은 표준화되어야 하고, 조성들이 잘 밝혀져야 한다. 이러한 관점에서 볼 때, 지렁이를 실험실

에서 재현성 있게 사육하는 일은 지렁이 독성시험 방법을 확립하는데 선결되어야 하는 문제이기 때문에, 본 연구에서는 국내의 여건을 감안하여 실험실에서 지렁이를 재현성 있게 사육하는 방법을 찾아 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시생물

본 시험에서는 붉은지렁이(*Lumbricus rubellus*)와 줄지렁이(*Eisenia foetida*)를 사용하였다. 붉은지렁이는 1993년 본연구소 인근에서 양식하고 있는 것을 구입하여, 본 연구실에서 계대사육중인 것을 사용하였고, 줄지렁이는 영국 ICI Agrochemicals(현재 ZENECA Agrochemicals)에서 분양받아 계대사육중인 것을 사용하였다.

### 2. 인공토양(artificial soil)

본 시험에 사용한 인공토양은 OECD Guideline에서 제시한 방법<sup>1)</sup>을 기본으로 하여, 다음 표 1과 같이 세 가지로 조제하여 사용하였다.

Table 1. The composition of artificial soil substrates. (% , dry weight basis)

Substrates	Sphagnum Peat*1	Kaolinite*2	Sand*3	pH*4
Artificial Soil I	10	20	70	6.78
Artificial Soil II	20	18	62	6.81
Artificial Soil III	40	14	46	6.62

\*1 : Grower Mix (Canada).

\*2 : 성산실업.

\*3 : Particle size between 50 and 200 microns.

\*4 : pH is adjusted by addition of calcium carbonate.

### 3. 실험과정

조제된 인공토양 I, II, III을 100g(건중량 기준)

씩 플라스틱 상자(폭 10cm × 길이 13cm × 높이 7.5cm : 인공토양 I 과 II, 폭 10.5cm × 길이 15.5cm × 높이 9.5cm : 인공토양 III)에 넣고, 어린 붉은지렁이(44 ~ 46 mg/마리)와 줄지렁이(38 ~ 45 mg/마리)를 각각 10마리씩 넣은 다음(3 반복), 증류수로 수분을 30%로 맞추었다. 먹이는 현미가루 45%, 엿기름 20%, 보리가루 35%를 섞어서, 증류수로 죽을 만들어, 주 1회 유리판에 붙여 인공토양 위에 얹어 주었는데, 2개월마다 먹이량을 늘려 주었다. 인공토양은 2개월마다 50g씩 늘려 교체해 주고, 수분은 주 2회 감소한 양만큼 보충해 주었다. 사육은 조도 400 ~ 600 Lux로 계속 조명되고, 온도 20±1°C로 조절되는 항온기에서 하였다. 관찰은 2주마다 실시하여 지렁이 무게, 치사개체수 및 난포수(cocoon)를 조사하였고, 결과는 일원배치 분산분석을 실시하고, p < 0.05인 경우, Duncan 검정법을 이용하여 처리간 유의차를 조사하였다<sup>5)</sup>.

**결과 및 고찰**

**1. 인공토양 조성에 따른 지렁이의 생체량 변화**

인공토양 I, II와 III에서 사육한 지렁이 생체량

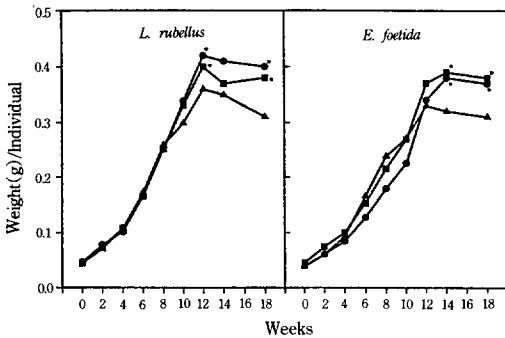


Fig. 1. The growth of *L. rubellus* and *E. foetida* grown in the different soil substrates. (\*P<0.05)

- : artificial soil I
- : artificial soil II
- ▲—▲ : artificial soil III

의 변화를 보면 그림 1과 같다. 그림 1에서 보는 바와 같이, *L. rubellus*는 사육 약 12주에 생체량이 428 mg(I), 394 mg(II) 및 343 mg(III)으로 각 처리 공히 정점에 도달하였고, 그 이후에는 별 변화가 없거나, 다소 감소하는 경향(III)을 보였다. 인공토양에 있어서는 I > II > III의 순서로 생체량이 컸고, 인공토양 I 과 III 간에는 P<0.05 수준에서 유의성이 인정되므로, *L. rubellus*를 사육하는 데는 인공토양 I의 조성으로 배지를 만드는 것이, 생체량 증가면에서 가장 유리할 것으로 판단된다. 그런데 일반적으로 독성시험에서는 지렁이의 생체량이 300 ~ 600mg인 것을 사용하는데<sup>1)</sup>, 만일 이러한 배지 조건에서 지렁이를 사육한다면, 난포(cocoon)에서 부화후 약 10주이상 경과하면, 독성시험에 사용할 수 있는 크기의 지렁이를 생산할 수 있을 것이다.

*E. foetida*는 그림 1에서와 같이, 사육 14주후 되는 시점에서 생체량이 377mg(I), 389mg(II) 및 315mg(III)으로 각 처리 공히 정점에 달하였고, 그 이후에는 다소 감소하는 경향을 보였다. 인공토양간에는 II > I > III의 순으로 생체량이 컸고, 사육 20주 후에는 인공토양 I 과 II의 생체량이 인공토양 III의 생체량에 비해서 p<0.05 수준에서 유의성이 인정되었다. 그러므로 *E. foetida*는 인공토양 I 과 II를 배지로 했을 때, 생체량의 차이가 거의 없으므로, 비록 절대적인 생체량은 인공토양 II에서(그림 1) 가장 좋았지만, *L. rubellus*와 동시에 사육할 경우에는 작업의 편의성을 고려하여, 인공토양 I을 사육배지로 선택하는 것이 합리적이라고 생각된다. 그리고 *E. foetida*를 이 배지에서 사육하는 경우, 독성시험에 사용할 수 있는 크기의 성체(300 mg 이상)를 생산하는 데는 난포에서 부화후 약 12주 이상이 소요될 것으로 예측된다. 한편 Neuhauser와 Callahan이 동일종에 대하여 마분(horse manure)으로 사육한 결과, 약 8~9주일만에 생체량이 410~570mg에 도달했다는 연구결과<sup>6)</sup>와 비교해 보면, 본 실험에서 *E. foetida*의 생체량 증가는 늦은 것으로 판단된다. 이는 본 사육조건(배지 및 먹이)이 이 종의 사육에 최적조건이 아님을 보여주는 것

이고, 아울러 먹이, 배지 및 생육조건이 다르면, 지렁이의 생육이 크게 다르다는 기존의 결과<sup>7,8)</sup>들을 확인시켜 주는 것이다.

2. 난포(cocoon)생산량

인공토양 조성에 따른 *L. rubellus*와 *E. foetida*의 난포생산 시기를 보면(그림 2), 두종 모두 사육을 시작한 후 12주만에 난포가 관찰되었는데, 시험에 사용한 지렁이의 생육기간(약 3~4주)을 감안하면, 난포에서 부화한 후 약 15~16주부터, 본 시험배지에서 사육한 지렁이가 난포를 생산하는 것으로 판단된다.

그런데 *L. rubellus*의 경우는 연구된 자료가 없어 비교할 수 없었으나, *E. foetida*는 25°C에서 사육하면 약 4~6주후에 성적으로 성숙하여 난포를 생산하고, 사육환경에 따라서는 7~10주 정도 소요된다는 연구결과<sup>7)</sup>와 비교해 보면, 난포생산이 상당히 늦는데, 지렁이의 성적 성숙, 난포생산 등은 사육환경에 따라 크게 좌우되므로, 이 종을 사육하는 데는 본 실험에서의 배지 조성과 먹이가 적합하지 않은 것으로 보인다. 배지종류별로 난포 생산량을 보면(그림 2), *L. rubellus*의 경우 인공토양 I과 II에

서는 시험종료시까지 계속 증가하였으나, 인공토양 III에서는 사육한 지 16주 이후에는 다소 감소하는 추세를 보였고, 매 조사시점 공히, 인공토양 I과 II에서의 누적난포생산량이 인공토양 III에서의 생산량보다 유의하게 많았다( $p < 0.05$ ). 처리종료 후인, 24주 후의 지렁이 한 마리당 평균누적난포생산량을 보면, 인공토양 I이 11.0개, 인공토양 II가 9.8개, 인공토양 III이 5.5개로, 인공토양 I에서 사육한 지렁이의 난포생산량이 가장 많았다. *E. foetida*의 처리간 평균 누적난포생산량(24주후)을 보면, 인공토양 I에서 3.7개, 인공토양 II에서 3.5개, 인공토양 III에서 1.6개로, 인공토양 I, II에서의 생산량이 인공토양 III에 비해서 유의하게 많았다( $p < 0.05$ ). 그런데 Neuhauser와 Callahan의 연구결과에 따르면<sup>6)</sup>, 1주당 지렁이 한마리가 생산하는 난포수는 0.86~1.09개로, 본 연구결과의 주당 생산난포수인 0.13~0.31개 보다 훨씬 높은데, 이는 먹이, 사육온도, 사육밀도 등의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 그리고 가장 많은 난포생산량을 보인 인공토양 I에서, *L. rubellus*와 *E. foetida*의 난포생산량을 비교해 보면, *L. rubellus*의 경우가 약 3배 높은 것으로 보아, 본 실험조건과 같은 사육배지와 먹이조건은 *L. rubellus*를 사육하는데 더 적합한 것으로 사료된다.

3. 누적 치사율

각 인공토양 I, II 및 III에서 24주 동안 사육하면서, 관찰한 두 시험종의 누적 치사율을 보면 표 2와 같다. 처리별 치사율은 *E. foetida*가 다소 높으

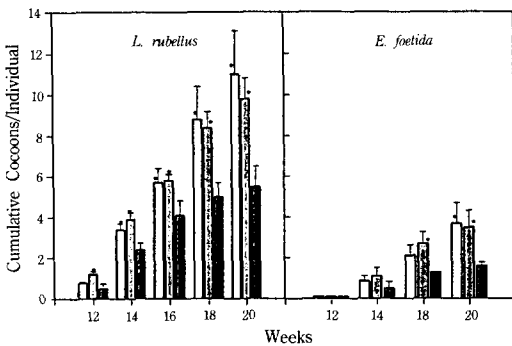


Fig. 2. The cumulative cocoon production of *L. rubellus* and *E. foetida* grown in the different soil substrates. (\* $P < 0.05$ )

- : artificial soil I
- ▨ : artificial soil II
- ▩ : artificial soil III

Table 2. The cumulative mortality of *Lumbricus rubellus* and *Eisenia foetida* in the different soil substrates.

Substrates	Mortality (%)	
	<i>L. rubellus</i>	<i>E. foetida</i>
Artificial Soil I	0	6.7
Artificial Soil II	3.3	3.3
Artificial Soil III	0	3.3

나, 그 차이는 무시할 정도이고, 전반적으로 보아, 치사율이 0 ~ 6.7% 이므로, 일반적인 독성시험에서 요구되는 대조군에서의 치사율<sup>1)</sup> 10% 보다 낮기 때문에, 인공토양 I, II 및 III에서 지렁이를 사육할 경우, 치사의 문제는 없을 것으로 판단된다.

4. 난포당 부화지렁이 수

난포당 부화된 지렁이 수는 인공토양 III의 경우가 인공토양 I, II에 비하여 적으나, 그 차이는 크지 않았다.(표 3) 평균적인 부화 지렁이 수를 보면, *L. rubellus*의 경우가 1.8 ~ 2.2개, *E. foetida*가 1.5 ~ 2.2개로 두 종간에는 큰 차이가 없었다. 문헌에 의하면<sup>8)</sup>, 사육조건에 따라 난포당 부화지렁이의 수가 달라, *E. foetida*는 1.6 ~ 3.6마리, *L. rubellus*는 대개 1 ~ 2마리의 지렁이가 부화된다고 한다. 즉, 사육조건에 양호하면 *E. foetida*의 경우는 1개의 난포에서 나오는 지렁이의 수가 더 많음을 알 수 있다. 그런데 *L. rubellus*의 경우는, 본 시험의 결과와 문헌상의 결과가 대체로 일치하므로, 본 시험에서의 배지와 먹이가 비교적 적합하다고 판단되지만, *E. foetida*의 경우는 난포당 부화마리수를 보더라도, 생육 최적조건에는 미치지 못하는 것으로 생각된다.

Table 3. The number of juvenile worm/cocon from cocoons produced by worms grown in the different soil substrates.

Substrates	No. of juvenile worm per cocoon	
	<i>Lumbricus rubellus</i>	<i>Eisenia foetida</i>
Artificial Soil I	1.9±0.08*	2.1±0.25
Artificial Soil II	2.3±0.09	2.0±0.09
Artificial Soil III	1.8±0.05	1.5±0.36

\* Mean ± SD

요 약

육상생태계에서 농약 및 일반화학물질의 환경생

태독성을 평가할 때, 중요 항목으로 지렁이(earthworm)에 대한 독성시험 자료가 필요하다. 그런데 국내에서 지렁이 독성시험을 할 때, 가장 문제가 되는 점은, 독성시험을 목적으로 사육하는 지렁이가 없어, 결과의 신뢰성에 다소 문제가 있다. 따라서 본 연구에서는, 독성시험에 사용하는 종인 *Lumbricus rubellus*, *Eisenia foetida*를 실험실에서 사육할 수 있도록, 사육배지의 조성을 달리하여 성장인자의 차이를 조사하였다. 사육배지는 OECD Guideline에서 제시한 인공토양을 기본으로 하여(인공토양 I), 조성을 달리한 인공토양 II와 III을 사용하였고, 먹이는 같게 공급하였다. 결과는 다음과 같다.

1) 지렁이 생체량은 *L. rubellus*의 경우, 인공토양 I에서 가장 양호하였고, *E. foetida*는 인공토양 I과 II에서 양호하였으므로, 이 두종을 함께 사육하는 경우는 인공토양 I의 조성을 가진 배지에서 사육하는 것이 생체량의 증가면에서는 유리할 것이다.

2) 누적난포(cocoon) 생산량은 두종 모두 인공토양 I에서 가장 많았고, *L. rubellus*는 *E. foetida*에 비하여 약 3배 많이 생산하였으므로, 본 실험에서의 사육조건은 *L. rubellus*에게 더 적합한 것으로 판단된다.

3) 누적치사율은 모든 처리 토양에서 두종 모두 10% 이하로 낮았다.

4) 난포당 부화된 지렁이 수는 1.5 ~ 2.3 마리로 종간 및 토양처리에 따른 차이에 크지 않았다.

따라서 위의 두종을 실험실에서 사육하는데는 *L. rubellus*의 경우 인공토양 I의 배지로 해서, 현재의 먹이를 공급해 주면, 비교적 잘 사육할 수 있으나, *E. foetida*의 경우는 사육배지뿐만 아니라, 먹이에 대한 문제도 검토되어야 할 것이다.

감사의 말씀

*Eisenia foetida*를 분양해 준 영국 Zeneca Agrochemicals 관계자에게 심심한 사의를 표하고, 아울러 지렁이 사육 및 본 연구의 수행에 귀중한 일을 기여하여 도와주신, 본 연구실의 윤희길 주임께 감사드린다.

참고문헌

1. OECD (1993). Earthworm acute toxicity tests, 207, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD, Paris.
2. Edwards P. J. and Coulson, J. M. (1992). Choice of earthworm species for laboratory tests, *Ecotoxicology of Earthworms*, Intercept Ltd., U. K., p. 36-43.
3. Callahan, C. A. and Linder, G. (1992). Assessment of contaminated soil using earthworm test procedures, *Ecotoxicology of Earthworms*, Intercept Ltd., U. K., p. 187-196.
4. Hichs, W. W., Parkhurst, B. R., and Baker, S. S. Jr. (1988). Ecological assessments of hazardous waste sites: A field and laboratory reference document, U. S. EPA Contract No. 68-03-3439.
5. SAS Institute Inc. (1991). Version 6.04, SAS Institute Inc.
6. Neuhauser, E. F. and Callahan, C. A. (1990). Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to sublethal concentrations of organic chemicals, *Soil Biol. Biochem.*, **22**(2) : 175-179.
7. Hartenstein, R., Neuhauser, E. F., and Kaplan, D. L. (1979). Reproductive potential of the earthworm *Eisenia foetida*, *Oecologia*, **43** : 329-340.
8. 국립환경연구원 (1992). 토양생물을 이용한 유기성 슬러지 처리기술 개발에 관한 연구(I), 과학기술처.