

붉은지렁이(*Lumbricus rubellus*)를 이용한 농약의 급성독성 시험법 개발

박연기* · 박경훈 · 김병석 · 경기성 · 신진섭 · 오병렬

농업과학기술원 농약안전성과

요약 : 국내 널리 사육되고 있는 지렁이를 이용한 농약의 급성독성 시험법을 개발하기 위하여 붉은지렁이(*Lumbricus rubellus*)를 이용한 독성 시험 조건을 설정하고 이 조건에서 원예용 살균제에 대한 급성독성시험을 수행하였다. OECD guideline에서 추천하고 있는 인공토양(artificial soil)에서 환경조건을 달리하여 시험한 결과 붉은지렁이의 최적 시험 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, pH는 7 ± 1 , 그리고 토양 수분함량은 40%이었다. 위의 설정된 시험조건에서 4종의 원예용 살균제에 대하여 14일간 급성독성시험을 수행한 결과, 가벤다수화제, 베노밀수화제, 지오판수화제, 치아벤다졸수화제에 대한 지렁이의 반수치사농도(LC₅₀)는 각각 59, 53, 64, 36 mg/kg건토 이었다. 또한 붉은지렁이의 실내사육이 용이하고 14일간의 급성독성 시험기간 동안 대조군에서 치사 및 이상증상을 보이지 않았을 뿐만 아니라 농약의 농도 수준에 따른 독성반응 차이가 명백히 나타나 붉은지렁이를 이용한 농약의 급성독성평가가 가능하였다.(2000년 11월 10일 접수, 2000년 11월 30일 수리)

Key words : *Lumbricus rubellus*, earthworm, acute toxicity test method, artificial soil, pesticide.

서 론

지렁이는 생태적으로 육상생태계의 food chain 중 가장 아래에 위치하며, 토양내 유기물 분해와 토양 물리력을 향상시켜 토양 비옥도를 높이고 토양의 생산성과 건강성을 증진시키기 때문에 지렁이 서식밀도는 토양생태계의 다양성 유지에도 아주 중요하다(Darwin, 1881).

또한 지렁이는 세계적으로 분포하고 일반적으로 토양생물 중 가장 많이 서식하며, 토양 오염에 쉽게 해를 받는다(Edwards와 Thompson, 1973). 따라서 1980년 초부터 유럽 여러 나라와 OECD를 중심으로 농약 사용 이전에 환경생태독성을 평가하기 위하여 토양 생물중 지표종인 지렁이에 대한 독성시험 성적을 요구하고 있고(OECD, 1993), 국내에서도 농약, 유해화학물질 및 산업폐기물에 대한 토양오염을 방지하고 평가하기 위한 지표로서 지렁이에 대한 독성시험을 요구하고 있다(농촌진흥청, 2000, 환경부, 1996). 그러나 국내(농촌진흥청, 2000) 및 OECD(OECD, 1984)의 표준시험법에서 시험종으로 제시하고 있는 추천종인 줄지렁이(*Eisenia fetida*)는 국내 독성시험용으로 사육되지 않고 있다. 또한 OECD guideline에서 제안한 인공토양(artificial soil)에서 줄지렁이(*Eisenia fetida*)와 국내 대량 사육되고 있는 붉은지렁이(*Lumbricus rubellus*)간의 성장인자 차이 구명 실험을 통하여 줄지렁이보다 붉은지렁이의 사육이 더 용이한 것으로 보고되고 있다(이, 1995).

따라서 본 연구에서는 국내 대량 사육종인 붉은지렁이를 이용한 농약의 급성독성시험법을 개발하기 위하여 붉은지렁이에 대한 독성 시험 조건을 설정하고 시험법에 따라 4종의 원예용 살균제에 대한 14일간 급성독성시험을 수행하였으며, 아울러 환경추정농도를 산출하여 환경 위해성을 평가하였다.

재료 및 방법

시험 약제 및 대조물질

지렁이에 대한 농약의 급성독성 시험시 사용한 원예용 살균제인 가벤다수화제(60%), 베노밀수화제(50%), 지오판수화제(70%), 그리고 치아벤다졸수화제(60%)는 시중 농약상에서 구입하였고, 대조물질 chloroacetamide는 Sigma사(USA)에서 구입하여 사용하였다.

시험생물 및 시험토양

이 시험에 사용된 붉은지렁이는 농업과학기술원 농업생태과에서 분양받아 실험실에서 적응시킨 지렁이중 체중이 300~600 mg인 개체를 실험에 사용하였다. 또한 시험에 사용된 지렁이 사육용 토양은 OECD guideline 207(OECD, 1984)에서 제시한 방법에 따라 표 1의 재료를 건조량을 정확한 비율로 혼합기로 완전히 혼합 후 증류수를 가하여 수분함량 조절한 후 사용하였다.

Table 1. Composition of the artificial soil for culturing earthworms

Sphagnum peat	10%
Kaolin clay (kaolinite content above 30%)	20%
Industrial sand (particle size 0.05~0.2 mm)	69%
CaCO ₃	1%

최적 사육조건 설정시험

시험토양 조제방법에 따라 혼합기로 균일하게 혼합한 인공토양 500 g에 증류수를 가하여 수분함량을 조절하고 이를 다시 혼합기로 혼합후 유리용기(내경 14 cm×높이 13

*연락처

cm)에 담았다. 각 용기마다 10마리씩의 붉은지렁이(300~600 mg/마리)를 투입하여 토양 수분함량은 5수준(10, 20, 30, 40, 50%), 토양 pH는 4수준(pH 5, 6, 7, 8), 그리고 온도는 6수준(18, 20, 22, 24, 26, 28°C)으로 달리하여 사육하였으며, 처리구당 4반복씩 시험하였다. 용기는 통풍구멍이 뚫린 플라스틱필름으로 덮어 수분 건조를 막았으며, 수분은 최초 시험시작시 측정된 무게를 기준으로 감소한 만큼 매일 보충하였다. 조도는 400~800 lux로 시험기간내 점등하였으며, 먹이는 시험시작과 1주일후에 우분을 공급하였다.

급성독성시험 방법

붉은지렁이에 대한 시험농약의 반수치사농도를 구하기 위하여 시험토양 500 g에 각 시험농약을 농도별로 처리하여 골고루 섞은 후 최적사육 조건 설정시험 결과에 따라 수분함량은 증류수를 가하여 40%, pH는 CaCO₃로 pH 7 ± 1로, 온도는 22 ± 2°C로 조절하고 혼합기로 혼합후 유리 용기(내경 14 cm × 높이 13 cm)에 담았다. 각 용기마다 10마리씩의 붉은지렁이(300~600 mg/마리)를 투입하고 용기는 통풍구멍이 뚫린 플라스틱필름으로 덮어 수분 건조를 막았으며, 수분은 최초 시험시작시 측정된 무게를 기준으로 매일 감소한 만큼 보충하였다. 조도는 400~800 lux로 시험기간내 점등하였으며, 먹이는 시험기간중 주지 않았다. 붉은지렁이의 최적사육조건(표 2)에서 시험농약과 대조물질을 각각 0.1, 1, 10, 100, 1,000 mg/kg되게 처리한 인공토양에 시험생물을 투입하여 14일간 사육한 후 치사율에 따라 시험농도를 설정하였다. 시험은 농도별로 4반복씩 처리하였으며, 14일후 생체량과 치사수를 조사하여 probit 분석법에 의하여 반수치사농도를 산출하였다.

결과 및 고찰

사육온도별 지렁이의 생체량(biomass) 변화

인공토양(artificial soil)에서 붉은지렁이를 14일간 사육하였을 때 사육온도별 지렁이의 생체량 변화는 그림 1에서 보는 바와 같이 18°C와 26°C에서는 생체량 변화가 거의 없으나 20~24°C에서 생체량이 증가하여 이 온도를 최적 사육온도로 선정하였다. Lofs-Holmin(1982)은 인공토양에서 지렁이를 사육할 때 지렁이의 종에 따라 최적온도가 다

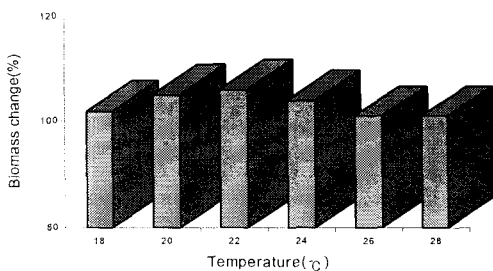


Fig. 1. Effect of temperature on the biomass change of earthworms during the 14-day of culture in artificial soil.

르고 생체량도 차이가 난다고 하였으며, Edwards와 Coulson(1992)은 지렁이에 대한 농약의 독성이 온도에 따라 다르게 나타난다고 보고하였다.

pH별 지렁이의 생체량의 변화

CaCO₃를 가하여 pH를 각기 다르게 조절된 인공토양에서 14일간 사육하였을 때 붉은지렁이의 생체량 변화는 그림 2에서 보는 바와 같이 pH 5에서는 생체량이 감소하였으나 pH 6~8에서 생체량이 증가를 하였다. 이 결과는 Lofs-Holmin(1986)이 pH 4.5~7 범위의 토양에서 지렁이를 사육하였을 때 붉은지렁이는 pH 6.5 이상에서 일정한 개체수가 유지되었다는 보고와 유사하였다.

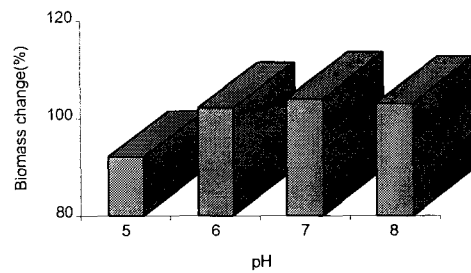


Fig. 2. Effect of pH on the biomass change of earthworms during the 14-day of culture in artificial soil.

수분 함량별 지렁이 생체량의 변화

수분함량이 각기 다른 인공토양에서 14일간 사육한 후 붉은지렁이의 생체량 변화는 그림 3에서 보는 바와 같이 수분함량이 40%인 시험구에서 높은 생체량이 증가 하였으나 수분함량이 20% 이하에서는 모두 치사하였다. 이 결과는 환경요인별 지렁이에 대한 농약의 독성시험 결과 수분함량이 가장 중요한 인자였으며, 수분함량을 최대용수량의 50%와 80%로 조절된 인공토양에서 지렁이를 사육하였을 때 수분함량이 높은 처리구에서 생체량이 증가를 하였다는 Bauer와 Rombke(1997)의 연구보고와 유사하였다.

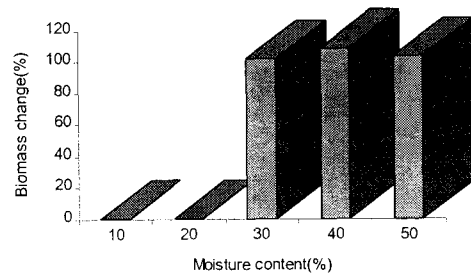


Fig. 3. Effect of moisture content on the biomass change of earthworms during the 14-day of culture in artificial soil.

급성 독성 시험조건 설정

인공토양의 pH와 수분함량 및 사육온도가 다른 조건에서 붉은지렁이를 14일간 사육하여 biomass를 기준으로 설정된 붉은지렁이의 최적 사육조건은 표 2와 같으며, 이 조건에서 독성시험을 수행하였다. 붉은지렁이의 최적 사육조건은 지렁이에 대한 표준독성시험법을 제시하고 있는 OECD guideline에서 추천하는 줄지렁이의 시험 조건과 큰 차이가 나지 않는데는 이는 붉은지렁이와 줄지렁이가 같은 과(Family)에 속하기 때문인 것으로 추정된다(Sims와 Gerard, 1985).

Table 2. Test conditions for evaluating the acute toxicity of the pesticides using earthworms(*Lumbricus rubellus*)

Factor	Test conditions
Species	<i>Lumbricus rubellus</i>
Soil	Artificial soil
Temperature	22 ± 2°C
Soil moisture	40%
pH	7 ± 1
Light intensity	400~800 lux

처리농도 설정시험(Range finding test)

붉은지렁이에 대한 반수치사농도를 구하기 위한 처리농도를 설정하기 위하여 시험농약과 대조물질을 농도별로 처리하고 최적사육조건에서 붉은지렁이를 사육한 결과는 표 3에서 보는 바와 같다. 무처리구에서는 치사 개체 없이 5% 이내의 체중감소를 보였는데 이것은 시험기간중에 먹이를 공급하지 않았기 때문인 것으로 보인다. 그러나 시험 농약 및 대조물질을 100 mg/kg 이상 처리한 시험구에서는 모두 치사하였으며, 10 mg/kg 이하 처리구에서 치사개체는 관찰되지 않았으나 10~20%의 체중감소를 보여 무처리구의 체중감소율과 비교해 볼 때 이는 처리 농약에 의한 영향으로 추정되었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 시험농약과 대조물질의 처리농도를 100~10 mg/kg 로 설정하였다.

반수치사농도 산정시험(Definitive Test)

반수치사농도 산정을 위한 처리농도 설정시험의 결과에 근거하여 설정된 범위의 농도로 처리된 인공토양에서 붉은지렁이를 처리한 후 최적 사육조건에서 14일간 사육한 결과는 표 4에서 보는 바와 같이 가벤다 수화제, 베노밀 수화제, 지오판 수화제, 치아벤다졸 수화제의 붉은지렁이에 대한 반수치사농도는 각각 59, 53, 64, 36 mg/kg 건토로 나타났다. 이 결과는 인공토양을 이용한 50% benomyl 수화제의 줄지렁이 급성독성시험을 한 결과 반수치사농도가 27 mg/kg 건토였다는 보고(Haque와 Ebing, 1983)와 차이가 있는데, 이것은 농약의 지렁이에 대한 독성은 지렁이의 종에 따라 차이가 있다는 보고(Stenersen, 1979)로 미루어 볼 때 지렁이 종간의 독성차이로 추측된다. 또한 Heimbach와 Edwards(1983) 및 Lofs-Holmin (1981)는 benomyl과 carbendazim 계통의 농약이 지렁이에 대한 독

Table 3. Mortality and loss of body weight of the earthworms(*Lumbricus rubellus*) exposed to some selected pesticides for 14 days

Pesticide	Concentration (mg/kg)	Mortality (%)	Loss of body weight (% mean)
Carbendazim WP	1,000	100	-
	100	100	-
	10	0	10
	1	0	10
	0.1	0	9
Benomyl WP	1,000	100	-
	100	100	-
	10	0	11
	1	0	9
	0.1	0	8
Thiophanate-M WP	1,000	100	-
	100	100	-
	10	0	12
	1	0	8
	0.1	0	10
Thiabendazole WP	1,000	100	-
	100	100	-
	10	0	15
	1	0	9
	0.1	0	8
Chloroacetamide	1,000	100	-
	100	100	-
	10	0	11
	1	0	10
	0.1	0	9
Control	0	0	5

성이 있다고 보고한 바 있다. 대조물질의 반수치사농도는 27 mg/kg 건토로, 이것은 Edwards(1984) 및 Viswanathan과 Korte(1984)가 20~40 mg/kg 건토로 보고한 것과 큰 차이가 없었다. 또한 같은 시험기간 동안 치사율과 생체량의 변화는 그림4 에서 보는 바와 같이 치사율과 생체량을 비교해 보면 치사율이 증가할수록 체중감소가 크게 나타나 전반적인 생존 개체의 체중 감소가 10% 이상 관찰되었으며, 몇몇 약제는 30% 이상 체중감소를 보였다.

EU의 지렁이 위해성 평가기준에 의한 환경추정농도(PEC, Predicted environmental concentration)를 산출하여 독성-노출비(TER, Toxicity-exposure ratios)를 구한 결과는 표 5에서 보는 바와 같다. TER값이 10 이상이면 지렁이에 대한 위해성이 없는 것으로 평가하고 있는 것을 감안할 때 3종의 농약은 위해 가능성이 없는 것으로 판단되

Table 4. LC₅₀ of four fungicides to earthworms (*Lumbricus rubellus*)

Pesticide	Concentration (mg/kg)	Mortality (%)	LC ₅₀ (mg/kg dry weight soil)
Carbendazim WP	100	100	59 (54 ~ 63) ^{a)}
	76	62	
	59	52	
	45	22	
	35	7	
	27	2	
Benomyl WP	100	100	53 (47 ~ 59)
	67	55	
	44	32	
	30	12	
	20	5	
	13	0	
Thiophanate-M WP	100	100	64 (60 ~ 68)
	76	62	
	59	35	
	45	12	
	35	2	
	27	0	
Thiabendazole WP	100	100	36 (33 ~ 40)
	67	90	
	44	62	
	30	32	
	20	12	
	13	0	
Chloroacetamide	50	100	27 (25 ~ 29)
	38	77	
	29	57	
	23	35	
	17	5	
	13	0	
Control	0	0	-

^{a)}95% confidence limits.

었다. 치아벤다졸 수화제는 토양에 직접 처리하는 것이 아니라 버섯재배용 배지조성시 사용하는 농약이므로 위해성 평가에서 제외하였다.

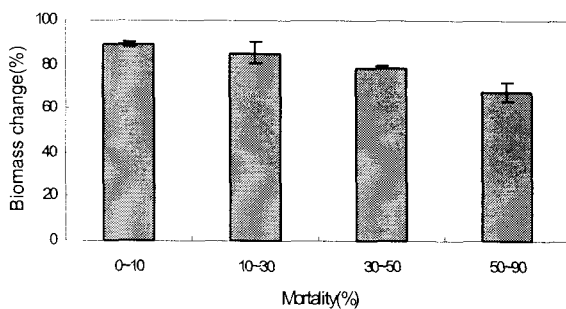


Fig 4 . Relationship between mortality classes and biomass change of earthworms after the 14-day exposure of pesticides in artificial soil.

Table 5. Estimation of toxicity-exposure ratios(TER) of pesticides to earthworm

Pesticide	LC ₅₀ (mg/kg)	PEC ^{a)} (mg/kg)	TER
Carbendazim WP	59	2.6	23
Benomyl WP	53	2.1	25
Thiophanate-M WP	64	3.0	21

^{a)}Predicted environmental concentration.

^{b)}LC₅₀/PEC.

인용문헌

Bauer, C. and J. Rombke (1997) Factors influencing the toxicity of two pesticides on three Lumbricid species in laboratory tests. *Soil Biol. Biochem.* 29(3/4):705~708.

Darwin, C. (1881) The formation of vegetable mould through the action of worms. Murray, London. pp. 326.

Edwards, C.A. (1984) Report of the second stage in development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Commission of the European Communities. EUR 9360 EN, pp.99.

Edwards, C.A. and A.R. Thompson (1973) Pesticides and the soil fauna. *Res.Rev.* 45:1~79.

Edwards P. J. and J. M. Coulson (1992) Choice of earthworm species for laboratory tests. *Ecotoxicology of Earthworms*, Intercept Ltd., U. K., pp.36~43.

Haque, A. and W. Ebing (1983) Toxicity determination of pesticides to earthworms in the soil substrate. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 90:395~408.

Heimbach, F. and P. J. Edwards (1983) The toxicity of 2-Chloroacetamide and Benomyl to earthworms under various test conditions in an Artificial Soil Test. *Pesticide Science* 14:635~636.

Lofs-Holmin, A. (1981) Influence in field experiments of benomyl and carbendazim on earthworms (*Lumbricide*) in relation to soil texture. *Swedish J. Agric. Res.* 11:141~147.

Lofs-Holmin, A. (1982) Reproduction and growth of common arable land and pasture species of earthworms (*Lumbricidae*) in laboratory cultures. *Swedish J. Agric. Res.* 13:31~37.

Lofs-Holmin, A. (1986) Occurrence of eleven earthworm species (*Lumbricidae*) in permanent pastures in relation to soil-pH. *Swedish J. Agric. Res.* 16:161~165.

OECD (1984) Guideline for testing of chemicals, No.

207. Earthworm acute toxicity tests. Adopted 4 April 1984.
- OECD (1993) Earthworm acute toxicity test, 207, *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*, OECD, Paris.
- Lanno R. P. and L. S. Mccarty (1997) Earthworm bioassays: adopting techniques from aquatic toxicity testing. *Soil Biol. Biochem.* 29(3/4): 693~697.
- Rombke J., P. Vickus, and C. Bauer (1992) Experiences and problems with the OECD-Earthworm Acute Test in routine testing. In: *Ecotoxicology of Earthworms*(H. Becker *et al.*, eds) pp 209~212, Intercept, Hants, U.K.
- Sims, R. W. and B. M. Gerard (1985) Earthworms,(Doris M. Kermack and R. S. K. Barnes., eds) pp 46~48, The Linnean Society of London., U.K.
- Stenersen, J. (1979) Action of Pesticides on Earthworms. Part I: The Toxicity of Cholinestrase-inhibiting Insecticides to Earthworms as Evaluated by Laboratory Tests. *Pesticide Science*, 10: 66~74.
- Van Gestel, C. A. M. (1988) The influence of soil characteristics on the toxicity of four chemicals to the earthworm *Eisenia fetida andrei*(Oligochaeta). *Biology and Fertility of Soils* 6: 262~265
- Viswanathan, R. and F. Korte (1984) A laboratory study to determine the toxicity of 15 organic chemicals to *Eisenia fetida* using an artificial medium. In: *Actes Symposium Internationale 'Ecotoxicologie terrestre'*, Les Ares, 1984. pp. 629~636.
- 농촌진흥청 (2000) 환경생물독성 시험기준과 방법, 농진청 고시 제 2000-1호.
- 이성규 (1995) 몇가지 안공토양에서 사육한 *Lumbricus rubellus*와 *Eisenia foetida*의 성장인자의 차이. *한국환경농학회지* 14(1):82~87.
- 환경부 (1996) 화학물질 유해성시험방법.

Development of test method for the evaluation of pesticide acute toxicity using earthworm(*Lumbricus rubellus*)

Yeon-Ki Park*, Kyeong-Hoon Park, Byung-Seok Kim, Kee-Sung Kyung, Jin-sup Shin, and Byung-Youl Oh
(National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, 441-707, Suwon, Korea)

Abstract : A study was performed to determine the maintenance conditions of the earthworm, *Lumbricus rubellus*, for the acute toxicity test. To fine out climatic and soil conditions, the earthworms were maintained in artificial soil consisting of sand, clay mienral and peat at different levels of conditions for 14 days. *Lumbricus rubellus* led to an increase of biomass at temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$, soil pH 7.0 ± 1 and moisture 40%. And four fungicides were tested for acute toxicities to *Lumbricus rubellus*, according to the optimum condition. The test earthworms were exposed to each pesticide with various concentration gradients. After 14 days, the number of surviving earthworms and their weight alteration during the test period was determined. The 14-day LC₅₀ values for the *Lumbricus rubellus*, of carbendazim, benomyl, thiophanate-methyl and thiabendazole were determined to be 59, 53, 64 and 36 mg/kg soil dry weight, respectively.

*Corresponding author (Fax:+82-331-290-0521, E-mail:pyk519@rda.go.kr)