

바이오차르 토양 투입에 따른 지렁이의 행동변화 연구
- 회피 및 생산성 변화 -

Behavior Changes of Earthworm from Soils Amended with Biochar
- Avoidance and Productivity -

김유진 · 양승훈 · 김서연 · 윤홍석 · 유가영[†]

경희대학교 공과대학 환경학및환경공학과

Kim, You Jin, Yang, Seung Hoon, Kim, Seo Yeon,
Yoon, Hong Seok and Yoo, Ga Young[†]

Dept. of Environmental Science and Engineering, College of Engineering,
Kyung Hee University, Yongin-si, Gyeonggi-do, Korea

ABSTRACT

Biochar application to soil is widely known to have effects of climate change mitigation and soil quality improvement. However, effects of biochar on soil ecosystem are not always positive and some biochars are reported to contain toxic materials which might influence soil ecosystem. In this context, this study aims to investigate behavioral changes of earthworms(*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei*) in response to different application rates of biochar to artificial soil. Treatment included two types of biochars made from rice husk (RH_Char) and wastewater sludge (SL_Char) with 1% and 10% application rates, respectively. Avoidance test revealed that earthworms did not avoid SL_Char treatments at 1% and 10%, while they rather moved to the RH_Char treatments probably due to higher labile carbon content(Hot water extractable carbon) of the RH_Char. The HWC content of RH_Char was 4 times higher than that of the SL_Char. Results of reproduction test showed that the survival rates, number of juveniles and number of cocoons were not influenced by biochar application except for the treatment of SL_Char at 10% rate. In the SL_Char 10% treatment, fatality was approximately 3.3 times as high as the control and the number of cocoons was 1.3 times higher in the same treatment than the control, indicating that earthworms were under environmental stress. The possible explanation for the stress condition was related to higher Cd, Ni, Cr, and As contents in the SL_Char. Overall results imply that biochar application at low rate might not change earthworms' behavior for the short term, while the reproduction behavior might be negatively influenced under the high application rate.

Key words : Earthworm, Eisenia Fetida, Eisenia Andrei, Biochar, Rice Husk Biochar, Sludge Biochar, Avoidance, Reproduction

[†] Corresponding author : E-mail: gayoo@khu.ac.kr

1. 서론

바이오차르란 산소공급을 제한한 환경에서 유기물을 열분해하여 얻은 부산물을 말한다(Lechmann and Joseph, 2009). 바이오차르는 난분해성으로 미생물 또는 기타 환경요인에 의해 쉽게 산화되지 못하므로 토양 내 탄소 격리 효과 및 기후변화 완화 효과를 갖는다고 알려져 있다(Lechmann *et al.*, 2006). 바이오차르는 다공성 구조로 높은 표면적을 가지므로 토양의 산소와 수분 함량을 높게 유지할 수 있고(Lechmann *et al.*, 2011; Mukherjee and Zimmerman, 2013), 산도, 양이온 치환능력, 질소 비료이용 효율, 미생물 활성도 등을 증가시켜 토양 구조 및 질 개선에 긍정적 영향을 준다고 보고되고 있다(Novak *et al.*, 2009; Laird *et al.*, 2010). 이러한 긍정적 효과로 인하여 바이오차르를 이용하는 토양환경 관리 전략들이 널리 제안되었고 연구가 활발히 진행되고 있다(Hartley *et al.*, 2009; Inyang *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2012).

바이오차르를 생성하는데 필요한 원료물질은 일반적으로 볏짚, 톱밥과 같은 농업 및 임업부산물이 일반적이었으나, 최근에는 하수슬러지와 같은 도시 폐기물까지 다양하게 고려되고 있다(Shackely *et al.*, 2011). 하지만, 바이오차르는 원료물질과 생성 조건(온도, 산소 분압, 시간) 등에 따라 그 특성이 달라질 수 있으며, 어떤 바이오차르는 생성 과정에서 다양한 유해물질이 함유될 수 있다(Spokas *et al.*, 2009; Mukherjee *et al.*, 2011). 이는 바이오차르를 토양에 투입할 때에 반드시 토양 환경에 대한 위해성 평가가 이루어져야 한다는 점을 시사한다.

지렁이는 토양의 유기물을 분해하여 토양을 비옥하게 해주는 대표적 토양 생물체로써(Darwin, 1881), 토양 환경에서 중요한 생태적 지위(Niche)를 차지하고 있다(Edwards and Lofty, 1977; Cooke *et al.*, 1992). 또한, 지렁이는 물리화학적 변화에 매우 민감하기 때문에 유럽연합(EU)과 OECD의 생태 독성 시험 주요 생물로 채택되었으며, 많은 생태 독성 연구에 지렁이를 이용하고 있다(Amorim *et al.*, 2005; Lukkari and Haimi, 2005; He *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007). Li *et al.*(2011)은 사과나무 톱밥으로 생

성된 바이오차르를 무게 기준으로 10% 이상을 토양에 투입했을 때 지렁이가 회피행동을 하였으며, 고농도 바이오차르 투입토양에서 28일 간 배양했을 때 몸무게가 줄었음을 보고하였다.

국내에서도 다양한 종류의 폐기물의 친환경 처리를 위해 바이오차르를 토양에 투입하는 관리방법이 고려되고 있으며, 이 방법을 실제 이용하기 위해서는 잠재적 독성 및 위해성 평가가 꼭 이루어져야 할 것이다. 그러나 이러한 중요성에도 불구하고, 국내에서는 바이오차르의 생태독성 평가가 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구는 국내에서 농업 부산물 중 발생량이 높은 왕겨와 친환경적 처리가 요구되는 하수슬러지를 이용한 바이오차르를 국내산 지렁이를 이용하여 생태 독성 평가를 수행하였다. 본 연구의 목적은 1) 바이오차르의 토양 투입이 토양 생태 독성 시험 표준생물인 지렁이에게 생태독성이 있는지 여부를 판단하고, 2) 바이오차르 종류 및 농도에 따른 지렁이의 회피 반응 및 생산성 반응 변화를 관측함으로써 바이오차르 토양 투입의 안전성 평가 및 실행 가능성 판단의 근거를 마련하는 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1 지렁이 준비

지렁이는 OECD 공시종인 줄지렁이(*Eisenia fetida*)와 한국 대표 분포종인 붉은줄지렁이(*Eisenia andrei*)를 구입하였고, 이 두 종을 혼합하여 사용하였으며, 2개월 이상 사육 후 환대가 보이는 250~900 mg 무게의 건강한 개체를 선별하였다. 선별 개체들은 실험시작 전 인공토양에서 7일간 적응시켰다.

2.2 바이오차르 준비

본 연구에서는 왕겨 바이오차르(RH_Char)와 하수슬러지 바이오차르(SL_Char)를 준비하였다. 하수슬러지는 런던 협약 이후 해양투기가 전면 금지되었으므로 친환경적 처리가 필요하여, 본 연구의 대상물질로 설정하였다. 왕겨 바이오차르는 강진 농협에서 구매한 상품으로 5 mm 이하로 분쇄된 왕겨

를 500~600°C에서 약 20 분간 열분해한 부산물이다. 이 과정은 소규모의 열분해 반응기(DCH-400, 1.4 m×5.2 m×5 m(L×W×H))에서 일어나며, 시간당 반응기의 왕겨 처리량은 400 kg이다. 반면, 하수슬러지 바이오차르는 원재료의 함수율을 15% 이하로 낮추고, 산소를 차단한 상태에서 450~550°C에서 10~20분간 탄화하여 생성하였다.

두 바이오차르의 pH는 시료와 증류수를 1:5(w/v)의 비율로 혼합하여 1시간 교반 후 pH meter(Orion3 star, Thermo, USA)로 측정하였다. 총 탄소, 질소 함량은 Carlo Erba NS 1500 C/N analyzer를 이용하였고, 열수 추출 가능 탄소(Hot water extractable carbon, HWC) 측정은 Haynes and Francis(1993)의 방법에 따라 수행하였다. 또한, 토양 내 중금속 함량은 PerkinElmer ICP-OES OPTIMA5300DV를 이용하여 분광학적으로 분석하였다. 토양 내 PAH (Polycyclic aromatic hydrocarbon) 분석은 GC/MSD (7890/5975, Agilent Technologies, USA)를 이용하여 수행하였다. 분석된 PAH 종류는 Anthracene, Benzo[a]anthracene, Benzo[a]pyrene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[e]pyrene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo [g,h,i]perylene, Chrysene, Dibenz[a,h]anthracene, Fluoranthene, Indeno[1,2,3-c,d]pyrene, Phenanthrene, Pyrene이었다.

2.3 인공토양 준비 및 바이오차르 투입

인공토양은 OECD 지침서(1984)에 따라 Sphagnum peat : Kaolin clay : 산업용 모래를 1:2:7의 비율로 섞고, pH를 6.0±0.5가 되도록 CaCO₃를 일정량 가하여 믹서기로 혼합하였다. Sphagnum peat는 pH 5.5~6.0으로 식물 조직이 남아 있지 않고 분말 형태로 건조된 것, Kaolin clay는 Kaolinite의 함량이

30% 이상인 것, 산업용 모래는 지름 50~200 μm 인 입자가 50% 이상인 것을 이용하였다(Lee *et al.*, 2005). 본 연구의 처리구는 인공토양에 왕겨와 하수슬러지 바이오차르를 무게 기준으로 각각 1%, 10%의 비율로 혼합하여 투입하였고, 대조구는 아무것도 넣지 않은 인공토양을 준비하였다(Table 1).

2.4 회피 실험

회피 실험은 Environment Canada(2004)의 생물 시험법을 참고하여 수레바퀴 모양의 회피 실험 용기를 아크릴 재질로 제작하여 이용하였다(Fig. 1). 실험용기는 제거 가능한 내부분리대에 의해 중앙 직경 5.4 cm의 원형 구역과 부채꼴 모양의 6개 구역으로 나뉘어져 있다. 이 용기에는 각 처리구와 대조구를 한 세트로 하여 각각 200 g씩 6개 구역에 번갈아 가며 채웠다. 처리구에 따라 총 4개의 실험 용기를 준비하였고, 실험은 5회 반복하였다. 내부분리대는 지렁이가 중앙 원형 공간에 투입된 후 제거하였고, 48시간 동안 빛이 없는 조건에서 온도는

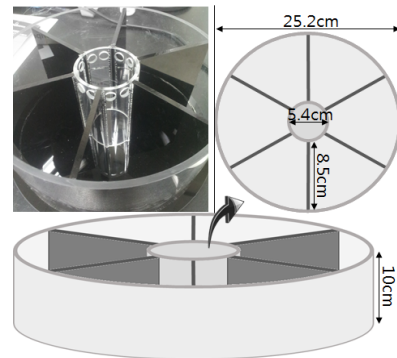


Fig. 1. Avoidance test container which is composed of six compartments separated by removable partitions. Earthworms are added to the center.

Table 1. Description of the treatments

	RH_Char 1%	RH_Char 10%	SL_Char 1%	SL_Char 10%	Control
Treatment	Artificial soil + 1% biochar from rice husks	Artificial soil + 10% biochar from rice husks	Artificial soil + 1% biochar from sludge	Artificial soil + 10% biochar from sludge	Artificial soil

20±2℃로 유지하였다. 바이오차르 투입에 따라 인공토양과 차르 혼합물의 보수력은 달라지므로, 변화된 보수력(Water holding capacity)을 고려하여 수분함량을 각각 보수력의 85±10%로 일정하게 유지하였다(Coleman *et al.*, 2010). 48시간 경과 후, 회피 실험 용기 내에 내부 분리대를 원위치하고, 각 구역별로 지렁이 개체수를 파악하였다. 만일 지렁이가 분리대에 의해 두 부분으로 나뉘었다면 0.5 마리로 처리구와 대조구에 각각 포함시켰다.

2.5 생산성 실험

생산성 실험 역시 Environment Canada(2004)의 실험 내용을 참고하여 수행하였다. 처리구와 대조구 토양은 1 L 비커에 각각 200 g씩 담았으며, 모든 실험은 5회 반복하였다. 각 비커에 지렁이 10마리를 투입하고, 파라필름과 고무줄을 이용하여 입구를 막았으며, 파라필름에 작은 구멍을 뚫어 공기가 통할 수 있도록 했다. 지렁이 배양은 20일 동안 암실에서 온도 20±2℃를 유지하며 진행되었고, 12시간 간격으로 400~800 Lux 형광등을 이용하여 빛을 주기적으로 제공해줌으로써 지렁이가 낮과 밤을 느낄 수 있도록 하였다. 배양이 종료된 후에는 각 처리구와 대조구에서 살아남은 지렁이 수 및 새끼 수, 알 수를 조사하였다. 또한, 배양 시작 시 수분 조건은 보수력의 85±10%로 보정해 주며, 배양 시작일로부터 7일, 14일에는 줄어든 수분이 감소한 만큼 보충하였다.

2.6 통계분석

회피 실험에서의 처리구와 대조구 간의 차이는 90% 및 95%의 신뢰수준에서 Student's t-test를 진행하였으며, 생산성 실험에서는 바이오차르의 종류 및 투입농도별 차이를 95% 신뢰수준에서 분산 분석을 실시하였다(SAS Institute, 2008).

3. 결과 및 토의

3.1 회피 실험

회피 실험 결과, 지렁이는 RH_Char 1%와 RH_

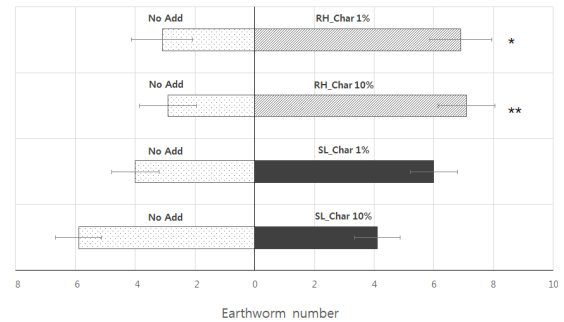


Fig. 2. Number of earthworms(*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei*) recovered in amended and unamended soil compartments after 48h avoidance tests. Bars with * and ** indicate significant difference at 10% and 5% probability levels, respectively.

Char 10% 처리구를 회피하지 않았고, 오히려 투입 토양을 선호하여 대조구 대비 각각 123% 및 145% 더 많은 개체수가 발견되었다. 반면, SL_Char 1% 및 10% 투입 토양에서는 회피도 선호도 하지 않은 것으로 나타났다(Fig. 2). 왕겨 바이오차르와 하수 슬러지 바이오차르의 이와 같은 상이한 회피실험 결과는 바이오차르가 포함한 열수추출탄소량(HWC)의 차이로 설명할 수 있다. Yoo *et al.*(2013)의 연구에서 바이오차르 내 유기물은 비교적 안정하여 분해가 매우 느리지만, 그 표면에서는 토양미생물이 가용할 만한 성분들이 존재한다고 보고된 바와 같이, 본 연구에서 RH_Char는 인공토양 대비 약 34% 높은 HWC를 포함하고 있는 반면, SL_Char는 인공토양 대비 오히려 74% 적은 HWC를 함유하고 있었다(Table 2). 즉, RH_Char의 높은 가용성 유기물로 인하여 이것이 인공토양에 투입되었을 경우, 토양 내에 지렁이의 먹이로 작용할 수 있음을 의미한다. 한편, 일반적으로 지렁이 생육에는 산성보다 약 알칼리 조건이 적합하다고 알려져 있는데(Park *et al.*, 2000), 지렁이가 RH_Char를 선호하는 것은 pH가 높은 왕겨 바이오차르의 투입으로 인공토양의 pH를 약알칼리성으로 변화시켰기 때문으로 해석할 수 있다(Table 2). 반면, SL_Char의 pH는 6.70으로 인공토양의 pH와 크게 다르지 않아, 투입된 토양의 pH를 변화시키지 않았을 것이다. 또 한편, Fig. 3

Table 2. Basic characteristics of biochar and artificial soil

	pH	Total C	Total N	C/N ratio	HWC*	
		g kg ⁻¹ soil			g kg ⁻¹ soil	
Biochar	Rice husks	10.36	48.05	0.93	51.67	4.20
	Sludge	6.70	13.16	2.09	6.30	0.83
Artificial soil	6.30	6.21	0.51	12.18	3.14	

* HWC: Hot water extractable carbon

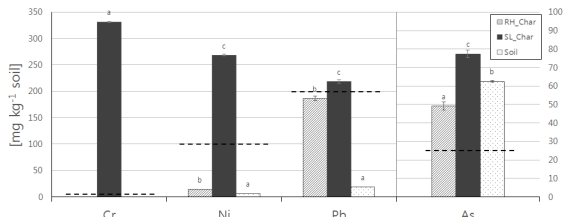


Fig. 3. Contents of Cr, Ni, Pb, and As in biochars and artificial soil. Dashed lines indicate the standard values of soil pollution. Bars with different letters indicate significant difference at 5% probability level.

에서 보는 바와 같이, SL_Char의 크롬, 니켈, 납 및 비소의 함량이 인공토양 및 RH_Char에 비하여 월등히 높은 것을 알 수 있으나, 본 연구에서는 SL_Char 처리구에 대한 지렁이의 회피 반응은 나타나지 않았다. 이는 지렁이 투입 후 48시간이라는 비교적 짧은 시간 조건에서는 중금속에 의한 지렁이의 행동 변화가 나타나지 않기 때문이라 추측된다.

Li *et al.*(2011)은 바이오차르 토양투입에 따른 지렁이 회피 실험에서 톱밥으로 만든 바이오차르를 무게 대비 10% 투입하였을 경우, 지렁이가 바이오차르 처리구를 유의하게 회피한 것으로 보고하였다. 그러나 바이오차르 처리구에 추가적으로 수분을 투입하여 바이오차르를 수분으로 포화시킨 경우에는

이러한 회피행동이 관찰되지 않았다. 즉, Li *et al.* (2011)는 지렁이의 바이오차르 회피행동이 토양의 수분 함량과 밀접한 관련이 있음을 밝혀내었다. 본 실험에서는 Li *et al.*(2011)과는 달리 실험 시작 전에 바이오차르 투입에 따른 토양의 추가적 건조화를 방지하기 위해 처리구별 보수력을 각각 측정하였고(Table 3), 이를 고려한 수분상태를 85±10% 보수력 수준으로 맞추었으므로 Li *et al.*(2011)이 보고한 회피행동과 토양 수분함량 간의 관계는 변인통제가 된 것이라 할 수 있다. 즉, 본 연구결과는 지렁이 회피행동에 영향을 미치는 수분함량 이외의 주요한 요인을 밝혀냈다.

3.2 생산성 실험

생산성 실험 동안 생존한 지렁이 수와 알 수는 SL_Char 10%에서만 유의한 차이를 보였다. SL_Char 10% 처리구에서 생존 수는 대조구 대비 약 28% 감소하였고, 알 수는 대조구 대비 약 127% 증가하였다. 반면, 새끼 수는 통계적으로 차이가 없었다(Fig. 4). 생존수의 감소 및 알 수의 증가는 지렁이 개체군이 환경의 변화에 따라 생존전략의 변화가 있었음을 시사한다. 일반적으로 열악한 외부 교란에 의해 개체군이 스트레스를 받은 경우, 생존 수는 줄어들지만 알 수를 증가시켜 r-생존전략으로

Table 3. Water holding capacity of the soils with different treatments

	RH_Char 1%	RH_Char 10%	SL_Char 1%	SL_Char 10%	Control
WHC [mL water g ⁻¹ soil]	0.52	0.62	0.59	0.55	0.47

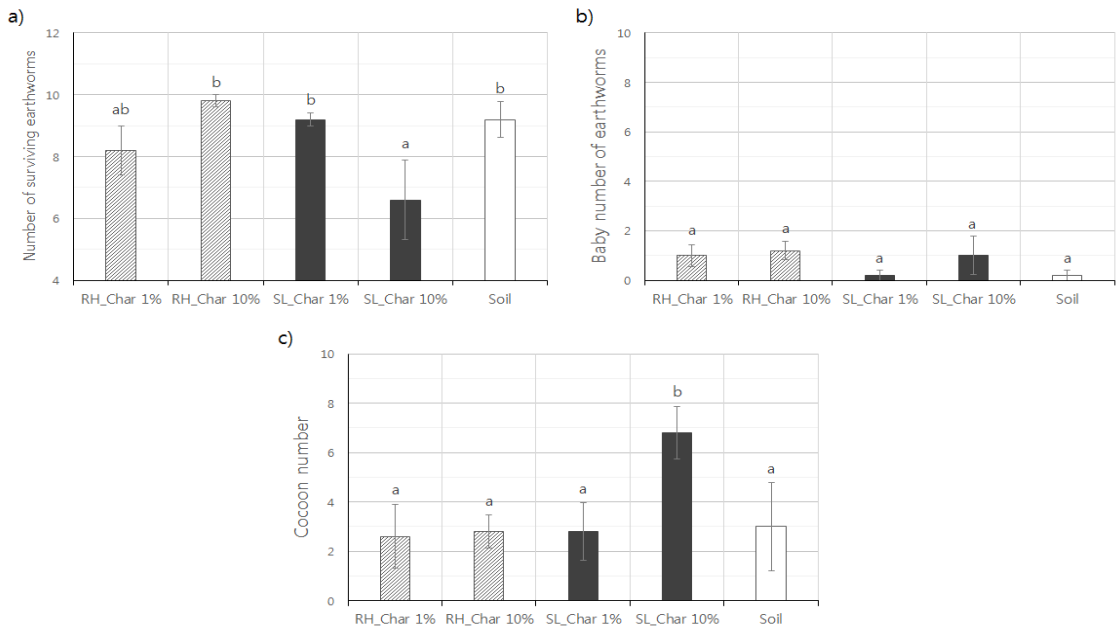


Fig. 4. (a) Number of earthworms (*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei*) survived, (b) number of juveniles, and (c) cocoon production after 20d reproduction tests. Bars with different letters indicate significant difference at 5% probability level.

적응함은 널리 보고되고 있다(Odum and Barrett, 2005). 또한, SL_Char 10%에서 지렁이의 생존을 감소에 대해서는 SL_Char의 중금속 함량으로 설명이 가능하다. Lee *et al.* (2001)에 의하면 크롬, 카드뮴, 수은 등으로 오염된 토양에서 지렁이는 생존을 하였으나, 알 부화율과 새끼수가 감소하여 불안정한 생존을 한 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 회피 실험과 달리 생산성 실험은 비교적 긴 시간인 20일 동안 지렁이를 배양하였고, SL_Char에 포함된 크롬, 니켈, 납 및 비소의 농도가 RH_Char 및 인공토양에 비해 월등히 높았다(Fig. 3). 이에 SL_Char를 고농도(10%)로 투입한다면 지렁이의 생존을 위협할 수 있는 것으로 판단된다. 그러나 SL_Char 1% 처리구의 지렁이는 대조구와 유사한 생존율을 보였는데, 이는 SL_Char가 인공토양에 저농도로 투입되어 희석으로 인해 중금속에 의한 위해성이 완화되었기 때문이라 사료된다. 한편, RH_Char와 SL_Char의 PAHs 분석 결과 Anthracene, Benzo[a]anthracene, Fluoranthene, Pyrene은 검출한계 이하였으며, RH_Char와 SL_Char 모두에서 Chrysene, Phe-

nanthrene은 0.02~0.06 mg/kg, Benzo[a]pyrene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[e]pyrene, Benzo[k]fluoranthene은 0.07~0.16 mg/kg, Benzo[g,h,i]perylene, Dibenz[a,h]anthracene, Indeno[1,2,3-c,d]pyrene은 0.11~0.13 mg/kg의 농도로 검출되었다. 그러나 이는 모두 미국 토양정화표준에서 거주 지역에 대한 기준 수치 이하의 결과였다(Choi *et al.*, 2012).

4. 결론

본 연구는 기후변화 완화 전략으로 토양에 바이오차르를 투입할 경우, 가져올 수 있는 생태독성을 지렁이를 이용하여 평가하였다. 바이오차르에 따른 토양의 수분함량 변화를 통제된 상태에서 진행한 회피실험에서는 투입된 바이오차르의 종류에 따라 지렁이의 회피행동이 변화하였다. 지렁이는 왕겨 바이오차르 처리구를 오히려 선호하였으며, 하수슬러지 바이오차르 처리구는 단기적으로 영향을 받지 않았다. 이는 지렁이가 왕겨 바이오차르에 포함된 가용한 유기물을 오히려 먹이자원으로 활용할 수 있어 선호하였음을 시사한다. 20일 간 진행한 생산

성 실험에서는 왕겨 바이오차르의 경우 1% 및 10% 투입구 모두에서 생존 수, 알 수 및 새끼 수가 변화하지 않았으나, 하수슬러지 바이오차르의 경우, 특히 10%의 고농도 처리구에서 생존수가 유의하게 감소하였고, 알 수는 오히려 증가하였다. 본 실험결과는 왕겨 바이오차르가 지렁이에게 생태독성이 없으며, 하수 슬러지 바이오차르는 고농도에서 지렁이에게 독성을 나타냄을 보여주었다. 향후 연구는 보다 다양한 바이오차르 종류 및 농도별 지렁이의 회피 및 생산성 변화를 살피고, 이를 설명하기 위하여 지렁이 행동에 영향을 주는 주요 요인인 토양 수분함량, 바이오차르가 포함하는 가용한 유기물의 양, pH, 중금속 등 유해한 물질의 함량 등을 조사하여 바이오차르 토양투입의 안전성 평가 기준을 마련하는 것에 집중해야할 것이다.

사사

본 논문은 농촌진흥청 어젠다사업(과제번호: PJ0-092532014)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

Ahmad M, Lee SS, Yang JE, Ro HM, Lee YH, Ok YS. 2012. Effects of soil dilution and amendments(mussel shell, cow bone, and biochar) on Pb availability and phytotoxicity in military shooting range soil. *Ecotoxicol Environ Saf* 79:225-231.

Amorim MJ, Rombke J, Soares SM. 2005. Avoidance behavior of *Enchytraeus albidus*: effects of benomyl, carbendazim, phenmedipham and different soil types. *Chemosphere* 59:501-510.

Choi Y, Yoo E, Kim M. 2012. Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) distribution in Busan soils. *Health Environ* 22:216-234.

Coleman JG, Johnson DR, Stanley JK, Bednar AJ, Weiss CA, Boyd RE, Steevens JA. 2010. Assessing the fate and effects of nano aluminum oxide in the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida*.

Environ Toxicol Chem 29:1575-1580.

Cooke AS, Greig-Smith PW, Johnes SA. 1992. Consequences for a vertebrate wildlife of toxic residues in earthworm prey. *Ecotoxicology of Earthworms*, Intercept, pp 139-158.

Darwin C. 1881. The formation of vegetable mould through the action of worm with observation of their habit. John Murray, London, pp 328.

Edwards CA, JR Lofly. 1977. *Biology of Earthworms*. Chamman and Hall, London.

Environment Canada. 2004. Tests for toxicity of contaminated soil to earthworms(*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*). In: *Biological test method*. Environment Canada, Ottawa, Ontario.

Hartley W, Dickinson NM, Riby P, Lpp NW. 2009. Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. *Environ Pollut* 157:2654-2662.

Haynes R, Grancis G. 1993. Changes in microbial biomass C, soil carbohydrate composition and aggregate stability induced by growth of selected crop and forage species under field conditions. *J Soil Sci* 44:665-675.

He Q, Yan Z, Wang Q, Li F. 2007. The application of earthworm avoidance test in ecological risk assessment of naphthalene-contaminated soils. *J Agro-Environ Sci* 26:538-543.

Inyang M, Gao B, Ding W. 2011. Enhanced lead sorption by biochar derived from anaerobically digested sugarcane bagasse. *Separation Science and Technology* 46:1950-1956.

Laird D, Fleming P, Wang BQ, Horton R, Karlen D. 2010. Biochar impact on nutrient leaching from a midwestern agricultural soil. *Geoderma* 158: 436-442.

Lechmann J, Gaunt J, Randon M. 2009. Bio-char sequestration in terrestrial ecosystem-a review. *Mitig Adapt Strat Gl* 11:403-427.

Lechmann J, Joseph S. 2009. Biochar for environ-

- mental management, science and technology. Earthscan, London, UK & Washington DC, USA.
- Lechmann J, Rilling M, Thies J, Masiello CA, Hockaday WC, Crowley D. 2011. Biochar effects on soil biota-A review. *Soil Biol Biochem* 43: 1812-1836.
- Lee C, Park SY, Yun J, Choi K, Chung Y, Kim HM. 2005. Risk assessment of soil through earthworm toxicity test of nonylphenol and bisphenol A. *J Environ Toxicol* 20:279-286.
- Lee HC, Choi HG, Phae CG. 2001. Evaluation of noxiousness on materials of various kinds and hazardous substance using in living environmental by earthworm. Workshop presentation file, Organic Recycling Association, Korea, pp 87-92.
- Li D, Hockaday WC, Masiello CA, Alvarez PJJ. 2011. Earthworm avoidance of biochar can be mitigated by wetting. *Soil Biol Biochem* 43:1732-1737.
- Lukkari T, Haimi J. 2005. Avoidance of Cu- and Zn-contaminated soil by three ecologically different earthworm species. *Ecotoxicol Environ Saf* 62: 35-41.
- Mukherjee A, Zimmerman AR, Harris W. 2011. Surface chemistry variations among a series of laboratory produced biochars. *Geoderma* 163:247-255.
- Mukherjee A, Zimmerman. 2013. Organic carbon and nutrient release from a range of laboratory-produced biochars and biochar-soil mixtures. *Geoderma* 193:122-130.
- Novak JM, Busscher WJ, Laird DL, Ahmendra M, Watts DW, MAS Niandou. 2009. Impact of biochar amendment on fertility of a southeastern coastal plain soil. *Soil Sci* 174:105-112.
- Odum EP, Barrett GW. 2005. *Fundamentals of ecology*, 5 edn.
- OECD. 1984. OECD guidelines for testing of chemicals: Earthworm acute toxicity test. OECD guideline, No 207, Paris, France.
- Park YK, Park GH, Kim BS, Kyung KS, Shin JS, Oh BY. 2000. Development of test method for the evaluation of pesticide acute toxicity using earthworm(*Lumbricus rubellus*). *Korean J Pestic Sci* 4:56-60.
- SAS Institute. 2008. SAS user's guide. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Shackely S, Hammond J, Gaunt J, Ibarrola R. 2011. The feasibility and costs of biochar deployment in the UK. *Carbon Management* 2:335-356.
- Spokas KA, Koskinen WC, Baker JM, Reicosky DC. 2009. Impacts of woodchip biochar additions on greenhouse gas production and sorption/degradation of two herbicides in a Minnesota soil. *Chemosphere* 77:574-581.
- Yoo G, Kim H, Chen J, Kim Y. 2013. Effects of biochar addition on nitrogen leaching and soil structure following fertilizer application to rice paddy soil. *Soil Ci Soc Am J* 78:852-860.
- Zhou SP, Duan CQ, Fu H, Chen YH, Wang XH, Yu ZF. 2007. Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. *J Environ Sci, China* 19:854-858.