

## 지렁이를 이용한 바이오디젤과 바이오디젤 유래 Neopentyl Polyol Ester 윤활유 베이스의 독성테스트

정해영 · 박완선 · 이재용 · <sup>1</sup>유정우 · <sup>2</sup>김의용 · †채희정  
호서대학교 식품생물공학전공 및 벤처전문대학원, <sup>1</sup>(주) 신한에너지, <sup>2</sup>서울시립대학교 화학공학과  
(접수 : 2004. 12. 15., 게재승인 : 2005. 4. 23.)

## Toxicity Test of Biodiesel and Biodiesel-derived Neopentyl Polyol Ester Lubricant Oil Base Using Earthworm

Haeyoung Jung, Wanseon Park, Jaeyong Lee, Jeong Woo Yoo<sup>1</sup>, Eui Yong Kim<sup>2</sup>, and Hee Jeong Chaet<sup>†</sup>  
Department of Food and Biotechnology and Department of Innovative Industrial Technology,  
Hoseo University, Asan 336-795, Korea

<sup>1</sup>Neo Energy Co. Ltd., 633 Manho, Pyeongtack 451-764, Korea

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

(Received : 2004. 12. 15., Accepted : 2005. 4. 23.)

Toxicity test for biodiesel (BD), biodiesel-derived neopentyl polyol ester (NPE) lubricant oil base, lubricant oil for diesel engine oil (LODE) and petroleum diesel (PD) was carried out using earthworm, *Eisenia fetida*. According to the method by OECD 207, the LC<sub>50</sub> values of BD and NPE were estimated as 2,450 and 1,528 mg/kg, respectively; which indicate that these compounds are classified as slightly toxic compounds. The LC<sub>50</sub> values of LODE and PD were estimated as 500 and 603 mg/kg, respectively, showing that these compounds are evaluated as moderately toxic compounds.

**Key Words** : Biodiesel, neopentyl polyol ester (NPE) lubricant oil base, earthworm, *Eisenia fetida*, LC50, toxicity test

### 서론

환경오염은 인구의 증가 및 산업사회로의 전환에 따라 부득이 발생되게 마련이다. 제 2차 세계대전 이후 중화학공업의 발달에 따라 막대한 양의 화학약품이 사용되어 왔다(1). 최근 환경오염이 증가함에 따라 생태계에 대한 위해성 평가의 중요성이 증대되고 있다. 과도한 에너지 소비, 화학물질의 생산과 소비 등으로 생물종의 다양성이 사라지고 생태계 본래의 기능이 상실되어 인간의 생존 자체도 위협받는 심각한 상황까지 이르렀기 때문이다(2).

토양은 물, 대기와 더불어 인간의 생명을 지속하기 위한 터전이며, 생활에 필요한 의·식·주의 기반이다. 토양생태계는 무생물과 생물의 안정된 평형상태로 유지되고 오염물질의 정화, 홍수방지, 토양침식방지 등 인간의 주변환경을 유지·보전시켜 주고 있다. 토양오염은 농작물 및 생태계의 오염으로 연결되

어 인간을 비롯한 생태계에 직접적인 피해를 유발시킬 수 있다(3). 토양 생태계에서 지렁이는 생태적으로 육상 생태계의 먹이 사슬 중 가장 아래에 위치하고 있다. 지렁이는 토양의 생산성과 건강성을 증진시키기 때문에 지렁이의 서식 밀도는 토양생태계의 다양성 유지에도 매우 중요하다(4).

어떤 화학물질이 토양으로 유출되었을 때 환경에 미치는 독성 영향을 평가하기 위하여 국제표준화기구 (international organization for standardization, ISO)에서는 지렁이를 토양오염의 지표생물로 이용하고 있으며, 경제협력개발기구 (organisation for economic cooperation and development, OECD)에서도 독성물질을 시험하는 표준동물로 지렁이를 활용하는 등 그 용도와 사용이 확대 개발되고 있다(5). 또한 독성물질에 오염된 토양을 복구하기 위하여 지렁이를 이용하는 방법도 시도되고 있다(6).

토양 속에서 여러 가지 화학물질에 대한 독성분석은 다양한 방법에 의해 수행되어 왔다. 지렁이를 이용하여 반수치사농도 (lethal concentration when 50% of the population were killed, LC<sub>50</sub>)를 추정하거나(7), 중금속으로 오염된 토양의 독성학적 평가로서 식물의 성장저해율 (effective concentration which caused a 50% reduction in a measured parameter, EC<sub>50</sub>)값을 산정하는 방법 등이 보고되어 있다(4). 또한 납에 의해 오염된 토양

† Corresponding Author : Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea  
Tel : +82-41-540-5642, Fax : +82-2-6280-6346  
E-mail : hjchae@office.hoseo.ac.kr

에서 28일간 지렁이를 이용한 독성테스트 방법이 제시되어 있다(8). 이 경우, OECD 2000(9)을 기준으로 하여 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>), 무영향농도 (no observed effect concentration, NOEC)와 성장저해율 (EC<sub>50</sub>)을 산출한다(10). 야외 현장에서 지렁이에 대한 물질의 영향을 규정한 규격이 있는데(11, 12) 이것은 혼합된 화학 물질의 영향을 측정하는 방법으로 테스트 기간은 1년으로 정하고 있다.

바이오디젤 (biodiesel, BD)은 폐식용유, 대두유, 쌀겨 등 식물성 오일을 알코올에 반응시켜 만드는 분자 내 산소를 포함하고 있는 친환경 제품이다(13). 바이오디젤은 저장 중 미생물에 대한 안정성이 높지만(14) 토양이나 수중에 유출되었을 때 생분해성이 높은 것으로 보고되어 있다(15). 석유계 윤활유 등이 생태계에 유출되어 오염문제를 유발하므로 세계적으로 친환경성 생분해 윤활유의 개발에 많은 노력을 기울이고 있다(15).

물질안전보건 (material safety data sheets, MSDS)에서 제시한 독성 정보에 의하면 윤활유 베이스와 석유디젤의 경우, 동물 실험에 의한 독성 판정기준이 없으며, 바이오디젤과 디젤유 윤활유에 대한 독성 항목 자체가 자료에 존재하지 않는다(16).

본 연구에서는 바이오디젤과 neopentyl polyol ester (NPE)계 윤활유 베이스가 생태계에 유출되었을 때 미치는 독성평가를 위한 국내의 규격 및 여러 문헌을 비교 검토하였다. 대두유 (soybean oil)를 원료로 하여 생산된 바이오디젤과 NPE 윤활유 베이스, 디젤유 윤활유와 석유디젤의 지렁이에 대한 독성을 함께 비교평가하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 장치

급성독성시험 대상 시료인 NPE계 윤활유 베이스 [96% tetrapentaerythritol (C<sub>77</sub>H<sub>140</sub>O<sub>8</sub>)과 4% methyl ester (C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>)의 혼합물]과 바이오디젤 (biodiesel, BD, C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>)은 ㈜신한에너지로부터 제공받아 사용하였다. 비교 분석을 위해 석유디젤 (petroleum diesel, PD, C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub>)과 디젤유 윤활유 (lubricant oil for diesel engine, LOD)는 각각 (주) LG와 (주) S-oil로부터 구입하였다. 지렁이 (*Eisenia fetida*)는 ㈜그렌지 (한국)에서 분양받아 독성 시험용 생물체로 사용하였다. 지렁이의 배양을 위하여 형광등에 의해 400~800 lux의 광도로 빛이 조절되며 공기가 순환되는 BOD배양기 (Vision Scientific, Korea)를 사용하였다.

### 시험생물 및 배양조건

시험에 사용한 지렁이는 성체가 환대 (지렁이의 생식기구)를 가지고 있고 체중이 300~600 mg인 개체를 분양받아 급성독성시험 전에 OECD 207(17)에서 제시한 방법에 따라 준비된 인공토양에서 사육시켰다(Table 1). 시험토양은 Table 1의 조성으로 준비하되 소량의 샘플을 취해 중량을 재고 105℃에서 건조시켜 잔류 수분함량으로부터 수분함량을 추정하였다. 토양 중의 전체 수분함량이 35%가 되도록 시험토양에 증류수를 가하여 조절하였다. 인공토양에는 탄산칼슘 (CaCO<sub>3</sub>)을 충분히 첨가하여 pH를 6.0 ± 0.5로 유지시켜 실험하였다. 0.01 M의 염화칼

슘 (CaCl<sub>2</sub>) 용액에 토양을 5배로 희석하여 pH를 측정하였다 (18, 19).

**Table 1.** Test conditions for evaluating the acute toxicity using earthworms

Substrate for artificial soil	Soil condition	Composition (%)
Sphagnum peat	pH 5.5~6.0, no visible plant and finely ground	10
Kaolin clay	kaolinite content above 30%	20
Industrial sand	particle size 0.05~0.2 mm	70

### 급성독성시험

1 L의 유리 비이커에 제조된 인공토양을 750 g씩 넣고 1일 이상 순화시킨 지렁이를 시험 농도당 10마리씩 증류수로 씻어 토양 표면에 넣었다. 인공토양으로부터 수분의 증발을 막기 위하여 통풍 구멍이 뚫린 플라스틱 필름으로 비이커를 덮은 후 BOD 배양기에 넣었다(7, 17).

반수치사농도를 구하기 위하여 시험물질과 대조물질로서 chloracetamide을 각각 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000 mg/kg dry weight of soil 농도별로 예비시험하였다. 예비시험 결과에서 지렁이가 생존한 최고농도 및 최저농도를 고려하여 6단계 이상의 농도를 등비급수적으로 설정하여 최종 시험하였다. 최종 시험은 4회 반복 수행하였다. 각 테스트 기간 중 머리 부분에 자극을 주어도 반응이 없을 때 치사된 것으로 간주하여 배양용 비이커로부터 제거하였다. 시험 전과 종료 후에 시험 농도군 및 대조군의 토양 pH와 수분, 지렁이 길이와 체중을 측정하였다. 14일 후의 생체량과 치사수를 조사하여 SPSS 10.0 프로그램 (SPSS Science, USA)을 이용한 probit 분석법에 의하여 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>)를 산출하였다(17).

## 결과 및 고찰

### 국내의 규격 검토

독성 시험은 화학물질의 독성 유무나 그 강도를 실험적으로 계획하고, 사람의 건강에 대한 화학물질의 위험성을 예측하는 것이다. 독성 오염물질의 환경안전성을 결정하기 위해서는 오염물질의 이화학적 분석만으로는 부족하고, 생물학적 검정이 필요하다. 생물학적 검정은 어떤 물질이 시험 생물체의 신진 대사, 번식의 감소, 생체기능의 상실이나 치사 등에 미치는 영향을 조사 분석함으로써 오염물질의 유해성을 검사하는 방법이다.

본 연구에서는 토양 속에서 화학물질의 영향을 분석하는 독성테스트에 대한 국내외 규격을 검토하였다. 국내에 표준화되어 있는 규격으로 "지렁이에 대한 오염 물질의 영향 측정 방법" (KS M 9724)이 있는데 14일간 인공 토양 기질을 이용한 급성 측정 방법이다(20). 또한 "지렁이에 미치는 오염 물질의 영향" (KS M 9744)은 1년 동안 자연 생태계에서 독성 테스트하는 방법으로서 제시되어 있다. 국외에 표준화되어 있는 독성 테스트의 규격으로 OECD 207은 14일간 인공토양 기질을 이용한 급성 측정 방법으로 국내 규격과 동일하다. OECD 207 규격에 근거하여 수행된 독성분석으로서 급성독성시험 대상 시료인

가벤다 수화제 (carbendazim), 베노밀 수화제 (benomyl)과 지오 판 수화제 (thiophanate-M)의 LC<sub>50</sub> 값은 각각 59, 53, 64 mg/kg의 농도로 제시하고 있다(7).

국의 규격 중에서 OECD는 화학물질에 대한 국제적 상호 인 증의 시발점이라 할 수 있다. 우리나라를 비롯하여 대부분의 경제 선진국들이 OECD 시험 지침을 공인하고 있어 본 실험에 서는 OECD 207을 채택하여 실험하였다.

**Table 2.** Mortality and loss of body weight of the earthworms in the preliminary tests

Test compounds	Concentration (mg/kg dry weight of soil)	Mortality (%)	Loss of body weight (%)	pH	Moisture (%)
Biodiesel (BD)	24,000	100	-	5.8	32~38
	12,000	100	-	5.7	
	6,000	100	-	5.4	
	3,000	100	-	5.8	
	2,000	0	10	5.6	
Neopentyl polyol ester (NPE) lubricant oil base	1,000	0	7	5.6	31~37
	24,000	100	-	5.6	
	12,000	100	-	5.7	
	6,000	100	-	5.6	
	3,000	100	-	5.9	
Lubricant oil for diesel engine (LODE)	2,000	100	-	5.4	31~38
	1,000	0	7	5.9	
	100	0	12	5.9	
	10	0	9	6.1	
	1	0	10	5.7	
Petroleum diesel (PD)	0.1	0	9	5.8	30~39
	0.01	0	8	5.7	
	1,000	100	-	5.9	
	100	20	-	6.2	
	10	0	16	6.6	
Chloracetamide (positive control)	1	0	14	5.8	30~39
	0.1	0	9	5.8	
	0.01	0	8	5.8	
	100	100	-	5.7	
	10	0	14	5.6	
Control	0	0	6	5.9	32~38

### 급성 독성 예비 시험

OECD 207에 의하면 분석시료를 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000 mg/kg의 농도로 인공토양에 처리하여 지렁이를 치사시키는 최저 농도와 최고의 비치사 농도 사이의 범위를 선정하여 최종 시험하는 방법이 권장되고 있다. 독성 시험용 지렁이는 시험 전에 무게를 재어 개체당 300~600 mg 범위의 지렁이로 선별하였으며 시험이 끝난 후 지렁이의 체중감소를 측정하였다. 또한 지렁이 독성 시험 기간 중에 최적의 사육조건을 위해 분무기로 물을 첨가하여 수분함량이 35%가 되도록 조절하였으며 탄산칼슘 (CaCO<sub>3</sub>)을 첨가하여 pH를 5.9 ± 0.5로 유지시켰다. Table 2에서 보는 바와 같이 지렁이에 대한 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>)를 구하기 위하여 바이오디젤, NPE계 윤활유 베이스, 디젤유 윤활유, 석유 디젤과 대조물질을 농도별로 처리하여 독성 예비 시험한 결과 각각 3,000, 2,000, 1,000, 1,000, 100 mg/kg에서 치사율 100%를 나타내었다. 시험 물질을 처리하지 않은 농도에서는 치사 개체가 관찰되지 않았으며 6% 이내의 체중 감소만을 보였는데 이것은 시험기간 중에 먹이를 공급하지 않았기 때문인 것으로 판단된다. 바이오디젤과 NPE계 윤활유 베

이스의 체중 감소는 시험물질의 농도가 각각 2,000과 1,400 mg/kg 이하에서 7~10%의 체중 감소를 보였다. 반면에 디젤유 윤활유와 석유 디젤은 각각 200과 400 mg/kg 이하의 농도에서 8~16%의 체중감소를 보였다. 시험 물질과 무처리구에 대한 체중 감소율을 비교해 볼 때 이와 같은 체중 감소는 시험 물질에 의한 영향으로 추정되었다. 또한 pH와 수분에 의한 지렁이의 치사영향을 확인하기 위해 모든 시험구의 pH와 수분함량을 측정하였는데 각각 5.4~6.2와 30~39%로서 큰 폭으로 변화하지 않았음을 확인하였다. 이것은 지렁이의 치사가 pH와 수분에 의해 영향을 받는 것이 아니라 시험 물질의 독성에 의해 영향을 받는 것으로 사료된다.

**Table 3.** Mortality and loss of body weight of the earthworms in the final test

Test compounds	Concentration (mg/kg dry weight of soil)	Mortality (%)	Loss of body weight (%)
Biodiesel (BD)	3,000	100	-
	2,800	100	-
	2,600	70	-
	2,400	45	-
	2,200	27	-
Neopentyl polyol ester (NPE) lubricant oil base	2,000	0	10
	2,000	100	-
	1,800	67	-
	1,600	42	-
	1,400	37	10
Lubricant oil for diesel engine (LODE)	1,200	22	6
	1,000	2.5	7
	1,000	100	-
	800	72.5	-
	600	62.5	-
Petroleum diesel (PD)	400	42.5	-
	200	0	16
	100	0	14
	1,000	100	-
	800	67	-
Chloracetamide (positive control)	600	37	-
	400	0	16
	200	0	14
	100	0	8
	100	100	-
Control	80	87.5	-
	60	70	-
	40	55	-
	20	42.5	-
	10	0	10
Control	0	0	0

**Table 4.** LC<sub>50</sub> values of the test compounds

Test compounds	LC <sub>50</sub> (mg/kg dry weight of soil)	Toxicity grade
Biodiesel (BD)	2,450 (2,313~2,547)*	slightly toxic
Neopentyl polyol ester (NPE) lubricant oil base	1,528 (1,340~1,761)*	slightly toxic
Lubricant oil for diesel engine (LODE)	500 (350~636)*	moderately toxic
Petroleum diesel (PD)	603 (469~740)*	moderately toxic

\*predicted by 95% confidence limits

### 급성 독성 최종 시험

Table 2의 예비 시험 결과에 근거하여 새로이 설정된 시험물질의 시험농도 범위에서 14일간 독성 시험을 수행하였다 (Table 3). Table 3에서 보는 바와 같이 시험기간 동안 치사율과 생체량을 비교해 보면 치사율이 증가할수록 체중감소가 크게 나타나 생존 개체의 체중 감소가 10% 이상 관찰되었으며, 시

함물질의 농도가 높을수록 10~85% 이상 체중감소를 보였다. 바이오디젤, NPE계 윤활유 베이스, 디젤유 윤활유, 석유디젤과 대조물질의 지렁이에 대한 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>)를 SPSS에 의한 probit 분석법에 의해 추정된 결과 각각 2,451, 1,529, 500, 603, 32 mg/kg의 값으로 산출되었다(Table 4). 대조물질인 chloracetamide의 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>)는 32 mg/kg로서, 다른 연구자에 의하여 20~40 mg/kg로 보고한 것과 큰 차이가 없었다 (21, 22). 일반적으로 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>)가 100,000 mg/kg 이상인 물질을 상대적 무해 (relatively harmless)라고 하며 이외에도 실제적 무독성 (practically nontoxic, LC<sub>50</sub>: 10,000~100,000 mg/kg), 경독성 (slightly toxic, LC<sub>50</sub>: 1,000~10,000 mg/kg), 중등독성 (moderately toxic, LC<sub>50</sub>: 100~1,000 mg/kg), 고독성 (highly toxic, LC<sub>50</sub>: 10~100 mg/kg)과 맹독성 (extremely toxic, LC<sub>50</sub> < 10 mg/kg)으로 구분한다(23). Table 4에서 보는 바와 같이 바이오디젤과 NPE계 윤활유 베이스는 6단계로 분류되는 독성등급 중 독성이 적은 경독성 (slightly toxic)으로 분류되었다. 반면 디젤유 윤활유와 석유디젤은 중등독성 (moderately toxic)으로 분류되었다. 이상의 결과는 동일한 화합물을 미세조류를 이용한 수상에서의 독성 분석 결과(24)와 일치하였다. 바이오디젤, NPE계 윤활유 베이스, 디젤유 윤활유, 석유디젤과 대조군의 지렁이에 대한 반수치사농도 추정시의 유의확률 (p-value)은 각각 0.049, 0.032, 0.011, 0.031, 0.007로서 유의수준 5%에서 유의성 있게 추정되었음을 알 수 있었다.

## 요 약

바이오디젤과 바이오디젤을 기반으로 생산된 neopentyl polyol ester (NPE)계 윤활유 베이스, 디젤유 윤활유와 석유디젤을 분석대상으로 하여 지렁이 (*Eisenia fetida*)를 이용한 독성 시험을 수행하였다. OECD 207 규격에 근거하여 독성을 분석한 결과 바이오디젤과 NPE계 윤활유 베이스의 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>) 값은 각각 2,450과 1,528 mg/kg dry weight of soil로서 두 물질은 독성이 적은 경독성 (slightly toxic) 물질인 것으로 판명되었다. 디젤유 윤활유와 석유디젤의 경우 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>) 값이 각각 500과 603 mg/kg로서 중등독성 (moderately toxic) 물질로 판정되었다.

## 감 사

본 연구는 산업자원부 청정생산기술사업의 연구지원 (과제번호: 10006873, 2003~2004년도)에 의하여 수행된 연구 결과이며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Lee, S. (1998), New challenges in environmental toxicology. *Kor. J. Environ. Agric.* 7, 65-73.
- Van Leeuwen, C. J. and J. L. M. Hermens (2001), In *Risk Assessment of Chemical: An Introduction*, pp128-132, Kluwer Academic Publishers, Boston.
- An, Y. J., Y. M. Kim, E. J. Lee, T. L. Kwon, and H. W. Yang (2003), Ecotoxicological evaluation of soils contaminated by copper, *Kor. Soc. Environ. Eng.* 1446-1445.
- Dawin, C. (1881), In *Formation of Vegetable Mould through the Action of Worms*, pp326, Murray, London.
- Choi, H. K. (2001), Resource anger of waste for organic matter that use earthworm, *Kor. J. Sol. Wast. Eng. Soc.* 18, 30-40.
- Edwards, C. A. and A. R. Thompson (1973), Pesticides and the soil fauna, *Res. Rev.* 45:1-79.
- Park, Y. K., K. H. Park, B. S. Kim, K. S. Kyung, J. S. Shin, and B. Y. Oh (2000), Development of test method for the evaluation of pesticide acute toxicity using earthworm (*Lumbricus-rubellus*), *Kor. J. Pestic. Sci.* 4, 56-60.
- Davies, N. A., M. E. Hodson, and S. Black (2003), The influence of time on lead and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test, *Environ. Pollut.* 121, 55-61.
- OECD (2000), Draft guideline for the testing of chemicals: Earthworm reproduction tests (*Eisenia fetida/ andrei*), Organisation for Economic Cooperation and Development.
- USEPA (1994), EPA/600/4-91/002: Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to fresh water, United States Environmental Protection Agency (USEPA).
- KS (2001), KS M 9744: Soil quality-Effects of pollutants on earthworms, Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations, Korean Agency for Technology and Standards.
- ISO (1999), ISO 11268-3: Soil quality-Effects of pollutants on earthworms, Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations, International Organization for Standardization (ISO).
- NREL (1998), Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus, NREL/SR-580-24089, National Renewable Energy Laboratory.
- Park, K., H. Jung, and H. J. Chae (2003), Microbiological stability test of biodiesel, *Kor. Acad. Indus. Soc.* 4, 387-390.
- Jung, H., E. Y. Kim, and H. J. Chae (2004), Biodegradability tests of biodiesel-derived pentaerythritol lubricant oil bases, *Kor. J. Biotechnol.* 19, 132-137.
- <http://www.kosha.or.kr/> (2001).
- OECD 207 (1984), Earthworm, acute toxicity tests, Organisation for Economic Cooperation and Development.
- KS (2001), KS M 9741: Soil quality-Determination of pH, Korean Agency for Technology and Standards.
- ISO (1994), ISO 10390: Soil quality-Determination of pH, International Organization for Standardization (ISO).
- KS (1998), KS M 9724: Soil quality-Effects of pollutants on earthworm (*Eisenia fetida*) Part 1: Determination of acute toxicity using artificialsoil substrate, Korean Agency for Technology and Standards.
- 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, *EUR 9360 EN*, pp 99, Commission of the European Communities.
- Viswanathan, R. and F. Korte (1984), A laboratory study to determine the toxicity of 15 organic chemical to *Eisenia fetida* using an artificial medium. In *Actes Symposium Internationale Ecotoxicologie Terrestre*, pp 629-636, Les Ares.
- USEPA (1996), EPA 738-R-96-022: Reregistration eligibility decision (RED) mintin FF, United States Environmental Protection Agency (USEPA).
- Jung, H., J.-H. Lee, J. W. Yoo, E. Y. Kim, and H. J. Chae (2005), Toxicity test of biodiesel and biodiesel-derived neopentyl polyol ester lubricant oil base using microalgae, *Kor. J. Biotechnol.* 20, 55-59.