

# 지렁이를 이용한 바이오디젤 유래 펜타에리쓰리톨계 윤활유 베이스의 환경 독성 테스트

정해영 · 박완선\* · 김의용\*\* · 채희정\*

\*호서대학교 식품생물공학전공 및 벤처전문대학원,

\*\*서울시립대학교 화학공학

hjchae@office.hoseo.ac.kr

## Biodiesel-derived Pentaerythritol Lubricant Oil Bases Earthworm Using Toxicity Test

Haeyoung Jung, Wanseon Park\*, Eui Yong Kim\*\* and Hee Jeong Chae\*

\*Department of Food and Biotechnology and Department of Innovative Industrial  
Technology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

\*\*Department of Chemical Engineering, The University of Seoul, Seoul 130-743,  
Korea

### 요 약

바이오디젤(지방산 메틸에스테르)을 기반으로 하여 생산된 합성윤활유 베이스에 대한 독성을 분석 평가 하였다. OECD 207의 방법에 의거하여 인공토양(artificial soil)에서 300~600 mg의 지렁이를 선별하였다. 0.01, 0.1, 1, 10, 100과 1,000 mg/kg의 각 농도별로 선별된 지렁이를 10마리씩 넣고 수분 31~37%, 온도 20±2℃와 pH 6.0±0.5를 조절하여 14일간 지렁이의 반수치사농도(lethal concentration when 50% of the population were killed, LC<sub>50</sub>)를 측정하였다. 합성윤활유의 측정된 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)는 1,555 mg/kg로 측정되었으며, 유의확률이 < 0.02로서 유의수준 5%에서 유의함을 알 수 있었다.

### Abstract

Toxicity test for various synthetic lubricant oil bases derived from biodiesel was carried out. The earthworms(*Eisenia fetida*) were maintained in artificial soil consisting of sand for 14 days. *Eisenia fetida* was cultivated at temperature of 20±2℃, pH 6.0±0.5 and moisture of 31~37%. Pentaerythritol(PE) lubricant oil base was tested for acute toxicities to *Eisenia fetida*. The earthworms were exposed to each lubricant oil with various concentrations of lubricant oil base. After 14 days, the number of surviving earthworms and their weight alteration during the test period was determined. LC<sub>50</sub>(lethal concentration when 50% of the population were killed) pentaerythritol was determined to be 1,555 mg/kg soil dry weight.

Key Words : biodiesel, LC<sub>50</sub>, Pentaerythritol, earthworms

### 1. 서론

환경오염은 인구의 증가 및 산업사회로의 전환에 따라 부득이 발생되게 마련이다. 제 2차 세계대전 이후 중화학공업의 발달에 따라 막대한 양의 화학약품이 사

용되어 왔다. 지난 수 십 년간 환경오염문제를 해결하기 위한 수많은 노력 가운데 환경으로 유입되는 화학물질이 인간과 생태계에 미치는 영향을 조사하는 환경위해성 평가의 대부분은 주로 경제협력개발기구(Organization of Economic Cooperation and

Development, OECD), 세계보건기구(World Health Organization, WHO), 유럽 및 지중해 식물 보호협회(European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO)와 화학물질의 독성 및 생태독성에 관한 유럽공동체(The Council of Europe and the European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, ECETOC) 등의 단체가 주도하였다. 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[1]. 여러 가지 화학물질에 대한 독성분석은 다양한 방법에 의해 수행된다. 14일간 급성 독성 시험하여 반수치사농도 LC<sub>50</sub>를 평가하거나[2], 중금속으로 인해 오염된 토양의 독성학적 평가로는 인위적으로 농도가 다른 중금속을 주입하여 토양오염상황을 조성하여 식물의 성장저해율(effective concentration which caused a 50% reduction in a measured parameter, EC<sub>50</sub>)값을 산정하는 방법 등이 제시되어 있다[3]. 또한 납에 의해 오염된 토양에서 28일간 지렁이를 이용한 독성테스트 방법이 제시되어 있다[4]. 이 경우, OECD 2000을 기준으로 하여 LC<sub>50</sub>, 무 영향농도(no observed effect concentration, NOEC)과 EC<sub>50</sub>을 산출한다. 또한 야외 현장에서 지렁이에 대한 물질의 영향을 규정한 규격이 있다[5,6]. 혼합된 화학물질의 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[7]. 세계적으로 석유계 윤활유 등이 생태계에 유출되어 오염문제를 유발하여 친환경성 생분해 윤활유의 개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 바이오디젤은 저장 중 미생물에 대한 안정성이 높으면서 토양이나 수중에 유출되었을 때 생분해성이 높은 것으로 보고되어 있다[8]. 본 연구에서는 생분해성 윤활유의 품질 평가에서 생태계에 유출되었을 때 미치는 독성평가를 위한 국내외 규격 및 여러 문헌을 비교 검토하였다. 대두유(soybean oil)를 원료를 하여 생산된 바이오디젤 유래의 여러가지 합성 윤활유 베이스, 석유디젤과 디젤엔진오일의 독성평가를 함께 비교하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 재료 및 장치

지렁이에 대한 급성독성시험시 사용한 에스테르계 윤활유 베이스와 바이오디젤은 ㈜신한에너지로부터 제공받아 사용하였으며, 지렁이(*Eisenia fetida*)는 ㈜그렌지에서 구입하여 실험하였다. 검토한 국내외 규격 중 본 연구에서 분석절차로 채택한 규격인 OECD 207에 근거한 지렁이의 급성독성실험은 조도측정기(IM 20, Topcon, Japan)를 사용하여 광도 400~800 Lux의 조건에서 20±2℃의 온도에서 공기가 순환되는 BOD인큐베이터(VS-120391, Vision scientific, Korea)에서 수행하였다.

### 시험생물 및 시험토양

시험에 사용한 지렁이는 성체가 환대(지렁이의 생식기구)를 가지고 있고 체중이 300~600 mg인 개체를 분양받아 급성독성실험 전에 OECD 207에서 제시한 방법에 따라 준비된 인공토양에서 사육시켰다(Table 1).

Table 1. Composition of the artificial soil for culturing earthworms

| Artificial soil test substrate | Soil condition   | Component (%) |
|--------------------------------|--|---------------|
| Sphagnum peat                  | pH 5.5~6.0, no visible plant and finely ground kaolinite content above 30% | 10            |
| Kaolin clay                    | particle size 0.05~0.2 mm  | 20            |
| Industrial sand                |  | 70            |

시험토양은 Table 1의 조성으로 준비하되 소량의 샘플을 취해 105℃에서 수분함량을 측정하여 전체 수분함량이 35%가 되도록 증류수를 가하여 조절 후 CaCO<sub>3</sub>을 충분히 첨가하여 pH를 6.0±0.5로 유지시켜 실험하였다. 토양의 pH측정은 증류수, 1M 염화칼륨(KCl) 또는 0.01 M의 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>)이 함유된 pH 측정용액 내에서 토양의 1:5(V/V) 현탁액에 대하여 pH를 측정하였다[9,10].

### 급성독성시험

1 L의 유리 비이커를 사용하여 인공토양에서 1일 이상 순화시킨 지렁이를 시험 농도당 10마리씩

중류수로 씻어 토양 표면에 넣고 뚜껑은 통풍 구멍이 뚫린 플라스틱 필름으로 덮어 건조 방지하였다[11]. 지렁이에 대한 펜타에리트리톨계 윤활유, 바이오디젤, 디젤 엔진윤활유와 석유디젤의 반수치사농도를 구하기 위하여 유리용기마다 시험토양 750 g을 넣고 각각 농도별(0.01, 01, 10, 100, 1,000 mg/kg)로 예비시험하며 최종시험은 4번 반복하여 시험하였다. 예비시험 결과에서 지렁이가 생존한 최고농도 및 최저농도를 고려하여 5단계이상의 농도를 등 비급수적으로 설정하였다. 머리 부분에 자극을 주어도 반응 없을 때 사망으로 간주하여 제거하였다. 14일 후의 생체량과 치사수를 조사하여 SPSS10.0 프로그램(SPSS Science, USA)를 이용한 probit 분석법에 의하여 반수치사농도를 산출하였다.

3. 결과 및 고찰

국내외 규격 검토

독성 시험법은 화학물질의 독성 유무나 그 강도를 실험적으로 계획하고, 사람의 건강에 대한 화학물질의 위험성을 예측하는 연구 분야이다. 따라서 독성을 검출하기 위하여 적절한 생물을 이용하여, 그 생물에 대한 독성의 강도를 예측하는 방법이다.

본 연구에서는 바이오디젤 유래의 생분해성 윤활유를 독성 테스트를 하기 위하여 화학물의 독성 테스트에 대한 국내외 규격을 검토하였다. 국내에 표준화되어 있는 독성 테스트에 관한 규격으로 "지렁이에 대한 오염 물질의 영향 측정 방법"(KS M 9724)는 14일간 인공 토양 기질을 이용한 급성 측정 방법과 "지렁이에 미치는 오염 물질의 영향" (KS M 9744)은 1년 동안 자연 생태계에서 독성 테스트를 하는 방법을 제시하고 있다. 국외에 표준화되어 있는 독성 테스트의 규격으로 "지렁이의 급성 독성 테스트" OECD 207는 14일간 인공토양 기질을 이용한 급성 측정 방법으로 국내 규격과 동일하다. 국외 규격 중에서 OECD는 화학물질에 대한 국제적 상호인종의 시발점이라 할 수 있다. 우리나라를 비롯하여 대부분의 경제선진국들이 OECD 시험지침을 공인하고 있어 본 실험에서는 OECD 207B를 채택하여 실험하였다.

급성 독성 예비 시험

지렁이에 대한 반수치사농도를 구하기 위한 처리 농도를 설정하기 위하여 pentaerythritol[96% Tetra PE(C<sub>77</sub>H<sub>140</sub>O<sub>8</sub>)와 4% methylester(C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>

O<sub>2</sub>)의 혼합물]Fig. 1 을 최적 사용조건은 Table 2. 의 조건에서 독성시험을 수행하였고, 예비시험 결과는 Table 3과 같다.

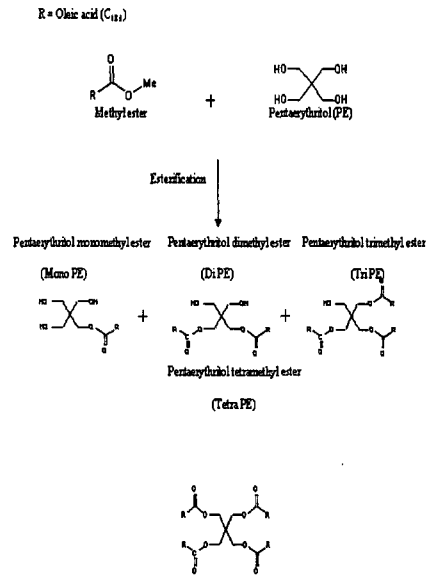


Fig. 1 Manufacturing process for PE methyl ester lubricant oil bases.

Table 2. Test condition for evaluating the acute toxicity of the pesticides using earthworms

| Factor          | Test conditions       |
|-----------------|-----------------------|
| Species         | <i>Eisenia fetida</i> |
| Soil            | Artificial Soil       |
| Temperature     | 20 ± 2 °C             |
| Soil moisture   | 35%                   |
| Light intensity | 400~800 lux           |

Table 3. Mortality and loss of body weight of the earthworms

| lubricant oils | concentration(mg.kg) | Mortality(%) | Loss of body weight(%) |
|----------------|----------------------|--------------|------------------------|
| biodiesel      | 1,000                | 0            | 17                     |
|                | 100                  | 0            | 15                     |
|                | 10                   | 0            | 16                     |

|              |       |   |    |
|--------------|-------|---|----|
|              | 1     | 0 | 6  |
|              | 0.1   | 0 | 10 |
|              | 0.01  | 0 | 7  |
|              | 1,000 | 0 | 17 |
|              | 100   | 0 | 14 |
| pentaerythri | 10    | 0 | 9  |
| tol          | 1     | 0 | 10 |
|              | 0.1   | 0 | 6  |
|              | 0.01  | 0 | 7  |
|              | 1,000 | 8 | -  |
|              | 100   | 2 | -  |
|              | 10    | 0 | 16 |
| diesel Oil   | 1     | 0 | 16 |
|              | 0     | 0 | 14 |
|              | 0.1   | 0 | 8  |
|              | 0.01  | 0 | 6  |
| control      | 0     | 0 | 6  |

예비시험 토대로 PE의 농도를 1,000, 1,200, 1,400, 1,600, 1,800과 2,000mg/kg의 농도를 설정하여 농도당 4개의 비이커에 10마리씩 넣고 14일 후 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. LC<sub>50</sub> pentaerythritol to earthworms

| Test compound   | concentration mg/kg | mortality (%) | LC <sub>50</sub> (mg/kg dry weight soil) |
|-----------------|---------------------|---------------|--|
| pentaerythritol | 2,000               | 100           | 1,555 (1384~1749)                        |
|                 | 1,800               | 67.5          |  |
|                 | 1,600               | 42.5          |  |
|                 | 1,400               | 37.5          |  |
|                 | 1,200               | 22.5          |  |
|                 | 1,000               | 2.5           |  |
| control         | 0                   | 0             | -  |

\*95% confidence limits

SPSS의 probit 분석법에 의하여 PE의 LC<sub>50</sub>값을 산출한 결과 1,555.08mg/kg의 결과를 보였고, 유의확률이 < 0.02로서 유의수준 5%에서 유의함을 알 수 있었다.

4. 참고문헌

[1]. Van Leeuwen, C. J. and J. L. M. Hermens (2001), Risk assessment of chemical: an

introduction, pp128-132, DongHwa Technology, Seoul.

[2]. 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*), *J. Kor. Pestic. Soc.* 4, 56-60.

[3]. 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.* 1446-144.

[4]. 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.

[5]. 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).

[6]. 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 Standard* (KS).

[7]. NREL (1998), Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus, NREL/SR-580-24089, National Renewable Energy Laboratory.

[8]. Jung, H., E. Y. Kim and H. J. Chae (2004), Biodegradability Tests of biodiesel-derived pentaerythritol lubricant oil bases, *Kor. J. Biotechnol.* (in press).

[9]. ISO (1994), ISO 10390: Soil quality- determination of pH, *International Organization for Standardization* (ISO).

[10]. KS (2001), KS M 9741: Soil quality- determination of pH, *Korean Agency for Technology and Standard* (KS).

[11]. OECD 207 (1984), Earthworm, acute toxicity tests, *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD).