

Caenorhabditis elegans를 이용한 phenol류의 독성 연구

정 강 식, 현 선 희, 정 세 영*

경희대학교 약학대학 위생화학교실

Toxicity of Phenols to the Nematode *Caenorhabditis elegans*

Kang Sik Jung, Sun Hee Hyun and Se Young Choung*

Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University,
Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) is a free-living soil nematode that commonly used as a biological model and recently, much work has been done using *C. elegans* as a toxicity model. To evaluate the acute toxicity of phenols to *C. elegans*, worms were subsequently exposed to nine different xenobiotics. This study described lethal toxicity, reproductive toxicity and movement inhibition using 2-propylphenol, 4-propylphenol, 2-tert-butylphenol, 3-tert-butylphenol, 4-tert-butylphenol, 2-phenylphenol, 4-phenylphenol, nonylphenol and 4-dodecylphenol to *C. elegans* for 24 hr or 72 hr. We found that phenols used in this study were very toxic to *C. elegans*. The order of lethal toxicity, reproductive toxicity and movement inhibition is as follows.

4-propylphenol > 2-phenylphenol > 2-tert-butylphenol > 2-propylphenol > nonylphenol > 3-tert-butylphenol > 4-dodecylphenol > 4-tert-butylphenol > 4-phenylphenol.

Key words : *Caenorhabditis elegans*, phenols, lethal toxicity, reproductive toxicity

서 론

2000년대에는 경제 개발 보다는 환경이라는 단어에 더 많은 관심을 가지게 되었다. 이의 배경은 환경을 파괴함으로써 생겨난 새로운 부작용들이 갑작스럽게 나타났기 때문이다. 이런 부작용 중 인간에게 심각한 영향을 끼치는 것이 환경호르몬

(environmental hormones)이다. 환경호르몬이란 말은 '환경'에 노출된 화학물질이 생체 내로 유입돼 마치 호르몬처럼 작용한다는 의미에서 일반인의 이해를 돕기 위해 만들어진 용어로, 학술적으로 널리 사용되는 용어는 내분비계 교란물질(endocrine disruptors)이며 생체의 생리기능을 관장하는 내분비계의 비정상적인 작용을 유발하는 원인물질이다(국립환경연구원, 1998).

내분비계 장애물질은 생체 호르몬과는 달리 쉽게 분해되지 않고, 잔류성이 강해 수년간 지속될 수도 있으며 인체 등 생물체의 지방조직에 점차

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-961-0372, Fax: +82-2-961-0372
E-mail: sychoung@khu.ac.kr

농축되는 성질이 있다.

내분비계 장애물질의 독성은 field survey, *in vitro* assay, *in vivo* assay 등의 방법으로 평가하는데 각 방법마다 특성이 다르다. Field survey는 실제 생태계에서 내분비계 장애물질에 대한 노출영향을 집단수준의 차원에서 조사하는 것이다. 이는 생태계 현장에서 나타나는 영향 유무를 단순히 관찰하는 것뿐만 아니라, 기존의 *in vitro* assay, *in vivo* assay, 생태학적 조사, 그리고 이들을 통합·분석하는 각종 통계학적 기법을 이용한 프로그램으로 운영되고 있다.

In vitro assay는 생체내의 조건을 인위적으로 만들어 시험관 등의 생체 밖에서 실시하는 시험으로서 *in vivo* assay 보다 용이하고, 결과를 신속히 볼 수 있는 장점이 있어, 유해화학물질을 일차적으로 검색하는데 널리 이용되고 있다. 현재 내분비계의 요소들을 조절하거나 이들과 반응하는 물질들의 영향을 평가하기 위해 수많은 *in vitro* assay가 사용되고 있으며 이들 방법의 대부분은 작용기전을 규명하거나, 대상물질의 잠재적 위해성을 평가하는데 이용되어왔다. 그러나 이 방법은 *in vivo* assay 결과와의 상관관계 확보 등 그 이용에 한계가 있고, 현재로는 *in vitro* assay는 생체 내 시험을 대체하기보다는 보완적 측면에서 이용될 수 있다고 결론을 내리고 있다. *In vivo* assay는 시험물질을 시험동물에 직접 투여하여 실시하는 시험으로서 물질의 영향을 직접적으로 확인할 수 있는 장점이 있다. 그러나 이 방법은 시간이 오래 걸리며, 심지어 수 세대에 걸쳐 실시하기도 하는 단점이 있다. 현재 내분비계장애물질 연구를 위해 일반적으로 이용되는 설치류 외에도 어류, 조류, 양서류, 파충류 등을 이용한 시험방법들이 점차 개발되고 있다. 그러나 내분비계 장애물질을 검색하기 위한 표준화된 생체 내 시험방법이 아직 정립되지 않은 실정이라 OECD를 비롯한 각 국에서 이러한 시험법 개발에 대한 노력을 계속하고 있다(국립환경연구원, 1998; 신동천, 1999).

그 중 하나로 새로 주목을 끌기 시작하는 것이 예쁜 꼬마 선충(*Caenorhabditis elegans*)이다(Kessel *et al.*, 1989; Hood *et al.*, 2000; Easton *et al.*, 2000; Emmons, 2005). 예쁜 꼬마 선충은 흙 속에 사는 작은 선충류(nematoda)로서 주로 토양세균을 먹이로 하며, 암수 한 몸의 자가 수정을 통해 동일

한 인자형의 자손을 생산할 수 있으며, 단일 개체의 성체로부터 생산되는 자손의 개체수가 극히 많아 유전학적인 연구의 좋은 모델로서 이용되고 있는 생명체이다. 야생형의 경우 성체가 되어도 크기가 1 mm 정도에 지나지 않는 투명한 구조를 가지며 인체에 직접적인 해를 끼치지 않으므로 생물학 실험실에서 일반적인 광학현미경이나 해부현미경으로도 관찰할 수 있다. 또한 지속된 유전학적 연구의 결과로 상당수 유전자에 관한 돌연변이종이 동정되어 유지되고 있으므로 돌연변이종의 표현형질을 관찰하고자 할 때 용이하게 사용되고 있다. 또 life cycle이 짧아 단기간에 많은 수의 자손을 얻을 수 있어서 중금속 독성이나 생태오염물질의 독성 연구에 적합한 동물 모델로 알려져 있다. *C. elegans*는 최적 조건에서 약 3~4일의 life cycle을 갖고 있다. 자웅동체(Hermaphrodite)와 웅체(Male)의 두 가지 성으로 존재하나 99.7%가 자웅동체이며, 성체의 길이는 약 1 mm 정도이다. *C. elegans*는 해부학적으로, 유전적으로 단순한 개체로 자웅동체는 XX, 웅체는 XO의 유전자형을 갖고 있다. 한 마리의 자웅 동체로부터 생성되는 알과 정자는 모두 같은 유전자형을 지니기 때문에 나오는 자손들은 모두 부모세대와 동일한 유전자형을 지니게 되어, 유전학적인 실험 등에 다양하게 사용되고 있다. *C. elegans*는 알에서부터 L1, L2, L3, L4의 네 유생 시기를 거쳐 성체가 된다. 성장에 적합한 온도는 15°C에서 25°C 정도이고, 알에서 성체가 되기까지 걸리는 시간은 20°C에서 대략 4일 정도이다. 그리고 실제 자연 상태에서 먹이의 문제와 환경의 문제를 극복하고 생존해 나가기 위해, L3의 변형인 dauer라는 특수한 시기를 가지기도 한다. *C. elegans*의 웅체는 생식세포 분열시 염색체 비분리 현상(Chromosome nondisjunction)에 의해 아주 낮은 빈도로 존재한다. 성체가 되었을 때, 웅체가 자웅동체보다 작고 가늘게 생겼다. 자웅동체는 대략 300여 개의 정자를 만들고, 1,000개 이상의 난자를 생성한다. 따라서 자웅동체 단독으로 자가수정에 의해 300마리 정도의 자손을 낳을 수 있다. 웅체와의 교미를 통해 더욱 많은 수의 자손을 만들 수도 있다(Lewis *et al.*, 1995; Squire *et al.*, 1995; Emmons, 2005).

내분비장애물질로 추정되는 물질들은 세계야생생물보호기금(World Wildlife Fund: WWF)에서 총

67종, 일본에서는 140여종, 미국환경관련단체들에서 총 74종으로 분류하고 있다.

미국환경청 (US EPA)은 내분비장애물질로 추정되는 물질들 중 POH를 상위 환경 오염물질로 지정하였다 (US EPA, 1997). 이는 이들 페놀들이 적은 양으로 음용수나 강물에 존재한다고 하더라도 수중식물과 물고기의 생명에 위협을 주고 물의 냄새가 달라지기 때문이다 (Realini *et al.*, 1981). 일반적으로 1 ppb 이하 농도에서는 무해하나, 그 이상이 되면 독성이 나타난다고 한다. 1 ppb 이하의 용액이 무해하다고 하나 축적효과와 먹이사슬현상 때문에 수중 생물과 인간에게 피해를 줄 수 있다. 우리나라에서 두 번에 걸쳐 일어난 낙동강 페놀오염사건은 대표적인 수질오염 사건이다. 페놀은 유독물로 피부암과 생식이상을 일으키고 태아에도 영향을 끼치는 유해물질이다. 따라서 본 연구에 사용한 페놀류는 내분비계 장애물질로 추정되고 있을 뿐, nonylphenol을 제외하고는 아직 그 독성연구가 시작단계에 있으므로 이에 대한 연구가 시급하다고 사료된다. Kwack 등은 4-propylphenol, 4-butylphenol, 4-t-butylphenol, 4-pentylphenol, 4-nonylphenol, 4-octylphenol, 4-t-octylphenol, and 4-phenylphenol 등의 페놀류에 대해 MCF-7 cell 증식 효과와 estrogen receptor와의 결합능을 *in vitro* test를 통해 연구했으며 난소 절제술을 실시한 SD rat에서 uterotrophic assay와 Calbindin-D9K mRNA expression을 통해 estrogen 유사작용을 확인하였다 (Kwack *et al.*, 2002). 그러나 아직까지 *C. elegans*를 대상으로 내분비계 장애물질로 추정되는 phenol류 독성을 연구한 보고는 없다. 따라서 본 연구에서는 phenol류가 *C. elegans*의 생식기능과 운동능력에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. *C. elegans*

본 실험에 사용한 *C. elegans*는 미국 Minnesota 주립대학에 있는 *Caenorhabditis Genetics Center*로부터 분양 받았다.

*C. elegans*를 NGM (Nematode Growth Medium) plate, 20°C BOD incubator에서 약 3일간 배양하였

다. 개체의 밀도가 높은 plate를 K-medium을 이용하여 알과 성충 등을 모아 2,000 rpm에서 2분간 원심분리하고 상징액을 제거하였다. Clorox액을 가하여 약 10분간 부드럽게 흔들어서 알과 성충을 분리하였다. 다시 2,000 rpm에서 2분간 원심분리 후 상징액을 제거하고, K-medium을 이용하여 수회 세척하였다. 이 과정을 통해 분리한 알을 *E. coli* OP50을 깔 NGM plate에 놓아, 3~4일 후 젊은 성충이 되도록 동조화 (age synchronized worm)시켰다 (Kessel *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1999).

2. 시험물질

2-propylphenol, 4-propylphenol, 2-tert-butylphenol, 3-tert-butylphenol, 4-tert-butylphenol, 2-phenylphenol, 4-phenylphenol, nonylphenol, 4-dodecylphenol은 Sigma제품을 사용하였다.

Phenol류를 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해한 후 K-medium으로 희석하여 10 mM 인 stock solution을 만들어 사용하였다.

3. 치사율시험 (LD₅₀)

*C. elegans*에 대한 페놀류의 급성독성을 알아보기 위해 페놀류의 최종농도가 0.1, 1.0, 10, 100, 1,000 μ M되게 K-medium으로 희석하여 500 μ L씩 24-well 넣고 3일 동안 보관한 egg plate에서 동조화된 젊은 성충을 30±1마리씩 취해 각 well에 옮겼다. 20°C BOD incubator에서 24시간 배양하면서 대조군과 비교하여 관찰하였다. 대조군은 K-medium에 0.5% DMSO를 가하였다. 현미경으로 관찰되지 않거나, 움직이지 않는 개체는 모두 죽은 것으로 간주하였으며 살아서 움직이는 개체의 수를 측정하였다. 실험은 3회 반복 실시하였다.

4. *C. elegans*의 생식기능에 미치는 영향

페놀류를 최종농도가 0.1, 1.0, 10, 100, 1,000 μ M되게 K-medium으로 희석하여 500 μ L씩 24-well 넣고 3일 동안 보관한 egg plate에서 동조화된 젊은 성충을 5마리씩 취해 각 well에 옮겼다. 20°C BOD incubator에서 보관하면서 72±1시간 후 알의 수를 측정하였다. 실험은 3회 반복 실시하였다 (Dhawan *et al.*, 1999).

5. *C. elegans*의 운동능력에 미치는 영향

페놀류의 최종농도가 0.1, 1.0, 10, 100, 1,000 μM 되게 K-medium으로 희석하여 500 μL 씩 24-well 넣고 3일 동안 보관한 egg plate에서 동조화된 젊은 성충을 5마리씩 취해 각 well에 옮겼다. 20°C BOD incubator에서 보관하면서 24시간 후 현미경을 통해 대조군의 움직임 속도와 비교하여 같거나 1 ± 1 초일 경우를 거의 정상적인 움직임, 4 ± 1 초일 경우를 움직임이 다소 느림, 6 ± 1 초일 경우를 활발한 운동을 하지 않음, 10 ± 1 초일 경우를 약간의 움직임만 보임, 10 ± 1 초 이상일 경우를 거의 움직이지 않음으로하여 총 5 단계로 나누어 관찰하였다 (Dhawan *et al.*, 1999).

6. 통계학적 방법

SAS program을 이용했으며, p value가 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 치사율 시험 (LD_{50})

2-propylphenol, 4-propylphenol, 2-tert-butylphenol, 3-tert-butylphenol, 4-tert butylphenol, 2-phenylphenol, 4-phenylphenol, nonylphenol, 4-dodecylphenol의 *C. elegans*에 대한 사망률을 측정하기 위해, 최종 농도 0.1, 1.0, 10, 100, 1,000 μM 에서 30마리 중 *C. elegans*의 살아남은 개체 수를 측정하였다. 이를 토대로 LC_{50} 치를 Table 1에 나타냈다.

LD_{50} 치로 비교해 본 결과, 4-propylphenol이 가장 독성이 강한 반면 4-phenylphenol이 가장 약한 독성을 나타냈다. Propyl기의 위치에 따라 4-propylphenol이 2-propylphenol보다 독성이 강하였으며, tert-butyl기의 위치에 따라 2, 3, 4-tert-butylphenol 순으로 독성이 강하게 나타났다. Phenyl기의 위치에 있어서는 2-phenylphenol이 4-phenylphenol보다 강했다.

2. *C. elegans*의 생식기능에 미치는 영향

*C. elegans*의 생식기능에 미치는 영향을 알아보기 위해, 페놀류를 가한 후 *C. elegans*가 낳은 알의

Table 1. LD_{50} value of phenols to *C. elegans*

Chemical	LD_{50} (μM)
2-Propylphenol	13.0
4-Propylphenol	2.9
2-tert-Butylphenol	7.8
3-tert-Butylphenol	17.1
4-tert-Butylphenol	32.4
2-Phenylphenol	5.6
4-Phenylphenol	175.4
Nonylphenol	15.0
4-Dodecylphenol	18.1

Table 2. Effect of phenols on reproduction rate of *C. elegans* (%)

Chemical	0.1 μM	1.0 μM	10 μM	100 μM	1 mM
Control	100	100	100	100	100
2-Propylphenol	88**	75**	70**	44**	1**
4-Propylphenol	75**	47**	46**	33**	1**
2-tert-Butylphenol	89**	81**	50**	28**	0**
3-tert-Butylphenol	78**	48**	44**	39**	5**
4-tert-Butylphenol	82**	65**	54**	45**	1**
2-Phenylphenol	90**	49**	45**	38**	1**
4-Phenylphenol	92**	80**	51**	47**	0**
Nonylphenol	91**	62**	45**	39**	0**
4-Dodecylphenol	93*	83**	60**	32**	1**

Significant difference from controls (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)
The results were expressed as the average of triplicate plate.

개수를 세어 대조군에 대한 비율로 비교하였다 (Table 2). 그 결과 모든 phenol류는 control과 비교하여 알의 개수가 유의성 ($P < 0.05$) 있게 감소했다. 알의 개수에 있어서는 농도 의존적인 독성을 나타냈으며 1 mM에서 2-tert-butylphenol, 4-phenylphenol, nonylphenol은 모두 사망하여 알이 발견되지 않았다. 2-propylphenol, 4-tert-butylphenol, 4-phenylphenol, 4-dodecylphenol은 100 μM , 2-tert-butylphenol, nonylphenol은 10 μM 이상에서는 알의 개수가 대조군에 비해 50% 이상 줄어들었다. 특히 4-propylphenol, 3-tert-butylphenol, 2-phenylphenol의 경우, 1.0 μM 에서 50% 이상 감소하기 시작했다. 치사율 시험에서와 마찬가지로 4-propylphenol이 가장 강한 생식 독성을 나타냈다.

3. *C. elegans*의 운동속도에 미치는 영향

*C. elegans*의 운동속도에 미치는 영향을 알아보

Table 3. Effect of phenols on movement of *C. elegans*

Chemical	0.1 μ M	1.0 μ M	10 μ M	100 μ M	1 mM
Control	++++	+++++	+++++	+++++	+++++
2-Propylphenol	++++	++++	++++	++	+
4-Propylphenol	+++	+++	+++	++	+
2-tert-Butylphenol	++++	+++	++	++	+
3-tert-Butylphenol	+++	+++	+++	++	+
4-tert-Butylphenol	++++	++++	+++	+++	+
2-Phenylphenol	++++	+++	+++	++	+
4-Phenylphenol	+++++	+++++	+++	+++	-
Nonylphenol	++++	+++	++	++	+
4-Dodecylphenol	+++++	+++++	+++	+++	+

+++++: very active, ++++: active, +++: slow, ++: very slow, +: almost stop

기 위해, 최종 농도 0.1, 1.0, 10, 100, 1,000 μ M에서 *C. elegans*의 운동속도를 포함한 움직임을 보았으며, 거의 정상적인 움직임, 움직임이 다소 느림, 활발한 운동을 하지 않음, 약간의 움직임만 보임, 거의 움직이지 않음으로 5단계로 나누어 대조군과 비교하여 Table 3에 나타냈다. 최저농도인 0.1 μ M에서는 대조군과 비교하여 그다지 차이가 없었지만 농도가 높아짐에 따라 움직임의 속도가 점점 느려졌으며 최고농도인 1 mM에서는 거의 움직이지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 내분비계 장애물질로 선정된 페놀류 9종이 *C. elegans*에 미치는 영향을 통해 페놀류의 독성 시험 모델로서 사용 가능한 지를 확인하고자 하였다.

*C. elegans*에 대한 사망률을 측정한 결과, 대조군은 30마리 모두 살아있는 반면에 phenol류를 처리함으로써 급격하게 사망하였다. LD₅₀치는 4번 위치의 propylphenol이 2번 위치의 propylphenol보다 4.5배 낮았으며, tert-butylphenol의 경우 2번 위치가 가장 낮았으며 4번 위치의 tert-butylphenol이 가장 높은 LD₅₀치를 나타냈다. 2번 위치의 tert-butylphenol은 3번 위치에 비해 2.2배, 4번 위치에 비해 4.2배 낮아 가장 강한 독성을 나타냈다. Phenylphenol의 경우 2-phenylphenol은 4-phenylphenol에 비해 31.3배 낮았다. 탄소수 9개인 nonylphenol

은 탄소수 10개인 4-dodecylphenol보다 1.2배 낮았다.

같은 위치에 있는 2-propylphenol, 2-tert-butylphenol, 2-phenylphenol은 탄소수가 증가할수록 독성이 강하게 나타났으며 반면에 4-dodecylphenol을 제외한 4-propylphenol, 4-tert-butylphenol, 4-phenylphenol의 경우 탄소수가 적을수록 독성이 강하게 나타났다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, phenol에 반응기가 붙어 있는 위치에 따라, 탄소수에 따라 독성이 다름을 확인할 수 있었다.

Phenol류가 생식독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 72시간동안 *C. elegans*가 낳은 알의 개수를 측정하였다. 최저농도인 0.1 μ M의 경우, 대조군에 비해 7~25% 감소하였으며 최고농도인 1 mM에서는 95~100% 감소하였다. 2-tert-butylphenol, 4-phenylphenol, nonylphenol의 경우 최고농도에서는 24시간 안에 사망하여 하나의 알도 관찰되지 않았다. 4번 위치의 propylphenol이 2번 위치의 propylphenol보다 17% 감소하였으며, tert-butylphenol의 경우 3번 위치가 가장 낮았으며 4, 2번 위치순으로 낮았다. Phenylphenol의 경우 2-phenylphenol은 4-phenylphenol에 비해 낮았다. Nonylphenol은 4-dodecylphenol보다 낮았다.

같은 위치에 있는 2-propylphenol, 2-tert-butylphenol, 2-phenylphenol은 탄소수가 적을수록 생식독성이 강하게 나타났다. 4-propylphenol, 4-tert-butylphenol, 4-phenylphenol, 4-dodecylphenol의 경우도 탄소수가 적을수록 독성이 강하게 나타났다. 이상의 결과로 phenol류는 *C. elegans*의 생식에 매우 강한 영향을 줄 수 있었다.

독성발현에 따른 움직임의 변화를 관찰한 결과 0.1 μ M에서는 대조군에 비해 움직임이 다소 느렸으며 1.0 μ M의 경우 움직임이 다소 느리거나 활발한 운동을 하지 않았다. 10, 100 μ M의 경우 활발한 운동을 하지 않거나 약간의 움직임만 보이는 것도 있었다. 1 mM에서는 거의 움직이지 않았다. 최저농도인 0.1 μ M의 경우, 4번 위치의 propylphenol이 2번 위치의 propylphenol보다 움직임이 적었으며, tert-butylphenol의 경우 3번 위치가 가장 느렸으며 2, 4번 위치순으로 낮았다. Phenylphenol의 경우 2-phenylphenol은 4-phenylphenol에 비해 움직임의 속도가 느렸다. Nonylphenol은 4-dodecylphenol보다 속도가 느렸다.

같은 위치에 있는 2-propylphenol, 2-tert-butylphenol, 2-phenylphenol은 비슷한 속도를 나타내었다. 반면에 4-propylphenol, 4-tert-butylphenol, 4-phenylphenol, 4-dodecylphenol의 경우 탄소수가 적을수록 움직임의 속도가 느렸다.

본 연구를 통해 앞으로 내분비계 장애추정물질 검색 동물모델로서 *C. elegans*의 가능성을 확인했으며, 독성기전 및 세포나 조직 내의 수천 개 유전자의 발현 양상 (gene expression pattern)을 한번에 볼 수 있게 하는 도구이며 여러 세포나 조직의 수천 개 유전자의 발현도 (expression level)를 한번의 측정을 통한 유전자 발현 관련 연구를 가능케 하는 microarray기법을 이용한 toxicogenomics, 체내 biomarker에 관한 추가연구를 통해, 내분비계 장애 추정물질 검색 표준 시험법을 개발할 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

- 국립환경연구원 환경위해성 연구부, 환경위해성 연구과, 내분비계 장애물질이란?. 국립환경연구원 1998.
- 신동천. 내분비 장애물질이란?. 한국식품과학회지 1999; 32: 1-17.
- Dhawan R, Dusenbery DB and Williams PL. Comparison of Lethality, Reproduction, and Behavior as Toxicological Endpoints in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. J Toxicology and Environmental Health 1999; 58: 451-462.
- Easton A, Guven K and de Pomerai DI. Toxicity of the Dithiocarbamate Fungicide Mancozeb to the Nontarget Soil Nematode, *Caenorhabditis elegans* J Biochem Molecular Toxicology 2000; 15: 15-25.
- Emmons SW. Sexual Behavior of the *Caenorhabditis elegans* Male. Int Rev Neurobiol 2005; 69: 99-123.
- Hood TE, Calabrese EJ and Zuckerman BM. Detection of an estrogen receptor in two nematode species and inhibition of binding and development by environmental chemicals. Ecotoxicol Environ Saf 2000; 47: 74-81.
- Kwack SJ, Kwon O, Kim HS, Kim SS, Kim SH, Sohn KH, Lee RD, Park CH, Jeung EB, An BS and Park KL. Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity in vitro and in vivo. J Toxicol. Environ Health A 2002; 65: 419-431.
- Lewis JA and Fleming JT. Basic culture methods. Methods Cell Biol 1995; 48: 3-29.
- Realini PA. Determination of priority pollutant phenols in water by HPLC. J Chromatogr Sci 1981; 19: 124-129.
- Squire MD, Tornoe C, Baylis HA, Fleming JT, Barnard EA and Sattelle DB. Molecular cloning and functional co-expression of a *Caenorhabditis elegans* nicotinic acetylcholine receptor subunit (acr-2). Receptors Channels 1995; 3: 107-115.
- Cincinnati OH. "Sampling and Analysis procedures for Screening of Industrial Effluents for Priority Phenols" Environmental Monitoring and Support Laboratory, USEPA 1997.
- Van Kessel WH, Brocades Zaalberg RW and Seinen W. Testing environmental pollutants on soil organisms a simple assay to investigate the toxicity of environmental pollutants on soil organisms, using CdCl₂ and nematodes. Ecotoxicol Environ Saf 1989; 18: 181-190.
- Williams C, Xu L and Blumenthal T. SL1 trans splicing and 3'-end formation in a novel class of *Caenorhabditis elegans* operon. Mol Cell Biol 1999; 19: 376-383.