

토양선충 *Caenorhabditis elegans*를 이용한 Nonylphenol의 독성 영향 연구

노 지 연, 최 진 희*

서울시립대학교 환경공학과

Toxicological Study on Nonylphenol using the Soil Nematode, *Caenorhabditis elegans*

Ji-Yeon Roh and Jinhee Choi*

Faculty of Environmental Engineering, College of Urban Science, University of Seoul,
90 Jeonnong-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-743, Korea

ABSTRACT

The aim of current study was to evaluate the toxicity of nonylphenol (NP) on soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. The stress-related gene expression, growth, reproduction and development have been employed to monitor soil toxicity. The 24-h median effect concentrations (LC_{50s}) of NP was 0.15 mg/L. The expressions of vitellogenin-6, vitellogenin-2, cytochrome P450 family protein 35a2 and apoptosis enhancer-1 genes were upregulated in *C. elegans* by NP exposure. Alterations in growth, reproduction and development were also observed in NP-exposed group and especially hatching failure was observed. The overall results indicate that *C. elegans* has considerable potential as sensitive markers for NP toxicity monitoring.

Key words : *Caenorhabditis elegans*, nonylphenol, stress-related gene expressions, growth, reproduction, development

서 론

인간이 만들어 내는 다양한 화학 물질들은 대부분 환경에 유입되기 전에 분해과정을 거쳐 무독화 과정을 거치지만, 일부 물질들은 분해되지 않고 환경 내에 축적되어 생태계에 악영향을 미친다. 그 중에서도 내분비계 장애물질 (Endocrine disrupting chemicals, EDCs)은 장기간에 걸쳐 생체 내에 흡

수, 축적되어 야생동물과 사람의 정상적인 내분비계 작용을 방해하여 생식에 관련된 기능에 이상을 가져오는 물질로 (EPA, 1998) 당세대 뿐만 아니라 다음 세대에까지도 영향이 전달될 수 있다는 점에서 부각되고 있다. 이는 생체 내에서 호르몬과 유사한 작용을 한다고 하여 일명 환경호르몬 (Environmental hormone)이라고 불려지고 있다. 대표적인 내분비계 장애물질로 꼽히는 노닐페놀 (NP, Nonylphenol)은 알킬페놀 폴리옥시레이트 (alkylphenol polyethoxylate)의 분해산물로서 오랫동안 비음이온성 계면활성제, 윤활유 첨가제, 폴리머 안정제 등으로 널리 사용되어 왔다. 그러나 현재는 미국 EPA

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-2210-5622, Fax: +82-2-2244-2245
E-mail: jinchoi@uos.ac.kr

를 비롯한 여러 연구기관에서 NP의 잔류성과 독성에 대해 파악하기 시작하였고 (EPA, 2003), 생태계에서의 내분비계 이상현상 (Sonnenschein and Soto, 1998; Sumpter, 1998), 성장장애 (Kahl, 1997) 등의 결과들이 꾸준히 보고되면서, 사용량을 축소시키고 있는 실정이다 (Sun and Gu, 2005; Lee *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2006).

지금까지 NP의 독성영향 평가에는 주로 수서생태계를 대상으로 연구가 진행되어 왔지만 (Balch and Metcalfe, 2006; Ghekiere *et al.*, 2006), 토양 생태계에 미치는 영향에 대해서는 미진한 실정이다. 근래에 들어 농작물의 비료로 쓰이거나 매립하는 슬러지 (biosoil) 내의 NP의 오염이 토양 오염도를 높이고 있다는 보고가 되면서 토양에 미치는 NP의 독성평가에도 관심을 가지고 연구가 진행되고 있으나 (Widarto *et al.*, 2004; Gibson *et al.*, 2005; Hseu, 2006), 수서생물종을 이용한 연구에 비하면 극히 적은 편이다 (Ura *et al.*, 2002; Skovlund *et al.*, 2006).

본 연구에서 NP의 독성평가를 위해 토양선충의 일종인 *Caenorhabditis elegans*를 이용하여 토양계 모니터링을 위한 마커로서의 가능성을 시험해 보았다. 우리나라 학명으로 예쁜꼬마선충인 *C. elegans*는 토양 사이 공극수에서 박테리아를 먹고 사는 종으로 토양생태계의 하위생물군으로 중요위치를 차지하고 있으며, 실험실에서 배양하기 쉽고 생활사 (life cycle)가 짧다는 장점을 가지고 있어서 생태독성연구를 위해 적합한 생물종으로 연구되고 있다 (Peredney and Williams, 2000; Williams *et al.*, 2000; Boyd and Williams, 2003). 특히 *C. elegans*는 게놈프로젝트가 완료되어 다세포 생물로서는 처음으로 전체 게놈의 DNA 염기서열이 밝혀져 있어 유전자들의 기능을 손쉽게 밝혀낼 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이러한 이유로 *C. elegans*는 발생학이나 유전학뿐만 아니라 분자수준의 독성을 연구하는 생태연구종으로써 매우 적합한 것으로 인정되고 있으며, 현재는 여러 환경 내에 다양한 종말점에서 *C. elegans*를 적용한 독성평가들이 진행되고 있다 (Boyd and Williams, 2003; Menzel *et al.*, 2005; Reichert and Menzel, 2005). 본 연구에서는 토양오염의 지표모델의 가능성을 가지고 있는 *C. elegans*에 내분비계 장애 의심물질로서 실생활에서의 사용량을 점차 금지하고 있는 NP를 적용하여 스트레스관련 유전자의 발현과 성장, 생

식, 발달의 수준에서 영향을 조사하였다. 스트레스 관련 유전자로는 heat shock protein (hsp 16-1, hsp 16-2, hsp 16-48, hsp 70), metallothionein (mt-1, mt-2), vitellogenin (vit-2, vit-6), cytochrome p450 family protein 35A2 (cyp35a2), glutathione-S-transferase (gst-4), superoxide dismutase-1 (sod-1), catalase-2 (ctl-2), *C. elegans* p53-like protein (cep-1), apoptosis enhancer (ape-1)을 조사하였다. 성장과 생식에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 *C. elegans*의 몸체길이와 체내 알 수를 계수하였으며, 발달 생식에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 노출상태에서의 알 수와 부화되는 수를 계수하였다.

재료 및 방법

1. 생물종

본 연구에 사용한 토양선충은 wild-type *C. elegans* Bristol strain N2로, 이 종은 Brenner (1974)이 정립한 표준방법에 의하여 nematode growth medium (NGM)에 대장균의 일종인 OP50을 먹이로 첨가하여 20°C 배양기에서 배양을 하였다.

2. 노출방법

NP 노출시험에는 K-media (0.032 M KCl, 0.051 M NaCl)를 사용하였고, *C. elegans*는 10% sodium aldehyde용액을 이용하여 동조화시킨 알을 3일간 배양하여 얻은 어린 성충을 이용하였다. 노출 후 배양 조건은 20°C에서 24시간을 기준으로 OP50을 첨가하지 않고 두었다.

3. 급성독성실험

Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA)에 녹인 NP (Sigma-Aldrich Chemical) 농도 4개 (0.01, 0.1, 1, 10 mg/L)와 무처리군 1개로 구성하여 24 well plate에 동조화한 어린 성충 10마리씩을 넣어 20°C에서 24시간을 배양했다. 24±1시간이 지난 후, 광학현미경으로 운동상태를 관찰하고 백금선으로 건드려 보았을 때 움직임이 없는 것을 죽은 것으로 계수하여 반치사농도 LC₅₀ (median lethal concentration)을 결정하였다.

4. 스트레스 관련 유전자 발현 실험

앞서 실시한 급성독성실험결과로 얻은 NP LC₅₀의 1/1,000, 1/100, 1/10로 희석하여 만든 NP를 K-media에 노출 시키고 동조화 과정을 거쳐 얻은 *C. elegans* 어린 성충을 넣은 후 24시간을 20°C에서 배양하여 Phenol-chloroform법으로 mRNA를 추출하였다. 추출한 mRNA는 RT Premix kits (Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사(Reverse transcription) 시킨 뒤, PCR Premix kits (Bioneer)를 이용하여 PCR (Polymerase chain reaction)을 실시하였다. PCR을 위한 primer는 *C. elegans* database (www.wormbase.org)에서 얻은 염기서열로부터 제작하였다(Table 1). 결과물은 ethidium bromide (Bioneer)를 넣은 1.5% agarose gel (Promega, Medisonm WI, USA)에 올려서 전기영동을 하고, 정량을 위해 TFX-20.M UV transilluminator (Vilber Lourmat, Marne la Vallee, France)에 gel을 올려 Kodak EDAS 290 image analyzer (Kodak, Rochester, NY, USA)로 분석하였다.

5. 생장 및 생식

스트레스 관련 유전자 발현 실험과 동일한 농도 (LC₅₀의 1/1,000, 1/100, 1/10 희석 농도)로 k-media에 어린성충을 넣어 노출 시키고 24시간 배양 후 55°C에서 약 10분간 열을 가하고 10% formaldehyde (Sigma-Aldrich Chemica)로 고정시켰다. 현미경 아래에서 한 마리의 전체 몸체 길이를 재고 이어서 체내의 알 수를 계수하였다. 이때 한 농도 당 100마리씩 측정하였고 이 수치를 %로 분석하였다.

6. 발달

생장 및 생식 독성 실험 농도와 동일한 농도의 NP를 agar에 직접 투여하여 OP50을 먹이로 포함한 NGM배지를 만든 뒤, 동조화하여 얻은 L4기의 *C. elegans*를 한 마리씩 각각 옮겼다. 옮긴 시점을 기준으로 96시간 동안 12시간마다 관찰하며 알, L1~L3, L4, 성충의 갯수를 계수하고, 그 값을 각각의 단계별로 나타내었다.

7. 통계처리

급성독성실험 결과는 Probits을 이용하여 구하였

Table1. Sequence of primers used in the amplification of stress-related gene mRNA in *C.elegans*

Gene (wormbase accession No)	Primer sequence
hsp 16-1 (T27E4.8)	5'TCTCAATGTCTCGCAGTTCA3' 5'CTTCCTTCTTTGGTGCTTCA3'
hsp 16-2 (Y46H3A.3)	5'GCTATCAATCCAAGGAGAAC3' 5'GAACCGCTTCTTCTTTGG3'
hsp 16-48 (T27E4.3)	5'ACTCGATGTTTCTCATTTC3' 5'TGGGAATAGAACGAGATGAG3'
hsp 70 (C12C8.1)	5'ACAACGAGATCGAATTAGCTCG3' 5'ATCAACTCCTCTACAGTAGGTC3'
mt-1 (K11G9.6)	5'GAAATCATGGCTTGCAAGTGTG3' 5'TTTAATGAGCCGCAGCAGTCC3'
mt-2 (T08G5.10)	5'CAAAAATGGTCTGCAAGTGTG3' 5'AATGAGCAGCCTGAGCACATTC3'
vit-2 (C42F8.2)	5'TCTGAGCTTTCCCAATCCCG3' 5'TCAAGGAAGGCATCTGCTCG3'
vit-6 (K07H8.6)	5'GACTTCCAGTCCCATCTACC3' 5'CTTGGTGCTCACGGTTCATG3'
cyp35a2 (C03G6.15)	5'TCGATTTGTGGATGACTGG3' 5'AATGGATGCATGACGTTGAA3'
gst-4 (K08F4.7)	5'TTGGAGACTCATTGACTTGG3' 5'AAACAATACTATCCTTTCTTGTGCC3'
cep-1 (F52B5.5)	5'TTCCGACGCAAGTAGTCTCC3' 5'CGGTAAGCTGAGAAACG3'
ape-1 (F46F3.4)	5'GTTTGGTGATAGTCTAGACG3' 5'TGTTGGTATCACTACCTAATACC 3'
sod-1 (C15F1.7)	5'CGAGGGAGTCCGGAGACAAGG3' 5'GTAGTAGGAGTAGGAACAAC3'
ctl-2 (Y54G11A.5)	5'GACAATCAGCAACATGCTCC3' 5'CTGGCACATCTCTCCCGAG3'
actin (T04C12.6)	5'AGAAGAGCACCCAGTCTCC3' 5'GAAGCGTAGAGGGAGAGGAC3'

고 유전자 발현실험의 대조군과 실험군의 통계적 차이는 모수적 방법인 T 검정을 실행하였다.

결 과

NP의 급성독성실험 결과를 probit 분석한 결과, 24시간 LC₅₀은 0.15 mg/L로 나타났다 (Table 2). 본 결과를 바탕으로 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 NP를 1/1,000, 1/100, 1/10로 희석하여 유전자 발현 및 생장, 생식, 발달 실험을 실시할 농도를 선정하였고,

이는 0.0001, 0.001, 0.01 mg/L로 결정하였다.

*C. elegans*를 NP에 노출시켜 스트레스관련 유전 인자의 발현량을 살펴본 결과 (Fig. 1) NP에 의해 스트레스 유전자의 발현량이 *ape-1*, *cyp35a2*, *vit-2*, *vit-6*을 제외하고는 크게 변화한 것은 없었다. 그러나, NP에 의해 *vit-6*는 무처리군과 비교했을 때 최고 1.9배의 증가를 나타내었고, *vit-2*는 1.4배, *ape-1*과 *cyp35a2*는 각각 1.6배와 1.4배의 증가를 나타내었다. 특히 *vit-6* 유전자의 경우 NP의 농도 의존적 발현량 증가추세를 보였다(1.1배, 1.5배, 1.9배).

NP의 노출에 따른 생리학적 영향을 살펴보기 위

Table 2. Estimation of 24 h LC₁₀, LC₅₀ and LC₉₀ of Nonlphenol in *C.elegans*

	24 h LC (mg/L)	Interval of confidence (95%)
Nonylphenol	LC ₁₀	0.005
	LC ₅₀	0.15
	LC ₉₀	11.5
		0.00 < LC ₁₀ < 0.027
		0.031 < LC ₅₀ < 0.59
		1.994 < LC ₉₀ < 1960.3

해 변수로 *C. elegans*의 몸체 길이와 체내 알 수의 변화를 조사하였다. 동조화시킨 어린 성충에게 NP를 반수치사량 농도로 노출시키고 몸통 길이를 조사해 본 결과는 (Fig. 2a) 무처리군에 비해 큰 변화 없이 평균 1.2 mm의 분포를 나타내었다. 체내 알 수의 변화량 역시 눈에 띄게 변화가 조사되지는 않았으나, 최고농도 0.01 mg/L에서 무처리군에 비해 평균값이 약 14.1%의 감소율을 나타내었다 (Fig. 2b).

96시간의 장기간 조사를 통해 한 마리의 성충으로부터 시작된 다음 세대에서의 알과 생식선이 보이지 않는 L1~L3기와, 생식선이 나타나기 직전 초기증상을 갖는 L4기와 성충기의 단계가 나타나는 과정을 시간에 따라 조사해 본 결과 발달단계가 무처리군에 비해 NP를 처리한 *C. elegans*에서 느리게 나타나는 것을 알 수 있었다. 초기에 나타난 알 수가 시간이 흐름에 따라 빠르게 다음 단계로 발달해 가는 무처리군에 비해, NP에 노출시킨 *C. elegans*에서는 각각의 단계로의 발달도 늦고, 2

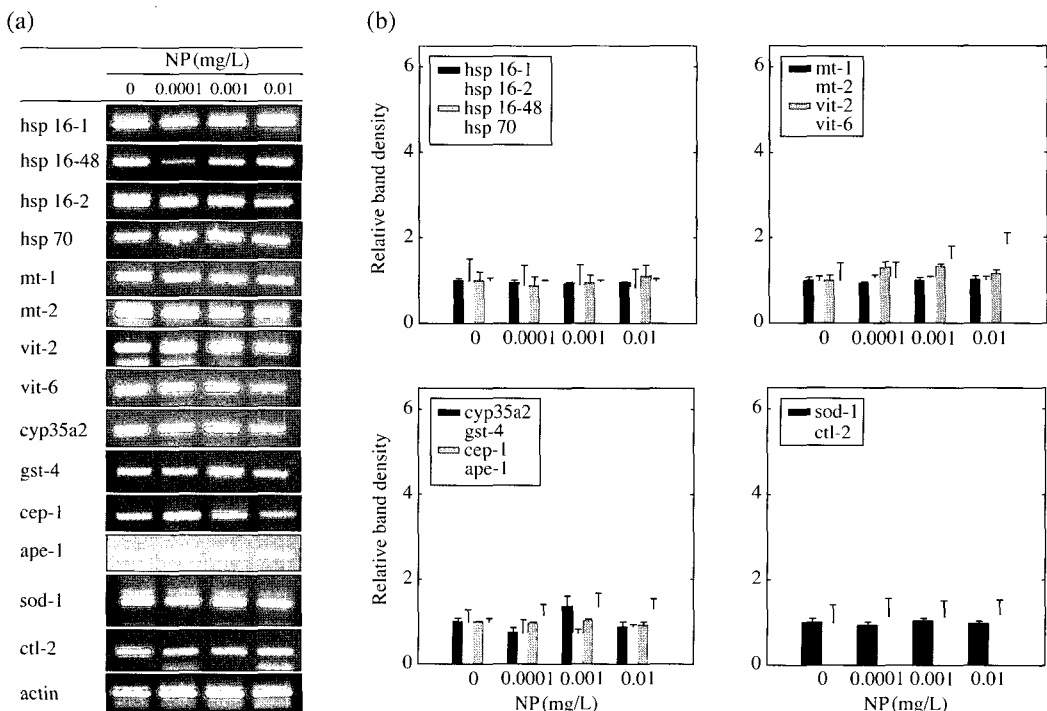


Fig. 1. Stress-related gene expression profiling in the young adult of *C. elegans* exposed to NP for 24 h (a). Densitometric values were normalized using actin mRNA and are presented in arbitrary unit compared to control (control=1, b; n=3; mean ± SEM; *p < 0.05).

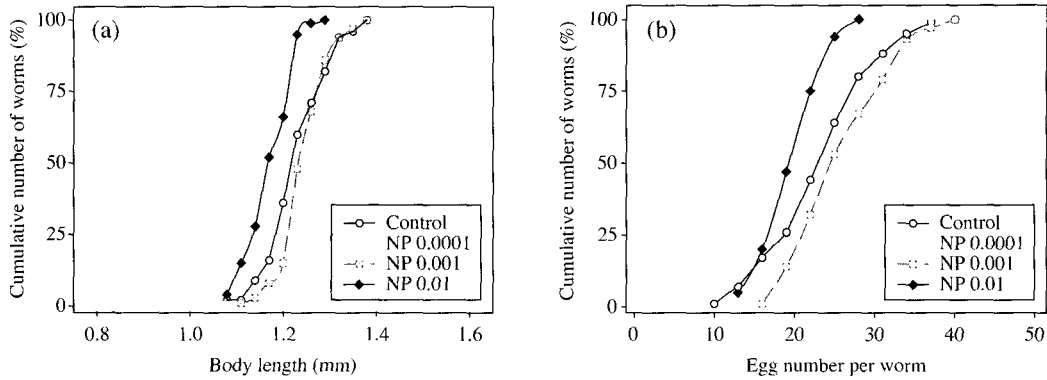


Fig. 2. Body length measured in the young adult of *C. elegans* exposed to NP for 24h (a). Egg number per worm measured (b).

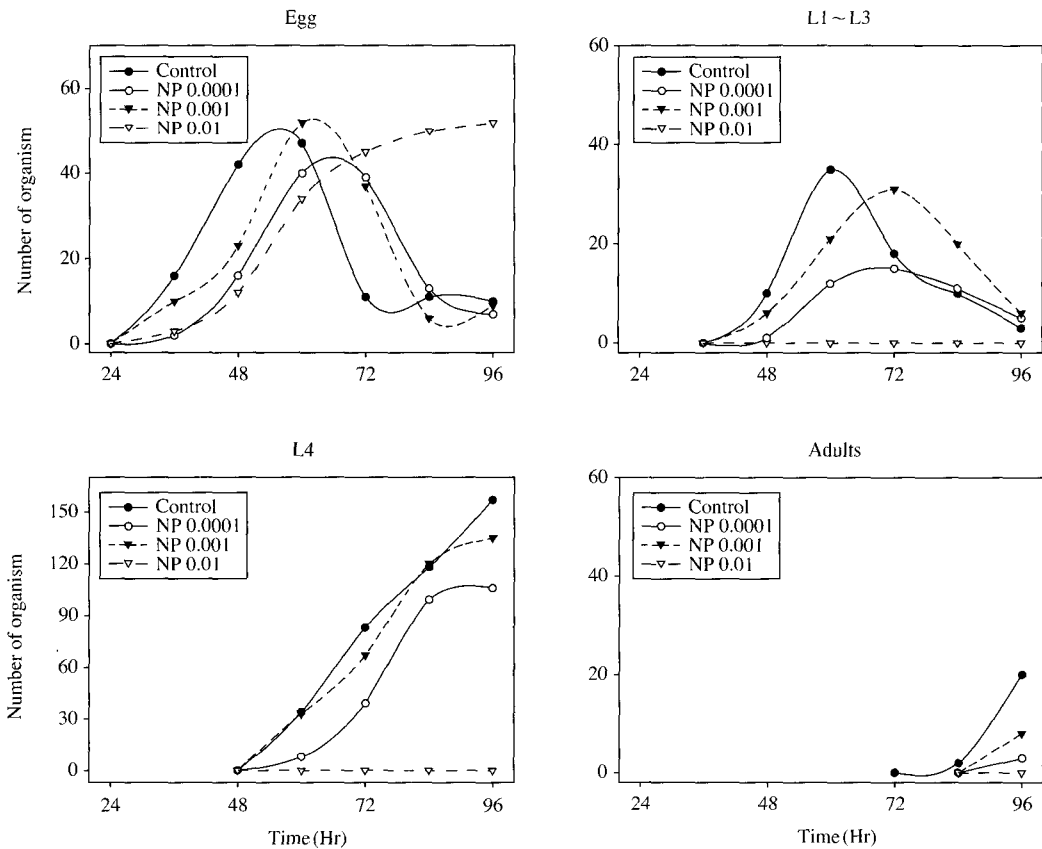


Fig. 3. Development parameters in *C. elegans* exposed to NP for 96 h.

세대의 첫 성충이 나타나는 시점도 대조군에 비해 약 12시간가량 늦게 나타났음을 알 수 있었다. 특

히 최고농도인 0.01 mg/L에 노출시킨 *C. elegans*에서는 알에서 다음 단계인 L1으로 진행이 전혀 이

루어지지 않는 결과를 나타내었다. 또한 1세대 성충이 계속해 알을 생식하였으나 그 증가율이 점차 감소되어 실험이 종료되는 96시간의 시점에서의 알수가 무처리군의 성충이 실험시작 후 약 60시간 안에 낳은 알 수에도 못 미치는 결과가 나타났다.

고 찰

*C. elegans*를 이용한 NP의 독성 평가는 대부분 성장(growth)과 생식(reproduction), 발달(development)을 변수로 조사되었다(Hood *et al.*, 2000; Hoss *et al.*, 2002; Kohra *et al.*, 2002). 본 연구에서는 NP의 생리학적 영향 외에도 분자수준에서의 영향을 조사하여 바이오마커의 가능성을 살펴보았는데, 스트레스관련 유전자 14종을 이용하여 발현정도를 조사해 본 결과로 vit-6, vit-2, cyp35a2, ape-1의 유전자가 처리군에서 증가된 것을 알 수 있었다. 특히 vitellogenin류의 유전자인 vit-6가 그 중에서 두드러지게 변화하는 경향을 나타내었다. vitellogenin은 난생동물의 암컷에서만 생산되는 물질로 알려져 있지만, 외부로부터 내분비계 장애물질에 노출되어진 수컷에서 발생되므로 이것을 통해 환경호르몬의 노출여부를 판단할 수 있는 바이오마커로서 많이 연구되고 있다(Sumpter, 1998; Garcia *et al.*, 2004; Li and Wang, 2005).

NP가 의한 성장과 생식에 장애를 일으킨다는 것은 여러 생물종을 통해 밝혀진 바 있다(Fliedner, 1993; Brooke, 1994; Balch and Metcalfe, 2006; Yang *et al.*, 2006). 특히 발달장애의 경우는 단기간 노출한 NP에서는 큰 영향을 나타내지 않으나, 만성으로 노출시킨 경우에는 부화율이 눈에 띄게 떨어진다고 보고된 바가 있다(Ward and Boeri, 1990b). 본 연구에서는 LC₅₀의 1/10 희석 농도에서 알 생성률이 무처리군에 비해 크게 떨어짐을 알 수 있었고, 발달 시험에서는 처리군에서 발달이 늦어진 것을 볼 수 있었다. 과거에 보고된 바에 의하면 NP의 발달변수는 성장과 생식변수에 비해 그리 민감하지 않은 것으로 보고되었으나(Brooke, 1993a; EPA, 2003), 본 연구에서 *C. elegans*의 발달은 성장과 생식보다도 더 민감한 변수로서 작용하는 것을 볼 수 있다.

본 연구 결과 NP에 노출된 *C. elegans*의 스트레스관련 유전자중 vit-6, vit-2, ape-1, cyp35a2 등의

유전자는 발현이 증가되었고, 생리학적 수준에서의 독성영향으로는 NP에 의해 급격하게 발달이 저해되는 결과를 얻을 수 있었다. *C. elegans*를 이용한 생리학적 영향과 유전인자 수준에서의 독성평가가 현재 매우 다양한 종말점을 가지고 평가되어지고 있다. 중금속을 이용한 경우는 카드뮴에서 매우 민감한 반응성을 나타낸다고 보고된 바 있으며(Roh *et al.*, 2006) 또한 alkylphenol류인 bisphenol A에 노출시킨 *C. elegans*의 경우 운동장애 종말점을 통한 생물학적 파라메타로서의 가능성을 제시한 바 있다(Hoss *et al.*, 2002; Kohra *et al.*, 2002). 본 연구 결과는 다른 연구 결과들과 함께 *C. elegans*가 NP의 토양환경 독성평가를 위한 생물종으로서 가능성이 매우 높음을 확인할 수 있었으며 분자수준에서의 내분비계 관련 유전자의 연구에 있어서 매우 흥미로운 토양 지표 생물종이 될 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 우수여성과학자 도약연구지원사업(과제번호 KRF-2005-204-D00009)으로 학술진흥재단의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Balch G and Metcalfe C. Developmental effects in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to nonylphenol ethoxylates and their degradation products, *Chemosphere* 2006; 62: 1214-1223.
- Boyd WA and Williams PL. Availability of metals to the nematode *Caenorhabditis elegans*: toxicity based on total concentrations in soil and extracted fractions, *Environ. Toxicol Chem* 2003; 22: 1100-1106.
- Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics* 1974; 77: 71-94.
- Brooke LT. Acute and chronic toxicity of nonylphenol to ten species of aquatic organisms. Report to the U.S. EPA for Work Assignment No. 02 of Contract No. 68-C1-0034. Lake Superior Research Institute, University of Wisconsin-Superior, Superior, WI. March 24. 30pp. 1993a.
- Brooke LT. Accumulation and lethality for two freshwater fishes (fathead minnow and bluegill) to nonylphenol. Report to the U.S. EPA for Work Assignment No. 1-15

- of Contract No. 68-C1-0034. Lake Superior Research Institute, University of Wisconsin-Superior, Superior, WI. 1994. May 31. 49pp.
- EPA. Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Nonylphenol-Draft, 2003.
- EPA. Research Plan for Endocrine Disruptors, 1998.
- Fliedner A. *Daphnia magna*, Reproduction test (OECD No. 202). Fraunhofer-Institute für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Postfach 1260, W-5948 Schmallenberg-Grafschaft, Germany. 1993. Report No. UBA-002/4-22 February.
- Garcia-R N, Raldua D, Quiros L, Llaveria G, Cerda J, Barcelo D, Grimalt JO and Pina B. Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish, *Anal Bioanal Chem* 2004; 378: 670-675.
- Ghekiere A, Verslycke T and Janssen C. Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid *Neomysis integer*, *Gen Comp Endocrinol* 2006; 147: 190-195.
- Gibson R, Wang MJ, Padgett E and Beck AJ. Analysis of 4-nonylphenols, phthalates, and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids, *Chemosphere* 2005; 61: 1336-1344.
- 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.
- Hoss S, Juttner I, Traunspurgerd W, Pfisterb G, Schramm KW and Steinberg CE. Enhanced growth and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in the presence of 4-nonylphenol, *Environ Pollut* 2002; 120: 169-172.
- Hseu ZY. Response of microbial activities in two contrasting soils to 4-nonylphenol treated with biosolids, *Chemosphere* 2006; in press.
- Kahl MD, Makynen EA, Kosian PA and Ankley GT. Toxicity of 4-nonylphenol in a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*, *Ecotoxicol Environ Saf* 1997; 38: 155-160.
- Kohra S, Kuwahara K, Takao Y, Ishibashi Y, Lee HC, Arizono K and Tominaga N. Effect of Bisphenol A on the Feeding Behavior of *Caenorhabditis elegans*, *J Health Science* 2002; 48: 93-95.
- Lee SM, Lee SB, Park CH and Choi J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring, *Chemosphere* 2006; 65: 1074-1081.
- Li MH and Wang ZR. Effect of nonylphenol on plasma vitellogenin of male adult guppies (*Poecilia reticulata*), *Environ Toxicol* 2005; 20: 53-59.
- Menzel R, Rodel M, Kulas J and Steinberg CE. CYP35: xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Arch Biochem Biophys* 2005; 438: 93-102.
- Peredney CL and Williams PL. Utility of *Caenorhabditis elegans* for assessing heavy metal contamination in artificial soil, *Arch Environ Contam Toxicol* 2000; 39: 113-118.
- Reichert K and Menzel R. Expression profiling of five different xenobiotics using a *Caenorhabditis elegans* whole genome microarray, *Chemosphere* 2005; 61: 229-237.
- Roh JY, Lee J and Choi J. Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: a potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment, *Environ Toxicol Chem* 2006; 25: 2946-2956.
- Skovlund G, Damgaard C, Bayley M and Holmstrup. Does lipophilicity of toxic compounds determine effects on drought tolerance of the soil collembolan *Folsomia candida*, *Environ Pollut* 2006; 31: inpress
- Sonnenschein C and Soto AM. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists, *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 65: 143-150.
- Sumpter JP. Xenoendocrine disrupters-environmental impacts, *Toxicol Lett* 1998; 102-103: 337-342.
- Sun H and Gu X. Comprehensive toxicity study of nonylphenol and short-chain nonylphenol polyethoxylates on *Daphnia magna*, *Bull Environ Contam Toxicol* 2005; 75: 677-683.
- Ura K, Kai T and Sakata S. Aquatic Acute Toxicity Testing Using the Nematode *Caenorhabditis elegans*, *J Health Science* 2002; 48: 583-586.
- Ward TJ and Boeri RL. Acute flow through toxicity of nonylphenol to the mysid, *Mysidopsis bahia*. Study Number 8974-CMA. EnviroSystems, Hampton, NH. 35 pp. 1990b.
- Widarto TH, Holmstrup M and Forbes VE. The influence of nonylphenol on life-history of the earthworm *Dendrobaena octaedra* Savigny: linking effects from the individual- to the population-level, *Ecotoxicol Environ Saf* 2004; 58: 147-159.
- Williams PL, Anderson GL, Johnstone JL, Nunn AD, Tweedle MF and Wedeking P. *Caenorhabditis elegans* as an alternative animal species, *J Toxicol Environ Health A* 2000; 61: 641-647.

Yang FX, Xu Y and Hui Y. Reproductive effects of prenatal exposure to nonylphenol on zebrafish (*Danio rerio*), *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006; 142: 77-84.

Yao G, Yang L, Hu Y, Liang J, Liang J and Hou Y. Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis involved caspase-3 activation and mitochondrial depolarization, *Mol Immunol* 2006; 43: 915-926.