

*Lumbricus rubellus*를 이용한 endosulfan의 간편, 신속 독성 평가 및 endosulfan 분해 미생물의 선별

손호용* · 김홍주 · 금은주 · 이종복¹ · 권기석¹

안동대학교 식품영양학과, ¹안동대학교 생명자원과학부

Received November 22, 2005 / Accepted January 16, 2006

Simple and Rapid Evaluation System for Endosulfan Toxicity and Selection of Endosulfan Detoxifying Microorganism Based on *Lumbricus rubellus*. Ho-Yong Sohn*, Hong-Ju Kim, Eun-Joo Kum, Jung-Bok Lee¹ and Gi-Seok Kwon¹. Dept. of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea, ¹The School of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea – To compensate the problems of chemical assay in detoxification of recalcitrant and a practical approach in selection of bioremediation bacteria, a simple and rapid toxicity evaluation system was constructed based on *Lumbricus rubellus*. Long term-culture and specific equipment are not necessary, and semi-quantitative analysis of toxicity at sub-lethal concentration is possible by measuring of dose-dependent increased yellowish secreted compounds. When the toxicity of endosulfan, its metabolites and structurally related chemicals were measured for 24 h, the results were coincided with previous reports. Toxicity was found in endosulfan, endosulfan sulfate, aldrin, and dieldrin, respectively. Rapid and economic selection of endosulfan-detoxifying bacteria was possible using our system. *Klebsiella pneumoniae* KE-1, *K. oxytoca* KE-8 and *Pseudomonas* sp. KS-2P, reported endosulfan degrading bacteria, ameliorated the endosulfan toxicity, whereas *E. coli*, *B. subtilis* and other bacteria failed to protect the toxicity of endosulfan in *L. rubellus*. Our results suggest that the constructed system is useful to selection of microorganism as well as toxicity evaluation against toxic recalcitrants.

Key words – Bioremediation, endosulfan detoxification, *Lumbricus rubellus*, microplate assay, selection of microorganism, toxicity evaluation

Endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,3, 4-benzodioxathiepin-3-oxide)은 채소나 과일, 목화 등의 재배시 광범위 살충제로 널리 쓰이고 있다 [9,12,22,23]. 그러나, 광범위한 사용에도 불구하고, endosulfan은 인축 및 수중 생물체에 강한 독성을 나타내며 [14-16,21], 특히 수중 생명체의 경우 0.01-10 µg/L의 적은 양으로도 치명적으로 작용하여 독성 구분 Class I으로 분류되고 있다 [9]. 또한 endosulfan은 난분해성 물질로서 자연계에 지속적으로 축적되어 대기, 토양, 침전물, 상수, 음식물 재료 등에서 빈번히 검출되고 있으며, 내분비 교란물질로 보고되어 있다 [9,12]. 최근 본 연구진에서는 endosulfan이 고등 생명체에서 산화적 스트레스를 유발하며, 호흡저해에 따른 세포 사멸을 유도함을 보고하였다 [21]. 따라서 토양, 수계 및 생활 환경에 존재하는 endosulfan을 효율적으로 분해, 제거하여 세포독성 및 내분비 교란현상을 감소시키고자 하는 연구는, 국내외적으로 지속적으로 이루어져 왔으며, 특히 endosulfan을 효율적으로 분해할 수 있는 미생물의 개발에 많은 연구가 집중되어 있다 [3,13-16,20,22-25].

현재까지 보고된 endosulfan 분해 미생물은 세균 [3,14,15,

22-25], 곰팡이 [13], 미세 조류 [16,20] 등 다양하며, 본 연구진에서도 다양한 균주 선별 및 처리 공정개발에 지속적인 연구를 수행하여 왔다 [14-16]. 그러나 화학분석에 기초한 균주 선별은, 시스템 및 환경의 화학 오염 현상을 파악하고 대상물질의 분해 및 제거도를 빠르게 결정할 수 있다는 장점은 가지나, 필연적으로 생물학적 및 생태학적 시점이 결여되는 단점이 있다. Endosulfan의 경우, 미생물 분해과정 중 endosulfan sulfate가 생성될 수 있으며, 이는 모 화합물인 endosulfan보다 더욱 강한 독성을 나타내며, 토양내에서 더욱 난분해성 물질로 작용하게 된다 [9,12,16]. 이러한 문제로 인해 endosulfan 분해 균주 개발 연구는, endosulfan의 고효율 분해균주 선별 및 제제화에서, 현재는 독성 대사산물인 endosulfan sulfate 분해 가능 미생물 개발로 옮겨가고 있는 실정이다 [14,15,25]. 따라서 실제적인 이용을 위해서는, 균주 선별 초기단계에서 endosulfan sulfate와 같은 독성물질을 부가적으로 생성하지 않으면서 endosulfan을 효율적으로 분해할 수 있는 균주의 선별 기법이 필요하며, 다양한 균주의 수 많은 대사산물과 다양한 대사경로를 고려할 때 화학분석만으로는 독성물질의 분해 및 무독화 판단이 불가하며, 최종적으로는 생물 독성평가를 통해 보완하는 것이 필수적이라고 판단된다.

생물독성 평가에는 조류, 물벼룩, 어류, 꿀벌 등을 이용한

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5491, Fax : +82-54-823-1625

E-mail : hysohn@andong.ac.kr

급성, 아급성, 만성 및 번식 독성 등을 평가하여 왔으며, 최근에는 지렁이를 이용한 독성평가가 유럽, 미국, 일본을 위시해 국내에서도 실용화되어 있다[2,6,7,11,17]. 지렁이는 생태적으로 육상 생태계의 먹이사슬 중 가장 아래에 위치하며, 토양 내 유기물을 직접 섭취하며, 많은 개체를 동시에 취급할 수 있어, 독성물질의 환경생물에 대한 위해성을 평가할 수 있는 좋은 모델 생명체이다. 지렁이를 이용한 독성평가는 침지법, 표토 처리법, 여지점측법 및 인공토양에서의 치사율 결정 [2,11,17] 등 다양한 방법이 개발되어 있으나, 3주 이상의 오랜 시간과 BOD 생장기 등 특별한 장치가 필요하며, 독성평가는 오랜 시간동안의 치사율이나, 무게감소, 번식 능력 측정을 통해 이루어지게 되어 신속한 정량적 측정의 한계를 가진다. 특히 지렁이는 지렁이의 종류뿐만 아니라, 토양 수분함량 및 pH, 먹이, 토양 조성 등에 민감하게 반응하므로, 사육 환경에 따라 독성평가 결과의 오차가 발생할 수 있다[6,7].

본 연구에서는, 지렁이를 독성물질이 포함된 12-well microplate에 침지하여 별도의 사육 과정 없이 24 시간 이내에 독성 물질의 위해성을 빠르고 간편하게 파악하며, 처리액의 흡광도를 측정하여 치사량 이하의 농도에서도 독성정도를 정량하고자 하였으며, 최종적으로는 확립된 방법을 이용하여 endosulfan 분해에 실제적으로 이용 가능한 균주 선별에 사용하였다. 이러한 방법은 endosulfan 뿐만 아니라 여타의 유해 잔류물질의 독성 평가 및 분해균주 선별에도 유용하게 적용될 수 있으리라 판단된다.

실험 방법

실험 재료

Endosulfan, endosulfan lactone, endosulfan diol, endosulfan sulfate, endosulfan ether, aldrin 및 dieldrin은 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA)사에서 구입하여 사용하였다. 지렁이는 판매되는 *Lumbricus rubellus*종으로 300~600 mg 중량의 환대가 형성된 성체를 구입하여, 22°C 생장기 (LS-103-2, Lab-Tech Korea, Korea)에서 2~3일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

사용 균주 및 배지

본 연구진의 선행된 연구에서 endosulfan 분해균으로 보고한 *Klebsiella pneumonia* KE-1[15], endosulfan 및 endosulfan sulfate 분해균 *Klebsiella oxytoca* KE-8[14], 신규 분리된 *Pseudomonas* sp. KS-2P를 사용하였으며, 연세대학교에서 분양받은 YSU-4, -5, -6, -9, -10, -13의 미동정 세균을 사용하였다. YSU 균주들은 endosulfan의 분해에 관여한다고 추측되는 aromatic dioxygenase 활성[4,24,25]이 우수한 균주들이며, 실험 대조군으로는 *E. coli* KCTC 1682, *B. subtilis* KCTC 1024를 사용하였다. 균주 성장용 배지로는 Nutrient agar

(Difco Co., USA)를 사용하였고, endosulfan의 분해용 배지로는 최소배지(KH₂PO₄ 0.435%, K₂HPO₄ 0.17%, NH₄Cl 0.21%, MgSO₄ 0.02%, FeSO₄·7H₂O 0.001%, CaCl₂ 0.003%, MnSO₄ 0.005%, agar 1.5%)에 endosulfan을 25 µM 첨가하여 사용하였다.

지렁이를 이용한 endosulfan 급성 독성평가

순화된 지렁이는 0.6%의 설탕을 함유한 0.2% skim milk 용액에 1시간 침지한 후, 1차 증류수를 이용하여 skim milk 및 기타 분비물을 제거하고, 12-well microplate well당 1 g씩 되도록 2 마리를 첨가하였다. Microplate에는 well당 3 ml 증류수를 가하고, 다양한 농도의 endosulfan 및 endosulfan 유도체 등을 메탄올에 녹여 첨가하였다. 이후 22°C 생장기에서 24 시간 동안 처리하면서 지렁이의 사멸, 황색 분비물의 증대 및 외형적 변화를 관찰하였으며, 최종적으로 처리액의 흡광도를 420 nm에서 측정(U-3010 spectrophotometer, Hitachi Co., Japan)하여 독성을 평가하였다. 모든 실험은 3 회 이상 반복하였다.

지렁이 평가 시스템을 이용한 endosulfan 무독화 균주의 선별

먼저 지렁이에 대한 사용균주 자체의 독성을 평가하였다. 각각의 균주는 1%의 포도당이 포함된 최소배지를 이용하여 30°C, 24시간, 130 rpm 진탕배양 한 후, 원심 집균하고, Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.2) 용액으로 2~3 회 세척한 후, 이들을 각각 600 nm 흡광도에서 0.1로 조정하였다. 이후, 메탄올(최종농도 0.5%)이 포함된 최소배지 2.7 ml를 microplate well에 가하고, 준비된 균주 현탁액 0.3 ml와 지렁이 1 g을 가하여 22°C 생장기에서 24 시간 동안 처리하였다. 이후 경시적으로 지렁이의 사멸, 황색 분비물의 증대, 외형적 변화 및 처리액의 흡광도를 측정하였다. 한편 endosulfan 분해 및 무독화 균주의 선별에는, 12-well microplate의 well 당 25 µM의 endosulfan이 포함된 최소배지 3 ml를 가한 후, 각각의 균주를 접종한 후 30°C에서 배양하였다. 배양 3 일 후 well 당 1 g의 지렁이를 가하고 22°C 생장기에서 24 시간 처리 후, 지렁이의 사멸, 황색 분비물의 증대, 외형적 변화 및 처리액의 흡광도 측정을 통해, 처리균주의 endosulfan 분해 및 무독화 정도를 평가하였다. 모든 실험은 3 회 이상 반복하였다.

결과 및 고찰

지렁이를 이용한 endosulfan 독성평가 가능성을 검토하기 위해, microplate well에 지렁이를 첨가하고, 각각 25 µM과 250 µM의 endosulfan을 처리하였다. 그 결과, 250 µM 처리구에서는 모두 18시간 이내에 사멸이 나타났으며, 황색 분비

물의 급격한 증가가 나타났다. 반면 25 μM 처리구에서는 24 시간 이후 사멸이 나타나기 시작하였다. 이는 endosulfan이 맹독성임을 나타내며, endosulfan의 처리농도는 25 μM 이하가 적당한 것으로 판단되었다. 동일한 조건하에서, endosulfan을 5 μM , 12.5 μM 및 25 μM 처리한 경우에는 지렁이의 독성 정도가 큰 차이를 나타내었으며, 25 μM 처리를 제외하고 지렁이의 사멸은 나타나지 않았으며, 황색분비물은 처리농도에 의존하여 증대되었다(Fig. 1). 무처리구에서는 특별한 변화를 확인할 수 없었다. 지렁이를 제외한 endosulfan 처리액을 다양한 파장에서 흡광도를 측정 한 결과, 280 nm 및 420 nm에서 특징적인 흡수대를 나타내었으며 (Fig. 2), 이는 분비된 단백질 및 세포 독성에 의해 분비된 물질에 의한 나타나는 것으로 추정되었다. 본 연구에서는 지렁이의 외형적 변화, 사멸율과 함께 420 nm 파장의 흡광도를

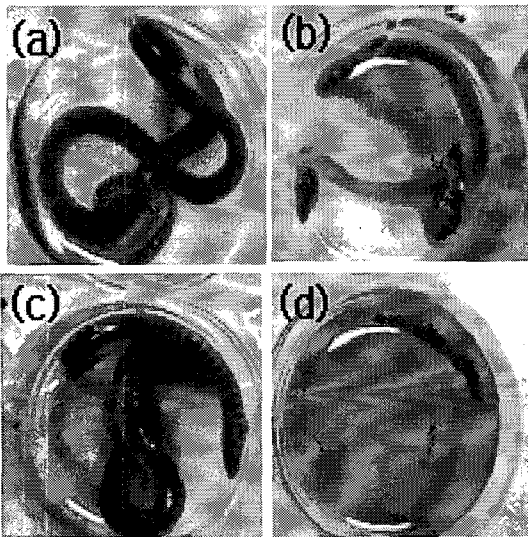


Fig. 1. Toxicity evaluation based on *Lumbricus rubellus* after treatment of (a) 0 μM , (b) 5 μM , (c) 12.5 μM , and (d) 25 μM of endosulfan, respectively.

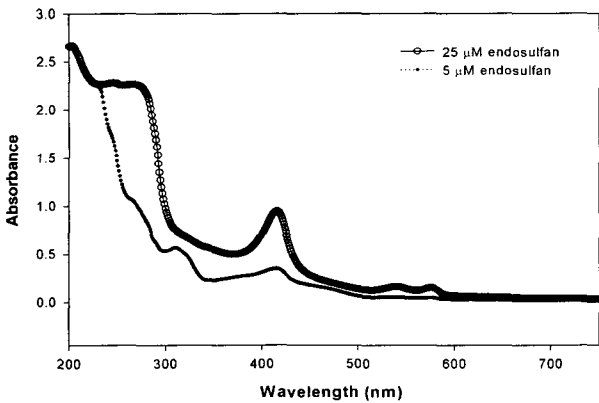


Fig. 2. UV-Visible spectrum in culture supernatant of *Lumbricus rubellus* after treatment of endosulfan for 24 h.

처리액의 독성평가지표로 사용하였으며, 이는 endosulfan 처리시 농도 의존적인 증대를 나타낼 뿐만 아니라(Fig. 3), 280 nm 흡광도보다 측정의 특이성과 정확도가 우수하리라 판단되었다.

다양한 endosulfan 유도체 및 구조적 유사물질인 aldrin, dieldrin의 독성 평가 및 endosulfan 분해균주의 선별을 위해, 최소배지와 용매로 사용되는 메탄올 (0.5%) 또는 포도당 (1%)의 독성을 지렁이로 평가하였다. 최소배지, 메탄올, 포도당을 각각 첨가하고 24 시간 관찰한 결과, 지렁이의 사멸이나 황색분비물은 나타나지 않아, 이의 독성은 무시할 수 있었다(Fig. 4). 먼저 endosulfan 대사 산물과 유사체를 각각 25 μM 처리하고, 24 시간 동안 독성을 평가한 결과, endosulfan, endosulfan sulfate, aldrin 및 dieldrin에서 독성이 나타났으며, 가장 현저한 독성은 endosulfan sulfate 처리구에서 나타났다(Fig. 5). 이는 기존의 보고와 매우 잘 일치하였다 (9,12,14,15,24,25). 이러한 결과는, 본 시스템이 지렁이의 사멸이 나타나지 않는 단기간, 저농도 처리시에서도 독성을 평가할 수 있는 우수한 시스템임을 제시하고 있다. 또한 endosulfan으로부터 독성물질을 생산하지 않는 미생물 균주 선별에 매우 유용하게 적용될 수 있음을 시사하였다.

본 시스템을 이용하여 endosulfan 분해 및 무독화 균주 선별을 시도하였다. 사용균주는 endosulfan 분해시 endosulfan sulfate를 생산하지 않는 *K. pneumonia* KE-1[15], endosulfan 및 endosulfan sulfate를 동시에 분해하는 *K. oxytoca* KE-8 [14], 신규 분리된 *Pseudomonas* sp. KS-2P 및 aromatic dioxygenase 활성이 우수한 YSU 균주들을 사용하였다. 먼저 배양된 각각의 균주 현탁액을 지렁이에 처리한 결과, 사용 균주 자체에 의한 독성은 나타나지 않음을 확인하였다 (Fig. 6). 그러나, microplate well당 endosulfan이 25 μM 첨가된 최소배지에서 3일간 각각의 균주를 배양한 후, 지렁이

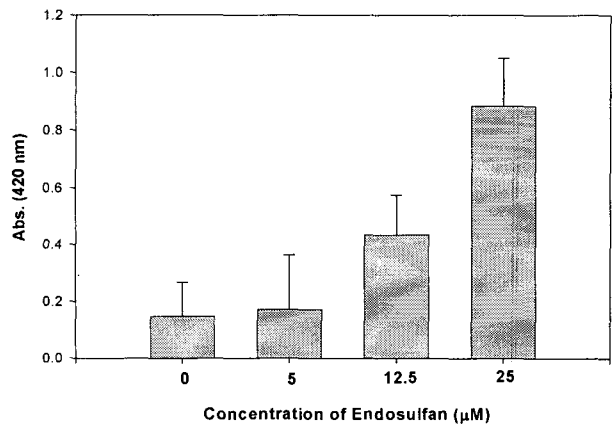


Fig. 3. Concentration-dependent increases of absorbance at 420 nm in culture supernatant of *Lumbricus rubellus* after treatment of different concentrations of endosulfan for 24 h.

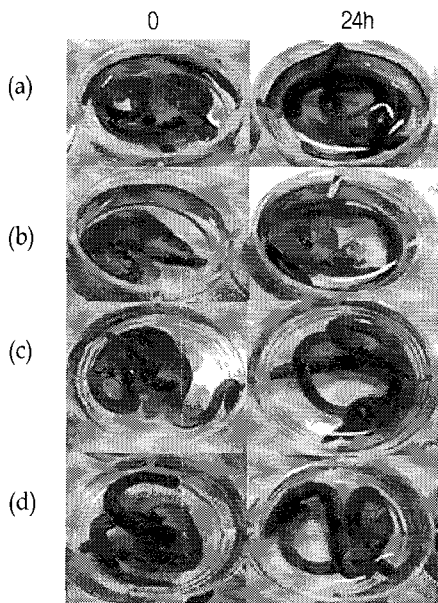


Fig. 4. Toxicity evaluation based on *Lumbricus rubellus* in (a) distilled water, (b) minimal medium, (c) methanol (0.5%), and (d) glucose (1%) in minimal medium.

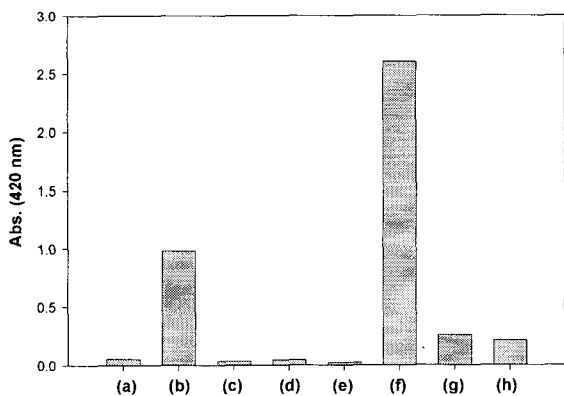
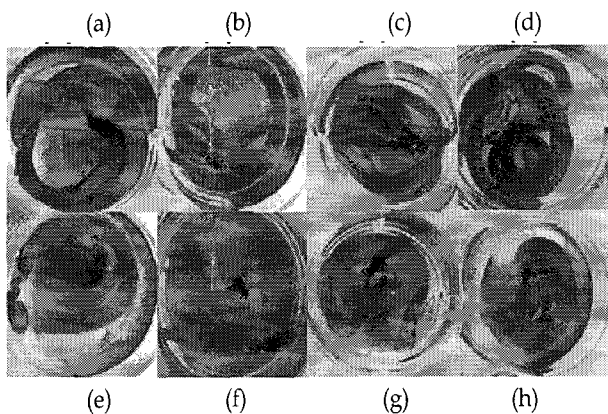


Fig. 5. Toxicity evaluation based on *Lumbricus rubellus* after additions of 25 μ M of (b) endosulfan, (c) endosulfan lactone, (e) endosulfan ether, (f) endosulfan sulfate, (g) aldrin, and (h) dieldrin, respectively. The addition of (a) distilled water and (d) methanol (0.5%) are used as controls.

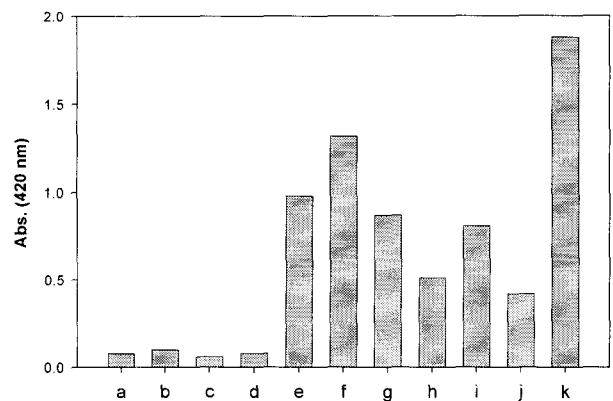
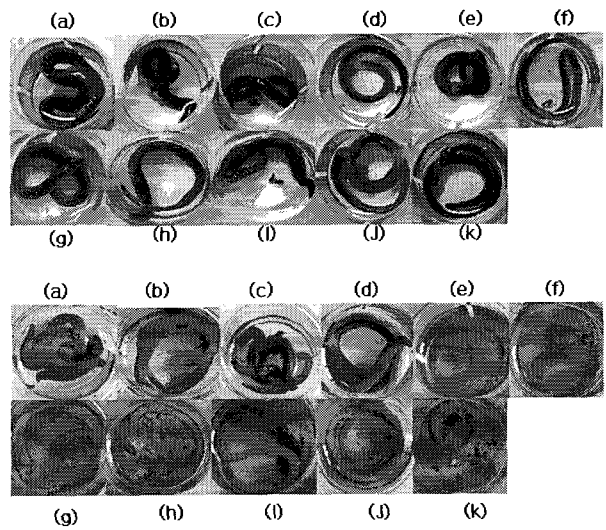


Fig. 6. Selection of endosulfan detoxifying bacteria based on *Lumbricus rubellus* assay.

Treatment of bacteria to *L. rubellus* in (upper panel) minimal medium or (lower panel) minimal medium containing endosulfan (25 μ M).

Symbols; (a) no treatment, (b) KE-1, (c) KE-8, (d) KS-2P, (e) YSU-4, (f) YSU-5, (g) YSU-6, (h) YSU-9, (i) YSU-10, (j) *B. subtilis* and (k) *E. coli*, respectively.

를 첨가한 경우에는 독성의 상당한 차이가 나타났다(Fig. 6). 이미 보고한 바와 같이, 배양 과정중 endosulfan의 분해 및 endosulfan sulfate를 생산하지 않거나 분해하는 KE-1 및 KE-8의 경우 독성이 나타나지 않았으며, 신규분리된 KS-2P의 경우에도 미약한 독성만이 인정되었다. 그 외 대조군으로 사용된 *E. coli*, *B. subtilis* 처리구 및 YSU 균주들은, endosulfan의 실제적 무독화가 나타나지 않았음을 알 수 있었다. 420 nm에서 흡광도를 측정된 결과, 이와 동일한 결과를 나타내었다. 현재, 독성물질 처리에 의한 지렁이의 황색 분비물의 대량 회수 및 정제를 진행 중에 있으며, 이러한 물질은 독성평가의 biomarker로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, endosulfan 독성의 방어기작에도 관련되는 것으로 추측되며,

endsulfan이 산화적 스트레스를 유발하는 것[21]을 감안한다면 항산화 활성을 가지는 물질일 것으로 예상된다. 현재까지 지렁이의 독성물질 반응에 대한 biomarker들은 주로 중금속 처리에 의해 유발되는 물질들을 조사하였으며, HSP70[1], metallothionein-like protein[8], lysosomal membrane stability[26] 및 comet assay[18], annetocin 유전자 발현[19] 및 tissue extract G-90 [10]이 보고된 바 있으나, 단일 평가는 불가능한 상태이다. 따라서, 다양한 독성물질의 독성평가에 이용될 수 있는 보편적 biomarker 선정 연구가 필요하다고 판단된다.

요 약

독성물질의 무독화 연구의 화학적 분석방법의 문제점을 보완하고, 난분해성 독성물질의 분해 미생물을 효율적으로 탐색하기 위해, 지렁이와 microplate를 이용한 빠르고 간편한 독성평가 시스템을 구축하였다. 본 방법은 지렁이의 사육이나 특수시설이 필요하지 않으며, 치사 및 무게감소가 현저하게 나타나지 않는 저농도, 단기간 처리시에도 신속하게 독성의 정량평가가 가능하다. 실제 endsulfan 및 다양한 endsulfan 유도체, 구조적 유사체 등을 대상으로 독성 평가한 결과, endsulfan, endsulfan sulfate, aldrin 및 dieldrin에서만 독성이 나타나 기존의 연구결과와 잘 일치하였다. 이를 이용하여 endsulfan 분해 및 무독화 균주 선별을 시도한 결과, 기존 endsulfan 분해 및 무독화 균주로 선별된 KE-1, KE-8, KS-2P 균주 처리의 경우에는 지렁이의 독성이 거의 나타나지 않았으나, *E. coli*, *B. subtilis*, 및 YSU 균주들을 처리한 경우에는, 지렁이 사멸과 함께 심각한 독성이 나타났다. 따라서, 본 시스템은 독성물질의 독성평가뿐 아니라, 독성물질의 분해 및 무독화 미생물 선별에 매우 유용함을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 BioGreen21 과제(Code: 1000520030096000) 지원 연구비로 수행되었기에 이에 감사드립니다

참 고 문 헌

- Ait-Aissa, S., P. Pandard, H. Magaud, A. P. Arrigo, E. Thybaud and J. M. Porcher. 2003. Evaluation of an in vitro hsp70 induction test for toxicity assessment of complex mixtures: comparison with chemical analyses and ecotoxicity tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **54**, 92-104.
- An, Y. J. 2005. Assessing soil ecotoxicity of methyl tert-butyl ether using earthworm bioassay; closed soil microcosm test for volatile organic compounds. *Environ. Pollut.* **134**, 181-186.
- Awasthi, N., A. K. Singh, R. K. Jain, B. S. Khangarot and A. Kumar. 2003. Degradation and detoxification of endsulfan isomers by a defined co-culture of two *Bacillus* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 279-283.
- Boyd, D. R., N. D. Sharma and C. C. R. Allen. 2001. Aromatic dioxygenase: molecular biocatalysis and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 564-573.
- Bundy, J. G., D. J. Spurgeon, C. Svendsen, P. K. Hankard, J. M., Weeks, D. Osborn, J. C. Lindon and J. K. Nicholson. 2004. Environmental metabonomics: applying combination biomarker analysis in earthworms at a metal contaminated site. *Ecotoxicology* **13**, 797-806.
- Charrois, J. W., W. B. McGill and K. L. Froese. 2001. Acute ecotoxicity of creosote-contaminated soils to *Eisenia fetida*: a survival-based approach. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 2594-2603.
- Conder J. M. and R. P. Lanno. 2000. Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. *Chemosphere* **41**, 1659-1668.
- Gillis, P. L., D. G. Dixon, U. Borgmann and T. B. Reynoldson. 2004. Uptake and depuration of cadmium, nickel, and lead in laboratory-exposed *Tubifex tubifex* and corresponding changes in the concentration of a metallothionein-like protein. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 76-85.
- Goebel, H., S. Gorbach, W. Knauf, R. H. Rimpau and H. Huttenbach. 1982. Properties, effect, residues and analytics of the insecticide endsulfan. *Residue Rev.* **83**, 1-122.
- Grdisa, M., M. Popovic and T. Hrzenjak. 2004. Stimulation of growth factor synthesis in skin wounds using tissue extract (G-90) from the earthworm *Eisenia fetida*. *Cell Biochem. Funct.* **22**, 373-378.
- Jung, H., W. Park, J. 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 earthworm. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **20**, 84-87.
- Kaur, I., R. P. Mathur, S. N. Tandon and P. Dureja. 1998. Persistence of endsulfan (technical) in water and soil. *Environ. Tech.* **19**, 115-119.
- Kullman, S. W. and F. Matsumura. 1996. Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endsulfan. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 593-600.
- Kwon, G.-S., H.-Y. Sohn, K.-S. Shin, E. Kim and B.-I. Seo. 2005. Biodegradation of the organochlorine insecticide, endsulfan, and the toxic metabolite, endsulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 845-850.
- Kwon, G.-S., J.-E. Kim, T.-E. Kim, H.-Y. Sohn, S.-C. Koh, K.-S. Shin and D.-G. Kim. 2002. *Klebsiella pneumoniae* KE-1 degrades endsulfan without formation of the toxic metabolite, endsulfan sulfate. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 255-259.
- Lee, S.-E., J.-S. Kim, I.-R. Kennedy, J.-W. Park, G.-S. Kwon,

- S.-C. Koh and J.-E. Kim. 2003. Biotransformation of an organochlorine insecticide, endosulfan, by *Anabaena species*. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1336-1340.
17. Na, Y. E., H. S. Bang, K. K. Kang, M. S. Han and Y. J. Ahn. 2005. Assessment of the effects of some insecticides on mortality of earthworm (*Eisenia fetida*). *Korean J. Environ. Agr.* **24**, 289-294.
18. Rajaguru, P., S. Suba, M. Palanivel. and K. Kalaiselvi. 2003. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ. Mol. Mutagen.* **41**, 85-91.
19. Ricketts, H. J., A. J. Morgan, D. J. Spurgeon, P. Kille. 2004. Measurement of annetocin gene expression: a new reproductive biomarker in earthworm ecotoxicology. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **57**, 4-10.
20. Sethunathan, N., M. Megharaj, Z. L. Chen, B. D. Williams, G. Lewis and R. Naidu. 2004. Algal degradation of a known endocrine disrupting insecticide, a-endosulfan, and its metabolite, endosulfan sulfate, in liquid medium and soil. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3030-3035.
21. Sohn, H.-Y., C.-S. Kwon, G.-S. Kwon, J.-B. Lee and E. Kim. 2004. Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. *Toxicol. Lett.* **151**, 357-365.
22. Suh, Y.-D. 2004. Biodegradation of the endosulfan by *Sphingomonas wittichii* RW1, *J. Korea Soc. Environ. Administrat.* **10**, 287-294.
23. Sutherland, T. D., I. Horne, R. L. Harcourt, R. J. Russell and J. G. Oakeshott. 2002. Isolation and characterization of a Mycobacterium strain that metabolizes the insecticide endosulfan. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 380-389.
24. Sutherland, T. D., I. Horne, M. J. Lacey, R. L. Harcourt, R. J. Russell and J. G. Oakeshott. 2000. Enrichment of an endosulfan-degrading mixed bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2822-2828.
25. Sutherland, T. D., K. M. Weir, M. J. Lacey, I. Horne, R. J. Russell and J. G. Oakeshott. 2002. Enrichment of a microbial culture capable of degrading endosulphate, the toxic metabolite of endosulfan. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 541-548.
26. Svendsen, C., D. J. Spurgeon, P. K. Hankard and J. M. Weeks. 2004. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **57**, 20-29.