

## 염화수은 (II)과 이온화 방사선 처리에 따른 토양 내 환형동물의 DNA 손상 측정

류태호<sup>1,3</sup> · 모하마드닐리<sup>2</sup> · 안광국<sup>3</sup> · 김진규<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>한국원자력연구원 방사선과학연구소, <sup>2</sup>스페인 도네쉬방사선연구소,

<sup>3</sup>충남대학교 생명시스템과학대학

## Evaluation of DNA Damage Induced by Mercury Chloride (II) and Ionizing Radiation in the Earthworm

Tae Ho Ryu<sup>1,3</sup>, Mohammad Nili<sup>2</sup>, Kwang-Guk An<sup>3</sup> and Jin Kyu Kim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Korea Atomic Energy Research Institute, Advanced Radiation Technology Institute, Jeongeup 580-185, Korea

<sup>2</sup>Dawnesh Radiation Research Institute, Barcelona 08007, Spain

<sup>3</sup>College of Bioscience and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

**Abstract** – Soil pollution by heavy metals has become a significant environmental concern due to a variety of human activities. Specially toxicity caused by excessive mercury exposure is now being recognized as a widespread environmental problem and is continuing to attract a great deal of public concerns. The earthworms are very important animals that aerate the soil with their burrowing action and enrich the soil by decomposing organic matters. Especially the earthworm *Eisenia fetida* is routinely used in ecotoxicological studies. The levels of DNA damage in earthworms treated with HgCl<sub>2</sub> and ionizing radiation were investigated in this study. Genotoxic effects were evaluated in the earthworm’s coelomocytes using the comet assay (Single Cell Gel Electrophoresis; SCGE). The results showed that the mercury chloride and radiation were responsible for the genotoxic effects on earthworms. The level of DNA damage significantly increased after the treatment of mercury chloride combined with ionizing radiation. The combined treatment of HgCl<sub>2</sub> and ionizing radiation had a greater genotoxicity. This study is amenable to further study such as enzyme activation assay.

**Key words** : mercury chloride, radiation, earthworm, comet assay (SCGE), DNA damage

### 서 론

토양은 공기, 물과 함께 동·식물 및 토양에 서식하는 모든 생물체의 생존 기반이며, 물질 순환과 오염원의 여

과와 같은 자정 능력을 지님으로써 생태계에서 중요한 기능을 수행한다. 그러나 급격한 경제개발과 그에 따른 환경오염으로 인하여 자연의 정화 능력을 넘는 오염원이 발생하였고 이는 자연 생태계의 불균형을 가속화시켰다 (Lim 1995). 토양에 유출되어 생물에게 유해성을 미칠 수 있는 화학물질들에는 중금속, 산성비, 농약, 각종 화학비료, PCBs (polychlorinated bipenyls), PAHs (polynuclear

\*Corresponding author: Jin Kyu Kim, Tel. 063-570-3130, Fax. 063-570-3139, E-mail. jkkim@kaeri.re.kr

aromatic hydrocarbons) 등이 있다. 이러한 토양 오염물질의 환경모니터링을 위해 다양한 물리화학적, 생물학적 지표들이 개발되고 있으며, 육상생태계에서 지렁이는 토양 내 유기물을 분해하고, 설치류나 조류, 포유류 등의 먹이가 되는 생태학적 중요성을 지니고 있기 때문에 토양 오염의 지표생물로 적절하다(Button *et al.* 2010). 유럽에서는 이미 지렁이를 지표 생물로 선정하여 농약 등 화학물질의 위해성을 평가하는데 이용하도록 규정하고 있으며(OECD 1984), 국내에서도 이러한 연구가 활발히 진행 중이다. 지렁이를 이용한 국내외 연구들을 살펴보면 농약의 위해성을 평가한 실험과 여러 가지 중금속이 일으키는 생물학적 영향 및 유전독성을 알아본 연구들이 있다(Reinecke *et al.* 2004; 박 2005; Manerikar *et al.* 2008; Bigorgne *et al.* 2010).

토양 오염을 일으키는 대표적인 물질 중 하나인 중금속은 수은, 납, 크롬 등 비중이 4 이상인 금속을 총칭하는 화학물질로서 생물체 내에 축적되면 만성적인 피해를 주는 경우가 많기 때문에 독성물질로 구분 된다(우 등 2006; Mirlean *et al.* 2008). 여러 중금속 중에서도 수은 화합물은 크게 무기수은, 유기수은 등으로 나뉘는데 화학적 분류에 따라 증상이 다양하게 나타나기 때문에 다각적 측면에서의 연구가 요구되며, 주로 신경계, 신장, 간 기능의 손상을 유발하는 것으로 보고되어왔다(Emanuelli *et al.* 1996). 무기수은(수은염)은 화장품, 아말감, 이뇨제, 방부제 등에서 발견되며, 일반적으로 용해도가 낮은 무기수은은 인체 내에서 크게 문제가 되지 않으나, HgCl<sub>2</sub>와 같은 가용성 무기수은이나 수은증기는 유독하다(Ozuah 2000). 유기수은은 가장 독성이 큰 수은의 형태로 알릴계와 알킬계가 있는데 그 중에서도 알킬수은화합물은 신경계를 침해하여 중증 중독을 일으켜 죽음에 이르게 할 수도 있다. 자연 상태에서 검출되는 메틸수은은 일반적으로 미생물 등의 요인에 의해 무기수은이 메틸수은으로 변화하여 생성되며, 연안에서 생육하는 생물체 내에 축적되는 양상을 통해 발생한다(이 등 2005). 1953년 일본의 구마모토 현에서 발생한 미나마타병은 화학비료공장의 폐수에 포함되어 있었던 메틸수은이 그 원인으로 밝혀지면서 수은중독의 위험성을 대표적으로 알리는 사건이 되었다.

한편, 방사능으로 인한 토양 오염은 핵실험에 의해 발생한 낙진이나, 원자력 발전소, 병원, 연구소, 대학 등에서 배출된 방사성 폐기물이 토양에 축적되어 발생한다. 이러한 토양 내 방사성 물질은 식물의 뿌리 또는 토양 동물의 체내 기관을 통해 흡수되어 생태계에 심각한 영향을 미칠 수 있다. 따라서 최근 ICRP (International Commission on Radiological Protection)에서는 이온화 방사선

의 생태학적 영향을 중요한 연구 분야로 인식하고, 환경에서의 방사선 방호를 위해 비인간생물상의 데이터를 요구하고 있다(ICRP 2003). 지금까지의 방사능과 생물에 관련된 연구를 살펴보면 히로시마 원폭피해 및 체르노빌 사건의 피폭 환자에서의 임상 증상 등이 주를 이루고 있으며, 방사선 방호는 주로 인간에만 집중적으로 초점이 맞춰져 연구되어왔다. 그러나 환경 방사선 방호에 관한 연구는 이제 인간뿐만이 아닌 생태계의 동·식물을 대상으로 하여 진행되고 있는 추세이며, 지렁이는 방사선에 대한 영향을 생태학적으로 연구하는데 중요한 지표로 이용할 수 있다(Hertel-Aas *et al.* 2007).

또한 자연계에 존재하는 다양한 형태의 방사선과 환경 내 존재하는 유해물질과의 복합작용에 대한 연구는 생물을 대상으로 함에 따라 생물이 받을 영향에 대한 실질적인 자료를 제공한다. 그러므로 이온화 방사선과 화학물질의 동시노출에 따른 생물체내의 상승, 가산, 길항작용 등의 다양한 복합작용 규명 연구의 필요성이 제기되고 있다. 그 동안 복합 처리에 관한 연구에는 사람 림프구를 대상으로 수은과 이온화 방사선의 노출 시 나타나는 DNA 손상에 대한 연구(Panek *et al.* 2001), 수은 이외 물질 중 살충제와 방사선을 사람의 림프구 세포에 동시 노출 시켜 상승작용을 관찰한 연구(김 2001), 그리고 어류 간암세포에 수은과 방사선을 처리하여 세포 생존율을 확인한 연구(한 등 2009) 등의 시도가 이루어지고 있다. 따라서 본 연구는 지렁이에 염화수은과 방사선을 각각 처리하여 DNA의 손상 유무와 손상의 정도를 측정하는데 목적이 있으며, 중금속과 방사선의 복합적인 효과를 연구하는데 새로운 자료를 제시하기 위하여 염화수은과 이온화 방사선에 지렁이를 순차적으로 노출시켜 단독 처리한 실험 결과와 비교, 분석해 보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험생물의 배양

실험에 사용한 지렁이는 우리나라에서 자생하는 줄지렁이(*Eisenia fetida*)로서 중량이 300~600 mg으로 환대가 잘 발달된 성체만을 선택하였다. 배양에 이용한 토양은 배양토와 왕겨 및 우분을 각각 6:3:1의 부피비로 혼합하여 조제하였으며, 배양토는 원예용 상토를 시중에서 구입하여 사용하였다. 사육기간 중의 실내 온도는 23±2°C, 수분은 65±5%를 유지시켰다.

### 2. 염화수은(II) 및 방사선 처리

염화수은은 각각의 적정 농도로 증류수에 용해시켜 건

조된 인공 배양토와 잘 혼합하고, 이를 배양 용기에 0.12 kg씩 넣었다. 배양 용기는 수분 증발을 억제하고 지렁이의 탈출을 방지하기 위하여 뚜껑을 덮어 주었으며, 호흡에 필요한 산소가 공급되도록 뚜껑과 용기 바닥에 직경 1 mm의 구멍을 약 20개씩 뚫어 사용하였다. 염화수은의 노출 농도는 배양토의 총 질량을 기준으로 하여 0~160 mg kg<sup>-1</sup>로 설정하였으며, 지렁이는 사육할 때와 동일한 조건에서 용기별로 20마리씩 24시간과 48시간 동안 각각 배양하였다. 방사선 조사는 Petri dish와 뚜껑의 내부에 모두 증류수로 적신 여과지를 깔아 방사선 조사를 하는 동안 수분공급이 유지되도록 하고, 한 개의 Petri dish 당 3~10마리씩의 지렁이를 넣어 수행하였다. 방사선 조사는 한국원자력연구원 방사선과학연구소의 <sup>60</sup>Co 감마선원(선원강도, 7.4 PBq)을 이용하여 0~50 Gy의 이온화 방사선을 조사하였다. 조사가 끝난 시료는 빛이나 온도에 의한 영향을 최소화하기 위해 검은 천으로 덮고 얼음이 담긴 아이스박스 안에 넣어 이동시켰다. 염화수은 노출 시험과 방사선 조사가 끝난 지렁이는 다시 깨끗한 인공배양토로 옮기고 comet assay를 통해 DNA 손상 여부 및 정도를 평가하였다.

### 3. 체강세포 (coelomocyte)의 분리 및 수집

지렁이의 체강세포 수집은 Eyambe *et al.* (1991)과 Diogene *et al.* (1997)이 제안한 비침습성 기술을 약간 변형시켜 사용하였다. 지렁이를 증류수로 행귀 배양토를 제거하고 1 mL의 차가운 extrusion 용액(5% ethanol, 95% saline, 2.5 mg mL<sup>-1</sup> EDTA, 10 mg mL<sup>-1</sup> guaiacol glycerol ether)에 넣어 얼음 위에서 3분간 방치시켰다. 체강세포가 함유된 체액이 방출되면 eppendorf tube에 용액을 옮기고 4°C에서 380×g로 5분간 원심분리하여 조심스럽게 상층액만 버린다. 튜브의 바닥에 남은 세포 침전물은 380×g에서 PBS (Phosphate-buffered saline)로 두 번 행귀낸 후 100 μL의 PBS를 넣어 재부유 시켰다.

### 4. Comet assay (Single Cell Gel Electrophoresis; SCGE)

본 분석법은 Singh (1988)이 서술한 바를 토대로 진행하였다. 실험진행 과정 중 외적인 환경요인으로 발생할 수 있는 DNA 손상을 최소화하기 위하여 모든 과정은 4°C의 어두운 조건에서 수행하였다. 실험에 앞서 1% NMA (normal melting point agarose)로 미리 코팅해둔 슬라이드 글라스에 PBS로 부유시킨 coelomocytes 20 μL와 0.5% LMA (low melting point agarose) 200 μL를 혼합하여 떨어뜨린 후 커버 글라스를 덮어 전체적으로 퍼지게 한다. 슬라이드 글라스를 20분간 굳히고 커버 글라스를

벗겨낸 뒤, 200 μL의 0.5% LMA로 한 층을 덧입혀 한 번 더 굳힌다. 만들어진 슬라이드는 커버 글라스를 제거한 후, lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 10% dimethylsulfoxide, 1% Triton X-100, pH 10)이 담긴 stain jar에 2시간 이상 담가 세포를 용해시킨다. 증류수로 슬라이드를 행귀 남은 용액을 제거하고, 전기영동 버퍼 (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, >pH 13)에서 20분간 나신폴립을 유도한 후, 4°C, 25 V, 300 mA에서 25분간 전기영동을 실시한다. 전기영동이 끝난 슬라이드는 neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5)로 중성화과정을 거친다. Tris 용액에서 꺼낸 슬라이드를 absolute alcohol에 10분간 담가 탈수과정을 거친 뒤, 실온에서 건조시킨다. 건조된 슬라이드 글라스는 80 μL의 EtBr (Ethidium Bromide) 용액 (20 μg mL<sup>-1</sup>)으로 염색하여 형광현미경 (Olympus fluorescence microscope, Japan)에서 200배율로 검경하고, Komet ver. 4.0 image analysis (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK)를 이용하여 이미지를 분석한다. 각 시료 당 2개의 슬라이드 표본을 만들고 슬라이드 1개 당 50개씩 총 100개의 핵을 관찰하여 나온 데이터를 통해 Olive tail moment 값으로 계산한다.

### 5. 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 일원분산분석 (one-way ANOVA test)을 사용하였고, *p*값이 0.005보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 염화수은 (II) 처리에 의한 DNA 손상

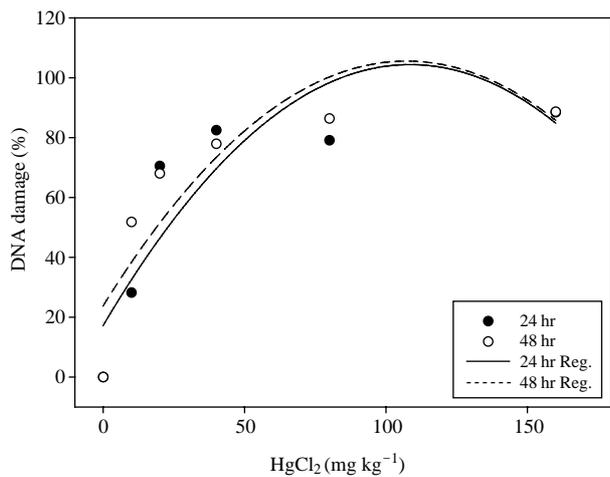
*E. fetida*를 0~160 mg kg<sup>-1</sup> 농도의 염화수은에 24시간 및 48시간 동안 노출시킨 후, 체강세포를 수집하여 DNA 손상 정도를 측정하였다. 그 결과, 24시간과 48시간 노출시킨 염화수은의 모든 농도 구간에서 유전자 손상의 차이가 유의하게 나타났다 (Table 1). 또한 대조군의 DNA 손상을 0%로 하여 노출시킨 수은의 농도에 따라 DNA의 손상률을 구해 보면, 노출 시간에 관계없이 유사한 경향으로 DNA가 손상되었음을 알 수 있다. 이때 도출된 수식을 통해 DNA가 50% 손상 되는 EC<sub>50</sub> 값을 계산해 보면 24시간과 48시간 노출 시 각각 23과 19 mg kg<sup>-1</sup>의 농도인 것으로 추측할 수 있다 (Fig. 1).

### 2. 방사선 조사에 의한 DNA 손상

방사선이 지렁이의 DNA 손상에 미치는 영향을 알아

**Table 1.** Tail moment (mean ± S.D.) in coelomocytes of *E. fetida* after 24 and 48 hr exposed to HgCl<sub>2</sub>. Tail moment means Olive tail moment

HgCl <sub>2</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	Mean tail moment ± S.D.	
	24 hr	48 hr
Control	0.28 ± 0.23	0.38 ± 0.33
10	0.39 ± 0.33	0.78 ± 0.58
20	0.95 ± 0.59	1.17 ± 1.04
40	1.60 ± 0.70	1.70 ± 1.28
80	1.34 ± 1.06	2.75 ± 1.48
160	2.43 ± 1.50	3.31 ± 1.45

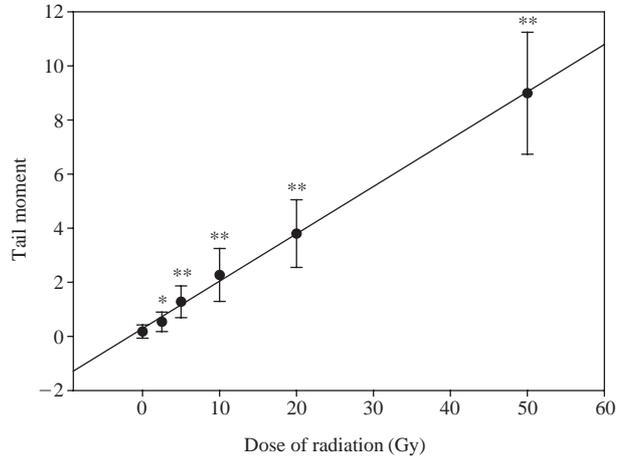


**Fig. 1.** DNA damage in coelomocytes of *E. fetida* after 24 and 48 hr exposed to mercury chloride (0 to 160 mg kg<sup>-1</sup>). Data are presented as the percentage of control TM level.

보기 위하여 *E. fetida*를 0~50 Gy의 감마선에 노출시키고, DNA 수복을 방지하기 위해 모든 실험과정은 단시간 내에 수행하였다. 실험 결과, 방사선 총 선량의 증가에 따라 tail의 끌림 현상이 더 강하게 나타나 DNA 손상이 증가하는 경향을 보였다. Comet assay 결과를 직접 분석해 보면, 대조군과 2.5, 5, 10, 20, 50 Gy의 방사선을 조사했을 경우 Olive tail moment ± 표준편차의 값은 각각 0.18 ± 0.22, 0.54 ± 0.36, 1.28 ± 0.59, 2.27 ± 0.98, 3.8 ± 1.25, 8.99 ± 1.98로 대조군에 비하여 각각 3, 7, 12, 21, 50배 정도의 손상을 나타내었다 (Fig. 2). DNA 손상의 방사선량-반응 (dose-response)은 다음과 같은 식으로 계산된다.

$$TM = 0.175D + 0.291 \quad (r^2 = 0.998)$$

여기서, TM은 Tail moment, D는 방사선 선량 (radiation dose)을 나타낸다. 이 수식을 이용하면 방사선 선량에 따른 DNA 손상을 TM 값의 수치로 표현할 수 있으며, 반대로 실험을 통해 산출해 낸 TM 값을 식에 대입하여 조사

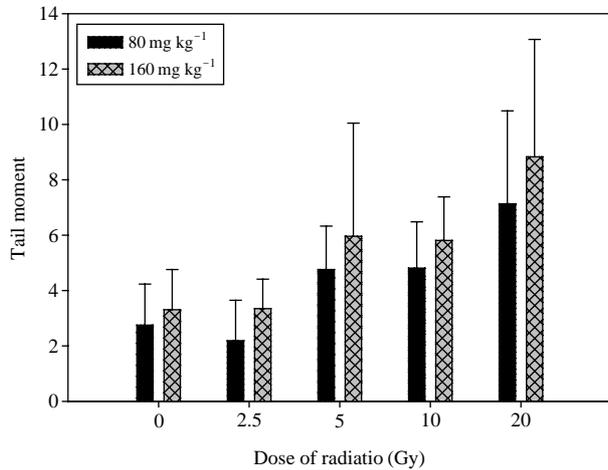


**Fig. 2.** The effects of radiation dose on the average tail moment values in coelomocytes of *E. fetida*. Tail moment means Olive tail moment. Olive tail moment = (tail mean - head mean) × tail %DNA/100. Significant difference from controls is indicated (\*P < 0.005; \*\*P < 0.001).

된 감마선의 선량을 추론하는데도 유용한 데이터로 사용될 것이다. 또한 유전독성물질을 생물에 인위적으로 처리하여 DNA 손상을 발생시켰을 때, 선량-반응식을 통해 두 처리군 사이의 동일한 TM 값을 구하여 방사선 조사 선량과 물질의 농도 값을 서로 대조해 볼 수도 있다. 이는 지렁이뿐만 아니라 다른 여러 생물에도 응용이 가능할 것으로 사료된다.

### 3. 염화수은 (II)과 방사선의 복합처리에 의한 DNA 손상

수은에 48시간 동안 노출시킨 *E. fetida*를 감마선으로 조사한 뒤 DNA의 손상을 확인한 결과, 수은 단독 처리군이나 방사선 단독 처리군보다 DNA의 손상이 유의적으로 크게 나타났다. 특히 80과 160 mg kg<sup>-1</sup>의 염화수은 농도에서 지렁이를 배양하고 방사선을 조사한 뒤 DNA가 받는 손상을 측정하면 수은만을 단독으로 처리했을 때와 수은과 방사선을 함께 처리했을 때의 영향을 명확히 비교할 수 있다. 80과 160 mg kg<sup>-1</sup>의 염화수은을 처리한 실험군의 TM 값은 2.75 ± 1.48과 3.31 ± 1.45이지만, 염화수은에 노출시킨 후 2.5, 5, 10, 20 Gy의 방사선을 조사한 복합 처리군의 TM 값은 모든 구간에서 염화수은 단독 처리군의 수치보다 확실히 증가했음을 알 수 있다 (Fig. 3). 또한 수은과 방사선의 단독처리와 복합처리 시 발생한 DNA의 손상을 비교해 보면, 복합처리 된 지렁이의 DNA 손상치는 각각 단독 처리한 지렁이의 DNA 손상치를 단순히 합한 값보다 크게 나타나 손상의 정도가



**Fig. 3.** DNA damage in coelomocytes of *E. fetida* exposed in vivo to HgCl<sub>2</sub> (80 and 160 mg kg<sup>-1</sup>) and  $\gamma$ -rays (0, 2.5, 5, 10 and 20 Gy). Tail moment means Olive tail moment. Olive tail moment=(tail mean-head mean)  $\times$  tail %DNA/100.

**Table 2.** Tail moment in *E. fetida* after combined treatment of HgCl<sub>2</sub> (0 to 160 mg kg<sup>-1</sup>) and  $\gamma$ -rays (0 to 50 Gy). Tail moment means Olive tail moment

Treatment		Mean tail moment $\pm$ S.D.
HgCl <sub>2</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	Radiation (Gy)	
0	0	0.28 $\pm$ 0.21
10	2.5	2.42 $\pm$ 1.28
20	5	2.75 $\pm$ 1.20
40	10	4.26 $\pm$ 1.67
80	20	7.14 $\pm$ 3.36
160	50	14.83 $\pm$ 7.82

더 심해졌다고 판단 할 수 있었다 (Table 2). 이것은 수은과 방사선을 실험생물에 동시에 노출시켜 두 요인의 상승작용을 알아본 다른 연구의 결과들과도 일치한다 (우 등 2006; 한 등 2009).

## 적 요

각종 유전독성학적 물질로 인한 생물체내의 영향을 평가해보기 위해 *E. fetida*를 대상으로 본 연구를 수행하였다. 염화수은에 대한 DNA 손상을 알아보는 실험에서는 노출 시간에 상관없이 노출 농도에 비례한 유전자의 손상이 나타났다. 방사선이 지렁이의 DNA 손상에 미치는 영향을 알아본 실험에서도 역시 방사선 총 선량의 증가에 따라 DNA 손상이 증가하는 경향을 보였다. 염화수은에 48시간 동안 노출시키고 방사선을 조사한 지렁이의 세포를 comet assay하면, 수은 단독 처리군이나 방사선

단독 처리군에 비해 DNA의 손상이 유의적으로 크게 나타났다. 염화수은과 방사선 모두에 복합처리 된 지렁이의 DNA 손상치는 각각 단독 처리한 지렁이의 DNA 손상치를 합한 값보다 크게 나타나 두 요인의 상승작용이 확인되었다. 본 연구를 통해 지렁이의 세포내에서 수은과 방사선이 야기하는 DNA 손상을 측정하고, 두 인자의 복합처리에 따른 유전독성 상승효과를 관찰할 수 있었다. 이는 중금속과 방사선의 복합적인 효과를 나타낸 기존의 여러 연구결과와도 비교가 가능한 연구라고 사료되며, 향후 이를 보완하고 더 정확한 평가를 위해 지렁이 세포 내에서의 스트레스 반응 측정이나 효소 활성 실험 등을 추가로 수행하여야 할 것이라고 생각된다.

## 사 사

본 연구는 교육과학기술부에서 시행하는 기관고유사업의 지원으로 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- 김진규. 2001. 환경재해 방지를 위한 생물정보로서의 사람 림프구 DNA 손상에 대한 방사선과 살충제의 상승작용. 환경생물. 19:19-24.
- 박경훈. 2005. 지렁이와 누에에 대한 농약의 위해성 평가. 경북대학교 대학원 박사논문. pp. 1-98.
- 우현정, 김지향, 안토니나 체블스카바실레프스카, 김진규. 2006. 이온화 방사선 및 염화수은(II)에 의한 자궁경부암 세포의 DNA 손상 평가. 환경생물. 24:46-52.
- 이성연, 원호식, 이동섭. 2005. *Pseudomonas balearica*를 이용한 고농도의 메틸수은 제거. 대한환경공학회 2005 추계학술연구발표회 논문집. pp. 1440-1446.
- 한 민, 현경만, 모하마드닐리, 황인영, 김진규. 2009. 이온화 방사선 및 염화수은 처리에 따른 어류 간암세포의 생존능 평가. 환경생물. 27:140-145.
- Bigorgne E, C Cossu-Leguille, M Bonnard and J Nahmani. 2010. Genotoxic effects of nickel, trivalent and hexavalent chromium on the *Eisenia fetida* earthworm. Chemosphere. 80:1109-1112.
- Button M, GRT Jenkin, KJ Bowman, CF Harrington, TS Brewer, GDD Jones and MJ Watts. 2010. DNA damage in earthworms from highly contaminated soils: assessing resistance to arsenic toxicity by use of the comet assay. Mutat. Res. 696:95-100.
- Diogene J, M Dufour, GG Poirier and D Nadeau. 1997. Extrusion of earthworm coelomocytes: comparison of the cell populations recovered from the species *Lumbricus terrestris*,

- Eisenia fetida* and *Octolasion tyrtaeum*. Lab. Anim. 31:326-336.
- Emanuelli T, JBT Rocha, ME Pereira, LO Porciuncula, VM Morsch, AF Martins and DOG Souza. 1996. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on  $\sigma$ -aminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. Pharmacol. Toxicol. 79:136-143.
- Eyambe GS, AJ Goven, LC Fitzpatrick, BJ Venables and EL Cooper. 1991. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. Lab. Anim. 25: 61-67.
- Hertel-Aas T, DH Oughton, A Jaworska, H Bjerke, B Salbu and G Brunborg. 2007. Effects of chronic gamma irradiation on reproduction in the earthworm *Eisenia fetida* (oligochaeta). Radiat. Res. 168:515-526.
- ICRP. 2003. A framework for assessing the impact of ionising radiation on non-human species. Publication 91, Annals of the ICRP. Elsevier. Amsterdam. Vol. 33.
- Lim SK. 1995. Studies on the establish of soil environmental standard in Korea. Korea Committee Environ. Sci. Res., Seoul. pp. 125-135.
- Manerikar RS, AA Apte and VS Ghole. 2008. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity assessment of Cr(VI) using comet assay in earthworm coelomocytes. Environ. Toxicol. Phar. 25:63-68.
- Mirlean N, P Baisch, I Machado and E Shumilin. 2008. Mercury contamination of soil as the result of long-term phosphate fertilizer production. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 81:305-308.
- OECD. 1984. Guideline for testing of chemicals 207. Earthworm acute toxicity tests. OECD, Paris.
- Ozuah PO. 2000. Mercury poisoning. Curr. Probl. Pediatr. 30: 91-99.
- Panek A, JK Kim and A Cebulka-Wasliewa. 2001. *In Vitro* studies of repair efficiency of DNA damage induced by X-rays in lymphocytes exposed to mercury. 12nd Symposium of Polish Radiation Research Society, Sept. 10-12, 2001, Krakow, Poland.
- Reinecke SA and AJ Reinecke. 2004. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46:208-215.
- Singh NP, MT McCoy, RR Tice and EL Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175:184-191.

Manuscript Received: October 28, 2010

Revision Accepted: November 12, 2010

Responsible Editor: Hak Young Lee