

Utilisation de trois tests de génotoxicité pour l'étude de l'activité génotoxique de composés organohalogénés, d'acides fulviques chlorés et d'échantillons d'eau (non concentrés) en cours de traitement de potabilisation

Use of Three Genotoxicity Tests to Evaluate the Genotoxic Activity of Organohalides, Chlorinated Fulvic Acids and Unconcentrated Water Samples Collected from a Drinking Water Treatment Plant

F. Le Curieux, S. Giller, D. Marzini, A. Brice and F. Erb

Volume 9, Number 1, 1996

URI: <https://id.erudit.org/iderudit/705243ar>

DOI: <https://doi.org/10.7202/705243ar>

[See table of contents](#)

Publisher(s)

Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

ISSN

0992-7158 (print)

1718-8598 (digital)

[Explore this journal](#)

Cite this article

Le Curieux, F., Giller, S., Marzini, D., Brice, A. & Erb, F. (1996). Utilisation de trois tests de génotoxicité pour l'étude de l'activité génotoxique de composés organohalogénés, d'acides fulviques chlorés et d'échantillons d'eau (non concentrés) en cours de traitement de potabilisation. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 9(1), 75–95. <https://doi.org/10.7202/705243ar>

Article abstract

Since the identification of organohalides in drinking water in 1974, several investigators have detected genotoxic activity in drinking water concentrates. It is now widely admitted that the observed genotoxicity originates mainly from the reaction of chlorine on natural organic matter contained in the raw water, which leads to the formation of organohalogenated compounds.

The aim of this study is to show the benefit of three short-term assays for the evaluation of the genotoxic potency of organohalogenated compounds and of complex mixtures. In a wider context, the purpose is to identify a test or a battery of tests that can contribute to the control of natural and drinking water genotoxicity.

The three genotoxicity assays carried out during this work were:

- the SOS chromotest, a primary DNA damage *in vitro* assay on *Escherichia coli*;
- the Ames-fluctuation test, a point mutation *in vitro* assay on *Salmonella typhimurium*;
- and the newt micronucleus test, a chromosomal aberration *in vivo* assay on the amphibian *Pleurodeles waltl*.

These assays display a valuable advantage: the water samples under study can be analyzed without concentration prior to testing. Thus, the different concentration procedures, which may modify the original genotoxicity of the water samples, are avoided.

A previous study on seven reference genotoxic chemicals had indicated that the SOS chromotest was never the most sensitive of the three tests (for a given chemical, the most sensitive assay is defined as the test which detects the lowest concentration inducing a significant genotoxic effect). On the contrary, the Ames-fluctuation test proved to be the most sensitive for compounds showing direct genotoxic activity, and the newt micronucleus test the most sensitive for chemicals with indirect genotoxic effects. None of the assays was the most sensitive for every substance analyzed. These observations suggested the need to implement a battery of tests using several cell types, different metabolism systems and detecting several genotoxicity events. This earlier study also showed, in accord with several results in the literature, that the Ames-fluctuation test (in liquid medium) demonstrated a better sensitivity than the Ames test (in agar solid medium).

The first part of the present study involved testing the genotoxicity of 14 organo-halogenated compounds identified in drinking water samples in chlorinated humic matter samples. The chemicals studied were four chlorinated and/or brominated trihalomethanes (trichloro-, bromodichloro-, chlorodibromo- and tribromomethane), five chlorinated and/or brominated acetonitriles with one, two or three halogens (monochloro-, dichloro-, trichloro-, monobromo- and dibromoacetonitrile) and five chlorinated propanones with one, two or three substitutions on one or two carbon atoms (monochloro-, 1,1-dichloro-, 1,3-dichloro-, 1,1,1-trichloro- and 1,1,3-trichloropropanone). Although the SOS chromotest was the most sensitive for 3 of the 14 substances analyzed, the results confirmed that this test was globally the least sensitive; the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test remained the most efficient assays. It is interesting to note that the Ames-fluctuation test appeared the most sensitive for all the chloropropanones tested and the newt micronucleus test, for all the haloacetonitriles analyzed. Moreover, several structure-activity relationships were demonstrated: the nature of the halogenated substituents (bromine or chlorine), the number and, above all, the position of chlorine atoms strongly influenced the genotoxicity of the organohalides studied.

In the second part of the work we analyzed the effects of complex mixtures containing several organohalogenated compounds: the three tests were performed on two chlorinated fulvic acids of different origin. Pomic fulvic acid was extracted from a surface water reservoir used to produce drinking water in Vendée (France) and Pinaul fulvic acid came from a forest pond near Poitiers (France). The total organic carbon was about 1 g/l in the solution subjected to chlorination and the molar chlorination ratio was 1.5 Cl₂/C. The results showed the advantage of tests using bacteria: the Ames fluctuation test was the only assay able to detect the genotoxicity of both chlorinated fulvic acids; the SOS chromotest detected the genotoxic effect of only one of the chlorinated fulvic acids (Pinaul). In contrast, the newt micronucleus test did not show any genotoxicity of the chlorinated fulvic acids. However, it must be pointed out that, as insufficient fulvic acid was available, the genotoxic potency of these solutions on the newt was not tested under adequate conditions (e.g., subchronic concentrations were not studied). Nevertheless, the concentrations of fulvic acid analyzed were very close to those found in the aquatic environment.

The last part of the study attempted to approximate environmental and human exposure conditions: the three tests were performed on four water samples taken at several stages of a drinking water treatment plant. These samples were analyzed for genotoxicity in the three test systems without preconcentration. The plant studied is characterized by the following treatment steps:

- coagulation-flocculation;
- chlorination at 6 g Cl₂/m³;
- sand filtration;
- ozonation at 1.9 g O₃/m³;
- final chlorination at 1.4 g Cl₂/m³ before sending the treated water into the distribution system.

The four samples were taken:

1. before any treatment (raw water, 10 to 13 mg total organic carbon per liter),
2. between the sand layer filter and the ozonator (chlorinated water),
3. after the ozonator (ozonated water),
4. and at the end of the treatment process (treated water).

The results obtained confirmed the advantage of the Ames fluctuation test, which was the only assay able to detect a genotoxic activity in the unconcentrated water samples studied. Regarding the influence of the different chemical treatments on the mutagenicity observed, it was demonstrated that the first chlorination step led to the formation of direct-acting mutagens. The treatment with ozone, at the rate used, did not significantly modify the mutagenicity of the samples that had previously been chlorinated. Similarly, the second chlorination step did not significantly increase the direct mutagenicity detected.

Practically, our study indicated that the Ames-fluctuation test is the only assay, among the three performed that is able to contribute efficiently to the control of drinking water genotoxicity. In this context, the benefit of the SOS chromotest appears only in case of accidental pollution: indeed, it is the only test able to yield results within 24 hours. The implementation of the newt micronucleus test could be useful for the control of natural or drinking water genotoxicity in case of extensive pollution.

Utilisation de trois tests de génotoxicité pour l'étude de l'activité génotoxique de composés organohalogénés, d'acides fulviques chlorés et d'échantillons d'eau (non concentrés) en cours de traitement de potabilisation

Use of three genotoxicity tests to evaluate the genotoxic activity of organohalidés, chlorinated fulvic acids and unconcentrated water samples collected from a drinking water treatment plant

F. LE CURIEUX^{1,2}, S. GILLER^{1,2}, D. MARZIN^{1,2}, A. BRICE² et F. ERB²

Reçu le 25 octobre 1994, accepté le 23 octobre 1995*.

SUMMARY

Since the identification of organohalides in drinking water in 1974, several investigators have detected genotoxic activity in drinking water concentrates. It is now widely admitted that the observed genotoxicity originates mainly from the reaction of chlorine on natural organic matter contained in the raw water, which leads to the formation of organohalogenated compounds.

The aim of this study is to show the benefit of three short-term assays for the evaluation of the genotoxic potency of organohalogenated compounds and of complex mixtures. In a wider context, the purpose is to identify a test or a battery of tests that can contribute to the control of natural and drinking water genotoxicity.

The three genotoxicity assays carried out during this work were (1) the SOS chromotest, a primary DNA damage *in vitro* assay on *Escherichia coli*, (2) the Ames-fluctuation test, a point mutation *in vitro* assay on *Salmonella typhimurium*, and (3) the newt micronucleus test, a chromosomal aberration *in vivo* assay on the amphibian *Pleurodeles waltl*. These assays display a valuable advantage: the water samples under study can be analyzed without concentration prior to testing. Thus, the different concentration procedures, which may modify the original genotoxicity of the water samples, are avoided.

A previous study on seven reference genotoxic chemicals had indicated that the SOS chromotest was never the most sensitive of the three tests (for a given chemical, the most sensitive assay is defined as the test which detects the lowest concentration inducing a significant genotoxic effect). On the contrary, the

1. Laboratoire de Toxicologie génétique, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France. Tél : 20 87 79 14. Fax : 20 96 73 10.
2. Département Toxicologie-Hydrologie-Hygiène, Faculté de Pharmacie, 3, rue du Professeur Laguesse, BP 83, 59006 Lille Cedex, France. Tél : 20 96 40 18. Fax : 20 96 40 18.

* Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 août 1996.

** Communication présentée au Colloque International du GRUTTEE « Les sous-produits de traitement et d'épuration des eaux », les 29 et 30 septembre 1994 à Poitiers.

Ames-fluctuation test proved to be the most sensitive for compounds showing *direct genotoxic activity*, and the *newt micronucleus test* the *most sensitive for chemicals with indirect genotoxic effects*. None of the assays was the most sensitive for every substance analyzed. These observations suggested the need to implement a battery of tests using several cell types, different metabolism systems and detecting several genotoxicity events. This earlier study also showed, in accord with several results in the literature, that the Ames-fluctuation test (in liquid medium) demonstrated a better sensitivity than the Ames test (in agar solid medium).

The first part of the present study involved testing the genotoxicity of 14 organo-halogenated compounds identified in drinking water samples or in chlorinated humic matter samples. The chemicals studied were four chlorinated and/or brominated trihalomethanes (trichloro-, bromodichloro-, chlorodibromo- and tribromomethane), five chlorinated or brominated acetonitriles with one, two or three halogens (monochloro-, dichloro-, trichloro-, monobromo- and dibromoacetonitrile) and five chlorinated propanones with one, two or three substitutions on one or two carbon atoms (monochloro-, 1,1-dichloro-, 1,3-dichloro-, 1,1,1-trichloro- and 1,1,3-trichloropropanone). Although the SOS chromotest was the most sensitive for 3 of the 14 substances analyzed, the results confirmed that this test was globally the least sensitive; the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test remained the most efficient assays. It is interesting to note that the Ames-fluctuation test appeared the most sensitive for all the chloropropanones tested and the newt micronucleus test, for all the haloacetonitriles analyzed. Moreover, several structure-activity relationships were demonstrated: the nature of the halogenated substituents (bromine or chlorine), the number and, above all, the position of chlorine atoms strongly influenced the genotoxicity of the organohalides studied.

In the second part of the work we analyzed the effects of complex mixtures containing several organohalogenated compounds: the three tests were performed on two chlorinated fulvic acids of different origin. Pornic fulvic acid was extracted from a surface water reservoir used to produce drinking water in Vendée (France) and Pinail fulvic acid came from a forest pond near Poitiers (France). The total organic carbon was about 1 g/l in the solution subjected to chlorination and the molar chlorination ratio was 1.5 Cl_2/C . The results showed the advantage of tests using bacteria: the Ames-fluctuation test was the only assay able to detect the genotoxicity of both chlorinated fulvic acids; the SOS chromotest detected the genotoxic effect of only one of the chlorinated fulvic acids (Pinail). In contrast, the newt micronucleus test did not show any genotoxicity of the chlorinated fulvic acids. However, it must be pointed out that, as insufficient fulvic acid was available, the genotoxic potency of these solutions on the newt was not tested under adequate conditions (e.g., sub-chronic concentrations were not studied). Nevertheless, the concentrations of fulvic acid analyzed were very close to those found in the aquatic environment.

The last part of the study attempted to approximate environmental and human exposure conditions: the three tests were performed on four water samples taken at several stages of a drinking water treatment plant. These samples were analyzed for genotoxicity in the three test systems without preconcentration. The plant studied is characterized by the following treatment steps: (1) coagulation-flocculation; (2) chlorination at 6 g Cl_2/m^3 ; (3) sand filtration; (4) ozonation at 1.9 g O_3/m^3 ; and (5) final chlorination at 1.4 g Cl_2/m^3 before sending the treated water into the distribution system. The four samples were taken: before any treatment (raw water, 10 to 13 mg total organic carbon per liter), between the sand layer filter and the ozonator (chlorinated water), after the ozonator (ozonated water) and at the end of the treatment process (treated water). The results obtained confirmed the advantage of the Ames-fluctuation

test, which was the only assay able to detect a genotoxic activity in the unconcentrated water samples studied. Regarding the influence of the different chemical treatments on the mutagenicity observed, it was demonstrated that the first chlorination step led to the formation of direct-acting mutagens. The treatment with ozone, at the rate used, did not significantly modify the mutagenicity of the samples that had previously been chlorinated. Similarly, the second chlorination step did not significantly increase the direct mutagenicity detected.

Practically, our study indicated that the Ames-fluctuation test is the only assay, among the three performed, that is able to contribute efficiently to the control of drinking water genotoxicity. In this context, the benefit of the SOS chromotest appears only in case of accidental pollution: indeed, it is the only test able to yield results within 24 hours. The implementation of the newt micronucleus test could be useful for the control of natural or drinking water genotoxicity in case of extensive pollution.

Key words : *genotoxicity, SOS chromotest, Ames-fluctuation test, newt micronucleus test, sensitivity, organohalogenated compounds, chlorination, water samples.*

RESUMÉ

Il est admis aujourd'hui que la génotoxicité identifiée dans les extraits d'eau potable provient principalement de l'action du chlore sur la matière organique naturelle qui donne naissance à des dérivés organohalogénés.

Dans le présent travail, nous avons comparé la sensibilité de trois essais de génotoxicité (SOS chromotest, test d'Ames-fluctuation et test micronoyau triton) lors de l'étude de composés organohalogénés, d'acides fulviques chlorés et d'échantillons d'eau (non concentrés) en cours de traitement de potabilisation.

Les composés organohalogénés étudiés sont 4 trihalométhanés, 5 acétonitriles et 5 chloropropanones identifiés dans l'eau potable ou dans des solutions de substances humiques chlorées. Les résultats obtenus révèlent que le SOS chromotest est globalement le moins sensible des trois essais et que le test d'Ames-fluctuation et le test micronoyau triton permettent généralement de détecter les plus faibles concentrations de composés génotoxiques. Les essais ont également permis de démontrer que la nature des substituants halogénés (brome ou chlore), le nombre et la position des atomes de chlore influencent notablement la génotoxicité des composés organohalogénés.

Toutefois, les résultats obtenus indiquent qu'aucun des trois tests réalisés n'est suffisant à lui seul pour détecter l'ensemble des produits génotoxiques. Ces observations confirment la nécessité de réaliser une batterie de tests qui mette en œuvre divers types cellulaires et différents systèmes de métabolisation, et détecte divers événements de génotoxicité.

Les travaux portant sur les solutions concentrées d'acides fulviques chlorés montrent l'intérêt des essais sur bactéries (particulièrement le test d'Ames-fluctuation) pour la détection rapide de l'activité génotoxique de ces solutions.

L'étude concernant les échantillons d'eau prélevés à différents niveaux d'une station de potabilisation, et analysés sans concentration préalable, indique que le test d'Ames-fluctuation est le seul capable de détecter une activité génotoxique dans les échantillons non concentrés étudiés. On montre, conformément à la littérature, que l'activité mutagène observée résulte de la chloration de l'eau.

Mots clés : *génotoxicité, SOS chromotest, test d'Ames-fluctuation, test micronoyau triton, sensibilité, composés organohalogénés, chloration, échantillons d'eau.*

1 – INTRODUCTION

Depuis la mise en évidence, au milieu des années 70, de la présence de trihalométhanes dans les eaux d'alimentation, de nombreuses études ont cherché à détecter une activité génotoxique dans des extraits d'eau potable. C'est en 1982 que l'équipe de BULL démontre pour la première fois, en utilisant le test d'Ames, l'existence d'une activité mutagène dans un concentrat d'eau d'alimentation (BULL *et al.*, 1982).

Les nombreux travaux qui ont suivi permettent aujourd'hui d'affirmer que l'activité génotoxique détectée résulte principalement de l'action du chlore sur la matière organique contenue dans l'eau brute. Il est intéressant de noter que cette génotoxicité est détectée à l'aide de tests *in vitro* et rarement au moyen de tests *in vivo*. On peut citer l'exemple du 3-chloro 4-(dichlorométhyl) 5-hydroxy(2(5H)-furanone (MX), un puissant mutagène retrouvé dans les eaux potables et issu de la chloration. Ce composé est parfois responsable de plus de 50 % de l'activité génotoxique des eaux (KRONBERG et VARTIAINEN, 1988). La génotoxicité du MX est détectée par la plupart des tests *in vitro* mais pas par les tests *in vivo* (BRUNBORG *et al.*, 1991), la métabolisation entraînant une diminution de son activité.

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'intérêt de trois tests, deux tests *in vitro* et un test *in vivo*, pour l'étude de la génotoxicité de composés organohalogénés et de mélanges complexes. De manière plus globale, le but est d'identifier un test ou une batterie de tests pouvant contribuer au contrôle de l'activité génotoxique des eaux en cours de traitement de potabilisation. Dans ce but, trois tests ont été mis en œuvre : le SOS chromotest, le test d'Ames-fluctuation et le test micronoyau triton.

Ces trois essais de génotoxicité peuvent être aisément adaptés à l'étude directe d'échantillons d'eau. On peut ainsi éviter de recourir aux diverses techniques de concentration (adsorption sur résine, extraction par solvants organiques) qui risquent de modifier l'activité génotoxique initiale de l'échantillon. Ces trois tests montrent une bonne sensibilité. Ils présentent d'autre part une diversité et une complémentarité, en terme de système biologique utilisé, d'événements génétiques mis en évidence (altération primaire de l'ADN, mutations géniques, aberrations chromosomiques) et de durée d'exposition au composé à analyser (LE CURIEUX *et al.*, 1993). Nous avons évalué la génotoxicité de 14 composés organohalogénés, puis celle de deux solutions d'acides fulviques chlorés. Nous avons ensuite recherché une activité génotoxique dans des échantillons d'eau prélevés à différents niveaux d'une station de potabilisation et testés sans concentration préalable.

2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Composés chimiques et échantillons étudiés

2.1.1 Composés organohalogénés

Les 14 composés organohalogénés étudiés ont déjà été identifiés dans des échantillons d'eau d'alimentation ou dans des solutions de substances humiques

chlorées. Il s'agit de 4 trihalométhanes chlorés et/ou bromés (trichloro-, bromodichloro-, chlorodibromo- et tribromométhane), de 5 acétonitriles chlorés ou bromés contenant un, deux ou trois atomes d'halogène (monochloro-, dichloro-, trichloro-, monobromo- et dibromoacétonitrile), et de 5 propanones chlorées contenant un, deux ou trois atomes de chlore positionnés sur un ou deux atomes de carbone (monochloro-, 1,1-dichloro-, 1,3-dichloro-, 1,1,1-trichloro- et 1,1,3-trichloropropanone). Les différentes caractéristiques de ces produits sont indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1 Caractéristiques des composés organohalogénés étudiés.

Table 1 Characteristics of the organohalogenated compounds studied.

Produits			Masse molaire (g/mol)	Densité (ρ = poudre)	Solubilité (mg/l H ₂ O à 20 °C)	Solvant utilisé	Fournisseur	Pureté (%)	N° cas
Nom	Abbréviation	Formule chimique							
Trihalométhanes									
Chloroforme	CF	CHCl ₃	119,38	1,49	8 000	DMSO	Fluka	IR ^a	67-66-3
Bromoforme	BF	CHBr ₃	252,75	2,82	-	DMSO	Fluka	97	75-25-2
Bromodichlorométhane	BDCM	BrCHCl ₂	163,83	1,98	-	DMSO	Fluka	> 98	75-27-4
Chlorodibromométhane	CDBM	ClCHBr ₂	208,3	2,45	3 200	DMSO	Fluka	> 97	124-48-1
Haloacétonitriles									
Monochloroacétonitrile	MCAN	ClCH ₂ CN	75,5	1,2	< 1	DMSO	Fluka	> 99	107-14-2
1,1-dichloroacétonitrile	DCAN	Cl ₂ CHCN	109,94	1,369	< 1	DMSO	Aldrich	98	3018-12-0
1,1,1-trichloroacétonitrile	TCAN	Cl ₃ CCN	144,39	1,44	< 1	DMSO	Aldrich	98	545-06-2
Monobromoacétonitrile	MBAN	BrCH ₂ CN	119,95	1,722	1	DMSO	Aldrich	97	590-17-0
Dibromoacétonitrile	DBAN	Br ₂ CHCN	198,84	2,33	< 10	DMSO	Merck	> 98	3252-43-5
Chloropropanones									
Monochloropropanone	MCP	CH ₃ COCH ₂ Cl	92,53	1,15	100 000	DMSO	Merck	> 95	78-95-5
1,1-dichloropropanone	1,1-DCP	CH ₃ COCHCl ₂	126,97	1,327	32 000	DMSO	Aldrich	98	513-88-2
1,3-dichloropropanone	1,3-DCP	ClCH ₂ COCH ₂ Cl	126,97	p	27 900	DMSO	Aldrich	> 95	534-07-6
1,1,1-Trichloropropanone	1,1,1-TCP	CH ₃ COCCl ₃	161,42	1,435	-	DMSO	Aldrich	97	918-00-3
1,1,3-Trichloropropanone	1,1,3-TCP	ClCH ₂ COCHCl ₂	161,42	1,53	-	DMSO	Merck	95	921-03-9

^a Spectre infra-rouge conforme.

2.1.2 Acides fulviques chlorés

Deux acides fulviques d'origine différente ont été étudiés :

- L'acide fulvique **Pornic** est extrait d'une eau de retenue située en amont d'une station de production d'eau potable (Pornic Gâtineau, Loire-Atlantique, France). L'analyse élémentaire de l'acide fulvique Pornic a révélé les pourcentages massiques suivants : C = 49 ; H = 4,9 ; N = 1,9 ; O = 37,5 ; S = 1,6 ; résidu calculé = 5,1.

- L'acide fulvique **Pinail** est extrait d'une eau de mare située en forêt, près de Poitiers (Vienne, France). L'analyse élémentaire de l'acide fulvique Pinail a révélé les pourcentages massiques suivants : C = 54,6 ; H = 4,8 ; N = 0,8 ; O = 37,7 ; résidu calculé (soufre compris) = 2,1.

Ces deux acides fulviques ont été extraits suivant une méthode très proche de celle de THURMAN et MALCOM (1981) utilisant des membranes tubulaires et des résines XAD8 (LEGUBE *et al.*, 1990). Les solutions d'acides fulviques (diluées dans de l'eau mQ) sont chlorées pendant 72 h (hypochlorite de sodium à 17,2 g Cl₂/l). Le chlore en excès est neutralisé par du thiosulfate de sodium à stoechiométrie.

Les caractéristiques principales de chacune des solutions d'acides fulviques ainsi que les paramètres de la chloration sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 Caractéristiques principales des solutions d'acides fulviques Pornic et Pinail et paramètres de la chloration.

Table 2 Main characteristics of the Pornic and Pinail fulvic acid solutions and parameters of the chlorination step.

Paramètres	Pornic	Pinail
COT ^a avant chloration (g C/l)	2,2	2
pH avant chloration	8	7
Taux de chloration (rapport molaire Cl ₂ /C)	1,3	1,5
Chloration (durée, température)	72 h, 8 °C	72 h, 6 °C
COT ^a après chloration (g C/l)	1,1	1
pH après chloration	3	3,8
Chlore résiduel (g Cl ₂ /litre)	2,5	2,7
Chlore libre après neutralisation	0	0
AOX ^b (éq. mg Cl ⁻ /litre)	388	386
THM ^c (CHCl ₃ en mg Cl ⁻ /litre)	88	81

^a Carbone organique total.

^b Organohalogénés adsorbables (méthode analytique : dosage par microcoulométrie sur appareil Dohrmann après adsorption sur charbon actif et pyrolyse à 800 °C).

^c Trihalométhanes (méthode analytique : chromatographie gazeuse après extraction par Head-Space, précision des mesures : 2 %).

L'analyse des valeurs présentées dans le tableau 2 indique que : (1) les deux solutions d'acides fulviques présentent initialement des concentrations en carbone organique total voisines ; (2) les paramètres de la chloration (durée, température et taux de chloration) sont très voisins ; (3) les solutions d'acides fulviques obtenues après chloration, sont presque identiques en ce qui concerne les paramètres organohalogénés totaux et les trihalométhanes.

2.1.3 Echantillons d'eau en cours de traitement de potabilisation

La station de production d'eau potable étudiée possède une filière de traitement pouvant être résumée comme suit :

- pompage de l'eau brute dans la retenue (eau très chargée en matière organique : 10 à 15 mg/l COT, pH de l'ordre de 6,8) ;
- envoi dans le décanteur où se produit la coagulation-floculation par ajout de sulfate d'aluminium (80 g/m³) et de polymère ou d'adjuvant de floculation (0,3 g/m³). De l'eau saturée en chaux est également ajoutée pour porter la valeur du pH autour de 6,5, ce qui améliore la floculation ;
- chloration intermédiaire à 6 g Cl₂/m³ (entre décanteur et filtre à sable) ;
- filtration sur sable calibré ;
- ozonation à 1,9 g O₃/m³ ;
- chloration finale 1,4 g Cl₂/m³ et ajout d'eau saturée en chaux pour augmenter le pH jusqu'au pH d'équilibre de 8,7-8,8 (eau ni trop agressive, ni trop entartrante).

Les échantillons ont été prélevés en quatre points différents de la filière de traitement. Ils ont donc subi un traitement chimique spécifique comme cela est résumé dans le tableau 3.

Deux campagnes de prélèvements ont été mises en œuvre à huit mois d'intervalle en 1992 : la première en mars (fin de l'hiver) et la seconde en novembre (milieu de l'automne). Les échantillons ont été prélevés dans des flacons en verre munis de bouchons en téflon et maintenus à 4 °C à l'abri de la lumière pendant la période de conservation.

Tableau 3 Traitements chimiques appliqués à chaque échantillon.**Table 3** Chemical treatment applied to each sample.

Echantillon	Décantation Coagulation-floculation	Chloration (6 g Cl ₂ /m ³)	Ozonation (1,9 g O ₃ /m ³)	Chloration finale (1,4 g Cl ₂ /m ³)
Eau brute	-	-	-	-
Eau chlorée	+	+	-	-
Eau ozonée	+	+	+	-
Eau traitée	+	+	+	+

Les tableaux 4 et 5 présentent les résultats des analyses et dosages effectués sur les échantillons au moment du prélèvement.

Tableau 4 pH et teneur en chlore (libre et total) des échantillons au moment de chaque prélèvement.**Table 4** pH and chlorine (free and total) of the samples when taken from the water treatment plant.

Prélèvements	Echantillons	pH ^a	Chlore (mg/l) ^a	
			Libre	Total
Mars 1992	Eau brute	6,83	0,00	0,00
	Eau chlorée	7,40	0,15	0,90
	Eau ozonée	-	-	-
	Eau traitée	8,90	0,35	0,55
Novembre 1992	Eau brute	6,57	0,00	0,00
	Eau chlorée	8,20	0,20	1,20
	Eau ozonée	-	0,25	1,40
	Eau traitée	8,45	0,40	0,70

^a Analyses effectuées à la station de potabilisation (méthode à la diéthyl p-phenyldiamine et à l'iode de potassium).
- Analyses non réalisées.

L'examen du tableau 4 permet de constater que : (1) le pH initialement en dessous de 7 est remonté au dessus de 8,4 en sortie de station ; (2) l'eau brute est exempte de chlore ; (3) l'eau traitée sort de la station avec un résiduel de chlore (chlore libre) supérieur à 0,3 mg/l.

L'analyse du tableau 5 permet plusieurs remarques :

- en novembre, l'eau brute est plus chargée en carbone organique total (COT) qu'en mars (cette valeur plus forte en novembre se retrouve tout au long de la filière de traitement, jusqu'à l'eau traitée). Cette observation peut avoir deux explications : en novembre (automne), la chute des feuilles conduit à l'accroissement de la teneur en matières humiques dans les eaux naturelles ; cette période peut d'autre part correspondre à un niveau bas de la retenue, ce qui aurait tendance à concentrer la matière organique ;

- les concentrations en trihalométhanes (THM) sont comparables entre les deux séries de prélèvements ;

- en revanche, les teneurs en organohalogénés adsorbables sur charbon actif (AOX) observées dans les échantillons de novembre sont supérieures de 75 à 110 % aux teneurs rencontrées dans les prélèvements de mars. Cet aspect peut être relié à la plus forte valeur en COT des échantillons de novembre ;

Tableau 5 Teneurs en carbone organique total et en organohalogénés de chacun des échantillons de la station de potabilisation étudiée, pour les prélèvements de mars et novembre.

Table 5 Amount of total organic carbon and organohalide concentrations of each sample taken from the drinking water plant, in March and in November.

Prélèvements	Echantillons	COT ^a (mg/l)	THM ^b (µg/l)				AOX ^c (µg/l)
			CHCl ₃	CHBrCl ₂	CHBr ₂ Cl	CHBr ₃	
Mars 1992	Eau brute	10,1	< 2	3	3	< 2	11
	Eau chlorée	6,1	32	18	9	< 2	171
	Eau ozonée	4,6	31	20	9	< 2	147
	Eau traitée	4,5	61	28	15	< 2	237
Novembre 1992	Eau brute	13,7	< 2	< 2	< 2	< 2	44
	Eau chlorée	6,5	35	18	5	< 2	322
	Eau ozonée	5,6	–	–	–	–	307
	Eau traitée	6,1	77	37	16	< 2	415

^a Carbone organique total (analysé par oxydation chimique en phase aqueuse au Na₂S₂O₈ puis dosage par microcoulométrie au Dohrmann).

^b Trihalométhanes (méthode analytique : chromatographie gazeuse après extraction par Head-Space ; précision : 2 µg/l).

^c Organohalogénés adsorbables sur charbon actif (dosage par microcoulométrie sur appareil Dohrmann après adsorption sur charbon actif et pyrolyse à 800 °C ; précision : 5 µg/l ou 2 %).

– Analyse non réalisée.

– la présence d'AOX dans l'eau brute (qui n'a subi aucun traitement) peut être expliquée par la présence de micropolluants dans l'eau de la retenue, suite à des rejets d'eaux usées.

2.2 Tests de génotoxicité

Pour les tests *in vitro* (SOS chromotest et test d'Ames-fluctuation), un système d'activation métabolique, constitué de la fraction S9 de foie de rats induits par l'Aroclor 1254, est utilisé. Ce système contient les microsomes, supports de l'activité des enzymes à cytochrome P450. Le test *in vivo* (test micronoyau triton) étant réalisé sur un organisme entier pourvu de son métabolisme propre, ne nécessite pas l'emploi de ce système d'activation métabolique. Dans chacun des trois tests, on inclut un témoin solvant dans lequel l'échantillon est remplacé par le solvant utilisé. Pour l'étude des acides fulviques, le témoin négatif est effectué avec les acides fulviques non chlorés lorsque les acides fulviques chlorés montraient une génotoxicité dans le test mis en œuvre. Pour les eaux en cours de potabilisation, le témoin négatif est constitué par de l'eau ultrapure. Un témoin positif est également systématiquement réalisé afin de contrôler la sensibilité des souches à un mutagène de référence.

2.2.1 SOS chromotest

Le SOS chromotest est un test *in vitro* d'altération primaire de l'ADN qui consiste en l'étude des propriétés génotoxiques éventuelles d'un produit en utilisant la réponse SOS d'*Escherichia coli* souche PQ37 (QUILLARDET *et al.*, 1982). Dans l'un des gènes SOS (le gène SfiA) de l'ADN de cette bactérie, a été inséré le gène LacZ responsable de la synthèse de la β-galactosidase. Quand un produit génotoxique altère l'ADN et qu'il déclenche la réponse SOS (induction des gènes

SOS à un haut niveau), on observe une induction de SfiA et de LacZ. Il y a donc synthèse de β -galactosidase dont il suffit de mesurer l'activité pour déterminer le niveau d'induction du mécanisme de réparation SOS. L'augmentation de l'activité de la β -galactosidase sera comparée à l'activité de la phosphatase alcaline, non inducible par les agents génotoxiques, qui constitue un contrôle de la synthèse protéique (indicateur de toxicité). C'est une mesure colorimétrique rapide et quantitative de l'action génotoxique d'un produit. L'essai a été réalisé avec et sans activation métabolique, selon le protocole de QUILLARDET et HOFNUNG (1985) et les adaptations de MARZIN *et al.* (1986). La mesure des activités enzymatiques a été réalisée selon XU *et al.* (1989). Ce test peut être effectué sous un délai de 24 h.

Pour une concentration c , l'activité génotoxique peut être exprimée par le rapport $R = \beta/p$ où β représente l'activité de la β -galactosidase (en mUI) et p , l'activité de la phosphatase alcaline (en mUI). Le facteur d'induction à la concentration c est défini par $I_c = R_c/R_0$ où R_0 est le rapport enzymatique mesuré pour le témoin solvant. Une substance est considérée comme génotoxique si les trois conditions suivantes sont remplies : (1) le facteur d'induction I est supérieur à 1,5, (2) l'activité de la β -galactosidase augmente par rapport au témoin et (3) il existe une relation dose-effet.

2.2.2 Test d'Ames-fluctuation

Le test d'Ames-fluctuation, test *in vitro* de mutation génique sur *Salmonella typhimurium*, est une adaptation en milieu liquide du test d'Ames (MARON et AMES, 1983). La souche *S. typhimurium* TA100 a été choisie pour l'ensemble de cette étude car elle est considérée comme la plus sensible aux composés mutagènes contenus dans les eaux et particulièrement aux sous-produits de chloration (LOPER, 1980 ; FORSTER *et al.*, 1983 ; HARRINGTON *et al.*, 1983 ; VARTIANEN and LIIMATAINEN, 1986 ; FIELDING and HORTH, 1987 ; MEIER, 1988). L'essai a été réalisé avec et sans activation métabolique suivant le protocole décrit par HUBBARD *et al.* (1984). Brièvement, le mélange (milieu pauvre en histidine (acide aminé indispensable) + produit à tester + souche bactérienne) est réparti dans des plaques de microtitration. Quand l'acide aminé est épuisé, seules les bactéries ayant subi une mutation au locus muté (zone de l'ADN correspondant au gène d'une des enzymes de synthèse de l'histidine) pourront se développer. Cette mutation peut être spontanée ou induite par le produit étudié. Dans tous les puits contenant au moins une bactérie mutée, le développement bactérien sera normal et le milieu aura tendance à se troubler. Parallèlement à cette opacification, le développement bactérien s'accompagne d'une acidification du milieu : en effet, les bactéries rejettent dans le milieu des composés acides issus de la dégradation du glucose (source de carbone). Il suffit ensuite d'ajouter dans tous les puits un indicateur de pH (bleu de bromothymol par exemple). Quand il y a eu développement bactérien, l'indicateur vire au jaune (pH compris entre 5,2 et 6,5). Les puits ne contenant aucun révertant (donc aucune croissance bactérienne) restent à un pH voisin de 7 et l'indicateur coloré est vert. Les puits de couleur jaune sont comptés comme positifs. Tout puits ayant une coloration douteuse (vert-jaune) est compté négatif. Ce test nécessite un délai de 4 à 5 jours.

Un produit sera considéré comme mutagène s'il provoque une augmentation significative du nombre de puits positifs par rapport au nombre de puits positifs du lot témoin (Test statistique du χ^2 , GREEN *et al.*, 1976).

2.2.3 Test micronoyau triton

Le test micronoyau triton est un test *in vivo* d'aberration chromosomique sur amphibien *Pleurodeles waltl* (JAYLET *et al.*, 1986). Il fait l'objet d'une norme AFNOR depuis 1992 (AFNOR, 1992). Les larves au stade 53 de la table de développement de GALLIEN et DUROCHER (1957) sont exposées pendant 12 j à trois concentrations différentes du produit à tester (le milieu est renouvelé quotidiennement). En fin de traitement, le sang de chaque larve est prélevé pour réaliser un frottis. Les lames (15 à 20 par lot) sont fixées et colorées à l'Hémalun acide de Masson. Pour chaque lame, le nombre d'érythrocytes micronucléés est compté sur un échantillon de 1 000 érythrocytes. Le calcul statistique, basé sur les médianes et les quartiles, est réalisé selon la méthode de MACGILL *et al.* (1978).

Un composé est considéré comme génotoxique si (1) une augmentation significative du nombre d'érythrocytes micronucléés par rapport au lot témoin est observée et (2) la médiane pour le groupe traité est au moins égale au double de la médiane du lot témoin. Dans le cas où la seconde condition n'est pas remplie, le composé est considéré comme faiblement positif.

3 – RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Génotoxicité des composés organohalogénés

Les résultats du SOS chromotest, du test d'Ames-fluctuation et du test micronoyau triton sur les 14 composés organohalogénés étudiés sont résumés sur le tableau 6.

Les résultats obtenus indiquent que tous les composés étudiés sauf le chloroforme montrent une activité génotoxique dans au moins l'un des tests. Le SOS chromotest permet de détecter la génotoxicité de 9 produits, le test d'Ames-fluctuation, celle de 10 substances et le test micronoyau triton, celle de 9 composés. Pour un composé donné, on définit le test le plus sensible comme étant celui qui détecte la plus faible concentration induisant une activité génotoxique. Le SOS chromotest est le plus sensible pour 3 substances, le test d'Ames-fluctuation pour 5 composés et le test micronoyau triton pour 7 produits. Le SOS chromotest apparaît donc globalement comme étant le moins sensible des trois essais. Ce point corrobore les conclusions d'une étude antérieure portant sur sept composés génotoxiques de référence (LE CURIEUX *et al.*, 1993).

Il est intéressant de noter que chaque test semble être particulièrement performant pour la détection d'une famille chimique donnée. Ainsi, le SOS chromotest révèle une bonne aptitude à détecter les trihalométhanes. Cet aspect est encore plus nettement observable pour les deux autres tests : le test d'Ames-fluctuation est le plus apte à détecter les 5 chloropropanones étudiées et le test micronoyau triton, les 5 haloacétonitriles testés.

Les résultats obtenus permettent également de remarquer l'existence de corrélations entre la structure et l'activité génotoxique des composés organohalogénés étudiés. Ces relations structure-activité sont observables au niveau de la nature du substituant halogéné (brome ou chlore), et au niveau de la position des atomes de chlore. La corrélation entre la génotoxicité observée et le nombre d'atomes de chlore semble beaucoup moins nette.

Tableau 6 Résumé des résultats obtenus dans les trois tests de génotoxicité à partir des trihalométhanes, des haloacétonitriles et des chloropropanones.**Table 6** Summary of the results obtained in the three genotoxicity tests with the trihalomethanes, haloacetonitriles and chloropropanones.

Produits chimiques		Concentrations testées (µg/ml)	Tests ^a		
			SOS Chromotest	Ames-fluctuation	Micronoyau triton ^b
Trihalométhanes					
CF	S9 -	10-10 000 *	-	-	-
	S9 +	10-10 000	-	-	-(1)
BDCM	S9 -	1-10 000	+ 366	-	-
	S9 +	1-10 000	+ 18	-	+ 153 ⁽²⁾
CBDM	S9 -	1-10 000	+ 144	-	-
	S9 +	1-10 000	+ 48	-	-(2)
BF	S9 -	3-10 000	+ 237	+ 1 187	-
	S9 +	3-10 000	+ 40	-	+ 10 ⁽²⁾
Haloacétonitriles					
MCAN	S9 -	1-1 000	-	-	-
	S9 +	1-1 000	-	+ 397	+ 17
DCAN	S9 -	0,3-1 000	-	+ 91	-
	S9 +	0,3-1 000	+ 455	+ 2 729	+ 2
TCAN	S9 -	0,01-1 000	-	+ 208	-
	S9 +	0,01-1 000	-	-	+ 1 ⁽²⁾
MBAN	S9 -	0,01-1 000	-	-	-
	S9 +	0,01-1 000	-	+ 50	+ 1
DBAN	S9 -	0,03-1 000	+ 50	-	-
	S9 +	0,03-1 000	-	-	+ 1
Chloropropanones					
MCP	S9 -	0,01-3 000	-	-	-
	S9 +	0,01-3 000	-	+ 65	-
1,1-DCP	S9 -	0,03-1 000	+ 236	+ 79	-
	S9 +	0,03-1 000	-	-	-
1,3-DCP	S9 -	0,001-100	+ 2	+ 0,2	-
	S9 +	0,001-100	+ 158	-	+ 0,2
1,1,1-TCP	S9 -	3-10 000	+ 1 859	+ 620	-
	S9 +	3-10 000	-	-	-
1,1,3-TCP	S9 -	0,03-3 000	+ 2	+ 2	-
	S9 +	0,03-3 000	+ 124	-	+ 6

^a + : activité génotoxique significative (la concentration génotoxique la plus faible est indiquée en µmole/litre dans l'essai).

- : aucune activité génotoxique détectable.

^b Références : (1) Gauthier, 1989 ; (2) Gauthier, 1992.

En ce qui concerne la nature de l'atome d'halogène, on peut noter que, dans le SOS chromotest, seuls les trihalométhanes bromés sont positifs et le dibromoacétonitrile est plus génotoxique que le dichloroacétonitrile. Dans le test d'Ames-fluctuation, seul le trihalométhane tribromé est positif et le monobromoacétonitrile est plus génotoxique que le monochloroacétonitrile. Le test micronoyau triton indique que le monobromoacétonitrile et le dibromoacétonitrile sont, respectivement, plus génotoxiques que le monochloroacétonitrile et le dichloroacétonitrile : dans les deux cas (substitution par un ou deux atomes

d'halogène) la concentration génotoxique minimale est plus faible et le rapport (fréquence maximale de micronoyaux dans les lots traités/fréquence de micronoyaux du lot témoin) est plus fort pour l'acétonitrile bromé. Ces différentes observations semblent indiquer que l'atome de brome confère une activité génotoxique plus forte que l'atome de chlore, la seule exception étant le dichloroacétonitrile positif dans le test d'Ames-fluctuation alors que le dibromoacétonitrile est négatif.

Une autre relation structure-activité apparaît au niveau de la position des atomes de chlore dans le groupe des chloropropanones. L'examen des résultats concernant les propanones possédant deux ou trois atomes de chlore met en évidence que, dans le SOS chromotest, la 1,3-DCP est 100 fois plus génotoxique que la 1,1-DCP et la 1,1,3-TCP est 1 000 fois plus active que la 1,1,1-TCP. La même tendance est observée pour le test d'Ames-fluctuation : la 1,3-DCP est 333 fois plus mutagène que la 1,1-DCP et la 1,1,3-TCP est également 333 fois plus mutagène que la 1,1,1-TCP. C'est toutefois le test micronoyau triton qui aboutit au résultat le plus remarquable : la 1,3-DCP induit la formation de micronoyaux alors que ce n'est pas le cas de la 1,1-DCP, et la 1,1,3-TCP est clastogène tandis que la 1,1,1-TCP ne l'est pas. La position des atomes de chlore influence donc notablement la génotoxicité de propanones polychlorées, la présence des deux atomes de carbone chlorés induisant une activité nettement plus élevée que celle d'un seul atome de carbone chloré.

Comme l'ont proposé MEIER *et al.* (1985), cette relation structure-activité peut être expliquée par le fait que les propanones portant un chlore sur chaque carbone terminal (la 1,3-DCP ou la 1,1,3-TCP) constituent des agents génotoxiques poly- ou bifonctionnels : ces molécules peuvent en effet produire, par réactions de substitution, l'alkylation de l'ADN au niveau de deux sites nucléophiles (LÉONARD, 1990). L'action de la 1,3-DCP et de la 1,1,3-TCP aboutirait ainsi à des pontages intra ou interbrins qui constituent des lésions beaucoup plus graves que les simples alkylations de bases induites par la 1,1,1-TCP ou la 1,1-DCP (agents génotoxiques monofonctionnels). La MCP est une propanone possédant un atome de chlore sur le carbone 1. Le fait que ce composé n'induisse pas d'activité génotoxique dans le test micronoyau triton (comme la 1,1-DCP et la 1,1,1-TCP) constitue un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse suivante : les propanones substituées sur un seul carbone (MCP ou 1,1-DCP ou 1,1,1 TCP) constituent des agents monofonctionnels qui sont moins actifs que des agents poly- ou bifonctionnels.

En ce qui concerne la relation entre le nombre d'atomes de chlore et l'activité génotoxique détectée, seule une analyse cloisonnée des résultats peut faire apparaître certaines corrélations. Dans le test micronoyau triton, l'activité clastogène des acétonitriles chlorés (monochloro-, dichloro- et trichloroacétonitrile) augmente avec le nombre d'atomes de chlore. A l'inverse, dans le test d'Ames-fluctuation, l'activité mutagène des propanones chlorées sur un atome de carbone (monochloro-, 1,1-dichloro- et 1,1,1-trichloropropanone) diminue quand le nombre d'atome de chlore augmente. Dans le test d'Ames-fluctuation, le nombre d'atome de chlore semble être sans influence sur la série des acétonitriles. Ces observations indiquent que l'influence du nombre d'atomes de chlore varie selon la famille chimique et le test mis en œuvre. Aucune conclusion nette ne peut être tirée.

3.2 Génotoxicité des acides fulviques chlorés

Le tableau 7 résume les résultats obtenus par les trois tests mis en œuvre à partir des solutions d'acides fulviques chlorés.

Pour le **test micronoyau triton**, les résultats obtenus après chloration des acides fulviques Pornic et Pinail sont très cohérents : ces deux acides fulviques n'induisent, après chloration, aucune augmentation significative du taux d'érythrocytes à micronoyaux chez le triton *Pleurodeles waltl*, aux concentrations testées. Ceci n'exclut pas la possibilité de trouver une activité clastogène des acides fulviques chlorés pour des concentrations plus élevées : le test préliminaire de toxicité n'ayant pas pu être réalisé (quantité limitée de substance), les concentrations plus élevées peuvent être compatibles avec la vie des larves. Cette étude sur le triton aboutit à des résultats en accord avec d'autres études, à savoir que les substances humiques après chloration n'induisent généralement pas d'action génotoxique après exposition *in vivo*. Par exemple, MEIER et BULL (1985) ont démontré qu'une solution concentrée (1 g/l) d'acide humique chloré ne conduit pas à la formation de micronoyaux dans les cellules de moelle osseuse de souris après gavage.

Tableau 7 Résumé des résultats obtenus dans les trois tests de génotoxicité à partir des deux solutions d'acides fulviques chlorés.

Table 7 Summary of the results obtained in the three genotoxicity tests with the two solutions of chlorinated fulvic acids.

Acide fulvique	Tests ^a		
	SOS Chromotest	Ames-fluctuation	Micronoyau triton
Pornic	S9 -	-	+ 37
	S9 +	-	-
Concentrations testées	0,12-60	0,36-225 ^b	0,38-3,8
Pinail	S9 -	-	+ 20
	S9 +	+ 10	-
Concentrations testées	0,6-200	0,6-20	7,5-1,5

^a + : activité génotoxique significative (la plus faible concentration génotoxique est indiquée en µg/ml dans l'essai).

- : aucune activité génotoxique détectable.

^b Témoin négatif (acide fulvique non chloré µg/ml) : aucune activité génotoxique détectée pour cette gamme de concentration.

En ce qui concerne le **test d'Ames-fluctuation**, les témoins réalisés sur les solutions d'acides fulviques Pornic non chlorés ne montrent aucune activité toxique ou génotoxique avec ou sans S9 comparés à la même gamme de concentrations des échantillons chlorés. Les témoins équivalents n'ont pu être effectués sur l'acide fulvique Pinail compte tenu de la faible taille de l'échantillon de cet acide. Les deux acides fulviques chlorés provoquent une activité mutagène directe sur la souche TA100 mais aucune activité mutagène indirecte (en présence de S9mix). LEGUBE *et al.* (1990) ont étudié les principaux composés issus de la chloration de l'acide fulvique Pinail. Parmi les produits identifiés, on retrouve l'acide dichloroacétique, l'acide trichloroacétique et la 1,1,1-trichloropropanone : chacun de ces composés a montré une activité mutagène directe dans le test d'Ames-fluctuation sur la souche TA100 (résultats obtenus au laboratoire et non encore publiés). Le résultat concernant l'acide fulvique Pinail chloré est conforme à la

littérature décrivant la mutagénicité des substances humiques chlorées sur Salmonelles (article de synthèse de MEIER, 1988 ; FIELDING et HORTH, 1987 ; AGARWAL et NETON, 1989). Signalons que la majorité des travaux cités sont menés en utilisant le test d'Ames en milieu solide et seuls quelques auteurs mettent en œuvre l'adaptation en milieu liquide, le test d'Ames-fluctuation (KOWBEL *et al.*, 1984, 1986 ; BECHER *et al.*, 1985).

L'analyse des résultats du **SOS chromotest** fait apparaître une différence entre les deux acides fulviques chlorés : Pinail manifeste une activité génotoxique en présence de S9mix tandis que ce n'est pas le cas pour Pornic ; aucun des deux acides fulviques chlorés ne provoque d'altération primaire de l'ADN sur *E. coli* en absence de S9mix. Afin de s'assurer de ces résultats, il serait souhaitable de tester, en présence de S9mix, des concentrations plus élevées pour l'acide fulvique chloré Pornic. Toutefois, cette différence peut trouver une explication dans le fait que les deux acides fulviques sont d'origines différentes, l'un provenant d'une eau de barrage (Pornic) et l'autre, d'une eau de mare (Pinail).

POMMERY *et al.* (1989) ont mis en évidence, au moyen du SOS chromotest en l'absence d'activation métabolique, une activité génotoxique nette de plusieurs acides fulviques (dont l'acide fulvique Pinail) chlorés à des taux proches de celui choisi pour notre étude. Les résultats de cette étude ne sont pas en accord avec ceux obtenus dans nos travaux, mais cette discordance peut être vraisemblablement expliquée par le fait que l'étude de POMMERY *et al.* (1989) portait sur des concentrations non compatibles avec la vie normale des cellules (inhibant de manière significative la synthèse protéique). Cette même étude ne détecte aucune activité génotoxique pour le témoin acide fulvique Pinail non chloré à la concentration de 0,5 mg C/l.

Il convient de noter que les concentrations minimales manifestant une activité génotoxique par le SOS chromotest et le test d'Ames-fluctuation, de l'ordre de 10 à 100 µgC/ml soit 10 à 100 mg de carbone par litre, ne sont que très rarement rencontrées dans des eaux naturelles. En effet, les eaux naturelles les plus chargées en matière organique dépassent rarement 10 à 15 mg COD/litre (LEGUBE *et al.*, 1990).

Les résultats obtenus montrent que, pour la détection de l'activité génotoxique de l'acide fulvique Pornic après chloration, le test d'Ames-fluctuation est le plus sensible. En revanche, le SOS chromotest est aussi sensible que le test d'Ames-fluctuation pour la mise en évidence de l'effet génotoxique de l'acide fulvique Pinail après chloration.

3.3 Génotoxicité des échantillons d'eau en cours de potabilisation

Les trois tests de génotoxicité ont été réalisés sans concentration préalable des échantillons. Lors des deux campagnes de prélèvement, aucun échantillon n'a démontré d'effets génotoxiques dans le SOS chromotest (avec ou sans S9mix) et le test micronoyau triton. Seul le test d'Ames-fluctuation a permis de détecter une activité mutagène dans les échantillons. Les résultats de mutagénicité obtenus lors des deux séries de prélèvements sont tout à fait semblables d'une campagne à l'autre et reportés sur le tableau 8.

Au cours des deux campagnes de prélèvement : (1) aucun échantillon n'a montré d'activité génotoxique dans le SOS chromotest ou le test micronoyau triton ; (2) tous les échantillons (sauf l'eau brute) ont manifesté dans le test d'Ames-fluctuation un effet mutagène en présence et en absence de S9mix, l'eau brute se révélant mutagène uniquement en présence de S9mix.

Tableau 8 Résultats du test d'Ames-fluctuation à partir des quatre échantillons d'eau prélevés en Mars et en Novembre.**Table 8** Results of the Ames-fluctuation test with the four water samples taken in March and in November.

Echantillons d'eau	Dilution (% d'échantillon)	S9	Nombre de puits positifs (/96)	
			Mars	Novembre
Témoin	0	-	5	5
	10	-	8	6
Brute	33	-	4	5
	100	-	7	7
	10	-	5	4
Chlorée	33	-	7	17 ^b
	100	-	17 ^b	33 ^b
	10	-	7	8
Ozonée	33	-	10	21 ^b
	100	-	17 ^b	36 ^b
	10	-	6	10
Traitée	33	-	11	11
	100	-	19 ^b	33 ^b
	Témoin	0	+	19
Brute	10	+	17	11
	33	+	34 ^a	46 ^b
	100	+	37 ^b	61 ^b
Chlorée	10	+	19	22
	33	+	36 ^b	96 ^b
	100	+	23 ^c	60 ^{b,c}
Ozonée	10	+	17	17
	33	+	33 ^a	31
	100	+	26 ^c	28 ^c
Traitée	10	+	27	17
	33	+	32 ^a	33 ^a
	100	+	27 ^c	20 ^c

^a Activité mutagène avec $p < 0,05$.

^b Activité mutagène avec $p < 0,01$.

^c Activité bactériostatique.

Les résultats obtenus avec le **SOS chromotest** sont négatifs en présence et en absence du système d'activation métabolique : aucun des échantillons testés ne contient de substances provoquant (directement ou après transformation par les enzymes du S9mix) l'induction du système de réparation SOS chez *E. coli*. Aucune publication ne fait état de travaux utilisant le SOS chromotest dans le cadre de l'étude de l'activité génotoxique d'eaux potables ou en cours de potabilisation sans concentration préalable des échantillons. Le SOS chromotest a toutefois été utilisé par BOURBIGOT *et al.* (1986) pour mettre en évidence une altération primaire de l'ADN induite par des extraits d'eau potable. La méthode d'extraction utilisée par ces auteurs, le passage sur résines XAD-2 et XAD-7 suivi d'une élution avec un mélange méthanol-éther, permettait de concentrer 4 000 fois les échantillons d'eau potable étudiés. Les concentrations en composés génotoxiques rencontrées dans ces extraits étaient certainement assez fortes pour provoquer des altérations primaires de l'ADN chez *E. coli*.

Dans le **test micronoyau triton**, le nombre d'érythrocytes à micronoyaux n'est pas augmenté de manière significative après une exposition de 12 jours à chacun des échantillons d'eau collectés en mars ou en novembre : l'eau brute, l'eau chlorée, l'eau ozonée et l'eau traitée ne contiennent aucune substance manifestant une activité clastogène sur les érythrocytes de larves de triton. Il est également intéressant de constater qu'au moment des prélèvements de mars et de novembre, l'eau traitée contenait un taux de chlore libre de l'ordre de 0,4 mg/l. Une telle teneur en chlore libre avait provoqué la mort des larves en quelques heures dans une étude précédente (GAUTHIER *et al.*, 1989). Aucune mortalité particulière par rapport au témoin n'ayant été observée, nous pouvons raisonnablement penser que la concentration en chlore libre a considérablement diminué au cours du transport (24 h) et/ou de la conservation de l'échantillon pendant le test (12 jours). De plus, l'eau après chloration n'ayant manifesté aucune action clastogène sur les larves de triton, nous pouvons déduire que ce taux de chlore libre a diminué jusqu'à une valeur inférieure ou égale à 0,12 mg/l (valeur maximale ne provoquant aucune activité clastogène selon GAUTHIER *et al.*, 1989).

Plusieurs études avaient démontré l'intérêt du test micronoyau triton pour la détection de l'activité clastogène retrouvée dans l'eau potable (JAYLET *et al.*, 1987) ou dans des eaux ayant subi divers traitements de désinfection (GAUTHIER *et al.*, 1990). L'eau de la station de potabilisation étudiée a déjà fait l'objet de travaux concernant leur éventuel effet clastogène sur larve de triton : GAUTHIER (1992) a montré que l'eau brute, non chlorée, ainsi que l'eau brute chlorée au laboratoire à 2,5-5 ou 10 mg/l n'induisent pas la formation de micronoyaux dans les érythrocytes de larves de triton. Nos travaux corroborent ces résultats et montrent que si des composés génotoxiques sont formés après chloration et ozonation d'une eau riche en matière humique, ces substances ont une durée de vie très courte et/ou sont présentes à des concentrations relativement faibles.

La génotoxicité des mélanges complexes que constituent les substances humiques chlorées a été étudiée de manière très limitée (UBON et CHIPMAN, 1994 ; NUNN et CHIPMAN, 1994). La majorité des travaux s'est en effet concentrée sur les effets génotoxiques de sous-produits de chloration isolés et bien identifiés. Le 3-chloro-4(dichlorométhyl)-5-hydroxy-2(5H)furanone ou MX fait partie de ces sous-produits formés lors de la chloration d'eau contenant des substances humiques (HEMMING *et al.*, 1986 ; MEIER *et al.*, 1987a). Il est retrouvé dans l'eau potable à des concentrations pouvant atteindre 60 ng/l (HEMMING *et al.*, 1986 ; MEIER *et al.*, 1987 a et b ; LALONDE *et al.*, 1991). Ce composé est un puissant mutagène qui est généralement responsable de 30 à 60 % de l'ensemble de l'activité mutagène directe de l'eau potable sur *Salmonella typhimurium* (KRONBERG et VARTIAINEN, 1988 ; KRONBERG *et al.*, 1988). Les résultats négatifs obtenus avec le test micronoyau triton sur les échantillons d'eau en cours de potabilisation sont en accord avec la tendance généralement décrite dans la littérature concernant les effets génotoxiques du MX *in vivo* : ce composé n'induit pas de cassures monobrins de l'ADN dans le tractus gastro-intestinal, le foie, le rein, les poumons, les testicules, la vessie ou la moelle osseuse de rat (BRUNBORG *et al.*, 1991), ne démontre aucune activité clastogène dans le test micronoyau sur moelle osseuse de souris (MEIER *et al.*, 1987b ; TIKKANEN et KRONBERG, 1990) ou dans le test micronoyau sur érythrocytes de triton (GAUTHIER, 1992). Quelques études plus récentes ont toutefois permis de démontrer l'existence d'une faible activité génotoxique du MX *in vivo* (FURIHATA *et al.*, 1992 ; JANSSON *et al.*, 1993). Comme le MX, les sous-produits de chloration de substances humiques seraient facilement détoxifiés *in vivo*.

Les résultats du **test d'Ames-fluctuation** sans activation métabolique montrent que l'eau chlorée, l'eau ozonée et l'eau traitée ont une activité mutagène directe sur *Salmonella* souche TA100. Seule l'eau brute (qui n'a pas subi de chloration) ne manifeste pas d'activité mutagène directe. L'action du chlore ou la présence de composés organohalogénés semble être à l'origine de l'activité mutagène directe des échantillons. L'activité mutagène directe produite par la chloration intermédiaire n'est pas modifiée par l'étape d'ozonation ni par la seconde phase de chloration (chloration finale). Par ailleurs, nos résultats sont conformes à ceux de la littérature à savoir que sans S9mix, on retrouve une activité mutagène dans tous les échantillons ayant subi un traitement par le chlore (KOOL et VAN KREIJL, 1984 ; FIELDING et HORTH, 1986 ; MEIER, 1988). Il est maintenant largement admis que l'activité mutagène directe est due à la formation, au cours de la chloration de la matière organique présente dans l'eau, de composés organohalogénés. L'analyse des résultats du dosage des AOX (organohalogénés adsorbables sur charbon actif, Tableau 5) dans les 4 échantillons permet d'appuyer l'hypothèse selon laquelle l'activité mutagène est une conséquence de la présence de substances organohalogénées : (1) une plus forte concentration en AOX aboutit à une plus forte activité génotoxique directe (pour l'eau chlorée, l'eau ozonée, l'eau traitée) et (2) l'eau brute qui ne contient pas (ou très peu) d'AOX n'est pas mutagène.

Dans le test d'Ames-fluctuation réalisé en présence du système d'activation métabolique, l'eau brute, l'eau chlorée, l'eau ozonée et l'eau traitée montrent une activité mutagène sur la souche TA 100 : ces trois échantillons contiennent un ou des composés qui, après transformation par les enzymes hépatiques du rat (S9), provoquent l'apparition de mutations de type substitution de paire de bases. Ces composés à effet mutagène indirect sont présents dans l'eau brute. Ils ne seraient donc pas issus de la chloration et pourraient être d'origine naturelle. Signalons que pour les 3 échantillons ayant subi une chloration (eau chlorée, eau ozonée et eau traitée) nous observons une activité bactériostatique (ralentissement de la croissance bactérienne du à une certaine toxicité de l'échantillon) sur les Salmonelles TA 100. Cette activité bactériostatique n'est pas retrouvée dans le cas de l'eau brute ni quand les échantillons chlorés sont étudiés en absence de S9mix : l'effet bactériostatique serait lié à la biotransformation, par les enzymes hépatiques, de composés issus de la chloration.

4 - CONCLUSION

Dans ce travail nous avons mis en œuvre trois tests, le SOS chromotest, le test d'Ames-fluctuation et le test micronoyau triton, pour évaluer l'activité génotoxique de composés organohalogénés, de solutions d'acides fulviques chlorées et d'échantillons d'eau en cours de traitement de potabilisation. L'étude concernant 14 composés organohalogénés, identifiés comme étant des sous-produits de chloration, a permis de démontrer la complémentarité des trois tests ainsi que leur intérêt pour la mise en évidence de relations structure-activité. Le test d'Ames-fluctuation a montré sa valeur pour la recherche de l'activité mutagène de solutions d'acides fulviques chlorées puisque au moins avec l'un des acides

fulviques testé la chloration a provoqué l'apparition d'une activité mutagène. L'étude concernant quatre échantillons d'eau prélevés à différents niveaux d'une station de potabilisation a confirmé l'intérêt du test d'Ames-fluctuation qui est le seul, parmi les trois mis en œuvre, capable de détecter l'activité génotoxique de ces échantillons d'eau testés sans concentration préalable.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude permet de contribuer à la validation des trois tests mis en œuvre, pour la surveillance des milieux hydriques. Sur le plan pratique, les résultats obtenus semblent indiquer que le test d'Ames-fluctuation apparaît comme l'un des seuls à pouvoir contribuer de manière efficace au contrôle de l'activité génotoxique de l'eau potable. Des essais complémentaires seraient toutefois à pratiquer sur d'autres sous-produits de chloration, substances humiques et eaux en cours de potabilisation pour confirmer l'intérêt du test d'Ames-fluctuation pour ce type de contrôle. Dans ce cadre, le SOS chromotest semble être adapté aux cas de pollutions accidentelles du fait des résultats obtenus en moins de 24 h. Le test micronoyau triton indépendamment de sa lourdeur, mérite d'être retenu notamment dans les cas difficiles (pollution diffuse ou prolongée) pour l'évaluation de l'activité clastogène des eaux d'alimentation.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée dans le cadre du Groupe d'Etude Scientifique sur le Test Micronoyau Triton (GESTMINT) et financée en partie par la Lyonnaise des Eaux, la Compagnie Générale des Eaux et la SAUR. Nous souhaitons remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille, du Département Toxicologie-Hydrologie-Hygiène de la Faculté de Pharmacie de Lille et du Laboratoire de Chimie de l'Eau et des Nuisances de l'ESIP de Poitiers pour leur aide et leur soutien. Nos remerciements s'adressent également à Monsieur A. PHILIPPO du Service des Eaux de l'Institut Pasteur de Lille et à Madame P. RACAUD de la SAUR pour leur contribution à ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR, 1992. Essai des eaux : évaluation de la génotoxicité au moyen de larves de batraciens (*Pleurodeles waltli*). Association Française de Normalisation (AFNOR), T 90-325, Mai 1992.
- AGARWAL S., NETON J., 1989. Mutagenicity and alkylating activity of the aqueous chlorination products of humic acid and their molecular weight fractions. *The Science of the Total Environment*, 79, 69-83.
- BECHER G., CARLBERG G.E., GJESSING E.T., HONGSLO J.K., MONARCA S., 1985. High-performance size exclusion chromatography of chlorinated natural humic water and mutagenicity studies using the microscale fluctuated assay. *Environ. Sci. Technol.*, 19, 422-426.

- BOURBIGOT M.M., HASCOET M.C., LEVI Y., ERB F., POMMERY N., 1986. The role of ozone and granular activated carbon in the removal of mutagenic compounds. *Environ. Health Perspect.*, 69, 159-163.
- BRUNBORG G., HOLMET J., SODERLUND E., HONGSLO J., VARTIAINEN T., LÖTJONEN S., BECHER G., 1991. Genotoxic effects of the drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone (MX) in mammalian cells *in vitro* and in rats *in vivo*. *Mutation Res.*, 260, 55-64.
- BULL R.J., ROBINSON M., MEIER J.R., STOBBER J., 1982. Use of biological assay systems to assess the relative carcinogenic hazards of disinfection by-products. *Fundamental and Applied Toxicology*, 5(6), 1065-1074.
- FIELDING M., HORTH H., 1986. Formation of mutagens and chemicals during water treatment chlorination. *Water Supply*, 4, 103-126.
- FIELDING M., HORTH H., 1987. The formation and removal of chemical mutagens during drinking water treatment. Paper for the 5th European Symposium - Organic pollutants in aquatic environment, Rome 20-22 October 1987.
- FORSTER R., GREEN M.H.L., GWILLIAM R.D., PRIESTLEY A., BRIDGES E., 1983. Use of the fluctuation test to detect mutagenic activity in unconcentrated samples of drinking waters in the United Kingdom. In: Jolley, Brungs and Cumming (Eds). *Water Chlorination: Envir. Impact and Health Effects*, vol. 4, Ann Arbor Sc. Pub. Ann Arbor, MI, 1189-1197.
- FURIHATA C., YAMASHITA Y., KINAE N., MATSUSHIMA T., 1992. Genotoxicity and cell proliferative activity of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in rat glandular stomach. *Water Sci. Technol.*, 25, 341-345.
- GALLIEN ET DUROCHER, 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltii* Michah. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 91, 97-114.
- GAUTHIER L., 1989. Etude du pouvoir génotoxique des eaux de surface, potables ou en cours de traitement, par la formation de micronoyaux chez le triton : *Pleurodeles waltii*. Thèse de 3e cycle, Université Paul Sabatier de Toulouse.
- GAUTHIER L., LEVI Y., JAYLET A., 1989. Evaluation of the clastogenicity of water treated with sodium hypochlorite or monochloramine using a micronucleus test in newt larvae (*Pleurodeles waltii*). *Mutagenesis*, vol. 4, n° 3, 170-173.
- GAUTHIER L., LEVI Y., JAYLET A., 1990. Application du test micronoyau triton à l'étude directe de la génotoxicité des procédés de désinfection des eaux. *J. Fran. d'Hydrologie*, 21(1), 147-157.
- GAUTHIER L., 1992. Rapport final présenté à la réunion du Groupement d'Etudes Scientifiques du Test Micronoyau triton. Paris, le 23 Octobre 1992.
- GREEN M.H.L., MURIEL W.J., BRIDGES B.A., 1976. Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Res.*, 38, 33-42.
- HARRINGTON T.R., NESTMANN E.R., KOWBEL D.J., 1983. Suitability of the modified fluctuation assay for evaluating the mutagenicity of unconcentrated drinking water. *Mutation Res.*, 120, 97-103.
- HEMMING J., HOLMBOM B., REUNANEN M., KRONBERG L., 1986. Determination of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in chlorinated drinking and humic waters. *Chemosphere*, 15, 549-556.
- HUBBARD S.A., GREEN M.H.L., GATEHOUSE D., BRIDGES J.W., 1984. The fluctuation test in bacteria. In *Hand book of mutagenicity test procedures*, ed. by Kilbey B.J., Legator M., Nichols W., Ramel C. Elsevier Science publishers.
- JANSSON K., MAKI-PAKKANEN J., VAITTINEN S.L., VARTIAINEN T., KOMULAINEN H., TUOMISTO J., 1993. Cytogenetic effects of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in rat peripheral lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. *Mutation Research*, 229, 25-28.
- JAYLET A., DEPARIS P., GASHIGNARD D., 1986. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of axolotl larvae following *in vivo* exposure to mutagenic agents. *Mutagenesis*, vol. 1, n° 3, 211-215.
- JAYLET A., GAUTHIER L., FERNANDEZ M., 1987. Detection of mutagenicity in drinking water using a micronucleus test in newt larvae (*Pleurodeles waltii*). *Mutagenesis*, vol. 2(3), 211-214.

- KOOL H.J., VAN KREIJL C.F., 1984. Formation and removal of mutagenic activity during drinking water preparation. *Water-Research*, vol. 18, n° 8, 1011-1016.
- KOWBEL D.J., MALAIYANDI M., PARAMASIGAMANI P., NESTMANN E.R., 1984. Chlorination of ozonated soil fulvic acid: mutagenicity studies in Salmonella. *The Science of the Total Environ.*, 37, 171-176.
- KOWBEL D.J., RAMASWAMY S., MALAYANDI M., NESTMANN E.R., 1986. Mutagenicity studies in Salmonella: Residues of ozonated and for chlorinated water fulvic acids. *Environ. Mutagenesis*, 8, 253-262.
- KRONBERG L., HOLMBOM B., REUNANEN M., TIKKANEN L., 1988. Identification and quantification of the Ames mutagenic compound 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its geometric isomer (E)-2-chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxobutenoic acid in chlorinated-treated humic water and drinking water extracts. *Environ. Sci. Technol.*, 22, 1097-1103.
- KRONBERG L., VARTIAINEN T., 1988. Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its geometric isomere E-2-chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxo-butenoic acid in chlorine treated tap waters. *Mutation Res.*, 206, 177-182.
- LALONDE R.T., COOK G.P., PERAKYLA H., DENCE C.W., BABISH J.G., 1991. *Salmonella typhimurium* (TA100) mutagenicity of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and its open- and closed-ring analogs. *Environ. Mol. Mutagen.*, 17, 40-48.
- LE CURIEUX F., MARZIN D., ERB F., 1992. Genotoxic activity of three carcinogens in peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl*. *Mutation Res.*, 283, 157-160.
- LE CURIEUX F., MARZIN D., ERB F., 1993. Comparison of three short-term assays: results on seven chemicals. Potential contribution to the control of water genotoxicity. *Mutation Research*, 319, 223-236.
- LEGUBE B., XION F., CROUE J.P., DORE M., 1990. Etude sur les acides fulviques extraits d'eaux superficielles françaises. Extraction, caractérisation et réactivité avec le chlore. *Revue des Sciences de l'Eau*, 3, 399-424.
- LEONARD A., 1990. Les Mutagènes de l'Environnement et leurs Effets Biologiques. Masson, Paris.
- LOPER J.C., 1980. Mutagenic effects of organic compounds in drinking water. *Mutation Research*, 76, 241268.
- MACGILL R., TUCKEY J.W., LARSEN W.A., 1978. Variation of box plots. *Am. Statist.*, 32, 12-16.
- MARON D., AMES B., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113, 173-215.
- MARZIN D., OLIVIER P., VOPHI H., 1986. Kinetic determination of enzymatic activity and modification of the metabolic activation system in the SOS chromotest. *Mutation Res.*, 164, 353-359.
- MEIER J.R., BULL R.J., 1985. Mutagenic properties of drinking water disinfectant and by-products. In: R.L. Jolley, Bull R.J., Davis W.P., Katz S., Roberts M.H., Jacobs V.A., eds, *Water chlorination, Environmental Impact and Health Effects*, vol. 5, Lewis, Chelsea, MI, pp. 207-236.
- MEIER J.R., RINGHAND H.P., COLEMAN W.E., MUNCH J.W., STREICHER R.P., KAYLOR W.H., SCHENCK K.M., 1985. Identification of mutagenic compounds formed during chlorination of humic acid. *Mutation Research*, 157, 111-122.
- MEIER J.R., KNOHL R.B., COLEMAN W.E., RINGHAND H.P., MUNCH J.W., KAYLOR W.H., STREICHER R.P., KOPFLER F.C., 1987a. Studies on the potent bacterial mutagen, 3 chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acid solutions. *Mutation Res.*, 189, 363-373.
- MEIER J.R., BLAZAK W.F., KNOHL R.B., 1987b. Mutagenic and clastogenic properties of 3 chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: a potent bacterial mutagen in drinking water. *Environ. Mol. Mutagen.*, 10, 421-424.
- MEIER J., 1988. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutation Research*, 196, 211245.
- NUNN J.W. CHIPMAN J.K., 1994. Induction of DNA strand breaks by 3-chloro-4-(dichloro-

- romethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and humic substances in relation to glutathione and calcium status in human white blood cells. *Mutation Res.*, 341, 133-140.
- POMMERY J., IMBENOTTE M., URIEN A.F., MARZIN D., ERB F., 1989. SOS chromotest study concerning some appreciation criteria of humic substances' genotoxic potency. *Mutation Res.*, 223, 183-189.
- QUILLARDET P., HUISMAN O., D'ARI R., HOFNUNG M., 1982. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure toxicity. *Proceeding of national Academic of Science, USA*, vol. 79, 5971-5975.
- QUILLARDET P., HOFNUNG M., 1985. The SOS chromotest, a colometric bacterial assay for genotoxins : procedures. *Mutation Res.*, 147, 65-78.
- THURMAN E.M., MALCOM R.L., 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Envir. Sci. Technol.*, 15, 463-466.
- TIKKANEN L., KRONBERG L., 1990. Genotoxic effects of various chlorinated butenoic acids identified in chlorinated drinking water. *Mutation Res.*, 240, 109-116.
- UBOM G., CHIPMAN J.K., 1994. Absence of unscheduled DNA synthesis in rat hepatocytes treated with mutagenic and cytotoxic chlorinated humic substances. *Mutation Research*, 321, 57-63.
- VARTIAINEN T., LIIMATAINEN A., 1986. High levels of mutagenic activity in chlorinated drinking water in Finland. *Mutation Res.*, 169, 29-34.
- XU H., DUTKA B.J., SCHURR K., 1989. Microtitration SOS chromotest : a new approach in genotoxicity testing. *Toxicity Assessment : an International Journal*, vol. 4, 105-114.