

Identification de composés génotoxiques dans les eaux de boisson

Identification of genotoxic compounds in drinking waters

F. LE CURIEUX¹, F. ERB² et D. MARZIN^{3*}

SUMMARY

In 1974, two independent studies – one in the Netherlands and the other in the United States – demonstrated the occurrence of trihalomethanes in drinking water. Following studies showed that these chemicals were common contaminants of drinking water and that chloroform, *i.e.* one of these trihalomethanes, was carcinogenic in rodents. Further investigations demonstrated that extracts of chlorinated drinking water induced significant mutagenicity in the Ames/Salmonella assay. In the present paper we will first discuss the methods used to detect the genotoxic activity of drinking water and, then, the methods developed to identify the compounds responsible for this activity. After this, we will present the main genotoxic chemicals identified in drinking water, before finally considering several propositions to limit the exposure of populations to these genotoxic compounds.

Drinking water is usually produced through a multistage process which includes one or several chlorination steps. It is now widely accepted that the genotoxic activity of drinking water mainly originates from the reaction of chlorine with humic substances present in raw water. Humic substances are natural organic matters (resulting from the degradation of plants and animal tissues) of very complex structure with most chemical functions arranged in aromatic rings or aliphatic chains. The identification of a genotoxic activity in drinking water usually requires concentration of the water samples. Even though such a process implies a probable qualitative/quantitative alteration of the constituents of water samples, the extremely low amounts of genotoxic compounds in drinking water require concentration steps. Among the many genotoxicity tests carried out, the Ames test (which detects reverse mutations in bacteria

1 Department of Organic Chemistry, Åbo Akademi University, Biskopsgatan 8, FIN-20500 Turku, Finland.

2 Département Toxicologie-Hydrologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 3, rue du Professeur Laguesse, BP 83, F-59006 Lille cedex, France.

3 Laboratoire de Toxicologie, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP 245, F-59019 Lille cedex, France.

* Correspondance.

Salmonella typhimurium) is the assay which was the most frequently used in the field of drinking water mutagenicity. Other tests were performed on eucaryotic cells. Assays detecting micronuclei or chromosomal aberrations in plants, or mutations in mold, yeast, or maize enabled the detection of genotoxic effects of drinking water extracts. Tests on mammal cells also showed that drinking water extracts induced point mutations, sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations and micronuclei. *In vivo* tests on aquatic organisms such as newt or mussels demonstrated the micronuclei inducing effect of unconcentrated drinking water samples.

Regarding the identification of the compounds responsible for the genotoxicity, it is obviously not possible to identify all of the thousands of chemicals that may be involved. But such a process is important in order to evaluate the specific genotoxicity and the risk associated with (at least) the main chemicals occurring in drinking water. The identification process usually follows three steps: (i) *concentration* of the sample can be performed using reverse osmosis, freeze drying, liquid-liquid extraction, and/or adsorption on non ionic resin followed by extraction with organic solvent; (ii) the *purification* step uses one or a combination of chromatographic techniques (TLC, packed column liquid chromatography, HPLC or GC); (iii) *structural identification* of the chemical is performed using data from mass spectrometry, and proton and carbon NMR, or UV spectroscopy. The analysis of the genotoxic compounds of drinking water showed that they are rather non-volatile, quite acid and not stable at high pH, rather polar, and with a mean molecular weight around 200.

Turning now to the identity of these compounds, it is considered that the genotoxicity of drinking water is mainly due to organohalogenated chemicals. Some inorganic chemicals (this class of chemicals is usually not recovered in drinking water extracts) which induce genotoxic or carcinogenic effects must, however, be recalled. Arsenic, nitrates, bromates and radon are natural or human-activity-related drinking water contaminants which are responsible for cancers in rodents or in humans. Among the many genotoxic or carcinogenic organohalogenated compounds identified in drinking water, the most abundant chemicals are chlorinated and/or brominated trihalomethanes. Other important groups of compounds are chlorinated and/or brominated derivatives of acetic acids, acetonitriles, ketones, phenolic compounds. The chlorinated hydroxyfuranones, although present at concentrations lower than 0.1 µg/l in drinking water, can be responsible for more than half of the Ames mutagenicity. MX, the most potent of these chlorohydroxyfuranones, has been submitted to intensive toxicological studies worldwide and was very recently identified as a potent carcinogen in rats.

Now that the presence of genotoxic compounds in drinking waters is a well documented and accepted fact, the perspectives lie in the better identification of the impact of these drinking water contaminants. The development of more sensitive tests such as the Comet assay (detection of DNA strand breaks) or the 32P postlabelling assay (detection of DNA adducts) should be pursued. Moreover, the interaction between genotoxic compounds and DNA must be investigated more thoroughly, including the identification of adduct structures. More globally, it is of interest to better assess the impact of these agents on public health and on the occurrence of specific human cancers. At present, even though a few individual water contaminants are classified as human probable carcinogens, the chlorinated drinking water (in itself) is not considered as carcinogenic to humans. Exposure to these potentially harmful agents can be limited with (1) improving drinking water quality – *i.e.* decreasing the formation of genotoxins – by using raw water containing lower amounts of organic matter; and (2) modifying the water chemical treatment by using lower amounts of chlorine and/or combining chlorine with other disinfectants. The public health can also be protected by the setting of guidelines for drinking water: each compound identified as dangerous would be given a concentration threshold which should never be exceeded. The Environmental Protection Agency in the USA

and the World Health Organisation are authorities setting such guidelines. Finally, we believe it is important to limit the concentration of genotoxic compounds in drinking water as much as possible, and one way to do so is to use chlorine in smaller amounts and in a more efficient way. But it is of paramount importance to keep in mind that the disinfection process (in which chlorine still plays a major role) and the providing of a microbiologically safe drinking water should never be jeopardized.

Key-words: identification, genotoxic compounds, drinking water, chlorination, humic substances, organohalogenated.

RÉSUMÉ

Depuis la mise en évidence de trihalométhanes dans les eaux potables en 1974, de multiples travaux ont démontré la présence de nombreux composés génotoxiques dans l'eau de boisson. L'eau potable obtenue à partir d'eau de surface subit un traitement incluant généralement une étape de chloration. Il est aujourd'hui largement admis que l'activité génotoxique des eaux de boisson provient principalement de la chloration des substances humiques, composés organiques naturels contenus dans l'eau brute et issus de la dégradation des déchets animaux et végétaux. Les très faibles concentrations en composés génotoxiques dans les eaux potables nécessitent la concentration des échantillons, procédé qui risque toutefois de modifier la génotoxicité. Plusieurs tests mettant en œuvre des cellules procaryotes ou eucaryotes, des plantes ou des mammifères, ont permis de mettre en évidence les effets génotoxiques dans des eaux potables chlorées. L'identification des composés génotoxiques est réalisée au moyen des données de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie UV ou RMN (proton ou carbone). Ces agents sont généralement non volatils, acides et polaires. Bien que certains composés inorganiques interviennent parfois, la majeure partie de la génotoxicité est attribuée aux agents organohalogénés (bromés ou/et chlorés), les principaux étant les trihalométhanes, acides acétiques, acétonitriles, cétones, et hydroxyfuranones. La fixation de normes contribue à limiter l'exposition des populations aux agents potentiellement dangereux. La qualité des eaux de boisson peut être accrue en utilisant une eau brute moins chargée en matière organique, et en améliorant le traitement chimique tout en veillant à conserver la qualité microbiologique de l'eau produite.

Mots clés : identification, composés génotoxiques, eau potable, chloration, substances humiques, organohalogénés.

INTRODUCTION

Jusque dans les années 1970, seule une contamination d'origine industrielle ou domestique pouvait expliquer, dans l'imaginaire collectif, la présence de composés toxiques dans l'eau potable. En 1974, la présence de trihalométhanes dans les eaux potables a été mise en évidence aux Pays-Bas (ROOK, 1974), et aux États-Unis (BELLAR *et al.*, 1974). En 1976, de nouveaux travaux démontrent que le chloroforme, l'un des principaux trihalométhanes retrouvés dans les eaux d'alimentation, est cancérigène chez le rat et la souris. Les nombreux travaux qui ont suivi ont abouti à la démonstration de l'existence d'une activité mutagène induite par les extraits d'eau d'alimentation chlorée dans le test d'Ames sur *Salmonella typhimurium* (LOPER *et al.*, 1978).

Dans le présent article, nous nous proposons de traiter des méthodes permettant de mettre en évidence une activité génotoxique dans les eaux potables, puis nous envisagerons les techniques permettant d'identifier les composés responsables des effets génotoxiques observés. Nous présenterons ensuite les principaux composés génotoxiques identifiés dans les eaux de boisson, pour envisager dans la dernière partie quelques propositions concernant la limitation de l'exposition des populations à ces agents.

1 – MISE EN ÉVIDENCE D'UNE ACTIVITÉ GÉNOTOXIQUE

1.1 Origine des composés génotoxiques

L'eau potable obtenue à partir d'une eau de surface subit un traitement incluant généralement une étape de chloration. L'hypothèse selon laquelle les agents génotoxiques retrouvés dans l'eau potable seraient initialement présents dans l'eau brute a pu être émise. Toutefois, les composés d'origine naturelle présentant la double caractéristique d'être retrouvés dans les eaux brutes et de manifester une activité génotoxique sont rares. Seuls quelques dérivés minéraux (l'arsenic par exemple) sont retrouvés à des concentrations non négligeables et ont montré des effets génotoxiques sur différents systèmes biologiques.

Les composés génotoxiques retrouvés dans l'eau potable peuvent également provenir d'une contamination, d'origine industrielle, agricole ou domestique, de l'eau brute. Des types très variés de produits chimiques peuvent ainsi être retrouvés dans le milieu aquatique.

L'existence d'un lien direct entre le processus de chloration des eaux et l'apparition d'une activité génotoxique dans l'eau de consommation a été mise en évidence à la fois par des expériences en laboratoire (MARUOKA et YAMANAKA, 1980), par des études en installation pilote (MILLER *et al.*, 1986), et par des études in situ consistant à comparer l'activité mutagène de l'eau brute et celle de l'eau traitée dans une station de potabilisation (KOOL et VAN KREIJL, 1984). FAWELL et FIELDING (1985) ont montré que la chloration des eaux de surface induit une activité mutagène nettement plus forte que celle observée pour les eaux souterraines. L'importance de l'étape de chloration dans l'apparition de l'activité génotoxique a été mise en exergue par les travaux de BAKER et WILCOX (1987). Ils ont en effet démontré que : (1) il n'y a pas de relation entre l'activité mutagène détectée dans une eau chlorée et le degré de pollution des eaux brutes ; (2) une eau prélevée dans un site exempt de pollution peut manifester, après chloration, une activité mutagène significative. En outre, des études de l'USEPA (MEIER *et al.*, 1983) ont confirmé expérimentalement que la chloration d'eaux naturelles ou de matières humiques engendre une activité mutagène directe sur plusieurs souches de *Salmonella typhimurium*, les effets mutagènes observés étant très comparables.

L'ensemble de ces résultats conforte l'hypothèse aujourd'hui admise selon laquelle la mutagénicité des eaux potables provient principalement de la chloration des substances humiques contenues dans l'eau brute. Les substances humiques sont issues de la dégradation biologique de déchets naturels végétaux et animaux.

Elles représentent la majeure partie du carbone organique contenu dans les eaux brutes. Leur structure, très complexe, comprend des structures aromatiques ou aliphatiques supportant des fonctions carboxyles, carbonyles, hydroxyyles... La formation de composés mutagènes au cours de la réaction de chloration des substances humiques semble être étroitement liée à la rupture des structures phénoliques. Les composés aromatiques contenant des unités phénoliques constituent donc de bons précurseurs des composés organohalogénés mutagènes. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les substances humiques constituent les précurseurs principaux de la mutagénicité des eaux chlorées. L'activité mutagène produite est proportionnelle, d'une part, au taux de chloration appliqué (KOOL *et al.*, 1985), et d'autre part, à la quantité de composés organohalogénés formés (KOOL *et al.*, 1984). Les acides aminés, notamment la tyrosine qui porte une fonction phénolique, peuvent produire une activité mutagène significative après chloration mais la nécessité de taux de chloration très élevés semble exclure les acides aminés et peptides comme précurseurs significatifs de la mutagénicité des eaux potables chlorées (HORTH *et al.*, 1991). Le développement saisonnier d'algues peut également accroître la formation de trihalométhanes (SCULLY *et al.*, 1988).

1.2 Problèmes liés à la concentration des échantillons d'eau

L'étude de l'activité génotoxique d'une eau potable devrait, idéalement, être réalisée sur échantillon pur afin d'éviter la modification quantitative ou qualitative des constituants susceptibles d'intervenir durant la concentration. Toutefois, les très faibles concentrations en composés mutagènes dans les eaux potables rendent nécessaire l'étape de préconcentration. Bien que certains travaux aient réussi à mettre en évidence une activité mutagène dans des échantillons d'eau *non concentrés* (LE CURIEUX *et al.*, 1996 ; SCHWARTZ *et al.*, 1979), une étape d'extraction/concentration apparaît indispensable dans la grande majorité des cas afin de pouvoir détecter une éventuelle activité génotoxique dans les eaux potables.

1.3 Recherche de l'activité génotoxique

Plusieurs tests de génotoxicité impliquant divers systèmes biologiques ont été mis en œuvre. La mise au point du test de mutation reverse sur *Salmonella typhimurium*, ou test d'Ames (AMES *et al.*, 1975) a coïncidé avec la publication des premières études démontrant l'existence de composés organochlorés dans les eaux potables. Ce test s'est depuis imposé comme l'essai le plus utilisé dans le domaine de la génotoxicité des eaux. Selon un rapport de l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC, 1991), plus d'une trentaine de travaux étudiant la mutagénicité d'extraits d'eau potable au moyen du test d'Ames ont été publiés entre 1979 et 1989. La quasi totalité de ces travaux, qui portait sur des échantillons d'eau prélevés dans différents pays (Afrique du Sud, Belgique, Canada, États-Unis, Finlande, France, Italie, Pays-Bas, Royaume-Uni, Taiwan) et impliquait divers types de traitements, ont montré l'activité mutagène significative de certains extraits sur plusieurs souches de *Salmonella typhimurium*, notamment sur les souches TA100 et TA98. Le test d'Ames-fluctuation, variante du test d'Ames dans laquelle le milieu d'incubation gélosé est remplacé par un milieu liquide, a aussi été mis en œuvre pour la recherche de la mutagénicité des eaux sans concentration préalable (LE CURIEUX *et al.*, 1996). Le SOS chromotest, un autre test sur procaryote, a été utilisé pour démontrer que des extraits d'eau potable induisaient des altérations primaires de l'ADN chez *E. coli* (BOURBIGOT *et al.*, 1986).

Des échantillons d'eau potable testés sans préconcentration provoquent l'augmentation de la fréquence de micronoyaux dans les cellules de pollen de *Tradescantia* (MA *et al.*, 1985), et induisent des aberrations chromosomiques dans les cellules de plante *Crepis capillaris* (DUBININA et DUBININ, 1996). Néanmoins, DEMARINI *et al.* (1982) n'ont pas réussi à démontrer la capacité d'extraits d'eau potable à induire des mutations dans les champignons *Neurospora crassa*, dans des levures *Saccharomyces cerevisiae*, ou dans le maïs *Zea mays*. Les extraits d'eau potable testés par GALASSI *et al.* (1989) produisent des mutations sur *Saccharomyces cerevisiae*.

En ce qui concerne les cellules de mammifères, certains extraits d'eau potable induisent des transformations cellulaires dans des cellules de fibroblaste de souris (LOPER *et al.*, 1978), et des cellules embryonnaires de poumon humain, ainsi que des mutations géniques sur cellules de poumon V79 de hamster chinois (GRUENER et LOCKWOOD, 1979). Les extraits d'eau potable ont démontré des capacités significatives à induire sur cellules d'ovaire de hamster chinois, des échanges de chromatides soeurs, des aberrations chromosomiques (ATHANASIOU et KYRTOPOULOS, 1983 ; DOUGLAS *et al.*, 1986 ; WILCOX et WILLIAMSON, 1986 ; WILCOX *et al.*, 1988), et la formation de micronoyaux (WILCOX et WILLIAMSON, 1986). Les travaux de Wilcox indiquent également que les extraits d'eau potable produisent des aberrations chromosomiques sur des lymphocytes humains *in vitro*, mais ne produisent pas d'aberrations chromosomiques sur cellules de moelle osseuse de souris *in vivo*, ni de mutations létales récessives liées au sexe chez la drosophile (WILCOX *et al.*, 1988).

Grâce au développement d'un test *in vivo* très sensible qui permet de détecter l'augmentation de la fréquence des micronoyaux dans les érythrocytes de larves de triton *Pleurodeles waltl*, JAYLET *et al.* (1987) ont démontré que les échantillons d'eau potable non concentrés induisent la formation de micronoyaux chez le triton. SCARPATO *et al.* (1990) ont également montré la formation de micronoyaux chez la moule *Anodonta cygnea*.

2 – IDENTIFICATION DES COMPOSÉS RESPONSABLES DE L'ACTIVITÉ GÉNOTOXIQUE

2.1 Pourquoi identifier les principaux composés responsables de l'activité génotoxique ?

La mise en œuvre de tests de génotoxicité sur des produits purs et de structure chimique connue permettrait d'évaluer la génotoxicité et les risques liés à chaque composé. En outre, la synthèse de composés potentiellement mutagènes permettrait de compléter les données toxicologiques disponibles, rendant ainsi possible une première évaluation du risque encouru par le consommateur. Par ailleurs, la connaissance des mécanismes réactionnels impliqués dans la formation des sous-produits de chloration dans l'eau potable pourrait favoriser l'amélioration des filières de traitement afin de limiter la quantité de composés mutagènes produits.

Toutefois, l'identification de la totalité des composés mutagènes contenus dans l'eau potable n'est pas un projet réaliste. Le nombre de composés présents

dans l'eau s'élèverait à plus de 2000 (LUCAS, 1985). Par ailleurs, près d'un tiers des composés identifiés manifesteraient une activité génotoxique sur au moins un test (GOODMAN, 1981 ; SIMMON *et al.*, 1977). Déterminer la génotoxicité des produits non encore testés serait une opération très longue et coûteuse, d'autant plus que certains composés, difficiles à isoler à partir d'échantillons d'eau, doivent être synthétisés. En outre, les composés mutagènes sont généralement peu ou pas volatils et relativement polaires, ce qui complique leur analyse par le couplage classique chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse.

Enfin, la contribution exacte de chaque substance mutagène identifiée à l'activité mutagène globale de l'eau potable est souvent mal définie du fait de l'imprécision des données quantitatives concernant la concentration du composé dans l'eau et de l'intensité de son activité mutagène spécifique. La probabilité de phénomènes de synergie ou d'antagonisme entre les divers composés mutagènes ajoute à la complexité de la tâche. McCANN *et al.* (1984) ont démontré que l'intensité de l'activité mutagène induite par les sous-produits de chloration peut varier d'un facteur 10^8 .

Toutefois, la fixation de normes de qualité pour les eaux de boisson implique la caractérisation des principaux composés responsables de l'activité génotoxique.

2.2 Méthodes d'analyse des composés responsables de l'activité génotoxique

D'un point de vue pratique, l'analyse des composés responsables de l'activité génotoxique des eaux chlorées peut être séparée en trois phases : (1) la concentration des échantillons d'eau, (2) la séparation, l'isolement et la purification des composés, et (3) l'identification de la structure chimique des composés.

2.2.1 Concentration des échantillons d'eau

Les principales techniques de concentration utilisées sont l'osmose inverse, la lyophilisation suivie d'une extraction des résidus solides avec un solvant organique, l'extraction liquide-liquide avec un solvant organique et l'adsorption sur résine suivie d'une élution par un solvant organique (la méthode la plus généralement utilisée). Certaines méthodes de concentration (évaporation de solvants) impliquent la perte des composés volatils susceptibles d'être contenus dans les échantillons. La nature même des procédés mis en œuvre limitera donc l'identification aux seuls composés mutagènes non volatils.

2.2.2 Séparation, isolement et purification des composés génotoxiques

La séparation et la purification des composés chimiques est réalisée en associant et répétant les différentes techniques chromatographiques. Les quatre principaux procédés utilisés sont la chromatographie sur colonne de silice, la chromatographie sur couche mince (TLC), la chromatographie liquide haute performance (HPLC) utilisant plusieurs colonnes et différents éluents (acétonitrile, méthanol), et la chromatographie en phase gazeuse.

2.2.3 Identification de la structure chimique des composés génotoxiques

L'identification de la structure des composés purifiés est généralement obtenue au moyen des données de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie UV ou de résonance magnétique nucléaire du proton ou du carbone ^{13}C .

2.3 Caractérisation des composés mutagènes retrouvés dans les eaux potables

Les progrès significatifs réalisés en matière de techniques analytiques ont rendu possible la détection des composés génotoxiques présents dans l'eau potable à des concentrations très faibles, souvent inférieures à $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (FIELDING et HORTH, 1987), ou même de l'ordre de $1 \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (BAIRD *et al.*, 1984). Les sous-produits de chloration des eaux sont caractérisés par un poids moléculaire moyen de 200 selon KOOL *et al.* (1982) et une valeur maximale de 500 selon KOPFLER *et al.* (1985). Les composés mutagènes sont peu ou pas volatils (FIELDING et HORTH, 1986), plutôt de nature acide, relativement polaires (KOOL *et al.*, 1981) et généralement électrophiles (CHEH *et al.*, 1983). La majeure partie des composés responsables de la mutagénicité d'une eau est isolée par extraction sur résine XAD en milieu acide (RINGHAND *et al.*, 1987). Ils sont en outre peu stables en milieu alcalin (NAZAR et RAPSON, 1982). Une perte d'activité mutagène est constatée après stockage de l'eau pendant plusieurs jours à un pH proche de la neutralité (KOOL *et al.*, 1985). Par ailleurs, les composés réducteurs ou déchlорants tels que le sulfite de sodium ou le dioxyde de soufre détruisent ces composés mutagènes (MORLAY, 1991).

L'activité génotoxique des composés présents dans les eaux potables varie considérablement en fonction de leur structure. Des travaux récents mettant en œuvre le SOS chromotest, le test d'Ames-fluctuation et le test micronoyau-triton ont permis de démontrer l'existence de relations entre la structure et l'activité génotoxique de divers groupes de composés retrouvés dans les eaux potables (GILLER *et al.*, 1997 ; LE CURIEUX *et al.*, 1994, 1995a-b). Trois aspects principaux se dégagent : (i) pour un même type de substitution, l'atome de brome semble conférer une activité génotoxique plus forte que l'atome de chlore ; (ii) pour un même isomère, la position des atomes de chlore peut faire varier le pouvoir génotoxique d'un facteur allant jusqu'à 1000 ; (iii) l'augmentation du nombre d'atomes de chlore ou de brome conduit à l'accroissement (dans le cas des acétonitriles halogénés) ou bien à la diminution (dans le cas des propanones chlorées) de l'effet génotoxique. Il est intéressant de noter que certains essais se montrent particulièrement sensibles pour la détection d'un groupe donné de composés. Ainsi, le test d'Ames-fluctuation apparaît le plus sensible pour l'ensemble des chloropropanones, alors que le test micronoyau-triton est le plus sensible pour le groupe des haloacétonitriles.

3 – COMPOSÉS GÉNOTOXIQUES IDENTIFIÉS

3.1 Composés inorganiques

Un nombre très limité de travaux a été consacré au rôle des produits inorganiques dans la génotoxicité des eaux potables. Ces produits inorganiques (ex : arsenic) sont certes généralement non mutagènes dans le test d'Ames mais manifestent parfois des effets génotoxiques ou cancérigènes sur d'autres systèmes biologiques (ROSSMAN *et al.*, 1984). En outre, les diverses méthodes de concentration mettent en œuvre des solvants organiques qui ne permettent pas

d'extraire les composés inorganiques. Cette classe de composés a donc été exclue de la plupart des études citées dans ce texte.

Les effets génotoxiques ou les potentialités cancérigènes de l'arsenic, des nitrates, des bromates et du radon sont connues mais, en l'état actuel des connaissances, seul l'arsenic a été reconnu comme responsable d'une augmentation des cancers chez l'homme (MORRIS, 1995). En tant qu'agent génotoxique, l'arsenic induit la formation de micronoyaux dans les cellules de vessie (MOORE *et al.*, 1997), et dans les lymphocytes de sang humain (DULOUT *et al.*, 1996), et des échanges de chromatides sœurs dans les lymphocytes périphériques humains (LERDA, 1994). Les nitrates, retrouvés en quantité parfois excessive dans l'eau de boisson, peuvent être transformés au sein du tractus digestif en nitrites puis en composés de type nitrosamines dont les propriétés cancérigènes sont avérées. L'absorption de nitrates dans l'eau d'alimentation provoque des cassures chromosomiques dans les lymphocytes périphériques humains (TSEZOU *et al.*, 1996). Les ions bromates sont formés lors de l'ozonation d'eaux brutes contenant des ions bromures (KOU DJONOU *et al.*, 1996). Or le bromate de potassium induit la formation de micronoyaux dans les lymphocytes périphériques de souris (AWOGI *et al.*, 1992) et les érythrocytes polychromatiques de souris (HAYASHI *et al.*, 1988 ; NAKAJIMA *et al.*, 1989). Ce composé provoque également des aberrations chromosomiques dans les cellules de moelle osseuse de rat (FUJIE *et al.*, 1988), et est cancérigène chez le rat (KUROKAWA *et al.*, 1986). À titre indicatif, le radon, un composé radioactif naturel retrouvé dans le sol et les eaux de certaines régions, est associé au cancer du poumon par inhalation.

3.2 Composés organohalogénés

Un nombre considérable de composés organohalogénés mutagènes ou cancérigènes a été identifié dans les eaux potables chlorées (MEIER, 1988). Les plus abondants sont les trihalométhanes chlorés ou/et bromés, le principal étant le chloroforme, puis le groupe des acides acétiques halogénés. Viennent ensuite les acétonitriles halogénés, les cétones halogénées, les composés phénoliques halogénés, et les hydroxyfuranones chlorées. Le tableau 1 présente une liste de composés identifiés (et dosés) dans des échantillons eau potable, et pour lesquels une activité génotoxique ou cancérigène a été observée. L'un des composés présentés dans ce tableau, le MX, est l'un des plus puissants mutagènes directs jamais testés dans le test d'Ames et, bien qu'il soit présent à des concentrations inférieures à $70 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, il est parfois responsable de 50 % de l'activité mutagène d'un extrait d'eau potable. Ce composé est considéré par l'OMS et l'USEPA comme pouvant affecter la santé publique. Très récemment, le MX a été identifié comme étant cancérigène chez le rat (KOMULAINEN *et al.*, 1997) et induisant des adduits à l'ADN *in vitro* (LE CURIEUX *et al.*, 1997).

4 – PERSPECTIVES

La génotoxicité des extraits d'eau de boisson étant aujourd'hui un fait démontré et relativement bien documenté, les perspectives de recherche résident essentiellement dans (1) la connaissance plus approfondie des effets génotoxi-

Tableau 1 Principaux composés organiques génotoxiques ou cancérogènes identifiés et dosés dans l'eau potable.

Table 1 Main genotoxic or carcinogenic organic compounds identified and quantified in drinking water.

Composés	Concentrations dans l'eau potable		Concentration minimale génotoxique ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, Test ^e)	Activité Cancérogène : Classement IARC ^g
	Valeur maximale détectée ^a ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Recommandations OMS ^d ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)		
Trihalométhanes				
Bromoforme	10	100	2500, MT	3
Bromodichlorométhane	50	60	3000, SOS	2B
Chlorodibromométhane	20	100	8000, AC	3
Chloroforme	300	200	—	2B
Acides haloacétiques				
Acide Dichloroacétique	200	50 ^p	50 000, AF	4 ^h
Acide Trichloroacétique	200	100 ^p	80 000, AF	4 ^h
Acide Bromoacétique	4	*	20 000, AF	4
Acide Dibromoacétique	19	*	10 000, AF	4
Acétonitriles halogénés				
Bromochloroacétonitrile	10	*	120, MT	3
Dibromoacétonitrile	11	100 ^p	30, ECS	3
Dichloroacétonitrile	24	90 ^p	250, MT	3
Trichloroacétonitrile	0,1 ^b	1 ^p	2 000, ECS	3
Cétones chlorées				
1,1-dichloropropanone	2,2	*	10 000, AF	4
1,1,1-trichloropropanone	20	*	100 000, AF	4
Furanones chlorées[#]				
MX	0,07 ^c	*	4, SOS	4 ⁱ
CMCF	0,02 ^c	—	nd	4
MCF	0,07 ^c	—	nd	4
MCA	0,07 ^c	—	4000, HPRT	4
Divers				
Chloral (trichloroéthanal)	19	10	200 000, MT	4
Chloropicrine	1	*	300, SOS	4
Acétaldéhyde	7	—	—	2B
Formaldéhyde	17	900	10 000, AF	2A

[#] MX : 3-chloro-4- (dichlorométhyl)-5-hydroxy-2 (5H)-furanone, CMCF : 3-chloro-4- (chlorométhyl)-5-hydroxy-2 (5H)-furanone, MCF : 3-chloro-4-méthyl-5-hydroxy-2 (5H)-furanone, MCA : 3,4-dichloro-5-hydroxy-2 (5H)-furanone.

^a Selon IARC (1991), sauf ^b BRUCHET *et al.* (1985) et ^c KRONBERG (1994) et SMEDS *et al.* (1997).

^d Valeurs guides de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1994). ^p : Provisoire, * : En cours d'élaboration (informations disponibles insuffisantes), — : Non encore l'objet d'évaluations.

^e MT : micronoyau-trifon, AF : Ames-fluctuation, SOS : SOS chromotest, HPRT : mutation au locus HPRT, AC : aberration chromosomique, ECS : échanges de chromatides sœurs, nd : non déterminé.

^f Aucune activité génotoxique observée dans les tests classiques.

^g 2A : probablement cancérogène chez l'homme, 2B : possiblement cancérogène chez l'homme, 3 : non classifiable concernant sa cancérogénicité chez l'homme, 4 : non classifié par l'IARC.

^h Cancérogène chez le rat (DEANGELO *et al.*, 1991).

ⁱ Cancérogène chez le rat (KOMULAINEN *et al.*, 1997).

ques et du risque sanitaire associés à ces composés, et (2) la limitation de l'exposition des populations à ces agents génotoxiques. En ce qui concerne les méthodes d'isolement et d'identification, les méthodologies disponibles et utilisables en routine semblent répondre aux besoins immédiats. En matière de dosage, il semblerait que certains composés comme les bromates posent encore des difficultés ; les méthodes d'analyse les plus généralement utilisées et de coût raisonnable ne permettent en effet pas d'abaisser les limites de détection aux niveaux souhaités (de l'ordre du μg pour les bromates par exemple).

4.1 Effets génotoxiques des eaux de boisson

Il s'agit tout d'abord de poursuivre le développement des tests de génotoxicité les plus sensibles. Nous pouvons ici évoquer deux tests, le Comet Assay et le test de postmarquage au ^{32}P . Le *Comet Assay* permet de détecter les cassures de brin d'ADN. Dans ce test, les cassures de brin sont mesurées dans des cellules incluses au sein d'un gel d'agar. Après lyse des cellules, la migration des brins d'ADN (placés dans un champ électrique) vers l'anode est d'autant plus importante que le nombre de cassures est élevé. Le *test de postmarquage au ^{32}P* qui permet de détecter des adduits à l'ADN est à l'heure actuelle la technique la plus sensible pour détecter une grande diversité de composés modifiant la structure de l'ADN. Les principales étapes sont : hydrolyse enzymatique de l'ADN, enrichissement en nucléotides portant des adduits, marquage enzymatique des nucléotides au ^{32}P , séparation des adduits marqués au ^{32}P par chromatographie en couche mince bi-dimensionnelle, et autoradiographie.

Un autre domaine de recherche à développer est l'identification de la nature des interactions intervenant entre l'agent génotoxique et l'ADN : formation d'adduits (et identification de leur structure chimique), liaisons intra- ou interbrin, ou cassures de l'ADN.

De manière plus globale, il est nécessaire de déterminer les effets sur la santé des agents génotoxiques contenus dans l'eau de boisson. Il est aujourd'hui largement admis que la plupart des composés mutagènes sont également cancérigènes, et que les dommages génétiques sont l'un des facteurs responsables des cancers. MORRIS *et al.* (1992) ont démontré une corrélation entre la consommation de sous-produits de chloration contenus dans l'eau potable et l'augmentation de la fréquence du cancer de la vessie et du rectum chez l'homme. Les données toxicologiques publiées n'apparaissent pas suffisantes pour que l'IARC considère qu'il y ait un risque réel et qu'il faille classer l'eau potable chlorée parmi les cancérigènes potentiels pour l'homme. L'ensemble des résultats démontrant les effets génotoxiques de certains composés présents dans les eaux de boisson laisse pourtant penser qu'il est souhaitable de limiter autant que possible l'exposition des populations à ces agents.

4.2 Limitation de l'exposition aux agents génotoxiques des eaux de boisson

Afin de limiter l'exposition des populations aux agents génotoxiques des eaux de boisson, il est nécessaire d'améliorer la qualité des eaux potables en diminuant la concentrations de ces composés génotoxiques. Ce résultat peut être atteint soit en améliorant la qualité de l'eau brute utilisée pour produire l'eau de boisson (notamment en diminuant la quantité de matières organiques ou en choi-

sisant une eau brute moins chargée en matières organiques), soit en améliorant le processus de traitement (en particulier en utilisant moins de chlore ou en employant d'autres oxydants). Un des indices d'amélioration de la qualité de l'eau pourrait être la diminution de l'activité mutagène observée.

La fixation de normes, sous forme de valeurs/concentrations guides qui ne doivent pas être dépassées dans l'eau potable, peut également contribuer à limiter le risque sanitaire pour le consommateur. Plusieurs organismes, tels que l'Agence de Protection de l'Environnement aux États-Unis (USEPA) ou l'Organisation Mondiale pour Santé (OMS) au niveau international, fixent de telles normes. Pour les trihalométhanes : chloroforme, bromodichlorométhane, chlorodibromométhane et bromoforme par exemple, l'OMS a fixé les valeurs de 200, 60, 100 et 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivement. Ce système de norme, tout à fait louable, souffre parfois d'un problème d'harmonisation. Ainsi, selon la norme de l'USEPA, c'est la somme des concentrations des quatre trihalométhanes qui ne doit pas dépasser 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. On peut ici se poser la question de la pertinence du choix des critères ainsi que des facteurs de sécurité entrant en jeu lors de la fixation des normes au sein de différents organismes.

5 – CONCLUSION

L'étude de la génotoxicité d'une eau de boisson constitue une approche nouvelle du problème de la contamination des eaux potables. L'introduction de la génotoxicité des eaux comme nouveau critère de qualité pour les eaux de boisson, en complément des critères physico-chimiques et microbiologiques déjà en vigueur, pourrait s'avérer profitable. L'identification, la quantification et l'étude de la génotoxicité des agents potentiellement dangereux permettraient en outre de fixer les normes afin d'améliorer la sécurité du consommateur. Par ailleurs, il est important de rappeler que le risque microbiologique prime sur le risque génotoxique. En d'autres termes, l'ensemble des efforts visant à limiter la formation des agents génotoxiques, notamment en utilisant moins de chlore, ne doit jamais mettre en péril la parfaite désinfection de l'eau délivrée au consommateur.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMES B., MCCANN J., YAMASAKI E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-363.
- ATHANASIOU K., KYRTOPOULOS S., 1983. Mutagenic and clastogenic effects of organic extracts from the Athenian drinking water. *Sci. Total. Environ.* 27, 113-120.
- AWOGI T., MURATA K., UEJIMA M., KUWARA T., ASANAMI S., SHIMONO K., MORITA T., 1992. Induction of micronucleated reticulocytes by potassium bromate and potassium chromate in CD-1 male mice. *Mutat. Res.* 278, 181-185.
- BAIRD R., GUTE J., JACKS C., NEISESS L., NELLOR M., SMITH J., WALKER A., 1984. Negative-ion chemical ionization mass spectroscopy and Ames mutagenicity tests

- of granular activated carbon treated waste water. *Proceedings of the 188th Meeting of the American Chemical Society*, Philadelphia, PA, August 29-31, 1984.
- BAKER A., WILCOX P., 1987. An investigation on the origin of mutagens in water samples collected from three different sites along a low land river – Technical Report PRD 1468-M, Water Research Center, Medmenham, Marlow, Bucks, U.K..
- BELLAR T., LICHTENBERG J., KRONER R., 1974. The occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters. *J. Am. Water Works Ass.* 66, 703-706.
- BOURBIGOT M., HASCOET M., LEVI Y., ERB F., POMMERY N., 1986. The role of ozone and granular activated carbon in the removal of mutagenic compounds. *Environ. Health Perspec.* 69, 159-163.
- BRUCHET A., TSUTSUMI Y., DUGUET J., MALLEVIALLE J., 1985. Characterisation of total halogenated compounds during water treatment processes. In: JOLLEY *et al.* (Eds.), *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Vol. 5, Lewis, Chelsea, MI, pp. 1341-1353.
- CHEH A., CARLSON R., HILDEBRAND J., WOODWARD C., PEREIRA M., 1983. Contamination of purified water by mutagenic electrophiles. In: JOLLEY *et al.* (Eds.), *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Vol. 4, Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, pp. 1221-1235.
- DEANGELO A., DANIEL F., STOBER J., OLSON G., 1991. The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male B6C3F1 mouse. *Fundam. Appl. Toxicol.* 16, 337-347.
- DEMARINI D., PLEWA M., BROCKMAN H., 1982. Use of four short-term tests to evaluate the mutagenicity of municipal water. *J. Toxicol. Environ. Health.* 9, 127-140.
- DOUGLAS G., NESTMANN E., LEBEL G., 1986. Contribution of chlorination to the mutagenic activity of drinking water extracts in *Salmonella* and Chinese hamster ovary cell. *Environ. Health Perspec.* 69, 81-87.
- DUBUNINA L., DUBININ N., 1996. Mutagenicity of drinking water in various districts of Moscow. *Genetica* 32, 1225-1228.
- DULOUT F., GRILLO C., SEOANE A., MADERNA C., NILSSON R., VAHTER M., DARROUDI F., NATARAJAN A., 1996. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from Northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. *Mutat. Res.*, 370, 151-158.
- FAWELL J., FIELDING M., 1985. Identification and assessment of hazardous compounds in drinking water. *Sci. Total Environ.* 47, 317-341.
- FIELDING M., HORTH H., 1986. Formation of mutagens and chemicals during water treatment chlorination. *Wat. 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, Italy, 20-22 October 1987.
- FUJIE K., SHIMAZU H., MATSUDA M., SUGIYAMA T., 1988. Acute cytogenetic effects of potassium bromate on rat bone marrow cells *in vivo*. *Mutat. Res.* 206, 455-458.
- GALASSI S., GUZELLA L., SORA S., 1989. Mutagenic potential of drinking waters from surface supplies in northern Italy. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 109-116.
- GILLER S., LE CURIEUX F., ERB F., MARZIN D., 1997. Compared genotoxicity of halogenated acetic acids found in drinking water. *Mutagenesis*, 12(5), 321-328.
- GOODMAN D., 1981. Review of genotoxic activity of chemicals identified in drinking water. Paper presented at the *International Symposium on Health Effects of Drinking Water-Disinfectants and Disinfection By-Products*, Cincinnati, OH, April 21-24, 1981.
- GRUENER N., LOCKWOOD M., 1979. Mutagenicity and transformation by recycled water. *J. Total Environ. Health* 5, 663-670.
- HAYASHI M., KISHI M., SOFUNI T., ISHIDATE M., 1988. Micronucleus test in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food Chem. Toxicol.* 26, 487-500.
- HORTH H., FIELDING M., JAMES C., JAMES H., GWILLIAM R., 1991. Identification of mutagens in drinking water. (EC 9105 SLD) DoE 2489-M(P). Water Research Centre, Marlow, Bucks, United Kingdom.
- IARC, 1991. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the

Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Volume 52: chlorinated drinking water; chlorination by-products; some other halogenated compounds; cobalt and cobalt compounds. Lyon, France.

- JAYLET A., GAUTHIER L., FERNANDEZ M., 1987. Detection of mutagenicity in drinking water using a micronucleus test in newt larvae (*Pleurodeles waltli*). *Mutagenesis* 2, 211-214.
- KOMULAINEN H., KOSMA V., VAITTINEN S., VARTAINEN T., KALISTE-KORHONEN E., LOTJONEN S., TUOMINEN R., TUOMISTO J., 1997. Carcinogenicity of the drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in the rat. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 848-856.
- KOOL H., VAN KREIJL C., VAN KRANEN H., 1981. The use of XAD resins for the detection of mutagenic activity in water. I. Studies with surface water. *Chemosphere* 10, 85-98.
- KOOL H., VAN KREIJL C., DE GREEF E., VAN KRANEN H., 1982. Presence, introduction and removal of mutagenic activity during the preparation of drinking water in the Netherlands. *Environ. Health Perspec.* 46, 207-214.
- KOOL H., VAN KREIJL C., 1984. Formation and removal of mutagenic activity during drinking water preparation. *Water Res.* 18, 1011-1016.
- KOOL H., VAN KREIJL C., VAN OERS H., 1984. Mutagenic activity in drinking water in the Netherlands. A survey and a correlation study. *Toxicol. Environ. Chem.* 7, 111-129.
- KOOL H., KUPER F., VAN HAERINGEN H., KOEMAN J., 1985. A carcinogenicity study with mutagenic organic concentrates of drinking water in the Netherlands. *Food Chem. Toxicol.* 23, 79-85.
- KOPFLER F., RINGHAND H., COLEMAN W., MEIER J., 1985. Reactions of chlorine in drinking water, with humic acids and in vivo. In: JOLLEY R. et al. (Eds.), *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Vol. 5, Lewis, Chelsea, MI, pp. 161-173.
- KOUDJONOU B., CROUE J.P., LEGUBE B., 1996. Formation des ions bromate lors de l'ozonation des ions bromure en présence de la matière organique. *Rev. Sci. Eau* 1996, 9, 231-245.
- KRONBERG L., 1994. Occurrence of mutagenic chlorohydroxyfuranones and related compounds in chlorinated treated water. *Colloque GRUTTEE Sous-produits de traitement et d'épuration des eaux*, 29-30 Septembre 1994, Poitiers, France.
- KUROKAWA Y., TAKAYAMA S., KONOSHI Y., HIASA Y., ASAHINA S., TAKAHASHI M., MAEKAWA A., HAYASHI Y., 1986. Long term in vivo carcinogenicity tests of potassium bromate, sodium hypochlorite, and sodium chlorite conducted in Japan. *Environ. Health Perspec.* 69, 221-235.
- LE CURIEUX F., MARZIN D., ERB F., 1994. Study of the genotoxic activity of five chlorinated propanones using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test. *Mutat. Res.* 341, 1-15.
- LE CURIEUX F., GILLER S., GAUTHIER L., ERB F., MARZIN D., 1995a. Study of the genotoxic activity of six halogenated acetonitriles using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test. *Mutat. Res.*, 341, 289-302.
- LE CURIEUX F., GAUTHIER L., ERB F., MARZIN D., 1995b. Use of the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test to study the genotoxicity of four trihalomethanes. *Mutagen.* 10, 333-341.
- LE CURIEUX F., GILLER S., MARZIN 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. *Rev. Sci. Eau* 1996, 9, 75-95.
- LE CURIEUX F., MUNTERT T., KRONBERG L., 1997. Identification of adenine adducts formed in reaction of calf thymus DNA with mutagenic chlorohydroxyfuranones found in drinking water. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1180-1185.
- LERDA D., 1994. Sister chromatid exchange (SCE) among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Mutat. Res.* 312, 111-120.
- LOPER J., LANG D., SCHOENY R., RICHMOND B., GALLAGHER P., SMITH C., 1978. Residue organic mixtures from drinking water show *in vitro* mutagenic and transforming activity. *J. Toxicol. Environ. Health* 4, 919-938.

- LUCAS S., 1985. GC/MS analysis of organics in drinking water concentrates and advanced waste treatment concentrates. U.S. EPA Report NTIS n° PB 85-128213.
- MA T., ANDERSON V., HARRIS M., NEAS R., LEE T., 1985. Mutagenicity of drinking water detected by the *Tradescantia* micronucleus test. *Can. J. Genet. Cytol.* 27, 143-150.
- MARUOKA S., YAMANAKA S., 1980. Production of mutagenic substances by chlorination of waters. *Mutat. Res.* 79, 381-386.
- MCCANN J., HORN L., KALDOR J., 1984. An evaluation of Salmonella (Ames) test data in the published literature: application of statistical procedures and analysis of mutagenic potency. *Mutat. Res.* 134, 1-47.
- MEIER J., LINGG R., BULL R., 1983. Formation of mutagens following chlorination of humic acid: a model for mutagen formation during drinking water treatment. *Mutat. Res.* 118, 25-41.
- MEIER J., 1988. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutat. Res.* 196, 211-245.
- MILLER R., KOPFLER F., CONDIE L., PEREIRA M., MEIER J., RINGHAND H., ROBINSON M., CASTO B., 1986. Results of toxicological testing of Jefferson Parish pilot plant samples. *Environ. Health Perspec.* 69, 129-139.
- MOORE L., SMITH A., HOPENHAYN-RICH C., BIGGS M., KALMAN D., SMITH M., 1997. Micronuclei in exfoliated bladder cells among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6, 31-36.
- MORLAY C., 1991. Action du sulfite de sodium sur l'activité mutagène de solutions de substances humiques et d'eaux de surface chlorées. Application à la déchlorination des eaux potables. Thèse de doctorat, Université de Poitiers, n° 463.
- MORRIS R., AUDET A., ANGELILLO I., CHALMERS T., MOSTELLER F., 1992. Chlorination, chlorination by-products and cancer: a meta analysis. *Am. J. Public Health* 82, 955-963.
- MORRIS R., 1995. Drinking water and cancer. *Environ. Health Perspec.* 103 suppl. 8, 225-231.
- NAKAJIMA M., KITAZAWA M., OBA K., KITAGAWA Y., TOYODA Y., 1989. Effect of route administration in the micronucleus test with potassium bromate. *Mutat. Res.* 223, 399-402.
- NAZAR M., RAPSON W., 1982. pH stability of some mutagens produced by aqueous chlorination of organic compounds. *Environ. Mutagen.* 4, 435-444.
- OMS, 1994. Organisation Mondiale de la Santé. Directives de Qualité pour l'Eau de Boisson. 2^e édition, Vol. 1: Recommandations. Genève, 1994.
- RINGHAND H., MEIER J., KOPFLER F., SCHENCK K., KAYLOR W., MITCHELL D., 1987. Importance of sample pH on the recovery of mutagenicity from drinking water by XAD resins. *Environ. Sci. Technol.* 21, 382-387.
- ROOK J., 1974. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treatment and Examination* 23, 234-243.
- ROSSMAN T., MOLINA M., MEYER L., 1984. The genetic toxicology of metal compounds. I. Induction of lambda prophage in *E. coli* WP2s(). *Environ. Mutagen.* 6, 59-69.
- SCARPATO R., MIGLIORE L., BARALE R., 1990. The micronucleus assay in *Anodonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenicity. *Mutat. Res.* 245, 231-237.
- SCHWARTZ D., SAXENA J., KOPFLER F., 1979. Water distribution system, a new source of mutagens in drinking water. *Environ. Sci. Technol.* 13, 1138-1141.
- SCULLY F., HOWELL G., KRAVITZ R., JEWELL J., 1988. Proteins in natural waters and their relation to the formation of chlorinated organics during water disinfection. *Environ. Sci. Technol.* 22, 537-542.
- SIMMON V., KAUKANEN K., TARDIFF R., 1977. Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water. In: Scott, Bridges, Sobels (Eds.), *Progress in Genetic Toxicology*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 249-258.
- SMEDS A., VARTIAINEN T., MÄKI-PAAKKANEN J., KRONBERG L., 1997. Concentrations of Ames mutagenic chlorohydroxyfuranones and related compounds in drinking waters. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1033-1039.

- TSEZOU A., KITSIOU-TZELI S., GALLA A., GOURGIOTIS D., PAPAGEORGIOU J., MITROU S., MOLYBDAS P., SINANIOTIS C., 1996. High nitrate content in drinking water: cytogenetic effects in exposed children. *Arch. Environ. Health* 51, 458-461.
- WILCOX P., WILLIAMSON S., 1986. Mutagenic activity of concentrated drinking water samples. *Environ. Health Perpec.* 69, 141-149.
- WILCOX P., WILLIAMSON S., LODGE D., BOOTMAN J., 1988. Concentrated drinking water extracts, which cause bacterial mutation and chromosome damage in CHO cells, do not induce sex-linked recessive lethal mutation in *Drosophila*. *Mutagenesis* 3, 381-387.