

음용수의 변이원성에 관한 조사 연구

박지인 · 유춘만* · 위인선*

한국수자원공사, *전남대학교 자연과학대학 생물학과

Study on the Mutagenicity of Drinking Water

Ji-In Park, Chun-man Yu* and In-sun Wui*

Korea Water Resources Corporation

*Department of Biology, Natural Science college, Chonnam National University

ABSTRACT

This is a study on the risk assessment of drinking water using mutagenicity testing. The tests have been carried with the raw water, treated water, and drinking water (tap water) in Kwangju and Mokpo areas. The Ames preincubation test was carried concentrating samples using by Sep-Pak PLUS cartridges in *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98. The samples were tested with several chemical water quality analysis. The THMs have not been measured in raw water, but measured treated water and tap water at a value of 7.135~12.473 µg/l. It was observed that the number of revertants colonies increased in treated water and tap water on TA100 without S9 and showed weak mutagenicity on TA98 without S9. Indirect mutation was not seen in TA100 and TA98 with S9. The results indicated that formed substances of treatment process's of water that increased mutagenicity.

Keywords : Mutagenicity, Ames test, Drinking water

I. 서 론

최근들어 상수원수의 오염이 심각해짐에 따라 수도수의 안전성에 대한 관심이 고조되고 있다. 발암물질로 알려져 있는 trihalomethane이 염소 처리된 수도수에서 발견되고,¹⁾ 1974년 미국 New Orleans 수도수의 음용자와 암사망률 사이에 높은 상관관계를 가지고 있다는 역학조사 결과가 발표되면서²⁾ 음용수의 안전성에 대한 문제가 대두되었고 음용수의 위해성에 대한 논란이 증대되고 있다. 또한 세계 각국에서 음용수의 유독성 미량 오염물질의 조사연구와 안전성 평가가 새로이 이루어지고 있으며, 염소소독에 의해 humic substance들로부터 여러가지 유해물질이 생성된다는 것³⁾이 알려지면서 정수과정에 실시하는 염소 소독에 대한 문제점이 대두되었다.⁴⁾ 또, 복합 물질인 경우 화학적 분석 결과 예측되는 독성과 생물학적 검정 결과와는 크게 차이가 있기 때문에 복합 물질의 독성 평가시에는 생물학적 검정 방법의 도입이 필수적으로 필요하다.⁵⁾

특히 저농도에서 장기간 섭취가 문제시 되는 유전자 독성을 평가하기 위해서는 간편한 bioassay법을 병용해야 하는데, 이러한 안전성 평가는 실험 동물을 이용한 발암성(carcinogenicity)의 파악으로 이루어지며 이는 막대한 비용과 시간을 필요로 한다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 Ames 등⁶⁾은 약 300여종의 화학 물질에 대해 돌연변이원성(mutagenicity)을 검색하여 발암성과의 상관을 분석한 결과 83%의 상관을 보였다고 보고하고 이런 발암성의 예비 검색 방법으로서, 돌연변이시험 이용가능성을 제시하였다. 또한 Vartiaine⁷⁾과 浦野 등⁸⁾이 수도수의 변이원성에 대한 실험 방법을 연구하기 시작하면서 수도수의 안전성에 더욱 관심이 커지기 시작했다. Kool 등⁹⁾은 Netherlands에서 여러가지 정수처리 과정을 거친 수도수를 대상으로 변이원성 실험을 실시하여 염소처리 정수과정을 거친 수도수에서 직접 돌연변이가 일어난다고 보고하였다. 高梨 등¹⁰⁾은 염소첨가에 의해 변이원성이 발견된 물질의 양을 측정하기 위해 변이원성 생성능을 측정하고 이

것을 측정할 무렵의 전구물질과 염소와의 반응시간, 염소 첨가량 및 시료수의 TOC 농도의 영향에 대해 보고하였다. 또한, 松田 등¹¹⁾은 사람 배양세포의 DNA 단편을 측정에 이용하여 수도수 중의 DNA 손상성을 평가하였으며, 木苗¹²⁾는 수도수의 추출물을 가지고 CHO·K1세포를 이용하여 염색체 이상 유발에 대해 보고하였다.

변이원성 시험방법은 소량의 검체로도 시험할 수 있고, 비교적 고감도이고, 재현성이 높고, 비용이 싸다는 등의 잇점이 있기 때문에 화학 약품이나 식품 첨가물, 화장품 등에는 이미 전 세계적으로 많이 사용되고 있다.

이러한 견지에서 수도수의 안전성 척도 판별의 한 방법으로 광주와 목포지역의 수도수와 정수처리수, 정수처리 전의 원수에 대해 최근 많이 사용되고 있는 시험 방법 중 공시 균주인 *Salmonella typhimurium* 중에서 가장 민감도가 뛰어난 TA100, TA98균주로 직접, 간접 돌연변이유발을 보는 Ames 변이원성 시험을 실시하여 그 얻어진 결과를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 조사지점

실험에 사용한 시료는 광주 용연정수장으로 공급되어지는 동북호의 원수, 용연정수장의 정수처리수, 용연정수장에서 공급하는 광주시 가정의 수도수(관말수), 주암호에서 덕남정수장으로 공급되어지는 주암호의 원수, 덕남정수장의 정수처리수, 덕남정수장에서 공급되는 광주시 가정의 수도수(관말수), 영산강에서 취수되고 있는 몽탄정수장의 정수처리 전의 원수, 정수처리수, 몽탄 정수장에서 공급되는 목포시 가정의 수도수(관말수)를 1994년 7~8월에 채수하였다.

2. 이화학적 수질분석

이화학적 환경요인을 파악하기 위하여 화학적 산소요구량, 인산성인, 총 인, 암모니아성 질소, 트리할로메탄농도, A260, 총 유기탄소, 잔류염소의 농도를 측정하였다.

3. 변이원성 시험

1) 시약

D-biotin, L-Histidine HCl(monohydrate), G-6-P(Monosodiumsalt), NADP, DMSO(Dimethylsul-

foxide)는 Sigma Chemical Co.(St.Louis, MO, U.S.A.)에서 Bacto nutrient broth, bacto agar는 Difco laboratories(Detroit, Michigan, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

2) 시료의 추출

(1) 흡착제

흡착제는 三氯化成製의 MCI Gel CSP800을 일본 Millipore Co.(Waters)가 내용적 2 ml의 cartridge에 충전해서 Sep-Pak PLUS(Long) CSP800 cartridges로 시판되는 것과, Millipore Co.(Waters U.S.A.)에서 시판하고 있는 Sep-Pak PLUS tC18 Environmental cartridge(EPA method 525)를 이용하였다.

(2) 시료수의 농축

채수한 시료를 4°C로 유지하면서 실험실로 운반하여 pH를 2로 조정하면 흡착효과가 뛰어나다고 보고되고 있으므로¹³⁾ 5N HCl로 pH를 2로 조정 후 하나의 cartridge당 2l의 용량을 통수하였다. 즉, conditioning된 cartridge를 20 ml의 pure water로 50 ml/min의 유속으로 washing 후 시수를 50 ml/min의 유속으로 MASTER FLEX(cole-parmer instrument, Co)를 이용하여 통수하였다. 통수를 마친 cartridge에 0.15 ml/min의 유속으로 DMSO(Dimethylsulfoxide)를 통수하여 2 ml를 용출시켰다(peristaltic pump(2332 Microperpex S peristaltic pump)]. 용출된 시료를 유기용매에 내성이 있는 Membrane Filter로 여과 멸균하여 즉시 시험할 수 없는 경우에는 -30°C에서 보관 후 실험을 실시하였다.¹³⁾

3) 사용균주

실험에 사용된 *Salmonella typhimurium* TA100과 TA98 균주는 유전 공학 연구소로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 이들 균주는 모균의 histidine operon에서 돌연변이된 것으로 histidine 요구성, deep rough(*rfa*) 돌연변이, *uvrB* 돌연변이, R-factor 등의 유전형질을 확인, 검정하여 사용하였다.

4) S-9 조제

Indirect mutagene을 활성화시키기 위하여 Maron과 Ames 방법(1983)에 따라 rat의 간 microsomal enzyme mixture인 S-9을 조제하였다.

(1) S-9 mixture

S-9 fraction(10%)을 MgCl₂(8 μmol), KCl(33 μmol), glucose-6-phosphate(5 μmol), NADP(4 μmol), Sodium phosphate buffer(pH 7.4, 100 μmol)로 S-9 mixture를 제조하였다.

5) Mutagenicity test

실험에 사용된 preincubation test⁶⁾는 S9 mix 0.5 ml(indirect mutagene인 경우) 혹은 인산 완충액 0.5 ml(direct mutagene인 경우), 하룻밤 배양된 균주 (1×10^9 cell/ml) 0.1 ml, 시료 0.1 ml를 testitube에서 가볍게 vortex한 후 37°C에서 30분간 예비 배양하였다. 45°C의 top agar(0.5 mM bio/his 첨가) 2 ml씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant 숫자를 계수하였다. 음성대조에는 DMSO를, 양성대조에는 S-9 무첨가시에는 4NQO를, S-9 첨가시에는 2AF를 처리하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 이화학적 환경요인

광주와 목포지역의 정수장을 중심으로 원수와 정수처리수, 정수장에서 공급되는 관말수(수도수)에 대한 수질분석을 행하였다. 조사지점을 대상으로 유기물의 총괄적인 농도를 구하기 위하여 A260과 총 유기탄소 농도를 측정하고 THMs 농도와 화학적 산소요구량, 잔류염소 농도를 측정하였으며, 영양염류로는 인산성 인, 총 인, 암모니아성 질소의 환경적 요인을 분석한 결과는 Table 1과 같다.

2. 변이원성 실험 결과

Ames 변이원성 시험은 신규 화학물질의 안전성 평가와 환경독성의 평가에 광범위하게 이용되고 있다. 이 실험 방법에는 그 검출한계를 음성대조와 비교하여 음성대조 물질의 revertant colony수보다

2배 이상의 revertant colony수의 증가가 있으면 양성으로 보는 2배법이 많이 이용되었지만,^{13,14)} 이것에도 명확한 근거는 없고 약한 변이원성을 검출할 수는 없으므로 $MR \leq 1.4$ ($MR = \text{시료의 복귀 Colony수} / \text{음성대조 Colony수}$)이면 변이원성이 인정되지 않는 것으로 판단하였다.⁸⁾

실험에 사용한 TA100과 TA98균주는 다른 균주들에 비해 R factor plasmid에 의해 많은 carcinogens을 감지하여 test의 민감도가 크게 증가한 종으로,¹⁵⁾ R-factor는 mutagens에 있는 mutagenesis를 증가시켜 error prone recombinational repair를 통해 효과적으로 복귀시킨다. 또한 생물학적 활성을 나타내는 물질대사를 요구하는 검체를 실험하기 위해 Aroclor 1254를 처리한 백쥐의 간에서 추출한 S9을 체내 대사활성화계를 모방하기 위해 보편적으로 사용하며 간접돌연변이 물질을 검색하는데 이용하였다. 광주지역과 목포지역의 원수, 정수처리수, 관말수에 대해 Sep-Pak PLUS CSP800 cartridge를 사용하여 변이원성 실험을 실시한 결과와 Sep-Pak PLUS tC18 Environmental cartridge를 사용하여 실험한 결과는 *Salmonella typhimurium* TA 100-S9에서 원수에서는 변이원성이 거의 나타나지 않았으며 정수처리수와 관말수에서 나타나는 비슷한 양상을 보였으며, 변이원성 물질의 회수율이 CSP800의 경우가 tC18보다 우수하다는 것이 인정되었다. CSP800을 사용하여 실험한 *Salmonella typhimurium* TA100에서 S-9을 처리하지 않은 직접돌연변이는 원수에 있어 몽탄의 경우 209 ± 28 , 용연의 경우 187 ± 38 , 덕남의 경우가 184 ± 25 로 음성대

Table 1. Environmental parameters on each sampling sites

Parameter Site	TOC mg/l	A260 10 mm ⁻¹	THMs µg/l	NH ₃ -N mg/l	Resi. Cl mg/l	COD mg/l	PO ₄ -P mg/l	T-P mg/l
*YONG. R	3.968	0.060	-	0.208	0.04	4.0	0.0064	0.031
YONG. T	1.685	0.025	8.400	0.076	0.60	2.0	0.0063	0.009
YONG. D	1.385	0.015	8.139	0.043	0.30	1.6	0.0016	0.013
DUCK. R	3.010	0.034	-	0.186	0.04	4.0	0.0016	0.019
DUCK. T	1.711	0.015	7.298	0.069	0.56	1.8	0.0016	0.025
DUCK. D	1.634	0.018	7.135	0.066	0.28	1.4	0.0031	0.035
MONG. R	5.037	0.073	-	0.136	0.05	4.4	0.0048	0.018
MONG. T	3.003	0.029	12.473	0.044	0.70	2.4	0.0032	0.017
MONG. D	2.007	0.021	10.885	0.097	0.30	1.6	0.0031	0.029

*YONG. R: Raw water in Yongyeun, YONG. T: Treated water in Yongyeun, YONG. D: Drinking water in Yongyeun, DUCK. R: Raw water in Ducknam, DUCK. T: Treated water in Ducknam, DUCK. D: Drinking water in Ducknam, MONG. R: Raw water in Mongtan, MONG. T: Treated water in Mongtan, MONG. D: Drinking water in Mongtan.

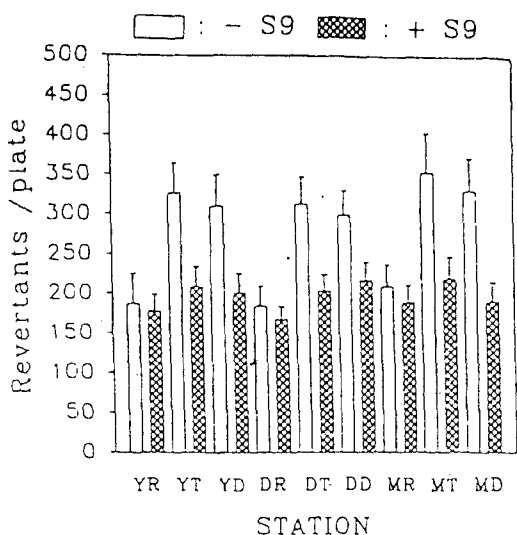


Fig. 1. Mutagenicity of concentrated water from Kwangju and Mokpo used by CSP800 ctrygies on TA100.

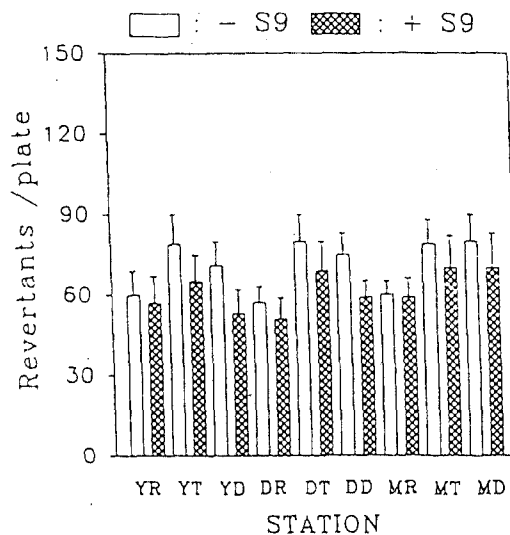


Fig. 3. Mutagenicity of concentrated water from Kwangju and Mokpo used by CSP800 ctrygies on TA98.

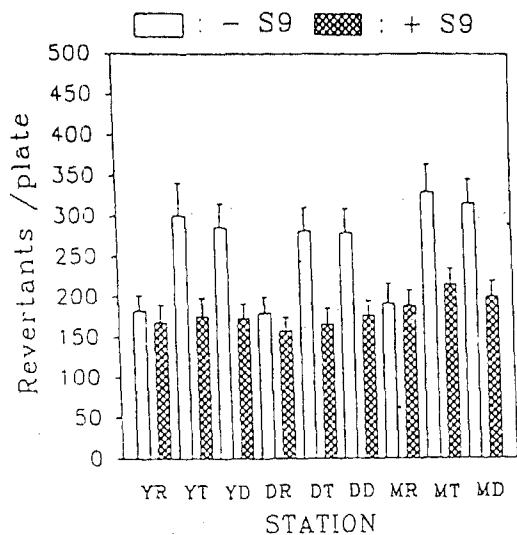


Fig. 2. Mutagenicity of concentrated water from Kwangju and Mokpo used by tC18 ctrygies on TA100.

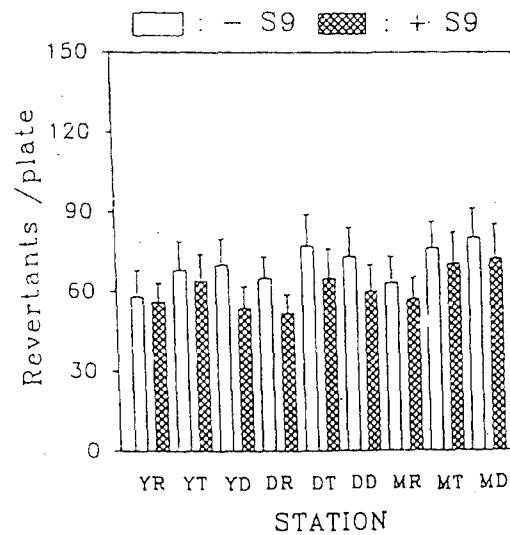


Fig. 4. Mutagenicity of concentrated water from Kwangju and Mokpo used by tC18 ctrygies on TA98.

YR: Raw water in Yongyeon, YT: treated water in Yongyeon, YD: Drinking water in Yongyeon, DR: Raw water in Ducknam, DT: Treated water in Ducknam, DD: Drinking water in Ducknam, MR: Raw water in Mongtan, MT: Treated water in Mongtan, MD: Drinking water in Mongtan.

조 복귀 돌연변이수 163 ± 17 에 비해 증가하지 않았다. 정수처리수의 경우는 몽탄이 353 ± 43 , 용연이 327 ± 38 , 덕남이 313 ± 34 로, 관말수가 몽탄의 경우

330 ± 41 , 용연의 경우 310 ± 40 , 덕남의 경우가 299 ± 31 로 모든 지역에서 원수에 비해 상당한 증가를 나타냈으며 S-9을 처리한 간접돌연변이는 모든

지역에서 나타나지 않았다. CSP800을 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98에서 용연원수에서의 직접 돌연변이는 plate당 colony수가 용연 원수가 60 ± 9 , 덕남원수가 57 ± 6 , 몽탄원수가 60 ± 5 로 음성대조 복귀 돌연변이수 44 ± 7 보다 별다른 증가를 나타내지 않았다. 용연 정수처리수는 79 ± 11 , 덕남 정수처리수는 80 ± 10 , 몽탄정수처리수는 79 ± 9 로 나타나 원수에서 변이원성이 나타나지 않은 것과는 달리 약간의 증가를 나타내었으나 변이원성의 정도는 약하였다. 관말수의 경우는 용연정수장의 관말수가 71 ± 9 , 덕남정수장의 관말수가 75 ± 8 , 몽탄정수장의 관말수가 80 ± 10 으로 나타나 정수처리수와 거의 비슷한 수준의 약한 변이원성을 나타내었다. 직접돌연변이 유발이 정수처리수와 관말수가 원수에 비해 약간 증가하는 약한 변이원성을 나타냈으며, *Salmonella typhimurium* TA100에서와 마찬가지로 간접돌연변이는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 정수과정에서 생성되는 유해물질들은 직접돌연변이만을 일으킨다는 Kool 등³⁾의 결과와 같았다. 中塚克彦 등¹⁶⁾은 수도수 유기농축물의 *Salmonella typhimurium* TA100(S-9)에 대한 일본 각 지역의 정수처리수에 대한 변이원 실험 결과로 수도수의 변이원성을 확인하였다. 田中 浩 등¹⁷⁾은 일본 新潟縣내에 있는 수도수와 하천수에 대해 TA100균주로 실험을 하여 20개시의 26개 정수장중 23개에서 변이원성이 나타남을 보았으며 THMs의 농도가 높은곳에서 변이원성이 높게나타남을 확인하였다. 浦野紘平 등¹³⁾도 XAD-2, XAD-4, CSPS00 수지를 가지고 TA100 균주에 대한 수도수의 변이원성에 대한 보고에서 CSP800 cartridge가 가장 변이원의 흡착률이 뛰어났으며 TA100(S-9)에 대한 변이원이 나타난다고 보고하였다. Kool 등³⁾은 Netherlands지역의 음용수에 대한 변이원성에 관한 연구에서 염소소독과의 관계를 살펴보면서 대부분의 경우 지표수가 염소처리 과정을 거치면서 직접 돌연변이원성이 증가한다고 보고하였다. 변이원성에 영향을 주는 유해물질로서 원수에서는 검출되지 않지만 정수처리수나 관말수에서 증가하는 것은 THMs의 농도와 관계가 있는것으로 추정할 수 있다. THMs은 원수에 포함되어 있던 유기물질이 정수처리과정에서 실시하는 염소소독에 의해 생성되는 것으로 밝혀졌다.¹³⁾ TOC나 A260의 값이 높은곳에서 THMs생성률이 높았는데 이것은 수중의 유기물질이 THMs의 생성원인물질로 보고되었다.^{18,19)} THMs중 특히 chloroform은 동물실험결과발암성이 인정되었

으며 인간에게서도 발암가능성이 밝혀졌으며³⁴⁾ THMs이 변이원성에 영향을 준다는것이 많은 연구자들에 의해 보고되었다. 또한 MX(3-chloro-4(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-fluranone)는 *Salmonella typhimurium* TA100-S9을 이용한 Ames시험에서 1 nmole당 4,000~13,000의 복귀콜로니를 유발시켜 수도수의 총 변이원성에 대한 기여율이 10~50%에 달하는 것으로 보고 되었다.²⁰⁾ TOX(Total Organic Halogen)도 정수장에서 생성되는 발암성 물질로서 THM의 약 4~5배의 양이 생성된다고 알려져 있다.²¹⁾ Coleman 등²²⁾ 또한 역삼투(reverse osmosis)방법으로 수도수로부터 오염물질을 농축하여 그중에서 약 460가지의 돌연변이원성 미량 유기오염물질을 파악하였다. 근래에 들어 염소소독에 의한 유해물질 생성에 따른 건강상 위해성을 제거하기 위하여 많은 연구와 노력이 있어 왔다. 특히 수질오염 물질을 감소시키기 위해 염소와 병행하거나 또는 대체소독제를 사용하는 방법이 제시되고 있다. 본 연구는 정수처리에서 형성되는 물질이 변이원성을 일으키는것을 주로 살펴보았는데 앞으로 변이원성에 영향을 주는 유해물질 등에 대한 연구와 변이원을 감소시키기 위한 정수처리방법의 개발에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다. 또한 수도수의 종합적인 안전성 척도의 한 방법으로 Ames 변이원성시험을 새로운 bioassay법의 하나로 실시하여도 좋으리라 생각된다.

IV. 결 론

음용수의 안전성에 대해 연구할 목적으로 광주와 목포지역을 중심으로 원수와 정수처리수, 수도수(관말수)에 대해 변이원성실험을 실시하였다. Sep-Pak PLUS cartridges를 이용하여 시료를 농축하여 공시균주 *Salmonella typhimurium* TA100과 *Salmonella typhimurium* TA98 균주에 대하여 음용수의 안전성 검사법으로 국제적으로 활용하고 있는 Ames preincubation test를 실시하였다. 그 결과 수도수와 정수처리수는 TA100에서 직접 돌연변이가 나타났으나 원수에서는 변이원성이 나타나지 않았다. TA98에 있어서는 직접 돌연변이 유발은 약하게 나타났다. 또, 수도수와 정수처리수, 원수 모두 TA100과 TA98 모두 간접 돌연변이는 나타나지 않았다. 이러한 결과로써 정수처리 과정에서 생성되는 물질들이 변이원성을 일으키는 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) Bellar, T.A., Lichtenberg, J.J. and Kroner, R.C.: The occurrence of organohalides in chlorinated drinking water, *J. AWWA*, **66**, 703-706, 1974.
- 2) Page, T., Harris, R.H. and Epstein, S.S.: Drinking water and cancer mortality in Louisiana, *Science*, **193**, 55, 1976.
- 3) Rook, J.J.: Production of potable water from highly polluted river, *Water Treatment and Examination*, **23**, 234, 1974.
- 4) Weisburger, E.K.: Carcinogenicity studies on halogenated hydrocarbins, *Environ. Health Perspec.*, **21**, 7, 1977.
- 5) Miller, W.E., S.A. Peterson, J.C. Green and C.A. Callahan: Comparative Toxicology of Laboratory Organisms for Assessing Hazardous waste-sites, *J. Environ. Qual.*, **14**, 569-574, 1985.
- 6) Joyce McCANN, and Bruce N. Ames: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300chemicals: Discussion, *Proc. Nat. Acad. sci. U.S.A.*, **73**, 950-954, 1976.
- 7) T. Vartianen and A. Limatainen.: High levels of mutagenic activity in chlorinated drinking water in Finland. *Mutation Res.*, **169**, 29-34, 1986.
- 8) 浦野紘平, 高梨哲和, 金澤伸浩, 藤江幸一: 水道水のAmes變異原性に關する研究 第1報 變異原性物質濃縮回收用の吸着劑, 水環境學會誌, **17**, 451-460, 1994.
- 9) Kool, H.J., Van Krwijil, C.F. and Van Oers, H.: Mutagenic activity in drinking water in the Netherlands. A survey and a correlation study, *Toxicol. Environ. Chem.*, **7**, 111-129, 1984.
- 10) 高梨哲和, 岡部文枝, 藤江幸一, 浦野紘平: 高度淨水處理による變異原性の變化, 第27回 日本水環境學會年會講演集, 458-459, 1993.
- 11) 松田三郎, 山田春美, 仙波節明, 紺野貴史, 瀧上英孝: 疎水性微量汚染物質のDNA毒性總合評價(Rec-assay), 環境技術, **23**, 81-85, 1994.
- 12) 木苗直秀: 水道水中の強力な變異原物質 "MX", 和光純藥時報, **62**, 5-7, 1994.
- 13) 浦野紘平, 高梨哲和, 岡部文枝, 金澤伸浩, 藤江幸一: 水道水のAmes變異原性に關する研究 第2報 高性能吸着劑を用いた變異原性物質の濃縮 回收方法, 水環境學會誌, **17**, 461-469, 1994.
- 14) 이성규, 심점순: 어류, Daphnia 및 조류와 Ames Test를 이용한 산업 폐수의 환경 독성 및 유전독성 평가, **7**, 100-109, 1991.
- 15) Joyce McCANN, Edmund Choi, Edith Yamasaki, and Bruce N Ames: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome system, *Bull. Nat. Acad. sci. USA.*, **72**, 5135-5139, 1975.
- 16) 中室克彦, 佐谷戸安好: 淨水處理における變異原物質の毒性評價, 水環境學會誌, **16**, 847-853, 1993.
- 17) 田中一浩, 守田康彦, 高橋敬雄: 新潟縣内の水道水, 河川水の變異原性について, 水環境學會誌, **16**, 657-665, 1993.
- 18) 高梨哲和, 藤江幸一, 浦野紘平: 水試料のAmes變異原性試驗結果の總計的解析, 第28回 日本水環境學會年會講演集, 764-765, 1994.
- 19) 相澤貴子: 鹽素處理による消毒副生成物の生成特性, 水環境學會誌, **16**, 830-835, 1993.
- 20) Meier, J.R., Ringhand, H.P., Coleman, Munch, J. W., Streicher, R.P., Kaylor, W.H. and Schenck, K.M.: Identification of mutagenic compounds formed during chlorination of humic acid *Mutation Res.*, **157**, 111-122, 1985.
- 21) 中西準子: いのちの水, 讀賣新聞社, 1990.
- 22) Coleman WE: Gas chromatography/Mass spectroscopy analysis of mutagenic extracts of aqueous chlorinated humic acid, A comparison of the by-products to drinking water contaminants, *Environ. Sci. Techol.*, **18**, 674-681, 1984.