

## 수질관리와 수처리에의 독성시험의 응용

# An Application of Toxicity Test to Water Management and Water Treatment

김 범 수

Berm-Soo Kim\*

한국수자원공사 수자원연구원 국제상하수도연구소

(2005년 7월 29일 논문 접수; 2005년 10월 9일 최종 수정논문 채택)

### Abstract

In this research, we tried to develop the application method to water management and treatment using toxicity test method.

When we measure the toxicity of environmental samples, we have to decide whether we take some countermeasures to reduce the toxicity or not. The first issue is how to set these action levels in each bioassays. A new idea was attempted to authorize indirect approach of each bioassays through the response characteristics against mixture of chemicals in water quality standard. The significant response in the cell-growth-inhibition bioassay was detected for standards-mixture(STDs). For acute toxicity assay, STDs-based implicit correlation between risks to humans and bioassay data showed a rational approach to set action levels in practical management.

A simple model was proposed to describe and predict the changes in the total toxicity based on the concentrations of toxic-controlling chemicals during the ozonation of landfill leachates. On the basis of this simple model, toxicity reduction was predicted for pre-aggregation treatment before ozonation and ozone concentration during the ozonation. The method proposed in this study would be useful in optimizing water treatment processes and their running conditions in terms of the toxicity reduction efficacy.

**Key words:** cell-growth-inhibition bioassay, standards-mixture(STDs), ozonation, toxicity reduction efficacy

**주제어:** 세포성장저해 시험, 수질기준물질-혼합물, 오존산화, 독성삭감효과

## 1. 서 론

미래의 환경관리를 고려해보면 작금의 화학물질

특이적인 관리는 많은 문제점과 제약이 따른다. 첫 번째로 가까운 미래에는 화학물질의 수는 계속 증가할 것이기 때문이다. 이와 같은 현상을 해결하기 위해서는 끊임없는 새로운 환경기준을 설정해야만 한

\*Corresponding author Tel: +82-42-860-0384, Fax: +82-42-860-0399, E-mail: ddvpozne@yahoo.co.kr (Kim, B.S.)

다. 실제로 매립지 침출수에 대한 화학분석으로 총유기탄소농도에 대해 1% 미만밖에 분석할 수 없었다는 보고도 있다(Yasuhara 등, 1999). 둘째로는 여러 화학물질에 동시에 노출되는 경우 이에 대한 평가를 할 수 없고, 셋째로 내분비계장애활성과 같은 새로운 독성 매카니즘의 출현이 그 이유이다.

한편 보편적인 화학분석에 대해 생물검정법(Bioassay)은 몇 가지 장점을 가지고 있다. 그것은 특이 생물체에 대한 여러 가지 형태의 생물학적인 응답에 기초를 두고 있다. 첫째로 여러 화학물질에 대해 동시에 노출되는 경우에도 생물활성의 삭감정도를 가지고 평가 할 수 있다. 둘째로 독성이 알려지지 않은 화학물질에 대해서도 그 활성의 삭감으로 평가 할 수 있다. 그러나 생물검정법의 큰 제약은 생물검정법 데이터와 사람이나 생태계에 대한 위험레벨사이의 입증된 관계가 없다는 것이다. 그것은 아주 어려운 문제로 생각되어지고 가까운 미래에도 해결될 것 같아 보이지는 않는다. 그러나 환경관리라는 실제적인 상황에서는 이와 같은 관계를 만들기 위한 차선책의 아이디어가 필요하다. 이와 같은 단점을 극복하기 위한 하나로는 환경수에 대한 독성을 측정했을 때 그 독성을 삭감시키기 위한 어떤 대책을 취해야 할지 말아야 할지의 기준(action level)을 정해야 한다. 그러니까 개개의 생물검정법에 있어서 이와 같은 기준을 어떻게 설정하느냐 하는 것이다.

두 번째로 실제 수처리에 있어서의 독성삭감평가에의 응용을 예로 들 수 있다. 여러 화학물질이 오염되어 그 전체의 독성을 무시할 수 없는 폐수를 처리할 때, 그 폐수의 독성을 대표하는 화학물질을 찾아낸다면 그에 적합한 수처리를 실시하면 간단히 해결되나 화학분석에 의해 그 원인 물질을 찾아내기는 상당히 어려운 일이다. 또한 수처리 과정에서의 형태변화로 인한 독성을 예측하기는 더욱 어려운 것이다. 이러한 독성원인물질의 동정이 어려운 상황에 생물검정법을 도입한다면 수처리의 결과로서 나타나는 전체 유출수의 독성을 유입수와 비교하여 독성의 삭감정도를 파악할 수 있을 것이다(USEPA, 1933, 1988). 이때 처리조건과 처리방법의 변동에 따른 독성삭감의 정도를 비교·분석함으로써 최적의 수처리 조건을 확립하는 데에도 기여할 수 있을 것이다.

유해화학물질은 공기나 물을 이용하여 인체내로

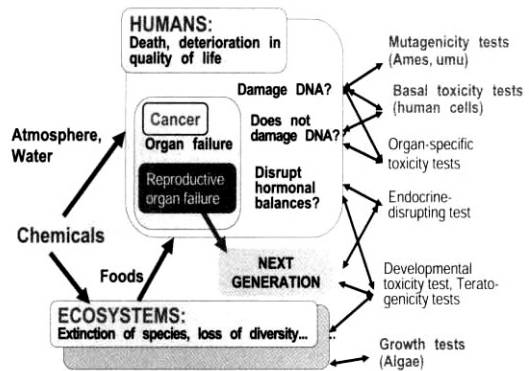


Fig. 1. Various toxicities and relevant bioassays.

흡수되고 생태계를 거쳐 식품을 통하여 인체내로 흡수된다(Sakai 등, 2001)(Fig. 1). 체내로 흡수된 후에는 DNA의 손상을 거쳐 암으로까지 발전하거나 장기 특이적인 독성을 나타내기도 하며, 호르몬체계를 교란시키기도 한다. 이러한 독성을 평가하기 위하여 발암성평가, 기초적인 독성평가, 내분비계 교란성평가 등이 개발되어 있다. 그 중 사람세포를 이용한 기초 독성평가는 사람세포를 이용하므로 인체에 대한 독성에 가장 신뢰할만한 결과를 주며, 세포대기관, 세포막, DNA에 대한 독성의 결과를 종합적으로 얻을 수 있다.

본 논문에서는 독성평가를 기초로 한 생물검정법을 수질관리와 수처리에 적용하는 방법을 제시하기 위하여, 사람정상세포를 이용한 세포독성시험을 이용하여 수질관리기준(action level)의 설정에 관한 기초적인 실험과 그 결과에 관해 논하고, 매립지 침출수를 모델 오염수로 하여 오존처리에 있어서의 세포독성의 변화를 기술하는 수리 모델을 작성·제안하고, 수리모델을 이용한 독성삭감을 위한 수처리 조건의 설정에 관해 그 유효성과 의의를 검토하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 표준혼합물 조제

Table 1의 일본 환경수질기준의 표준항목 및 감시 항목의 23종류의 혼합물을 조제하여 표준독성물질로 하였다(Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, 1993). 각 항목의 표준물질은 일본 Wako사의 제품을 구입하여 사용하였다. 이들 항목 중에서 시안, 알킬

**Table 1.** Japanese quality standard for environmental waters and chemicals in the STDs mixture.

Chemical or properties (23)	Standard	Mixture(20)
Cadmium	< 0.01 mg/L	•
Total cyanide	#	-
Lead	< 0.01 mg/L	•
Chromium(VI)	< 0.05 mg/L	•
Arsenic	< 0.01 mg/L	•
Total mercury	< 0.0005 mg/L	•
Alkyl mercury	#	-
PCB	#	-
Dchloromethane	< 0.02 mg/L	•
Carbon tetrachloride	< 0.002 mg/L	•
1,2-dichloroethane	< 0.004 mg/L	•
1,1-dichloroethylene	< 0.02 mg/L	•
cis-1,1-dichloroethylene	< 0.04 mg/L	•
1,1,1-trichloroethane	< 1 mg/L	•
1,1,2-trichloroethane	< 0.006 mg/L	•
Trichloroethylene	< 0.03 mg/L	•
Tetrachloroethylene	< 0.01 mg/L	•
1,3-dichloropropene	< 0.002 mg/L	•
Thiuram	< 0.006 mg/L	•
Simazine	< 0.003 mg/L	•
Benthocarb	< 0.02 mg/L	•
Benzene	< 0.01 mg/L	•
Selenium	< 0.01 mg/L	•

# should not be detected.

수는 그리고 PCB는 검출되지 않아야 하기 때문에 혼합물에 포함시키지 않고 20종류의 혼합물을 사용하였다. 위의 화합물들은 환경수에서 일상적으로 조사하고 그 농도 기준이 엄격히 지켜져야 될 항목들이고, 사람에게 대한 입증된 위해성 평가의 결과로 정해진 것이기 때문에 이 표준혼합물은 사람에게 대한 허용할 수 있는 최대의 독성을 암시적으로 나타내 준다고 할 수 있겠다.

이 혼합물을 환경기준의 0.001배에서 1000배까지의 농도로 첨가하여 세포독성의 변화를 관찰하였다.

## 2.2. 세포독성시험

세포독성시험은 사람정상 이배체세포인 TIG-1 세포를 사용하였다(Ohashi 등, 1980). 초기농도  $1 \times 10^4$  cells·cm<sup>-2</sup>로 96 well-plate에 접종하고 하루 동안 배양한 후, 모델수 및 각 시료수로 조제한 FBS 5% 첨가의 DME배지에서 3일간 더 배양하여, 세포내의 가수분해 효소인 Acid Phosphatase(AP)를 이용한 발색

반응으로 생 세포수를 측정했다(Connolly 등, 1986). AP를 이용한 발색반응시험이 생세포수와 높은 비례 관계를 보이며, MTT법이나 Tripa blue법보다 실험 절차가 간단하여 생세포수측정방법으로 채택하였다. 세포독성의 음성대조군으로 증류수로 조제한 FBS 5% 첨가의 DME배지를 사용하여 3일간 배양한 경우의 세포수(A<sub>0</sub>)와 각 시료수를 사용한 경우의 세포수(A)와의 비를 상대세포수로 하여, 세포독성(T)를 식(2-1)로 기술하였다.

$$\text{세포독성}(T) = 1 - (A/A_0) \quad (2-1)$$

## 2.3. 오존처리

해면매립처분장의 침출수를 저류하고 있는 조정지로부터 채취하여, 막여과로 SS성분을 제거한 모델 원수를 내경 5cm, 길이 20cm의 유리 칼럼에 200ml를 넣고, 이 칼럼에 오존발생기로 발생시킨 오존을 도입하여 오존처리를 하였다. 처리개시 후 일정시간마다 시료수를 채취하여 용존오존농도를 측정 한 후 공기폭기에 의해 잔류오존을 제거한 후 화학분석과 세포독성시험을 하였다.

## 2.4. 분자량분획과 화학분석

분리용담체로 Sepadex G-15와 G-75(Pharmacia)의 혼합 겔을 충전한 XK26/40칼럼(138cm<sup>3</sup>, Pharmacia)을 사용하여 겔 크로마토그래피에 의해 시료수 및 오존처리수에 포함된 유기물의 분자량분획을 하였다.

시료수중의 용존유기탄소(DOC)는 전유기탄소계(시마즈, TOC-5000)로 분석하였다. 용존오존농도는 Indigo법으로 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 세포독성시험에 의한 수질관리기준(Action level)의 설정

환경기준 표준혼합물에 대해 사람세포를 이용한 성장저해시험을 이용하여 급성독성시험을 하였다(Fig. 2). x축은 표준혼합물의 각각의 환경 기준치를 기준으로 하여 혼합한 혼합물의 농도를 나타내었다. 그 결과 환경기준의 10배 정도의 농도에서부터 세포독성이 관찰되었다. 이는 환경기준물질의 위험수준과

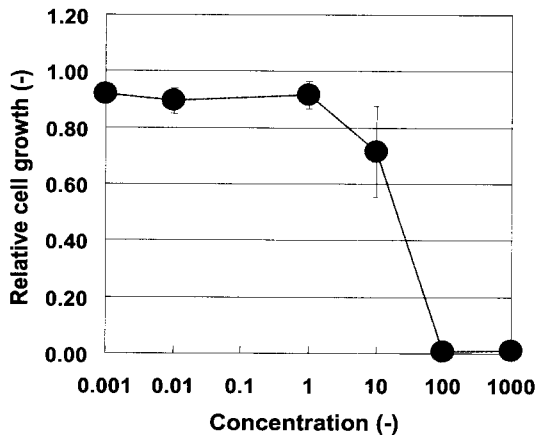


Fig. 2. Dose-responses in cell-growth-inhibition for standards mixture.

세포독성시험을 이용한 독성검출레벨사이의 함축적인 관계를 나타낸다고 할 수 있다. 그러므로 희석이나 농축을 하지 않은 어떤 환경수 시료에서 이와 같은 특이적인 응답이 관찰되었을 경우 그 독성레벨은 우리가 받아들일 수 있는 최대 위험수준을 초과한다는 것을 암시적으로 보여준다고 할 수 있다. 그러므로 아주 실제적인 상황에서 위와 같은 급성독성시험의 생물검정법에서 환경수 시료가 어떤 현저한 응답을 나타내는지 혹은 그렇지 않는지에 대해 생물검정법을 기준으로 한 환경관리로서의 action level의 척도를 세울 수 있을 것이다.

### 3.2. 세포독성시험을 이용한 독성사감평가

위에서 언급한 환경수가 무시할 수 없는 독성을 나타낼 때 그 독성을 제거하기 위한 조치를 취해야 할 것이다. 그 중 가장 효과적인 방법은 독성의 원인물질을 찾아내면 거기에 적합한 수처리를 행하면 될 것이다. 수많은 화합물에 오염된 환경수의 특성상 그것을 밝히는 것은 쉬운 일은 아닐 것이다. 그때 그 독성의 원인 물질은 모르지만 그 독성을 삭감시키기 위한 수처리 조건을 찾는 것은 하나의 해결책이 될 수 있을 것이다. 여기서는 모델 오염수에 대한 수처리, 특히 오존처리에 있어서 독성사감평가를 기본개념으로 한 수처리 조건의 확립을 위한 세포독성시험법의 응용방법을 고려해 보았다.

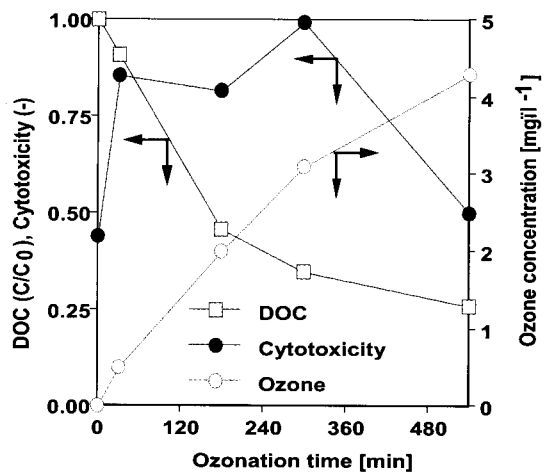


Fig. 3. Changes in DOC and cytotoxicity during ozonation.

#### 3.2.1. 모델 오염수에 대한 오존처리

Fig. 3은 매립지 침출수를 모델 오염수로 했을 때의 오존처리의 결과를 표시한 것이다. 용존유기탄소 농도는 오존처리경과 시간에 따라 일정하게 감소하다가 180분 이후부터는 감소율이 저하가 관찰되었다. 그때의 세포독성을 보면 초기에 50% 정도의 독성을 보이던 원수는 오존처리초기에 독성이 증가하여 300분 경과 후에는 가장 높은 독성을 나타내다가 그 후 감소되는 결과를 얻었다. 이와 같은 결과를 좀더 자세히 관찰하기 위하여 각 시간의 오존처리수를 분자량분획을 하고 그에 따른 독성을 분석한 것을 Fig. 4에 나타내었다. 오존처리에 따른 분자량의 변화를 보면 분자량 10000 부근의 고분자분획과 1000 부근의 중분자분획 그리고 100 부근의 저분자분획의 3분획을 보이던 원수는 오존처리에 따라 저분자화되어 가는 것을 관찰할 수 있었다. 오존처리수의 분자량분획한 시료에 대해 세포독성을 관찰한 결과 가장 높은 독성을 나타낸 300분 오존처리수에서 분자량 100 이하에서 아주 강한 독성을 나타내는 분획이 관찰되었다.

#### 3.2.2. 물질변화의 수리 모델화

위와 같은 기초적인 실험을 바탕으로 오존에 의한 산화분해에 의해 침출수의 물질변화를 다음과 같이 나누었다. 원수중에 포함된 비교적 큰 분자량 물질을 포함하는 물질군을  $L$ , 오존처리 초기에 독성증가를 보이는 미동정의 물질군을  $L'$  그리고 300분 처리에 의해 저분자가 세포독성을 지배하는 물질군  $L''$ 으로

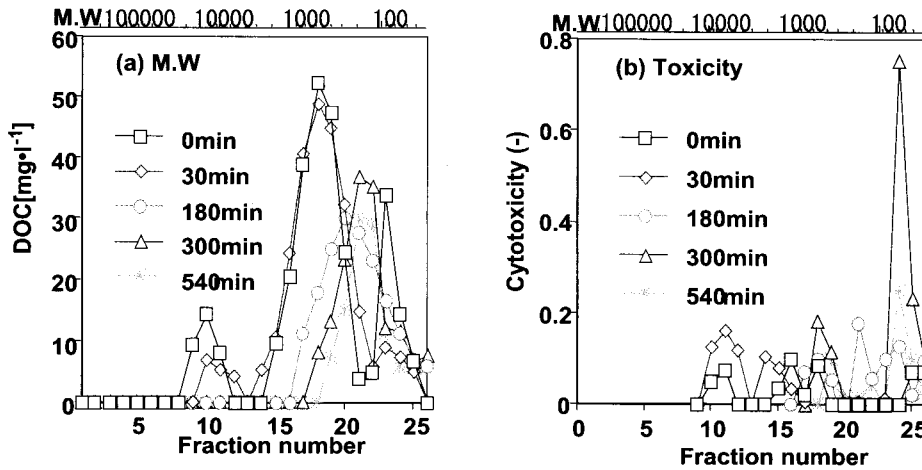
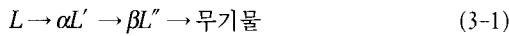


Fig. 4. Changes in the molecular weight and cytotoxicity of landfill leachate during ozonation.

의 변환으로 간략화 하였다.



- L: 처리원수중의 물질군
- L': 오존처리초기의 물질군
- L'': 충분한 오존처리후의 물질군
- $\alpha$ : L이 산화되어 L'로 변환되는 비율
- $\beta$ : L'가 산화되어 L''로 변환되는 비율

여기서  $\alpha$ 는 Fig. 3에서 DOC가 급격히 감소한 180분까지의 감소율 0.45,  $\beta$ 는 300분까지의 감소율 0.40으로 하였다.

식 (3-1)의 반응은 식 (3-2)~(3-4)로 나타내었다.

$$\frac{d[L]}{dt} = -k_1 [L][O_3] \quad (3-2)$$

$$\frac{d[L']}{dt} = -\alpha k_1 [L][O_3] - k_2 [L'][O_3] \quad (3-3)$$

$$\frac{d[L'']}{dt} = -\beta k_1 [L'][O_3] - k_2 [L''][O_3] \quad (3-4)$$

- $[O_3]$ : 용존오존농도[mg·l<sup>-1</sup>]
- $[L], [L'], [L'']$ : 각 물질군농도[mg·C·l<sup>-1</sup>]
- $k_1, k_2, k_3$ : 분해반응정수[1·mg<sup>-1</sup>·hr<sup>-1</sup>]

용존오존농도의 변화는 다음과 같이 나타내었다.

$$\begin{aligned} \frac{d[O_3]}{dt} = & -(k_1 [L][O_3] + k_2 [L'] + k_3 [L'']) [O_3] \\ & + k_d ([O_3]_s - [O_3]) \end{aligned} \quad (3-5)$$

- $[O_3]_s$ : 포화오존농도[mg·l<sup>-1</sup>]
- $k_d$ : 오존자기분해를 포함한 외견상의 유효오존 용해속도정수[1·hr<sup>-1</sup>]

여기서  $k_d$ 는 순수를 이용한 블랭크실험에서 구했고,  $k_1, k_2, k_3$ 는 DOC감소속도를 기준으로 컴퓨터를 이용하여 구했다.

식 (3-1)~(3-5)를 초기조건  $[O_3]_0 = 0, L_0 = 270 \text{mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ 로 수치계산한 결과 Fig. 5(a)와 같은 결과가 얻어져 L', L''에 대한 실측치는 없지만 전체의 DOC의 삭감은 실측치와 근사한 결과를 얻었다.

### 3.2.3. 독성변동의 수리모델화

오존처리에 의한 물질변화에 따른 세포독성을 기술하기 위해 용량작용곡선의 수식화와 이것을 이용한 복합독성의 기술법을 검토하였다. 실험에서 얻어진 용량작용곡선을 식 (3-6)을 이용해 비선형최소2승법에 의해 m과 s를 결정하여 수식화하였다(Shoji 등, 2000).

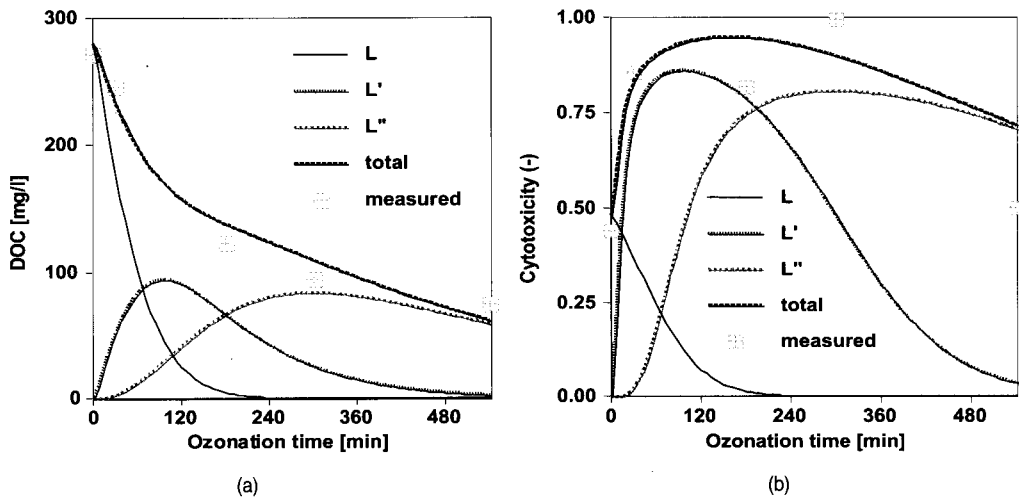


Fig. 5. Concentration and cytotoxicity changes of native organic compounds and oxidation products.

$$y = 1 / (1 + \exp((x - m) / s)) \quad (3-6)$$

y: 세포독성

x:  $\log \text{DOC} (\text{DOC} [\text{mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}])$

m:  $\log \text{ED}_{50} (y = 0.5 \text{가 되는 } \log \text{DOC})$

s: 곡선의 기울기를 간접적으로 나타내는 계수

또한 다성분의 물질에 의한 복합독성은 각 물질이 단독으로 나타내는 독성의 곱으로 나타낼 수 있다고 가정하였다. 즉, 다성분계( $n$ 성분)에서 발현하는 세포독성을  $Y$ ,  $i$ 성분단성분계에서 발현하는 세포독성을  $y_i$ 라고 하면 식 (3-7)이 성립한다.

$$Y = \prod y_i = y_1 \cdot y_2 \dots y_n \quad (3-7)$$

각 처리시간에 있어서의 총괄 세포독성을  $L, L', L''$ 의 3물질군의 합으로 식 (3-7)로 나타내기 위해 먼저 각 물질군의 각각의 용량작용곡선을 다음과 같이 구했다. 물질군  $L$ 에 대해서는 처리원수를 희석하여 용량작용곡선을 구했다. 오존처리 초기단계에 나타나는  $L'$ 에 대해서는 30분 처리수가  $L$ 과  $L'$ 의 복합독성으로 발현된다고 고려되므로, 30분 처리수와 처리원수의 용량작용곡선을 식 (3-7)에 적용하여 용량작용곡선을 구했다. 물질군  $L''$ 에 대해서는 300분 처리수를 희석하여 용량작용곡선을 구했다.

이상의 3물질군의 농도가 경시 변화하는 처리수의 복합독성을 식 (3-7)에 의한 계산치와 실측치를 Fig. 5(b)에 나타내었다. 양자의 일치는 물리화학적 불확실한 요소가 많은 생물화학적 현상을 포함한 기술로서 양호한 결과라 생각된다. 이와 같은 결과는 이후 다종다양의 유기물을 포함하는 처리 대상수의 산화처리 프로세스중에 생성되는 분해 생성물을 동정할 필요 없이, DOC의 경시변화와 일정한 처리시간에 있어서의 세포독성의 정보로 세포독성의 변화를 예측하는 것이 가능하다는 것을 나타낸다고 생각할 수 있다.

#### 3.2.4. 수리모델을 이용한 독성삭감예측

위에 서술한 해석방법은 대상원수나 오존처리 조 작조건이 다른 오존처리에 있어서 세포독성의 증감을 예측하는 데에도 응용가능하다. 여기서는 그 예로서 i) 본 실험에 사용한 처리원수의 조성은 변하지 않고 DOC가 낮은 경우와 ii) 오존농도를 높인 경우를 가정하여 각 처리수의 세포독성의 경시변화를 계산으로 예측하였다(Fig. 6).

(a)는 가상적인 처리원수의  $\text{DOC} (= \text{DOC}_s)$ 가 본 실험에서 사용한 처리원수의  $\text{DOC} (= \text{DOC}_r)$ 와 비교해  $\text{DOC}_s / \text{DOC}_r = 0.75, 0.5, 0.25$  일 때의 독성변화를 나타내었다. 오존농도는  $5 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 로 일정하게 하였다. 원수의 저분자화와 원수보다 세포독성이 높아지지 않

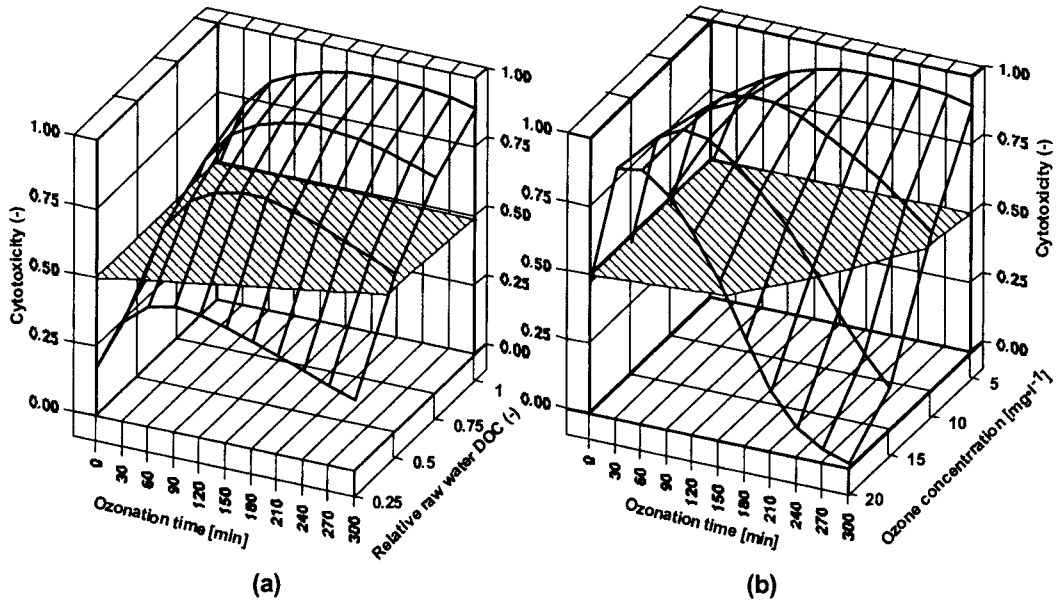


Fig. 6. Numerical prediction of cytotoxicity reduction for (a) lower DOC and (b) higher ozone concentration.

는 것을 필요조건으로 가정하면, 상대DOC농도가 0.25 이하일 경우에만 이 조건을 만족시키는 결과를 얻었다.

한편, Fig. 6(b)는 처리수질은 동일하게 하고 오존 농도를 높였을 때의 독성변화를 나타낸다. 그 결과로 오존농도 10mg·l<sup>-1</sup>로 200분 이상, 20mg·l<sup>-1</sup>로 150분 이상 처리 하였을 때 위의 조건을 만족시키는 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

이와 같은 수리모델에 의한 예측은 Fig. 6의 예와 같이 독성사감에는 처리원수의 DOC보다 오존농도가 더 지배적이라는 것과 같은 지배인자의 추출과 유효한 프로세스의 설계에도 유용하리라 생각된다.

#### 4. 결 론

환경수 기준물질의 혼합물에 대한 급성독성시험으로 사람세포를 이용한 성장저해시험에서 기준농도의 10배의 혼합물에서 유효한 독성을 관찰하였다. 이와 같은 결과는 환경수 기준물질의 급성독성수준이 만성 독성시험 및 동물실험 등을 통하여 사람에게 대한 위생성이 입증된 항목들에 대한 최대한 허용할 수 있는 독성레벨을 함축하고 있다고 할 수 있다. 향후 이러한 *in vitro* 시험의 신뢰도를 향상시키기 위하여 몇 종

류의 조합된 생물검정법의 시험방법이 확립된다면, 어떤 환경수에 대한 독성시험의 결과로 현저한 독성이 관찰되었을 경우에 생물검정법을 기초로 하는 실제의 환경관리에서 어떤 기준-Action level-이 될 수 있을 것이다.

매립지 침출수를 대상으로 한 모의적인 오존처리에 있어서 세포독성의 변동을 기술하고, 가상적인 처리방법과 조건에 따른 독성사감을 예측하는 수리모델을 제안하여 실제의 독성변동을 설명 할 수가 있었다. 이 수리모델은 독성사감을 목표로 하는 수처리법의 검토에 유용하리라 예상된다.

#### 참고문헌

Connolly, D. T., Knight, M. B., Harakas, N. K., Wittwer, A. J. and Feder, J. (1986) Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay, *Anal. Biochem.*, **152**, pp. 136-140.  
Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (1993) *Quality standard for water*.  
Ohashi, M., Aizawa, S., Ooka, H., Ohsawa, T., Kaji, K., Kondo, H., Kobayashi, T., Noumura, T., Matsuo, M., Mitsui, Y., Murota, S., Yamamoto, K., Ito, H., Shimada, H. and Utakoji T. (1980) A new human diploid cell strain, TIG-1,

- for the research on cellular aging, *Exp. Geront.*, **15**, pp. 121-133.
- Sakai, Y., Shoji, R., Kim, B. S., Sakoda, A. and Suzuki, M. (2001) Cultured human-cell-based bioassay for environmental risk management, *Environ. monitoring and assessment*, **70**, pp. 57-70.
- Shoji, R., Sakoda, A., Sakai, Y., Utsumi, H. and Suzuki, M. (2000) Quantitative description of mixture toxicity of chemicals and environmental waters detected by bioassays, *J. Jpn. Soc. Water Environ.*, **23**, pp. 487-494.
- USEPA (1988) Methods for aquatic toxicity identification evaluations-Phase I Toxicity characterization procedures, *EPA/600/3/034*, US EPA, Duluth, MN, USA.
- USEPA (1989) Toxicity reduction evaluation protocol for municipal wastewater treatment plant, *EPA/600/2-88/062*, US EPA, Cincinnati, OH, USA.
- Yasuhara, A., Shiraishi, H., Nishikawa, M., Yamamoto, T., Nagasugi, O., Kenmotsu, K., Hukui, H., Nagase, M., and Kawagoshi, Y. (1999) Organic components in leachates from hazardous waste disposal sites, *Waste manage. Res.*, **17**, pp. 186-197.