

利用 *umu*/SOS 实验评价污灌土壤的遗传毒性

禹果, 肖睿洋, 王春霞*, 王子健

(中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

摘要: 利用 *umu*/SOS 显色实验评价北京市郊污水灌溉土壤中遗传毒性物质的积累, 得到表征样品遗传毒性大小的 β -半乳糖苷酶诱导活性(IU 值). 以达到阳性时诱导比率 $R = 2$ (试验管 IU 值/对照管 IU 值) 需要的土壤重量来反映土壤样品的相对遗传毒性. R 值起初随着 96 孔板每孔土壤样品量的增大而增大, 但在达到某一定值后呈现稳定, 此时各土壤样品投加量均为每孔约含 10mg 土壤. 用剂量效应曲线中线性段的斜率作为标准, 判断出遗传毒性物质为性质相同的一类污染物, 根据相关资料推测主要是由于多环芳烃类污染物积累.

关键词: *umu*/SOS 实验; 污灌土壤; 遗传毒性

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)06-1162-04

Genotoxicity of Soil Irrigated by Wastewater Using *umu*/SOS Test

YU Guo, XIAO Ruiyang, WANG Chunxia, WANG Zrjian

(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: *umu*/SOS test is used to screen the accumulation of genotoxic substances in soil irrigated with wastewater in urban Beijing. The relative genotoxicity is evaluated based on the weight of soil used for extraction that could result in a positive reaction (or the induction ratio R equals 2) and the characteristics of genotoxic substances could be evaluated by the slop of linear part of the dose/effect relationship. R reaches the maximum when the amount of soil in each cell is about 10 mg. In a case study on a wastewater or reclaimed water irrigation area, the genotoxicity of soil samples could be observed and it may be attributed to the accumulation of PAHs, according to relevant information.

Key words: *umu*/SOS test; wastewater irrigated soil; genotoxicity

污水和再生水灌溉作为我国缺水地区废水资源化利用的重要手段已经在我国北方地区大规模应用. 污水中含有的遗传毒性物质在长期灌溉后会在土壤中积累, 并可能通过食物链污染粮食和蔬菜, 或对土壤生态系统产生潜在影响. 快速筛选遗传毒性物质的方法包括 Ames 试验和微核试验, 而近年来发展的 *umu*/SOS 显色实验方法则更为简单快速, 测试结果更为直观^[1], 例如可以用 Ames 实验和 SOS 显色实验发现污染河水及沿岸井水^[1], 工业废水^[2,3]和地表水^[4]中存在遗传毒性. 尽管已有相当多工作研究了土壤重金属的积累^[4-6], 但针对土壤中持久性有机污染物积累, 尤其是遗传毒性物质的积累, 及其产生的生态健康风险研究则十分少见.

umu/SOS 实验的原理是 DNA 损伤物能够诱导 SOS 反应并表达 *umuC* 基因, *umu* 基因正常情况下被遏蛋白所封闭, 一旦菌体 DNA 受损失, 细胞即产生 SOS 反应, 此时组成该反应系统的基因产物 Rec A 即转化为具有活性的蛋白水解酶. 该酶可切除阻遏蛋白, 使受封闭的 *umu* 操纵子启动, 并带动 *Lac Z* 基因转录, 转译, 其转译产物即为 β -半乳糖苷

酶. 根据 β -半乳糖苷酶的被诱导生成量, 判断 DNA 受损伤的程度. 但是未见使用该方法快速检测土壤中的遗传毒性物质的研究工作报道.

1 材料与方法

1.1 样品采集

2004-10 采用全球卫星定位系统 GPS 定位, 于北京市大兴区北野厂污灌区采集了 9 个土壤样品. 土壤样品采用梅花五点采集法, 保存于不锈钢制饭盒内, 立即送回实验室于 -20°C 保存. 该灌区长期使用污水灌溉, 近年来开始改用再生水. 采样点分布见图 1. 灌区由主渠道和支渠组成. 各支渠对应编号 D1~D3, 沿各支渠布设 2~3 个采样点, 同时在长期用地下水灌溉的六支西侧采集对照土壤样品(DR1 六支西点). 表 1 描述了这些采样点的特点.

1.2 样品处理

收稿日期: 2005-06-06; 修订日期: 2005-06-30

基金项目: 北京市科技计划项目(H030730040330); 国家自然科学基金项目(40471129)

作者简介: 禹果(1980~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生态毒理学, E-mail: yuguodaxia@126.com

* 通讯联系人, E-mail: cxwang@mail.nsfec.gov.cn

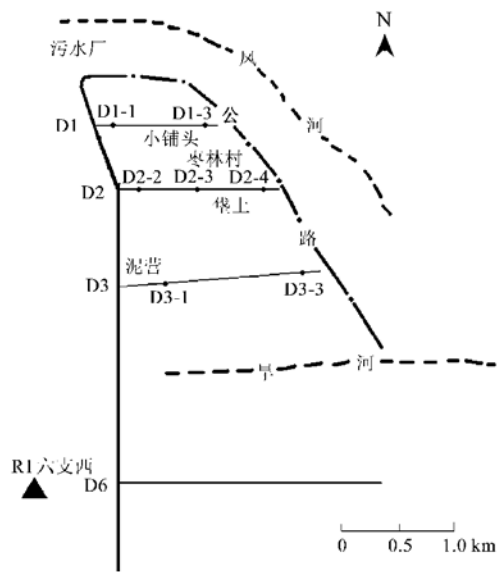


图1 土壤样品采集示意

Fig. 1 Sampling scheme

表1 土壤样品特点描述

Table 1 Characterizations of the soil samples

采样点	相对位置	特点
D1-1	渠首	D1 最接近水源
D1-3	渠尾	
D2-2	渠首	D2, 仅次于 D1, 水量较大
D2-3	渠中	
D2-4	渠尾	D3, 水量逐渐减少
D3-1	渠首	
D3-3	渠尾	
DR1 六支西	六号沟渠西侧	对照, 地下水灌溉

土壤样品冷冻干燥(FD-1 冷冻干燥机, 北京博医康技术公司)后, 研磨后过 2mm 筛. 取 20g 用二氯甲烷: 丙酮(体积比为 1: 1)的混合液 200mL, 在索氏提取器中先浸泡 24h 后抽提 48h, 并用活化铜片脱硫. 提取液在旋转蒸发仪(瑞士 Büchi)上浓缩至约 1mL, 加入 10mL 正己烷, 再次浓缩至 1mL, 然后土壤提取液转移到小瓶中, 用高纯氮气将提取液吹至 10 μ L 后, 用 DMSO 溶剂置换定容至 200 mL 以待生物测试.

1.3 umu/SOS 显色试验方法

菌种: umu/SOS 测试中使用鼠伤寒沙门氏菌 TA1535/PSK1002 由日本国大阪府立公共卫生研究所惠赠, 菌株是用质粒 PSK1002 转化得到, PSK1002 质粒是携带 umu 操纵子, umuD 以及 umuG-LacZ 融合基因的起动基因的 PMC1403 质粒衍生物.

umu/SOS 试验按文献所提供的方法^[6], 经实

验室改进. 具体操作如下: 取 40 μ L 冷冻 *Salmonella typhimurium* TA 1535/PSK 1002 菌液(大肠杆菌)于 10mL 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡隔夜培养 12h. 次日将培养菌液用于 TGA 培养液稀释 10~ 50 倍后 37 $^{\circ}$ C 条件下振荡(175 r/min)培养 1.5~ 2h 后再用 LB 培养基将培养液吸光值(600nm)调至 0.3 左右. 取前培养菌液 990 μ L 加入试管中, 再添加经过梯度稀释的 10 μ L 溶于 DMSO 的样品溶液后振荡摇匀, 以 DMSO 为溶剂对照, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2h. 之后将培养板于 595nm 波长下测定菌液的吸光度值. 另取 100 μ L 反应菌液加入 100 μ L Z-Buffer 溶液, 5 μ L SDS 溶液, 混合 5min 后再加入 5 μ L 三氯甲烷, 振荡摇匀 10min, 加入含 ONPG 的磷酸缓冲溶液 30 μ L 于上述溶液中, 于 37 $^{\circ}$ C 下反应 20min, 加入 50 μ L 的 Na₂CO₃ 溶液终止反应, 吸取上清液 200 μ L 于 96 孔酶标板中, 分别于 420nm 和 550nm 波长下测定吸光度值.

按照计算下式 β 半乳糖苷酶诱导活性 IU:

$$IU = 1\,000 \times (A_{420} - 1.75A_{550}) / (t \cdot V \cdot A_{595}) \quad (1)$$

其中 t 为加入 ONPG 后的反应时间, V 为反应菌液的稀释倍率, 在本试验中为 0.069, A_{595} 为最终培养液细菌含量; A_{420} 为酶与底物反应后生成物的含量; A_{550} 为代表反应系统中有无颗粒性干扰物, 通常接近 0. 根据 IU 值计算得到经过稀释后样品的诱导比率(R)值:

$$R = \text{试验管 IU 值} / \text{对照管 IU 值} \quad (2)$$

因为先取出 25 μ L 土壤提取原液经过不同梯度稀释, 每个浓度的提取液定容至 50 μ L 后, 并且每次取 10 μ L 进行 umu/SOS 实验. 所以 96 孔板每孔对应的土壤重量(G)可以通过下式计算:

$$G = \frac{20\text{g}}{200\mu\text{L}} \times 25\mu\text{L} \times \frac{1}{n} \times \frac{10\mu\text{L}}{50\mu\text{L}} \times \frac{200\mu\text{L}}{1\,000\mu\text{L}} = \frac{1}{10n}\text{g} \quad (3)$$

一般地, 在 Ames 或 umu/SOS 实验中, 当 R 值大于或等于 2.0 时认为试验结果为阳性, 反之为阴性. 式中的 G 用 mg/孔表示; n 是稀释倍数. 根据插值得到的当 $R = 2$ 时, 每孔对应的土壤重量 G 越大, 说明该土壤样品的遗传毒性越小; 反之说明该土壤样品的遗传毒性越大.

2 结果与讨论

2.1 诱导比率 R 与每孔土壤投加量关系

将土壤样品 umu/SOS 实验的诱导比率 R 与 96 孔板每孔土壤投加量作图得到样品的 R 值与土

壤量关系(图2),用 sigmoid 拟合并插值得到当

$R=2$ 时每孔所需的土壤投加量(表2).

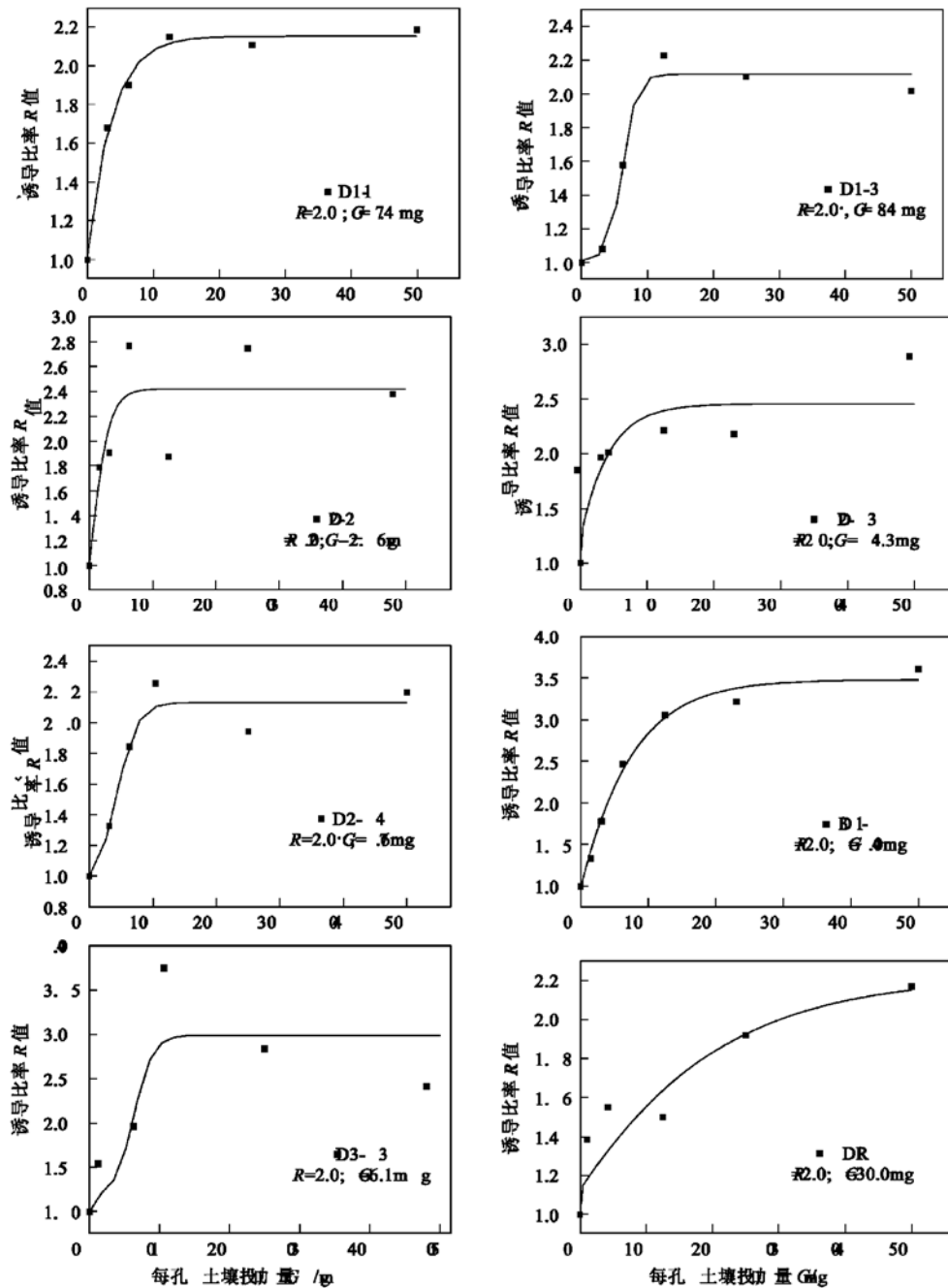


图2 不同采样点 R 值与 96 孔每孔土壤投加量关系

Fig. 2 Relationship between R and the soil weight in each well

由图2可以看出来自1~3号沟渠的样品, R 值随土壤量增大先线性增大, 然后达到一个饱和的平台, 达到平台的土壤投加量约为 10mg/孔, 达到平台的 R 值($R_{\max}$) 随距离污水源越远而越大. 来自1号沟渠的2个样品, 当诱导比率 R 增长到 2.2 左右后趋于稳定; 来自2号沟渠的3个样品, 当诱导比率 R 增长到 2.5 左右后趋于稳定; 来自3号沟渠的2个

样品, 当诱导比率 R 增长到 3.0 左右后趋于稳定. 对照土样的 R 值同样随土壤量增大而增大, 但是即使土壤投加量达到 30 mg/孔, R 也只能达到 2. 按照 $R_{\max}$ 数值大小, 3号支渠产生的响应最大.

Yoshimitsu Oda^[8] 等曾用 2-aminofluorene (2-AF) 等作为诱导物进行 *umu*/SOS 实验, 诱导比率在 0.003~0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的 2-AF 剂量下于 1.5~2h 后

达到最大值, R 并不随暴露时间的增加而一直增加, 而是在达到某一个值后趋于恒定, 或达到平台. 当用蚯蚓活体暴露于上述土壤时, 蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤的 COMET 实验亦观察到类似的实验现象^[10]. 这些结果说明遗传毒性物质的剂量/效应关系并不是单调变化型曲线, 而是存在一个最大效应值.

由各土壤样品的 R 值随土壤投加量变化的曲线可以看出, 污水或再生水灌溉土壤的遗传毒性物质积累明显高于对照土壤, 采自同一条沟渠的土壤样品的遗传毒性大小呈现出渠首> 渠中> 渠尾的关系, 2 和 3 号支渠土样遗传毒性高于 1 号支渠.

从样品的 R 值对土壤量关系(图 2) 可以看出,

表 2 阳性结果出现时各样点土壤投加量
Table 2 Amount of soil per well when the $R = 2.0$

项目	D1-1	D1-3	D2-2	D2-3	D2-4	D3-1	D3-3	DR1 六支西
G/mg	7.4	8.4	2.6	4.3	7.6	4.0	6.1	30.0
$\Delta R(R_{\max} - 1)$	1.2	1.2	1.2	1.2	1.4	2.0	2.0	1.2
$\Delta G^{1)}/\text{mg}$	10	10	10	10	10	10	10	30
中性线段斜率 k	0.12	0.12	0.12	0.12	0.14	0.20	0.20	0.04
采样点所属沟渠位置	渠首	渠尾	渠首	渠中	渠尾	渠首	渠尾	六号渠西侧

1) ΔG 为 R 值达到稳定时的土壤投加量

R 在上升阶段与土壤投加量呈现线性关系, 直线斜率(k) 为:

$$k = \Delta R / \Delta G \tag{4}$$

其中, $\Delta R = R_{\max} - 1$.

对于大兴北野厂区污灌土样来说 ΔR 值在 1.2 ~ 2.0 之间, 且来自同一沟渠的土样之间的斜率 k 值相同. 由于不同类型诱导物质所产生的剂量/效应关系的 R 值和曲线斜率 k 值各不相同^[9], 可以推测该灌区土壤中积累的遗传毒性物质可能是性质相同的一类物质. 在对该灌区土壤进行的重金属、有机氯农药和多环芳烃分析实验结果中^[10], 实验组和对照组土壤重金属和有机氯含量没有显著差异, 只有多环芳烃表现出与污水灌溉有关的积累. 在北京市高碑店污水灌溉区也观察到多环芳烃积累和蚕豆根尖微核率之间存在正相关关系^[7]. 因此, 本研究观察到的遗传毒性可能与多环芳烃在土壤中富集有关.

3 结论

umu/SOS 实验可以用来快速筛选土壤遗传毒性物质, 其剂量/效应关系曲线由线性上升段与平台稳定段组成, 诱导比率 $R = 2$ 时所使用的土壤样品量可以作为比较遗传毒性的相对参考剂量, 而其线性段的斜率可以作为判断遗传毒性物质性质是否相同的一个重要判据. 针对北京市大兴污水/再生水灌区的研究表明, 土壤中存在遗传毒性物质的积累, 推测主要是多环芳烃类污染物.

参考文献:

[1] 韩发彬, 王福琳, 丁恬, 等. 用 Ames 实验和 SOS 显色实验对

污染河水及沿岸井水的遗传毒性研究[J]. 中国环境科学, 1991, **11**(4): 285~ 289.

[2] Ma M, Wang Z J, Shang W, *et al.* Mutagenicity and acute toxicity of waters from different treatment processes in Beijing waterworks [J] Environmental and Science and Health, 2003, **35**(10): 88~ 96.

[3] 崔金山, 张黎. 应用 SOS 显色试验检测工业废水的遗传毒性[J]. 环境与健康杂志, 1992, **9**(4): 205~ 208.

[4] Shen L, Lin G F, Tan J W, *et al.* Genotoxicity of surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Lake, Eastern China [J]. Chemosphere, 2000, **41**: 129~ 132.

[5] 易秀, 刘秀华, 周玉明. 土壤质量的生态毒理学评价[J]. 农业环境保护, 2001, **20**(5): 345~ 347.

[6] Whong W Z, Wen Y F, Stewart J, *et al.* Validation of the SOS/ *umu*-test with mutagenic complex mixtures[J]. Mutation Research, 1986, **175**: 139~ 144.

[7] Chen Y, Wang C X, Wang Z J, *et al.* Assessment of the contamination and genotoxicity of the soil irrigated with wastewater[J]. Plant and Soil, 2004, **261**: 189~ 196.

[8] Yoshimitsu Oda, Hiroshi Yamazaki, Masahiko Watanabe, *et al.* Development of high sensitive *umu* test system: rapid detection of genotoxicity of promutagenic aromatic amines by *Salmonella typhimurium* strain NM2009 possessing high *O*-acetyltransferase activity [J]. Mutation Research, 1995, **334**: 145~ 156.

[9] Bojan Hamer, Nevenka Bihari, Georg Reifferscheid, *et al.* Evaluation of the SOS/ *umu*-test post-treatment assay for the detection of genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures[J]. Mutation Research, 2000, **366**: 161~ 171.

[10] 陈颖. 用生物测试和化学分析进行污染土壤的生态毒理诊断——以污水灌溉土壤为例[D]. 北京: 中国科学院生态环境研究中心, 2005.