

太湖梅梁湾有机污染物对纤细裸藻(*Euglena gracilis*)的遗传毒性效应

高香玉¹, 崔益斌¹, 胡长伟², 钱新¹, 孔志明¹, 李梅^{1*}

(1. 南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093; 2. 临沂师范学院生命科学院, 临沂 276005)

摘要:采用 GC-MS 方法分析了太湖梅梁湾水样的主要有机污染物成分和含量, 共检测出 15 种目标化合物, 表明该区域水体已经受到有机物污染; 纤细裸藻(*Euglena gracilis*)在低浓度浓缩水样处理下(1 倍组)生长无显著影响, 叶绿素 a、b 含量和类胡萝卜素含量比对照组显著增加, 而高浓度下(5 倍和 10 倍组)生长明显受到抑制, 叶绿素 a 和类胡萝卜素含量呈下降趋势; 抗氧化酶系统中 SOD 和 POD 活性呈上升趋势, 显示有机污染物胁迫可诱导抗氧化酶活性; 彗星试验中, Olive 尾矩和尾动量增加, 纤细裸藻细胞 DNA 损伤程度随着太湖水样污染物浓度增加而加重, 呈现出明显的剂量-效应关系, 提示太湖梅梁湾水样具有潜在致突变性。结果表明, 彗星试验和 SOD 活性试验结合使用在水环境中的遗传毒性监测方面具有较大的应用价值, 适合作为水体有机污染监测的生物标志物。

关键词:有机污染物; 纤细裸藻; 生物标志物; 彗星试验

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)11-3388-05

Genotoxicity Effect of Organic Pollutants in Meiliang Bay of Taihu Lake on Microalga *Euglena gracilis*

GAO Xiang-yu¹, CUI Yi-bin¹, HU Chang-wei², QIAN Xin¹, KONG Zhi-ming¹, LI Mei¹

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. School of Life Sciences, Linyi Normal University, Linyi 276005, China)

Abstract: Organic pollutant ingredients and content of water samples from Taihu Lake were analyzed by GC-MS. Results showed that Taihu Lake was already contaminated by the organic pollutant, and 15 kinds of targeted organic pollutants were detected. At lower concentrations (1 time), organic pollutants could not have notable effect on the growth of *Euglena gracilis*, but could increase the content of photosynthetic pigment. At higher concentrations (5, 10 times), organic pollutants restrained the growth of *E. gracilis* remarkably, and decreased the content of photosynthetic pigment. Activities of SOD and POD increased with the content of organic pollutants. It is indicated that organic pollution could induce activities of antioxidation enzymes in *E. gracilis*. TOM and TM for the genotoxicity assay increased and DNA damage was found. In higher concentration groups, DNA damage was serious and had an obvious dose-effect relationship. It is indicated that Meiliang bay water may have potential mutagenicity. Comet assay combined with SOD analysis was of value to genotoxic monitoring of polluted water and was a suitable biomarker for organic pollutants in water.

Key words: organic pollutants; *Euglena gracilis*; biomarker; comet assay

藻类对水生生态系统的平衡和稳定起着十分重要的作用。水生毒理学研究中, 藻类因其个体小、繁殖快、对毒物敏感等特点, 成为监测评价水环境质量的重要指标^[1, 2]。纤细裸藻(*Euglena gracilis*), 裸藻属, 又称眼虫藻属, 已被广泛地用作水环境监测评价的实验材料。

梅梁湾位于太湖北部, 地处无锡市郊, 是无锡的主要水源地。由于受到周边入湖河道工业污水排放的影响, 加上该湖区与大太湖水体交换滞后, 使得该湖区水体有机物污染严重^[3, 4]。鉴于此类有机污染物大都呈现低剂量长期暴露的特点, 常规的理化分析不足以对水质状况做出全面的评价, 所以建立一

种有效的测试方法评价水中有机物的遗传毒性是环境监测的一项重要工作。

近年来, 彗星试验因具有快速、敏感、可靠等诸多优点而得到越来越广泛的应用^[5], 但有关微藻的彗星试验国内鲜见报道, 国外也鲜见报道。有报道以纤细裸藻、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和埃

收稿日期: 2008-12-16; 修订日期: 2009-03-14

基金项目: 江苏省社会发展项目(BS2007049); 国家自然科学基金委-广东省联合基金重点项目(U0733007); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2008CB418003)

作者简介: 高香玉(1984~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物学, E-mail: gaoliangyu123yang@163.com

* 通讯联系人, E-mail: meili@nju.edu.cn

伦新月藻(*Closterium ehrenbergii*)为材料,通过彗星试验测试几种污染物的遗传毒性^[6~8],认为彗星试验比同样条件下人体淋巴细胞的反应更加明显.特定的酶反应(如抗氧化酶系、乙酰胆碱脂酶、谷胱甘肽转移酶等)可以指示外源化合物的毒性及其作用机制,这也是低剂量化学品生态毒理研究的有效手段之一^[9, 10].因此本试验拟以纤细裸藻作为受试生物,选择彗星试验、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和藻类色素作为评价指标,研究太湖水体有机污染物对藻类的毒性效应,以期建立一种有效的测试和评价水体有机污染的方法.

1 材料与方法

1.1 微藻培养

纤细裸藻由中国科学院水生生物研究所典型培养物保藏委员会淡水藻类藻种库(FACHB)提供,采用 Checcucci 等^[11]的培养基培养.试验设 3 个浓度处理组,分别相当于原水样浓度的 1、5 和 10 倍,每个浓度 3 个平行,并设空白和溶剂对照组(DMSO).接种浓度为 0.5×10^5 个细胞/mL 左右,培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光强为 $80 \sim 90 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗周期为 12 h:12 h,连续培养 6 d.每天定时摇动并随机移动各瓶的位置.

1.2 水样的前处理

2008 年 6 月,在太湖梅梁湾水源地(无锡)按国家环境保护局规范方法^[12]采集水样 20 L.静置 24 h 后,过滤去除悬浮颗粒,通过 XAD-2 树脂(Sigma)吸附柱富集.流速为 $30 \sim 40 \text{ mL}/\text{min}$,再用氮气排除水分,依次用甲醇、丙酮、二氯甲烷洗脱,洗脱液在 50°C 下浓缩、吹干,最后用二甲基亚砜(DMSO)溶解,定容至 2.0 mL, -18°C 下避光保存备用.

采用气质联用(GC-MS)法检测水样中有机污染物成分和含量.

1.3 微藻生长和光合色素含量测定

通过血球计数板计数及纤细裸藻细胞液 D_{680} 值确定细胞数与吸光值之间的关系: $y = (94.309 \times D_{680} + 0.9114) \times 10^4$,式中 y 为细胞数(个细胞/mL),相关系数 $r = 0.999$.在生长后期用 90% 丙酮提取,分别测定各组叶绿素^[13]及类胡萝卜素含量^[14].

1.4 粗酶液制备及酶活性测定

离心收集一定藻液重新悬浮于适量预冷磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中,冰浴下超声破碎(JY88-II 型超声细胞破碎仪,150 W,5 min,其间工作 20 s,间隙 10 s),低温高速离心,取上清液做酶活性分析.SOD 活

性测定采用黄嘌呤氧化酶法^[15],POD 活性参照愈创木酚法^[16].

1.5 单细胞凝胶电泳试验(SCGE)

彗星试验参照 Aoyama 等^[6]的报道并做适当修改.常规方法制片后将载玻片浸入新配制的细胞裂解液(2.5 mol/L NaOH , $1.0 \text{ mmol/L Na}_2\text{-EDTA}$, 0.01% SDS, pH = 10,实验前加入 1% 体积的 TritonX-100, 10% DMSO), 4°C ,避光裂解 20 min.碱性电泳液(pH = 13.0)中静止解旋 20 min 后,在电压 20 V、电流 200 mA 条件下电泳 20 min.随后用中性缓冲液中和,以溴化乙锭染色,在荧光显微镜下观察并获取图像.

1.6 数据分析

实验至少设 3 个平行,取其平均值.统计用 Origin 7.5 软件进行 ANOVA 分析,将实验组与对照组进行显著性 t 检验,以 $p < 0.05$ 作为显著性依据.彗星图像分析采用 CASP 软件,在评价参数中,Olive 尾矩(olive tail moment, OTM)同时反映了彗尾中 DNA 含量和彗尾形状特征,是定量化 DNA 损伤程度的常用指标^[17~19].另外提供尾动量(TM)参数作为参考指标,以便较全面反应 DNA 损伤情况.每张载玻片至少分析 50 个细胞.

2 结果与讨论

2.1 太湖水体有机物污染物的定性定量分析

太湖梅梁湾水样共检测出 15 种目标化合物(表 1),其中,属于美国 EPA 优先控制污染物有 7 种,分别是:异弗尔酮、2, 4-二硝基甲苯、菲、蒽、荧蒽、芘、苯并[a]蒽.在这些检出质物质中,检出率较高的是邻苯二甲酸酯类和多环芳烃类物质.邻苯二甲酸酯(PAEs)是环境激素类物质中的一类重要化合物,可混合在食物、空气和其它物质中,通过消化、呼吸器官和皮肤进入人体后经过体内一系列化学反应,发挥类似雌激素的作用,干扰人体内分泌,使人体肢体畸形、内分泌失调、生殖系统病变,出现精子数量减少,乳腺癌发病率升高等不良后果^[20].多环芳烃及其衍生物是一类重要的持久性环境污染物(POPs),因其致癌、致畸、致突变作用被美国环保局列为优先监测的污染物种^[21].试验结果表明太湖已经受到有机物的污染,应引起重视,需进行进一步精确的定量分析,以便为太湖水源地水体水质的治理提供依据.

2.2 对纤细裸藻生长的影响

接种后每天定时测定微藻的生长量,不同浓度组纤细裸藻生长曲线如图 1 所示.结果表明,有机污

染物浓度较低时,对藻类生长无显著影响.高浓度下生长受到抑制,抑制率分别为对照组的 46.79% (5 倍组)和 71.29 % (10 倍组).10 倍组在第 6 d 时藻细胞几乎全部死亡,藻液逐渐转黄直至透明.溶剂对照组(DMSO)对微藻生长无显著影响.试验用藻纤细裸藻(*E. gracilis*)为不具细胞壁的低级生物,细胞为纺锤形,具叶绿体.试验结果提示纤细裸藻对有机污染物比较敏感,可广泛用作水环境监测评价的实验材料.

表 1 水样中有机污染物浓度¹⁾

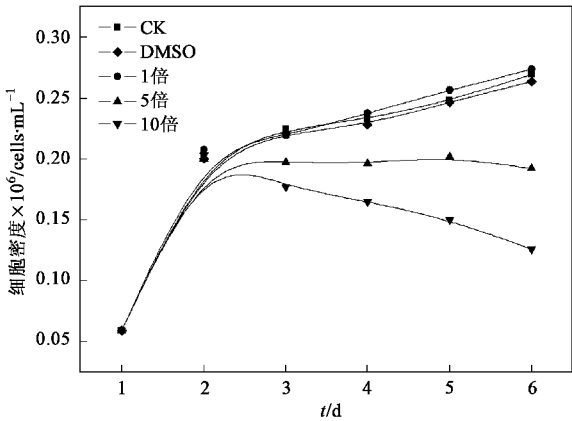
测试项目	浓度 $c/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
异弗尔酮	1.795
六氯环戊二烯	ND
萘烯	ND
2,6-二硝基甲苯	1.186
邻苯二甲酸二甲酯	ND
2,4-二硝基甲苯	0.048
芴	0.029
邻苯二甲酸二乙酯	0.096
六氯苯	ND
五氯酚	ND
菲	0.114
蒽	0.072
邻苯二甲酸二丁酯	3.040
芘	0.018
邻苯二甲酸丁苄酯	ND
己二酸二辛酯	0.165
+ 苯并[a]蒽	0.011
苯并[a]蒽	ND
邻苯二甲酸二辛酯	4.466
苯并[k]+ 苯并[b]	0.116
苯并[b]荧蒽	0.036
苯并[a]芘	0.016
二苯并[a,h]蒽	ND
苯并[ghi]芘	ND
总量	11.208

1) ND 表示未检出

2.3 对光合色素含量的影响

光合色素是在光合作用中参与吸收、传递光能或原初光化学反应的色素.植物的光合色素一般包括叶绿素 a(Chla)、叶绿素 b(Chlb)和类胡萝卜素(Car).图 2 显示了不同浓度水样下微藻光合色素含量的变化.叶绿素 a 和 b 含量分别在 0.037 ~ 0.05 $\text{mg}/(10^6 \text{ cells})$ 和 0.009 ~ 0.012 $\text{mg}/(10^6 \text{ cells})$ 范围内波动.低浓度水样(1 倍组)处理下叶绿素 a、b 含量和类胡萝卜素含量均比对照组显著增加(分别为对照的 23.28%、33.30% 和 18.19%),而高浓度下(5 倍和 10 倍组),叶绿素 a 和类胡萝卜素含量呈下降

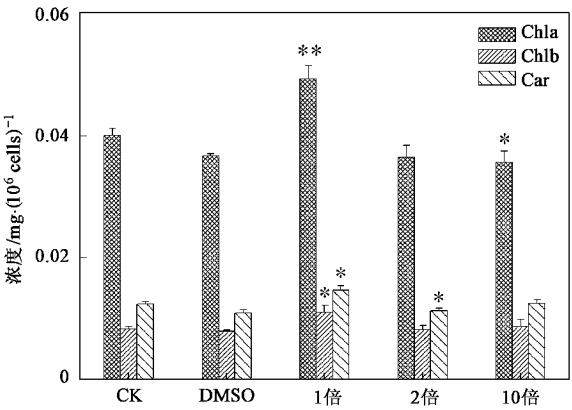
趋势.试验结果显示经不同浓度太湖水样处理后纤细裸藻叶绿素和类胡萝卜素含量均表现为低浓度促进,高浓度抑制,其中叶绿素 a 和类胡萝卜素比叶绿素 b 更为敏感.低浓度水样(1 倍组)能够提高微藻细胞光合效率、促进生长;高浓度下,污染物对生物体的毒性作用都与自由基的产生和效应有关^[22],对植物细胞来说,自由基的产生和累积会导致膜脂质过氧化,叶绿体的结构遭到破坏,致使叶绿素的含量下降,细胞生长受阻碍.



培养条件为(25 ± 1)℃、光暗周期 12 h:12 h, 光强 80 ~ 90 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$;连续培养 6 d.数据为 3 个平行平均值

图 1 不同浓度太湖浓缩水样对纤细裸藻生长的影响

Fig.1 Growth curves of *E. gracilis* treated with different concentrations of Taihu Lake water samples



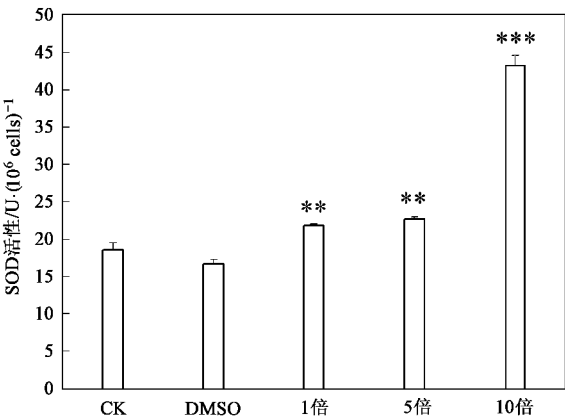
数据为 3 个平行的平均值 ± 标准差;与空白对照相比, * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$

图 2 不同浓度太湖浓缩水样对纤细裸藻光合色素含量的影响

Fig.2 Effects of Taihu Lake water samples on photosynthetic pigments content of *E. gracilis*

2.4 对抗氧化酶活性的影响

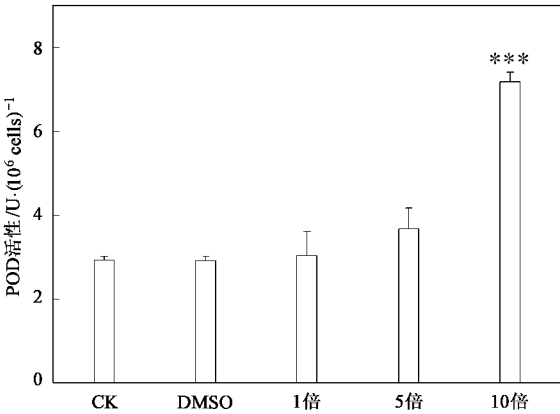
不同浓度组的抗氧化酶(SOD 和 POD)活性变化见图 3 和图 4.统计分析发现,处理组 SOD 活性与对照组相比均有显著性差异,1、5 和 10 倍组比对照



与空白对照相比, * * 表示 $p < 0.01$, * * * 表示 $p < 0.001$

图 3 不同浓度太湖浓缩水样对纤细裸藻 SOD 活性的影响

Fig.3 Total SOD activities of *E. gracilis* supplemented with different concentrations of Taihu Lake water samples

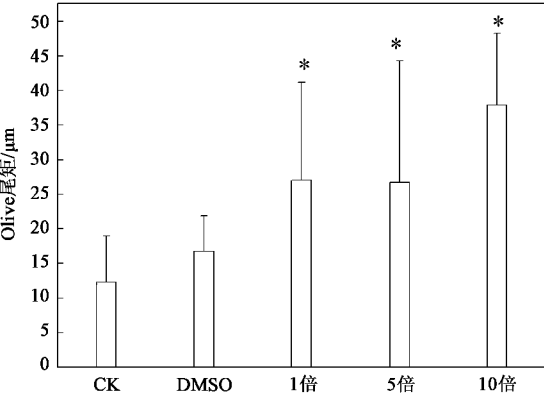


与空白对照相比, * * * 表示 $p < 0.001$

图 4 不同浓度太湖浓缩水样对纤细裸藻 POD 活性的影响

Fig.4 Total POD activities of *E. gracilis* supplemented with different concentrations of Taihu Lake water samples

组分别升高了 17.14%、21.52% ($p < 0.01$) 和 130.34% ($p < 0.001$)。不同浓度水样处理对微藻中



与空白对照相比, * 表示 $p < 0.05$

图 5 不同浓度浓缩太湖水样对纤细裸藻 DNA 损伤的影响

的 POD 活性无明显影响,仅最高浓度(10 倍)组比对照增强了 125.22 %。植物体内抗氧化防御机制包括酶促机制和非酶促机制,其中酶促机制中, SOD 和 POD 起着至关重要的作用^[23, 24]。SOD 主要催化细胞内的 O_2^- 转变为细胞毒性相对较低的 H_2O_2 , 在细胞的抗氧化保护机制中可能起中心作用^[25]; POD 则是细胞内清除 H_2O_2 的主要酶类,使藻细胞体内活性氧自由基的形成和清除之间保持动态平衡。当细胞暴露在胁迫的条件下,抗氧化酶中的一种或几种会出现活性增强的现象^[26]。试验结果表明, SOD 和 POD 活性均表现出相似的变化趋势,提示水样中有机污染物胁迫可能使藻细胞内活性氧含量上升^[27],这 2 种酶均受到显著诱导,以清除活性氧从而提高微藻的抗逆性。抗氧化酶活性变化结果提示纤细裸藻体内的 SOD 和 POD 可作为水污染的生物标志物,反映太湖的有机污染状况。

2.5 对纤细裸藻 DNA 损伤的影响

自 1988 年 Singh 等^[28]提出碱性电泳法以来,各国对彗星试验的研究几乎呈指数式增长,因单细胞凝胶电泳技术(SCGE)可在细胞水平上检验未修复 DNA 分子的单/双链损伤,不需要等到有丝分裂之后就可以观测,同时,由于“彗星”成像是因受损伤 DNA 在电泳中从核内迁出,所以“彗星”尾长、密度等都是评价和量化 DNA 损伤程度的重要参数,因此在遗传毒性研究、临床应用、DNA 修复研究、环境监测等领域已经得到广泛的应用^[29, 30]。有研究指出,在低损伤剂量范围内尾长与损伤呈线性关系,而高剂量的染毒可能造成细胞 DNA 的严重损伤,从而使大量 DNA 游离断片在电泳过程中丢失,引起可测 DNA 损伤的降低^[31],因此本试验中最高浓度采用原水样的 10 倍浓缩,以免误差过大。

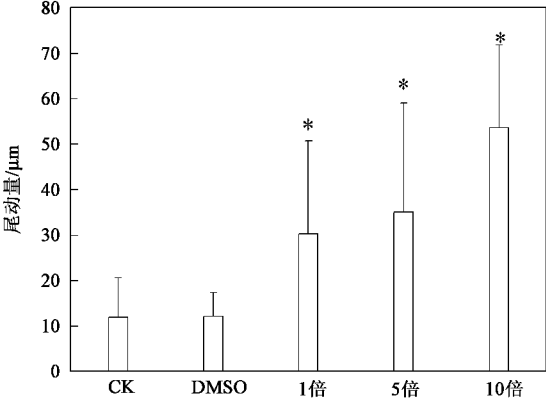


Fig.5 Induction of DNA damage in *E. gracilis* following exposure to different concentrations of Taihu Lake water samples *in vivo*

CASP 统计后,得到 DNA 损伤程度如图 5 所示.各浓度组与空白和溶剂(DMSO)对照组相比都有显著性差异($p < 0.05$),其中 Olive 尾矩(OTM)分别比对照组增加了 118.65%、116.15%和 206.49%,尾动量(TM)分别比对照组增加了 153.83%、194.25%和 349.62%.从图 5 中可以看出,表征 DNA 伤害程度的 2 个参数 OTM 和 TM 随浓缩水样加入量的提高而增加,即 DNA 损伤程度随着太湖水样污染物浓度增加而加重,呈现出明显的剂量-效应关系,与文献[6~8]等所得结果一致,说明太湖梅梁湾水样具有潜在致突变性.

3 结论

(1)高浓度太湖浓缩水样明显抑制纤细裸藻的生长,降低光合色素的含量,提示纤细裸藻对有机污染物比较敏感,可用作水环境监测评价的实验材料.

(2)纤细裸藻 SOD 和 POD 活性变化结果表明有机污染物胁迫可诱导抗氧化酶活性升高;彗星试验结果显示纤细裸藻细胞 DNA 损伤程度随着太湖水样污染物浓度增加而加重,呈现出明显的剂量-效应关系,说明太湖梅梁湾水样具有潜在致突变性.

(3)彗星试验和 SOD 活性试验结合使用在水环境中的遗传毒性监测方面具有较大的应用价值,适合作为水体有机污染监测的生物标志物.

参考文献:

- [1] Kobraei M, White D. Effects of 2,4-Dichloroenoxyacetic acid on Kentucky algae simultaneous laboratory and field toxicity testing[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1996, **31**: 571-580.
- [2] 刘国光,王莉霞,徐海娟,等.水生生物毒性试验研究进展[J].环境与健康杂志,2004, **21**: 419-421.
- [3] 乐成峰,李云梅,查勇,等.太湖梅梁湾水体组分吸收特性季节差异分析[J].环境科学,2008, **29**(9):2448-2455.
- [4] 张运林,杨龙元,秦伯强,等.太湖北部湖区 COD 浓度空间分布及与其它要素的相关性研究[J].环境科学,2008, **29**(6): 1457-1462.
- [5] Rojas E, Lopez M C, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications [J]. J Chrom B, 1999, **722**: 225-254.
- [6] Aoyama K, Lwaori K, Miyata N. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: Evaluation of DNA damage and repair [J]. Mutat Res, 2003, **538**: 155-162.
- [7] Erbes M, Webler A, Obst U, et al. Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified micro gel electrophoresis [J]. Environ Mol Mutagen, 1997, **30**: 448-458.
- [8] Ciniglia C, Cascone C, Giudice R L, et al. Application of methods for assessing the geno- and cytotoxicity of Triclosan to *C. ehrenbergii* [J]. J Hazardous Materials, 2005, **122**: 227-232.
- [9] Hankard P K, Svendsen C, Wright J, et al. Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis [J]. Sci Total Environ, 2004, **330** (123): 9-20.
- [10] Janeck J, Scott-Fordsmand, Jason M, et al. Biomarkers in earthworms [J]. Rev Environ Contam Toxicol, 2000, **165**: 117-159.
- [11] Checucci A, Colombetti G, Ferrara R, et al. Action spectra for

photo-accumulation of green and colorless *Euglena*: evidence for identification of receptor pigments [J]. Photochem Photobiol, 1976, **23**: 51-54.

- [12] GB/T 5750.2-2006, 生活饮用水标准检验方法[S].
- [13] Jeffrey S W, Humphrey G F. New spectrophotometric equation for determining chlorophyll a, b, c1 and c2 [J]. Biochem Physiol Pflanz, 1975, **167**: 194-204.
- [14] Strickland J D H, Parsons T R. A practical handbook of seawater analysis [J]. Bull Fish Res Bd Can, 1972, **167**: 201-203.
- [15] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) [J]. J Biol Chem, 1969, **244**: 6049-6055.
- [16] 陈贻竹,帕特森.低温对植物叶片中超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢水平的影响[J].植物生理学报,1988, **14** (4): 323-328.
- [17] Pouget J P, Douki T, Richard M J, et al. DNA Damage induced in cells by γ and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and comet assay [J]. Environ Sci Technol, 2000, **13**: 541-549.
- [18] Kleinsasser N H, Wallner B C, Harreus U A, et al. Genotoxicity and Cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell micro-gel electrophoresis (comet) assay [J]. J Dentistry, 2004, **32**: 229-234.
- [19] Pandey A K, Bajpayee M, Parmar D, et al. DNA damage in lymphocytes of rural Indian women exposed to biomass fuel smoke as assessed by the comet assay [J]. Environ Mol Mutagen, 2005, **45** (5): 435-441.
- [20] Jiping Z, Susan P, Yong L F, et al. Phthalate esters in human milk: concentration variations over a 6-month postpartum time [J]. Environ Sci Technol, 2006, **40**: 5276-5281.
- [21] Ravindra K, Sokhi R, Van G R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation [J]. Atmos Environ, 2008, **42**: 2895-2921.
- [22] 方允中,李文杰.自由基与酶[M].北京:科学出版社,1989.
- [23] Sharma P, Dubey R. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum [J]. Plant Cell Rep, 2007, **26** (11): 2027-2038.
- [24] Liu X, Zhang S, Shan X, et al. Combined toxicity of cadmium and arsenate to wheat seedlings and plant uptake and antioxidative enzyme responses to cadmium and arsenate co-contamination [J]. Ecotox Environ Safe, 2007, **68** (2): 305-313.
- [25] Elisabetta M, Gioacchino S. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Plant Sci, 2004, **167**: 289-296.
- [26] Knauer K, Behra R, Sigg L. Effects of free Cu^{2+} and Zn^{2+} ions on growth and metal accumulation in fresh-water algae [J]. Environ Toxicol Chem, 1997, **16**(2): 220-229.
- [27] 聂湘平,蓝崇钰,林里,等.多氯联苯对蛋白核小球藻和斜生栅藻生长影响的研究[J].中山大学学报(自然科学版),2002, **41**(1): 68-71.
- [28] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Exp Cell Res, 1988, **175**: 184-191.
- [29] Gabbianelli R, Moretti M, Carpena E, et al. Effect of different organotins on DNA of mollusk (*Scapharca inaequivalvis*) erythrocytes assessed by the comet assay [J]. Sci Total Environ, 2006, **367**: 163-169.
- [30] Banerjee P, Talapatra S N, Mandal N, et al. Genotoxicity study with special reference to DNA damage by comet assay in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe* exposed to drinking water [J]. Food Chem Toxicol, 2008, **46**: 402-407.
- [31] Devaux A, Pesonen M, Monod G. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes [J]. Toxicology in Vitro, 1997, **11**: 71-79.