

蚕豆根尖细胞微核试验对水质检测的研究

庞振凌, 张二芹, 杜瑞卿

(河南南阳师范学院 生命科学与技术学院 河南 南阳 473061)

摘要:以南水北调中线水源区丹江口水库水体为检测对象和试验材料,在2007年6月选取3个采样点进行水体采集和理化检测,水体浓缩为低、中、高3个剂量组,以自来水处理为阴性对照组,以 CrO_3 处理为阳性对照组,利用蚕豆根尖进行了5组不同的细胞微核试验。水体理化检测表明水质有一定的污染。微核试验表明,5组间都有显著差异。分析得出:蚕豆根尖细胞微核试验对水质检测是非常有效简单易行的方法,值得推广;丹江口水库水质有污染,但尚不严重,有待改善,并做好长期监测和研究。

关键词:蚕豆根尖细胞;微核检测;丹江口水质

中图分类号:S 634.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)08-0004-03

南水北调中线水源区位于豫、鄂、陕三省交界处的丹江口水库,是亚洲最大的人工淡水湖,控制流域面积 $9.5 \times 10^4 \text{ km}^2$,总库容量达 $408.5 \times 10^8 \text{ t}^{[1]}$,取水源头在河南省南阳市境内,包括西峡、淅川和内乡3个县。丹江口水库的入库河流水量大,水质较好。但随着库区周围地区经济的不断发展,自然和人为因素使入库干、支流水质发生变化,必将影响丹江水库的水质^[1,2]。因此,做好水源区的长期生态监测,加强理论和技术研究极为重要。

蚕豆根尖细胞微核试验(Micronucleus test, MCN)技术是Degrassi在1982年提出的一种用于环境致突变物的检测方法^[3]。近几年来,MCN技术作为一种以染色体损伤及纺锤丝毒性等为测试终点的植物微核检测方法,以其灵敏度高、操作技术简单,而且试验结果能够反映各种污染因子的综合遗传毒性等优点成为目前研究和运用较多的拟代替动物培养细胞检测环境“致癌、致畸、致突变”物质的高等植物细胞检疫体系^[4]。MCN技术在检测水环境中污染物的致突变性亦受到广泛重视,应用于对河流、湖泊、地下水及工业污水的水质研究。目前主要集中在由水体中 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 等重金属以及农药、抗菌素、洗涤剂对蚕豆根尖细胞遗传毒性方面的研究^[5,6],而对由含高N、P无机或有机污染物引起的水体富营养化所导致的蚕豆根尖细胞遗传毒性的研究报道甚少。基于上述原因,在对丹江口水库水质深入广泛的科学调研基础上,利用所获得的理化

指标值,并利用蚕豆根尖细胞微核技术对其遗传毒性进行检测,探讨其中可能存在的遗传毒性诱变因素,旨在为南水北调中线工程水源环境的保护、持续发展规划、科学研究提供一定的依据,同时为建立水源区生态监测机制提供基础资料。

1 研究方法

1.1 采样点布设与水样采集

采样时间为2007年6月,采样点为国家环境监测总站授权南阳市环境保护监测站监测南水北调中线水源区而设置的渠首(陶岔S1)、库心(小太平洋S2)和丹江入库上游(大石桥S3)3个水质监测点,各点均取水样3 L,置于塑料壶内。

1.2 水质理化指标测定

S1水质的理化检测由设在渠首的自动监测仪测定(同时进行人工平行样测定)。其它2个点的水温 T ($\theta\text{H}_2\text{O}$)、pH、溶解氧DO由便携式仪器测定。透明度采用塞氏盘法测定。总磷(TP)、总氮(TN)、生物耗氧量(BOD)、化学耗氧量(COD)参照《水和废水监测分析方法(第4版)》(2002)测定^[7]。

1.3 蚕豆根尖细胞微核试验

1.3.1 水样有机浓集物的制备 取丹江口水库各采样点水样1 L,共3 L,混匀,用滤纸滤去粗泥沙后,经XAD-2树脂柱浓缩,过柱流速约为 10 mL/min ,有机提取物用50%二甲基亚砜(DMSO)洗脱,浓缩,挥干后用DMSO定容至5 mL,置 1°C 冰箱中保存备用。

1.3.2 细胞微核试验 ①浸种催芽:将试验用蚕豆种子按需要量放入盛有自来水的烧杯中,在 25°C 下浸泡24 h,此间至少换2次水,所换水预温。种子吸胀后松散的铺在用4~5层纱布布置的磁盘中,保持湿度,在 25°C 温箱中催芽12~24 h,待初生根长出2~3 mm时,再取发芽

第一作者简介:庞振凌(1956-),女,副教授,现从事遗传学与生态学的教学与科研工作。E-mail: pz156@163.com.

基金项目:河南省自然科学基金资助项目(0511030700)。

收稿日期:2008-02-25

良好的种子放入铺满滤纸的磁盘中,在 25℃继续催芽,约经 36~48 h,大部分初生根长至 1~2 cm 左右,根毛发育良好,可作为检测材料。②对蚕豆根尖的不同检测处理:待测组:南丹江口水库水体分别给予浓缩 0.25 和 50 倍,形成低、中、高 3 个剂量组,每剂量组选初生根生长良好的已萌发种子 10 粒,分别放入盛有不同待测液的培养皿中(被测液浸没根尖即可),培养 24 h;阴性对照组:选取初生根生长良好的已萌发种子 10 粒,用自来水浸没根尖,培养 12~24 h。阳性对照组:选取初生根生长良好的已萌发种子 10 粒,以 CrO₃ (1.0 mol/L)配制的液体浸没处理根尖。由于 CrO₃ 毒性大,处理时间缩短为 12 h,避免因浓度过大,时间过长影响试验材料。③根尖细胞恢复培养:各处理组处理后的种子用自来水(或蒸馏水)浸洗 3 次,每次 2~3 min,洗净后再置入铺有湿润滤纸培养皿中,25℃恢复培养 22~24 h。使经过前期处理受到损伤的细胞核有充足的分裂时间,最终以微核形式出现便于观察。④根尖细胞固定:将上述恢复培养的根尖切下长 1 cm 左右,用 Caron's 固定液固定 24 h(固定的根尖如不及时制片可换用 70%的乙醇 4℃冰箱保存备用)。⑤酸解:蒸馏水冲洗根尖 3 次,每次 3 min,吸净蒸馏水,6 mol/L HCl,室温下解离 10 min,幼根软化。⑥染色、压片:酸解后的根尖蒸馏水冲洗 3~4 次,每次 3~5 min,最后浸入水中,制片前取出置载玻片上,截 1~2 mm 根尖,用石炭酸品红染色 5~8 min,加盖玻片,压片观察。每张片观察 1 000 个根尖细胞,计算微核发生率。数据采用 SPSS 13.0 统计软件包进行 T 检验。

表 1 南水北调中线水源区理化检测结果

采样点	采样时间	T/℃	pH	DO/mg·L ⁻¹	透明度(SD)/m	TN/mg·L ⁻¹	TP/mg·L ⁻¹	COD/mg·L ⁻¹	BOD/mg·L ⁻¹	Chl-a/mg·L ⁻¹
S1	6月	23.0	7.33	8.16	1.51	0.827	0.001	10	2.1	0.007
S2	6月	22.0	7.34	8.50	2.11	0.726	0	10	2.2	0.005
S3	6月	22.0	7.71	7.95	1.63	0.856	0.001	18.0	3.24	0.007

注 S1, S2, S3 三采样点; T: 水温; DO: 溶解氧; TN: 总氮; TP: 总磷; COD: 化学需氧量; BOD: 生化需氧量; Chl-a: 叶绿素

2 试验结果

2.1 水源区理化检测指标结果及分析

3 个检测点同步理化检测结果见表 1。从单项指标看,根据“地表水环境质量标准 GB3838—2002”,总氮(TN)、生物耗氧量(BOD)、化学耗氧量(COD)指标值属于Ⅲ类水质标准,其它指标属于Ⅰ、Ⅱ类水质标准,总体上来看,水质污染尚不严重。

2.2 蚕豆根尖细胞微核试验

表 2 阴性、阳性不同处理的蚕豆根尖细胞微核率(MCN)及 t 检验						
处理组	观察细胞数 /根尖	平均微核率 (3根尖微核率)	n	标准 差	t	p
阴性对照 (自来水)	1 000	5.35(5.7,4)	3	1.53		
阳性对照 CrO ₃ (1mol/L)	1 000	43.67(47.45,39)	3	4.16	14.98*	<0.001

注: 阳性处理结果以阴性处理结果为对照的 t 值。

每一处理组选取 3 张较好的切片进行观测,结果见表 2、表 3。阳性、阴性对照组观察试验结果及 t 检验如表 2 所示。从表 2 可以看出,阳性对照处理结果与阴性对照处理结果有极其显著差异,阳性对照处理的毒性较大。待测水样的低、中、高 3 个库水有机浓集物剂量组的对蚕豆根尖细胞微核试验结果见表 3。从表 3 中可以看出,3 个剂量组均能使豆根尖细胞微核升高,且库水各组随剂量增加而微核率呈增高趋势。低剂量组比阴性对照组高,且有显著差异,说明水受污染;高剂量组与阳性对照组有显著差异,说明水污染尚不严重。各剂量组都与阴性对照组、阳性对照组有显著差异,说明丹江口水库水质有一定的污染,但尚不严重,包括高剂量组仍

低于阳性对照组。因此做好水源区的长期生态监测,加强理论和技术研究,改善水质,极为重要²。

表 3 3 采样点水质处理的蚕豆根尖细胞微核率(MCN)及其 t 检验						
处理组	观察细胞数 /根尖	平均微核率 (3根尖微核率)	n	标准 差	t	p
阴性对照组	1 000	4.33(4.6,3)	3	1.53		
阳性对照组	1 000	43.67(47.45,39)	3	4.16		
低剂量组	1 000	7.67(7.8,8)	3	0.577	A: 3.538 B: 15.249	<0.05 <0.001
中剂量组	1 000	11.00(10.10,13)	3	1.73	A: 5.003 B: 12.561	<0.01 <0.001
高剂量组	1000	17.00(16.16,19)	3	1.73	A: 9.505 B: 10.254	<0.001 <0.001

注: A 表示以阴性为对照 B 表示以阳性为对照。

处理组	观察细胞数 /根尖	平均微核率 (3根尖微核率)	n	标准 差	t	p
阴性对照组	1 000	4.33(4.6,3)	3	1.53		
阳性对照组	1 000	43.67(47.45,39)	3	4.16		
低剂量组	1 000	7.67(7.8,8)	3	0.577	A: 3.538 B: 15.249	<0.05 <0.001
中剂量组	1 000	11.00(10.10,13)	3	1.73	A: 5.003 B: 12.561	<0.01 <0.001
高剂量组	1000	17.00(16.16,19)	3	1.73	A: 9.505 B: 10.254	<0.001 <0.001

注: A 表示以阴性为对照 B 表示以阳性为对照。

3 讨论与分析

根据有关微核形成机理的研究,认为微核形成有 2 条途径:一是诱变剂打断 DNA 分子形成 DNA 断片,该断片因没有纺锤丝相连无法随染色体分离过程被拉向两极,因而随机滞留在某一个子细胞的细胞质中形成独立于细胞之外的微小的具有核形状的微核;二是由纺锤丝毒剂打断纺锤丝造成的整条染色体落后于核分裂周期形成微核,这两种途径发生的概率各为 1/2^[89]。显然,当受试水样中含有能打断 DNA 分子的诱变剂或能打断纺锤丝的纺锤丝毒剂时,就能使蚕豆根尖细胞微核率上升,从而表现出遗传毒性。据调查,目前影响中线水源水质的因素主要有:一是库区生态环境比较脆弱,生态环境质量有待提高。二是上游流域区内森林覆盖率低,涵养水源功能不足。三是上游流域区内的工业企业主要是资源开采型和资源消耗型,技术含量低,治污

能力差,是该流域区的主要污染源。另外入库干、支流的沿岸城镇生活污水、工业废水大都未经处理排入水库,加上库区农业生产水平低下,自然资源的掠夺性开发,且不当使用化肥、农药,使库区局部有富营养化发生趋势和条件。废水的污染物主要以含氮磷的无机及有机污染物为主,其次为硫化物、苯、酚、汞、砷、烷基苯磺酸钠等,这些污染物对遗传物质的损伤形成微核具有直接的作用,而且还可通过食物链的积累、浓缩进而危害人类健康^[10]。通过微核试验,说明氮磷污染物及某些有机污染物是使水体产生遗传毒性的诱发因素之一,这与农清清等所报道的一致^[11-12]。

当前,水环境污染监测主要采用物理和化学方法,这些方法的优点在于可以反映不同污染物质的种类和数量,但不能综合反映环境质量状况和阐明多种污染物并存对生物体的危害和损伤机制。蚕豆根尖细胞微核监测技术不仅具有灵敏度高、可靠性强、取材简单、条件易控制、试验周期短、监测费用低等优点,还可直接反映多种污染物对生物遗传物质的综合影响,且反映出的遗传毒性是根据真核细胞 DNA 分子损伤试验得出的,这为理化监测所不及,是一种值得推广的环境监测方法^[9]。该研究以蚕豆根尖细胞微核率为指标,结合其它环境理化监测指标,则能更全面、更准确地反映水体的水质状况,研究表明,丹江口水库已有一定污染和营养化增强的趋势,其污染水质能诱导蚕豆根尖细胞微核率升高,具有较强的遗传毒性作用。

Study on the Monitoring of the Water Quality in Root-tip of Vicia Faba Cell Micronucleus Technique

PANG Zhen-ling, ZHANG Er-qin, DU Rui-qing

(College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang He'nan 473061, China)

Abstract: This article selected 3 water samples spots to carry on water gathering and physics and chemistry examination in July 2007 to water quality in water source area of middle line project of transferring water from south to north, Water body was concentrated to low, center and high three monitoring teams, and applied root-tip of vicia faba to experiment to different micronucleus in running water processing as negative comparison group, and CrO_3 processing as positive comparison group. Water body physics and chemistry examination showed that water quality had a little pollution. Micronucleus experiment indicated that there are remarkable difference among 5 groups. From these we concluded that root-tip of vicia faba cell micronucleus technique was an effective simple method and worthing promotion; Water quality on Danjiangkou reservoir had pollution, but not serious, we should monitor and research in long term.

Key words: Root-tip of vicia faba cell; Micronucleus monitor; Water quality on Danjiangkou reservoir

参考文献

- [1] 徐黎,李光华.南水北调中线工程源头生态环境的综合治理[J].华北水利水电学院学报,2003,24(2):74-77.
- [2] 林秋奇,韩博平.水库生态系统特征研究及其在水库水质管理中的应用[J].生态学报,2001,21(6):1035-1039.
- [3] Degrassi F. Micronucleus test in vicia faba root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution[J]. Mutation Research, Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 1982, 97(1): 19-33.
- [4] 杨积晴.应用蚕豆根尖细胞微核技术监测环境致突变物的研究进展[J].环境监测管理与技术,1997,9(1):16-18.
- [5] 段昌群,王焕校.重金属对蚕豆的细胞遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨[J].植物学报,1995,37(1):14-24.
- [6] Kengommesaus D J, Grant W F. Clastogenic and phydiological response of chromosome to nine pesticides in the vicia faba in vivo root tip Passay system[J]. Mutat Res 1983, 124: 69-84.
- [7] 水和废水监测分析方法编委会.水和废水监测分析方法[M].4版.北京:中国环境科学出版社,2002:56-58.
- [8] Shahin S A, El-Amodi K H. Induction of numerical chromosome aberrations during DNA synthesis using the fungicides min rod and rubigan-4 in root tips of vicia faba[J]. Mutat Res 1991, 261: 169-176.
- [9] 杨辉,嵇庆,张锡然.微核试验法监测奎河徐州市区段水质污染[J].南京师范大学学报(自然科学版),1996(4):56-59.
- [10] 郗媛媛.蚕豆根尖细胞微核技术监测黄河兰州段水质污染的研究[J].甘肃联合大学学报(自然科学版),2005,19(3):50-52.
- [11] 余江,杨宇峰,杨翠婵.珠江广州段与人工湖泊的富营养化及遗传毒性[J].重庆大学学报(自然科学版),2007,30(9):139-142.
- [12] 农清清,覃倩萍,张志勇等.南湖水质富营养化现状及致突变性研究[J].广西医科大学学报,2002,19(1):58-59.