

安徽沿江两个富营养化浅水湖泊克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 遗传毒性比较*

吴东艳, 周立志**

(安徽大学资源与环境工程学院, 安徽大学生物多样性与湿地生态研究所, 合肥 230601)

摘 要: 富营养化湖泊的蓝藻水华加剧了水体污染, 影响湖泊生态系统的稳定. 本研究针对安徽沿江富营养化程度不同的巢湖和菜子湖, 2010 年 4—9 月份, 利用微核和彗星电泳实验检测水体污染物对克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 血细胞的微核率和 DNA 损伤, 评价湖泊污染物的遗传毒性效应. 巢湖和菜子湖细胞微核率最低值分别为 0.316 ± 0.131 和 0.243 ± 0.063 , 最高值分别为 0.624 ± 0.136 和 0.360 ± 0.081 ; 巢湖 DNA 损伤三项指标 TailDNA、TM 和 OTM 最高值为 7.59 ± 1.58 、 2.75 ± 1.55 和 3.12 ± 1.45 , 菜子湖为 5.02 ± 1.42 、 1.07 ± 0.16 和 1.19 ± 0.26 . 两个湖泊克氏原螯虾血细胞微核率和 DNA 损伤都表现为随时间推移而增加, 且巢湖 6、7 月份血细胞微核率和 DNA 损伤增加幅度最大. 7、8、9 三月份, 两湖泊细胞微核率和 DNA 损伤差异性达到极显著. 彗星实验和微核实验结果一致, 但前者更敏感. 两种不同的遗传毒性检测方法结合能更好地检测污染物对机体产生的遗传毒性作用.

关键词: 遗传毒性; 微核实验; 彗星实验; 巢湖; 富营养化湖泊; 克氏原螯虾; 菜子湖

Genetic toxicity of *Procambarus clarkii* in two shallow eutrophic lakes along the Yangtze River in Anhui Province

WU Dongyan & ZHOU Lizhi

(School of Resources and Environmental Engineering, Institute of Biodiversity and Wetland Ecology, Anhui University, Hefei 230601, P. R. China)

Abstract: Cyanobacterial bloom promotes pollution of the eutrophic lakes and affects the stability of lake ecosystems. In the present research we detected DNA damages and micronucleus blood cells of *Procambarus clarkii* in Lake Caizi and Lake Chaohu, two different eutrophic lakes along the Yangtze River in Anhui Province by micronucleus test and comet assay to assess the genetic toxicity effects on the blood cells during the period from April to September, 2010. The lowest micronucleus ratios were 0.316 ± 0.131 and 0.243 ± 0.063 , and the highest values were 0.624 ± 0.136 and 0.360 ± 0.081 in Lake Chaohu and Lake Caizi, respectively. The highest values of the three indicators of DNA damage ratios, TailDNA, TM and OTM, which occurred in Lake Chaohu, were 7.59 ± 1.58 , 2.75 ± 1.55 , 3.12 ± 1.45 , respectively, and 5.02 ± 1.42 , 1.07 ± 0.16 , 1.19 ± 0.26 , respectively in Lake Caizi. DNA damage and micronucleus ratios increased with time in the two lakes, and in Lake Chaohu during the period from June to July by large amplitude. The DNA damage and micronucleus reached significant differences between the two lakes in July, August and September. Detection results were the same for the two different tests, but comet assay was more sensitive than micronucleus test. So we suggest that it's necessary to combine the two tests to get more effective detection of genetic toxicity.

Keywords: Genetic toxicity; micronucleus test; comet assay; Lake Chaohu; eutrophic lake; *Procambarus clarkii*; Lake Caizi

遗传毒性是指环境中的理化因素作用于有机体, 使其遗传物质在染色体水平、分子水平和碱基水平上受到各种损伤, 从而造成的毒性作用^[1]. 水体中的很多污染物对水生生物都具有潜在的遗传毒性^[2-3], 一些

* 安徽省教育厅重点科研项目 (KJ2009A179)、安徽省自然科学基金项目 (11040606M76) 和安徽大学人才培养项目联合资助. 2011-02-16 收稿; 2011-04-18 收修改稿. 吴东艳, 女, 1982 年生, 硕士研究生; E-mail: yutianfengjing@163.com.

** 通信作者; E-mail: zhoulz@ahu.edu.cn.

环境污染对生物的遗传毒性,有时几代后才能表现出来^[4].因此,关于水体污染遗传毒性的评价越来越受到重视.应用生物标志物进行环境风险评估是遗传毒理学研究的重要内容之一^[5].DNA损伤、染色体畸变、微核实验和姐妹染色体交换都已被用作生物标志物来衡量污染物对水生生物的遗传毒性^[6-7].彗星实验检测单细胞水平上DNA链各种形式的损伤(单、双链断裂,遇碱不稳定点,DNA氧化碱基损伤),被广泛用于检测水环境污染对水生动物的遗传毒性,特别是无脊椎动物^[8-9].微核实验检测染色体水平的损伤,常被用于评价生态系统指示物种的遗传毒性^[10-12].

近年来湖泊污染受到广泛关注,尤其是长江中下游富营养化湖泊形成的蓝藻“水华”已经导致了严重的环境问题,影响到区域生态安全.在蓝藻暴发的水体中,次生代谢物微囊藻毒素(Microcystin, MC)大量存在,尽管MC能够被光和生物降解,但水体中的含量仍保持在一定的水平,MC可沿着水生食物链在生物体内积累^[13-15],对一些水生生物产生一定的影响^[16].

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)是一种捕食性虾类,为长江中下游湿地中常见的外来物种,其扩散和适应能力强,分布广泛.由于其处于水生生态系统较高营养级上,水体污染物会沿着食物链在其体内富集^[17],因此是一种很好的环境监测指示物种.

本研究以克氏原螯虾为研究对象,通过彗星实验和微核实验检测不同富营养化湖泊中克氏原螯虾的遗传毒性效应,探讨水体富营养化与遗传毒性的相关性.

1 材料与方法

1.1 研究区域

选择巢湖和菜子湖为研究区域.菜子湖(30°45′~30°56′N, 117°01′~117°10′E)位于大别山东南侧,长江北岸,由3个彼此通连的湖泊组成,主要汇集大别山区来水,受工业污染较轻,湖泊富营养化较不明显,没有出现蓝藻水华.巢湖(31°25′~31°43′N, 117°11′~117°52′E)是长江中下游典型的富营养化湖泊^[18],是沿湖地区工农业生产和人民生活用水的重要水源,也是渔业生产的重要基地^[19],近年来由于污水排放、化肥、农药的大量使用、周围湿地面积减少、水土流失和湖盆的淤积速度加快,出现明显的富营养化,每年夏秋季节蓝藻大量暴发,4月份为巢湖蓝藻暴发前期,5—9月为蓝藻水华期.

2010年4—9月份,每月月初从两湖泊各采集克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)20尾做为实验材料.巢湖可划分为东湖区和西湖区,西湖区较东湖区污染严重,本研究巢湖采样点选择在西湖区.菜子湖采样点选择在东湖区(白兔湖).

1.2 微核测定

用一次性注射器插入克氏原螯虾围心窦取血,迅速制成血涂片,甲醇固定15 min, 10% Giemsa (pH 6.89)染色15 min;冲去多余的染液,自然风干镜检.每只克氏原螯虾样本做两张片子,每张片子在显微镜成像系统下随机拍摄10个视野,记录每个视野内的细胞总数,含有微核的细胞数量.正常血细胞核椭圆形或圆形,多位于细胞中央,Giemsa染色后,细胞核为紫红色,微核染色特点和主核相似,有的离细胞核很近,有些离细胞核较远.计算微核率(细胞微核率=含微核细胞数/观察的细胞总数×100),并记录结果.

1.3 血细胞DNA损伤测定

1.3.1 血细胞悬液的制备 克氏原螯虾围心窦取血用抗凝剂(0.14 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 葡萄糖, 30 mmol/L 柠檬酸, 26 mmol/L 柠檬酸钠, 10 mmol/L EDTA)抗凝后,1500 转/min, 4℃下离心5 min,弃上清液,加等量PBS溶液,同等条件下再离心,弃上清液,重复两次,然后用细胞计数板调整细胞浓度为 10^6 cells/ml,用台盼蓝染色,统计细胞成活率在95%以上,4℃保存备用.

1.3.2 DNA链损伤测定 碱性彗星电泳用于检测DNA单链断裂和遇碱不稳定点^[20],核DNA解旋后,在电泳电场作用下,DNA断裂片段离开细胞核向阳极迁移,形成彗尾状,DNA片段越小,在电泳时迁移的速度越快,离“核心”的位置越远(图1).

评价细胞损伤可以用彗星细胞率、总彗星长度、尾长、尾部DNA含量、尾矩、Olive尾矩等指标^[9],但有研究发现一些距离类指标和强度类指标不够全面,因为在损伤因素作用剂量增大时,DNA损伤程度明显增加而尾长基本不变^[21].本研究中我们选择尾部DNA含量(TailDNA)、尾矩(TM)和Olive尾矩(OTM)三个指标来综合评价细胞的DNA损伤情况^[10].

用碱性彗星电泳进行测定^[20],采用三层胶制片方法,在含高离子浓度的裂解液(pH 10, 1%十二烷基肌



图 1 CASP 软件分析克氏原螯虾血细胞 DNA 损伤的彗星图像
Fig.1 SCGE image of haemocytes of *Procambarus clarkii* analyzed by CASP soft

氨酸钠,0.01 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA,用前加 1% TritonX-100 和 10% DMSO)中裂解 2.5 h,碱性条件(pH 13)下解旋 40 min,电泳 30 min(300 mA,20 V),用 Tris-HCl(pH 7.5)中和 2 次,每次 15 min,然后用 EB 染色(2 μg/ml)20 min,蒸馏水漂洗 3 次,盖上盖玻片,在荧光显微镜(515 nm 的激发波长)下观察(10 × 20),并拍照.以上操作均在 4℃、避光下进行.

1.4 数据统计与分析

利用彗星分析软件 CASP 分析克氏原螯虾血细胞的 DNA 损伤程度(图 1).每只克氏原螯虾做一块胶,每块胶随机分析 10 个细胞,统计出每个细胞的 TailDNA、TM 和 OTM.采用 SPSS 17.0 分别对菜子湖和巢湖 4—9 月份微核实验、彗星实验结果进行单因素方差分析多重比较,比较各月份间细胞微核率和 DNA 损伤指标的差异性;对菜子湖和巢湖 4—9 月份微核实验结果、彗星实验结果进行独立样本 *t* 检验,比较两湖泊间的差异性.

2 结果

2.1 菜子湖、巢湖克氏原螯虾遗传毒性特征

菜子湖克氏原螯虾血细胞微核率最低出现在 4 月份(0.243 ± 0.063),9 月最高(0.360 ± 0.081),4 月份和 9 月份细胞微核率差异显著(0.01 < *P* < 0.05),但 4—9 月份相邻两月之间细胞微核率差异均不显著(*P* > 0.05);巢湖克氏原螯虾血细胞微核率最小出现在 4 月份(0.316 ± 0.131),9 月最高(0.624 ± 0.136),4 月份和 9 月份差异极显著(*P* < 0.01),6 月份和 7 月份微核率差异显著(0.01 < *P* < 0.05),其它相邻两月之间微核率差异不显著(*P* > 0.05)(表 1).随着时间的变化,菜子湖和巢湖细胞微核率都呈现增加的趋势,在蓝藻暴发初期 5—7 月份,巢湖细胞微核率增加的幅度较大,以 6—7 月份细胞微核率增加的幅度最大.

表 1 菜子湖和巢湖 2010 年 4—9 月份克氏原螯虾血细胞微核率¹⁾

Tab. 1 Cell micronucleus in haemocytes of *Procambarus clarkii* in Lake Caizi and Lake Chaohu from April to September in 2010

样点	月份	观察细胞数	总微核细胞数	微核率	<i>P</i>
菜子湖	4 月	7910	19	0.243 ± 0.063	0.028 ^{a*}
	5 月	7812	21	0.272 ± 0.087	0.510 ^b
	6 月	7929	22	0.282 ± 0.122	0.808 ^c
	7 月	7493	21	0.299 ± 0.112	0.709 ^d
	8 月	7615	25	0.331 ± 0.103	0.471 ^e
	9 月	7648	26	0.360 ± 0.081	0.790 ^f
巢湖	4 月	6568	18	0.316 ± 0.131	<0.001 ^{a**}
	5 月	7790	25	0.340 ± 0.089	0.710 ^b
	6 月	7760	34	0.447 ± 0.109	0.075
	7 月	7976	44	0.584 ± 0.171	0.024 ^{d*}
	8 月	8045	47	0.603 ± 0.142	0.760 ^e
	9 月	8163	49	0.624 ± 0.136	0.720 ^f

1) 对各月份间细胞微核率做单因素方差分析多重比较,由于方差具有齐性,选择 LSD 法; ** 表示两月份间差异极显著,*P* < 0.01, * 表示差异显著,0.01 < *P* < 0.05; a 代表 4 月与 9 月份之间细胞微核率差异显著性, b, c, d, e, f 分别代表“4—5”、“5—6”、“6—7”、“7—8”、“8—9”两个相邻月份之间的微核率差异显著性.

菜子湖 DNA 损伤指标 TailDNA、TM 和 OTM 最小值在 4 月份,分别为 1.92 ± 1.98 、 0.35 ± 0.33 和 0.51 ± 0.27 ;最大值在 9 月份,分别为 5.02 ± 1.42 、 1.07 ± 0.16 和 1.19 ± 0.26 ,4 月份和 9 月份 DNA 损伤指标差异极显著($P < 0.001$).7 月份和 8 月份 DNA 损伤指标 OTM 值差异显著($0.01 < P < 0.05$),其它相邻两月之间 DNA 损伤差异均不显著($P > 0.05$).巢湖 DNA 损伤指标最低值在 4 月份,TailDNA、TM 和 OTM 值分别为 2.34 ± 0.88 、 0.36 ± 0.22 和 0.52 ± 0.20 ;最高值在 9 月份,分别为 7.59 ± 1.58 、 2.75 ± 1.55 和 3.12 ± 1.45 ,4 月份和 9 月份 DNA 损伤指标差异均极显著($P < 0.01$),5 月份和 6 月份 DNA 损伤的指标差异均极显著($P < 0.01$),6 月份和 7 月份 TM 和 OTM 值差异极显著($P < 0.01$),TailDNA 值差异显著($0.01 < P < 0.05$),其它相邻月份间 DNA 损伤的指标差异不显著($P > 0.05$) (表 2).巢湖克氏原螯虾血细胞 DNA 损伤的三项指标都表现为随时间增加的趋势,6、7 月份 DNA 损伤增加幅度最大.富营养化程度相对较轻的菜子湖 6、7 月份克氏原螯虾血细胞 DNA 损伤的增加幅度相对较小.

表 2 菜子湖和巢湖 2010 年 4—9 月份克氏原螯虾血细胞 DNA 损伤¹⁾ ($n = 200$)
Tab. 2 DNA damage in haemocytes of *Procambarus clarkii* in Lake Caizi and Lake Chaohu
from April to September in 2010

样点	月份	TailDNA	$P(\alpha = 0.05)$	TM	$P(\alpha = 0.05)$	OTM	$P(\alpha = 0.05)$
菜子湖	4 月	1.92 ± 1.98	$< 0.001^{a***}$	0.35 ± 0.33	$< 0.001^{a***}$	0.51 ± 0.27	$< 0.001^{a***}$
	5 月	2.91 ± 1.12	0.613^b	0.50 ± 0.15	0.634^b	0.62 ± 0.20	0.185^b
	6 月	3.45 ± 0.96	0.923^c	0.61 ± 0.14	0.606^c	0.74 ± 0.23	0.259^c
	7 月	4.03 ± 0.62	0.782^d	0.74 ± 0.20	0.717^d	0.86 ± 0.32	0.284^d
	8 月	4.47 ± 0.66	0.825^e	0.89 ± 0.23	0.785^e	1.15 ± 0.41	0.019^{e*}
	9 月	5.02 ± 1.42	0.853^f	1.07 ± 0.16	0.553^f	1.19 ± 0.26	0.669^f
巢湖	4 月	2.34 ± 0.88	$< 0.001^{a***}$	0.36 ± 0.22	$< 0.001^{a***}$	0.52 ± 0.20	$< 0.001^{a***}$
	5 月	2.91 ± 0.57	0.196^b	0.49 ± 0.11	0.195^b	0.64 ± 0.15	0.361^b
	6 月	4.10 ± 0.92	0.002^{c**}	0.93 ± 0.21	$< 0.001^{c**}$	0.96 ± 0.18	$< 0.001^{c**}$
	7 月	5.43 ± 1.56	0.047^{d*}	1.23 ± 0.23	$< 0.001^{d**}$	1.41 ± 0.32	$< 0.001^{d**}$
	8 月	6.58 ± 1.41	0.332^e	2.18 ± 1.60	0.293^e	2.22 ± 1.50	0.436^e
	9 月	7.59 ± 1.58	0.430^f	2.75 ± 1.55	0.988^f	3.12 ± 1.45	0.496^f

1) 对各月份间细胞 DNA 损伤指标做单因素方差分析多重比较,由于 TailDNA 和 TM 值方差不齐,故选择 Tamhane'sT2 法;OTM 值方差具有齐性,故选择 LSD 法;*、**、a、b、c、d、e、f 同表 1.

2.2 巢湖和菜子湖克氏原螯虾遗传毒性特征比较

4、5 月份两湖泊克氏原螯虾血细胞微核率和 DNA 损伤指标差异不显著($P > 0.05$);蓝藻暴发初期 6 月份,巢湖细胞微核率和 DNA 损伤指标高于菜子湖,但细胞微核率差异不显著($P > 0.05$),6 月份巢湖克氏原螯虾血细胞 DNA 损伤 TM 和 OTM 值为 0.93 ± 0.21 、 0.96 ± 0.18 ,菜子湖 TM、OTM 值为 0.61 ± 0.14 、 0.74 ± 0.23 ,二者差异显著($P < 0.05$),TailDNA 值差异不显著($P > 0.05$) (表 2);比较两种不同的检测方法,发现彗星实验更敏感;7、8、9 月,巢湖克氏原螯虾血细胞微核率明显高于菜子湖,差异极显著($P < 0.01$) (表 3),血细胞 DNA 损伤也明显高于菜子湖,三项指标差异性均达到极显著($P < 0.01$);微核检测和彗星实验结果具有一致性(表 3,表 4).因此,7、8、9 月份富营养化程度较高的巢湖水质导致克氏原螯虾的遗传毒性效应显著高于菜子湖.

表3 巢湖和菜子湖 2010 年 4—9 月份克氏原螯虾血细胞微核率比较¹⁾
Tab. 3 Cell micronucleus in haemocytes of *Procambarus clarkii* in Lake Chaohu and Lake Caizi from April to September in 2010

	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月
巢湖	0.316 ± 0.131 (n = 6568)	0.340 ± 0.089 (n = 7790)	0.447 ± 0.109 (n = 7760)	0.584 ± 0.117 (n = 7493)	0.603 ± 0.142 (n = 8045)	0.624 ± 0.136 (n = 8163)
菜子湖	0.243 ± 0.063 (n = 7910)	0.272 ± 0.085 (n = 7812)	0.282 ± 0.122 (n = 7929)	0.299 ± 0.112 (n = 7493)	0.331 ± 0.103 (n = 7615)	0.343 ± 0.101 (n = 7648)
t 值	1.528	1.789	1.857	5.919 **	4.885 **	5.240 **
df	11.283	18.585	17.775	18.000	16.395	16.641
P(α = 0.05)	0.154	0.091	0.067	<0.001 **	<0.001 **	<0.001 **

1) 对两湖泊相同月份细胞微核率差异进行 *t* 检验, * 表示两湖泊差异具有显著性, *P* < 0.05, ** 表示两湖泊差异具有极显著性, *P* < 0.01.

表4 巢湖和菜子湖 2010 年 4—9 月份克氏原螯虾血细胞核 DNA 损伤比较²⁾ (n = 200)
Tab. 4 DNA damage in haemocytes of *Procambarus clarkii* in Lake Chaohu and Lake Caizi from April to September in 2010

月份	TailDNA			TM			OTM		
	巢湖	菜子湖	<i>P</i> (α = 0.05)	巢湖	菜子湖	<i>P</i> (α = 0.05)	巢湖	菜子湖	<i>P</i> (α = 0.05)
4 月	2.34 ± 0.88	1.92 ± 1.98	0.859	0.36 ± 0.22	0.35 ± 0.33	0.076	0.52 ± 0.20	0.51 ± 0.27	0.056
5 月	2.91 ± 0.57	2.91 ± 1.12	0.997	0.49 ± 0.11	0.50 ± 0.15	0.773	0.64 ± 0.15	0.62 ± 0.20	0.831
6 月	4.10 ± 0.92	3.45 ± 0.96	0.628	0.93 ± 0.21	0.61 ± 0.14	0.036 *	0.96 ± 0.18	0.74 ± 0.23	0.014 *
7 月	5.43 ± 1.56	4.03 ± 0.62	0.002**	1.23 ± 0.23	0.74 ± 0.20	<0.001**	1.41 ± 0.32	0.86 ± 0.32	<0.001**
8 月	6.58 ± 1.41	4.47 ± 0.66	<0.001**	2.18 ± 1.60	0.89 ± 0.23	0.008**	2.22 ± 1.50	1.15 ± 0.41	0.010**
9 月	7.59 ± 1.58	5.02 ± 1.42	<0.001**	2.75 ± 1.55	1.07 ± 0.16	<0.001**	3.12 ± 1.45	1.19 ± 0.26	<0.001**

2) 对两湖泊相同月份 DNA 损伤指标差异做独立样本 *t* 检验, * 表示湖泊差异具有显著性, *P* < 0.05, ** 表示湖泊差异具有极显著性, *P* < 0.01.

3 讨论

水体中有些污染物的稳定性较高,能通过食物链在生物体内富集,持久性地发挥毒性作用^[21-23],甚至还可以通过代谢转化为毒性更大的污染物^[11,24]. 污染物对生物体的毒性作用可以发生在个体、组织、器官、细胞和遗传物质等各个水平上,其潜在危害非常大^[25]. 重金属、有机农药、半挥发性、挥发性和多环芳烃类有机物是水体环境中常见的毒害性污染物,部分具有很强的致癌、致畸和致突变性^[26-27]. 复合污染物的毒性作用并不等于单一污染物毒性作用的简单相加,它包括污染物毒性作用之间的协同作用、相加作用、独立作用和拮抗作用等^[28],因此可用生物体内遗传物质的变化来综合表征水体遗传毒性污染物的污染程度. 有研究表明有机污染物是导致水体遗传毒性的一个重要因素^[29]. 具有遗传毒性的污染物可以引起 DNA、RNA 损伤和基因突变,也可在亚细胞水平上导致染色体或染色单体断裂缺失和重组^[2],因此可以把微核率和 DNA 损伤作为生物标志物来检测水体污染对生物体的遗传毒性.

微核实验和彗星实验检测结果表明,菜子湖和巢湖克氏原螯虾均出现不同程度的遗传毒性效应,说明两个湖泊存在不同程度的遗传毒性污染物. 近年来,由于化肥、农药的大量使用造成湖泊面源污染,城市附近的湖泊由于城镇污水的排放,水体污染严重^[30]. 巢湖周边的城镇较多,西半湖较东半湖污染严重^[19]. 水体污染物会沿着食物链在生物体内富集^[14,17],并对其产生一定的影响^[6,21]. 菜子湖虽然水体污染相对较轻,但近年来由于周边农业面源污染和人工养殖的兴起,水环境受到一定程度的影响. 本文研究结

果说明,菜子湖和巢湖水体都存在一定程度的污染物背景值. 克氏原螯虾是变温动物,随着环境温度的升高,摄食强度增加^[31]. 菜子湖和巢湖4—9月份细胞DNA损伤和微核率都不同程度地呈现增加的趋势,说明污染物对克氏原螯虾的遗传毒性效应具有累积作用.

蓝藻水华期的5—9月份,巢湖克氏原螯虾血细胞微核率最大值为 0.624 ± 0.136 ,TailDNA、TM、OTM最大值分别为 7.59 ± 1.58 、 2.75 ± 1.55 、 3.12 ± 1.45 ,菜子湖血细胞微核率最大值为 0.360 ± 0.081 ,DNA损伤三项指标最大值分别为TailDNA 5.02 ± 1.42 、TM 1.07 ± 0.16 、OTM 1.19 ± 0.26 ,巢湖克氏原螯虾血细胞微核率和DNA损伤显著高于菜子湖,两湖泊差异极显著($P < 0.01$) (表3,表4),说明巢湖水体对克氏原螯虾具有更强的遗传毒性效应,含有更高浓度的遗传毒性的污染物.

在本研究中,巢湖在蓝藻暴发初期DNA损伤指标和微核率都有较大幅度的增加,水体污染物对克氏原螯虾的遗传毒性效应增加明显,DNA损伤指标5月和6月、6月和7月份差异极显著($P < 0.01$) (表2),血细胞微核率6、7月份差异显著($P < 0.05$) (表1). 巢湖是长江中下游典型的富营养化湖泊^[18],西半湖水水质平均为V类,总磷和总氮严重超标^[19],对巢湖水体重金属含量进行抽样测定,结果表明巢湖水体中重金属污染物含量较低,均在安全质量浓度以下^[32-33],多环芳烃(PAHs)为一类具有致癌作用的有害物质,对生物体有害的PAHs浓度为 $10 \mu\text{g/L}$ ^[34-35],巢湖西半湖区PAHs的浓度低于 $10 \mu\text{g/L}$ ^[36],水体中有机氯农药的含量总体也属于中等偏下水平^[37],挥发性苯系物和挥发性有机物未检出($< 1 \mu\text{g/L}$)^[38],因此,巢湖水体主要受到N、P营养盐的污染^[19]. 蓝藻水华期水体pH达到最大(10.4),P营养盐含量增加^[39],但并无相关研究显示营养盐含量的增加与遗传毒性具有直接关系. 蓝藻水华期会产生次生代谢物MC^[16],在 $18 \sim 25^\circ\text{C}$,鱼腥藻和微囊藻产生的MC含量最高,在其它温度下MC含量较低^[15]. 巢湖在6、7月份,MC含量最高,而在水温较高的8月份,MC含量略低^[40]. 本研究中7、8月份巢湖细胞微核率和DNA损伤差异均不显著($P > 0.05$). 菜子湖没有发生蓝藻暴发,克氏原螯虾血细胞微核率和DNA损伤虽然总体也呈现增加的趋势,但相邻月份5月和6月、6月和7月份间DNA损伤指标差异不显著($P > 0.05$) (表2). MC会沿着食物链在水生生物体内富集^[15],水体中含一定浓度的MC时可导致鱼卵变形、蚤类死亡,鱼类行为和生长异常等现象^[24],有研究报道MC对鱼类^[16]、蚌类^[41]等水生生物具有潜在的遗传毒性. 由于巢湖水体中重金属、PAHs、农药等污染物浓度均较低,我们推测巢湖水体6、7月份遗传毒性增加幅度较大可能是由于水体富营养化引起的蓝藻水华释放的MC加强了对水体生物的毒性. 因此,对富营养化程度较高的巢湖水体水生生物体中MC含量的变化及其对水生生物的遗传毒性应予以长期监测.

两种不同的遗传毒性检测方法结果一致,但彗星实验更敏感,这与有关文献^[42]报道的结果一致. 两种方法检测到的结果差异显著性水平不是完全相同,表明污染物对机体的遗传毒性可能存在着水平差异,不同遗传毒性检测方法检测到的DNA损伤反映了污染物在不同水平上的遗传毒性效应^[12]. 微核实验检测到的损伤至少经历了一个有丝分裂周期,从染色体水平上进行检测^[43],而彗星实验则从分子水平上检测DNA损伤、碱不稳定点、双链断裂等^[20]. 所以有必要从多方面考虑,将不同的遗传毒性检测方法结合起来,如微核实验和彗星实验,才能更全面监测污染物对机体产生的遗传毒性作用.

致谢:样本采集过程中谷登芝、张黎黎、罗子君、黄翔等给予大力支持,陈勤教授和金蓓蓓同学在实验过程中提供帮助,数据分析得到了董翔老师和陈军林的帮助,在此谨致谢忱.

4 参考文献

- [1] Jha AN. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research*, 2004, **552**: 1-17.
- [2] Lacaze E, Geffard O, Bony S *et al.* Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutation Research*, 2010, **700**: 32-38.
- [3] Wang YM, Chen P, Cui RN *et al.* Heavy metal concentrations in water, sediment, and tissues of two fish species (*Triplophysa pappenheimi*, *Gobio huanghensis*) from the Lanzhou section of the Yellow River, China. *Environmental Monitoring Assessment*, 2010, **165**: 97-102.
- [4] Faria M, López MA, Fernández-Sanjuan M. Comparative toxicity of single and combined mixtures of selected pollutants among larval stages of the native freshwater mussels (*Unio elongatulus*) and the invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Science of the Total Environment*, 2010, **408**: 2452-2458.

- [5] Zhang M, Xu J, Xie P *et al.* Metals in surface sediments of large shallow eutrophic Lake Chaohu. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, **79**: 242-245.
- [6] Andrade VM, de Freitas TRO, da Silva J. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research*, 2004, **560**: 57-68.
- [7] Terry SF. Genetic testing and biomarkers in the new decade. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 2010, **14**(1): 1-2.
- [8] Klobucar GIV, Pavlica M, Erben R *et al.* Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*, 2003, **64**: 15-23.
- [9] Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, 2009, **681**: 80-92.
- [10] Yin XH, Li SN, Zhang L *et al.* Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay. *Ecotoxicology*, 2008, **17**: 280-286.
- [11] Mai WJ, Yan JL. Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells. *Aquatic Toxicology*, 2010, **100**: 271-281.
- [12] Boettcher M, Grund S, Keiter S *et al.* Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research*, 2010, **700**: 11-17.
- [13] Jin LN, Zhang WH, Zheng L *et al.* Biodegradation of microcystin in Dianchi Lake aquatic environment. *China Environmental Science*, 2002, **22**(2): 189-192.
- [14] Zhang DW, Xie P, Liu YQ *et al.* Spatial and temporal variations of microcystins in hepatopancreas of a freshwater snail from Lake Taihu. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, **72**: 466-473.
- [15] Zhang DW, Xie P, Liu YQ *et al.* Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Science of the Total Environment*, 2009, **407**: 2191-2199.
- [16] Dorr FA, Pinto E, Soares RM *et al.* Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon*, 2010, **56**: 1247-1256.
- [17] 周立志, 陈春玲. 三种重金属在克氏原螯虾体内的富集特征. *生态学杂志*, 2008, **27**(9): 1498-1502.
- [18] Chen X, Yang XD, Dong XH *et al.* Nutrient dynamics linked to hydrological condition and anthropogenic nutrient loading in Lake Chaohu (southeast China). *Hydrobiologia*, 2011, **661**: 223-234.
- [19] Jin XC, Xu QJ, Huang CZ. Current status and future tendency of lake eutrophication in China. *Life Science*, 2005, **48**: 948-954.
- [20] Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology Toxicology*, 2009, **25**: 5-32.
- [21] 李兆利, 厉以强, 陈海刚等. 长江南京段水体中有机污染物的遗传毒性研究. *环境科学研究*, 2006, **19**(3): 105-108.
- [22] Froehner S, Maceno M. Assessment of bioaccumulation of biphenyls in the trophic chain of a coastal area of Parana, Brazil. *Environmental Monitoring Assessment*, 2010, **164**: 189-198.
- [23] Rosa R, Rodea-Palomares I, Boltes K *et al.* Ecotoxicological assessment of surfactants in the aquatic environment: Combined toxicity of docusate sodium with chlorinated pollutants. *Chemosphere*, 2010, **81**: 288-293.
- [24] Xu MQ, Cao H, Xie P *et al.* The temporal and spatial distribution, composition and abundance of Protozoa in Lake Chaohu, China: Relationship with eutrophication. *European Journal of Protistology*, 2005, **41**: 183-192.
- [25] 黄德军. 黄河兰州段水质污染对花背蟾蜍的毒理学影响[学位论文]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [26] Webster L, Russell M, Walsham P *et al.* An assessment of persistent organic pollutants (POPs) in wild and rope grown blue mussels (*Mytilus edulis*) from Scottish coastal waters. *Journal of Environmental Monitoring*, 2009, **11**: 1169-1184.
- [27] 赵顺顺, 孟范平, 王震宇等. 监测水体重金属污染的分子生物标志物研究进展. *生态环境学报*, 2010, **19**(2): 453-458.
- [28] Faria M, López MA, Fernández-Sanjuan M *et al.* Comparative toxicity of single and combined mixtures of selected pollutants among larval stages of the native freshwater mussels (*Unio elongatulus*) and the invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Science of the Total Environment*, 2010, **408**: 2452-2458.

- [29] Li M, Hu CW, Gao XY *et al.* Genotoxicity of organic pollutants in source of drinking water on microalga *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology*, 2009, **18**: 669-676.
- [30] Xie XY, Qian X, Zhang YC *et al.* Effect on Lake Chaohu water environment of water transfer from Yangtze River to Lake Chaohu. *Research of Environmental Sciences*, 2009, **22**(8): 897-901.
- [31] Correia AM. Food choice by the introduced crayfish *Procambarus clarkii*. *Annales Zoologic Fennici*, 2003, **40**: 517-528.
- [32] 童军华, 黄祥明, 陈 勇. 巢湖水体重金属污染评价. 安徽农业科学, 2006, **34**(17): 4373-4374.
- [33] 宋维彦, 靳桂双, 毕伟伟等. 五种重金属离子对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)的急性毒性作用研究. 激光生物学报, 2010, **19**(2): 201-211.
- [34] 冯承莲, 雷炳莉, 王子健. 中国主要河流中多环芳烃生态风险的初步评价. 中国环境科学, 2009, **29**(6): 583-588.
- [35] Engraff M, Solere C, Smith KE. Aquatic toxicity of PAHs and PAH mixtures at saturation to benthic amphipods: Linking toxic effects to chemical activity. *Aquatic Toxicology*, 2011, **102**: 142-149.
- [36] 邹爱红. 巢湖西半湖水体中有机污染物监测及污染现状的研究[学位论文]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.
- [37] 张 明, 花日茂, 李学德等. 巢湖表层水体中有机氯农药的分布及其组成. 应用生态学报, 2010, **21**(1): 209-214.
- [38] 王永华, 徐福留. 顶空气相色谱法测定水中挥发性有机污染物. 湖泊科学, 2010, **22**(6): 910-915.
- [39] Kim SG, Joung SH, Ahn CY *et al.* Annual variation of *Microcystis* genotypes and their potential toxicity in water and sediment from a eutrophic reservoir. *Microbiology Ecology*, 2010, **4**: 93-102.
- [40] 杨 华. 巢湖和太湖微囊藻毒素的生态学研究[学位论文]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2006.
- [41] Juhel G, O'Halloran J, Culloty SC *et al.* In vivo exposure to microcystins induces DNA damage in the haemocytes of the Zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, as measured with the comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2007, **48**: 22-29.
- [42] Zhong Y, Feng SL, Luo Y *et al.* Evaluating the genotoxicity of surface water of Yangzhong city using the Vicia Faba micronucleus test and the comet assay. *Bulletin of Environment Contamination Toxicology*, 2001, **67**: 217-224.
- [43] Ali FK, El-Shehawi AM, Seehy MA. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. *African Journal of Biotechnology*, 2008, **7**(5): 606-612.