

# 太湖梅梁湾冬季表层水体致大肠杆菌 阿拉伯糖抗性正向突变\*

邬建勇<sup>1</sup> 沈 蕾<sup>1</sup> 高 光<sup>2</sup> 林国芳<sup>1</sup> 沈建华<sup>1</sup>

(1: 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所中德毒理学实验室, 上海 200025,

2: 中国科学院南京地理与湖泊研究所太湖湖泊生态系统研究站, 南京 210008)

**提 要** 本文采用阿拉伯糖抗性正向突变试验(ara 试验)并辅以鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷回复突变试验(Ames 试验)对太湖梅梁湾冬季表层水样品致突变性进行分析研究. ara 试验结果表明 9 个点样品中有 5 个(主要为入湖河口及近岸样品)表现显著的直接致突变性, 加入哺乳动物来源的代谢活化系统 S9 后, 结果仍呈现同样的趋势. Ames 试验在增加两倍半上样剂量的条件下表现出与 ara 试验大体一致的检出率. 在本研究中, ara 试验对于成分复杂的环境样品表现更高的检出灵敏度. 表明 ara 试验作为首选方法来检测环境中复杂化学物基因毒性方面有良好前景.

**关键词** 太湖 致突变性 ara 试验 Ames 试验

**分类号** X171.5

随着社会经济的高速发展, 进入环境中的有机化合物急剧增加, 水中有机污染物, 特别是饮用水源的有机污染已成为一个广泛关注的问题. 太湖流域是我国经济发达、人口高度密集的地区, 其湖水污染已经到了比较严重的地步<sup>[1]</sup>, 我国目前对此开展的水环境质量控制指标大多局限于一些化学物质的环境存在量的检测, 对于环境污染对人体健康和生态系统有害效应的直接研究, 尤其是自然状态下混合存在污染物的健康和生态效应的研究还较少<sup>[2, 3]</sup>.

阿拉伯糖抗性正向突变试验(L-arabinose resistance forward mutation test), 简称 ara 试验, 是一种细菌正向突变试验, 它选用在含阿拉伯糖选择性培养基上生长受阻但在致突变物的作用下能从阿拉伯糖敏感型转变为抗性型的 araD 突变菌株<sup>[4]</sup>. 在细菌中, 阿拉伯糖的降解需要三个基因: araB, araA, araD, 它们分别编码三个酶. 当 araD 发生突变时, 不仅阻碍细菌利用阿拉伯糖作为碳源, 而且导致有毒中间物 L-核酮糖-5-磷酸的积累, 从而抑制细菌生长. 如果 L-核酮糖-5-磷酸产生之前的反应步骤受阻, 这种中间有毒物不能产生, 细菌就能正常生长. 因此, 任何阻止从阿拉伯糖代谢成 L-核酮糖-5-磷酸的基因突变都能用这种方法检测到. 虽然 ara 试验和 Ames 试验所检测到的致突变物大部分相同, 但前者比后者更灵敏, 检测范围更广, 而且用一个菌株就可以完成范围广泛的致突变物的检测, 不必象 Ames 试验那样同时需要结合几种菌株才能完成检测<sup>[5]</sup>.

本文采用一种较新的研究方法, 即 ara 试验, 并结合 Ames 试验, 对西太湖冬季水体中有机

\* 中国科学院创新项目(KZCX2-403)资助

收到日期 2002-03-13; 收到修改稿日期 2002-05-13. 邬建勇, 男, 1977 年生, 硕士研究生.

物污染的遗传毒性进行了初步研究.

# 1 材料与方法

## 1.1 水样采集与处理

2000 年 12 月 15 日在西太湖梅梁湾水域 0、1、2、3、4、5、6、8、9 各点取表层水 25L,各样点的位置详见图 1. 水样采集和样品制备均按沈蕾方法进行<sup>[6]</sup>. 所取水样过滤后,用 XAD-2 树脂柱(XAD-2 树脂来自 SUPELCO 公司,美国)吸附,以 50mL 丙酮(分析纯)洗脱两次,洗脱液在 37℃ 恒温水浴中用高纯氮气(99.99%) 吹干,其残留物用二甲亚砜(缩写为 DMSO,分析纯,AM-RESCO 分装)溶解,并配成不同的浓度系列,-80℃ 冰箱保存备用.

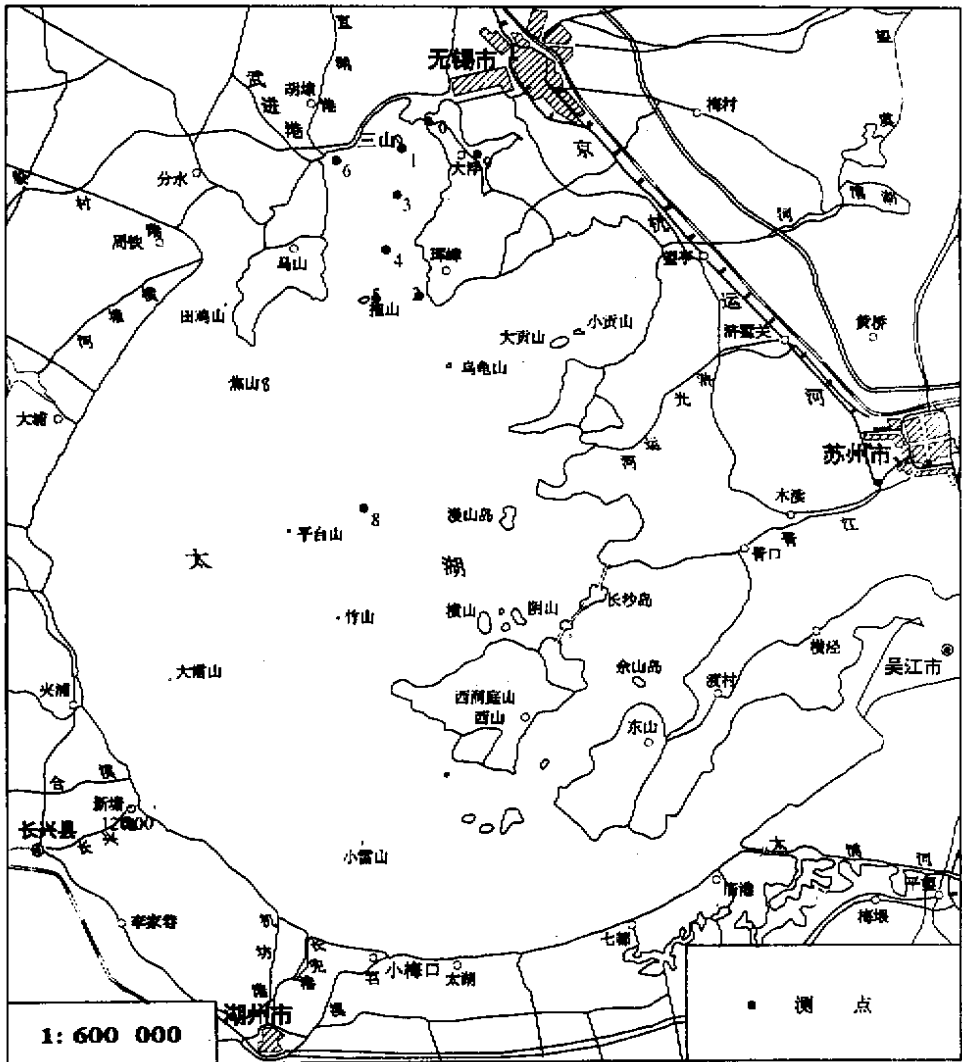


图 1 太湖梅梁湾水域采样点的地理位置图

Fig.1 The geographical location of sampling points in Meiliang bay of west Taihu Lake

## 1.2 方法

1.2.1 ara 试验 据 Vahl 等采用预培养法<sup>[7]</sup>,菌株为大肠杆菌 *araD* 基因突变型 UC1121,其 *araD* 基因发生突变,并带有抗青霉素基因、抗四环素基因和一些附加突变基因<sup>[4]</sup>(遗传标记为 *araD81*,  $\Delta$ (*uvrB* - *bio*)<sub>pKM101</sub>)。本菌株承蒙西班牙 Cordoba 大学 C. Pueyo 教授提供<sup>[4]</sup>。40 $\mu$ L 样品(分别相当于原水样 200mL、100mL、50mL) 0.5 mL 的 VB 盐、0.1 mL 的菌液(约  $10^7$  个细胞)与 2 mL 的顶层琼脂混匀后倒入选择性培养平板中,放入培养箱中培养 3d(37 $^{\circ}$ C)后记计数。加 S9 的做法参照<sup>[8]</sup>。同时设阴性对照(溶剂以及双蒸水)和阳性对照(加 S9 时为苯并[a]芘(BP),不加 S9 时为 1-硝基芘(NP))。每个平行剂量有三个重复。一般当突变率  $MR \geq \lambda$  突变率  $MR = \text{样品突变数} / \text{自发突变}$ ,且存在一定的剂量效应关系且标准差不超过均数的 20% 时确定为阳性。

1.2.2 Ames 试验 按照 Ames 平板渗入法鉴定浓缩物的致突变性<sup>[7]</sup>,具体步骤按沈蕾方法<sup>[6]</sup>。由于用鼠伤寒沙门氏杆菌组氨酸缺型菌株 TA100 在初步试验中一直表现为阴性,故本试验在正式阶段只用 TA98 菌株。浓缩样品的测试剂量分别为每平板相当原水样 500mL、250mL、125mL 三个浓度组,同时设阴性对照和阳性对照。阳性判断标准与 ara 试验相同。

## 2 结果

### 2.1 ara 试验

通过对表 1 的分析可看出 0、1、3、6、9 号表层水样的突变率大于 2,且有明显的剂量反应关系,统计学上均有显著意义( $P < 0.05$ ),可判断为阳性。其中 0、6、9 号水样有机物污染比较严重,6 号水样污染最严重。4 号、8 号水样未显示出阳性。2 号和 5 号点水样虽突变率大于 2,但剂量反应关系不明显,统计学上无显著意义,因此可认为它们有可疑的致突变性。加入 S9 后,0、1、3、6、9 号水样有致突变性,除 0 号、3 号点外,其余各点致突变强度有所降低。

### 2.2 Ames 试验

同样可以判定 0、1、3、6、9 号水样有不同程度的致突变性,其中 0、6、9 号水样致突变性非常明显,6 号水样最严重。2、4、5、8 号水样未显示出阳性,其中 8 号污染最轻。加入 S9 后,0、1、3、6、9 号水样依然呈阳性,0 号点的致突变性有所增加,其余各点的结果与未加 S9 的结果相近。需要注意的是 2 号和 5 号水样在 ara 试验中在 50~200mL 的检测范围内表现出可疑的致突变性,而在 Ames 试验中,该样品在 125~500mL 的剂量范围内对 TA98 菌株未表现出致突变能力。

## 3 讨论

两种试验方法对西太湖梅梁湾水域水体样品有机提取物的检测结果较为一致。二者都是 6 号点水样致突变性最高,0 号点和 9 号点次之,8 号点最低。6 号点位于直湖港口,0 号点位于梁溪河口,河中携带大量有机污染物直接流入湖中可能是这两处水样呈强致突变性的主要原因,有人观察到这两个河口区的藻类生物量明显高于其他湖区<sup>[9]</sup>;9 号点位于五里湖中,早在八十年代,五里湖就已经发现受到严重污染<sup>[1]</sup>,由于五里湖与主湖区相连的通道较为狭窄,湖水的稀释自净能力较差,因此,现在看来,虽经过长期的治理,水质状况仍未得到显著改善;8 号点位于太湖中心,水面宽阔,离岸源污染源较远,因此,受污染程度较轻。1、2、3、4、5 号位于

梅梁湾内近岸区,除 4 号点比较清洁外,其它几个水样也受到不同程度的污染,1 号点污染比较严重.这也从另一个途径证明了入湖河流以及其他岸源污染源是引起太湖水体有机物污染的重要原因.梅梁湖是重要工业城市无锡市的主要的饮用水源,因此对这一水域中有机污染物的控制和治理就显得尤为紧迫,对入湖河流全流域范围污染源以及沿湖地区面上污染的有效控制和治理对于整个太湖水体环境整治的最终成功与否十分重要.

表 1 用 ara 试验和 Ames 试验在加与不加 S9 的条件下测得表层水样的致突变率\*

Tab. 1 The mutation rate of the surface water samples using Ames test and ara test with or without S9

位点	ara 试验(UC1121)			Ames 试验(TA98)		
	剂量 (mL)	突变率 (-S9)	突变率 (+S9)	剂量 (mL)	突变率 (-S9)	突变率 (+S9)
200	2.512±0.15	3.58±0.20	5.95±0.18	3.58±0.41	4.347±0.742	1
100	1.711±0.02	2.72±0.13	4.08±0.28	2.412±0.29	2.594±0.235	
50	1.28±0.02	1.83±0.16	1.58±0.12	1.58±0.29	1.388±0.408	
2	200	2.34±0.08	1.27±0.06	500	1.52±0.35	1.23±0.08
	100	1.72±0.12	1.37±0.15	250	1.17±0.18	1.11±0.12
	50	1.68±0.08	1.10±0.11	125	1.17±0.06	1.03±0.15
3	200	2.08±0.16	2.25±0.17	500	2.64±0.43	2.57±0.38
	100	1.58±0.11	1.79±0.04	250	1.82±0.10	1.80±0.27
	50	1.37±0.05	1.68±0.04	125	1.41±0.24	1.11±0.15
4	200	1.80±0.06	1.29±0.08	500	1.64±0.06	1.77±0.27
	100	1.80±0.20	0.91±0.06	250	1.47±0.12	1.69±0.23
	50	1.70±0.04	1.33±0.03	125	1.17±0.35	1.03±0.21
5	200	2.29±0.06	1.28±0.02	500	1.70±0.06	1.84±0.20
	100	1.51±0.20	0.77±0.04	250	1.35±0.29	1.04±0.20
	50	1.52±0.12	1.04±0.07	125	1.35±0.24	1.24±0.20
6	200	6.02±0.45	4.96±0.43	500	12.76±0.59	10.76±0.76
	100	3.43±0.38	2.39±0.10	250	7.35±0.10	6.64±0.16
	50	2.82±0.18	2.17±0.19	125	4.23±0.24	2.76±0.12
8	200	1.82±0.14	0.97±0.07	500	1.23±0.35	1.20±0.08
	100	1.20±0.20	1.55±0.12	250	0.94±0.18	1.40±0.24
	50	1.26±0.12	1.57±0.12	125	1.06±0.12	0.88±0.04
9	200	5.59±0.37	3.60±0.10	500	5.47±0.59	5.72±0.44
	100	3.09±0.07	2.65±0.12	250	3.17±0.53	3.12±0.48
	50	2.22±0.23	2.03±0.06	125	2.23±0.24	2.20±0.44

\* :表中突变率为三个重复平板突变率的平均数与标准差.

加入 S9 后,除 0 号点水样的突变率有明显上升外,整体上呈下降趋势.由于 S9 的成分主要是混合功能氧化酶,可活化大多数前致突变物,但也可使一些直接致突变物代谢减毒,因此,太湖水体中的致变物以直接致变物为主.由于这些样品对 TA100 菌株均呈现阴性,对 TA98 菌株部分呈阳性,这也表明水中污染物致变机制以导致遗传密码插入或删除的移码型突变为主.

总体上看,水样的致突变性是比较强的,有些水样的突变率远在 2 倍以上,这与采样时间

也有很大关系.因为太湖是雨源型湖泊,受降水影响较大.在冬季,太湖湖区的降水量只占降水总量的 11%~14%,太湖处于枯水期,水体污染物的浓度高<sup>[10]</sup>.

对两种检测方法进行比较,可发现二者的结果基本一致,但又略有不同,ara 试验检测谱较广一些.ara 试验所用的最高剂量为每平板相当于 200mL 原始水样,而 Ames 试验为相当于 500mL 原始水样,但两者的结果却基本一致,表明 ara 试验的检出灵敏度比 Ames 试验高.理论上说,多个基因位点中其中一个位点发生突变的频率要比某个特定基因发生回复突变的频率要高的多,这也正是 ara 试验比 Ames 试验所优越的地方.但 ara 试验对剂量反应的区分度不如 Ames 试验那么明显,这需要对此方法进一步探讨和研究.以上实验结果也提示把 ara 试验作为检测复杂环境样品基因毒性的首选检测手段的可能前景.

致谢 在采集水样过程中,得到胡维平站长,季江高工,陈宇炜和钱荣树等同志大力帮助,在此表示感谢.

### 参 考 文 献

- 1 孙顺才,黄漪平.太湖.北京:海洋出版社,1993
- 2 高锡云,陈宇炜.梅梁湾及大太湖水环境现状特征与富营养化趋势分析.见:蔡启铭主编,太湖环境生态研究(-).北京:气象出版社,1998
- 3 高锡云,刘元波.梅梁湾及大太湖富营养化限制性营养盐研究.见:蔡启铭主编,太湖环境生态研究(-),北京:气象出版社,1998
- 4 Pueyo C. Forward mutations to arabinose resistance in salmonella typhimurium strains: A sensitive assay for mutagenicity testing. *Mutation Res*, 1978, **54**: 311~321
- 5 Ruiz-Rubio M, Hera C. Comparison of a forward and a reverse mutation assay in salmonella typhimurium measuring L-arabinose resistance and histidine prototrophy. *The EMBO Journal*, 1984, **3**: 1435~1440
- 6 Shen L, Lin G F, et al. Genotoxicity of surface water samples from Meiliang bay, Taihu Lake, Eastern China. *Chemosphere*, 2000, **41**: 129~132
- 7 Vahl H H, Karbe L et al. Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe river: comparison of salmonella microsome test, arabinose resistance test, and umu-test. *Mutation Res*, 1997, **394**: 81~93
- 8 Maron D M, Ames B N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*, 1983, **113**: 173~215
- 9 陈宇伟,高锡云等.西太湖北部夏季藻类种间关系的初步研究.湖泊科学,1998, **10**(4): 35~40
- 10 黄漪平,范成新等.太湖水环境及污染控制.北京:科学出版社,2001

# The Mutagenicity Study of Surface Water from Meiliang Bay , Taihu Lake in Winter By E.coli UC1121 L-arabinose Resistance Forward Mutation Test

WU Jianyong<sup>1</sup>    SHEN Lei<sup>1</sup>    GAO Guang<sup>2</sup>    LIN Gufang<sup>1</sup>    SHEN Jianhua<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>:Sino-German Laboratory of Toxicology ,Institute of Plant Physiology and Ecology ,

Shanghai Institutes for Biological Sciences , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200025 , P. R. China ;

<sup>2</sup>:Nanjing Institute of Geography and Limnology , Chinese Academy of Sciences , Nanjing 210008 , P. R. China )

## Abstract

The L-arabinose resistance forward mutation test ( ara test ) , together with Ames test , was performed for evaluation of mutagenicity of the surface water samples collected from Meiliang Bay , Taihu Lake in winter. The five of the nine surface water samples were detected as mutagen positive by ara test , most of them were collected from the estuary which flow into the lake or from the edge of shore area. The same tendency was observed with the involvement of mammalian S9 metabolic activation system. The roughly , coincident results were confirmed by Ames test when the sample doses applied were enhanced to two and a half times compared with that of ara test. The data suggest that detection sensitivity of ara test is higher if intricate environmental samples are concerned. Thus , prospect for ara test to be the primary choice is prompted when the genotoxicity screening of environmental mixtures is required.

**Keywords** :Taihu Lake ; mutagenicity ;ara test ;Ames test