

研究简报

利用蚕豆根尖微核试验监测遗爱湖水体遗传毒性的研究

陶佳喜

(黄冈师范学院生物系, 黄州 438000)

THE REASEARCH ON UTILIZING *VICIA FABRA* ROOT MICRKERNEL TEST TO MONITOR THE HEREDITARY TOXICITY ABOUT THE WATER BODY OF YIAI LAKE

TAO JiaXi

(Department of Biology, Huanggang Teachers College, Huangzhou 438000)

关键词: 微核技术; 遗传毒性; 遗爱湖; 蚕豆根尖; 水体

Key words: Microkernel technology; Hereditary toxicity; Yiai Lake; *Vicia fabra* root; Water body

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)04-0454-03

20世纪80年代以来, 微核技术已开始应用监测环境各个方面, 90年代以后, 进行环境水体监测研究的有陈建军等^[1,2], 均取得了一定成绩。作者以此技术对古城黄州东坡赤壁附近的遗爱湖水质进行首次的直接检测和研究。有关数据将为治理遗爱湖提供有关参考, 也对将要开发利用遗爱湖资源和旅游景点具有可持续性发展意义。

1 材料与方法

1.1 选点和采集水样 根据遗爱湖的地理状况, 将湖区分为西湖、东湖、青砖湖, 合称遗爱湖。在湖区设定8个有代表性的采样点。并进行逐一编号(1—8)和记录水样采样时间、采样地点、湖区水质现状及周边工厂有无情况, 然后用水样分别处理蚕豆, 观察统计根尖微核数。

1.2 处理 普通青皮蚕豆(*Vicia fabra*)购自黄冈市绿色粮行。选择无病、无霉和无质变的较饱满并又新鲜的青皮蚕豆放入玻璃水槽中, 用蒸馏水漂洗3—5次, 每次5min, 然后将蚕豆种子分别放入8个采样点的水样中置25℃的培养箱中浸泡24—48h左右, 直至种子完全膨胀, 中途换水1—2次, 再选取膨胀良好的种子放入用水样湿润的脱脂棉上, 连同培养皿一块放置25℃的培养箱继续催芽48h, 使初生根长2—3cm时, 再选发芽良好和根尖粗壮的种子, 剪下根尖进行固定处理。

1.3 染色、压片 按常規制片法^[3]。如果当时不能及时制

片和观察, 可将材料置于4℃冰箱内保存待用。

1.4 微核(MCN)观察与计数 选择蚕豆根尖的分生组织平铺在载玻片正中央, 盖上盖玻片, 压碎组织, 使平铺均匀的细胞展示在载玻片上, 直接在显微镜下先低倍镜寻找目标, 后转换高倍镜下观察计数微核。每一采样点镜检10个不同根尖, 每一根尖镜检100个左右细胞, 用手持计数器对每一样点的根尖细胞逐一统计, 并计算出MCN‰, 再利用生物统计学中方差分析法(F测验), 求出各采样点的MCN‰差数, 经q方法检验各采样点微核率与对照的差异显著性, 并对多重比较结果等一并归于各自表格中。另外, 结合遗传学和王永兴等^[3]方法判断微核大小、形态的标准进行微核观察计数。统计和判断微核标准为:(1)该物质位于细胞内的细胞质中, 与主核完全分开, 距离不等;(2)染色体的颜色深浅基本与主核一致或弱淡;(3)大小形态为主核的1/10以下, 一般情况下呈椭圆形或圆形, 且边缘较清晰的小核;(4)每个视野出现的微核数不多。观察时, 认真调节载玻片逐一统计微核数。

2 结果与讨论

2.1 遗爱湖区各采样点的MCN(表1)

黄冈遗爱湖区各采样点出现的MCN‰, 经方差分析可以看出, 湖区内两个大区即8个采样点与自来水(CK)对照的微核率显著不同(实得F>F_{0.05}, 故P<0.05)见表2。表2说明了直接用采样点水样对蚕豆进行处理, 能获得应用微核技术

收稿日期: 2003-12-21; 修订日期: 2004-02-21

基金项目: 湖北省教育厅自然科学研究重点(200204BA004)项目资助

作者简介: 陶佳喜(1952—), 男, 湖北省麻城市人; 副教授; 主要从事环境微生物研究。参加本项目还有课题组其他成员及本系99级学生程焱等, 在此一并致谢

表 1 湖区各采样点的微核率(%)的统计

Tab. 1 Statistic of MCN (%) in each sampling spot of lake

| 湖区号 Section of lake | 采样点 Sampling spot | 观察细胞数 Cell number of watching | 微核数 MCN(%) Microkernel number | $\bar{X} \pm SE$ | \bar{X} 与 CK 差数 |
|------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------|-------------------|
| 东区 | 市原种场 1 | 3031 | 53 | 17.49 ± 1.78 | 10.00 |
| East area | 市水产学校 2 | 3022 | 38 | 12.56 ± 1.58 | 5.07 |
| | 渔业基地 3 | 2998 | 33 | 11.01 ± 1.74 | 3.52 |
| | 连心桥(出水口) 4 | 3003 | 43 | 14.33 ± 0.96 | 13.37 |
| 西区 | 市二医院 5 | 3029 | 37 | 12.22 ± 1.75 | 4.73 |
| West area | 市教委 6 | 3038 | 80 | 26.37 ± 3.56 | 18.88 |
| | 市公安学校 7 | 3020 | 68 | 22.52 ± 1.89 | 15.03 |
| | 市委党校后 8 | 3001 | 47 | 15.66 ± 1.20 | 8.17 |
| | CK(自来水) 9 | 3027 | 22 | 7.49 ± 3.49 | / |

注: MCN% 总数为 10 个根尖(每个根尖观察约 100 个左右细胞)微核千分率的总和。

表 2 湖区各采样点 MCN(%) 的 F 测验(方差分析)

Tab. 2 The analyse of square surplus of MCN% in each sampling spot

| 变异来源 | Source of aberrance | DF | SS | MS | F | $F_{0.05}$ | $F_{0.01}$ |
|------|---------------------|----|--------|--------|-------|------------|------------|
| 样本间 | Among the swatch | 8 | 844.09 | 105.51 | 19.61 | 2.51 | 3.71 |
| 样本内 | Inner the swatch | 18 | 96.91 | 5.38 | | | |
| 总变异 | Chief aberrance | 26 | 941.10 | | | | |

注: $V_1 = 8, V_2 = 18$ 查下表得 $F_{0.05} = 2.51$, 现实得 $> F_{0.05}$, 故 $P < 0.05$ 。

手段监测淡水污染的显著效果, 方法简单, 数据可靠。

从表 1 中还可看到各采样点上微核率平均数与对照(CK)的差数有显著差别。即: 市教委(6 号样点)排放口的差数高达 18.88, 而渔业基地(3 号样点)的差数仅为 3.52, 分析原因是 3 号样点位于东区内靠近农村, 且有山丘和树林, 附近没有工厂又无湖角之处, 故无废水排出, 它的水源仅来自山丘流下的和自然的雨水, 所以基本没有污染, 为清洁水。其次污染较轻的为市二医院(5 号样点)和市水产学校(2 号样点)它们与对照组的差数分别为 4.73 和 5.07。这是因为二个样点有小山丘, 居住人口不多, 湖面水质只有漂浮物和污迹现象, 附近也无工厂废水排入所致。除此以外其他各样点的差数和污染轻重的原因, 就不再一一列举。依据表 1、表 2 的各种数据来分析, 各采样点的样水是具有代表性, 并且污染程度各不相同。同时也说明利用蚕豆根尖的微核技术监测淡水湖泊的污染, 遗传毒性, 其效果是好的, 结果十分灵敏可靠。同时还表明采用新鲜、饱满蚕豆为实验材料来监测湖水污染情况和致突变效果, 可在实际监测中能应用于土壤、空气及其他环境污染物之中。

2.2 遗爱湖区各采样点微核的差异显著性的多重比较

黄冈遗爱湖区各采样点微核的差异显著的多重比较, 经 q 检验^[3~4], 市教委附近排放口和市公安学校周围工厂排放口的微核率与对照之间有极显著性差异($P < 0.01$)见表 3。

6、7 号两个点水样是没有被湖水完全稀释的工厂废水, 它们的微核率和对照之比有极显著差异, 反映了采样点附近工厂排放的废水中有关于损伤 DNA 与染色体的物质,

表 3 湖区各采样点 MCN% 的 q 检验

Tab. 3 The verify of MCN % in each sampling spot of lake

| 采样点 Sampling spot | MCN % 平均数 Average of MCN % | 差异显著性 | |
|----------------------|-------------------------------|-------|------|
| | | 0.05 | 0.01 |
| 市教委(6) | 26.37 | a | A |
| 市公安学校(7) | 22.52 | a | Ab |
| 市委党校(8) | 17.49 | b | Bc |
| 市原种场(1) | 15.66 | bc | C |
| 连心桥(出水口)(4) | 14.33 | bc | CD |
| 市水产学校(2) | 12.56 | bc | CD |
| 市二医院(5) | 12.22 | bc | CD |
| 渔业基地(3) | 11.01 | cd | CD |
| 自来水(CK) | 7.49 | d | D |

注: 1. 凡有一个相同标记字母的即为差异不显著, 凡具不同标记字母的即为差异显著。

2. 小写字母表示 $P > 0.05$ 显著水平。大写字母表示 $P > 0.01$ 显著水平。

说明该工厂废水有多种遗传毒性物质存在。故此, 也说明了两个样点附近工厂的废水有严重污染。市委党校(8 号样点)和原种场(1 号样点)两个点出现的微核频率仅次于 6 号、7 号样点。其原因是这两个样点位于湖区的西南面, 属黄州的工业区, 多数厂已停产, 故污染率低于 6 号、7 号样点。从采样点中能清楚看出: 8 号样点, 水色昏黄、有泡沫, 并有少量生

活垃圾, 200米处有工厂排放废水的排放口; 1号样点, 水色浓绿、富有机质、水面漂浮有水葫芦和生活垃圾, 右方500m处有工厂及生活区排放的废水和污水排放口。所以微核(%)也较高, 均在17.49%和15.66%。但是, 在湖区的东南方向有意安排了生活区的三个采样点(2号、5号和3号)。目的是为了探索一下蚕豆根尖的微核效应对城市生活区排放的生活污水的敏感性。通过实验可以看到, 这3个点的微核率(分别为: 12.56% (2号); 12.22% (5号); 11.01% (3号))与对照组(9号)微核7.26%相比高于40%以上。说明了利用蚕豆根尖微核技术不仅能检测工厂废水, 而且能检测生活污水的污染情况。

从表3各项实测指标还可看出: (1) 黄州遗爱湖湖区的污染程度和遗传毒性是西北区4个样点高于东南区的4个样点。分析原因是西北区样点周围不远处多数有工厂和生活污水排放口, 而西南区多数为居民生活区, 少有工厂; 故排放的多为生活污染。所以西区污染程度高于东区。(2) 从四个组综合指标得出污染程度为: 即 $4 > 3 > 2 > 1$ 。(3) 8个采样点的综合指标得出污染程度为: 采样点 $6 > 7 > 8 > 1 > 2 > 4 > 5 > 3$ 。其中污染严重的为采样点6号(市教委)。它的微核率平均值26.37%为对照值7.49%高出18.88%, 污染指数

为3.63, 其污染程度属重度污染。也说明该采样点附近工厂排放出的废水中含有较多的遗传物质或者是致突变化学物质。该物质的数目越多其毒性和诱变、损伤植物DNA与染色体能力越强^[5], 也就是蚕豆根尖出现的微核率的平均值越高。也与李谷等^[3-4]研究的结果是一致。

2.3 遗爱湖各采样点的微核率的比较

为了说明采样点周边工厂排放的废水是否真正造成遗爱湖水质污染的主要因素, 将8个采样点的附近有无工厂分成有工厂、无工厂两组(表5), 求出各组微核的平均值, 并用F检验的方法对两组平均值进行检验(表5)。

表4 湖区采样点工厂分布的比较

Tab. 4 Some factories are distributed to sample in the lake region

| 采样点周边无工厂组 | | 采样点周边有工厂组 | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 水样编号 | MCN(%)平均值 | 水样编号 | MCN(%)平均值 |
| 2 | 12.56 | 1 | 15.66 |
| 3 | 11.01 | 6 | 26.37 |
| 4 | 14.37 | 7 | 22.52 |
| 5 | 12.22 | 8 | 17.49 |
| 4个样点 | 16.72 | 4个样点 | 27.34 |

表5 湖区采样点水样的MCN(%)方差分析

Tab. 5 Some factories have little and MCN% analysis of the anhydrous style to sample in the lake region

| 变异来源 | Make a variation the source | DF | SS | MS | F | F _{0.05} | F _{0.01} |
|------|-----------------------------|----|--------|--------|------|-------------------|-------------------|
| 组间 | Among groups | 1 | 127.04 | 127.04 | 9.93 | 5.99 | 13.74 |
| 组内 | In the group | 6 | 76.79 | 12.08 | | | |
| 变异 | Variation | 7 | 203.83 | | | | |

注: $V_1 = 1, V_2 = 6$ 得 $F_{0.05} = 5.99$, 因现实得 $F > F_{0.05}$, 故 $P < 0.05$ 。

综合表4、表5检测的数据为: 无工厂组的采样点(2、3、4、5)的微核率MCN%平均值16.72%; 而有工厂组的采样点(1、6、7、8)的微核率MCN%平均值27.34%。后者超出前者的60.42%。表5的MCN(%)方差分析结果表明: (1)二者间的差异显著; (2)工厂排废水是造成遗爱湖水质污染的主要因素。现在黄冈市政府正在采取积极措施整治遗爱湖的周边环境, 修改城镇发展规划, 扩大了绿化面积, 正在等修建遗爱湖区观光大道, 减少废水、污水的出口个数。这些重要举措的实施, 将有利于遗爱湖的资源保护和持久发展。

参考文献:

- [1] Chen J J, Xia Y Z. The micronucleus test of tadpoles *Rana nigricans lata*, A system for detection of mutagens in fresh water[J]. *Acta Hydrobiol Sinica*, 1993, 17(4): 298—307[陈军建, 夏宜. 青蛙蝌蚪微核试验——种水体诱变剂检测系统的建立. 水生生物学报, 1993, 17(4): 298—307]
- [2] Verschaeve L, Gilles J. Single cell gel electrophoresis assay in the

earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1995, 54: 112—119

- [3] Wang Y X, Wu Y L. The Research on Utilizing Little Nuclear Technology of Root of Broad Bean To Monitor The Water Quality of Tai Hu [J]. *China Envir Sci*, 1997, 17(3): 252—255[王永兴, 吴庆龙. 利用蚕豆根尖细胞微核技术监测太湖的研究[J]. 中国环境科学, 1997, 17(3): 252—255]
- [4] Li G, Cheng X L, Chen D, et al. Research on The application and studies of micronucleus assays with fish to screen mutagen in water[J]. *Acta Hydrobiol Sinica*, 2002, 26(1): 74—81[李谷, 程晓莉等. 鱼微核试验筛选水体诱变物的研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(1): 74—81]
- [5] Feng S L, Kong Z M, Wang W X, et al. Genotoxicological studies of two pesticides to tadpoles and frogs of *Rana nigriculata halloewii* by micronuclei test and single cell gel electrophoresis [J]. *Acta Hydrobiol Sinica*, 2004, 28(1): 52—57[封少龙, 孔志明, 王五香, 等. 应用微核试验和单细胞凝胶电泳技术来检测农药对青蛙蝌蚪及成体的遗传毒性[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1): 52—57]