

城镇污水诱发青蛙蝌蚪红细胞微核 及其在环境监测中的应用*

陈军建 夏宜珍

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

本文利用青蛙 (*Rana nigromaculata* Hallowell) 蝌蚪红细胞微核试验, 作为检测城镇污水诱变活性的一种新的监测技术。在 16d 生活污水处理的实验中, 青蛙蝌蚪红细胞微核细胞率 2d 后就呈现统计上的显著增加, 并随处理时间的延长而增高, 第 12d 达到最大值。在不同浓度混合污水处理实验中, 蝌蚪红细胞微核细胞率呈现明显的剂量依赖性增加。上述实验证明城镇生活污水和混合污水都具有较强的诱变活性。

作者从遗传毒理学的角度评价了湖北黄州综合生物塘系统对污水诱变活性的净化效能。城镇混合污水经综合生物塘各梯级塘处理, 蝌蚪微核细胞率逐级下降, 由进水的 7.54‰ 下降到最后出水的 1.52‰, 接近对照 (1.07‰) 水平。其中综合生物塘的藻菌单元比水生植物单元对污水诱变活性具有更强的净化效力。本文提出污水“诱变指数”可作为综合生物塘一项功能评价指标。

关键词 青蛙蝌蚪, 微核, 污水, 综合生物塘, 诱变指数

城镇污水是一类重要的环境污染物, 其大量排入江河、湖泊, 引起水体严重污染和水质恶化。其中遗传毒性物质, 它们往往含量很少, 却具有巨大的潜在危害, 通过长期作用, 一方面可以导致水生群落结构的改变和破坏, 同时通过食物链和饮水等途径可以在人体引起致突变和/或致癌效应, 对人类健康造成危害。因此, 发展有效的污水诱变活性监测新技术和探讨水体诱变污染净化途径已成为一项紧迫课题。

材 料 和 方 法

1. 实验生物 采集城郊清洁池塘中的小青蛙蝌蚪, 在实验室驯化培养至少一个星期。蝌蚪均饲养在经活性炭过滤的自来水中, 喂以充足饵料。挑选处于肢芽期后期^[3], 生长状态良好的蝌蚪用于实验。

2. 生活污水诱发青蛙蝌蚪微核实验 在城区生活污水汇合处定时取水样, 其来源主

* 本文系国家“七五”重点攻关课题研究结果之一, 并得到本所所长择优基金的资助。[工作中得到课题组全体同志的帮助和昆明动物所贺维顺先生的热情指导, 特此一并致谢。]

要是居民、机关、学校、商店和医院的生活废水。取 100 只蝌蚪置于含 20L 生活污水的大塘瓷缸中；另取 20 只置于含 4L 过滤水的小塘瓷缸中作为对照。实验蝌蚪喂以适量饵料，处理液隔天更换。实验组在处理的第 2、4、8、12 和 16d 随机取 20 只蝌蚪制备血涂片。对照组于第 16d 制片。

3. 不同浓度混合污水及综合生物塘各级塘出水诱发青蛙蝌蚪微核实验 湖北黄州综合生物塘中试系统包括污水输送设备，沉砂池和并、串联的系列处理塘，日污水处理量约为 150000kg。其工艺流程见图 1。综合生物塘的进水来自黄州城混合(综合)污水，其构成除城区生活污水外，又汇入各种来源的工业废水。

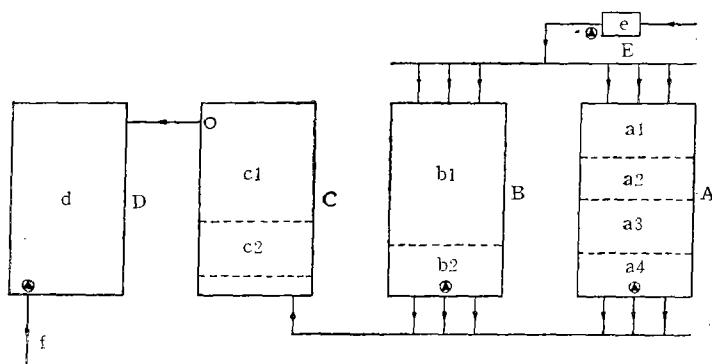


图 1 综合生物塘工艺流程及采样点分布示意图

○·水质分析取样点；◎·微核实验取样点；A. 2号塘；B. 3号塘；C. 4号塘；D. 5号塘；E. 沉砂池；a1、b2. 凤眼莲；a2. 空白；a3. 水花生；a4. 末端；b1. 藻-菌单元；c1. 生态修饰单元；c2. 河蚌；d. 水产养殖单元；e. 进水；f. 出水。

Fig. 1 Diagram of the Synthetic Biological Ponds System, Showing the location of sampling station

○. station for analysis of water quality; ◎. station for micronucleus test; A. pond 2; B. pond 3; C. pond 4; D. pond 5; E. grit chamber; a1,b2. *Eichhornia crassipes* Solms; a2. blank; a3. *Alternanthera philoxeroides* Griseb; a4. end point; b1. algae-bacteria unit; c1. ecological modification unit; c2. freshwater mussel; d. aquaculture unit; e. influent; f. effluent.

20 只蝌蚪一组，一批分别暴露于 4L 100%、25% 和 12.5% 的混合污水（即综合生物塘的进水）中；另一批分别暴露于 4L 2 号塘、3 号塘和 5 号塘出水中；20 只蝌蚪保持于 4L 过滤自来水中为对照。所有实验均在 5L 玻璃水槽 (ϕ , 27cm) 中同时进行。每日两次喂以饵料，每 24h 更换处理液，同时进行水质参数分析。9d 后制备血涂片。

4. 制备血涂片 处理期结束时取蝌蚪心脏血迅速制作涂片，甲醇固定 15min，5% 吉姆萨染液 (pH 6.98) 染色 15min，晾干。每只蝌蚪制备一张血涂片，每一处理组制备 15 张 ($n > 9$)。

5. 结果表达 油镜观察，每张血涂片检查 1000 个形态良好的红细胞，计数微核细胞率。由于微核细胞不遵循正态分布原则，原始数据先经平方根变换 ($x = \sqrt{x}$)，再进行方差分析 (F 检验和 q 检验)。

结 果

1. 生活污水诱发青蛙蝌蚪微核 图 2 是黄州生活污水处理时间与蝌蚪微核细胞率的
时间-效应曲线。

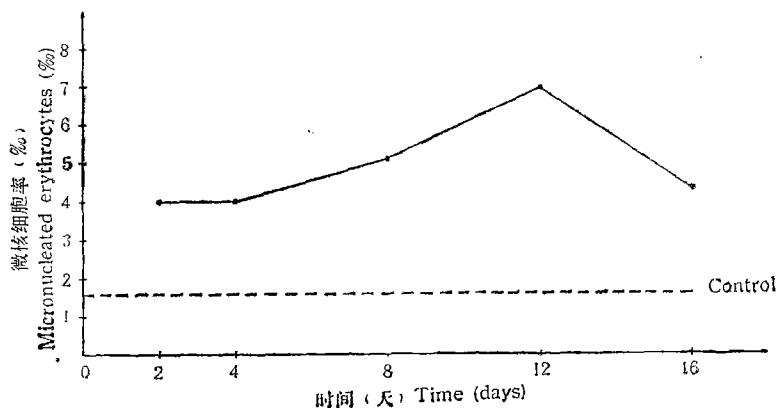


图 2 生活污水诱发青蛙蝌蚪红细胞微核的时间效应关系

Fig. 2 Relationship between proportion of micronucleated erythrocytes in frog tadpoles and duration of exposure to domestic sewage

对照组蝌蚪微核细胞率为 1.6‰。经城区生活污水处理, 蝌蚪红细胞中的微核细胞明显增加, 微核细胞率随污水处理时间的延长而增高, 第 12d 达最高值 (6.93‰)。经方差分析, 与对照相比所有处理组的微核细胞率的增加均属非常显著 ($P < 0.01$) (表 1a 和表 1b)。

2. 不同浓度混合污水诱发青蛙蝌蚪微核 图 3 是不同浓度混合污水对蝌蚪微核细胞率的影响。

表 1a 黄州生活污水诱发青蛙蝌蚪微核的生成

Tab. 1a Induction of micronuclei in frog tadpoles by domestic sewage from Huangzhou city

实验组 Group	暴露时间(天) Exposure time (day)	蝌蚪数(尾) Number of tadpoles	观察红细胞数(个) Number of erythrocytes examined	微核细胞数(个) Number of MEs*	微核细胞率 (%±SD)** Frequency of MEs	F 检验 F test	
						F	P
1	2	15	15000	60	4±1.93		
2	4	15	15000	60	4±2.33		
3	8	15	15000	76	5.07±3.33		
4	12	15	15000	104	6.93±4.53	6.58	<0.01
5	16	15	15000	64	4.27±2.60		
Control	16	15	15000	24	1.6±1.06		

* MEs—micronucleated erythrocytes (具有微核的红细胞), **SD—standard deviation (标准差)

表 1b 各组微核细胞率两两比较(q 检验)

Tab. 1b Multiple comparisons of frequencies of micronucleated erythrocytes (q test)

比较对象 Comparison	3	5	2	1	Control
4	×	×	×	×	**
3		×	×	×	**
5			×	×	**
2				×	**
1					**

× — P>0.05, ** — P<0.01

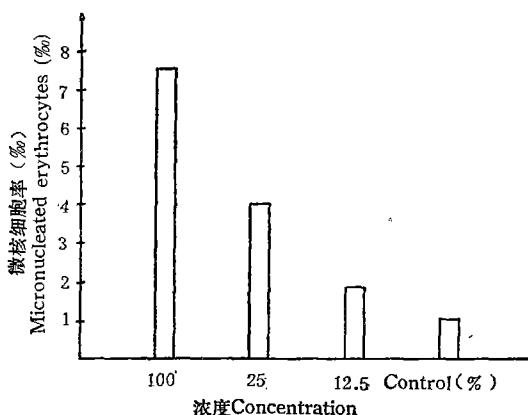


图 3 不同浓度混合污水对青蛙蝌蚪微核细胞率的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of mixed sewage on the level of micronucleated erythrocytes of frog tadpoles

对照组青蛙蝌蚪微核细胞率为 1.07%。与其相比，三组不同浓度的混合污水均引起蝌蚪微核细胞率的统计上显著增加。而且各浓度组之间微核细胞率也都有统计上的显著差异 (q 检验) (表 2a 和表 2b)。

表 2a 不同浓度混合污水诱发青蛙蝌蚪微核的生成

Tab. 2a Induction of micronuclei in frog tadpoles by the concentration of mixed sewage

浓度组 Concen- tra-tion	暴露时间(天) Exposure time (day)	蝌蚪数(尾) Number of tadpoles	观察红细胞数(个) Number of erythrocytes examined	微核细胞数(个) Number of MEs*	微核细胞率 (% ± SD)** Frequency of MEs	F 检验 F test	
						F	P
100%	9	13	13000	98	7.54±3.36		
25%	9	10	10000	40	4±1.33		
12.5%	9	13	13000	25	1.92±1.26	28.59	≤0.01
Control	9	15	15000	16	1.07±0.88		

* MEs—micronucleated erythrocytes (具有微核的红细胞), ** SD—standard deviation (标准差)

表 2b 各组微核细胞率两两比较(q 检验)

Tab. 2b Multiple comparisons of frequencies of micronucleated erythrocytes (q test)

比较对象 Comparison	25%	12.5%	Control
100%	**	**	**
25%		**	**
12.5%			*

* — P < 0.05, ** — P < 0.01

3. 综合生物塘进水和各级塘出水诱发蝌蚪微核的生成 图 4 显示混合污水在综合生物塘处理过程中对蝌蚪微核细胞率的影响。

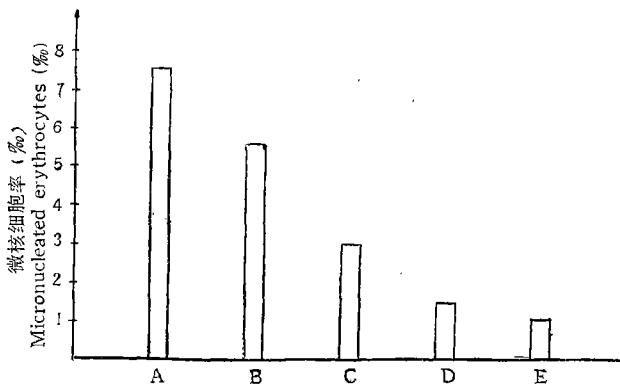


图 4 综合生物塘进、出水对青蛙蝌蚪微核细胞率的影响

A. 进水; B. 2号塘; C. 3号塘; D. 5号塘; E. 对照

Fig. 4 Effect of influent and effluents from various ponds of the Synthetic Biological Ponds System on the level of micronucleated erythrocytes of frog tadpoles

A. influent; B. pond 2; C. pond 3; D. pond 5; E. control

表 3a 综合生物塘各级塘出水诱发青蛙蝌蚪微核的生成

Tab. 3a Induction of micronuclei in frog tadpoles by influent and effluent from each pond of the synthetic Biological Ponds System

实验组 Treatment	暴露时间(天) Exposure time (day)	蝌蚪数(尾) Number of tadpoles	观察红细胞数(个) Number of erythrocytes examined	微核细胞数(个) Number of MEs*	微核细胞率 (% + SD**) Frequency of MEs	F 检验 F test	
						F	P
进水 Influent	9	13	13000	98	7.54 ± 3.36		
2号塘 Pond 2	9	13	13000	73	5.62 ± 3.59		
3号塘 Pond 3	9	15	15000	45	3 ± 1.46	19.37	< 0.01
5号塘 Pond 5	9	15	15000	23	1.53 ± 1.25		
对照 Control	9	15	15000	16	1.07 ± 0.88		

* MEs——micronucleated erythrocytes (具有微核的红细胞), ** SD——standard deviation (标准差)

表 3b 各组核细胞率两两比较(q 检验)

Tab. 3b Multiple comparisons of frequencies of micronucleated erythrocytes (q test)

比较对象 Comparison	2号塘 Pond 2	3号塘 Pond 3	5号塘 Pond 5	对照 Control
进水 Influent	×	**	**	**
2号塘 Pond 2		*	**	**
3号塘 Pond 3			*	**
5号塘 Pond 5				*

× - P > 0.05, * - P < 0.05, ** - P < 0.01

综合生物塘进水和各级塘出水诱发的蝌蚪微核细胞率各不相同，由高到低依次是进水>2号塘出水>3号塘出水>5号塘出水。根据方差分析的多重比较(q检验)，微核细胞率在综合生物塘中的变化可分成三个等级。第一级是进水组和2号塘出水组，第二级是3号塘出水组，第三级是5号塘出水组和对照组。级与级之间微核细胞率均有统计上的显著差异，同一级内的差异没有统计学意义(表3a和表3b)。实验期间综合生物塘水质理化参数的分析结果列于表4。

表 4 实验期间综合生物塘系统中水质理化参数

Tab. 4 Physico-chemical parameters of water quality in the synthetic Biological Ponds System during the experiment

综合生物塘净化系统 BPS	平均值 Average value							
	ASAS* (mg/l) (去除率) (percent removal)	CODcr (mg/l) (去除率) (percent removal)	BOD ₅ (mg/l) (去除率) (percent removal)	总磷 (mg/l) (去除率) (percent removal)	总氮 (mg/l) (去除率) (percent removal)	溶解氧 (mg/l) Dissolved oxygen	[μs/cm (25°C)] conductivity	pH
进水 Influent	0.2096	62.93	21.28	1.55	28.09	2.93	581.6	8.30
2号塘 Pond 2	0.1406 (32.92)	36.24 (42.41)	7.63 (64.14)	0.52 (66.45)	21.24 (24.39)	0.83	535.4	7.27
3号塘 Pond 3	0.0332 (84.16)	30.12 (52.14)	7.54 (64.57)	0.33 (78.71)	13.94 (50.37)	2.43	510.6	7.61
4号塘 Pond 4	0.0280	30.54	10.37	0.22	9.80	4.65	488.6	7.77
5号塘 Pond 5	0.0290 (86.16)	22.27 (64.61)	9.50	0.15 (90.32)	6.70 (76.15)	3.88	474.4	7.75

* ASAS—ionic surface active substance (阴离子表面活性物质)

讨 论

1. 城镇污水诱发青蛙蝌蚪微核

和鱼类细胞相比，青蛙蝌蚪的红细胞很大，胞质中形成的微核很容易辨认(图版I, 1、2、3、4)。微核主要是由于染色体断裂产生的无着丝粒片断或分裂后期没有迁移到纺锤体

极位去的整条染色体滞留在胞质中形成的^[4]。断裂剂和纺锤体毒性物质都能诱发微核的产生。在阅片过程中,作者注意到随着污水处理时间加长,具有两个或多个微核的红细胞增多(图版 I,3),这反映出遗传物质损伤加重。此外,其它类型的核异常现象也经常出现,如核凸、不规则核和无丝分裂等(图版 I, 4、5、6)。但这些核异常类型均未统计到实验结果中去,以减少判断上的主观因素和制片中的干扰。

青蛙蝌蚪是一种十分灵敏的实验材料,在城镇污水作用下,微核细胞率的变化具有独特的时间效应和明显的剂量效应关系。在 16d 生活污水处理实验中,青蛙蝌蚪红细胞对污水遗传毒性的应答速度很快,处理 2d 后微核细胞率就有统计上的显著增加 ($P < 0.01$),并随处理时间加长而增高。图 2 所得的时间效应关系表明,适当持续处理的时间对实验结果,尤其是阴性结果的判定是必要的。在污水处理试验中,蝌蚪处理 8 至 12d 似乎比较合理。蝌蚪微核细胞率在不同浓度混合污水处理实验中呈现出明显的剂量依赖性增加,以及各浓度组之间统计上的显著差异说明该方法能够准确、灵敏地反映出污水诱变活性的改变。另一方面,这两个实验结果也有力地证明城镇生活和混合污水都具有较强的诱变活性。这与其它学者的结论是一致的^[1,2]。现代家庭大量使用化学品,工厂排出各种有毒废水,以及农药的大量施用是导致城镇污水诱变效应增强的主要原因。污水诱变活性增强反映出我国城镇污水水质的一种变化趋势。由于这种变化往往并不表现为急性中毒事件,不易察觉而受忽视。但实际上,它对水环境和人类健康构成愈来愈大的危害,应当引起人们的高度重视。

2. 综合生物塘污水处理系统功能评价

综合生物塘是在氧化塘基础上发展起来的一种合理利用水生态系统结构与功能,对城镇污水进行资源化处理的生物学方法。水质理化参数(如 COD、BOD 等)是用来评价其净化功能的主要指标。作者尝试应用青蛙蝌蚪微核细胞率的变化,从遗传毒理学的角度对综合生物塘进行功能评价。实验结果表明,黄州综合生物塘处理系统是净化污水诱变活性的一种有效方法。城镇混合污水经综合生物塘各级塘处理,蝌蚪微核细胞率逐级下降,由进水的 7.54‰ 下降到最后出水的 1.52‰,接近对照水平。微核细胞率净去除率达 92.9%。即通过综合生物塘处理,城镇污水诱变活性基本上被完全去除。综合生物塘对污水诱变活性的这种高效净化效果与其独特的生物学结构和功能密切相关。它是借助于藻菌共生系统、水生植物和根系微生物系统、浮游动物、软体动物和鱼等多层次水生生物的协同作用,分解、转化有机污染物和各种遗传毒性物质,达到净化污水,去除污水诱变活性的目的。

另一方面,蝌蚪微核细胞率统计上的逐级下降反映出综合生物塘各生态净化单元对污水诱变活性也具有明显的净化能力。这里主要讨论一下 2 号塘和 3 号塘两个净化单元的净化特点。在作者进行微核实验期间,2 和 3 号塘是综合生物塘的核心部分,它们是并联的关系。污水同时等量进入两塘,但它们的出水诱发的微核细胞率却具有统计上的显著差异。表明 3 号塘的藻菌单元相对于 2 号塘的水生植物单元对污水诱变活性具有更强的净化能力。这两个单元净化能力的差异也明显地反映在对阴离子表面活性物质和总氮的去除上(表 4)。有人证明构成阴离子表面活性物的主要成份十二烷基苯磺酸钠(LAS)

在 0.14 ppm 时, 就能诱发梨形四膜虫 (*Tetrahymena pyriformis* Ehrenbeng) 微核的显著增加¹⁾。它可能与污水诱变活性有关。不过, 2、3 号塘对几个重要的水质化学指标 COD、BOD 和总磷的去除率都比较高, 差别不明显。可见这两个塘具有不同的净化特点。总之, 通过青蛙蝌蚪微核试验揭示出综合生物塘的一项新的重要功能。红细胞微核细胞率的变化不仅能够有效评价综合生物塘对污水诱变活性总的净化效能, 而且可以很好地反映出污水诱变活性在该处理系统的动态变化过程, 为综合生物塘各生态净化单元的结构、组合和净化机理的研究提供新的信息。

表 5 综合生物塘系统中污水变指数

Tab. 5 Mutation indices of sewage in the Syntheic Biological Ponds System

综合生物塘系统 SBPS	污水诱变指数 Mutation index
进 水 Influent	7.07
2 号塘 Pond 2	5.26
3 号塘 Pond 3	2.81
5 号塘 Pond 5	1.44

为了定量描述综合生物塘净化污水诱变活性的能力和效率, 作者提出应用污水诱变指数 (Mutation index, MI) 作为一项新的功能评价指标。

$$MI = \text{样品微核细胞率平均值}(\%) / \text{对照微核细胞率平均值}(\%)$$

综合生物塘各污水诱变指数见表 5。与水质化学和物理学指标不同, MI 是一项遗传毒理学指标, 反映的是污水中各种遗传毒性因子对生物的综合诱变效应。只有将该指标与其它生物学和理化指标相结合, 才能比较全面、客观地评价污水水质状况和综合生物塘的“综合”净化效能。

参 考 文 献

- [1] 陈光荣、李明、金波等, 1985。利用蚕豆 (*Vicia faba*) 根尖的微核技术监测青山湖污染的研究。中国环境科学, 5(4): 2—7。
- [2] 贺维顺、王蕊芳, 1990。蝌蚪 (*Bufo bufo andrewsi*) 血红细胞微核和核异常监测水质污染的研究。动物学研究, 11(1): 1—5。
- [3] Rugh, R., 1962. *Experimental embryology, techniques and procedures*, 3nd ed., pp. 70—74. Burgess Publishing Company.
- [4] Schmid, W., 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender, A. (ed.), *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, Vol. 4, pp. 31—53. Plenum, New York.

1) 吴玉萍, 1989。LAS、PCP-Na 和 K₂Cr₂O₇ 对梨形四膜虫 *Tetrahymena pyriformis* 毒性效应的研究。中国科学院水生生物研究所硕士研究生毕业论文。

INDUCTION OF MICRONUCLEI IN ERYTHROCYTES OF FROG TADPOLES BY CITY SEWAGE, WITH REFERENCE TO ENVIRONMENTAL MONITORING

Chen Junjian and Xia Yicheng

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan, 430072)

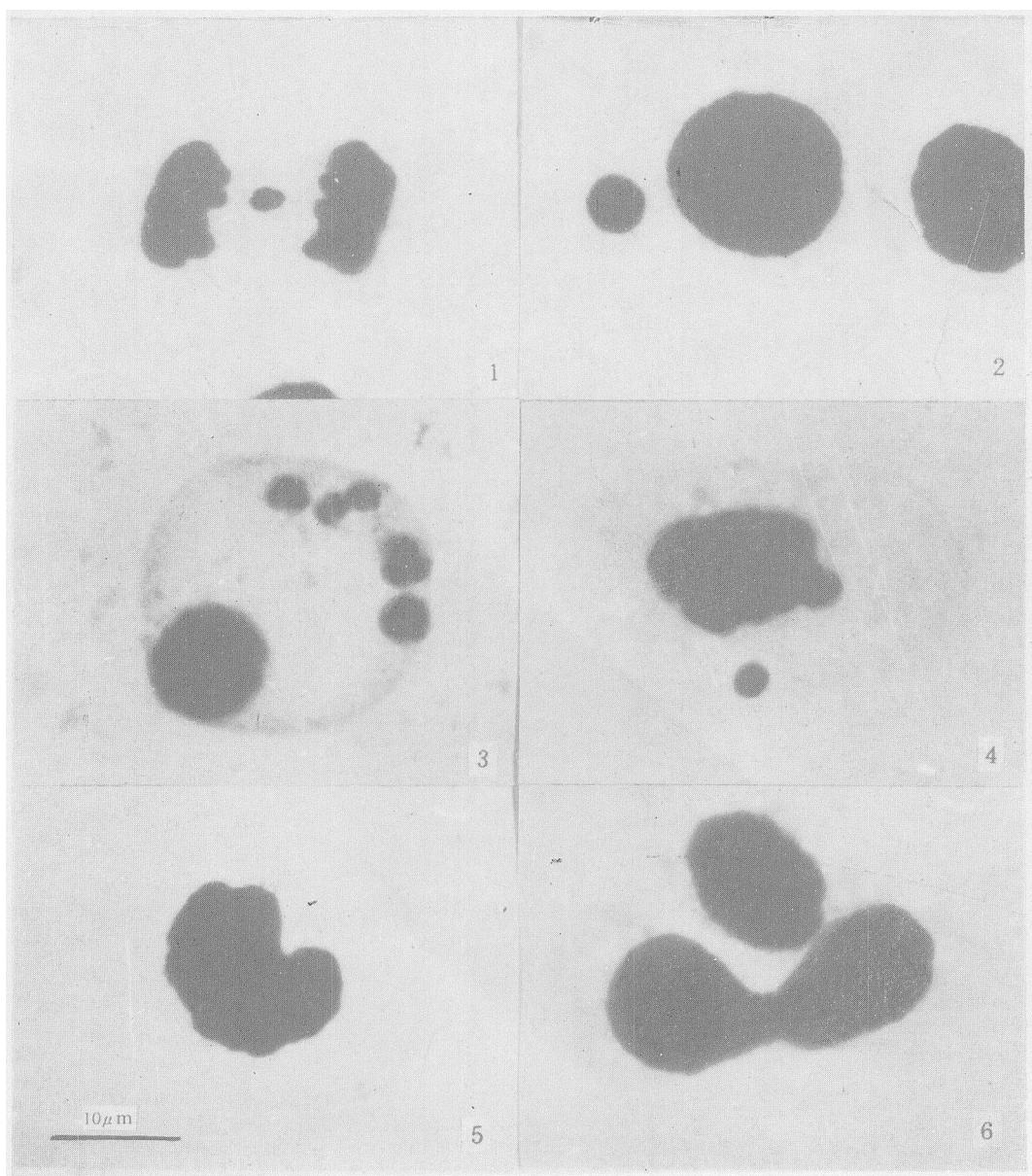
Abstract

In this study, a micronucleus test using the erythrocytes of the tadpoles of the frog (*Rana nigromaculata* Hallowell) was developed as a new monitoring system for the mutagenic activity of the city sewage. In an experiment in which the tadpoles were exposed to domestic sewage for 16 days, the frequency of micronucleated erythrocytes showed a significant elevation after 2 days of exposure, and then increased over time to a maximum after 12 days. In another experiment in which the tadpoles were exposed to mixed sewage of different concentrations, the frequency of micronucleated erythrocytes showed significant dose-dependent increases.

The micronucleus test was used to evaluate the efficiency of the Synthetic Biological Ponds System in Huangzhou city for reducing the mutagenic activity of city sewage. As the mixed city sewage flew through the biological ponds, the frequency of micronucleated erythrocytes induced by the sewage decreased gradually from 7.54‰ in the influent to 1.52‰ in the final effluent, approaching the level in the control (1.07‰).

The results indicated that both domestic and mixed sewage have strong mutagenic activity. The Synthetic Biological Ponds System is an efficient method to reduce the mutagenic activity of city sewage. The micronucleus test using erythrocytes of frog tadpoles is a sensitive, practical and easy-to-apply monitoring method.

Key words Frog tadpoles, Micronucleus, Sewage, Synthetic Biological Ponds System, Mutation index



1. 滞留在后期的无着丝粒片断；2.微核；3.核裂解；4.微核与核凸；5.不规则核；6.无丝分裂。

1. acentric chromosomal fragment lagging at anaphase; 2. micronucleus; 3. karyorrhexis; 4. micronucleus and nuclear protrusion; 5. irregular nucleus; 6. amitosis