

一种检测污染水体致突变性的快速简便方法

胡明阳¹ 季秀玲¹ 倪红梅² 米其利² 天建华^{2*}

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650093; 2. 云南烟草科学研究院, 云南 昆明 650106)

摘要: 采用鼠伤寒沙门氏菌 TA98 菌株为测试菌株, 二氨基芴为阳性物, 通过分析菌液体积分数、S9 体积分数、阳性物质质量浓度的配比关系, 确定了用于污染水体致突变性检测的微量波动法的最佳反应条件。在最佳反应条件下测试 TA97、TA100、TA102 菌株在河流水样检测中的反应情况, 确定了适用于鼠伤寒沙门氏菌系列菌株在污水检测中的反应条件。

关键词: 微量波动法; 污染物致突变性检测试验; 污水; 鼠伤寒沙门氏菌

中图分类号: X835 文献标识码: B 文章编号: 1006-2009(2011)05-0055-03

A Fast and Simple Method for Detecting Mutagenicity Determination in Polluted Water

HU Ming-yang¹, JI Xiu-ling¹, NI Hong-mei², MI Qi-li², YAO Jian-hua^{2*}

(1. Life Science and Technology College, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650093, China; 2. Yunnan Tobacco Science Research Institute, Kunming, Yunnan 650106, China)

Abstract: The best reaction condition of microtitre fluctuation test was obtained in polluted water to detect mutagenicity by analyzing bacteria liquid and S9 volume fraction using *Salmonella typhimurium* TA98 as test strain, and diaminofluorene as positive reactor. By using the best reaction condition, response of strain TA97, TA100, TA102 in polluted water had been analyzed to establish suitable reaction conditions for *Salmonella typhimurium* in detecting the mutagenicity.

Key words: Microtitre fluctuation test; Ames test; Sewage; *Salmonella typhimurium*

鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶回复突变试验(简称 Ames 试验)是全世界广泛采用的一种经典的致突变性检测方法,该方法计数固体平板上的回复菌落,结果可靠,但步骤繁琐。1976 年 Green 发明的波动试验能在更低的浓度下获得阳性反应结果^[1], Gatehouse 又将波动试验改良为微量法,不仅减轻了工作量,而且提高了方法灵敏性。微量波动法用液体培养基代替固体培养基,以观察培养液浊度或 pH 指示剂颜色变化代替菌落计数,近年来在饮用水的致突变研究中已得到应用^[2]。国内外研究主要集中在反应体系中组氨酸、细菌、S9、生物素浓度等方面,且主要研究 TA98 菌株的测试体系^[3]。为探讨微量波动法在 TA97、TA98、TA100、TA102 系列菌株的最佳反应条件,今采用鼠伤寒沙门氏菌 TA98 菌株为测试菌株,二氨基芴为阳性物,分析了对反应体系影响较大的菌液、

S9、阳性物浓度的试验结果,确定了该方法适用于 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株的最佳反应体系,并用昆明市河流水样作验证,探讨了微量波动法反应时间对测试结果的影响。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

Nikon X90 型显微镜。

菌株: 鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、

收稿日期: 2010-12-31; 修订日期: 2011-05-20

基金项目: 云南省应用基础研究基金资助项目(2009ZC190M); 云南省烟草化学创新团队建设基金资助项目(2009CZ014); 云南省中烟工业公司基金资助项目(2009JC01); 中国烟草总公司基金资助项目(110200902060)

作者简介: 胡明阳(1982—),男,河北沧州人,硕士,研究方向为食品及添加剂安全性生物毒理学评价。

* 通讯作者: 天建华 E-mail: jhyao_2007@126.com

TA102 菌株, MOLTOX AMES ASSAR STDisc, 购自 MOLECULAR TOXICOLOGY, INC; 10% S9 混合液: 按照《鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验》(GB 15193.4-2003) 制备; Vogel-Bonner 缓冲液贮备液(50倍): 称取 16.5 g 磷酸氢钠、10.0 g 柠檬酸、50.0 g 磷酸氢二钾、1.0 g 硫酸镁, 加蒸馏水至 100 mL, 溶解后灭菌; 生长培养液: 取 0.8 mg/L 生物素溶液、0.2 mg/L 组氨酸溶液、16 g/L 葡萄糖溶液, 溶于 Vogel-Bonner 缓冲液; 溴甲酚紫(BCP): 称取 0.15 g 溴甲酚紫, 溶于 30 mL Vogel-Bonner 缓冲液, 制得 5 mg/L 溴甲酚紫指示剂, 微孔滤膜过滤除菌备用; 阳性物: 10 g/L 二氨基苄溶液。

1.2 试验方法

1.2.1 反应体系设计

菌液取 0.2% (A)、1% (B)、5% (C) 3 个体积分数, S9 取 2% (D)、4% (E)、8% (F) 3 个体积分数, 阳性物取 3 mg/L (H)、6 mg/L (I)、9 mg/L (K) 3 个质量浓度。将上述 3 个因子采取组合方式分别反应, 反应体系组合分别为: ADH、BDH、CDK、ADI、BDI、CEH、ADK、BDK、CEI、AEH、BEH、CEK、AEI、BEI、CFH、AEK、BEK、CFI、AFH、BFH、CFK、AFI、BFI、CDH、AFK、BFK、CDI。

1.2.2 污染水体检测

采集昆明市内 4 条污染程度不同的河流水样, 分别记为 a、b、c、d, 每个水样分别选取 4 个体积分数进行菌株试验。

将上述反应体系分别配制生长培养液 12 mL, 加入 96 孔板中, 每个样品每个体积分数为 48 孔。于 37 °C 培养 24 h, 然后每孔加入溴甲酚紫 20 μ L, 继续培养 72 h, 观察反应孔数。孔内培养物由紫色变为黄色为阳性, 判为阳性反应。计算每个菌种每个体积分数的阳性孔数, 以体积分数为横坐标、阳性孔数的对数为纵坐标作图, 采用线性回归拟合直线, 计算线性方程, 以斜率为依据判定待测物致畸变强度, 斜率越大, 即相对致突变能力越强。

2 结果与讨论

2.1 反应体系的确定

反应体系中不同体积分数菌液的影响见图 1。当菌液体积分数分别为 0.2% 和 5% 时, 阳性结果呈密集分布, 不利于评估待测物致突变性的强弱; 当菌液体积分数为 1% 时, 阳性结果呈较好的分散性, 利于比较不同待测物的致突变性强弱。因此,

该试验确定反应体系中菌液体积分数为 1%。

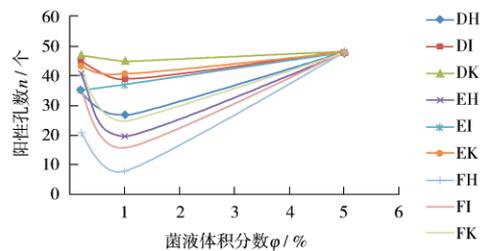


图 1 不同体积分数菌液的影响

Fig. 1 Influence of different volume fraction on bacterium fluid

确定菌液体积分数为 1%, 考察不同体积分数 S9 和不同质量浓度阳性物对反应体系的影响, 结果见图 2 和图 3。

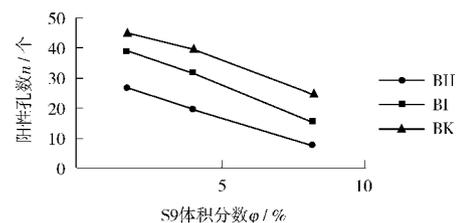


图 2 不同体积分数 S9 的影响

Fig. 2 Influence of different volume fraction on S9

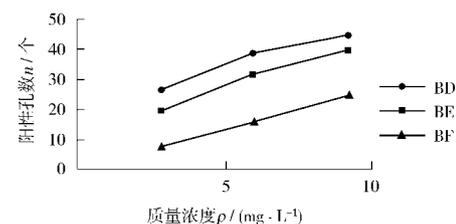


图 3 不同质量浓度阳性物的影响

Fig. 3 Influence of different concentration on positive material

由图 2 可见, 3 条曲线趋势一致, 当菌液体积分数为 1%, 阳性物质质量浓度分别为 3 mg/L、6 mg/L、9 mg/L 时, 随着 S9 体积分数增加, 所呈现的阳性孔数呈递减趋势。由图 3 可见, 3 条曲线走势一致, 当菌液体积分数为 1%, S9 体积分数分别为 2%、4%、8% 时, 随着阳性物质质量浓度增加, 所呈现的阳性孔数呈递增趋势。

试验还表明, 当 S9 体积分数为 2% 时, 曲线呈较好分布, 利于评估不同待测物的致突变性强弱。

因此,该试验确定反应体系中 S9 体积分数为 2%。

2.2 污染水体检测结果

选取菌液体积分数为 1%, S9 体积分数为 4% 进行 TA97、TA100、TA102 菌株试验,反应结果见图 4(a)(b)(c)。

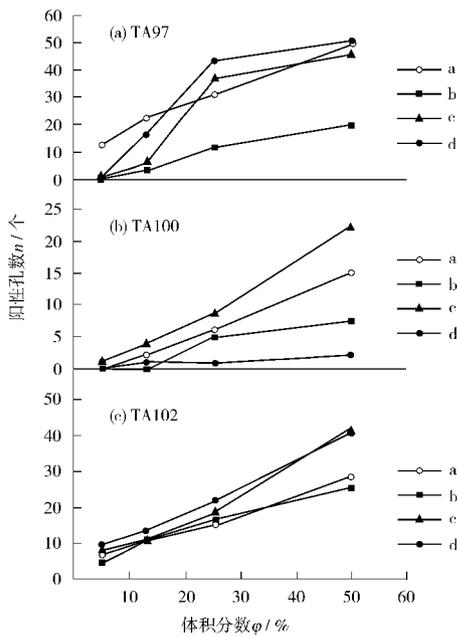


图 4 菌株反应结果

Fig. 4 Reaction result of strain

由图 4 可见,该试验体系在多数反应中呈较好的剂量-反应关系,说明用于污染水体致突变性检测可行。试验还发现,反应时间对反应结果存在影响,以 TA97 菌株为例,结果见图 5。

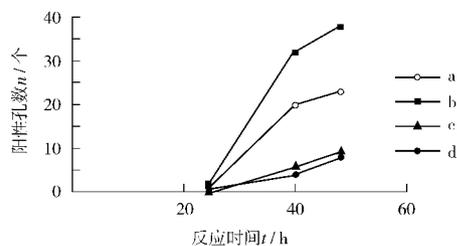


图 5 反应时间对 TA97 菌株阳性结果的影响

Fig. 5 Influence of reaction time on positive result of TA97 strain

由图 5 可见,在培养条件固定的情况下,随着反应时间增加,阳性结果呈线性增加。这说明在微量波动试验中培养时间是一个重要因素,必须合理控制培养时间,才能获得满意的试验结果。研究还

表明,当培养时间为 48 h 时,反应接近平稳,因而该试验确定培养时间通常为 48 h。

2.3 讨论

近年来,随着环境污染加重,致突变性检测已成为常规环境监测项目^[4-5]。如刘克明等^[6]采用 TA98、TA100 菌株,应用 Ames 方法分析了城市回用水的致突变性;方东等^[7]采用 Ames 方法研究了不同季节水源水及管网自来水中的遗传毒性。传统的 Ames 试验操作步骤繁琐,准备工作较多,给日常检测带来很多不便。随着改良的微量波动法的使用,致突变性检测变得更为快速和简便,目前国内已有 TA98 菌株的相关研究报道^[2]。

探讨了菌液体积分数、S9 体积分数、阳性物质浓度和反应时间对微量波动试验的影响,结果表明该试验体系要求比较严格,需要关注相关因子浓度组分的配比。对于培养时间,不同阳性物所需的培养时间不同,如采用 TA98 菌株检测阳性物二氨基芴时,在 48 h 时已反应完全,而当采用 TA97 菌株检测时,培养 48 h,反应仅进行到 2/3 的程度。

3 结语

探讨了 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株的反应条件,4 种菌株在相当的阳性物浓度下均呈现阳性反应,其中 TA97、TA98、TA102 菌株有良好的剂量-反应关系,TA100 菌株反应比较强烈,未能得到剂量-反应关系方程。研究表明,微量波动法操作简便,经济实用,试验结果的判定直观、明确,利用该方法可快捷、高通量地对污染水体作致突变性初筛,为后续治理与监测评价提供参考。

[参考文献]

- [1] GREEN M H L, WJ M. Mutagen testing using *trp*⁺ reversion in *Escherichia coli* [J]. *Mutat Res*, 1976, 38(3): 32-33.
- [2] 衡正昌, 杨在昌. 微量波动试验在水样检测中的应用 [J]. *环境与健康杂志*, 1990, 7(1): 22-25.
- [3] 胡长灯, 詹卓玲. 微量波动试验的影响因素及灵敏度研究 [J]. *卫生毒理学*, 1990, 4(2): 115-116.
- [4] 杨逢乐, 金竹静. 滇池北岸河流水环境污染现状及防治对策研究 [J]. *环境科学导刊*, 2008, 27(6): 43-46.
- [5] 宋芬, 李彤. 微量波动试验方法的研究 [J]. *中国公共卫生学报*, 1990, 9(1): 39-40.
- [6] 刘克明, 姜淑青. 城市回用水致突变性研究 [J]. *环境监测管理*, 2006, 18(6): 509-511.
- [7] 方东, 梅卓华. 用 Ames 试验检测水源水和自来水中的遗传毒性 [J]. *环境监测管理*, 2000, 12(1): 20-22.