

# 利用离体 *umu*/SOS 测试与活体蚯蚓彗星试验 评价再生水灌溉土壤的遗传毒性\*

禹果<sup>1</sup> 肖睿洋<sup>1</sup> 王春霞<sup>1†</sup> 吴文勇<sup>2</sup> 刘洪禄<sup>2</sup> 王子健<sup>1</sup>

(1 中国科学院生态环境研究中心, 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

(2 北京市水利科学研究所, 北京 100044)

**摘要** 污水和再生水灌溉在我国北方地区十分普遍, 由于长期灌溉导致土壤中遗传毒性物质累积并因此而引发的生态安全问题值得研究。本研究利用离体 *umu*/SOS 测试与活体蚯蚓彗星试验评价北京市郊区再生水灌溉土壤中遗传毒性物质的积累。*umu*/SOS 测试得到表征样品遗传毒性大小的  $\beta$ -半乳糖苷酶诱导活性(IU 值), 以达到阳性时(诱导比率  $R=2$ )需要的土壤重量( $G$ )来反映土壤样品的相对遗传毒性。活体蚯蚓彗星试验中, 以尾矩(TM)表征土壤遗传毒性的大小。研究表明, 再生水灌溉使得土壤的遗传毒性增大, 随着再生水灌溉量的增加, 土壤的  $G$  值减小, TM 值增大,  $G$  值与 TM 值之间呈现明显相关关系, 说明主要遗传毒性物质是有机污染物。离体 *umu*/SOS 测试和活体蚯蚓彗星试验的联合应用, 可以快速有效地筛选出遗传毒性高风险土壤样品。

**关键词** 污染土壤; *umu*/SOS 测试; 彗星试验; 遗传毒性

**中图分类号** X171.5; X131.3

**文献标识码** A

我国以灌溉为主的农业用水量占全国总用水量的70%以上, 然而由于总体水资源不足, 灌溉用水不断被工业和城市生活用水所挤占, 农业生产用水日趋严重<sup>[1]</sup>。因此, 合理引用再生水作为农业灌溉水源具有重要意义。目前再生水灌溉作为我国缺水地区废水资源化利用的重要手段已经在我国北方地区大规模应用。

然而污水中含有的有毒物质在长期灌溉后会在土壤中积累, 并可能通过食物链污染粮食和蔬菜, 或对土壤生态系统产生潜在影响。尽管已经有相当多的工作研究了土壤重金属的积累<sup>[2,3]</sup>, 但是针对土壤中持久性有机污染物积累, 尤其是遗传毒性物质的积累, 及其产生的生态健康风险研究则十分少见。快速筛选遗传毒性物质的方法包括 Ames 试验和微核试验, 例如可以用 Ames 实验和 SOS 显色实验发现工业废水<sup>[4,5]</sup>和地表水<sup>[2]</sup>存在遗传毒性, 而近年来发展的 *umu*/SOS 显色实验方法则更为简单快速, 测试结果更为直观<sup>[6]</sup>。已有研究表明, 离体 *umu*/SOS 测试用于初步筛选土壤高生态风险区后, 再确定主要污染物的研究方法是可行的<sup>[7]</sup>。

*umu*/SOS 实验的原理是 DNA 损伤物能够诱导 SOS 反应并表达 *umuC* 基因, *umu* 基因正常情况下被阻遏蛋白所封闭, 一旦菌体 DNA 受损, 细胞即产生 SOS 反应, 此时组成该反应系统的 *Rec A* 基因产物即转化为具有活性的蛋白水解酶。该酶可切除阻遏蛋白, 使受封闭的 *umu* 操纵子启动, 并带动 *Lac Z* 基因转录、转译, 其转译产物即为  $\beta$ -半乳糖苷酶。根据  $\beta$ -半乳糖苷酶的被诱导生成量, 判断 DNA 受损伤的程度。

彗星试验, 又称单细胞凝胶电泳, 因其能够在单细胞水平上灵敏地检验 DNA 损伤, 成为研究遗传毒性效应的新技术, 近年来得到重要应用。其实验原理可简单描述为: 在强碱溶液的作用下, 包埋于琼脂糖中的细胞膜、核膜及其他膜结构受到破坏, 膜内的蛋白质、RNA 及其他成分进入凝胶而扩散至电解液中, 而核 DNA 分子量很高, 不能进入凝胶, 只能留于原位。高 pH 值促使 DNA 变性和解螺旋。受损 DNA 片段的缺口暴露了阴电荷, 在电场力的作用下, 离开 DNA 核, 在凝胶分子筛中向阳极移动, 形成彗星状图像, 而未损伤细胞中 DNA 仍停留于核中形成圆形

\* 国家自然科学基金项目(40471129)和国家重点基础研究发展规划项目(2003CB415005)资助

† 通讯作者, E-mail: cxwang@mail.nsf.gov.cn

作者简介: 禹果(1980~), 男, 硕士研究生, 主要从事污水及再生水灌溉土壤生态毒理学研究

收稿日期: 2006-02-17; 收到修改稿日期: 2006-05-09

荧光团。因此,含 DNA 链缺口越多,则进入尾部的 DNA 越多,表现为尾长和尾部荧光强度增加<sup>[8]</sup>。

本研究利用离体 *umu*/SOS 测试与活体蚯蚓彗星试验考察再生水灌溉土壤的遗传毒性,用 *umu*/SOS 测试中实验结果为阳性时所需要的土壤量(*G*)与彗星试验中尾矩(TM),作为评判土壤遗传毒性大小的指标。建立了快速、有效的土壤遗传毒性筛选方法和用蚯蚓活体基因损伤进一步验证污染土壤遗传毒性效应的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与前处理

土壤样品于 2005 年 1 月采自北京郊区某温室实验地。温室实验设计如下:温室长 56 m,宽 5.5 m,将温室沿长度方向隔成 9 段,扣除进口保护区 2 m 外,每段长度为 6 m,共设计 9 个试验小区,试验小区分季节种植不同农作物,采样时种植作物为樱桃萝卜。每个小区净面积为 (6.0 × 5.0) m<sup>2</sup>。耕层土壤质地为当地农用地轻壤土,为棕褐土。试验共设计了 3 种灌溉处理方式:(1)再生水灌溉;(2)地下水、再生水(1:1)混合灌溉;(3)地下水灌溉,每种灌溉方式 3 次重复。灌溉时间 2 a,每年灌溉量约为 120 m<sup>3</sup>。用 S 形采样法采集 3 个不同灌溉方式和不同小区的 3 个平行样品,共计 9 个土壤样品,保存于不锈钢制饭盒内,立即送回实验室于 -20℃ 保存。

将土壤样品冷冻干燥(FD-1 冷冻干燥机,北京博医康技术公司),研磨后过 2 mm 筛。取 20 g 土样用二氯甲烷-丙酮(体积比为 1:1)的混合液 200 ml,在索氏提取器中先浸泡 24 h 后抽提 48 h,并用活化铜片脱硫。提取液在旋转蒸发仪(瑞士 Buchi)上浓缩至约 1 ml,加入 10 ml 二氯甲烷,再次浓缩至 1 ml,用高纯氮气将提取液吹至 10 μl 后,加入 200 μl DMSO(二甲基亚砜)溶剂置换后作为样品储备液。用 DMSO 将储备液按梯度稀释成原浓度的 1/4~1/32 作为待测样品,以备 *umu*/SOS 测试。另取 100 g 已干燥过筛后的土样以备 Comet 试验。

再生水、地下水常规水质与土壤理化性质按常规方法测定;土壤中 16 种多环芳烃定量分析在 GC 6890/MS 5973(美国 Agilent)上进行,采用 SIM 模式(selected ion monitoring mode),色谱柱为 HP-5 石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm,美国 Agilent),载气为高纯氮气。炉温从 80℃ 升至 200℃,升温速率为 10℃ min<sup>-1</sup>,保持 5 min 然后按 3℃ min<sup>-1</sup>的速率

从 200℃ 升温至 300℃,无分流进样 1 μl。采用 16 种 PAH 标准物质(Cat. No. 48905-U, Supelco Co.),并按 Method 8310 (U. S. Environmental Protection Agency)方法定量。将 D10-菲作为多环芳烃回收率指示物,在干净土壤样品中加入 D10-菲,掺混浓度与实际样品中 PAHs 浓度预估接近,按照上述操作方法前处理与分析,平行 3 次,所有数据均用回归率校正,样品多环芳烃的回收率均大于 80%。有机氯农药的测定方法参照中国科学院生态环境研究中心环境水质国家重点实验室水生生态毒理组以前的工作<sup>[9]</sup>。

### 1.2 *umu*/SOS 测试方法

菌种:*umu*/SOS 测试中使用的鼠伤寒沙门氏菌 TA1535/PSK1002 由日本国大阪府立公共卫生研究所惠赠,菌株是用质粒 PSK1002 转化得到,PSK1002 质粒是携带 *umu* 操纵子,*umuD* 以及 *umuC-LacZ* 融合基因的启动基因 PMC1403 质粒衍生物。

*umu*/SOS 测试按文献所提供的方法<sup>[6]</sup>,经中国科学院生态环境研究中心环境水质国家重点实验室水生生态毒理组改进进行。具体操作如下:取 40 μl 冷冻 *Salmonella typhimurium* TA 1535/PSK 1002 菌液(大肠杆菌)于 10 ml 的 LB 培养基(称取 10 g 胰蛋白胨、5 g 氯化钠、5 g 酵母膏溶解于 1 000 ml 超纯水中,高压灭菌后于 2~5℃ 冰箱保存备用)中,37℃ 振荡隔夜培养 12 h。次日将培养菌液用 TGA 培养液(称取 10 g 胰蛋白胨、5 g 氯化钠溶解于 980 ml 超纯水中,高压灭菌后加入 20 ml 10%葡萄糖溶液于 2~5℃ 冰箱保存备用)稀释 10~50 倍 37℃ 条件下振荡(175 min<sup>-1</sup>)培养 1.5~2 h 后,再用 LB 培养基将培养液吸光值(600 nm)调至 0.3 左右。取培养菌液 990 μl 加入 1.5 mL Eppendorf 管中,再添加经过梯度稀释的 10 μl 待测样品后振荡摇匀,以 DMSO 为溶剂对照,37℃ 振荡培养 2 h。将培养板于 595 nm 波长下测定菌液的吸光度值。另取 100 μl 反应菌液加入 100 μl 缓冲液(Z-Buffer 溶液,称取 21.48 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、6.24 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O、0.745 g KCl、0.12 g MgSO<sub>4</sub> · 3.9 g β-巯基乙醇溶解于 1 000 ml 超纯水中,高压灭菌后于 2~5℃ 冰箱保存备用),5 μl 十二烷基磺酸钠溶液(SDS),混合 5 min 后再加入 5 μl 三氯甲烷,振荡摇匀 10 min,加入含 ONPG(2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside)的磷酸缓冲溶液 30 μl 于上述溶液中,于 37℃ 下反应 20 min,加入 50 μl 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液终止反应,吸取上清液 200 μl 于 96 孔酶标板中,分别于 420 nm 和 550 nm 波长下测定吸光度值。

按照下式计算  $\beta$ -半乳糖苷酶诱导活性:

$$-\text{Galactosidase Activity (IU)} = 1\,000 \times (A_{420} - 1.75 \times A_{550}) / (t \times v \times A_{595}) \quad (1)$$

其中,  $t$  为加入 ONPG 后的反应时间,  $v$  为反应菌液的稀释倍率, 本研究中为 0.069,  $A_{595}$  为最终培养液细菌含量;  $A_{420}$  为酶与底物反应后生成物的含量;  $A_{550}$  代表反应系统中有无颗粒性干扰物, 通常接近 0。根据 IU 值计算得到经过稀释后样品的诱导比率 ( $R$ ) 值:

$$\text{诱导比率}(R) = \text{试验管 IU 值} / \text{对照管 IU 值} \quad (2)$$

96 孔板每孔对应的实际土壤重量 ( $SW$ ) 可以通过下式计算:

$$SW = \frac{W}{5V_i} \times \frac{1}{n} \times V_1 \quad (3)$$

式中,  $SW$  用  $\text{mg 孔}^{-1}$  表示;  $W$  为用于索提的土壤重量 (20 g);  $V_i$  为 20 g 土壤的提取液 (200  $\mu\text{l}$ );  $n$  为土壤提取液的稀释倍率 (4 ~ 32);  $V_1$  为每次  $umu/SOS$  测试中所用提取液剂量 (10  $\mu\text{l}$ )。

一般地, 在 Ames 或  $umu/SOS$  实验中, 当  $R$  值大于或等于 2.0 时认为试验结果为阳性“+”, 反之为阴性“-”。定义  $G$  为诱导比率  $R=2$  时  $SW$  的值。根据插值得到的当  $R=2$  时, 每孔对应的土壤重量  $G$  值。 $G$  越大, 说明该土壤样品的遗传毒性越小; 反之说明该土壤样品的遗传毒性越大。

### 1.3 活体蚯蚓彗星试验方法

本实验所采用的蚯蚓种为 *Eisenia foetida* (赤子爱胜蚓), 在室温 20 ~ 22  $^{\circ}\text{C}$  下, 通风良好的暗处培养。培养土壤的湿度控制在 50% ~ 70%, pH 在 7.0 左右。驯化期间培养土壤为北京谭柘寺附近森林褐

土, 每隔 6 ~ 8 周加入牛粪为食物。实验前选取有明显成年环, 发育好的蚯蚓作为实验个体, 每条重约为 300 mg。暴露实验前将蚯蚓置于 0.85% 生理盐水润湿的滤纸上, 置于保持透气的玻璃皿中, 在光照下, 饥饿清肠 48 h。

取经冷冻干燥后的土壤 100 g, 加入 40 ml 蒸馏水, 混合均匀后将 3 只清肠后的蚯蚓放入, 在光照透气的条件下 ( $23 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ ), 暴露 72 h。每份土壤样品重复 3 次实验。实验中所有蚯蚓均没有发生死亡现象。暴露结束后将蚯蚓取出, 放在用 4  $^{\circ}\text{C}$  生理盐水浸湿的滤纸上使其吐去肠内脏物, 然后将动物个体分别移入 EP 管中, 加入 1 ml 的细胞抽提液 (EM 溶液) (4  $^{\circ}\text{C}$ ), 3 min 后, 体腔细胞释放完全, 移去蚯蚓, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下离心沉淀细胞 ( $3\,000 \text{ min}^{-1}$ , 10 min), 除去上清液, 加入 1 ml 磷酸缓冲液 (PBS 溶液) (4  $^{\circ}\text{C}$ ) 缓冲液轻轻吹打洗涤细胞, 同样条件下再次离心。洗涤二次后将三只蚯蚓的细胞合并, 用 PBS 调节细胞密度为  $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  个, 放在冰水浴中待用。而后进行彗星试验, 具体实验步骤按参考文献 [8] 进行。

试验结果采用 SPSS 13.0 数据处理软件进行统计分析。并用箱图 (box-plot) 来描述暴露于不同灌溉方式土壤中蚯蚓 DNA 损伤的数据分布规律。

## 2 结果与讨论

### 2.1 再生水及地下水水质

灌溉用再生水以及地下水常规检测数据如表 1 所示。

表 1 再生水与地下水常规水质指标比较

Table 1 Comparison between reclaimed water and groundwater in quality

灌溉水类型 Water used for irrigation	总磷 Total P ( $\text{mg L}^{-1}$ )	全盐 Total salt ( $\text{mg L}^{-1}$ )	pH	氯化物 Chloride ( $\text{mg L}^{-1}$ )	生化需氧量 BOD <sub>5</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	化学需氧量 COD <sub>Cr</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	粪大肠杆菌 Fecal coliforms ( $\text{个 L}^{-1}$ )
地下水 Ground water	0.172	3 600	7.82	83.8	0.072	0.12	nd <sup>1)</sup>
再生水 Reclaimed water	1.42	16 100	7.89	1 576	39.0	82.1	102

1) 未检出 Not detectable

由表 1, 除氯离子外, 再生水各项检测常规指标均符合中华人民共和国农业灌溉水质标准 (GB5084-92)。但再生水的 BOD<sub>5</sub> 与 COD<sub>Cr</sub> 均远高于地下水, 结果表明再生水中含有较多的有机物质。

### 2.2 土壤基本理化性质及土壤中持久性有机污染物浓度

土壤的基本理化性质以及土壤中 16 种 PAHs 和有机氯农药浓度如表 2 所示。

表2 供试土壤基本理化性质及持久性有机污染物含量

Table 2 Some physico-chemical properties of soil samples and persistent organic pollutants in soil samples

样品 Samples	pH (CaCl <sub>2</sub> )	含水量 Water content (%)	总磷 Total P (mg kg <sup>-1</sup> )	总氮 Total N (mg kg <sup>-1</sup> )	有机碳 Organic C (g kg <sup>-1</sup> )	有机氯农药 OCPs (μg kg <sup>-1</sup> )	多环芳烃 Total PAHs (μg kg <sup>-1</sup> )
地下水灌溉土壤 Soil irrigated with groundwater	7.6	16.7	975	1 300	7.8	3.4	18.6
地下水再生水混合灌溉土壤 Soil irrigated with reclaimed water and groundwater	7.7	13.5	1 356	1 955	15.5	4.9	33.7
再生水灌溉土壤 Soil irrigated with reclaimed water	7.8	12.5	1 674	2 080	16.9	4.1	103.4

以往的研究表明<sup>[8,9]</sup>,污水与再生水灌溉可能使得多环芳烃类有机污染物在土壤中得以累积。从表2可以看出,再生水灌溉土壤的PAHs含量较地下水灌溉土壤而言有较大增加,而使用地下水与再生水混合灌溉土壤的PAHs含量则介于地下水灌溉土壤与再生水灌溉土壤之间。说明PAHs在土壤中的累积与再生水灌溉有关。而土壤有机氯农药含量大小则在采用不同灌溉水灌溉的土壤之间相

差不大。

### 2.3 离体 *umu*/SOS 测试中诱导比率 *R* 与每孔土壤投加量关系

利用软件 Origin7.5 将土壤样品 *umu*/SOS 实验的诱导比率 *R* 与 96 孔板每孔土壤投加量 (*SW*) 作图得到样品的 *R* 值与土壤量关系图(图1),用 sigmoid 拟和并插值得到当 *R* = 2 时每孔所需的土壤投加量 (*G*) (表3)。

表3 *umu*/SOS 测试呈阳性结果时不同土壤投加量

Table 3 Input of soil in each well when *R* = 2

样品 Samples	样品编号 Sample No.	诱导比率 <i>R</i> = 2 每孔土壤投加量 <i>G</i> Input of soil in each well when <i>R</i> = 2 (mg)	<i>G</i> 平均值 Mean value of <i>G</i> (mg)
地下水灌溉土壤 Soil irrigated with groundwater	1 #	20.82	20.20
	2 #	19.00	
	3 #	20.79	
地下水再生水混合灌溉土壤 Soil irrigated with reclaimed water and groundwater	1 #	12.29	12.23
	2 #	12.21	
	3 #	12.20	
再生水灌溉土壤 Soil irrigated with reclaimed water	1 #	8.03	8.43
	2 #	7.37	
	3 #	9.90	

从表3可以看出随着灌溉用水中再生水使用量的增加,使 *umu*/SOS 测试为阳性 (*R* = 2) 所需要的土壤量 (*G*) 就越小,土壤的遗传毒性增大。

从图1可以看出,随着每孔土壤投加量 *SW* 值的增加,诱导比率 *R* 也随之增加。再生水灌溉土壤的 *G* 值 (*R* = 2) 比地下水灌溉土壤的 *G* (*R* = 2) 值减

少了近 60%,相对于地下水灌溉土壤而言,再生水灌溉土壤的遗传毒性显著增大。曾有研究表明污水或再生水灌溉土壤的遗传毒性增大与 PAHs 在土壤中的累积有关<sup>[9]</sup>。从 *umu*/SOS 实验结果可以看出,由于其能够灵敏地检测出土壤遗传毒性与土壤使用量的关系,因而是一种有效的测试土壤遗传毒性的方法。

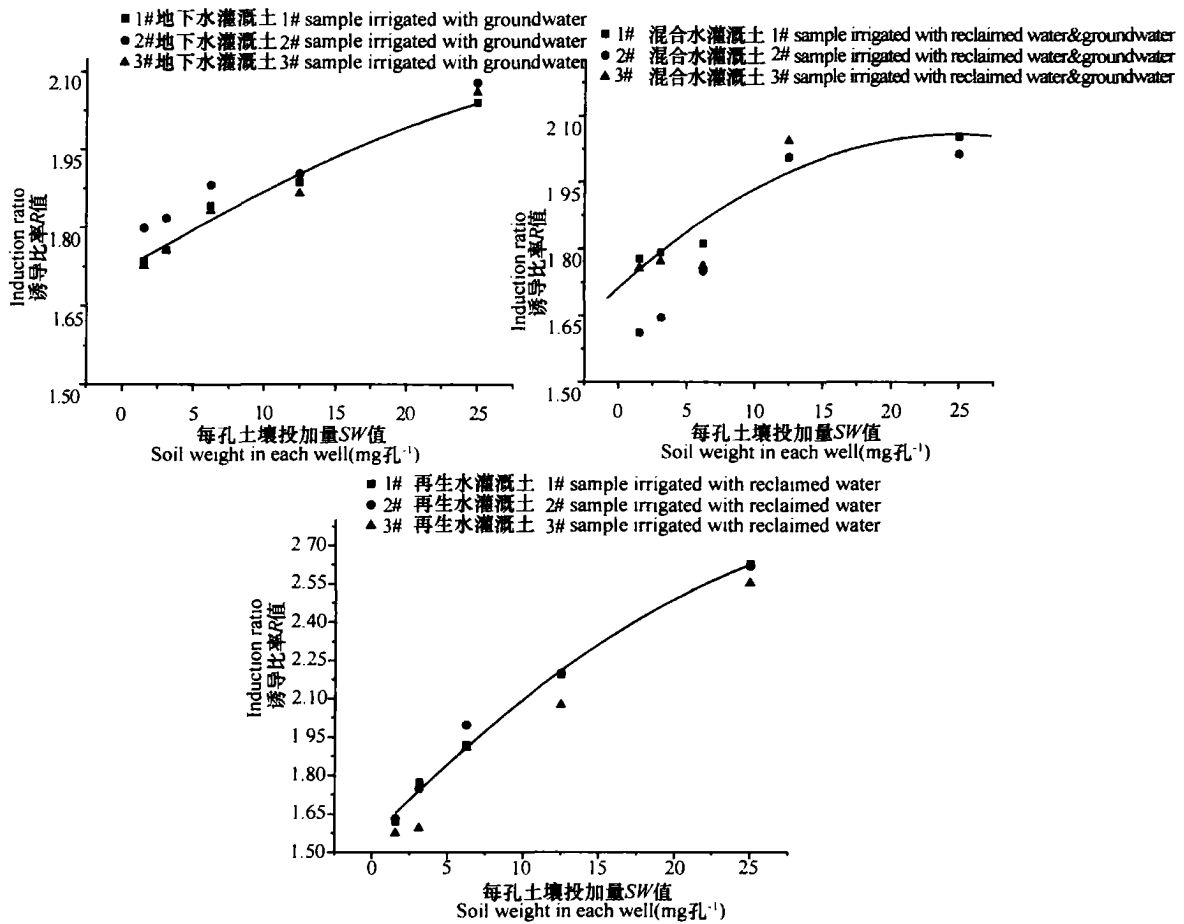


图1 不同水灌溉土壤的  $R$  值与 96 孔板每孔土壤投加量关系

Fig. 1  $R$  value in relation to soil input in each well under different irrigation patterns

#### 2.4 活体蚯蚓彗星试验验证土壤遗传毒性结果

彗星试验中,常用于评价 DNA 损伤的参数包括尾长 TL (Tail Length)、彗尾 DNA 含量 TD (Tail DNA content)、尾矩 TM (Tail Moment)。通常由于 TM 等于 TL 与 TD 的乘积,其包含了以上二种参数的影响,从而被优先选为评价细胞 DNA 损伤的参数<sup>[10]</sup>。

经 SPSS 软件统计分析发现,虽然彗星试验得到的尾矩值(TM)呈非正态分布,但基于同一变量的数值分布规律具有相似性的特点,可以进行非参数检验,即考察空白对照组和不同灌溉水土壤组之间的 TM 值是否具有显著性差异( $p < 0.05$ )。有研究表明<sup>[11]</sup>在 DNA 受到严重损伤时,细胞的个体差异变大,彗星试验的 TM 值会受到极大值的强烈影响,数值不能呈现良好的正态分布,用均值表示的实验结果有很大的标准偏差,因此在这种情况下用均值表示的量化结果的意义会有所降低。因此本研究利用箱图(box-plot)来描述 TM 的分布规律。

图 2 中矩形块的上、中、下三线分别表示 TM 值的 75%、50%和 25%的百分位数,50%的数据落在矩形块的范围内。和矩形块相连的垂直线为触须线,上下触须线之间的变量值为本体值,分别对应本体值的最大值和最小值,而极值和奇异值则被去掉。从图 2 可以发现:随着再生水灌溉量的增加,TM 值的分布呈现明显增大的趋势,说明暴露于其中的蚯蚓 DNA 损伤程度也有所增加。与空白对照相比,混合灌溉土壤与再生水灌溉土壤用 TM 表示的 DNA 损伤结果均表现出显著性差异( $p < 0.05$ )。

已有研究通过调查蚯蚓种群数量来评判土壤质量<sup>[12]</sup>以及利用彗星试验将蚯蚓直接暴露于某一类目标污染物下从而研究化合物引发的 DNA 损伤<sup>[13]</sup>。但目前直接将蚯蚓暴露于再生水灌溉土壤中,并利用活体彗星试验中 TM 值作为生物标记指标来研究再生水灌溉土壤的遗传毒性还不多见。

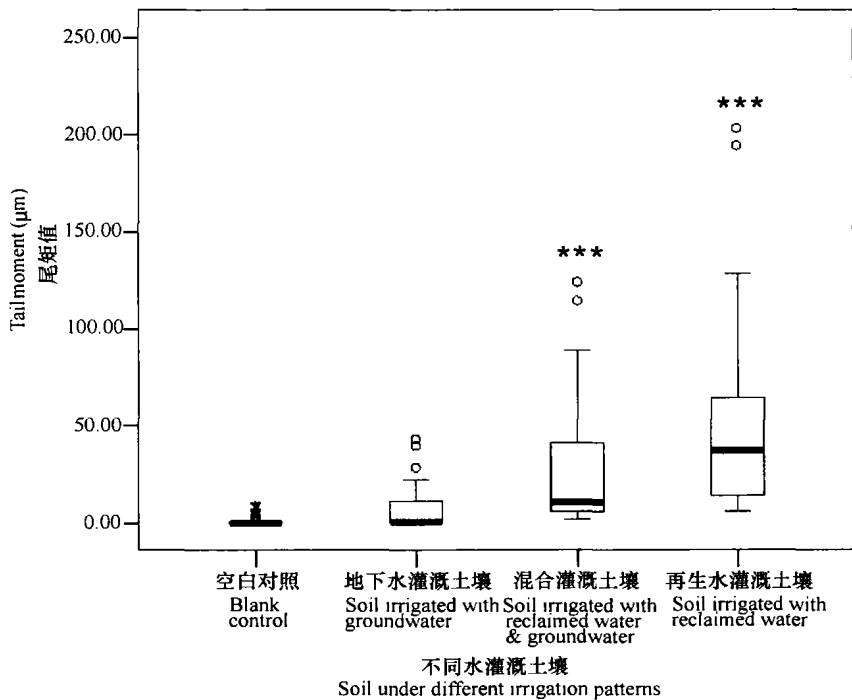


图2 不同水灌溉土壤对蚯蚓 DNA 损伤程度

Fig. 2 DNA damage of earthworm in soils irrigated with different waters

2.5 离体生物实验与活体生物实验结果的关系

在测定某些化合物与环境样品的遗传毒性时由于使用的生物测试方法不同可能得到的结果会有所差异<sup>[13]</sup>。因此离体生物实验与活体生物实验结果间的关系常用于相互验证实验结果是否可靠<sup>[14~16]</sup>。

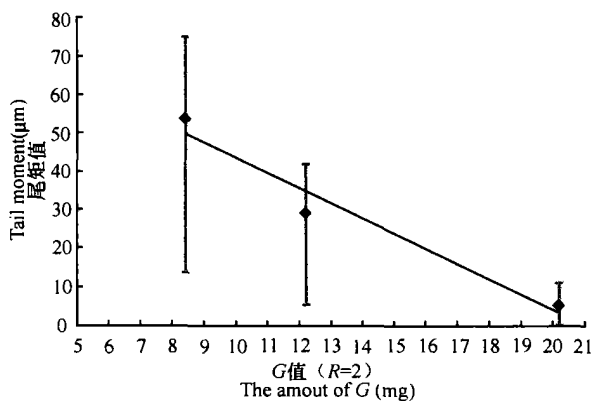


图3 G与TM的关系图

Fig. 3 Relationship between G and TM

图3给出在离体 *umu*/SOS 测试中表示土壤相对遗传毒性大小的 G 值 ( $R=2$ ) 与在活体蚯蚓彗星试验中表示土壤遗传毒性大小的尾矩 (TM) 平均值之间的关系。图中 TM 的正负误差线取自图2中 TM 值的 75% 和 25% 的百分位数值。从图中可以看

出, G 与 TM 的平均值存在着明显的相关性 ( $R^2 = 0.9553$ )。表明在本研究中使用的两种生物测试方法之间存在较好的相关性, G 值越小, TM 值越大, 反之亦然。结果均表明:随着再生水灌溉量的增加, 土壤的遗传毒性增大, 这可能是由于再生水中的遗传毒性物质在土壤中累积所致。

*umu*/SOS 测试所反映出的土壤相对遗传毒性高低能够在蚯蚓活体暴露彗星实验中得以验证, 表明了离体 *umu*/SOS 测试能够有效、快速筛选土壤的遗传毒性风险。同时, 活体蚯蚓彗星试验也提供了一种将土壤无脊椎动物直接暴露于污染土壤后, 通过 TM 值来评判土壤遗传毒性大小的方法。

3 结论

离体 *umu*/SOS 测试由于其快速、有效的特点可以用来筛选大量土壤样品遗传风险, 再利用活体蚯蚓彗星实验对高遗传毒性土壤进行确认, 可以作为表征污水灌溉中土壤生态风险物质积累的一个可行方案。本工作表明再生水灌溉使得遗传毒性物质在土壤中累积, 而根据离体 *umu*/SOS 与活体蚯蚓彗星试验结果的比较, 认为这类遗传毒性物质主要是持久性有机有毒污染物。

## 参考文献

- [ 1 ] 刘润堂, 许建中. 我国污水灌溉现状、问题及其对策. 中国水利, 2002, 10: 123 ~ 125. Liu R T, Xu J Z. Sewage water irrigation problems and solutions in China (In Chinese). China Water Resources, 2002, 10: 123 ~ 125
- [ 2 ] Shen L, Lin G F, Tan J W, *et al.* Genotoxicity of surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Lake, Eastern China. *Chemosphere*, 2000, 41: 129 ~ 132
- [ 3 ] 易秀, 刘秀华, 周玉明. 土壤质量的生态毒理学评价. 农业环境保护, 2001, 20(5): 345 ~ 347. Yi X, Liu X H, Zhou Y M. Evaluation on soil quality by ecotoxicological method (In Chinese). *Agro-environmental Protection*, 2001, 20(5): 345 ~ 347
- [ 4 ] Ma M, Wang Z J, Shang W, *et al.* Mutagenicity and acute toxicity of waters from different treatment processes in Beijing waterworks. *Environmental Science and Health*, 2003, 35(10): 88 ~ 96
- [ 5 ] 崔金山, 张黎. 应用 SOS 显色试验检测工业废水的遗传毒性. 环境与健康杂志, 1992, 9(4): 205 ~ 208. Cui J S, Zhang L. The Application of SOS Chromotest for the detection of genotoxicity of industrial waste water (In Chinese). *Journal of Environment and Health*, 1992, 9(4): 205 ~ 208
- [ 6 ] 韩发彬, 王福琳, 丁恬, 等. 用 Ames 实验和 SOS 显色实验对污染河水及沿岸井水的遗传毒性研究. 中国环境科学, 1991, 11(4): 285 ~ 289. Han F B, Wang F L, Ding T, *et al.* Application of ames assay and SOS chromotest for the detection of genotoxicity of polluted river water and coastwise well water (In Chinese). *China Environmental Science*, 1991, 11(4): 285 ~ 289
- [ 7 ] 肖睿洋, 禹果, 王春霞, 等. 天津地区土壤中遗传毒性物质的分布规律. 环境科学学报, 2005, 25(10): 1 403 ~ 1 407. Xiao R Y, Yu G, Wang C X, *et al.* Distribution of genotoxic substances in soils in Tianjin Area (In Chinese). *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(10): 1 403 ~ 1 407
- [ 8 ] 陈颖, 王子健. 用彗星试验检测土壤污染对蚯蚓活体基因损伤. 土壤学报, 2005, 42(4): 577 ~ 583. Chen Y, Wang Z J. Detection of genotoxicity of soil pollution to earthworm in vivo exposure by comet assay (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(4): 577 ~ 583
- [ 9 ] Chen Y, Wang C X, Wang Z J, *et al.* Assessment of the contamination and genotoxicity of the soil irrigated with wastewater. *Plant and Soil*, 2004, 261: 189 ~ 196
- [ 10 ] Richard F L, Scott S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 2003, 544: 43 ~ 64
- [ 11 ] Moretti M, Marcarelli M, Villarini M, *et al.* In vitro testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: Cytogenetic and primary DNA damage. *Toxicology in Vitro*, 2002, 16: 81 ~ 88
- [ 12 ] Smeaton T C, Daly A N, Cranwell J M. Earthworm population responses to cultivation and irrigation in a south Australian soil. *Pedobiologia*, 2003, 47: 379 ~ 385
- [ 13 ] Zhang Y, Zhong Y, Luo Y, *et al.* Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 2000, 108: 271 ~ 278
- [ 14 ] Sierra-Torres C H, Cajas-Salazar N, Hbyos L S, *et al.* In vitro and in vivo genotoxic activity of miral, an organophosphorus insecticide used in Colombia. *Mutation Research*, 1998, 415: 59 ~ 67
- [ 15 ] Thierry G, Valérie F, Sylvie H, *et al.* Comparative in vitro and in vivo assessment of genotoxic effects of etoposide and chlorothalonil by the comet assay. *Mutation Research*, 1999, 444: 103 ~ 116
- [ 16 ] Juliette L, Laura M Z, Femke S, *et al.* Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.*, 2002, 36: 4 410 ~ 4 415

## GENOTOXICITY ASSESSMENT OF SOIL IRRIGATED WITH RECLAIMED WATER USING IN VITRO UMU/ SOS TEST AND IN VIVO COMET ASSAY

Yu Guo<sup>1</sup> Xiao Ruiyang<sup>1</sup> Wang Chunxia<sup>1†</sup> Wu Wenyong<sup>2</sup> Liu Honglu<sup>2</sup> Wang Zjian<sup>1</sup>

(1 State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

(2 Beijing Hydraulic Research Institute, Beijing 100044, China)

**Abstract** Soil irrigation with wastewater and reclaimed water is a common practice in North China. Its potential ecological risk of accumulation of genotoxic substances is a major concern worth studying. In this paper, in vitro *umu*/ SOS test and in vivo Comet assay were used to assess accumulation of genotoxic substances in the soil irrigated with reclaimed water in suburbs of Beijing. Relative genotoxicity was determined by weight of the soil ( $G$ ) needed to show positive (or to reach 2 in induction ratio  $R$ ), and Tail Moment (TM) was cited in Comet assay to characterize genotoxicity of the soil. Results showed  $G$  decreased and TM increased along with the increase in amount of reclaimed water used in irrigation, implying that the use of reclaimed water in irrigation could result in increase in genotoxicity of the soil. A significant relationship was observed between  $G$  and TM, suggesting that genotoxic substances in the soil irrigated with reclaimed water are mainly organic contaminants. It could be concluded that the *umu*/ SOS test combining with the Comet assay could be used to screen out high risk soil samples rapidly and effectively.

**Key words** Polluted soil; *umu*/ SOS test; Comet assay; Genotoxicity