

三元复合驱采油污水对水丝蚓 DNA 损伤的影响

尹伟平, 徐长君*, 殷亚杰, 秦姝冕, 李铭, 聂春雨 (大庆师范学院, 黑龙江大庆 163712)

摘要 [目的]研究三元复合驱采油污水对水生动物基因的毒性效应。[方法]以霍甫水丝蚓(*Limnodrilu hoffmeisteri*)为受试生物,以浓度分别为12%、36%、24%和44%的采油污水稀释液为供试污染物,采用碱性单细胞凝胶电泳实验,以尾长(TL)、头部DNA含量(Head DNA)和尾部DNA含量(Tail DNA)为指标检测不同浓度采油污水对水丝蚓DNA的损伤程度。[结果]三元复合驱采油污水会引起水丝蚓体细胞DNA损失,暴露组中受试生物的头部DNA含量与对照组相比均显著减少($P < 0.05$),尾长和尾部DNA含量均显著升高($P < 0.05$),随着采油污水浓度的增加,DNA损伤表现出明显的“剂量-效应”关系。[结论]该研究表明三元复合驱采油污水对水丝蚓具有基因毒性效应,可能对油田生态环境产生严重影响。

关键词 三元复合驱;霍甫水丝蚓;急性毒性;DNA损伤

中图分类号 S96;TE357 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)02-00500-03

DNA Damage of *Limnodrilu hoffmeisteri* Somatopiasm by Oily Sewage of Alkali-surfactant-polymer Flooding

YIN Wei-ping et al (Daqing Normal University, Daqing, Heilongjiang 163712)

Abstract [Objective] The aim was to study the genotoxicity effects of oily sewage of alkali-surfactant-polymer flooding on aquatic animals. [Method] *Limnodrilu hoffmeisteri* exposed to oily sewage with concentrations of 12%, 36%, 24% and 44% (V/V) respectively. Then the lysed cells were detected by single cell gel electrophoresis under alkaline conditions and the DNA damage of *Limnodrilu hoffmeisteri* cells was detected by using the tail length (TL), Head DNA content and tail DNA content as the indexes. [Result] The oily sewage of alkali-surfactant-polymer flooding could cause the damage of *Limnodrilu hoffmeisteri* somatopiasm DNA. The tail length and tail DNA content of all the treated groups increased significantly compared with those of control ($P < 0.05$), and the head DNA content were decreased significantly ($P < 0.05$). The DNA damage showed obvious "dose-effect" relationship along with the concentration increased of oily sewage. [Conclusion] This study showed that the oily sewage of alkali-surfactant-polymer flooding has genotoxicity effect on *Limnodrilu hoffmeisteri*, and may have a serious impact on the ecological environment of oil field.

Key words Alkali-surfactant-polymer flooding; *Limnodrilu hoffmeisteri*; Acute toxicity; DNA damage

三元复合驱(ASP)采油技术利用降低油水界面张力原理,来启动残余油所需的最低界面张力,从而提高原油采收效率^[1-2]。该技术的成功应用极大地缓解了石油产量递减的速度,对大庆油田原油的高产及稳产接替具有重要作用。三元复合驱采出水中含大量聚丙烯酰胺、表面活性剂和碱等化学物质,其污水黏度高,水中油滴和固体悬浮物的乳化稳定性强^[3],长期使用三元复合驱采油可使油田废水外排量升高,这不仅会对油田生态环境造成严重污染,而且对人类及其他生物具有潜在的危害。单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis assay, SCGEA),也称彗星实验(Comet assay)是近年发展起来的在单细胞水平上检测DNA损伤的灵敏方法^[4-6],现已经广泛应用于生态风险评估和环境污染监测方面,并建立了环境污染物对生物的DNA损伤监测体系^[7-8]。霍甫水丝蚓(*Limnodrilu hoffmeisteri*)是淡水中常见的底栖动物,可用来指示水域的污染程度^[9-11],很多学者通过水丝蚓急性毒性试验进行了重金属、杀虫剂等污染物毒性效应的研究^[12-14],目前,关于环境污染物对水丝蚓DNA损伤方面的报道尚未发现。笔者以霍甫水丝蚓为试验材料,在急性毒性试验的基础上,用人工配制的不同浓度梯度的三元复合驱采油污水进行染毒处理,并通过彗星实验检测其基因毒性,旨在为水丝蚓彗星实验的建立提供理论依据,并且为评估油田环境的生态风险提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和化学试剂。试验仪器包括:Nikon 80i型尼康荧光显微镜(日本尼康公司);DYY-6C型双稳定时时电泳仪(北京市六一仪器厂);DYY-6C型电泳仪(北京市六一仪器厂);UPW-20NE型超纯水器(北京市历元电子仪器技贸公司);TGL-16M型高速台式冷冻离心机(湘仪集团)。主要试剂包括:正常熔点琼脂糖(NMA),购自香港基因有限公司;低熔点琼脂糖(LMA)、Triton X-100、二甲基亚砜(DMSO)、十二烷基肌氨酸钠($C_{15}H_{28}NNaO_3$)购自Amresco公司;吖啶橙(纯度)购自美国西格玛公司;其余化学试剂均为国产分析纯。

1.1.2 供试污染物和受试生物及其预处理。供试污染物:三元复合驱采油污水母液,采自大庆油田北一区断西西强碱三元复合驱示范区。受试生物:实验用水丝蚓为霍甫水丝蚓(*Limnodrilu hoffmeister*),购自于大庆农贸市场。将霍甫水丝蚓放置于大庆师范学院动物生态学实验室的鱼缸中,加入一定量曝气水,隔天换水,在室温下进行扩大培养。试验前挑选长1.5~2.5cm、健康活泼的无环带的成体水丝蚓,清洗后进行预处理。将霍甫水丝蚓放入装有100ml清水的培养皿中,盖上培养皿盖,在20℃、无光照的温箱中清肠24h,清肠后仍然健康的霍甫水丝蚓将用于正式试验。

1.2 方法

1.2.1 急性毒理学试验。将三元复合驱采油污水用8层纱布过滤处理后,再用双蒸馏水将其母液滤液分别稀释为浓度为10%、20%、30%、40%、50%、60%的采油污水溶液。参照

基金项目 黑龙江省自然科学基金项目(C200827)。

作者简介 尹伟平(1990-),女,黑龙江嫩江人,本科生,专业:动物学。
*通讯作者,教授,从事动物学、生态学研究, E-mail: changjunxu@126.com。

收稿日期 2012-11-16

国家环保局鱼类急性毒性测试方法^[15]来设计水丝蚓的急性毒性试验,急性毒性实验采用静态方式在室温条件下进行,每组处理随机放入长度相近的无环带的成体水丝蚓 30 条,周期为 24 h,于放入后 12、24 h 分别观察记录水丝蚓中毒症状和死亡数目。以身体对机械刺激无反应视为死亡,根据动物死亡率采用概率单位法^[16]计算其半致死浓度。

1.2.2 DNA 损伤测试。试验分为暴露组和对照组。暴露组是用双蒸馏水稀释的一定浓度梯度的采油污水,根据急性毒性试验的结果,将其设定为浓度分别为 12%、24%、37%、44% 的采油污水溶液。在预试验的基础上,将染毒时间设定为 4 h。对照组是双蒸馏水。试验时每组处理 10 条水丝蚓。

1.2.2.1 体细胞悬浮液的制备。将染毒恢复后的水丝蚓取出,用吸水纸吸干多余水分,将其放入预冷的研钵中(4℃),加入 3 ml PBS 缓冲液(pH 7.4)充分研磨,研磨液经 200 目尼龙网过滤后,转入 10 ml 离心管中,在 4℃下 2 000 r/min 离心 3 min 并吸取上清液放入另一离心管中放置于 4℃冰箱中。用 PBS 缓冲液反复冲洗离心管中沉淀,并在 4℃下 1 000 r/min 离心 1 min 后吸取上清液。将 2 次吸取的上清液合并后经 300 目尼龙网过滤,滤液即为水丝蚓体细胞悬浮液。将制备好的悬浮液在 4℃保存备用,使用时根据试验要求利用 PBS 缓冲液调整悬浮液中细胞浓度,以上操作均在 4℃条件下进行。

1.2.2.2 单细胞凝胶电泳。单细胞凝胶电泳试验参照 Singh 等^[17]、Gichner 等^[18]的方法,略加以改进。

(1)制片。采用“三明治”法铺胶。以 100 μl 质量分数为 0.8% 的正常琼脂糖(NMA)平铺于磨砂载玻片作为第 1 层胶,将盖玻片覆盖于第 1 层胶上面,待第 1 层胶完全凝固后,轻轻移去第 1 层胶上面的盖玻片。将细胞悬浮液与质量分数为 0.6% 的低熔点琼脂糖(LMA)按 1:5 的比例均匀混合(每个胶片)滴加在第 1 层胶上面,迅速用盖玻片压平,置于 4℃凝固,此为第 2 层胶。待第 2 层胶完全凝固后,取 75 μl 质量分数为 0.6% 的低熔点琼脂糖(LMA)溶液平铺于第 2 层胶上面,并将其置于冰袋上即可转移到 4℃冰箱中凝固。

(2)细胞裂解。待凝胶完全晾干后,揭去盖玻片,将载玻片水平浸入盛有冰冷的碱性裂解液的铝盒中。细胞裂解液组分为 2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂EDTA, 10 mmol/L Tris, 1% N-十二烷基肌氨酸钠, pH 10.0。临用前加入体积分数为 10% 的二甲基亚砜(DMSO)和 1% 体积的聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100),放置于 4℃冰箱中避光裂解 4 h。裂解结束后,载玻片用预冷的 PBS 缓冲液漂洗 3 次。

(3)解旋和电泳。将载玻片放置于水平电泳槽中,加入已配置好的电泳缓冲液(1 mmol/L Na₂EDTA, 300 mmol/L NaOH, pH 13.0, 从 4℃冰箱中取出缓缓倒入电泳槽中),于 4℃下避光解旋 30 min。解旋后,在电压 25 V、电流 300 mA 的条件下电泳 30 min。

(4)中和、染色。电泳结束后,用镊子轻轻取出载玻片,放入 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)反复漂洗 3 次,每次 5 min。用滤纸条将漂洗后载玻片上的缓冲液吸干,每个胶片加入 5

μl 2 mg/L 吖啶橙溶液,盖上盖玻片,避光染色 30 min。

(5)镜检观察与统计。在激发滤光片波长为 488 nm,阻碍滤光片波长为 515 nm 的荧光显微镜下观察,以 CCD 拍照获得彗星图像。

以每条水丝蚓的细胞做一块胶,每块胶随机分析 30 个细胞,利用 CASP 软件分析彗星图像,对不同染毒组和对照组中细胞彗星的尾长(TL)、头部 DNA 含量(Head DNA)和尾部 DNA 含量(Tail DNA)等 DNA 损伤参数指标进行计算。

1.3 数据处理与统计学分析 利用 SPSS 17.0 for Windows 软件对彗星实验数据进行方差分析(One way-ANOVA),并通过 Duncan's 检验进行不同处理组之间的差异显著性分析,显著水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 采油污水对水丝蚓的急性毒性效应 预试验中观察了 24、48 h 时水丝蚓的形态特征,发现采油污水的暴露浓度为 10%、20%、30%、40%、50%、60% 时,24 和 48 h 的水丝蚓全部死亡,因此未对 24 h-*LC*₅₀, 48 h-*LC*₅₀ 进行计算。在该试验中发现,霍甫水丝蚓经采油污水染毒处理后 12 h,暴露浓度为 10% 时,水丝蚓的身体表现为身体泛白,有些生物体已失去收缩能力,极少数的生物个体出现死亡现象;暴露浓度为 30% 时,水丝蚓出现了大部分死亡现象,而暴露浓度为 50%、60% 时,在染毒 12 h 后水丝蚓则全部死亡。通过计算得出水丝蚓采油污水暴露 12 h 时致死浓度,回归方程为 $y = -60.6x + 29.635$, $R^2 = 0.9705$, LC_{25} 为 11.86%, LC_{50} 为 24.19%, LC_{75} 为 36.12%, LC_{100} 为 48.25%, 95% 置信区间分别为 [10.99%, 12.72%]、[23.32%, 25.05%]、[34.47%, 37.77%]、[45.43%, 50.43%]。

2.2 采油污水对水丝蚓体细胞 DNA 损伤的影响 三元复合驱采油污水染毒条件下,水丝蚓体细胞中的“彗星”图像如图 1 所示。由图 1 可看出,对照组(双蒸馏水)处理的体细胞中头部 DNA 致密,边缘光滑,无明显的尾部,表明细胞 DNA 未发生断裂;不同浓度采油污水染毒实验组中的体细胞头部 DNA 减少,尾部由 DNA 断片组成,表现为扫帚状,表明细胞 DNA 已受到损伤。随着采油污水染毒浓度的增加,尾部荧光强度也逐渐加强,拖尾现象越加明显。

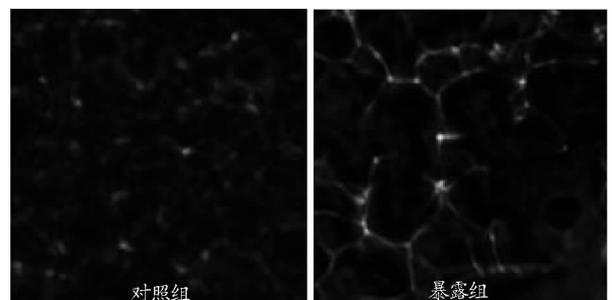


图 1 水丝蚓(*Limnodrilus hoffmeister*)体细胞彗星图像

三元复合驱采油污水对霍甫水丝蚓(*Limnodrilus hoffmeister*)体细胞 DNA 损伤如表 1 所示。从表 1 可看出,不同浓度采油污水染毒实验组的水丝蚓体细胞 DNA 受到明显损伤,尾长和尾部 DNA 含量均显著高于对照组($P < 0.05$);各染毒

实验组头部 DNA 含量均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。相关分析表明,尾长 ($R^2 = 0.9766, P < 0.05$)、尾部 DNA 含量 ($R^2 = 0.9852, P < 0.05$) 与采油污水染毒剂量浓度之间呈显著正相关,头部 DNA 含量 ($R^2 = 0.9852, P < 0.05$) 与采油污水染毒剂量浓度之间呈显著负相关,表现出显著的剂量-效应关系。这说明采油污水对水丝蚓具有显著的基因毒性效应。

表1 三元复合驱采油污水对霍夫水丝蚓(*Limnodrilus hoffmeisteri*)的 DNA 损伤

浓度 (V/V) // %	尾长 μm	头部 DNA 含量 // %	尾部 DNA 含量 // %
0(CK)	3.78 \pm 0.14 a	97.54 \pm 0.30 e	2.46 \pm 0.47 a
12	11.88 \pm 0.13 b	77.85 \pm 0.90 d	22.15 \pm 0.91 b
24	18.60 \pm 0.12 c	64.67 \pm 0.13 c	35.60 \pm 0.74 c
36	34.60 \pm 1.60 d	36.29 \pm 0.86 b	63.35 \pm 0.16 d
44	41.50 \pm 2.38 e	20.56 \pm 0.59 a	79.48 \pm 0.30 e

注:表中数据为平均数 \pm SE。数据后标有不同字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

水丝蚓是淡水底栖动物区系的重要组成部分,霍甫水丝蚓(*Limnodrilus hoffmeisteri*)作为世界广泛分布的优势种,经常在有机污染较为严重的水域中大量产生。杀虫剂、重金属是环境中一种主要的污染物,对生物具有生态效应。范学铭等^[12-13]、吕伟华^[14]等研究发现 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、敌百虫对水丝蚓均有不同程度的毒性效应,这充分表明水丝蚓是指示环境中水体污染物的敏感生物。

三元复合驱采油污水中含有重烷基苯磺酸盐和苯、萘等有毒物质,长期接触或使用这些物质会对生物体产生“三致”效应。魏鹏等^[19]研究表明,十二烷基磺酸钠(SDS)对蝌蚪染色体有损伤并对 SOD 有抑制作用。余坦健等^[20]的研究表明,当 SDS 浓度大于 0.4 mg/L 时,奥尼罗非鱼免疫功能受到了不同程度的抑制。张晶等^[21]研究发现,十二烷基磺酸钠对刺身幼参有急性毒性效应。徐长君等^[22]在先前的研究中发现聚驱污水对生物具有潜在遗传毒性,它可诱导蚕豆产生较高频率微核率和染色体畸变率。然而,微核(MN)实验在测试生物基因损伤时,已达到有丝分裂,甚至是分裂间期,此时染色体的后期修复已开始发生。单细胞凝胶电泳实验技术(SCGE)则可在细胞水平上检验未修复 DNA 分子的单/双链损伤,而无需等到细胞有丝分裂之后才可观测,与 MN 实验相比,其是一种更为敏感的 DNA 损伤检测手段。人们多以植物、哺乳类动物(如人和鼠)、两栖类动物(如蝌蚪)及其他生物(如四膜虫、蚯蚓)等为试验材料成功地进行了彗星实验,现已被广泛应用于生态毒理学的各个领域^[6-8]。笔者以霍甫水丝蚓(*Limnodrilus hoffmeisteri*)为试验材料,借鉴传统彗星实验的经验,成功地尝试建立了水丝蚓的单细胞凝胶电

泳实验体系,这为拓展单细胞凝胶电泳的试验生物种质资源,及对于研究水丝蚓生态毒理学的工作均有很大的参考价值。

该试验从 DNA 分子水平上评估了三元复合驱采油污水对生物的基因毒性。在正常条件下,水丝蚓体细胞的 DNA 分子超螺旋结构附着在核基质中,当水丝蚓受到采油污水中有毒物质的作用后,细胞 DNA 双链断裂,在电泳液中 DNA 断片向阳极迁移,形成荧光拖尾现象。水丝蚓细胞 DNA 受损愈重,产生断裂或键易变性断片就愈多,其断链或断片也就愈小,在电场作用下迁移的 DNA 量多,迁移的距离长,表现为尾长增加和尾部荧光强度增强。

参考文献

- [1] 于盛鸿,么世椿,姜江. 三元复合驱的驱油特征研究[J]. 河南石油, 2005,19(2):33-35.
- [2] 张学佳,纪巍,康志军,等. 三元复合驱采油技术进展[J]. 杭州化工, 2009,39(2):5-8.
- [3] 刘江红,郭城. 化学药剂在三元复合驱采出水处理中的应用[J]. 广东化工,2010,37(2):83-84.
- [4] 彭宝成,吴淑芬. 单细胞凝胶电泳分析(彗星实验)及应用[J]. 河北医科大学学报,1997,18(4):247-249.
- [5] 陈颖,王磊,王子健. 用彗星实验技术检测环境遗传毒性物质[J]. 土壤学报,2006,43(4):673-677.
- [6] 郑智新,胡继业. 彗星实验检测新农药吡喃虫酰肼对小鼠细胞 DNA 的损伤[J]. 生态毒理学报,2010,5(4):569-574.
- [7] 林爱军,张旭红,张增利,等. 利用不同植物进行 DNA 损伤彗星实验的方法比较[J]. 生态毒理学报,2006,1(2):165-171.
- [8] 王丽,鲁志松,丁书茂,等. 四膜虫彗星实验在环境水质检测中的应用[J]. 环境科学与技术,2006,29(5):31-33.
- [9] 蔡晓明. 羽摇蚊幼虫和霍甫水丝蚓的生态毒理学研究[J]. 应用生态学报,1991,2(1):52-57.
- [10] 劳建国. 鸭绿江水体污染对水丝蚓生态结构的影响[J]. 现代农业, 2007(7):78.
- [11] 付荣恕,杜作滨. 铅、镉污染对水丝蚓的急性毒性效应[J]. 山东师范大学学报:自然科学版,2008,23(4):93-95.
- [12] 赵双菁,李艳秋,柳郁滨,等. Pb^{2+} 对水丝蚓的急性毒性及超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 中国农学通报,2012,28(8):87-89.
- [13] 乔淑晶,范学铭,方芳,等. 敌百虫对水丝蚓的毒害[J]. 动物学杂志, 2006,41(6):92-96.
- [14] 吕伟华,赵元凤,付荣恕,等. 氯化镉对水丝蚓的急性毒性[J]. 辽宁工程技术大学学报:自然科学版,2011,30(5):137-140.
- [15] 国家环保总局《化学品测试方法》编委会. 水和废水检测分析方法[M]. 北京:中国环境科学出版社,2004.
- [16] 惠秀娟. 环境毒理学[M]. 北京:化学工业出版社,2003:268-269.
- [17] SINGH N P, MCCOY M T, TIE R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Exptl Cell Res, 1988, 175:184.
- [18] GICHNER T, PTACEK O, STAVREVA D A, et al. A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seed lings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation [J]. Mutation Research, 2000, 470:1-9.
- [19] 魏鹏,金叶飞. SDS、Cu 复合污染对螭蛸蝌蚪红细胞核异常及抗氧化酶活性的影响[J]. 中国西部科技, 2010, 9(1):5-7.
- [20] 余坦健,简纪常,林兴,等. 十二烷基苯磺酸钠对奥尼罗非鱼免疫毒性的研究[J]. 南方水产, 2008, 4(3):33-37.
- [21] 张晶,陈皓望,房建孟,等. 十二烷基磺酸钠(SDS)对刺参幼参的急性毒性[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(4):457-461.
- [22] 徐长君,张国发,袁红梅,等. 聚驱采出水对蚕豆根尖细胞的遗传毒性分析[J]. 安全和环境学报, 2010, 10(6):6-8.