

应用蚕豆根尖细胞微核技术评价广西平乐锰矿废弃地土壤的污染状况

赵志国¹, 郭红娟², 王任翔^{2,3*}

(1. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 2. 广西师范大学 生命科学学院, 中国科学院 广西 桂林 541004; 3. 广西环境工程与保护评价重点实验室, 广西 桂林 541004)

摘要: 分别选取废弃地上的花生地、柿树地、柑桔地和桃树地等4个采样点进行投资和监测,测定了各采样点土壤浸提物的蚕豆根尖细胞微核千分率(MCN‰)和污染指数(PI),应用蚕豆根尖细胞微核技术对广西平乐锰矿废弃地土壤的污染状况进行了评价,并对造成土壤污染的原因进行了分析讨论。结果表明,用浸提法处理的4个采样点土壤的根尖细胞微核千分率(MCN‰)均明显高于对照组($P < 0.05$),其中柑桔地的污染程度最严重,污染指数达到了2.93;污染程度最轻的是花生地,其污染指数为1.97。这表明广西平乐锰矿废弃地土壤均存在不同程度的污染,在锰矿废弃地土壤上早期不宜种植食用的农作物。

关键词: 蚕豆根尖细胞微核技术; 锰矿废弃地; 土壤污染; 污染指数; 广西

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2011)01-0102-05

Evaluation on soil pollution in Pingle Manganese Mine of Guangxi using *Vicia faba* root-tip cells micronucleus testing

ZHAO Zhi-Guo¹, GUO Hong-Juan², WANG Ren-Xiang^{2,3*}

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 2. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 3. The Guangxi Key Laboratory of Environmental Engineering, Protection and Assessment, Guilin 541004, China)

Abstract: In order to study the pollution status of soil in Pingle Manganese Mine wasteland of Guangxi, four sampling plots respectively in peanut field, persimmon field, orange field and peach field were selected and investigated, the PI and MCN‰ of root-tip cells under soil extracts from all plots were determined. By using micronucleus test technique of *Vicia faba* root-tip cells, this paper evaluated the pollution status of soil in Pingle Manganese Mine wasteland of Guangxi, and analyzed the reasons that might cause soil pollution. The results showed that the MCN‰ of root-tip cells of *V. faba* treated with the soils by means of maceration was obviously higher than that of the cells treated with the negative control group ($P < 0.05$); orange field was under the most serious pollution, the PI had reached up to 2.93, while peanut field got the least, the PI was 1.97. In conclusion, these indicated that the soil in this wasteland was more or less polluted, suggesting that it's not suitable for crops at the early stage of farming.

Key words: *Vicia faba*; micronucleus technique; manganese mine wasteland; soil pollution; Guangxi

收稿日期: 2010-06-13 修回日期: 2010-12-06

基金项目: 国家自然科学基金(31060030); 广西环境工程与保护评价重点实验室研究项目(桂科能 0802k012)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(31060030); the Research Fund of Guangxi Key Laboratory of Environmental Engineering, Protection and Assessment(GKN0802k012)]

作者简介: 赵志国(1964-),男,河北抚宁人,副研究员,主要从事植物生理及植物保育等研究,(E-mail)kfc@gxib.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: wrx05@126.com)

矿藏开采对我国经济发展有着举足轻重的作用,但也给生态环境带来严重破坏。重金属污染是矿区普遍存在且最为严重的问题之一,矿地与尾矿的自然恢复是相当缓慢的,有些甚至是不大可能自然恢复的(夏汉平等,2002)。广西是著名的“有色金属”之乡,其锰矿开采规模与强度居全国之首。广西平乐锰矿属中型露天锰矿,距桂林市约为 110 km。该锰矿于 20 世纪 50 年代末开始开采,因矿产资源日趋枯竭,近年已停止开采。目前广西平乐锰矿矿区大部分地段已进行了复垦工作,锰矿废弃地种植的农作物主要有花生、柿、柑桔和桃等。由于传统粗放型开采,广西平乐锰矿矿区及周边生态环境遭受了严重的污染和破坏,锰矿废弃地土壤上种植的农作物对人和动物的健康是否有危害一直是人们关心的问题。因此,对锰矿废弃地及周边土壤安全性的监测和评价就显得尤为重要。

蚕豆(*Vicia faba*)是一种很好的细胞遗传学研究材料。蚕豆根尖的微核试验是 Degrassi & Rizzoni(1982)正式介绍的,他们的研究指出该技术具有准确、快速、有明显的剂量—效应关系等特点,操作简便。1986 年蚕豆根尖微核技术被中国环保局列为一种水环境生物测试的规范方法,是环境致突变性的主要检测手段(臧宇等,1999)。近年来,我国对铅锌矿、铜矿等金属矿的研究报道较多,但关于锰矿的研究报道不多。杨胜香等(2006,2007)、赖燕平等(2007)报道了用化学方法监测广西平乐锰矿矿区废弃地的土壤污染物和植物对重金属的积累与危害的研究结果。但尚未有从土壤污染物对生物遗传物质直接影响的角度评价广西平乐锰矿废弃地土壤污染状况的研究报道。广西耕地资源紧缺、生态环境脆弱,采矿废弃地的恢复任务十分紧迫。因此,本文对广西平乐锰矿恢复区种植的食用农作物进行采样分析,着重应用蚕豆根尖细胞微核检测技术对广西锰矿废弃地土壤的污染状况进行评价,为矿业废弃地土壤的安全性评价以及生态恢复模式的选择提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 土壤样品采集与分析

2009 年 9 月在广西平乐锰矿矿区进行了调查采样。根据矿山开采和农作物种植的实际情 况,在矿区设花生地、柿地、柑桔地和桃地等 4 个土

壤样品采集点。分上层(0~20 cm)和下层(20~40 cm)分别采取土壤样品。按梅花型布点法随机采集,每个样品由 5 个子样混合而成。土壤经风干、碾碎、弃去石块残根等杂物,用四分法留取足够用量的样品,储存待测。

1.2 土壤浸提液制备

按金波等(1992)方法制备土壤浸提液。具体是将各土壤分别称取 100.00 g,放入 500 mL 三角瓶中,加蒸馏水 250 mL,充分震荡,静置浸提 24 h,取上清液备测。

1.3 材料处理与恢复

选用松滋青皮蚕豆(*Vicia faba*)。选择粒大饱满、大小均匀的蚕豆种子置于盛有蒸馏水的烧杯中,在 25 °C 下浸泡 24 h,此间至少换水两次。种子吸水膨胀后,用纱布裹置磁盘中,保持湿度,在 25 °C 温箱中培养。当根长到 2~3 cm 时,选取根长一致(约 1~2 cm)的种子,使其根尖浸入土壤浸提液中处理 24 h,同时以蒸馏水做阴性对照。用蒸馏水冲洗种子及其根尖 3 次,然后置于蒸馏水中恢复培养 24 h。

1.4 细胞学观察

把恢复培养后的种子取出,切下约 1 cm 的根尖,分别置于瓶中,用卡诺氏固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)固定 24 h。固定后,把根尖用蒸馏水浸洗 2 次,用 1 mol·L⁻¹ HCl 于 60 °C 下水解 10~15 min;卡宝品红染色,进行常规制片,用光学显微镜进行观察,并用 Nikon DXM1200C 数码显微相机拍摄照片。

1.5 统计与数据处理

每次观察 1 000 个细胞,统计含微核的细胞数,每个处理组统计 5 次,分别计算微核细胞个数和微核率(MCN‰);计算平均值及标准差。采用 *t*-检验对不同处理组与阴性对照组间的差异显著性进行分析。

微核率(MCN‰)=细胞中含有微核的细胞数/被观察的细胞总数×1000‰

环境污染指数(PI)=样品微核率的平均值/对照组微核率的平均值

2 结果与分析

2.1 各采样点土壤的蚕豆根尖微核率

对选取的花生地、柿地、柑桔地和桃地等 4 个采集点的不同样品进行检测,重复处理 5 次,以蒸

馏水做阴性对照。各处理样品引起的蚕豆根尖细胞微核千分率的检测结果详见表 1。

2.2 各采样点土壤的污染评价

污染程度划分标准根据《全国生物技术检测规范——蚕豆根尖微核技术》规定的污染指数划分标

准,采用污染指数(PI)值来划分受污染程度。此方法可避免因实验条件等因素带来的 $MCN\%$ 本底的波动。 PI 值在 $0\sim 1.5$ 区间为基本无污染, $1.5\sim 2.0$ 区间为轻度污染, $2.0\sim 3.5$ 区间为中度污染, 3.5 以上为重度污染。

表 1 不同样品的检测结果 ($MCN\%$)
Table 1 The result of the micronucleus frequency

采集点 Location		重复处理 Repetitions				
		1	2	3	4	5
花生地	上层 (0~20 cm)	12.87	10.25	11.91	12.75	11.14
Peanut field	下层 (20~40 cm)	11.08	10.16	9.89	8.73	11.22
柿树地	上层 (0~20 cm)	17.23	15.85	16.69	17.16	18.11
Persimmon field	下层 (20~40 cm)	7.95	10.12	8.78	9.71	10.074
柑桔地	上层 (0~20 cm)	17.74	18.21	18.87	16.97	15.93
Orange field	下层 (20~40 cm)	9.65	10.17	8.75	10.68	10.27
桃树地	上层 (0~20 cm)	18.04	17.41	19.08	15.97	15.83
Peach field	下层 (20~40 cm)	9.23	9.96	11.13	8.65	8.84
蒸馏水(对照)		6.17	5.74	5.81	6.15	6.07
Distilled water						

表 2 广西平乐锰矿废弃地土壤蚕豆根尖微核率($MCN\%$)和污染指数(PI)
Table 2 The micronucleus frequency and pollution index of *Vicia faba* root tip cells treated by soil from the Pingle Manganese Mine of Guangxi

采集点 Location		微核率 $MCN\%$ ($\bar{x}\pm S$) $\%$	概率 P 值	PI	污染程度 Pollution level
花生地	上层 (0~20 cm)	11.78 \pm 1.11**	<0.05	1.97	轻度污染
Peanut field	下层 (20~40 cm)	10.22 \pm 1.01	<0.05	1.71	轻度污染
柿树地	上层 (0~20 cm)	17.01 \pm 0.83**	<0.05	2.84	中度污染
Persimmon field	下层 (20~40 cm)	9.33 \pm 0.94**	<0.05	1.56	轻度污染
柑桔地	上层 (0~20 cm)	17.54 \pm 1.14**	<0.05	2.93	中度污染
Orange field	下层 (20~40 cm)	9.90 \pm 0.74**	<0.05	1.65	轻度污染
桃树地	上层 (0~20 cm)	17.27 \pm 1.38**	<0.05	2.88	中度污染
Peach field	下层 (20~40 cm)	9.56 \pm 1.00**	<0.05	1.60	轻度污染
蒸馏水(对照)		5.99 \pm 0.20			
Distilled water					

注: ** 表示差异显著 ($P<0.05$)。 Notes: ** Significant differences ($P<0.05$).

各处理样品引起的蚕豆根尖细胞微核千分率结果及与蒸馏水对照组差异显著性分析(t -检验)结果见表 2。对照污染指数划分标准,从表 2 中可以看出,花生地上层和下层土壤 PI 值在 $1.5\sim 2.0$,均为轻度污染;柿树地、柑桔地和桃树地上层土壤 PI 值在 $2.0\sim 3.5$,为中度污染,下层土壤 PI 值在 $1.5\sim 2.0$,为轻度污染。

通过对各采样点土壤污染指数(表 2)的分析可知,各采样点土壤引起的微核率中,上层土壤均比下层土壤诱导的蚕豆根尖细胞微核率高,但上层土壤与下层土壤诱导的蚕豆根尖细胞微核率并不成正相关性,柿树地、桃树地和柑桔地上下层土壤蚕豆根尖

细胞微核率的差异较大,说明上层土壤比下层土壤污染程度高;而花生地的差异较小,均为轻度污染。

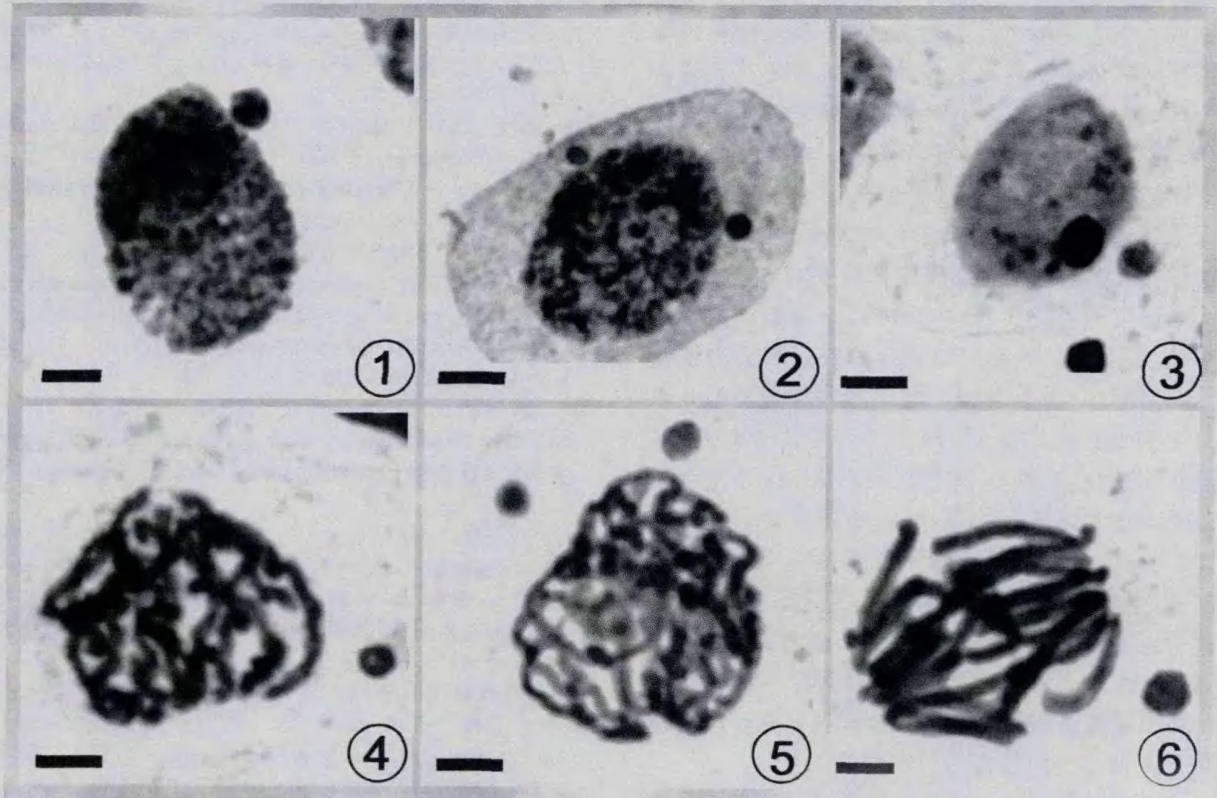
各采样点土壤的显著性概率 P 值均小于 0.05 ,这表明各采样点土壤引起的微核率和对照组微核率有着明显的差异,提示其土壤中含有遗传毒性物质。

2.3 各采样点土壤对蚕豆根尖细胞微核的影响

重金属元素可以打断 DNA 分子形成断片,造成纺锤体功能紊乱和结构伤害。蚕豆细胞染色体的损伤可以在一定程度上反映暴露在同样条件下哺乳动物遗传物质的损伤,它们之间对环境致突变物所引起的染色体畸变等定性反映的一致性可达 99% 以上(臧宇等,1999;涂俊芳等,2008)。在本次实验

的检片过程中,发现染色体产生了畸变(图版 I)。4 个采样点土壤浸提物对蚕豆根尖细胞微核影响显微观察结果中出现了间期单微核(图版 I:①)、间期双微核(图版 I:②)、间期三微核(图版 I:③)、前期单

微核(图版 I:④)、前期双微核(图版 I:⑤)、后期微核(图版 I:⑥)等类型。这说明广西平乐锰矿废弃地土壤的重金属元素已经造成了植物体内 DNA 和纺锤丝的毒害,导致了多种类型蚕豆根尖细胞微核



图版 I 4 个采样点土壤浸提物对蚕豆根尖细胞微核影响显微观察结果
Plate I Effect on micronucleus of the root tip cells of *Vicia faba* induced by soil pollution from the Pingle Manganese Mine of Guangxi

畸变的产生。

3 结论与讨论

杨胜香等(2006)的化学方法监测结果表明,广西平乐锰矿废弃地土壤重金属元素(Pb、Cr、Zn、Cu、Cd、Mn)的含量均远远高于广西土壤背景值和全国土壤背景值,其中 Pb、Cd、Mn 含量非常高,分别是广西背景值的 10~20 倍,66~210 倍,24~403 倍。按土壤环境质量二级标准(GB 15618-1995)来看,5 个区的 Cr、Cd 均超过污染的警戒值,而且 Cd 的含量超过土壤质量三级标准(1.0×10^{-6}),已造成对本区土壤的轻度污染。而从本研究的生物监测结果

看,用浸提法处理的 4 个采样点土壤的根尖细胞微核千分率(MCN‰)均明显高于对照组($P < 0.05$),锰矿废弃地土壤均存在不同程度的污染,其中花生地上层土壤已受到重金属的轻度污染,柿树地、柑桔地和桃树地上层土壤已受到重金属的中度污染;与化学方法监测结果一致。污染程度的等级不一致可能是化学监测和生物监测方法划分的标准不同造成的。

蚕豆根尖微核技术是一种以染色体损伤及纺锤丝毒性等为测试终点的植物微核监测方法。蚕豆根尖细胞染色体大而数量少,细胞增殖周期短,诱变剂进入植物体后通过切断分子或干扰合成与修复,造成染色体损伤或引起纺锤体丝断裂及其他畸变而导致微核形成;其所反映的是各种因素综合的遗传毒

性效应。其优点除快速、经济以外,还可以反映出化学法所不能表现出的综合叠加效应。目前多见于环境及水体污染的监测。微核形成的途径有两条:一是诱变剂打断 DNA 分子形成断片,该断片由于没有纺锤丝连接,在随后的细胞分裂过程中无法移向两极而随机分配到子细胞中,不能参与形成子核而凝缩成独立于主核之外的微核;另一是由纺锤丝毒剂造成纺锤体功能紊乱和结构伤害,由此产生滞留染色体,在有丝分裂后期不能结合进子核而形成微核(杨再福,2000;毛学文等,2003)。本研究的细胞学观察结果显示,广西平乐锰矿废弃地土壤的重金属元素已造成植物体内 DNA 和纺锤丝的毒害,导致了多种类型蚕豆根尖细胞微核畸变的产生。

本研究结果还表明,各采样点土壤引起的微核率中,上层土壤比下层土壤诱导的蚕豆根尖细胞微核率高,说明上层土壤比下层土壤污染程度高。但上层土壤与下层土壤诱导的蚕豆根尖细胞微核率并不成正相关性,柿树地、桃树地和柑桔地上下层土壤蚕豆根尖细胞微核率的差异较大;花生地的差异较小,均为轻度污染。这一方面可能是由于不同农作物对不同重金属元素的富集作用不同造成的;另一方面可能是由于一年收割的经济作物比多年收割的经济作物对重金属元素的富集作用强,从而使花生地上层土壤重金属污染降低。这说明在锰矿废弃地土壤上早期不宜种植食用的农作物。

由于重金属元素可通过食物链转移和富集影响人和动物的健康,重金属 Pb 和 Cd 还可以在人和动物体内富积,具有很强的神经发育毒性;Pb 还可通过改变脑血管内皮细胞的膜结构,使血脑屏障发生渗漏,而且 Pb 还可蓄积于血管内皮细胞内,当浓度达到很高时,就会损害未成熟大脑的血脑屏障,从而侵害动物的中枢神经系统(毛学文等,2003;臧宇等,1999)。在对作物的污染中,复合污染效应明显大于单一污染效应(魏海英等,2003)。因此,长期食用这些农作物对人和动物健康存在很大风险。由于马尾松等林木对 Pb、Cd 等重金属元素有较强的积累作用,当林木被采伐后,可起到良好的环境净化作用(方晰等,2004)。从本研究结果来看,在锰矿废弃地种植的食用农作物均存在不同程度的污染。因此,建议在矿山生态恢复的早期宜种植林木而不宜直接种植蔬菜、水稻、果树和其他食用经济作物,以免矿区重金属元素通过食物链危害人体健康。

参考文献:

- Degrassi F, Rizzoni M. 1982. Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution[J]. *Mutat Res*, 97: 19
- Fang X(方晰), Tian DL(田大伦), Xiang WH(项文化), et al. 2004. Absorption, accumulation and dynamic of heavy metal elements in *Pinus massoniana* plantation in Guangxi(广西马尾松人工林对重金属元素的吸收、累积及动态)[J]. *Guihaia*(广西植物), 24(5): 437-442
- Jin B(金波), Chen GR(陈光荣), Li M(李明), et al. 1992. Study on the monitoring of soil pollution with the technique of *Vicia faba* micronucleus(蚕豆细胞微核技术监测农业土壤污染的研究)[J]. *Environ Sci*(环境科学), 13(3): 74-77
- Lai YP(赖燕平), Li MS(李明顺), Yang SX(杨胜香), et al. 2007. Heavy metal concentrations and pollution assessment of edible crops grown on restored manganese minelands in Guangxi(广西锰矿恢复区食用农作物重金属污染评价)[J]. *J Appl Ecol*(应用生态学报), 18(8): 1 801-1 806
- Mao XW(毛学文), Wang YB(王弋博), Chen Q(陈荃). 2003. Effects of detergent on the roots and leaves of *Vicia faba*(洗涤剂对蚕豆根和叶片的作用)[J]. *Guihaia*(广西植物), 23(2): 185-187
- Tu JF(涂俊芳), Luo X(罗勋), Hu YH(胡云虎). 2008. The utilization of micronucleus test in *Vicia faba* root tip cell to monitor the water quality of Shijian Lake in Huainan City(蚕豆根尖细胞微核技术监测十洞湖水水质)[J]. *J Biol*(生物学报), 25(4): 65-67
- Wei HY(魏海英), Fang YM(方炎明), Yin ZF(尹增芳). 2003. Effects of Pb, Cd single and joint pollution on some physiological characters of *Hypnum revolutum*(Pb、Cd 单一及复合污染对弯叶灰藓某些生理特性的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), 23(1): 69-72
- Xia HP(夏汉平), Cai XA(蔡锡安). 2002. Ecological restoration technologies for mined lands: A review(采矿地的生态恢复技术)[J]. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), 13(11): 1 471-1 477
- Yang SX(杨胜香), Li MS(李明顺), Lai YP(赖燕平), et al. 2007. Dominant plants and their heavy metal concentrations in Manganese Mine Wastelands(广西锰矿废弃地优势植物及其土壤重金属含量)[J]. *J Guangxi Normal Univ*(广西师范大学学报), 25(1): 108-112
- Yang SX(杨胜香), Li MS(李明顺), Li Y(李艺), et al. 2006. Study on heavy metal pollution in soil and plants and ecological recovery in Guangxi Pingle manganese mine(广西平乐锰矿区土壤、植物重金属污染状况与生态恢复研究)[J]. *Mining Safety Environ Protection*(矿业安全与环保), 33(1): 21-23
- Yang ZF(杨再福). 2000. Study on toxicity of copper to tadpoles of toad(铜(Cu²⁺)对中华大蟾蜍蝌蚪的毒性试验)[J]. *Environ Protection Sci*(环境保护科学), 26(101): 37-38
- Zang Y(臧宇), Xue KX(薛开先). 1999. Application and advance in *Vicia faba* root-tip cells micronucleus testing(蚕豆根尖微核试验的应用与发展)[J]. *Carcinogenesis Teratogenesis and Mutagenesis*(癌变畸变突变), 11(3): 158-160