

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20121224001

张建超, 马福俊, 胡建英. 利用 SOS/umu 测试方法鉴定沙颍河河水中的遗传毒性物质 [J]. 生态毒理学报, 2013, 8(3): 344-349

Zhang J C, Ma F J, Hu J Y. SOS/umu test for detection of genotoxins in water of Shaying River [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(3): 344-349 (in Chinese)

利用 SOS/umu 测试方法鉴定沙颍河河水中的遗传毒性物质

张建超¹, 马福俊², 胡建英^{2,*}

1. 山东师范大学生命科学学院 济南 250014
2. 北京大学城市与环境学院 北京 100871

摘要: 采用 HPLC 分割导向的 SOS/umu 测试方法鉴定了沙颍河河水中的遗传毒性物质。当采用 TA1535/pSK1002 菌株测定 HPLC 分割的各馏分时, 如果不经大鼠肝微粒体酶(S9)代谢活化, 只有馏分 F10 显示遗传毒性。加入大鼠肝微粒体酶代谢活化后, 馏分 F10 和馏分 F15 都显示有遗传毒性, 说明河水中存在某些需经过大鼠肝微粒体酶代谢活化才能显示出遗传毒性的物质。当采用过量表达 O-乙酰转移酶(O-AT) 对芳香胺类物质和硝基芳烃化合物有特殊响应的 NM2009 菌株测定时, 馏分 F8、F9 和 F10 均呈现遗传毒性; 特别是对于馏分 F10 用 NM2009 菌株测定的遗传毒性远高于原始菌, 说明这 3 个馏分中都含有芳香胺类或硝基芳烃类物质。

关键词: 地表水; SOS/umu 实验; 遗传毒性; 芳香胺; 硝基芳烃

文章编号: 1673-5897(2013)3-344-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

SOS/umu Test for Detection of Genotoxins in Water of Shaying River

Zhang Jianchao¹, Ma Fujun², Hu Jianying^{2,*}

1. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China
2. College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

Received 24 December 2012 accepted 16 January 2013

Abstract: In the present study, HPLC fractionation directed SOS/umu assay was performed to identify the genotoxic chemicals in Shaying River water samples. After HPLC fractionation, every fraction was tested. Genotoxic activity was observed only in Fraction 10 upon using TA1535/pSK1002 strain without rat liver microsomes (S9) addition, while genotoxic activities were observed in both Fraction 10 and 15 by using same strain with rat liver microsomes addition, indicating that some genotoxins in water samples elicited their genotoxicity under rat liver microsomes metabolic activation. NM2009 strain can over-express O-AT and show specific response to aromatic amines and nitro-aromatic compounds. When NM2009 strain was used to test, the genotoxic activities were detected in Fractions 8, 9 and 10. Especially, the genotoxic activity of Fraction 10 was greater than that when using TA1535/pSK1002 strain to test. These results indicated that the major causative agents of Fraction 8, 9, and 10 should be aromatic amines or nitroarenes.

Keywords: surface water; SOS/umu test; genotoxicity; aromatic amines; nitro-aromatic compounds

收稿日期: 2012-12-24 录用日期: 2013-01-16

基金项目: 科技部 863 项目(2012AA062802)

作者简介: 张建超(1988-), 女, 硕士, 研究方向为食品生物技术, E-mail: ahcomeon@126.com;

* 通讯作者(Corresponding author) E-mail: hujy@urban.pku.edu.cn

水体的安全问题一直受到人们的广泛关注。研究表明,地表水中存在着遗传毒性物质^[1-2],低剂量长期暴露于这些物质会增加人类的患癌风险^[3],因此,解析水环境中遗传毒性成因是进行有效环境管理的基础。

由于水环境中的遗传毒性物质种类繁多,而且其浓度又非常小,因此,仅用化学检测方法较难综合评价水体中的遗传效应。生物检测方法能够检测多种物质共存下的综合毒性效应,在环境领域具有一定范围的应用。特别是以毒性检测为导向的遗传毒性物质的鉴定评价方法(toxicity identification evaluation, TIE)能够更加有效地鉴定环境样品中遗传毒性物质^[2,4-5]。但是除了环境样品本身基质高给痕量物质的鉴定带来难度之外,遗传毒性物质的结构特性各异,作用机制也各不相同,仅仅采用目前常用的遗传毒性生物检测方法如 Ames 实验、微核实验以及 SOS/umu 实验进行物质鉴定依然存在较大难度。

芳香胺和硝基芳烃是两大类重要的遗传毒性物质,对细菌和哺乳动物细胞都具有致突变性^[6-10],芳香胺易诱导人体产生膀胱癌^[11-12]、胃癌、食道癌、肝癌和胰腺癌等癌症^[13],硝基芳烃化合物是一种潜在的致癌物质,可引起肺、肝脏和肾脏的损伤^[14-16]。这些物质均需要 O-乙酰转移酶(O-AT)的代谢才能产生遗传毒性效应。Ames 实验中,O-AT 过量表达的菌株 YG1024、YG1029 已经应用于环境样品的检测;SOS/umu 实验中,O-AT 过量表达的菌株 NM2009 也已经被开发出来并逐渐应用于环境样品的遗传毒性检测中。这些菌株能够特异性地和高灵敏度地检测芳香胺和硝基芳烃这 2 类物质^[17-20]。与 Ames 实验相比,SOS/umu 实验具有所需菌株种类少、操作简单快速等优点,NM2009 在检测水样中的芳香胺类物质及硝基芳烃化合物方面更具优势。

为了研究河南沈丘癌症高发地区的沙颍河河水中的潜在遗传毒性物质,本研究用 HLB 固相萃取柱富集水样中的微量化学物质,HPLC 分割样品后,用生物检测方法测试各馏分的遗传毒性效应。选用了 SOS/umu 测试体系,比较了原菌 TA1535/pSK1002 和 O-AT 过表达的 SOS/umu 菌株 NM2009 的检测结果,探索沙颍河河水中是否存在芳香胺类或硝基芳烃类物质。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验试剂及仪器

色谱纯甲醇、丙酮、正己烷、二氯甲烷和乙腈购自 Fisher Chemical (Fair Lawn, NJ, USA),4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline-1-oxide,4-NQO,纯度

98%,Acros Organics)和 2-氨基蒽(2-aminoanthracene 2-AA,纯度 96%,Acros Organics)用作阳性对照;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO,ACS 级,美国 AMRESCO)为稀释溶剂和阴性对照;十二烷基磺酸钠(SDS);邻硝基酚-β-D-半乳糖苷(O-nitrophenol-β-D-galactopyranoside,ONPG,东京化成);酵母膏提取物(yeast extract,OXIOD);胰蛋白胍(tryptone,OXIOD);BIO-RAD 550 酶标仪;Costar 96 孔酶标板;Minishaker 震荡器。

大鼠肝微粒体酶溶液(S9 溶液)自提:大鼠经苯巴比妥钠和 β-萘黄酮诱导后处死,取肝脏加 KCl 溶液后匀浆、离心。上清即为 S9 溶液,S9 辅助因子:NADH、NADPH 和 G-6-P(购自美国 Sigma),MgCl₂、KCl、Na₂HPO₄和 NaH₂PO₄(购自国药集团化学试剂公司)。

1.2 样品采集与前处理

2011 年 12 月,从河南省沈丘县赵口村的沙颍河中采集 10 L 水样(图 1)。水样经 1.2 μm Whatman GF/C 玻璃纤维纸(Maidstone,UK)过滤后,过 HLB 固相萃取柱(6 mL,500 mg,Waters Oasis,USA),每根 HLB 柱富集 2 L 水,流速为 5~10 mL·min⁻¹。HLB 柱用之前需经 6 mL 正己烷、6 mL 丙酮、6 mL 甲醇和 6 mL 超纯水活化。HLB 柱富集后,用氮气吹干。然后每根 HLB 柱用 20 mL 丙酮洗脱,其中 5 mL 在微弱的氮气流下吹干后用 DMSO 定容到 6.25 μL;剩余的 15 mL 吹干后用甲醇溶解,用于 HPLC 分割。实验空白使用相同方法富集 2 L 超纯水,没有检测到遗传毒性。



图 1 沙颍河流域采样点

Fig. 1 Sampling site from Shaying River

1.3 HPLC 分割

高效液相色谱分割的色谱条件:采用 RP C18 柱(4.6 mm × 250 mm Waters,USA)梯度洗脱,柱温为室温,流速 1 mL·min⁻¹,流动相 A 为乙腈,B 为超纯水。梯度设置如表 1 所示,在 0~36 min 内,每隔 2 min 收集 1 个样品,共分割获得 18 个馏分。分割后的样品用真空冷冻干燥除去溶剂,为了减少冷冻干燥过程中的损失,样品瓶用带有小孔的铝箔封口,尽量减少冷冻干燥的接触面积,并严格控制干燥时间,等干燥完成后立即取出样品。最后,每一馏分用

95 μL DMSO 定容,以待生物测试。

表1 HPLC 分割梯度条件

时间/min	% A (乙腈)	% B (水)	梯度变化曲线
0	2	98	
2	2	98	1
20	30	70	6
30	100	0	6
36	100	0	1
46	2	98	1

注:表中百分比为流动相的体积百分比。

1.4 SOS/umu 实验

选用了 SOS/umu 实验的 2 种菌株:鼠伤寒沙门氏菌的原始菌株 TA1535/pSK1002 和 O-AT 过量表达的 NM2009 菌株。NM2009 菌株对芳香胺类物质和硝基芳烃类物质有较强的响应能力。

SOS/umu 测试按文献^[21]所提供的方法,具体操作如下:将冻存的菌液置于含氨苄青霉素和氯霉素的 LB 培养基(1 g NaCl、1 g 酵母膏提取物、2 g 胰蛋白胨溶于 200 mL 超纯水,高压灭菌,放置冷却;在 TA1535/pSK1002 的实验中加最终浓度 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氨苄青霉素, NM2009 的实验中加最终浓度 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氨苄青霉素和最终浓度 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯霉素)中。 30°C 下振荡培养过夜,次日上午将前夜培养的菌液用新鲜的 TGA 培养基(1 g NaCl、1 g D-葡萄糖、2 g 胰蛋白胨溶于 200 mL 超纯水,高压,放置冷却,加氨苄青霉素至最终浓度为 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)稀释 100 倍,用酶标仪测定 595 nm 处的吸光度(A_{595})为 0.05~0.09 左右。 37°C 下振荡培养 1.5 h 进行前培养。然后将 300 μL 前培养菌液与 10 μL 浓缩后的水样混合,按需要添加 S9 溶液。 37°C 下振荡培养 2 h 进行浓缩水样暴露。取 150 μL 培养后的菌液测定 A_{595} ,另取 100 μL 菌液与 900 μL Z-缓冲液($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.4)、 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Mg}\cdot\text{SO}_4$ 、 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 巯基乙醇)、50 μL $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ SDS 和 50 μL 氯仿混合摇匀,再加入 200 μL 的 ONPG 缓冲溶液($6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ONPG、 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 和 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4)。 30°C 下静置 20 min 进行酶促反应。最后加 500 μL 的 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 溶液终止反应,吸取 150 μL 的上清液于 96 孔酶标板中,用酶标仪测定 415 nm (A_{415})和 570 nm (A_{570})波长下的吸光度。

最后 β -半乳糖苷酶诱导活性可由下式获得:

$$\beta\text{-半乳糖苷酶诱导活性}(\text{unit}) = 1000 \times (A_{415} - 1.75 \times A_{570}) / (t \times V \times A_{595})$$

式中 t 表示酶促反应的时间(min), V 表示反应菌液在显色过程中的稀释倍率, A_{595} 、 A_{415} 、 A_{570} 为吸光度值。

A_{595} 表示实验开始时的细菌密度, A_{415} 表示酶与底物反应生成物邻硝基苯酚的含量, A_{570} 表示反应结束产生的颗粒性干扰物。DMSO 做溶剂对照, 4-NQO 和 2-AA 分别做 TA1535/pSK1002 和 NM2009 的阳性对照。 β -半乳糖苷酶诱导活性为对照组 2 倍时则视为阳性。未分割样品采用 2 倍稀释测试 8 个梯度 3 个平行, 分割样品采用 3 倍稀释测试 6 个梯度 3 个平行, 溶剂空白测试 3 个平行。

为了评价所富集水样的遗传毒性强度, 将样品折算为 4-NQO 等当量浓度和 2-AA 等当量浓度来进行评估。根据 4-NQO、2-AA 和样品的剂量效应曲线, 采用以下公式:

$$\text{TEQ}_{4\text{-NQO}}(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) = k_{\text{样}}/k_{4\text{-NQO}}$$

$$\text{TEQ}_{2\text{-AA}}(\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}) = k_{\text{样}}/k_{2\text{-AA}}$$

其中 $k_{\text{样}}$ 、 $k_{4\text{-NQO}}$ 、 $k_{2\text{-AA}}$ 分别表示浓缩水样、4-NQO 和 2-AA 剂量效应曲线中的线性部分的斜率。图 2 展示了阳性对照物质的低浓度线性部分的剂量效应曲线。

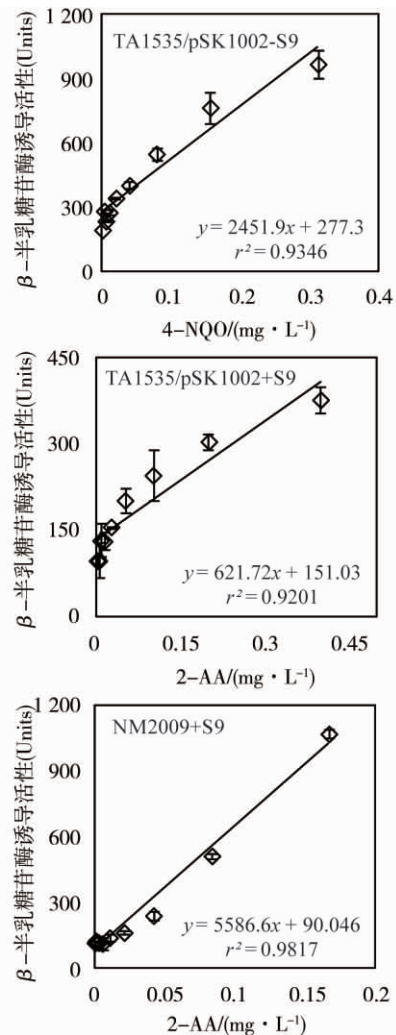


图2 阳性对照物质 4NQO 和 2-AA 的剂量效应曲线
Fig. 2 Dose-response curves of positive controls 4-NQO and 2-AA

2 结果与讨论 (Results and discussion)

图 3 所示为采用 TA1535/pSK1002 菌株(无 S9 溶液代谢)测定 HLB 柱富集后的河水样品的剂量效应曲线。可以看到,当暴露量为 0.00625 ~ 0.2 L 时,β-半乳糖苷酶的活性随暴露水样体积的增加而增加,表现出明显的剂量效应关系,表明水样具有遗传效应。但是当暴露量增加到 0.4 L 之后,随暴露水样的增加,β-半乳糖苷酶诱导活性上升缓慢。实验中观测到,当水样在 0.00625 ~ 0.2 L 范围时, A_{595} 值大约为 0.277,随后, A_{595} 值则随水样的增加而降低,水样为 0.8 L 时, A_{595} 已降低到 0.205,显示出细胞毒性。考虑到可能是河水中复杂的污染物质影响了菌株活性,因此以后的实验中,对样品进行 HPLC 分割,测试各馏分的遗传效应。

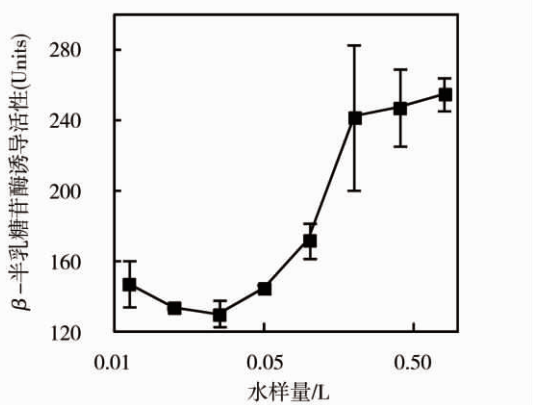


图 3 用 TA1535/pSK1002 菌株测定的水样遗传毒性的剂量效应曲线
注: 水样浓缩倍数为 8×10^4 。

Fig. 3 Dose-response curve of genotoxicity induced by water sample using TA1535/pSK1002 strain

图 4 所示为河水样品进行 HPLC 分割后所获得的每个馏分的活性测试结果。从图 4 可以看出,采用 TA1535/pSK1002 原始菌株和 NM2009 菌株进行 SOS/umu 实验都检测出河水样品分割后的馏分具有遗传毒性效应。TA1535/pSK1002 - S9 测试时,保留时间为 18 ~ 20 min 的馏分 10(F10)表现出遗传毒性,而 TA1535/pSK1002 + S9 测试时,除了 F10 外,馏分 15(F15,保留时间为 28 ~ 30 min)也表现出遗传毒性,说明河水中存在某些需经过 S9 溶液代谢活化才能显示出遗传毒性的物质。

芳香胺和硝基芳烃都可以被 S9 溶液代谢活化^[22-23]。研究表明,在 Cyp1A2 酶的作用下,芳香胺代谢氧化形成 N-羟基胺中间体^[24],然后在乙酰转移

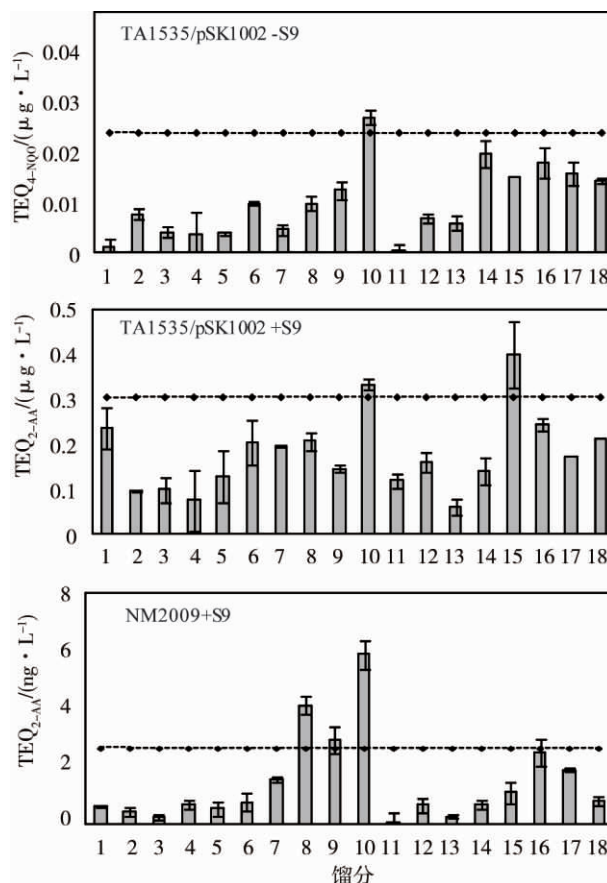


图 4 利用菌株 TA1535/pSK1002 和 NM2009 测定河水的遗传毒性

注: HPLC 分割每 2 min 收集 1 个样品; 河水的浓缩倍数是 8×10^4 ; TA1535/pSK1002 和 NM2009 测得的遗传效应分别用 TEQ_{4-NQO} 和 TEQ_{2-AA} 表示; 虚线表示为对照组 2 倍时所对应的 4-NQO 和 2-AA 的浓度。

Fig. 4 Genotoxicity profiles of water sample using TA1535/pSK1002 and NM2009 strains

酶(AT)的作用下,产生“阳氮离子”(R_2-N^+)攻击 DNA 引起 DNA 损伤而癌变。硝基芳烃化合物的作用机理类似,在硝基还原酶和 O-AT 的作用下形成“阳氮离子”产生遗传毒性^[22]。为探讨沙颍河河水中是否含有芳香胺和硝基芳烃类物质,采用对其有特殊响应的 NM2009 菌株对分割后的水样进行 SOS/umu 测试。结果表明, F8(保留时间为 14 ~ 16 min)、F9(保留时间为 16 ~ 18 min)、F10(保留时间为 18 ~ 20 min)馏分的遗传毒性测试结果都呈现阳性,但是在 TA1535/pSK1002 + S9 测试中呈阳性结果的 F15 并没有表现出遗传毒性,这可能是由于 NM2009 菌株过量表达 O-AT,可以对芳香胺类物质和硝基芳烃化合物表现出较强的响应,但是对其他一些遗传毒性物质的灵敏度低于原始菌株。例如使

用菌株 TA1535/pSK1002 时, $B[\alpha]P$ 的最低响应浓度为 $1.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而使用 NM2009 菌株时, $B[\alpha]P$ 在 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时都没有显现出遗传毒性^[25]。为进一步鉴定河水中的遗传毒性物质, 本研究进一步比较了 F8、F9、F10 和 F15 这 4 个馏分采用 3 种方法测试的剂量效应曲线。

图 5 所示为 F8、F9、F10 和 F15 采用 TA1535/pSK1002 菌株和 NM2009 菌株测得的剂量效应曲线。纵坐标表示水样 β -半乳糖苷酶活性与其溶剂对照的比值。从图中可知, 即使水量达到 0.4 L , A_{595} 值未出现降低, β -半乳糖苷酶活性也呈现出明显上升趋势, 这主要是因为通过 HPLC 样品分割去除了一些共存物质, 降低了高浓度暴露的细胞毒性。从图 5 可知, 采用 TA1535/pSK1002 菌株检测 F8 和 F9 时, 无论是否加 S9 代谢, β -半乳糖苷酶活性都随着暴露水量的增加而增加, 即使水量增加到 0.8 L , 其诱导活性也不到阴性对照的 2 倍, 这 2 个馏分的遗传毒性显示阴性; 但是用 NM2009 检测 F8 和 F9 馏分, 暴露水量从 0.0033 L 增加到 0.8 L 时, F8 的 β -半乳糖苷酶活性从阴性对照的 1.1 倍增加到 2.7 倍, F9

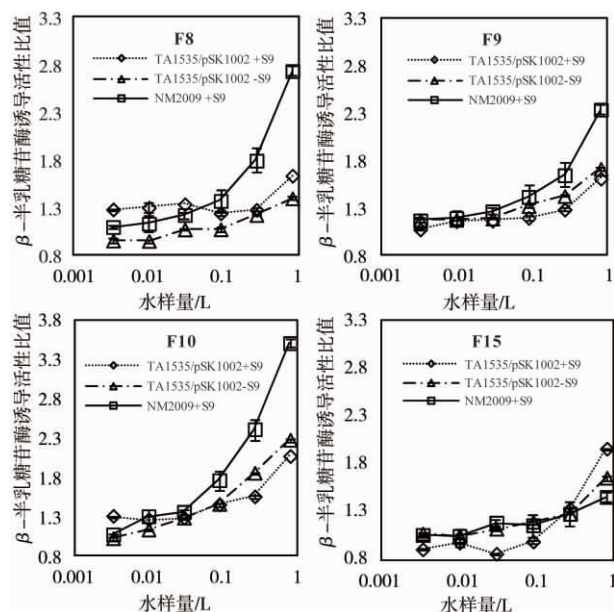


图 5 TA1535/pSK1002 和 NM2009 菌株测定的 HPLC 分割活性馏分遗传毒性的剂量效应曲线

注: F8 代表保留时间为 $14 \sim 16 \text{ min}$ 的馏分; F9 代表保留时间为 $16 \sim 18 \text{ min}$ 的馏分; F10 代表保留时间为 $18 \sim 20 \text{ min}$ 的馏分; F15 代表保留时间为 $28 \sim 30 \text{ min}$ 的馏分。

Fig. 5 Dose-response curves of genotoxicity induced by positive HPLC fractions using TA1535/pSK1002 and NM2009 strains

从 1.16 倍增加到 2.33 倍, 表现出了非常显著的剂量效应关系, 遗传毒性显示阳性, 表明这 2 个馏分中含有芳香胺类或硝基芳烃类遗传毒性物质。当采用 TA1535/pSK1002 原始菌株检测 F10, 不管是否添加 S9, 都显示出遗传效应, 但是 NM2009 菌株测试时活性远高于原始菌, 说明芳香胺类或硝基芳烃类物质是 F10 的主要遗传毒性物质。至于 F15 馏分, TA1535/pSK1002 + S9 测试时, β -半乳糖苷酶活性呈现很好的剂量效应关系, 暴露水量为 0.8 L 时, β -半乳糖苷酶活性是阴性对照的 2 倍, 呈现阳性, 但是用 NM2009 实验时, β -半乳糖苷酶活性仅达到阴性对照的 1.4 倍, 由此判断 F15 中的遗传毒性物质不是芳香胺和硝基芳烃类物质, 需要进一步鉴定。

综上所述, 笔者认为, 河南沈丘癌症高发区的沙颍河水中含有芳香胺或硝基芳烃类遗传毒性物质, 这一信息为该地区水域中的遗传毒性鉴定提供了方法, 为当地癌症高发成因解析提供了基础信息。

通讯作者简介: 胡建英 (1965—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事环境中微量有害化学物质的环境行为研究及化学物质的环境风险评价。

参考文献:

- [1] Ohe T, White P A, DeMarini D M. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America [J]. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental, 2003, 534(1-2): 101-112
- [2] Wang D, Xu Z, Zhao Y, et al. Change of genotoxicity for raw and finished water: Role of purification processes [J]. Chemosphere, 2011, 83(1): 14-20
- [3] Wogan G N, Hecht S S, Felton J S, et al. Environmental and chemical carcinogenesis [J]. Seminars in Cancer Biology, 2004, 14(6): 473-486
- [4] Siddiqui A H, Ahmad M. The Salmonella mutagenicity of industrial, surface and ground water samples of Aligarh region of India [J]. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental, 2003, 541(1-2): 21-29
- [5] Boettcher M, Grund S, Keiter S, et al. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test [J]. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental, 2010, 700(1-2): 11-17
- [6] 戴玄吏, 王晓栋, 黄宏, 等. 应用分子全息 QSAR 技术预测硝基芳烃的遗传毒性 [J]. 环境科学学报,

- 2003, 23(5): 674-678
- Dai X L, Wang X D, Huang H, et al. Predicting the genotoxicity of the nitroaromatics by the molecule hologram QSAR [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2003, 23(5): 674-678 (in Chinese)
- [7] 尹学钧, 李永顺, 刘君卓, 等. 1-硝基茈的远期效应 [J]. *国外医学卫生学分册*, 1990(4): 208-212
- [8] Weisburger J H. Past, present, and future role of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human cancer causation [M]// King C M, Romano J, Schuetzle D. *Carcinogenic and Mutagenic Responses to Aromatic Amines and Nitroarenes*. New York: Elsevier, 1988: 3-19
- [9] Sugimura T. Successful use of short-term tests for academic purposes: Their use in identification of new environmental carcinogens with possible risk for humans [J]. *Mutation Research*, 1988, 205(1-4): 33-39
- [10] Sugimura T. Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan [J]. *Science*, 1986, 233(4761): 312-318
- [11] Schulte P A, Ward E, Boeniger M, et al. Occupational exposure to N-substituted aryl compounds [M]// King C M, Romano J, Schuetzle D. *Carcinogenic and Mutagenic Responses to Aromatic Amines and Nitroarenes*. New York: Elsevier, 1988: 23-25
- [12] Shinka T, Sawada Y, Morimoto S, et al. Clinical study on urothelial tumors of dye workers in Wakayama City [J]. *Journal of Urology*, 1991, 146(6): 1504-1507
- [13] Gangadhar C. Human health perspectives on environmental exposure to benzidine: A review [J]. *Chemosphere*, 1996, 32(2): 267-291
- [14] Tokiwa H, Sera N, Nakashima A, et al. Mutagenic and carcinogenic significance and the possible induction of lung-cancer by nitro aromatic-hydrocarbons in particulate pollutants [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1994, 102(s4): 107-110
- [15] 刘兴宇, 吴建峰, 戴欣, 等. 微生物降解硝基芳烃化合物的物种多样性及其代谢途径 [C]// 热带亚热带微生物资源的遗传多样性与基因发掘利用研讨会论文集, 三亚市, 2005
- [16] 闫秀芬. 硝基芳烃衍生物结构-毒性定量关系和致毒机理的理论研究 [D]. 南京: 南京理工大学, 2007: 1-2
- Yan X L. Theoretical study on the nitroaromatics' QSAR and toxic mechanism [D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2007: 1-2 (in Chinese)
- [17] Nohmi T, Watanabe M, Einisto P, et al. Development of new *Salmonella typhimurium* tester strains highly sensitive to mutagenic nitroarenes and aromatic amines [J]. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental*, 1991, 252(1): 99
- [18] Oda Y, Yamazaki H, Watanabe M, et al. Development of high sensitive umu test system: Rapid detection of genotoxicity of promutagenic aromatic amines by *Salmonella typhimurium* strain NM2009 possessing high O-acetyltransferase activity [J]. *Mutation Research*, 1995, 334(2): 145-156
- [19] Watanabe M, Ishidate M, Nohmi T. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: New derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels [J]. *Mutation Research*, 1990, 234(5): 337-348
- [20] Ohe T. Evaluation of SOS-inducing activity with an O-acetyltransferase-overexpressing strain *Salmonella typhimurium* NM2009 for municipal river water and the identification of 1-nitropyrene [J]. *Water Science and Technology*, 1996, 33(6): 313-320
- [21] 朱舟, 顾炜旻, 安伟, 等. 基于 umu 遗传毒性效应的饮用水致癌风险评价的尝试 [J]. *生态毒理学报*, 2008, 3(4): 363-369
- Zhu Z, Gu W M, An W, et al. Carcinogen risk assessment of drinking water based on genotoxic activities using SOS/umu test [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3(4): 363-369 (in Chinese)
- [22] 钱崇濂. 致癌染料——芳香胺的致癌机理 [J]. *整染技术*, 1996, 18(2): 30-31
- Qian C L. Carcinogenic dyes-carcinogenesis of aromatic amine [J]. *Textile Dyeing and Finishing Journal*, 1996, 18(2): 30-31 (in Chinese)
- [23] 钟金汤. 偶氮染料及其代谢产物的化学结构与毒性关系的回顾与前瞻 [J]. *环境与职业医学*, 2004, 21(1): 58-62
- Chung K T. Review of the mutagenicity, carcinogenicity and autoimmunity of azo dyes and their metabolites from the perspective of their structure-activity relationships [J]. *Journal of Environmental & Occupational Medicine*, 2004, 21(1): 58-62 (in Chinese)
- [24] Guengerich F P, Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 1991, 4(4): 391-407
- [25] Oda Y, Funasaka K, Kitano M, et al. Use of a high-throughput umu-microplate test system for rapid detection of genotoxicity produced by mutagenic carcinogens and airborne particulate matter [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2004, 43(1): 10-19. ◆