

# 模拟真空辐照环境对 Ames 和 SOS 标准菌株的影响

田菁, 庞欣, 党磊, 沈自才, 印红

(中国空间技术研究院 空间生物实验室, 北京 100190)

**摘要:** 利用空间低能综合辐照实验设备对 Ames 标准菌株 TA97, TA98, TA100, TA102 和 SOS 显色反应标准菌株 PQ37 进行真空辐照处理, 研究航天器内真空辐照环境对微生物的影响。通过鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames 试验) 和 SOS 显色法对航天器内的真空辐照环境的致突变作用进行生物学评价。研究结果显示, 模拟航天器的真空辐照环境具有诱变性, 且对微生物的生理代谢有一定的影响。

**关键词:** 模拟空间环境; 空间诱变; Ames 试验; SOS 显色试验

**中图分类号:** Q693      **文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-9242(2011)05-0020-06

## Effects of Simulated Space Radiation and Vacuum Environment on Ames and SOS Standard Strain

TIAN Jing, PANG Xin, DANG Lei, SHEN Zi-cai, YIN Hong

(Space Biology R&D Center, China Academy of Space Technology, Beijing 100190, China)

**Abstract:** Ames Salmonella TA97, TA98, TA100, TA102 and E.coli PQ37 were treated in vacuum and irradiation environment using a space combined low energy irradiation test equipment developed by Beijing Institute of Spacecraft Environmental Engineering. The influence of vacuum and irradiation environment in spaceships on microbe was studied. Back mutation test (Ames test) and SOS chromotest test were carried out on salmonella to evaluate the mutation effect of vacuum and irradiation environment in spaceships. The results of both SOS chromotest and Ames test indicated that spaceship environment can induce mutations and has certain effect on physiological metabolism of microbe.

**Key words:** space environment simulation; mutation effects of spaceship; Ames test; SOS chromotest

太空飞行过程中很多危险是无法避免的, 对于宇航员来说, 威胁最大的莫过于太空辐射。即使处于低地轨道(LEO)上, 各种辐射对健康造成的损害

机率也比地球表面大 50 倍。目前, 辐射在太空飞行过程中并未造成严重的危害, 但随着中国空间站计划的行动日程变得越来越明晰, 空间站中工作的宇

收稿日期: 2011-03-30

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2008AA12A218-14)

作者简介: 田菁(1985-), 女, 北京人, 硕士, 研究方向为空间生物学。

宇航员可能遇到包括中子、电磁辐射(X射线和 $\gamma$ 射线)以及各种带电粒子<sup>[1]</sup>(如质子和其它元素的原子核)的长期威胁。近几年,国内外在空间辐射条件下微生物的生物学效应研究方面取得了一些进展,但仅局限于对诱变机理的假设和推测。由于不同种类、不同品种的微生物遗传学背景本身存在着差异性,空间试验中发现一些菌种的遗传结构受到破坏,而在另一些试验中却没有,很难分析结果不一致的原因,不能确定是空间环境导致的变化还是由误差所致<sup>[2]</sup>。因此,建立一种快速有效的检测方法,使用成熟且具有特异性的标准检测手段研究空间环境的生物学效应是十分重要的。

笔者利用北京卫星环境工程研究所的空间低能综合辐照实验设备模拟航天器内真空辐照环境,选择了2种使用最广泛并完全被了解的短期生物鉴定方法——Ames沙门氏菌测试方法和SOS显色法,作为研究宇宙辐射、真空环境对微生物和微生物生理代谢影响的手段。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 材料

1) 试验菌株:TA97, TA98, TA100, TA102, 这4个标准突变型菌株由中国人民解放军军事医学科学院馈赠,菌种特性经鉴定符合要求;PQ37标准菌株由EBPI公司提供。

2) 主要试剂:4-氮氧化喹啉(4NQO)。

### 1.2 实验装置

实验装置:空间低能综合辐照实验设备、MUTA-CHROMOPLATETM试剂盒(以下简称试剂盒)、干燥箱、玻璃器皿、酶标仪等。

### 1.3 试验菌株的真空辐照处理

由于真空低能综合辐照实验设备只能对干燥的样品进行试验,因此将增菌后的TA97, TA98, TA100, TA102这4个标准突变型菌株和PQ37标准菌株的菌液分别涂在35 mm的培养皿上,干燥后放入空间低能综合辐照实验设备中进行真空电子辐照试验。数小时后回收,将试验后平板上的菌液收回,

进行液体扩增。辐射通量为 $1.8 \times 10^{14} \text{ e}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 和 $3.6 \times 10^{14} \text{ e}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ ,辐照时间为数小时,本剂量模拟航天器舱内的辐照强度。

## 1.4 试验方法

### 1.4.1 Ames 致突变试验

参照Ames等1983年修订的方法<sup>[3]</sup>进行试验。用试剂盒对回收菌液进行Ames回复突变检测。由于不清楚真空辐照环境会对菌株产生何种突变效应,因此选用TA97, TA98, TA100, TA102这4个标准突变型菌株进行试验。其中,TA97和TA98可检测各种移码型诱变剂;TA100可检测引起碱基对置换的诱变剂;TA102能检测出其他测试菌株不能检测出或极少检测出的某些诱变剂。

### 1.4.2 SOS 显色试验

参照Quillardet等<sup>[4]</sup>报道的方法进行试验,用试剂盒对回收菌液进行SOS显色反应试验。为了使显色反应的试验结果更加明显,增加试验成功的可能性,需要将待测菌液进行倍比稀释。辐照菌液和空白对照均使用 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的4-氮氧化喹啉2倍倍比稀释。

#### 1.4.2.1 加样方法

1) 空白对照:将 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的4-氮氧化喹啉溶液 $10 \mu\text{L}$ 加入到96孔板中第1列的每个孔中。

2) 从第2列开始加入稀释后的待测样品。稀释倍数分别为1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16和1:32,用 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的4-氮氧化喹啉溶液对待测样品分别按照以上比例进行倍比稀释。

3) 96孔板的布局见表1。

#### 1.4.2.2 结果分析

终止反应后吸取各指管中反应液于96孔板中,在酶标仪上测定吸光度,按公式(1)求R值,根据R值的大小判断样品中污染物有无生物遗传毒性和遗传毒性的强弱。

$$R = A(m)_{420} / A(0)_{420} \quad (1)$$

式中: $A(m)_{420}$ 是样品浓度为 $m$ 时在波长420 nm处测得的吸光值; $A(0)_{420}$ 是样品浓度为0时在波长420 nm处测得的吸光值。

### 1.4.3 模拟辐照菌株生理生化检测

#### 1.4.3.1 温度突变试验

将模拟辐照后的TA97, TA98, TA100, TA102和

表1 PQ37菌株SOS显色反应中96孔板的布局设计

Table 1 96 microplate layout in SOS-chromotest of PQ37

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	空白对照	对照组	对照组	试验组	试验组	试验组	2倍剂量	2倍剂量	2倍剂量	试验组		
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	10	1:8	1:8	1:8	1:8	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	-
C	-	10	1:8	1:8	1:8	1:8	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	-
D	-	5	1:16	1:16	1:16	1:16	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	-
E	-	5	1:16	1:16	1:16	1:16	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	-
F	-	2.5	1:32	1:32	1:32	1:32	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	-
G	-	2.5	1:32	1:32	1:32	1:32	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:1.空白对照组中所加溶液是质量浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 的4-NQO溶液,10 mL;2.第3—6列、8—11列中的数据表示菌液和4-NQO的体积比。

PQ37菌株培养菌液以及对照菌株在4, 10, 15, 20, 25, 30, 33, 37, 40, 45, 47, 50, 52  $^{\circ}\text{C}$ 下进行培养,观察细菌的生长情况。

#### 1.4.3.2 耐酸碱突变试验

配制不同pH值的液体培养基,分别接种模拟辐照后的TA97, TA98, TA100, TA102和PQ37培养菌液和对照菌株。pH值设为2.50, 3.90, 4.90, 5.90, 6.50, 6.80, 7.60, 8.40, 9.20, 10.10。

#### 1.4.3.3 耐盐度试验

配制不同盐度(质量浓度,后同)的平板培养基,分别将模拟辐照后的TA97, TA98, TA100, TA102和PQ37菌液以及对照菌液涂布在平板培养基上。盐度设置为10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 g/L。

## 2 试验结果

### 2.1 Ames致突变试验结果

结果显示:在非代谢活化(-S9)的条件下,2种通量 $1.8 \times 10^{14} \text{ e}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 和 $3.6 \times 10^{14} \text{ e}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 下的辐照可使TA97, TA98, TA100, TA102这4个标准突变型菌株的回复突变远远超过自发回复突变的2倍,而对照组的回复突变小于自发回复突变。由此可见,真空环境下的低能电子辐照可使TA97和TA98产生移码型突变,引起TA100碱基对置换突变,并且还存在着其他的诱变作用使TA102发生突变。

### 2.2 SOS显色反应试验结果与分析

对照组菌株PQ37均未由黄色变为蓝色,说明对

照组菌株没有发生SOS反应。从试验结果还可看出2倍通量 $3.6 \times 10^{14} \text{ e}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 真空电子辐照后,因辐照剂量太大引起PQ37菌死亡,也未显现出蓝色的阳性结果,可见电子辐射的剂量超过了PQ37的致死剂量,引起了菌体的死亡。1倍通量 $1.8 \times 10^{14} \text{ e}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 真空电子辐照试验结果呈现出清晰的蓝色,说明电子辐射启动了PQ37的SOS修复反应。

SOS显色试验与Ames试验对模拟真空辐照环境的检测结果基本一致。SOS显色试验诱导因子R值与菌液剂量反应关系见表2。R值显色对PQ37菌株的遗传毒性随菌液浓度下降而下降,其趋势均可判定为强阳性反应。

表2 PQ37菌株SOS显色反应的遗传毒性结果

Table 2 Results of genotoxic activity of PQ37 in SOS-chromotest

菌液浓度	SOS显色试验诱导因子R	遗传毒性
1:1	6.32	强阳性反应
1:2	4.46	强阳性反应
1:4	3.81	强阳性反应
1:8	2.78	强阳性反应

注:菌液浓度为菌液和4-NQO体积比。

### 2.3 模拟辐照菌株生理生化检测

模拟辐照菌株生理生化检测结果见表3—表5。表3—表5中:“+”代表生长;“++”代表生长良好;“-”代表不生长;TA97, TA98, TA100, TA102和PQ37是对照菌株;TA97.1, TA98.1, TA100.1, TA102.1和PQ37.1是1倍辐照菌株;TA97.2, TA98.2, TA100.2, TA102.2是2倍辐照菌株。

表3 不同温度下对照组和实验组的生长情况

Table 3 Microbe growth of the control group and the experiment group under different temperature

菌株	温度/℃												
	4	10	15	20	25	30	33	37	40	45	47	50	52
TA97	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	-	-
TA97.1	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	-
TA97.2	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	-	-
TA98	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	-	-
TA98.1	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+
TA98.2	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	-
TA100	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	-	-
TA100.1	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	-
TA100.2	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	-
TA102	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	-	-
TA102.1	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+
TA102.2	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+
PQ37	-	-	-	+	+	+	++	++	+	+	-	-	-
PQ37.1	-	-	-	+	+	+	++	++	+	+	-	-	-

表4 不同酸碱度下对照组和实验组的生长情况

Table 4 Microbe growth of the control group and the experiment group under different acidity

菌株	pH											
	2.50	3.90	4.90	5.90	6.50	6.80	7.60	6.80	7.60	8.40	9.20	10.10
TA97	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
TA97.1	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
TA97.2	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
TA98	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
TA98.1	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
TA98.2	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
TA100	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
TA100.1	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
TA100.2	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
TA102	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
TA102.1	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
TA102.2	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
PQ37	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+
PQ37.1	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+

### 2.3.1 温度突变试验结果

温度突变试验显示:在 50 ℃时,TA97,TA98,TA100 和 TA102 1 倍通量下,真空电子辐照实验组可以生长,而对照组不能生长;50 ℃时,TA98,TA100 和 TA102 在 2 倍通量下,真空电子辐照实验组可以生长,而对照组不能生长;52 ℃时,TA98,TA102 在 1 倍通量

下,真空电子辐照实验组可以生长,而对照组不能生长;52 ℃时,TA102 在 2 倍通量下真空电子辐照实验组可生长,但对照组不能生长;PQ37 的辐照组和对照组在 45 ℃以上的环境中均不能生长(见表3)。由此可见,真空电子辐照环境提高了 TA97,TA98,TA100,TA102 对生长温度的耐受能力。

表5 不同盐度下对照组和实验组的生长情况

Table 5 Microbe growth of the control group and the experiment group under different salinity

菌株	盐度/(g·L <sup>-1</sup> )								
	5	10	20	30	40	50	60	70	80
TA97	++	++	++	++	++	++	+	-	-
TA97.1	++	++	++	++	++	+	-	-	-
TA97.2	++	++	++	++	++	+	-	-	-
TA98	++	++	++	++	++	+	+	-	-
TA98.1	++	++	++	++	++	+	-	-	-
TA98.2	++	++	++	++	++	+	-	-	-
TA100	++	++	++	++	++	+	+	-	-
TA100.1	++	++	++	++	++	+	-	-	-
TA100.2	++	++	++	++	++	+	-	-	-
TA102	++	++	++	++	++	++	+	+	-
TA102.1	++	++	++	++	++	++	+	+	-
TA102.2	++	++	++	++	++	++	+	+	-
PQ37	-	-	+	++	++	+	-	-	-
PQ37.1	-	-	+	++	++	+	-	-	-

### 2.3.2 耐酸碱度试验结果

耐酸碱度试验结果表明:TA97,TA98,TA100和TA102的对照组和真空电子辐照实验组在pH为2.50和10.10时均无法生长;无论是对照组还是真空电子辐照实验组在pH为3.90,4.90,5.90,6.50,6.80,7.60,8.40,9.20时均可生长。PQ37的对照组和真空电子辐照实验组在pH为3.9时无法生长,而在3.90,4.90,5.90,6.50,6.80,7.60,8.40,9.20和10.10时可以生长(见表4)。这说明真空电子辐照没有影响TA97,TA98,TA100,TA102和PQ37菌株对酸碱的耐受能力。

### 2.3.3 耐盐度试验结果

耐盐度试验结果表明:TA97,TA98,TA100和TA102的对照组和真空电子辐照实验组在盐度为80g/L的培养基上均无法生长;TA97,TA98,TA100对照组和真空电子辐照实验组在盐度为5,10,20,30,40,50g/L时均可生长;而对照组TA97,TA98,TA100在60g/L时可以生长,但是真空电子辐照实验组无法生长;TA102的对照组和实验组在5,10,20,30,40,50,60,70g/L时均可生长;PQ37的对照组和真空电子辐照实验组在5,10,20,30,40,50g/L时均可生长(见表5)。这说明真空电子辐照影响了TA97,TA98,TA100菌株对盐度的耐受能力,使其耐盐度能力下降。

## 3 结语

试验结果表明,真空辐照环境对TA97,TA98,TA100,TA102和PQ37菌株具有明显的致突变性。根据对不同菌株的特性进一步分析可知,真空环境下的低能电子辐照不仅可使TA97和TA98产生移码型突变,而且引起了TA100碱基对置换突变,还存在其他的诱变作用使TA102发生突变。SOS显色反应的强阳性试验结果肯定了真空辐照空间环境对细胞的致突变作用。由体外诱导实验得出的诱发细菌的突变与由动物或流行病学研究得出的致癌能力之间有很大的联系——癌变的体细胞突变学说,它指出DNA损伤是致癌的第一步<sup>[5-10]</sup>。

TA97,TA98,TA100,TA102和PQ37生理生化检测结果说明,真空电子辐照环境使菌株对温度的耐受能力提高,而对盐度的耐受能力下降。具体是哪些基因变化导致以上结果目前还不能确定,虽然短期生物试验阐述了诱导DNA损伤的机制,但是尚未探明宇宙辐射和DNA的关系,因此需要进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 沈羨云,唐承革.为星际飞行扫清障碍——NASA对宇宙

- 辐射的研究试验[J]. 航空知识, 2006(11):74.
- [2] TOWNES C H. Infectious Disease in Manned Spaceflight—probabilities and Countermeasures[M]. Washington D C: Space Science Board of the National Academy of Sciences, 1970:86.
- [3] MARON D M, AMES B N. Revised Methods for the Salmonella Muta-genicity Test [J]. Mutation Res, 1983 (113) : 173—215.
- [4] QUILLARDET P. The SOS Chromotest, A Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins: Procedures [J]. Mutation Res, 1985(147):65—78.
- [5] BRIDGES Bryna. Short Term Screening Tests for Carcinogens[J]. Nature, 1976(261): 195—200.
- [6] HOLLSTEIN M, MCCANN J, ANGELOSANTO F A, et al. Short-term Tests for Carcinogens and Mutagens [J]. Mutat Res, 1979(65): 133—226.
- [7] MONTESANO R, BARTSCH H, TOMATIS L, et al. Molecular and Cellular Aspects of Carcinogen Screening Tests [M]. France Lyon: IARC Scientific Publications, 1980: 324—330.
- [8] MOHN G R. Bacterial Systems for Carcinogenicity Testing [J]. Mutat Res, 1981(87):191—210.
- [9] MCCANN J, AMES BN. Origins of Human Cancer[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1977: 1431—1450.
- [10] MILLER E C. Mechanism of Chemical Carcinogenesis[J]. Cancer, 1981(47):1055—1064.

(上接第7页)

表面略有金属光泽,且表面出现很多点蚀坑;当溶液 pH 值为 10 时,试样表面会出现褐色腐蚀产物,当去除腐蚀产物后,试样表面也无金属光泽,呈现白色;当溶液 pH 值为 12 时,在挂片中试样表面出现一层深褐色泥状腐蚀产物,试样表面被均匀减薄。主要原因是铝为两性金属,在酸性和碱性溶液中均为可溶性。在中性溶液中,合金表面会形成  $\text{Al}(\text{OH})_3$  钝化膜,该钝化膜由于其低的溶解度而稳定,在侵蚀性介质中可以保护合金进一步免受腐蚀。在酸性溶液中,  $\text{Al}^{3+}$  的溶解会促进 Al 基体的溶解,进一步加速 Cl<sup>-</sup> 的侵蚀。同样, Al 基体在中性和碱性溶液中的腐蚀机制也可以用  $\text{Al}(\text{OH})_3$  保护膜的形成来解释。由于碱性溶液具有高的 OH<sup>-</sup> 浓度,氧化膜会因为化学溶解而导致均匀减薄。在强酸、强碱溶液中为全面均匀溶解腐蚀,在弱酸、弱碱、中性溶液中会由于 Cl<sup>-</sup> 的存在而出现点蚀<sup>[6]</sup>。

### 3 结论

1) 5083 铝合金中的夹杂物主要有 3 种类型,分别为 (Cr, Mn, Fe)Al<sub>6</sub>, Mg<sub>2</sub>Si 和 β 相 Mg<sub>5</sub>Al<sub>8</sub>。

2) 在去气条件下的极化试验中,5083 铝合金在不同 pH 值条件下 3%NaCl 溶液中的点蚀电位比较接近,为 -0.74~-0.76 V。在强碱性 3%NaCl 溶液中的阳极电流密度最大,自腐蚀电位最负,可达到 -1.35 V;

在中性及弱酸、弱碱性溶液中的阳极电流密度比较接近,自腐蚀电位为 -1.03 V 左右。

3) 在质量损失试验中,5083 铝合金在强酸、强碱溶液中由于发生了全面腐蚀溶解,其腐蚀质量损失较大,而在偏中性溶液中,由于发生局部点蚀,其腐蚀质量损失较低。

### 参考文献:

- [1] 蒙多尔福. 铝合金的性能与组织[M]. 王祝堂,张振录,郑璇,等译. 北京:冶金工业出版社,1988:36.
- [2] HOSIN Zuber, EL-HOU A D, EL-SHAWESH F. A Study on the Corrosion Behavior of Aluminum Alloys in Seawater [J]. Materials & Design, 2008, 29(4): 801—805
- [3] 王洪仁,吴建华,王均涛,等. 5083 铝合金在海水中的腐蚀电化学行为及活性氯影响研究[J]. 电化学, 2003, 9(1):60—65.
- [4] KIRVL A Yasakau, MIKHAIL L Zheludkevich, SVIATLANA V, et al. Role of Intermetallic Phases in Localized Corrosion of AA5083[J]. Electro Chimica Acta, 2007 52(27): 761—765.
- [5] 彭文才,侯健,郭为民,等. 温度和溶解氧对 5083 铝合金海水腐蚀性的影响[J]. 装备环境工程, 2010, 7(3): 22—26.
- [6] ZAID B, SAIDE D, BENZAID A, et al. Effects of pH and Chloride Concentration on Pitting Corrosion of AA6061 Aluminum Alloy[J]. Corrosion Science, 2008, 50(7): 1841—1847.