

台灣南部地區的環境污染物致突變性之調查

蔣連財 張瑞烽 葉丙炎 曾銘豐 孫岩章*

應用愛姆氏試驗法(Ames test)分析台灣南部地區環境污染物 34 件樣品，經過重覆檢驗三次，以便了解台灣南部地區環境污染物中致突變性物質之分佈情形。

三次檢驗之平均陽性反應率，分別為廢水樣品有 45.2%，污泥樣品有 56.3%，廢氣排煙收集樣品有 58.3%；全部樣品在三次檢驗中有兩次以上呈陽性反應者佔 52.94%；五種標準檢定菌株（沙門氏桿菌）在三次檢驗中之平均陽性反應率以 TA 100 最高，其次依序為 TA 102，TA 104，TA98 及 TA97a 等菌株。

Key words: environmental pollutants, mutagens, Ames test

(Kaohsiung J Med Sci 2: 304-309, 1986)

隨著科技之發展，環境中之污染物也急速增加，不論是水、土壤、或空氣，均遭受到日益嚴重之污染。近年來已開發國家，早就發現環境污染之嚴重性，因此不斷謀求改善對策。

最近幾年來國內的科技工業也突飛猛進，因此造成有關公害問題的不斷發生。一般中毒傷害容易查覺，因此偏重於急性中毒之防治。如果公害會引起人類遺傳基因之傷害，則可能會導致遺傳病、先天畸形、或誘生癌症⁽¹⁾。而根據統計的分析可知癌症，它一直高居先進國家十大死亡原因之前數名。至於國內的醫學報導，在最近二十年間，癌症也一直高居第一或第二名⁽²⁾，如此高程度的死亡率是否與環境污染有很大的關係，是相當值得研究之問題。

爲了能早期查覺化學物質之致突變性，在 1971 年愛姆氏研究出愛姆氏試驗法 (Ames test)⁽³⁾，此方法經過十幾年來不斷改進及測試，依然不差於近年來其他新方法。它具有節省時間及費用等優點^(4,5)，因此本實驗採用其中之濾

紙片點測法 (spot test)，來分析台灣南部地區環境污染物之致突變性，同時了解其分佈情況，以便將來作為環境保護及公害防治之參考。

材料與方法

一、環境污染物樣品：

主要的樣本是採自台灣南部地區，其中廢水樣品包括三個石化工業區（樣品 1~6）、一個合成橡膠廠（樣品 7，8）、一個煉油廠（樣品 9，10）、後勁溪沿線之三個點（樣品 11~13）及一個紙漿廠之放流口（樣品 14）等 14 件；而污泥樣品有貯煤場附近魚池底泥（樣品 15~18）、水源底泥（樣品 19~22）、三個石化工業區（樣品 23~26，30）、一個合成橡膠廠（樣品 27，28）及灣裡廢五金燃燒後灰燼（樣品 29）等 16 件；廢氣及排煙收集樣品是來自路邊汽機車排煙（樣品 31，32）、一個合成橡膠廠內（樣品 33）及一個煉油廠內（樣品 34）等 4 件。

高雄醫學院 微生物學科
行政院衛生署環境保護局*



三標準檢定菌種：

本實驗採用鼠傷寒桿菌LT2 (*Salmonella typhimurium* LT2) 之五種突變菌株，其編號為TA 97a、TA 98、TA100、TA102 及TA104 等菌株，以上菌株均為愛姆氏所贈送的。

三培養基及培養方法：

培養一般檢驗用菌株時，是使用營養肉湯 (Oxoid nutrient broth no. 2)。但作愛姆氏試驗時，底層培養基用 Vogel-Bonner E 培養基⁽⁶⁾，而頂層培養基要填加組氨酸 (histidine) 及維辛素 (biotin) 之半固體培養基 (含 0.6% agar)。當進行愛姆氏試驗之前，先把含有菌種的營養肉湯在 37°C 恒溫器振盪 (210 rpm)，並培養 12~14 小時。而作愛姆氏試驗時，培養皿要放在 37°C 恒溫箱中培養兩天後檢查試驗結果^(4,7)。

四環境污染物樣品之處理：

廢水樣品測定其固形物含量，然後取原液先用濾紙 (Toyo no. 2) 過濾，過濾液再用孔徑 0.45 μm 之無菌過濾膜過濾之，然後把無菌過濾液放在 4°C 冰箱中保存；污泥樣品則取一公克污泥加15毫升蒸餾水浸兩天，接著振盪混合後用濾紙過濾，再以過濾法取得樣品，然後放在 4°C 冰箱中保存，但其中合成橡膠廠廢棄物需要用 95% 酒精來取代蒸餾水⁽⁴⁾；排煙收集樣品乃根據收集24小時之標準方法來採集之⁽⁸⁾，其進行步驟是使用玻璃纖維濾紙 (Whatman EPM 1000, 20.3 × 25.4 cm)，每分鐘過濾25公升氣體，連續收集24小時。然後將此玻璃纖維濾紙浸在10毫升蒸餾水兩天，振盪混合後再用過濾法來過濾，接著把樣本放在 4°C 冰箱中保存。當進行愛姆氏試驗時

，上述無菌樣品均分別稀釋成 10 倍、100 倍及 1000 倍，然後放入無菌濾紙片 (Difco, concentration disks, ¼")。所有樣品均重複檢驗三次，而且每次均作三重覆 (triplicate) 的檢查。

三標準突變劑：

菌株 TA97a 用 cumene hydroperoxide，TA 98 用 sodium meta - arsenite，TA 102 用 methyl methanesulfonate，TA 104 用 crotonaldehyde 等標準突變劑^(4,9)。上述藥品均為 Merck 廠牌的產品。

六檢驗結果之判讀：

每培養皿中均分別含無菌標準突變劑 (陽性對照組) 及無菌蒸餾水和 95% 酒精 (陰性對照組) 作為判讀標準。只有標準突變劑呈陽性反應，同時無菌蒸餾水和酒精呈陰性反應之培養皿才判讀之。一般陽性反應者會沿著濾紙片四周長出細菌菌落⁽⁷⁾。

結 果

一廢水樣品的致突變率：

十四件廢水樣品在第一次及第二次檢驗時，均各有一半樣品呈陽性反應，而第三次檢驗有 5 件呈陽性反應，經過統計後三次平均之陽性檢出率為 45.2% (表 1)。三次檢驗中有兩次呈陽性反應者有 6 件，三次檢驗只有一次呈陽性反應者有 7 件，而三次檢驗均呈陰性反應者只有 1 件 (表 2)；五種標準檢定菌株之陽性反應率以 TA 102 及 TA 100 菌株為最高 (表 3)。

二污泥樣品的致突變率：

Table 1. Positive Rates of All Specimens

Specimens	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Mean
Sewages (14*)	50.00 (7/14)	50.00 (7/14)	35.70 (5/14)	45.24 (19/42)
Sludges (16)	62.50 (10/16)	62.50 (10/16)	43.80 (7/16)	56.27 (27/48)
Air pollutants (4)	25.00 (1/4)	75.00 (3/4)	75.00 (3/4)	58.33 (7/12)
Total (34)	52.94 (18/34)	58.82 (20/34)	44.12 (15/34)	51.96 (53/102)

* Total number of specimens



十六件污泥樣品在第一次及第二次檢驗時，均各有10種樣品呈陽性反應，而第三次只有7種呈陽性反應，經過統計後三次平均之陽性檢出率為56.3%（表1）；三次檢驗均呈陽性反應者有3種，三次檢驗中有兩次呈陽性反應者有6種，三次檢驗中只有一次呈陽性反應者也有6種，而三次重複檢驗均呈陰性反應者只有1種（表2）。五種標準檢定菌株之陽性檢出率以TA100、TA102及TA104等菌株為最高（表3）。

三廢氣排煙收集樣品的致突變率：

四件廢氣排煙收集樣品在第一次檢驗時只有1種呈陽性反應，而第二次及第三次檢驗時，均各有3種呈陽性反應，經過統計後三次平均之陽性檢出率為58.3%（表1）；三次檢驗中有兩次呈陽性反應者有3件，而三次檢驗中

只有一次呈陽性反應者有1件（表2）；五種標準檢定菌株之陽性反應率以TA102，TA100及TA104等菌株為最高（表3）。

四全部樣品的致突變率：

全部34件樣品在重複檢驗三次時，三次之陽性反應率分別為52.94%，58.82%及44.12%，因此三次平均之陽性檢出率為51.96%（表1）；重複檢驗三次均呈陽性反應者佔8.82%，只有兩次呈陽性反應者佔44.12%，只有一次呈陽性反應者佔41.18%，而三次均呈陰性反應者只佔5.88%（表2）；五種標準檢定菌株之陽性檢出率，依序為TA100，TA102，TA104，TA98及TA97a（表3）；另外根據表4很明顯表示出全部樣品中，絕大部分均呈致突變陽性反應，只是反應有強弱之差別而已，反應最強者有3件樣品，在重複三次檢驗

Table 2. Reproducibility of All Specimens

Positive frequency	Sewages (14*)	Sludges (16)	Air pollutants (4)	Mean (34)
3/3	0.0	18.8 (3/16)	0	8.82 (3/34)
2/3	42.9 (6/14)	37.5 (6/16)	75 (3/4)	44.12 (15/34)
1/3	50.0 (7/14)	37.5 (6/16)	25 (1/4)	41.18 (14/34)
0/3	7.1 (1/14)	6.3 (1/16)	0	5.88 (2/34)
Total	100.0 (14/14)	100.0 (16/16)	100 (4/4)	100.00 (34/34)

* Total number of specimens

Table 3. Positive Rates of Tester Strains

Specimens	Tester Strains (TA series**)					Goodness of Fit	
	TA97a	TA98	TA100	TA102	TA104	χ ²	p***
Sewages (14*)	8.7 (2/23)	8.7 (2/23)	30.4 (7/23)	34.8 (8/23)	17.4 (4/23)	15.22	0.01
Sludges (16)	4.7 (2/43)	9.3 (4/43)	34.9 (15/43)	25.6 (11/43)	25.6 (11/43)	18.80	0.001
Air pollutants (4)	8.3 (1/12)	8.3 (1/12)	25.0 (3/12)	33.3 (4/12)	25.0 (3/12)	14.12	0.01
Mean	6.41 (5/78)	8.97 (7/78)	32.05 (25/78)	29.49 (23/78)	23.08 (18/78)	16.02	0.01

* Total number of specimens

** Tester strains were histidine-requiring mutants of *Salmonella typhimurium* LT-2

*** Probabilities were smaller than the critical value in the table (degree of freedom: 4)



Table 4. Positive Frequency of Environmental Pollutants in Different Sources

Sources	Specimens	Positive Frequency			
		3/3	2/3	1/3	0/3
Petrochemistry	Sewage (6*)	0	2	3	1
	Sludge (5)	0	2	2	1
Rubber works	Sewage (2)	0	1	1	0
	Sludge (2)	1	0	1	0
Oil refinery	Air (1)	0	1	0	0
	Sewage (2)	0	2	0	0
	Air (1)	0	0	1	0
Coal pile	Sludge (4)	1	1	2	0
Water source	Sludge (4)	1	2	1	0
Paper mill	Sewage (1)	0	0	1	0
Hojin river	Sewage (3)	0	1	2	0
Vehicular exhaust	Air (2)	0	2	0	0
Ashes of metallic waste	Sludge (1)	0	1	0	0
Total	(34)	3	15	14	2

* Total number of specimens

中均呈陽性反應，另外很有意義的是其中有兩件樣品經過多次檢驗均呈陰性反應，其分別為石化工業區之廢水及污泥各一件。

討 論

廢水、污泥及廢氣排煙等 34 件樣品之平均致突變陽性率有 51.96%，其分別為廢水樣品有 45.2%，污泥樣品有 56.3%，及廢氣排煙樣品有 58.3%（表 1）。由以上的結果顯示廢水樣品中致突變成分比較少，這可能是廢水原液內固形致突變物含量比較少的關係。

由表 2 可知重覆檢驗三次均呈陽性反應者佔 8.82%，有兩次呈陽性反應者佔 44.12%，只有一次呈陽性反應者佔 41.18%，而三次檢驗均呈陰性反應者佔 5.88%，由此可顯示本實驗在台灣南部地區所採取之環境污染物大部分均含有致突變物，其中有兩次以上呈陽性反應者佔 52.94%。

愛姆氏試驗用檢定菌株均為不同突變種，只有特殊突變物能夠作用於原先突變位置使它恢復原來基因功能時，檢定菌株才能生長，也就是呈致突變陽性反應，因此不同檢定菌株在於檢定不同性質之突變物⁽⁴⁾。本實驗五種標準檢定菌株重覆三次檢驗 34 件樣品，均顯示 TA

100、TA 102 及 TA 104 菌株之陽性反應率最高，在統計學上有顯著性的意義 ($p < 0.01$)，因此顯示南台灣環境污染物中致突變性成分以置換性(substitution)、羥基化(alkylating)、交叉連結性(cross-linking)、醛類(aldehydes)及氫過氧化物(hydroperoxide)等致突變物為最常見⁽⁴⁾。而國外的報告認為菌株 TA 98 及 TA 100 之陽性反應率最高⁽¹⁰⁾，與本實驗結果有些差異，可能是南台灣環境污染物中致突變物之種類、含量或比例與外國者不同所造成的。

本實驗採用愛姆氏點測法，而所有樣品均未使用大白鼠肝臟抽出物 S-9 來活化處理，因此只能測定突變物之分佈情形。而前突變物(promutagen)必須有 S-9 中酵素活化為突變物之後才能測出其致突變活性⁽¹¹⁾，因此前突變物之分佈情形則有待將來之探討。

由於動物之化學致癌物(carcinogen)進行愛姆氏檢定時，有 83~90% 呈陽性致突變反應^(4, 12)，所以目前大多認為化學致癌物大部分有致突變活性，相反的，突變劑也大部分有致癌之可能性⁽¹⁾。本實驗初步篩檢三次的結果，有 94% 呈一次以上之致突變陽性反應，但是反應有強弱之差異，雖然只測致突變活性，其中可能也包含了有致癌活性的成分在內。

台灣地區之十大死亡原因中，癌症在民國 41 年為第 8 位，到民國 56 年已昇高到第 2 位，而且從此以後一直停在第一或第二位⁽²⁾。台灣近二十年來科技工業突飛猛進，工業廢物也急速增加，而本實驗初步篩檢結果，顯示半數環境污染物有致突變物存在，而且致突變物大部分有致癌可能性⁽¹⁾。因此台灣近二十年來癌症一直高居十大死亡原因之冠，恐怕與環境污染物中致突變成分之存在不無關連，至於其相關性，則有待將來更進一步來研究探討。

參考文獻

1. Nagao M, Sugimura T: Environmental mutagens and carcinogens. *Ann Rev Genet* 12: 117-159, 1978.
2. 中華民國七十三年衛生統計(→公務統計)。(行政院衛生署、台灣省衛生處、台北市衛生局、高雄市衛生局)。行政院衛生署，台北市，62-77，1985。
3. Ames BN: The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: *Chemical mutagens: Principles and methods for their detection*. Vol. I (Hollaender A. ed.), Plenum, New York, 267-282, 1971.
4. Maron DM, Ames BN: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215, 1983.
5. Brusick D, Kilbey BJ, Bartsch H, Malling HV, Natarajan AT, Rosenkranz HS, Russell LB, Choneich J, Vogel E, Wassom JS, Ashby J, Ehling UH, Kada T, Obe G, Searle AG, Zimmermann FK: Recommendations for development of a genetic screening program. *Mutat. Res* 114: 117-177, 1983.
6. Vogel HJ, Bonner DM: Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. *J Biol Chem* 218: 97-106, 1956.
7. Ames BN, Kammen HO, Yamasaki E: Hair dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 2423-2427, 1975.
8. Teranishi K, Hamada K, Watanabe H: Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* mutants of the benzene-soluble organic matter derived from air-borne particulate matter and its five fractions. *Mutat Res* 56: 273-280, 1978.
9. Yu HS, Sheu HM, Ko SS, Chiang LC, Chien SH, Lin SM, Tserng BR, Chen CS: Studies on blackfoot disease and chronic arsenism in southern Taiwan. *J Dermatol* 11: 361-370, 1984.
10. Plewa MJ, Hopke PK: Mutagenicity of municipal sewage sludge. In: *Carcinogens and mutagens in the environment*. Vol. III. naturally occurring compounds. (Stich HF ed.), CRC Press, Florida. 155-175, 1983.
11. Ong TM, Mukhtar M, Wolf CR, Zeiger E: Differential effects of cytochrome p450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *J Environ Pathol Toxicol* 4: 55-65, 1980.
12. McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN: Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 5135-5139, 1975.



PRELIMINARY SURVEY OF MUTAGENIC SUBSTANCES IN ENVIRONMENTAL POLLUTANTS FROM THE SOUTHERN TAIWAN

LIEN-CHAI CHIANG, SHUI-FENG CHANG, BING-YAN YEH
MING-FENG CHENG and EN-JANG SUN*

The Ames' spot test was used to detect mutagens and carcinogens that might be present in our environment. Thirty-four samples of sewage, sludge and air particulate pollutants were collected from the southern Taiwan area. Three repeated experiments indicated that the positive rate for sewages was 45.2%, while the positive rates for sludges and air particulate pollutants were 56.3% and

58.3% respectively. The five standard tester strains of *Salmonella typhimurium* LT2 used in these experiments varied in their positive rates. TA 100 strain showed the highest positive rate. The order of the other four bacterial strains in terms of their positive rates was TA 102, TA 104, TA 98 and TA 97a strains.

Department of Microbiology, Kaohsiung Medical College, Kaohsiung City 80708, Taiwan, Republic of China.

*Bureau of Environmental Protection, Department of Health, Executive Yuan, Republic of China.

