

文章编号: 1000-0615(2003)06-0575-07

臭氧对草鱼鱼种超氧化物歧化酶和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响

马广智, 徐军, 方展强, 唐玫

(华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631)

摘要: 采用控制分配气量的方法, 定量地研究了臭氧暴露对草鱼鱼种鳃、肝组织超氧化物歧化酶(SOD)和鳃、肝、肾组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响, 并且研究臭氧分解生成的氧气对草鱼相应组织酶活性的影响。结果表明, 低剂量($0.14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)臭氧处理, 短时间内(6h)鳃和肝组织的 SOD 活性提高显著($P < 0.01$), 但随着处理时间的延长明显下降($P < 0.05$); 高剂量($0.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)臭氧处理 SOD 活性明显受抑制, 并随着时间的延长而增强。低剂量($0.14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)臭氧处理, 短时间(6h)内对鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性有显著性降低作用($P < 0.05$), 但对肝和肾组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性没有影响; 高剂量($0.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和较长时间(72h)臭氧暴露对鳃、肝和肾组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性均有显著性抑制作用, 且随着浓度的升高和时间的延长而抑制增强的趋势。鳃组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 SOD 对臭氧显得更为敏感。

关键词: 草鱼; 臭氧; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S942

文献标识码: A

Effects of ozone on the activities of superoxide dismutase and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in *Ctenopharyngodon idellus* fingerling

MA Guang-zhi, XU Jun, FANG Zhan-qiang, TANG Mei

(College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: The effects of ozone on the superoxide dismutase (SOD) activity of the gill and liver tissues, and the effects of ozone exposure on the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of the gill, liver and kidney tissues in grass garp (*Ctenopharyngodon idellus*) fingerling were investigated with the method of controlling the speed of ozone flow. Effects of oxygen from the ozone decomposition on the homologous enzymes were studied too. The result indicated that low concentrations ($0.14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) of ozone exposure resulted in the fact that the SOD activity of liver and gill tissues was significantly improved ($P < 0.01$), and then the SOD activity of liver and gill tissues was significantly decreased ($P < 0.05$) as the time increased. However, at high ozone concentrations ($0.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $0.45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and long time ozone exposure, the SOD activity of gill and liver tissues was decreased very significantly. The higher the concentration of ozone or the longer the exposure time was, the more the enzymic activity was decreased. It also showed that low concentrations ($0.14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) of ozone exposure resulted in the fact that the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of gill tissue was very significantly decreased ($P < 0.05$), and

收稿日期: 2002-12-31

资助项目: 广东省高教厅攻关课题(600264)

作者简介: 马广智(1959-), 男, 安徽临泉人, 副教授, 博士, 从事动物学研究。Tel: 020-85212374, E-mail: magzh@scnu.edu.cn

that of the liver and kidney tissue was unaffected. The higher the concentration ($0.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) of ozone or the longer the exposure time (72h) was, the more the enzymic activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ was decreased. The $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and SOD activity of the gill tissue was more susceptible to ozone.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; ozone; superoxide dismutase (SOD)

臭氧 (ozone) 作为一种良好的水质净化消毒剂, 在水产养殖中已得到成功的应用^[1], 并有广泛的应用前景, 但当水体中残留臭氧超过一定浓度则有毒害作用^[2], 目前尚不清楚臭氧对鱼类的毒害机理, 也缺乏臭氧对鱼类毒性的安全评价标准。本文研究不同浓度的臭氧水对草鱼鳃、肝、肾组织超氧化物歧化酶 (SOD) 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响, 探讨臭氧对鱼类的毒害机理和臭氧毒性的酶学参考标准。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及驯养

实验以草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 鱼种为材料, 鱼体外观健壮, 全长 $7.11 \pm 1.10 \text{ cm}$, 体重 $7.30 \pm 1.50 \text{ g}$, 购自南海市鱼苗场。将草鱼鱼种移入实验室的水族箱 ($51 \text{ cm} \times 38 \text{ cm} \times 32 \text{ cm}$) 中, 驯养 1 周后进行实验, 两天换水 1 次, 每次换水 $2/3$ 。水源为充分曝气的自来水, 水温为 $12 \pm 2^\circ \text{C}$, $\text{pH} = 6.8$, 水硬度为 2.4 度 (德国度)。

1.2 实验分组及处理

进行急性毒性致死实验的草鱼鱼种分 7 组, 分别为对照组、氧气组和 5 个臭氧处理组; 进行酶活性测定的实验鱼共分 5 组, 分别为 1 个空白对照组、1 个纯氧气组、3 个臭氧处理组。每组实验均设平行组。臭氧发生器为清华大学臭氧技术开发中心的产品, 工作条件为: 电流 200 mA , 气流量 $0.1 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, 气压 0.041 MPa , 氧气瓶作为气源。臭氧处理装置如图 1 所示。

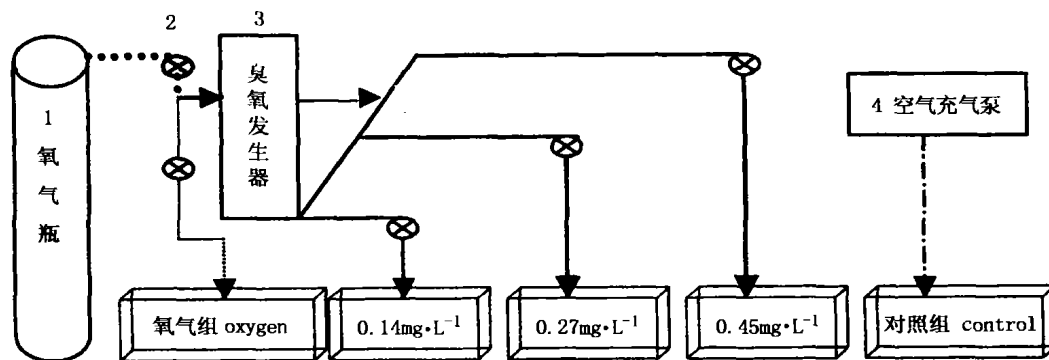


图 1 臭氧毒性实验设计

Fig. 1 Schematic illustration of toxicity test of ozone

1. 氧气瓶; 2. 弹簧夹; 3. 臭氧发生器; 4. 空气充气泵

1. Oxygen bottle; 2. Pinchcock; 3. Ozone generators; 4. Air charge pump

将臭氧发生器出气管分出若干细管, 通过调整通入水族箱的细管数量及弹簧夹来控制水中臭氧浓度。待各水箱中氧气和臭氧质量浓度稳定后, 测定对照组中的溶氧质量浓度为 $7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 氧气组和 3 个臭氧组中溶氧质量浓度为 $22.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 3 个臭氧组的臭氧质量浓度分别是 0.14 , 0.27 , $0.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 向每个水族箱放草鱼鱼种 25 尾, 分别在实验开始后 6h、12h、24h 和 72h 从各组中取出 5 尾草鱼鱼种, 用 MS-222 (traine methansulphorate, Sandoz) 进行麻醉, 取鳃、肝、肾组织冷藏于 -40°C 冰柜以备测定超氧化物歧化酶和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性。水中臭氧质量浓度测定方法及计算采用碘量法^[3,4], 溶氧量使用 Model 15775 溶氧仪 (YSI 公司) 测定。

1.3 酶液制备及活性测定

1.3.1 SOD 酶液制备及活性测定

分别取鳃和肝组织,加入适量预冷匀浆介质,用电动匀浆器在冰浴条件下进行匀浆,匀浆液进行冷冻离心($10000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 15min,上清液即为酶液。匀浆介质为 $\text{pH}6.8$, $0.02\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液。SOD 活性测定方法参照邹国林等^[5]方法,酶蛋白含量采用 Folin-Phenol 试剂测定^[6]。酶活性单位定义为:每毫升反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量定义为 1 个酶活性单位。

1.3.2 $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶液制备及活性测定

分别取鳃、肝和肾组织,用同上方法匀浆,匀浆液冷冻离心($3000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)15min,取上清液测定 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性,匀浆液含有:蔗糖 $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、EDTA $1.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Tris $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.0$ 。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性测定参照 Paxton 等^[7]方法。酶活性单位定义为:每毫克蛋白质每小时分解产生每微摩尔的无机磷的量为 1 个酶活性单位。

1.4 数据处理与分析

不同处理组数据间的差异性采用 Student's-t 检验法进行分析, $P < 0.05$ 被认为存在显著性差异; $P < 0.01$ 被认为存在极显著性差异。

2 结果

2.1 臭氧对草鱼鱼种的半致死浓度(LC_{50})

由臭氧对鱼种的急性中毒取得的实验数据,采用概率单位法(probit method)可求得臭氧对草鱼鱼种的半致死浓度(LC_{50})为 $24\text{h } \text{LC}_{50} = 0.653\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $48\text{h } \text{LC}_{50} = 0.173\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。安全浓度($48\text{h } \text{LC}_{50} \times 0.1$)为 $0.17\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 臭氧对草鱼鱼种鳃组织 SOD 活性的影响

表 1 为臭氧对草鱼鱼种鳃组织 SOD 活性影响的实验结果。可见,单纯氧气处理时,草鱼鳃组织 SOD 的活性明显提高,并随着时间的延长一直保持较高水平。低剂量臭氧处理($0.14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),短时间内(6h)鳃组织的 SOD 活性提高极显著($P < 0.01$),明显高于纯氧组,但随着处理时间的延长开始下降,72h 时已显著低于对照组($P < 0.05$);较高剂量臭氧处理组($0.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)SOD 活性则显著下降,并随着时间的延长而呈下降趋势。 $0.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组在 72h 后实验鱼死亡。

表 1 臭氧对草鱼鱼种鳃组织 SOD 活性的影响

Tab.1 The effect of ozone on the SOD activity of grass carp fingerling gill tissues

臭氧浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) O_3 concentration	酶活力($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) protein enzymes activity			
	6h	12h	24h	72h
对照组 control	1.85 ± 0.30	1.81 ± 0.26	1.83 ± 0.20	1.77 ± 0.25
氧气组 oxygen	$2.23 \pm 0.34^*$	$2.22 \pm 0.40^*$	$2.20 \pm 0.38^*$	$2.24 \pm 0.36^{**}$
0.14	$2.74 \pm 0.39^{**}$	1.93 ± 0.17	$1.46 \pm 0.18^{**}$	$1.19 \pm 0.16^{**}$
0.27	$1.29 \pm 0.24^{**}$	$1.16 \pm 0.14^{*1}$	$1.03 \pm 0.17^{**}$	-
0.45	$0.93 \pm 0.23^{**}$	$0.53 \pm 0.08^{*2}$	$0.68 \pm 0.23^{*2}$	-

注: * 与对照组相比较 $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 1. 与氧气组相比较 $P < 0.05$; 2. $P < 0.01$; 平均数 \pm 标准差, $n = 10$

Notes: * Compared with control group $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 1. Compared with oxygen group $P < 0.05$; 2. $P < 0.01$; values are expressed as mean \pm SD of 10 observations

2.3 臭氧对草鱼鱼种肝组织 SOD 活性的影响

表 2 为臭氧对草鱼鱼种肝组织 SOD 活性影响的实验结果。从实验结果看出,与对照组相比,氧气

对鱼种肝组织 SOD 活性影响并不明显 ($P > 0.05$)。结果表明,与对照组相比,低浓度 ($0.14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 臭氧暴露组在 6h 鱼种肝组织 SOD 活性提高极显著,但随着时间的延长而逐渐降低,24h 后明显低于对照组和氧气组.较高剂量臭氧处理组 ($0.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 肝组织 SOD 活性明显低于对照组和氧气组,并随暴露时间的延长其 SOD 活性也明显降低。 $0.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组在 72h 后实验鱼死亡。由此可见,肝组织中的 SOD 活性受臭氧影响的变化趋势类似于鳃组织中的变化趋势,即低剂量 ($0.14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 臭氧暴露在短时间 (6h) 内刺激肝和鳃组织中 SOD 活性提高,随后在 12 h 以后又迅速下降。此外可见,草鱼肝组织中单位质量的蛋白质 SOD 活性明显高于鳃组织中的酶活性 ($P < 0.05$)。

表 2 臭氧对草鱼鱼种肝组织 SOD 活性的影响

Tab. 2 The effect of ozone on the SOD activity of grass carp fingerling liver tissues

臭氧浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) O ₃ concentration	酶活力 ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) protein/enzymes activity			
	6h	12h	24h	72h
对照组 control	18.2±1.3	18.0±1.6	18.0±1.5	18.2±1.6
氧气组 oxygen	18.9±1.4	18.9±1.4	19.3±1.0	18.5±1.5
0.14	20.9±2.4 ^{**1}	17.5±0.9 ¹	16.5±1.3 ²	15.2±1.4 ^{**2}
0.27	17.3±0.9 ^{*2}	16.3±1.0 ^{*2}	14.3±1.2 ^{**2}	-
0.45	16.3±1.0 ^{*2}	14.1±0.9 ^{*2}	11.8±1.1 ^{*2}	-

注:同表 1

Notes: the same as notes of Tab. 1

2.4 臭氧处理对草鱼鱼种鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响

表 3 为臭氧对草鱼鱼种鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性影响的实验结果。结果表明,纯氧处理对草鱼鱼种鳃组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性没有明显的影响 ($P > 0.05$),说明氧气含量对草鱼体内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性影响不大.而各种不同浓度组 (从低剂量 $0.14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 到高剂量 $0.45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 臭氧处理对鳃组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性则有十分明显的影响,表 3 的数据显示,各浓度组随着时间的延长而 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性逐渐降低 ($P < 0.01$),并显示随处理浓度的增加鳃组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性也显著地下降 ($P < 0.01$)。同时显示 $0.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组在 72h 后实验鱼死亡。

表 3 臭氧对草鱼鱼种鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响Tab.3 The effect of ozone on the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of grass carp fingerling gill tissues

臭氧浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) O ₃ concentration	酶活力 ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) protein/enzymes activity			
	6h	12h	24h	72h
对照组 control	0.45±0.08	0.44±0.09	0.45±0.10	0.44±0.11
氧气组 oxygen	0.46±0.13	0.48±0.09	0.47±0.09	0.46±0.11
0.14	0.33±0.10 ^{**}	0.23±0.092 ^{**1}	0.21±0.08 ^{**2}	0.10±0.03 ^{**2}
0.27	0.25±0.07 ^{**2}	0.15±0.08 ^{**2}	0.10±0.05 ^{**2}	-
0.45	0.17±0.04 ^{**2}	0.11±0.04 ^{**2}	0.07±0.02 ^{**2}	-

注:同表 1

Notes: the same as notes of Tab. 1

2.5 臭氧处理对草鱼鱼种肝组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响

表 4 为臭氧对草鱼鱼种肝组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性影响的实验结果。氧气暴露对肝脏组织中的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性略有提高,但其影响不明显 ($P > 0.05$)。低剂量 ($0.14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 臭氧处理时,肝脏 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性在 6h 仅略微提高 ($P > 0.05$),而在 24h 下降则明显 ($P < 0.01$)。较高剂量 ($0.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 臭氧处理时,肝脏 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性随时间延长显著下降 ($P < 0.01$),但 $0.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组在 72h 后实验鱼死亡。

表4 臭氧对草鱼鱼种肝组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响Tab.4 The effect of ozone on the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of grass carp fingerling liver tissues

臭氧浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) O_3 concentration	酶活力 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) enzymes activity			
	6h	12h	24h	72h
对照组 control	0.35 ± 0.08	0.35 ± 0.10	0.36 ± 0.08	0.36 ± 0.10
氧气组 oxygen	0.40 ± 0.13	0.41 ± 0.10	0.41 ± 0.09	0.41 ± 0.10
0.14	0.36 ± 0.09	0.33 ± 0.06^1	$0.24 \pm 0.11^{*2}$	$0.11 \pm 0.03^{*2}$
0.27	$0.23 \pm 0.10^{*2}$	$0.19 \pm 0.06^{*2}$	$0.12 \pm 0.05^{*2}$	-
0.45	$0.19 \pm 0.06^{*2}$	$0.15 \pm 0.05^{*2}$	$0.11 \pm 0.05^{*2}$	-

注:同表1

Notes: the same as notes of Tab.1

2.6 臭氧处理对草鱼鱼种肾组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响

表5为臭氧对草鱼鱼种肾组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性影响的实验结果。结果表明,氧气对肾组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性影响不明显 ($P > 0.05$)。臭氧暴露组低剂量 ($0.14 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 短时间 (6h) 内对肾组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性没有明显的变化 ($P > 0.05$), 但随着处理时间的延长, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性显著下降 ($P < 0.01$)。实验数据表明, 肾组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性随着臭氧剂量增加而明显降低 ($P < 0.01$)。但 $0.27 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.45 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组在 72h 后实验鱼死亡。 $0.27 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.45 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组在 72h 后实验鱼死亡。

表5 臭氧对草鱼鱼种肾组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响Tab.5 The effect of ozone on the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of grass carp fingerling kidney tissues

臭氧浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) O_3 concentration	酶活力 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) enzymes activity			
	6h	12h	24h	72h
对照组 control	0.99 ± 0.14	0.99 ± 0.13	0.99 ± 0.09	0.99 ± 0.09
氧气组 oxygen	1.05 ± 0.13	1.05 ± 0.10	1.04 ± 0.16	1.04 ± 0.10
0.14	0.91 ± 0.11^1	$0.62 \pm 0.09^{*2}$	$0.33 \pm 0.10^{*2}$	$0.17 \pm 0.06^{*2}$
0.27	$0.56 \pm 0.13^{*2}$	$0.31 \pm 0.08^{*2}$	$0.21 \pm 0.04^{*2}$	-
0.45	$0.31 \pm 0.11^{*2}$	$0.21 \pm 0.08^{*2}$	$0.18 \pm 0.06^{*2}$	-

注:同表1

Notes: the same as the notes of Tab.1

3 讨论

3.1 草鱼鱼种对臭氧的中毒症状

臭氧对草鱼鱼种急性中毒的实验结果表明,随着臭氧浓度增高和暴露时间延长,鱼种死亡率均呈上升趋势。当浓度在 $0.1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时,24h~96h 各浓度臭氧暴露组中鱼种的死亡率均较低;当浓度高于 $0.218 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,各臭氧暴露组 24h~96h 的死亡率显著提高。实验鱼对臭氧的安全浓度为 $0.17 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 因此,较低浓度 ($0.14 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 臭氧暴露在 72h 后尚未发现有死亡个体,但对超过安全浓度的臭氧暴露组 ($0.27 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.45 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 实验鱼的观察发现,多数个体在 24h~72h 后出现明显中毒症状,如高浓度组 ($0.45 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 出现异常反应,其游泳的平衡能力下降,有时在水中侧转或打转等,呼吸急促,随后出现呼吸困难,持续到 72h 后所有实验鱼逐渐丧失运动能力,躺卧缸底直至死亡。对中毒鱼体的病理解剖学观察发现,多数个体的鳃其鳃小片上的上皮细胞严重受损,表面覆盖大量白色的粘液。鱼鳃呼吸面上的上皮细胞损伤,导致血浆渗透压迅速降低,破坏呼吸功能是导致中毒个体死亡的主要原因之一。因此,在渔业生产过程中,若使用臭氧作为水体的消毒剂,一定要严格限制在低于安全浓度的范围内,否则将对生物体的健康产生严重影响甚至导致死亡。

3.2 臭氧对鱼类的致毒机理探讨

一般认为臭氧的毒性与其强氧化性有关,强氧化性决定了臭氧消毒具有杀菌广谱性^[8]。臭氧在水

中分解成单原子氧和氧气,发挥强氧化性主要是单原子氧的作用,而氧气是比较稳定的,通常情况下是无毒的。本实验的结果表明,纯氧气处理对草鱼各组织中的 SOD、 $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性有一定的增强作用,而臭氧处理组尽管水体中氧气含量增加,但水体中单原子氧对酶的破坏作用大于氧气的促进作用,表现出不同程度的下降,与 Mustafa^[9]的研究结果相一致。结果显示,暴露于低于安全浓度的臭氧浓度 $0.144 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6h,鱼种鳃、肝组织中 SOD 的活性显著提高,但随着暴露时间的延长, SOD 的活性却又呈现降低的趋势,推测臭氧对草鱼鳃、肝组织中 SOD 活性的影响不仅仅通过其分解产生的氧气而发挥作用,更重要的是通过其分解产生的单原子氧直接对组织中 SOD 产生影响。臭氧对草鱼鳃、肝组织中 SOD 的作用经历了从诱导到抑制的过程。当臭氧浓度为 $0.14 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时(低于其安全浓度),鱼体内氧自由基浓度升高,刺激了 SOD 的合成,表现出鳃和肝组织内 SOD 活性的显著升高。这种现象与 Beaumont 等^[10]所观察的结果相类似,Stebbing^[11]将这种现象称为“毒物兴奋效应”。但测试结果也表明臭氧对 SOD 的诱导时间维持较短,24h 鳃和肝组织内 SOD 活性已显著低于对照组。当臭氧处理剂量增大(远高于其安全浓度)和处理时间延长时,体内 SOD 已不能维持机体抗氧化防御系统的动态平衡, SOD 活力下降,机体受到氧化损伤。

臭氧对鱼体不同组织 SOD 活性影响作用的机理推测如下。在水溶液中臭氧分解成氧气和单原子氧,单原子氧和水反应成超氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$)和羟自由基($\cdot\text{OH}$)。自由基在体内的过量积累可以引起类脂质的过氧化反应,促使 DNA、RNA 突变,导致蛋白质交联,从而破坏细胞正常代谢功能^[12]。此外,臭氧暴露诱导了其体内活性氧生成,并超出了其清除能力。一般来说,在鱼体内活性氧产生和抗氧化系统的酶促反应及非酶反应对活性氧清除之间存在良好的动态平衡,但是随着臭氧暴露时间的延长,鱼体内活性氧累积超过正常水平, SOD 等抗氧化物酶由于底物浓度升高而被诱导,加速生物合成^[13],单位组织内 SOD 增多,从而加速了活性氧清除,有效地阻止了它在体内过多地积累,阻抑了膜脂过氧化,保护了膜系统及相关酶系统。但当暴露时间延长或臭氧浓度远超过安全浓度(如高于 $0.27 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时, SOD 活性又显著下降,这是因为在较强的臭氧胁迫下,鱼体鳃和肝组织细胞中活性氧累积超过一定限度,对其多种功能膜和酶系统产生了破坏,致使组织 SOD 活性下降。这些能清除活性氧的抗氧化系统功能下降,将导致机体内活性氧更迅速累积,从而将大幅度地加剧膜脂过氧化作用,极大破坏膜系统,导致如 ATPase 和消化酶等一些酶活性的降低,使鱼体生命活动代谢失调。

臭氧暴露对鱼组织内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活动有明显地影响。低浓度臭氧处理水(低于安全浓度)仅对草鱼体内鳃组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性在短时间内有显著性的降低作用,而对肝和肾组织的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性却没有明显的影响;但较高浓度(高于安全浓度)的臭氧暴露则对各种组织的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性均有显著的降低作用,并随着暴露时间的延长而加剧。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 是生物膜上的一种蛋白酶,它在物质运输、能量转换、信息传递等方面具有重要的作用。目前已知有许多因素可影响到鳃、肾组织的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性,如 pH、盐度、重金属、温度及有机磷等^[14],其影响 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的机制也较为清楚,但较少见到有关臭氧对鱼类组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性影响的报道。由于臭氧的强氧化性,鱼体组织内细胞的膜成分包括脂质、酶和其它一些必需蛋白对臭氧是敏感的,因此臭氧暴露引起包围在细胞膜蛋白周围的脂质的改变必然导致膜结构和功能的改变。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 是细胞膜脂质双层上的四聚体的镶嵌蛋白,其构象的维持依赖于膜上的磷脂。推测暴露在不同浓度臭氧中不同组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性呈现不同程度的降低的可能原因是:①维持膜构象的磷脂被臭氧或臭氧氧化所产生的自由基所氧化而破坏;②脂质过氧化的产物促使膜蛋白发生交叉相联,细胞膜的结构发生改变;③酶活性所必需的 SH 基团受到氧化,致使酶失活;④酶所必需的其它一些成分受到氧化破坏。因此,联系 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的作用机制来看,以上①和②条使酶蛋白在转运离子的过程中两种构象不能相互转换,使酶失去转运离子或作为离子通道的功能;③和④则使酶蛋白不能很好地与 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 结合,从而也无法完成离子转运的功能,这也是臭氧暴露对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 抑制的主要原因,因为 SH 基团更容易受到臭氧或氧自由基的攻击^[15]。

因此,高浓度(超过安全浓度)、长时间臭氧胁迫下 SOD 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的降低,造成草

鱼鱼种的组织细胞不能进行正常的生命活动是臭氧对草鱼鱼种形成毒害的重要原因之一。

3.3 不同组织对臭氧的敏感性

实验的结果表明,不同组织的 SOD 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性对臭氧暴露的敏感性表现出一定的差异。根据前面的实验结果,按照公式:抑制率 = (对照组酶活性 - 实验组酶活性)/对照组酶活性 $\times 100\%$,可计算出臭氧对草鱼组织中 SOD 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的抑制率。结果表明,草鱼鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性对臭氧最敏感,特别是在相对低剂量($0.14\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)处理中,短时间(6h)对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的抑制率已达到 26.7%,与正常对照组有显著差异,说明鳃组织要比肝和肾更先受到臭氧的毒性作用。臭氧进入鱼体内的主要途径是鳃,通过鳃小片上皮进入血液中,即鳃小片是直接与水中的臭氧相接触的,这使得鳃要先受到臭氧的攻关,而臭氧经血液循环才能到达肝和肾,这一过程就使得臭氧的毒性在受到机体内酶性抗氧化系统(如 SOD、CAT 等)和非酶性抗氧化系统(如 GSH、维生素 E 等)^[16]的作用后有所降低,因而毒性减弱。这与其它一些毒物对鱼的鳃和肾 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的毒性特点有所不同。臭氧对 SOD 活性的影响在鳃和肝脏组织中都表现出从诱导到抑制的过程,但在鳃组织中这种波动最大。从这两种酶活性的变化来看,草鱼鳃组织是最先或最易受到臭氧的伤害。这可能与鳃组织细胞膜最先也最易受到臭氧在水中分解的单原子氧的攻击有关。因此,鳃组织中酶活性可作为衡量臭氧毒性的一个比较理想的指标,臭氧在水产养殖中的安全域值的确定则有待于作进一步的研究。

参考文献:

- [1] Xu J, Ma G Z, Chen X L. The today and future of application of ozone[J]. J South China Normal Univ (Natural Science), 1998(Suppl):127 - 131. [徐军,马广智,陈湘彝. 臭氧在水产养殖中的应用现状及前景[J]. 华南师范大学学报(自然科学版),1998(增刊):127 - 131.]
- [2] Graham L B, Steven T S, Alicia C N, et al. Ozone of a recirculating rainbow trout culture system I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria[J]. Aquac, 1997, 158:43 - 55.
- [3] Hana S. Spectrophotometric method for determination of ozone in aqueous solutions[J]. Water Research Pergamon Press, 1973, 7:729 - 739.
- [4] Kopczynski S L, Bufalini J J. Some observation stoichiometry of iodometric analyses of ozone at pH 7.0[J]. Anal Chem, 1971, 43:1126 - 1127.
- [5] Zou G L, Gui X F, Zhong X L, et al. Improvements in pyrogallol autoxidation method for the determination of SOD activity[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1986, 13(4):71 - 73. [邹国林,桂兴芬,钟晓凌,等. 一种 SOD 的测定方法—邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 13(4):71 - 73.]
- [6] Lower O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Bio Chem, 1951, 193:265 - 275.
- [7] Paxton R, Limiager B L L. Altered activities of branchial and renal Na/K - and Mg -ATPase in cold-acclimated goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1983, 74B(3): 503 - 506.
- [8] Finch G R, Black E K, Laratiuk C W, et al. Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muriscyst* inactivation by ozone[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(14): 3674.
- [9] Mustafa M G. Biochemical basis of ozone toxicity[J]. Free Radical Biol Med, 1990, 9:245 - 260.
- [10] Beaumont A R, Newman P B. Low levels of tributyltin reduce growth of marine microalgae[J]. Mar Pollut Bull, 1986, 17(10):457 - 461.
- [11] Stebbing A R D. Hormesis the stulation of growth by low levels of inhibitions[J]. Sci Tol Envir, 1982, 22(1): 213 - 234.
- [12] Kim K B, Lee B M. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo [J]. Cancer Lett, 1997, 113(1):205 - 212.
- [13] Sharma Y K, Davis K R. Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology, 1994, 105(4):1089 - 1096.
- [14] Kultz D, Somero G. Osmotic and thermal effects on *in situ* ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis* [J]. J Exp Biol, 1995, 198(9): 1883 - 1894.
- [15] Banks M A, Porter D W, Martin W G, et al. Ozone-induced lipid peroxidation and membrane leakage in isolated rat alveolar macrophages; protects of taurine[J]. J Nutri Biochem, 1991, 2(6):308 - 313.
- [16] Peters L D, Livingstone D R. Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot[J]. J Fish Biol, 1996, 49:986 - 997.