

文章编号: 1674-148X(2021)04-0251-05

臭氧水对小鼠急性毒性和蓄积毒性试验

王群¹, 尹春庆¹, 刘艺丹², 王利华¹, 王光¹

(1.青岛农业大学动物科技学院, 山东青岛 266109; 2.荣成市崖头畜牧兽医站, 山东荣成 264300)

摘要:用昆明种小白鼠作为实验动物分别进行急性毒性试验和蓄积毒性试验, 来评价臭氧水的毒性。急性毒性试验采用最大给药法, 试验组取浓度 ≥ 20 mg/kg 的臭氧水按 20 g/kg 体质量限量, 一次灌胃, 观察 14 d 内小鼠的死亡情况, 计算半数致死量(Median Lethal Dose, LD₅₀)。蓄积毒性试验采用剂量递增法, 按体质量计算染毒剂量。处理后 1~4 d 小鼠染毒剂量为 0.1 倍的 LD₅₀, 按 20 g/kg 体质量, 一次灌胃给药, 以后每 4 d 递增 1.5 倍剂量, 直至 20 d。每 4 d 对所有小鼠进行称重, 统计增重和采食量, 并测定小鼠器官指数, 观察胃组织切片。结果表明: 试验期间无小鼠死亡, 臭氧水对小鼠的经口 LD₅₀ 为 20 g/kg 体质量, 根据急性毒性分级, 属实际无毒物质。臭氧水的蓄积系数 K $>$ 5。与灌注纯净水的对照组小鼠相比, 灌注臭氧水对小鼠无任何不良影响。

关键词:昆明小白鼠; 臭氧水; 急性毒性试验; 蓄积毒性试验

中图分类号: S859

文献标识码: A

DOI: 10.3969/J.ISSN.1674-148X.2021.04.004

Acute Toxicity and Accumulative Toxicity Tests of Ozone Water in Mice

WANG Qun¹, YIN Chunqing¹, LIU Yidan², WANG Lihua¹, WANG Guang¹

(1.College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2.Yatou Animal Husbandry and Veterinary Station of Rongcheng City, Rongcheng 264300, China)

Abstract: Kunming mice were used as experimental animals to conduct acute toxicity and accumulative toxicity tests to assess the potential toxicity of ozone water. The acute toxicity test of ozone water was carried out by using maximal dosage administration. The mice in test group were administrated ozone water with a concentration ≥ 20 mg/kg according to 20 g/kg body mass limit. With one stomach gavage, the death of mice within 14 days was observed, and the median lethal dose (Median Lethal Dose, LD₅₀) was calculated. Accumulative toxicity test of ozone water was carried out by dose escalation, and the exposure dose was calculated according to body mass of the mice. The mice were administrated 0.1 LD₅₀ dosages during the first 4 days, and then dosages with 1.5 fold increase every 4 days until 20 days. All mice were weighted every 4 days, and the weight gain and feed intake were counted. Meanwhile, the organ indexes of the mice were measured and the stomach tissue sections were observed. The result showed that no mice died during the test and the oral LD₅₀ of ozone water to mice was 20 g/kg body mass. According to the acute toxicity classification, it is a non-toxic substance. Accumulative test showed that accumulation coefficient was no less than 5. Compared with purified water, ozone water did not have any adverse effects on the mice.

Key words: kunming mice; ozone water; acute toxicity test; accumulative toxicity test

臭氧作为一种高效广谱类的抗菌剂, 其抑菌作用机理是氧化破坏微生物细胞中的重要组成部分, 如细胞壁、细胞膜、线粒体与细胞核等^[1]。含有臭氧

的水溶液叫做臭氧水, 在水中臭氧的半衰期为 20 min^[2]。臭氧水具有较高的杀菌性能, 但是臭氧稳定性差、易分解为氧气, 所以使用臭氧水杀菌时应尽

收稿日期: 2021-01-12

基金项目: 山东省农业产业技术体系特种经济动物创新团队(SDAIT-21-08)

作者简介: 王群(1996—), 女, 山东烟台人, 在读硕士, 研究方向为动物营养与饲料科学。

通信作者: 王光(1970—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为动物营养代谢。E-mail: wangguang1996@163.com

量使用流动臭氧水,能解决臭氧半衰期短、易挥发的问题,从而提高臭氧的利用率^[3]。臭氧在水中能形成羟自由基,仍具有较强的氧化性^[4]。肖彩雯等^[5]研究表明,用 4 mg/L 的臭氧水对串珠菌作用 1 min,杀菌率为 99.86%,对烟曲菌作用 5 min,杀菌率为 99.57%。与臭氧气体相比,臭氧水应用于养殖场更为便捷,不仅可用于环境消毒,也可对畜禽饮水进行消毒。如果用于饮用水消毒,臭氧会残留在水中而被畜禽摄入体内。为了评价高浓度的臭氧水在畜牧生产上的安全性,本试验以昆明小白鼠为实验动物,采用最大给药法经口灌胃进行臭氧水急性毒性试验,采用剂量递增法进行臭氧水的蓄积毒性试验,以确定臭氧水的半数致死量(Median Lethal Dose, LD₅₀)和蓄积系数 K。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与实验动物

臭氧水由青岛欧帝欧环保科技发展有限公司生产并提供机器现场制得,经在线式溶解臭氧浓度检测仪(CL7685,淄博爱迪尔测控技术有限公司)分析,臭氧浓度为 ≥ 20 mg/kg。实验动物为无特定病原体(Specific pathogen Free, SPF)级昆明种小白鼠,购于青岛市即墨区实验动物和动物实验中心,生产许可号为 scxk(鲁)20040001。体质量 18~22 g,雌雄各半,试验期内自由采食、自由饮水(蒸馏水),采用自然光照,室温 26~30℃。鼠粮购自北京科澳协力饲料有限公司,为专用全价日粮。

1.2 试验方法

臭氧水的急性毒性试验采用最大给药法。取小鼠 20 只(雌雄各半)为试验组,灌注臭氧水前小鼠禁食约 12 h,不禁水。试验组取浓度为 ≥ 20 mg/kg 的臭氧水按 20 g/kg 体质量限量,一次灌胃,灌胃后禁食约 2 h 后再正常喂食;另取 10 只小鼠(雌、雄各半)用纯净水替代臭氧水做对照组。观察时间为 14 d,观察记录小鼠的行为活动、精神状态、采食饮水以及中毒和死亡情况。

在半数致死量的测定结果基础上,选用体质量为 18~22 g 昆明种小鼠 30 只,雌、雄各半。其中 20 只小鼠采用剂量递增法进行臭氧水的蓄积毒性试验,按体质量计算染毒剂量。第 1~4 天小鼠染毒剂量为 0.1 LD₅₀,按 20 g/kg 体质量一次灌胃给药,以后每 4 d 递增 1.5 倍剂量,直至 20 d,染毒方案见表 1;另取 10 只小鼠(雌、雄各半)每天按 20 g/kg 体质量灌注纯净水以确定灌注对小鼠的影响。连续染毒

20 d 后,若动物死亡未达半数,染毒累积剂量已达一次 LD₅₀ 的 5.3 倍,即蓄积系数大于 5.0,试验即可结束;若试验期间动物发生半数死亡,则可按表 1 查得相应的染毒累积剂量,并计算累积系数,按累积系数的评价标准评价蓄积毒性。

表 1 剂量递增法染毒方案
Table 1 Dosage escalation scheme

项目 Items	染毒天数/d Poisoning days				
	1~4	5~8	9~12	13~16	17~20
日染毒剂量(LD ₅₀)	0.10	0.15	0.22	0.34	0.50
4 d 累积剂量(LD ₅₀)	0.40	0.60	0.90	1.36	2.00
累积总剂量(LD ₅₀)	0.40	1.00	1.90	3.26	5.26

1.3 检测指标

在急性毒性试验中,观察小鼠中毒症状及出现时间,根据小鼠死亡情况计算半数致死量 LD₅₀。在蓄积毒性试验中,确定蓄积系数 K。每 4 d 对所有小鼠进行称重,统计增重和采食量,试验结束后即第 21 天对小鼠进行屠宰实验,对心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏进行称重,并计算相应的器官指数(器官指数为实验动物某器官质量与其体质量之比)。

取小鼠胃组织相同的部位 2 cm,用生理盐水清洗后放入 10 mL/L 甲醛溶液中进行固定。将已固定好的胃组织经修整、水洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片等步骤后,用苏木精-伊红(HE)进行染色,制成胃组织切片。采用光学显微镜(ae-2000, Nikon, 日本)观察切片。

1.4 数据统计分析

应用 Excel 2007,对数据进行整理与分析,小鼠的体质量、器官指数采用 SAS 9.4 软件中的 MIXED 过程进行方差分析,分析臭氧水、性别两个主效应及二者的互作效应对小鼠生产性能和器官指数的影响,计算最小二乘均数及标准误,检验误差为 5% 水平。

2 结果与分析

2.1 臭氧水的半数致死量

在试验进行的 14 d 内,试验组的小鼠未出现中毒症状,观察期间无小鼠死亡,试验结果见表 2。由此可判定臭氧水对小鼠一次经口 LD₅₀ 为 20 g/kg 体质量,根据 GB15193.3—2014 急性毒性剂量分级表,属实际无毒物质。

表 2 臭氧水对小鼠的急性毒性试验

Table 2 Acute toxicity test of ozone water in mice

组别 Groups	剂量 /(mg/kg) Dosage	数量/只 Number	死亡数量/只 Death number	死亡率/% Mortality
对照组 Control group	0	10	0	0
试验组 Experimental group	20	20	0	0

2.2 臭氧水的蓄积系数

试验观察期间小鼠连续染毒已达到 20 d,此时染毒的总剂量已累计达到 5 倍的 LD₅₀ 以上,小鼠无中毒症状和死亡现象,表明臭氧水的蓄积毒性不明显,因此中止试验。根据蓄积系数分级,判定臭氧水对小鼠蓄积系数 K>5,为弱蓄积性。

2.3 臭氧水灌注对小鼠生长性能的影响

试验组与对照组小鼠的体质量无显著差异 ($P>0.05$),故臭氧水灌注处理对小鼠的体质量没有显著影响 ($P>0.05$)。性别对小鼠体质量影响显著 ($P<0.05$)。第 1 天时,雄鼠与雌鼠的体质量差异不显著,从第 5 天开始,雄鼠的体质量均显著高于雌鼠 ($P<0.05$)。

表 3 各处理组不同时期小鼠体质量的变化

Table 3 The data of body mass of mice in different period in control and ozone water group

单位:g

时间/d Time	组别 Groups		合并标准误 Pooled SEM	性别 Gender		合并标准误 Pooled SEM	P 值 P-value		
	对照组 Control group	试验组 Ozone water group		雌鼠 Female	雄鼠 Mal		$P_{\text{臭氧水}}$ $P_{\text{Ozone water}}$	$P_{\text{性别}}$ P_{Gender}	$P_{\text{臭氧水} \times \text{性别}}$ $P_{\text{Ozone water} \times \text{Gender}}$
D ₁	20.13	19.42	0.25	19.91	19.64	0.26	0.07	0.47	0.60
D ₅	24.85	24.06	0.47	23.58 ^b	25.33 ^a	0.56	0.25	0.02	0.89
D ₉	26.55	25.44	0.51	24.03 ^b	27.96 ^a	0.52	0.14	<0.001	0.43
D ₁₃	28.60	26.96	0.57	25.46 ^b	30.10 ^a	0.57	0.053	<0.001	0.31
D ₁₇	29.02	28.75	0.66	26.18 ^b	31.58 ^a	0.64	0.76	<0.001	0.60
D ₂₁	29.43	28.81	0.68	27.44 ^b	32.69 ^a	0.69	0.53	<0.001	0.61

由图 1 可以看出,雄鼠的采食高于雌鼠,与对照组相比,试验组小鼠的采食量有降低的趋势。

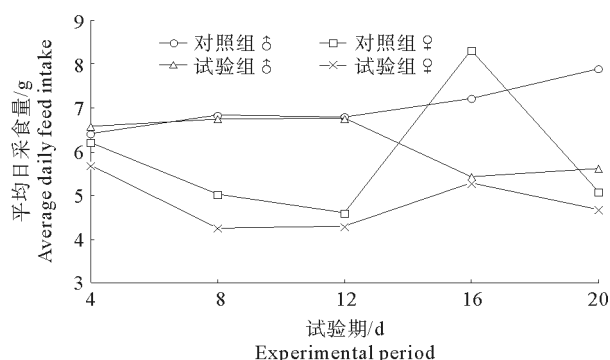


图 1 试验期内各组小鼠的平均日采食量

Fig. 1 Average daily feed intake of mice in control and ozone water group in the experimental period

2.4 臭氧水灌注对小鼠器官指数的影响

小鼠的内脏器官指数见表 4。试验组小鼠的心

脏、肝脏、肺脏和肾脏均未见异常,各器官指数均表现为对照组与试验组差异不显著 ($P>0.05$)。性别对小鼠的体质量、脾脏指数和肾脏指数的影响显著 ($P<0.05$),雄鼠的体质量显著高于雌鼠 ($P<0.05$),脾脏指数显著低于雌鼠 ($P<0.05$),肾脏指数显著高于雌鼠 ($P<0.05$)。灌注臭氧水与性别间的交互效应不显著 ($P>0.05$)。

2.5 臭氧水灌注对小鼠组织学检查的影响

对照组和试验组的小鼠胃组织切片镜检结果分别见图 2 和图 3。检查结果表明,试验组小鼠的胃的黏膜完整,未见有组织学损伤。

3 讨论

3.1 臭氧水半数致死量和蓄积系数

臭氧已广泛用于饮用水的消毒,臭氧水具有强氧化性和抑菌杀菌能力^[6]。赵永强等^[7]发现经 4.5 mg/L 浓度的臭氧水处理 30 min 后的罗非鱼片对

表 4 各组小鼠内脏器官指数

Table 4 Visceral organ indexes of mice in control and ozone water group

项目 Items	组别 Groups		合并标准误 Pooled SEM	性别 Gender		合并标准误 Pooled SEM	P 值 P-value		
	对照组 Control group	试验组 Ozone water group		雌鼠 Female	雄鼠 Male		$P_{\text{臭氧水}}$ $P_{\text{Ozone water}}$	$P_{\text{性别}}$ P_{Gender}	$P_{\text{臭氧水} \times \text{性别}}$ $P_{\text{Ozone water} \times \text{Gender}}$
	体质量/g	29.43	28.63	0.72	26.11 ^b	31.94 ^a	0.77	0.48	<0.001
心脏指数/%	5.02	4.76	0.26	4.85	4.93	0.25	0.47	0.82	0.82
肝脏指数/%	54.73	56.73	1.80	54.69	56.77	1.81	0.45	0.43	0.72
肺脏指数/%	7.83	7.27	0.47	7.86	7.25	0.46	0.40	0.37	0.06
脾脏指数/%	4.26	4.48	0.26	5.29 ^a	3.45 ^b	0.26	0.54	<0.001	0.66
肾脏指数/%	12.75	13.29	0.37	11.19 ^b	14.85 ^a	0.37	0.31	<0.001	0.39

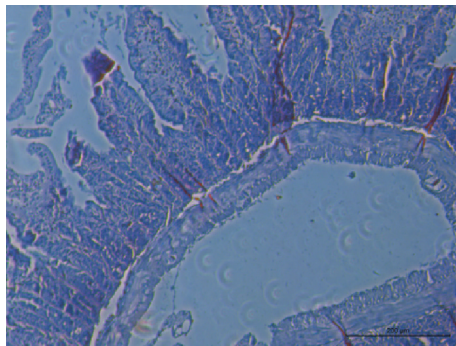


图 2 对照组小鼠胃组织切片(400 倍)

Fig. 2 Gastric tissue sections of mice in control (400 times)

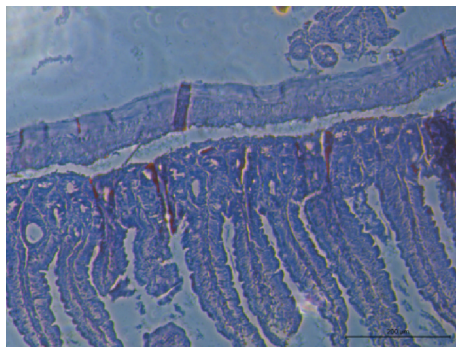


图 3 试验组小鼠胃组织切片(400 倍)

Fig. 3 Gastric tissue sections of mice in ozone water group (400 times)

SD 大鼠经口最大耐受剂量(MTD) >15 g/kg,毒性分级为无毒。张敏等^[8]对含 16 mg/L 的臭氧消毒水进行毒性试验,结果表明 16 mg/L 臭氧消毒剂为实际无毒、弱蓄积性物质,对小鼠骨髓 PCE 亦无诱变作用,对动物皮肤、眼睛和阴道黏膜均无刺激性,使用安全。本试验制得的臭氧水经在线分析系统分析在 20 mg/L 以上,对小鼠的急性毒性试验和蓄积毒

性试验均未发现小白鼠有中毒症状,可以进一步证实臭氧水为实际无毒物质,具有弱蓄积性。

3.2 臭氧水对小鼠生长性能的影响

小鼠存在藏料行为,采食量虽然不能真实反映小鼠食入的饲料量,但与小鼠的生长呈正相关。小鼠的生长性能可以间接反映小鼠的生理状况,理想的生长性能在一定程度上可以说明身体的机能良好。郑云燕等^[9]研究结果显示,10.35~10.95 mg/L 的臭氧水对大鼠急性经口毒性属实际无毒类,大鼠亚急性毒性试验各组动物生长发育良好,体质量增加正常。袁安生等^[10]证明,通过臭氧处理饮用水和饲料等的试验组比没有处理的对照组的雏鸡存活率、饲料利用率以及出栏体质量都有显著的提高。沈林园等^[11]研究发现通过臭氧水处理饮用水后饲喂的鸡,发病现象明显减少,药物投入减少,死淘率降低,提高了经济效益。本试验通过小鼠的体质量和采食量也可以证明灌注臭氧水对小鼠无不良影响。但若想用臭氧水作为畜禽的饮用水以此替代抗生素的作用还需要在畜禽生产上进行试验加以验证。

3.3 臭氧水对小鼠器官指数的影响

内脏器官指数可以初步作为评定内脏器官是否受到损伤的指标。当内脏器官受到损伤会发生炎症反应、坏死或出现水肿,最终表现在重量发生变化。免疫抑制剂可使脾脏重量减轻,一般免疫药理学试验常以脾脏的增重或减重作为衡量其免疫功能强弱的指标^[12]。肾是机体重要的解毒器官,肾功能将直接影响机体解毒机能,岳丽红等^[13]的试验数据为青年组昆明小鼠(体质量为 31.17 g)的肾脏指数为 15.28,而衰老组的肾脏指数为 16.64。由此可以推断,本试验中臭氧水灌注组的小鼠的肾脏较纯净水灌注组更为健康。张永东等^[14]从酶学水平研究了

臭氧对肉鸡的肺毒性,结果显示各臭氧处理组对肺脏均无明显损伤。本试验结果表明纯净水灌注组小鼠的内脏器官指数与臭氧水灌注组之间没有显著差异,说明臭氧水灌注对小鼠无不良影响。李玉冰等^[15]试验发现,臭氧处理 30 min、60 min、120 min,在第 30 天和第 60 天采样小鼠的脏器系数与对照组比较无显著性差异。这与本试验研究结果相一致。

3.4 臭氧水对小鼠组织学检查的影响

在本试验中,未见臭氧水对小鼠的胃造成损伤。这从组织学上进一步证实臭氧水的低毒性。而且臭氧作为一个强大的氧化剂,会立即与胃中大量的离子和生物分子即抗氧化剂、蛋白质、碳水化合物以及多不饱和脂肪酸结合白蛋白反应,从而降低臭氧的含量,同时也会减少臭氧的毒性。

4 结论

臭氧水对小鼠经口 LD₅₀ 为 20 g/kg 体质量,根据急性毒性分级,属实际无毒物质;臭氧水对小鼠蓄积系数 K>5,为弱蓄积性;与纯净水灌注组的小鼠相比,臭氧水灌注对小鼠无任何不良影响。

参考文献:

[1] KHADRE M A, YOUSEF A E, KIM J G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(9): 1242-1252

[2] 谭桂霞,陈焯璞,徐晓萍. 臭氧在气态和水溶液中的分解规律[J]. *上海大学学报(自然科学版)*, 2005(5): 510-512

[3] 孙继英,吴燕燕,杨贤庆,等. 臭氧水对军曹鱼片的减菌效果和品质的影响[J]. *南方水产科学*, 2013, 9(6): 66-71

[4] BRUCHET A, DUGUET J P. Role of oxidants and disinfectants on the removal, masking and generation of tastes and odours [J]. *Water Science and Technology*, 2004, 49(9): 297-306

[5] 肖彩雯,徐深. 臭氧水对真菌杀灭作用的研究[J]. *中国消毒学杂志*, 2004, 21(3): 229-230

[6] 袁成豪,刘永乐,黄铁群,等. 臭氧冰制备技术及其在食品保鲜中的应用研究进展[J]. *食品与机械*, 2019, 35(5): 224-230

[7] 赵永强,杨贤庆,李来好,等. 臭氧减菌化处理罗非鱼片的急性毒性与遗传毒性[J]. *水产学报*, 2014, 38(8): 1182-1189

[8] 张敏,纪晓光,王京燕. 臭氧消毒剂毒性试验观察[J]. *中国消毒学杂志*, 2005(1): 69-70

[9] 郑云燕,蔡德雷,夏勇,等. 臭氧水亚急性毒性试验观察[J]. *中国消毒学杂志*, 2009, 26(2): 144-146

[10] 袁安生,曲连文,满汉义,等. 养殖型臭氧发生器用于无公害肉鸡饲养的效果[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2004, 56(3): 56-57

[11] 沈林园,杜晓惠. 臭氧在养鸡生产中的应用[J]. *中国家禽*, 2011, 33(14): 54-55

[12] 陈德坤,穆杨,伊岚. 免疫学常用实验技术[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2001, 46-47

[13] 岳丽红,程广东,朱德全,等. 西藏灵菇酸奶对人工衰老小鼠肝肾指数的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2009(21): 2767-2769

[14] 张永东,李玉冰,许剑琴. 臭氧对肉鸡的毒性试验[J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47(4): 38-40

[15] 李玉冰,张永东,曹授俊,等. 臭氧对小鼠精子畸形率和睾丸标志酶活性的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2011(5): 142-144

(责任编辑:仇宏伟)

(上接 239 页)

[24] PEDRANZANI H, RODRÍGUEZ-RIVERA M, GUTIÉRREZ M, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates physiology and performance of digitaria erianthaplants subjected to abiotic stresses by modulating antioxidant and jasmonate levels [J]. *Mycorrhiza*, 2016, 26(2): 141-152

[25] 蒋明义,郭绍川. 氧化胁迫下稻苗体内积累的脯氨酸的抗氧化作用[J]. *植物生理学报*, 1997, 23(4): 347-352

[26] 朱虹,祖元刚,王文杰,等. 逆境胁迫条件下脯氨酸对植物生长的影响[J]. *东北林业大学学报*, 2009, 37(4): 86-89

[27] WANG Y, LI X. Salt stress-induced cell reprogramming, cell

fate switch and adaptive plasticity during root hair development in Arabidopsis[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2008, 3(7): 436-438

[28] 王鹏,马玲玲,陈雨,等. 盐胁迫对油菜种子萌发及内源激素含量的影响[J]. *北方园艺*, 2015(3): 12-15

[29] 张丽,罗孝明,蒙辉,等. 盐胁迫下植物激素水平的研究进展[J]. *蔬菜*, 2017(3): 29-32

[30] 贺忠群,李焕秀,汤浩茹,等. 丛枝菌根真菌对 NaCl 胁迫下番茄内源激素的影响[J]. *核农学报*, 2010, 24(5): 1099-1104

(责任编辑:杨德翠)