

铜的形态分布与 *Daphnia magna* 急性毒性关系

刘 清 王子健¹⁾ 汤鸿霄

(中国科学院生态环境研究中心, 国家重点环境水化学实验室, 北京, 100085)

摘 要

本文利用化学平衡模式 MINTEQA2 研究不同酸度、碱度和有机配体存在下铜的形态分布特点, 通过 *Daphnia magna* 毒性试验获得形态变化时的毒性变化规律. 结果显示: 无论是总量 (无机形态总量), 还是游离态浓度, 都不能反映出铜的毒性大小. 为此我们提出用活性态浓度来表征铜的毒性大小, 较好地解释了不同体系中铜的毒性变化规律.

关键词: 铜, 形态分析, *Daphnia magna*, 生物毒性.

考虑重金属的环境效应时, 形态是一个关键因素^[1]. 现行的国家水质标准是建立在总量基础上的, 在许多情况下, 对环境表现为过度保护. 美国环保局曾推荐用溶解金属总量来制定水质基准^[2], 因此, 扣除了对浮游生物影响较小的悬浮物结合态金属, 但这一基准依然未考虑溶解金属的形态效应. 很明显, 建立在总浓度或者溶解量基础上的水质标准都存在不足之处. 因此, 必须研究环境因素对形态分布及生物毒性的影响, 以便在形态与毒性关系的基础上建立更完善的水质标准.

水体中影响金属形态分布的主要因素有酸度、碱度、无机和有机配体等. 许多工作发现生物毒性与游离离子浓度有线性关系, 如 Sunda 和 Lewis^[3]发现铜对藻的毒性因与有机试剂 (Tris) 和溶解有机碳络合而降低, 并且毒性的大小与游离铜离子浓度成正比. Allen 等人^[4]在研究锌对藻的毒性时, 调查了几种稳定常数相差很大的螯合剂对毒性的影响, 发现生长速度的降低与锌的总浓度无关, 而与游离锌离子浓度成正比. 硬度也是影响重金属对水生生物毒性的的重要因素, Ca^{2+} 和金属离子在细胞膜上的竞争吸附可以降低金属的吸收. 在最近保护水生生物的水质标准中, 一些金属的安全浓度已表示为水质硬度的函数^[5].

本文在化学平衡模式 MINTEQA2 形态分布计算基础上, 考察酸度、碱度和有机试剂对铜的形态分布及对 *D. magna* 急性毒性的影响, 分析形态与毒性的关系, 为预测重金属的毒性效应和建立新的水质基准提供理论依据.

1) 通讯联系人

1 实验部分

D. magna 的急性毒性试验在美国环保局推荐的标准稀释水中进行^[6]: $48\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ NaHCO_3 ; $30\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $30\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ MgSO_4 ; $2\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl . 毒性试剂采用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. 所有试剂均为分析纯. 实验温度为 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 光照周期为 16:8, 光强为 2000 lux, 水的硬度保持为 $48\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (以 CaCO_3 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 表示). 如无特殊说明, 试验均在 $\text{pH}=7$ 时进行, 每次 10 只幼蚤, 平行三组, 分别记录 24h 和 48h 的死亡数.

试验结果采用概率单位法进行处理: 先将死亡百分数转换概率单位 (TP), 毒物浓度转换成对数浓度, 再进行线性回归, 求得 LC_{50} (48h) 及相应的回归参数.

2 结果与讨论

2.1 pH 值对铜的形态分布及毒性的影响

当 pH 值变化时, 各形态在总量中所占的百分比如图 1 所示, 其中主要是 Cu^{2+} , $\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{aq})$ 的变化. 随着 pH 值的增加, 游离态急剧降低, 而 $\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{aq})$ 急剧增加. 当 $\text{pH}=5.5$ 时, Cu^{2+} 所占比例为 91.7%; 当 $\text{pH}=8.5$ 时, $\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{aq})$ 为主要形态 (98.0%), 而游离态浓度接近于零.

在不同 pH 的标准稀释水中进行铜对 *D. magna* 的毒性试验, 由概率单位法计算出 LC_{50} 值, 结果如图 2 所示. 随着 pH 值的增加, 以总量 (Cu_t) 表示的 LC_{50} 呈上升趋势, 说明铜的毒性降低; 而以游离态 (Cu_f) 浓度表示 LC_{50} 逐渐降低, 在 pH 为 8 时接近于 0.

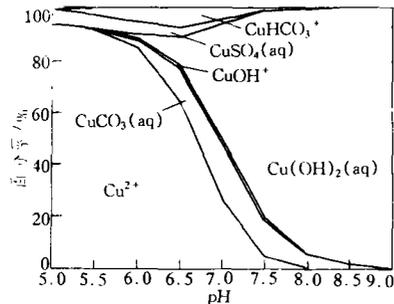


图 1 pH 值对形态分布的影响

Fig. 1 Speciation of copper versus pH

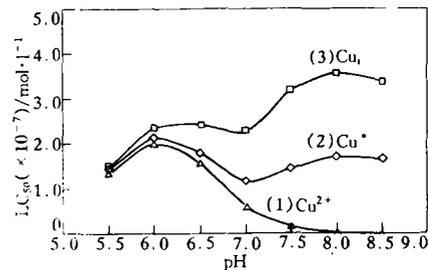


图 2 不同基准表示的 LC_{50} 随 pH 变化

Fig. 2 LC_{50} versus pH

重金属的毒性由其形态分布来决定, 确定其毒性形态对于预测重金属的生物效应具有决定性的意义. Howarth 和 Sprague^[7] 在研究铜对鳟鱼的毒性时指出, Cu^{2+} , CuOH^+ , $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$ 可能是铜的毒性形态; Wageman 和 Barica^[8] 在研究铜对藻类的毒性时, 发现铜的毒性主要由 Cu^{2+} , CuOH^+ , $\text{Cu}_2(\text{OH})_2(\text{aq})$ 引起. 在我们的实验中, 当 $\text{pH} > 7.5$ 时, 铜主要以 $\text{Cu}_2(\text{OH})_2(\text{aq})$ 形式存在, 游离态浓度可以忽略不计. 但溶液毒性依然存在, 因此, 我们认为羟基络合态为毒性形态. 以游离态表示的 LC_{50} 呈下降趋势, 可能是因为没有考

虑羟基络合态的毒性作用；而以总量表示的 LC_{50} 呈上升趋势，可能是因为羟基络合态与游离态毒性大小不同所致。

毒性形态决定着金属的毒性。对应于一定的毒性形态浓度，其毒性效应应该一定；反之，对应于一定的生物效应，毒性形态浓度也应基本不变。如与 50% 死亡率对应的毒性态浓度 LC_{50} 应基本不变。由此可见，在 pH 发生变化时，无论是总量，还是游离态浓度，都不能反映出铜的毒性。pH 变化时，稀释水中未观察到大型蚤死亡，因此，我们忽略 H^+ 的影响，而从形态的角度出发，同时考虑游离态和羟基络合态的毒性，以及它们之间的毒性差异，通过数学拟合定义一活性态浓度：

$$[Cu^*] = [Cu^{2+}] + 0.75[CuOH^+] + 0.70[Cu(OH)_2(aq)]$$

使其表示的 LC_{50} 基本保持不变（图 2），因而较好地反映出了铜的毒性。

2.2 碱度对铜的形态分布及毒性的影响

根据美国环保局建议，实验中由 $NaHCO_3$ 来调节溶液碱度^[9]。在 pH=7 时，各形态所占百分率随碱度变化的结果如图 3 所示。随着碱度（ $NaHCO_3$ 浓度）的增加， $CuCO_3(aq)$ ， $CuHCO_3^+$ 浓度逐渐增加， Cu^{2+} ， $Cu(OH)_2(aq)$ 浓度逐渐降低。碱度变化时，碳酸类络合物形态之间的比例发生变化，而其它形态之间比例不变： $[Cu^{2+}] : [CuOH^+] : [Cu(OH)_2(aq)] : [CuSO_2(aq)] = 1 : 0.084 : 1.69 : 0.053$ 。

将各形态浓度及毒性（TP）进行因子归类分析（图 4），发现六种形态可分为两类：碳酸类络合物为一类，游离态和羟基络合态为另一类，而且与毒性（TP）接近。由此证实碳酸类络合物较少具有毒性特征。因此，在我们定义活性态时可以忽略碳酸类络合物的毒性作用。在不同碱度的标准稀释水中进行铜对 *D. magna* 的毒性试验，由概率单位法计算出 LC_{50} 值，结果如图 5 所示。以总铜浓度表示的 LC_{50} 随碱度的增加而增加，说明铜的毒性随碱度增加而降低。碳酸类络合物较少具有毒性特征。

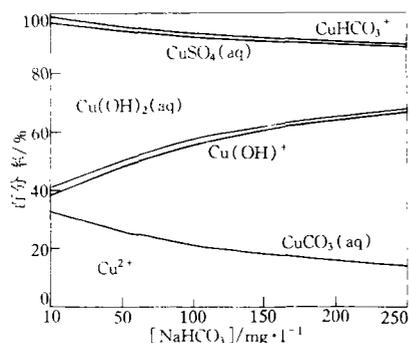


图 3 碱度对铜的形态及毒性的影响

Fig. 3 Speciation and toxicity of copper versus alkalinity

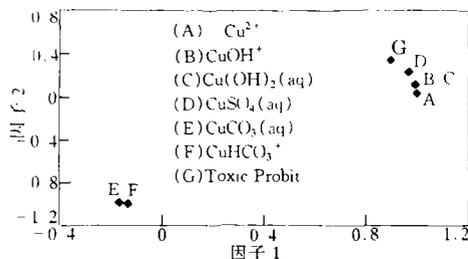


图 4 因子归类分析

Fig. 4 Factor analysis as a classification method for species and toxicity

以活性态浓度表示的 LC_{50} 如图 5 所示，其大小基本保持不变，说明在碱度变化时活性态浓度能较好地反映出铜的毒性。以游离态浓度表示的 LC_{50} 也基本不变（图 5），这是因为游离态和羟基络合态之间比例不随碱度变化而变化。

2.3 EDTA 对铜形态分布及毒性的影响

保持溶液 pH 值为 7, NaHCO_3 浓度为 $48\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 不变, 当 EDTA 加入到标准稀释水中时, 铜的无机形态之间的比例关系不变. 当 $[\text{Cu}_t] : [\text{EDTA}] < 1 : 1$ 时, 铜主要以 CuEDTA 形态存在; 当 $[\text{Cu}_t] : [\text{EDTA}] > 1 : 1$ 之后, $[\text{CuEDTA}]$ 保持不变, 所增加的铜以无机形态存在, 并且比例关系不变: $[\text{Cu}^{2+}] : [\text{CuOH}^+] : [\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{aq})] : [\text{CuCO}_3(\text{aq})] : [\text{CuHCO}_3^+] : [\text{CuSO}_3(\text{aq})] = 1 : 0.084 : 1.69 : 0.82 : 0.16 : 0.053$.

在不同 EDTA 浓度的标准稀释水中进行铜对 *D. magna* 的毒性试验, 根据实验结果计算出 LC_{50} , 结果如图 6 所示. 随着 EDTA 浓度的增加, 以总量表示的 LC_{50} 呈直线上升, 说明铜毒性下降; 而以活性态浓度表示的 LC_{50} 基本保持不变, 说明在 EDTA 存在时, 活性态也能很好地反映出铜的毒性. 此外, 以游离态浓度表示的 LC_{50} 也基本不变, 这是因为无机形态之间的比例不随 EDTA 浓度的变化而变化, 因此, 不能简单地认为毒性仅与游离态浓度成正比.

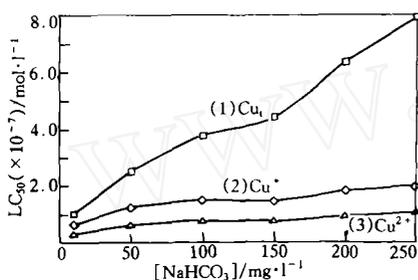


图 5 以不同基准表示的 LC_{50} 与碱度浓度的关系

Fig. 5 LC_{50} versus alkalinity

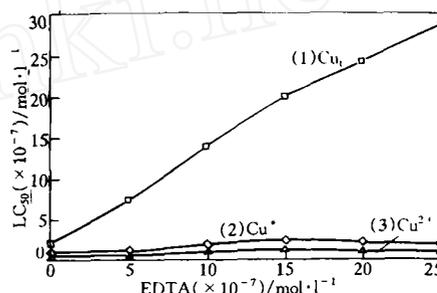


图 6 EDTA 对 LC_{50} 的影响

Fig. 6 LC_{50} versus concentration on EDTA

3 结论

许多研究表明, 重金属的毒性与总量之间没有直接的联系. 在本研究工作中, 当溶液 pH、碱度, 或者有机试剂浓度变化时, 铜的形态分布发生改变, 以总量表示的 LC_{50} 均发生变化, 说明铜的总量不能反映出铜的毒性大小.

重金属的毒性由其毒性形态决定, 游离态是公认的代表性毒性形态. 当溶液 pH 发生变化时, 以游离态浓度表示的 LC_{50} 随着 pH 的增加而降至 0, 说明铜的毒性并不仅仅由游离态引起, 还应考虑其它形态的毒性作用. 而碳酸类络合物较少具有毒性特征, 我们的碱度实验也证实了这一点.

根据实验结果我们提出用活性态来表征铜的毒性, 同时考虑游离态和羟基络合态的毒性作用, 以及它们之间的毒性差异. 在以上三种情况下均能较好地解释实验结果, 说明活性态比总量和游离态更能反映出铜的毒性效应.

将上述体系中的毒性 (TP) 与活性态浓度的对数进行回归处理, 得:

$$\text{TP} = 4.05 + 2.86 \lg[\text{Cu}^*]$$

由此建立起毒性与活性态浓度的关系, 根据活性态浓度即可对毒性进行预测.

在上述分析中, 我们忽略了 CuSO_4 的毒性作用, 这是因为在我们所研究的体系中, $[\text{Cu}^{2+}] : [\text{CuSO}_4(\text{aq})] = 1 : 0.053$ 一直未变, 我们无法确定其是否具有毒性. 此外, 在天然水体中还可能存在一系列配体, 如 Cl^- , F^- , S^{2-} , SH^- , SO_3^{2-} , NH_3 , NO_2^- 等, 它们对铜的形态分布的影响以及这些形态的毒性作用还有待进一步探讨.

参 考 文 献

- [1] Florence T M, Electrochemical Approaches to Trace Element Speciation in Waters. *Analyst*, 1986, **111** : 489
- [2] Prothro M G, Memorandum: Office of Water Policy and Technical Guidance on Interpretation and Implementation of Aquatic Life Metals Criteria. U. S. Environmental Protection Agency, 1993, Washington D C
- [3] Sunda W G, Lewis J M, Effect of Complexation by Natural Organic Ligands on the Toxicity of Copper to a Unicellular Alga *Monochrysis lutheri*. *Limnol. Oceanogr.*, 1978, **23** (5) : 870—876
- [4] Alen H E, Metal Speciation. Effects on Aquatic Toxicity. *Envir. Sci. Technol.*, 1980, **14** (4) : 441—443
- [5] U. S. Environmental Protection Agency, Quality Criteria for Water, EPA-440/5-86-001, 1986
- [6] U. S. Environmental Protection Agency, Methods for Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates, and Amphibians. EPA-600/3-75/009. Office of Research and Development, National Technical Information Service, 1975, Springfield V A
- [7] Howarth R S, Sprague J B, Copper Lethality to *Rainbow Trout* in Waters of Various Hardness and pH. *Water Res.*, 1978, **12** : 455—462
- [8] Wagemann R, Barical J, Speciation and Rate of Loss of Copper from Lakewater with Implications to Toxicity. *Water Res.*, 1979, **13** : 515—523
- [9] Weber C, U S. Environmental Protection Agency, EPA-600/4-89/001(2nd Ed), 1989, Cincinnati, O H

1996年7月18日收到.

RELATIONSHIP BETWEEN COPPER SPECIATION AND ACUTE TOXICITY TO *DAPHNIA MAGNA*

Liu Qing Wang Zijian Tang Hongxiao

(Research Center of Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Beijing, 100085)

ABSTRACT

The influences of pH, alkalinity, and EDTA on speciation of copper was modeled with MINTEQA2 software. The influence of copper speciation on toxicity was assayed by *Daphnia magna* test. The results show that toxicity of copper was attributed to Cu^{2+} , CuOH^+ , and $\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{aq})$, not to $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2$, CuHCO_3 , and CuEDTA complex. The results from different treatments can be explained by an empirical expression $\text{TP} = 4.05 + 2.86 \lg[\text{Cu}^*]$, where TP is toxic probity and $[\text{Cu}^*]$ is defined as "active copper species" ($[\text{Cu}^*] = [\text{Cu}^{2+}] + 0.75[\text{CuOH}^+] + 0.70[\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{aq})]$).

Keyword: copper, speciation, toxicity, *Daphnia magna*.