

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2020.05.006

朱侠, 李连祯, 涂晨, 等. 不同性质农田土壤中铜的可提取性与生物有效性及毒性. 土壤, 2020, 52(5): 911–919.

## 不同性质农田土壤中铜的可提取性与生物有效性及毒性<sup>①</sup>

朱侠<sup>1,2</sup>, 李连祯<sup>1</sup>, 涂晨<sup>1</sup>, 骆永明<sup>2,3\*</sup>

(1 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室(烟台海岸带研究所), 山东烟台 264003; 2 中国科学院大学, 北京 100049; 3 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008)

**摘要:**以重金属总量为基础的土壤环境质量标准已不适用于当前土壤管理的需求, 基于重金属生物有效性的生态风险评估和环境阈值研究对土壤重金属环境质量的修订具有重要的指导意义。本研究选取黑土、潮褐土和脱潜水稻土 3 种不同性质的农田土壤, 开展模拟铜(Cu)污染的生物毒性试验, 采用 HNO<sub>3</sub>、EDTA-Na<sub>2</sub>、NH<sub>4</sub>OAc 和 CaCl<sub>2</sub> 4 种不同浸提能力的化学试剂进行土壤有效态 Cu 提取, 探讨 Cu 可提取性与生物有效性及毒性的关系; 并通过敏感性生态物种生菜和赤子爱胜蚓的 Cu 暴露试验, 推导基于化学提取有效态的土壤 Cu 生态毒性阈值。研究表明: HNO<sub>3</sub>(41.4%)和 EDTA-Na<sub>2</sub>(56.8%)对 3 种土壤中 Cu 的平均提取效率显著高于 NH<sub>4</sub>OAc(0.12%)和 CaCl<sub>2</sub>(8.70%)。CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量与生菜 Cu 富集量和毒性效应之间存在显著或极显著相关, HNO<sub>3</sub> 提取态 Cu 含量则能很好地指示蚯蚓 Cu 富集量和 30 d 死亡率。不同生态受体毒性终点对土壤可提取态 Cu 的敏感性存在差异, 选用物种最敏感指标推导 3 种土壤中 Cu 的有效态毒性阈值 EC<sub>20</sub> 和 EC<sub>50</sub>, 结果显示, 基于不同化学提取态 Cu 含量的生菜毒性阈值 EC<sub>20</sub> 范围分别是 90.5 ~ 170 mg/kg(HNO<sub>3</sub>)、103 ~ 195 mg/kg(EDTA-Na<sub>2</sub>)、3.97 ~ 20.1 mg/kg(NH<sub>4</sub>OAc)和 0.21 ~ 8.68 mg/kg(CaCl<sub>2</sub>), EC<sub>50</sub> 范围分别是 110 ~ 188 mg/kg(HNO<sub>3</sub>)、119 ~ 230 mg/kg(EDTA-Na<sub>2</sub>)、5.69 ~ 32.2 mg/kg(NH<sub>4</sub>OAc)和 0.26 ~ 9.62 mg/kg(CaCl<sub>2</sub>); 基于不同化学提取态 Cu 含量的赤子爱胜蚓死亡率毒性阈值 EC<sub>20</sub> 范围分别是 138 ~ 193 mg/kg(HNO<sub>3</sub>)、108 ~ 226 mg/kg(EDTA-Na<sub>2</sub>)、8.92 ~ 11.6 mg/kg(NH<sub>4</sub>OAc)和 0.36 ~ 10.6 mg/kg(CaCl<sub>2</sub>), EC<sub>50</sub> 范围分别是 183 ~ 221 mg/kg(HNO<sub>3</sub>)、180 ~ 331 mg/kg(EDTA-Na<sub>2</sub>)、13.1 ~ 18.3 mg/kg(NH<sub>4</sub>OAc)和 0.54 ~ 13.2 mg/kg(CaCl<sub>2</sub>)。研究结果可为我国农田土壤重金属有效态化学提取方法的比选与优化提供科学依据, 同时对基于生物有效性的土壤重金属环境质量基准与标准的研究和制定具有重要意义。

**关键词:** 土壤; 铜; 可提取性; 生物有效性; 生物毒性; 阈值

中图分类号: X825 文献标志码: A

### Extractability, Bioavailability and Toxicity of Cu in Farmland Soils with Different Properties

ZHU Xia<sup>1,2</sup>, LI Lianzhen<sup>1</sup>, TU Chen<sup>1</sup>, LUO Yongming<sup>2,3\*</sup>

(1 Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** The environmental quality standards based on total contents of heavy metals can't meet the requirements of current soil management, studies on risk assessment and toxicity threshold that considering the bioavailability of heavy metals have great significance for the revision of corresponding standards. In this study, three farmland soils with different properties, i.e., black soil, meadow cinnamon soil, unsubmerged paddy soil, were selected and biological toxicity tests were conducted by simulating Cu pollution, four chemical extractants with different extraction capacities, including HNO<sub>3</sub>, EDTA-Na<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>OAc and CaCl<sub>2</sub>, were used to extract bioavailable Cu, the relationship between Cu extractability, bioavailability and toxicity were analyzed, and the toxicity thresholds of Cu were deduced for lettuce and earthworm *Eisenia foetida*. The results showed that HNO<sub>3</sub> (41.4%) and EDTA-Na<sub>2</sub> (56.8%) had strong Cu extraction ability, but NH<sub>4</sub>OAc (0.12%) and CaCl<sub>2</sub> (8.70%) had weak ability. Cu extracted by CaCl<sub>2</sub> significantly correlated with Cu accumulated in lettuce, the toxic effect, and the acute mortality of earthworms, while Cu

①基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0800405、2016YFE0106400)和中国科学院 STS 项目(KFJ-STZ-ZDTP-005)资助。

\* 通讯作者(ymluo@yic.ac.cn)

作者简介: 朱侠(1993—), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤重金属的生物有效性与基准。E-mail: xzhu@yic.ac.cn

extracted by  $\text{HNO}_3$  significantly correlated with the chronic toxicity and Cu accumulated in earthworms. Based on the effective concentration of different extractable Cu, the deduced EC20 for lettuce ranged from 90.5 mg/kg to 170 mg/kg based on  $\text{HNO}_3$ , 103 mg/kg to 195 mg/kg based on EDTA- $\text{Na}_2$ , 3.97 mg/kg to 20.1 mg/kg based on  $\text{NH}_4\text{OAc}$  and 0.21 mg/kg to 8.68 mg/kg based on  $\text{CaCl}_2$ , while the deduced EC20 for earthworm *Eisenia foetida* ranged from 138 mg/kg to 193 mg/kg based on  $\text{HNO}_3$ , 108 mg/kg to 226 mg/kg based on EDTA- $\text{Na}_2$ , 8.92 mg/kg to 11.6 mg/kg based on  $\text{NH}_4\text{OAc}$  and 0.36 mg/kg to 10.6 mg/kg based on  $\text{CaCl}_2$ . The deduced EC50 for lettuce ranged from 110 mg/kg to 188 mg/kg based on  $\text{HNO}_3$ , 119 mg/kg to 230 mg/kg based on EDTA- $\text{Na}_2$ , 5.69 mg/kg to 32.2 mg/kg based on  $\text{NH}_4\text{OAc}$  and 0.26 mg/kg to 9.62 mg/kg based on  $\text{CaCl}_2$ , while the deduced EC50 for earthworm *Eisenia foetida* ranged from 183 mg/kg to 221 mg/kg based on  $\text{HNO}_3$ , 180 mg/kg to 331 mg/kg based on EDTA- $\text{Na}_2$ , 13.1 mg/kg to 18.3 mg/kg based on  $\text{NH}_4\text{OAc}$  and 0.54 mg/kg to 13.2 mg/kg based on  $\text{CaCl}_2$ . The results have great significance for the selection and optimization of effective extraction methods of heavy metals in soils and the revision of environmental quality standards based on heavy metals bioavailability.

**Key words:** Soil; Cu; Extractability; Bioavailability; Toxicity; Threshold

我国土壤重金属污染问题不容忽视<sup>[1]</sup>。土壤中重金属的总量可在一定程度上反映其污染程度,但仅有部分形态的重金属可溶解到土壤溶液中,并通过溶液对生态系统产生危害<sup>[2]</sup>。重金属的毒性和生物可利用性更大程度上取决于其生物有效态,以总量评价土壤重金属的污染程度往往会高估其污染水平。在研究中常用化学提取剂对重金属生物有效性进行表征,不同提取剂对不同类型土壤重金属的提取效果不同<sup>[3-6]</sup>,有机质、pH、黏粒含量等因子通过影响重金属在土壤中的分布与形态,进而影响其有效性和毒性<sup>[7-8]</sup>。考虑到土壤理化性质对重金属生物有效性的影响,许多国家和地区基于土壤理化性质的差异分区域建立了重金属环境质量标准,但我国土壤重金属环境标准制定仍以总量为限值,难以准确反映重金属对生物的毒害效应<sup>[9-10]</sup>。因此,筛选适合的有效态提取剂,探索以有效态为基础的土壤重金属生态毒性阈值,对研究制定基于生物有效性的土壤环境质量基准及标准具有重要意义<sup>[11]</sup>。

铜(Cu)是农田土壤的主要重金属污染物之一,Cu过量会对土壤中动植物的生理生化功能产生毒害作用<sup>[12-14]</sup>。Cu通常以 $\text{Cu}^{2+}$ 形态进入土壤,以可溶性有机物的形态存在于土壤孔隙水中,易络合在铁铝氧化物表面,或吸附于黏土矿物,其形态和生物有效性受土壤理化性质影响显著<sup>[7-8]</sup>。本研究以Cu为例,选取我国3种代表性的农田土壤,通过 $\text{HNO}_3$ 、EDTA- $\text{Na}_2$ 、 $\text{NH}_4\text{OAc}$ 和 $\text{CaCl}_2$ 4种化学提取剂对模拟Cu污染土壤的有效态Cu进行分析,以敏感生态物种生菜和赤子爱胜蚓为受试生物进行毒性暴露试验,研究基于化学提取有效态Cu含量的生态毒性响应,推导基于有效态的土壤Cu生态毒性阈值,以期为我国农田土壤重金属有效态化学提取方法的比选、优化和基于生物

有效性的土壤重金属环境质量标准的制定提供方法和思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试土壤

供试的3种农田土壤分别采自黑龙江海伦(47°25'N, 126°47'E)、河北保定(38°31'N, 115°25'E)和浙江嘉兴(30°51'N, 120°41'E)。采集0~20 cm表层土壤,自然风干,过10目筛和100目尼龙筛后,装自封袋保存和测定。3种土壤的理化性质及重金属全量见表1。

根据土壤pH的不同,添加不同量的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 制成不同Cu含量污染土壤,具体添加量为:pH<6.5土壤,Cu添加量分别为0、100、200、400、800、1 000 mg/kg;pH>6.5土壤,Cu添加量分别为0、200、400、800、1 600、2 000 mg/kg。所有土壤样品制备5 kg,保持田间最大持水量的70%,充分混合均匀后,室温培养30 d,老化后的土壤经自然风干后,过10目尼龙筛备用。

### 1.2 土壤重金属有效态测定

称取过10目尼龙筛的风干土壤样品1.0000 g( $\pm 0.0005$  g)于50 ml塑料离心管中,分别加入10 ml不同的提取剂,置于振荡箱中按照表2所述条件进行恒温振荡后,1 000 g离心10 min,取上清液过0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜后,用ICP-MS(电感耦合等离子体质谱仪,ELAN DRC II, PerkinElmer)测上清液中提取态Cu的含量。每组重复3次。

### 1.3 植物毒性试验

以生菜作为受试生物,选取生菜的根长、株高和生物量作为生菜的毒性效应指标,检测不同农田土壤中Cu的植物毒害。农田土壤Cu的植物毒害试验参

表1 供试土壤的理化性质  
Table 1 Physiochemical properties of tested soils

采集地点	土壤类型	pH	有机质(g/kg)	黏粒(%)	CEC(cmol/kg)	重金属含量 (mg/kg)				
						Cd	Cu	Zn	Ni	Pb
黑龙江海伦	黑土	5.78	54.7	32.8	33.4	0.26	19.1	60.2	25.9	21.8
河北保定	潮褐土	8.21	7.90	14.4	9.50	0.28	19.7	52.9	24.1	19.0
浙江嘉兴	脱潜水稻土	6.82	33.4	26.2	20.4	0.25	30.3	80.5	34.4	31.4

表2 不同化学提取剂的提取条件  
Table 2 Extraction conditions of different chemical extractants

提取剂	pH	固液比	提取温度(°C)	振荡频率(r/min)	提取时间(h)
0.43 mol/L HNO <sub>3</sub>	0.50	1 : 10	20 ± 2	25 ± 10	4
0.05 mol/L EDTA-Na <sub>2</sub>	8.00	1 : 10	25 ± 2	180 ± 20	2
1 mol/L NH <sub>4</sub> OAc	7.00	1 : 10	25 ± 2	180 ± 20	1
0.1 mol/L CaCl <sub>2</sub>	7.00	1 : 10	25 ± 2	180 ± 20	2

考 ISO 的标准方法<sup>[15-16]</sup>进行。称取 200 g 风干土壤于塑料盆中, 加去离子水至田间最大持水量的 70%, 并平衡 24 h; 选择饱满、均一的生菜种子, 用 1% NaClO 溶液浸泡 15 ~ 20 min, 消毒灭菌后用去离子水洗净, 放入装有 2 层湿润滤纸的培养皿中, 在 25°C 培养箱里催芽 24 h; 选择发芽的种子移栽在事先平衡好的盆栽土壤中, 每盆移栽 9 棵, 在人工气候培养室中(25°C)中生长 60 d, 利用称重法保持整个过程中土壤水分含量为田间最大持水量的 70%; 60 d 后小心采集整株植株, 避免采集过程中植物根系的损伤, 用去离子水冲洗干净, 并测量生菜株高、根长和生物量。

生菜可食部位累积 Cu 含量测定采用 HNO<sub>3</sub> 消解法进行, 具体操作为: 将生菜根系移除后, 取生菜地上部放在 -80°C 冰箱中冷冻 12 h 后, 在冷冻干燥器冻干至恒重; 称量干重后, 将生菜置于玻璃消解瓶中, 加入 5 ml 浓 HNO<sub>3</sub> 消煮至近干(若消解不彻底, 继续加 5 ml 浓 HNO<sub>3</sub>), 用去离子水定容至 10 ml, 作为待测液。过 0.45 μm 滤膜后, 用 ICP-MS 测定植株地上可食部位 Cu 含量。

#### 1.4 蚯蚓毒性试验

农田土壤 Cu 的蚯蚓毒性试验参考 ISO 的标准方法<sup>[17]</sup>进行。称取 500 g 风干土壤于有孔带盖塑料盒中, 每个处理重复 3 次, 加去离子水至田间最大持水量的 70%, 平衡 24 h。将赤子爱胜蚓置于装有 2 层湿润滤纸的培养皿中, 在 25°C 培养箱里清肠 24 h 后, 选择活性状态良好、大小均一的赤子爱胜蚓清洗称重后转移至塑料盒中, 每盒放置 8 条。蚯蚓在人工气候培养室中(25°C)中培养 30 d, 利用称重法保持整个过程中土壤水分含量为田间最大持水量的 70%。在培养 14 d 和 30 d 时, 轻轻翻动土壤, 将盒内蚯蚓取出,

记录其死亡。30 d 后用去离子水将蚯蚓冲洗干净, 置于装有 2 层湿润滤纸的培养皿中, 在 25°C 培养箱里清肠 48 h 后, 清洗称重后于 -80 °C 冰箱中冷冻 12 h 后, 在冷冻干燥器中冻干至恒重, 用浓硝酸消煮, 定容至 10 ml, 用 ICP-MS 测定蚯蚓体内 Cu 含量。

#### 1.5 数据处理

土壤中重金属含量和毒性效应关系曲线并无特定的拟合方法, 常用的剂量-效应拟合曲线有 Log-normal、Log-logistic 和 Weibull 等, 其中 Log-logistic 函数因结果更具有实际性而被广泛应用<sup>[18]</sup>。本研究选择 Log-logistic 函数对土壤中不同提取态 Cu 含量与生菜、蚯蚓毒性效应进行拟合, 计算其 20% 抑制率(EC<sub>20</sub>)和半抑制率(EC<sub>50</sub>)的毒性阈值。计算方法如下:

$$Y = \frac{Y_0}{1 + e^{b(X - M)}}$$

式中:  $Y$  表示生菜株高、根长和生物量抑制率或蚯蚓死亡率,  $X$  表示 HNO<sub>3</sub>、EDTA-Na<sub>2</sub>、NH<sub>4</sub>OAc 和 CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量(mg/kg),  $M$  表示 Log EC<sub>x</sub>(EC<sub>20</sub>、EC<sub>50</sub>);  $Y_0$  和  $b$  为模型拟合参数。

试验数据采用 Excel 2010 和 Origin 9.0 进行分析和处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 农田土壤中 Cu 的可提取性比较

4 种化学提取剂对土壤中 Cu 的提取量存在较大差异。HNO<sub>3</sub> 提取态 Cu 含量范围为 2.61 ~ 1 013 mg/kg, 均值为 328 mg/kg; EDTA-Na<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量范围为 2.17 ~ 1 044 mg/kg, 均值为 336 mg/kg; NH<sub>4</sub>OAc 提取态 Cu 含量范围为 0.03 ~ 317 mg/kg, 均值为 62.4 mg/kg;

CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量范围为 0.03 ~ 265 mg/kg, 均值为 28.2 mg/kg; 4 种提取剂对土壤 Cu 的提取量大小为 EDTA-Na<sub>2</sub>>HNO<sub>3</sub>>NH<sub>4</sub>OAc>CaCl<sub>2</sub>。整体来看, EDTA-Na<sub>2</sub> 和 HNO<sub>3</sub> 对土壤中 Cu 的提取能力较强, NH<sub>4</sub>OAc 和 CaCl<sub>2</sub> 对 Cu 的提取能力较弱。

本研究采用提取态 Cu 占土壤总 Cu 含量的百分数表示不同提取剂对土壤中 Cu 的提取率, 由表 3 可知, 不同土壤中 HNO<sub>3</sub>、EDTA-Na<sub>2</sub> 和 NH<sub>4</sub>OAc 对 Cu 的提取率大小均为潮褐土>黑土>脱潜水稻土, 而 CaCl<sub>2</sub> 则相反。同种土壤中, 不同提取剂的提取率也存在显著差异: 黑土中, 提取率大小为 EDTA-Na<sub>2</sub>>HNO<sub>3</sub>>CaCl<sub>2</sub>>NH<sub>4</sub>OAc; 潮褐土中, 提取率大小为 HNO<sub>3</sub>>EDTA-Na<sub>2</sub>>NH<sub>4</sub>OAc>CaCl<sub>2</sub>; 脱潜水稻土中, 提取率大小为 EDTA-Na<sub>2</sub>>HNO<sub>3</sub>>NH<sub>4</sub>OAc>CaCl<sub>2</sub>。综合来看, EDTA-Na<sub>2</sub> 和 HNO<sub>3</sub> 对 3 种不同土壤中 Cu 提取率均达到 40% 以上, NH<sub>4</sub>OAc 和 CaCl<sub>2</sub> 对 Cu 的提取率低于 10%, 而 CaCl<sub>2</sub> 对潮褐土中的 Cu 提取率最弱, 平均提取率仅为 0.12%。

夏增禄<sup>[19]</sup>最早对草甸褐土、草甸棕壤、红壤性水稻土中重金属的有效态提取剂进行了较为系统全面的研究, 结果表明稀酸和络合剂对土壤中重金属的提取能力较强。李发生等<sup>[20]</sup>以湖南红壤、重庆紫色土和河南潮土 3 种土壤及 7 种提取剂作为研究对象, 对土壤中重金属的有效态提取剂进行筛选, 发现 EDTA-Na<sub>2</sub> 提取效果最为明显。易磊等<sup>[21]</sup>对分别代表酸性、中性和碱性的水稻土、紫色土、潮土和塍土中的重金属进行提取, 发现 EDTA-Na<sub>2</sub> 对 4 种土壤中重金属的提取能力最强。不同提取剂对土壤重金属的提取能力差异与其提取机制有关, 不同提取剂提取重金属的形态不同: EDTA-Na<sub>2</sub> 是一种络合型提取剂, 可以把碳酸盐结合态和部分有机结合态、铁锰氧化物结合态中的 Cu 提取出来, 其对土壤中重金属的提取能力较强; HNO<sub>3</sub> 是酸性较强的代换剂, 其 pH 较低, 可以将土壤中的某些非代换吸附态的重金属也提取出来; 而 NH<sub>4</sub>OAc 和 CaCl<sub>2</sub> 是中性盐试剂, 主要提取水溶态和交换态的 Cu, 提取率最低<sup>[22]</sup>。

表 3 4 种提取剂对不同土壤中 Cu 的平均提取率

Table 3 Mean extraction efficiencies of Cu in different soils by 4 different extractants

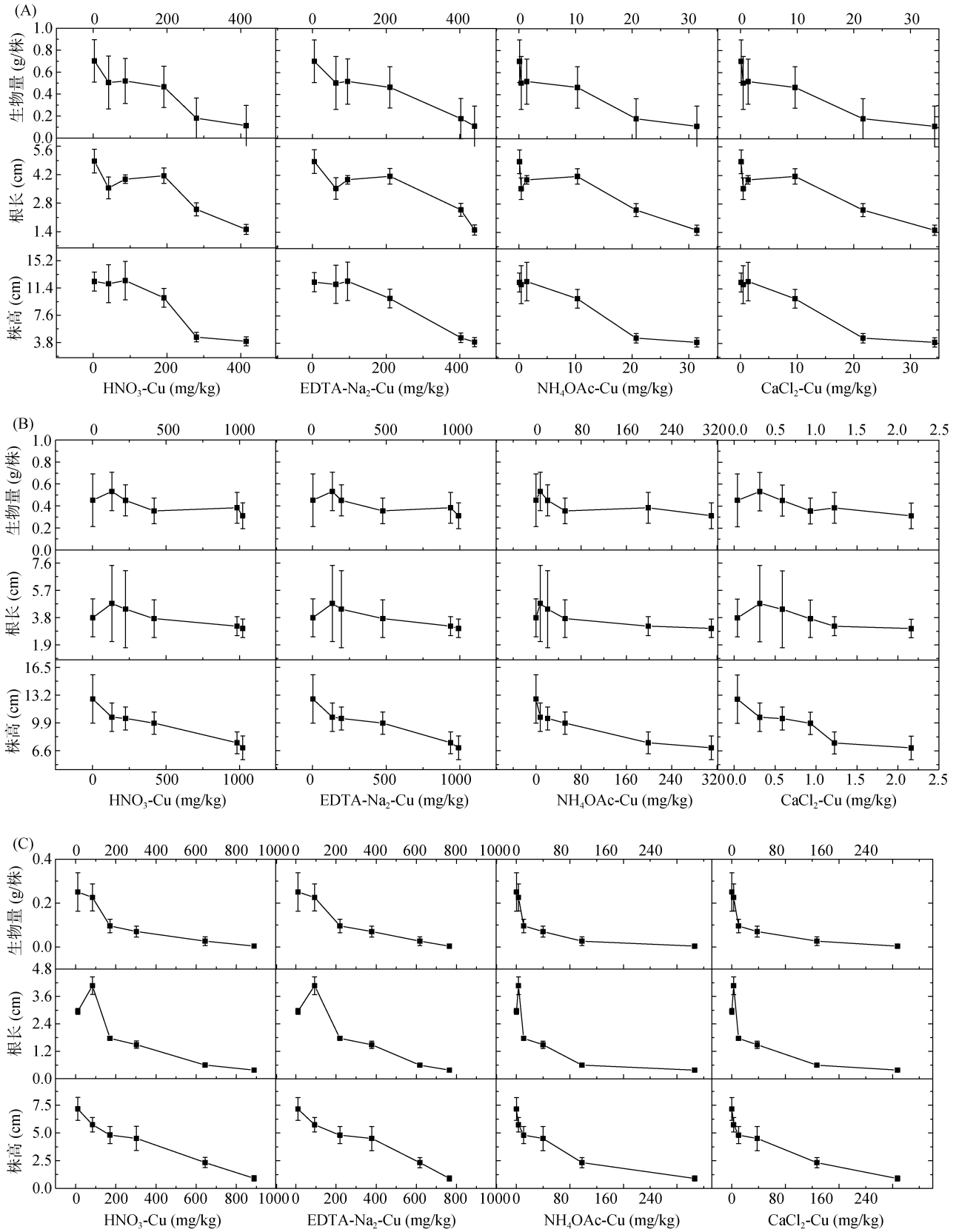
土壤类型	平均提取率(%)			
	HNO <sub>3</sub>	EDTA-Na <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> OAc	CaCl <sub>2</sub>
黑土	42.0	51.6	1.88	1.94
潮褐土	57.3	56.8	8.70	0.12
脱潜水稻土	41.4	45.2	6.52	5.77

## 2.2 农田土壤中生菜生长状况、可食部位 Cu 累积量与土壤提取态 Cu 含量的关系

在生菜盆栽试验过程中, 随着土壤 Cu 总量的增加, 不同土壤中生菜的生长状况逐渐变差。生长初期, Cu 高剂量组生菜发芽较晚, 生长较为缓慢。随着生长时间的延长, Cu 高剂量组生菜出现明显的毒性效应, 主要症状表现为叶片发焉, 渐黄, 逐渐出现干枯, 部分甚至死亡。

生菜的 Cu 毒害效应在不同土壤中存在差异, 除与土壤 Cu 总量有关外, 更大程度上取决于 Cu 的化学形态和生物有效态含量<sup>[23]</sup>。图 1 所示为黑土、潮褐土和脱潜水稻土中不同化学提取态 Cu 含量与生菜毒害效应的剂量-效应关系。随着化学提取态 Cu 含量的增加, 生菜株高、根长和生物量等呈下降趋势。当化学提取态 Cu 含量较低时, 土壤中 Cu 对生菜的毒害效应较小; 在潮褐土和脱潜水稻土中, 低含量的化学提取态 Cu 甚至出现了一定的刺激生长的作用。相同提取态 Cu 含量下, 潮褐土中生菜的根长、株高和生物量均显著高于黑土和脱潜水稻土, 除有效态重金属含量外, 土壤本身理化性质也会对其毒性效应产生影响。

通过 Log-logistic 函数分析了不同化学提取态 Cu 含量与生菜 Cu 富集和毒性效应的相关关系, 其相关性系数如表 4 所示。不同提取态 Cu 含量与生菜株高抑制率均有显著相关性 ( $R^2 > 0.60$ ,  $P < 0.05$ ), 其相关性大小为 CaCl<sub>2</sub>>EDTA-Na<sub>2</sub>>HNO<sub>3</sub>>NH<sub>4</sub>OAc。CaCl<sub>2</sub> 和 NH<sub>4</sub>OAc 提取态 Cu 含量与生菜根长抑制率相关性显著高于 EDTA-Na<sub>2</sub> 和 HNO<sub>3</sub> 提取态 Cu 含量; 其中 CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量与生菜株高和根长抑制率相关性均达到极显著水平。HNO<sub>3</sub>、EDTA-Na<sub>2</sub> 和 CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量与生菜生物量相关性显著, 相关性大小为 CaCl<sub>2</sub>>EDTA-Na<sub>2</sub>>HNO<sub>3</sub>。NH<sub>4</sub>OAc 和 CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量与生菜累积 Cu 含量显著相关。综合来看, CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量与生菜 Cu 富集和毒性效应均具有最好的相关性。已有不少研究报道, CaCl<sub>2</sub> 和 NH<sub>4</sub>OAc 提取能很好地表征农田土壤中 Cu 的生物有效性。Zhang 等<sup>[24]</sup>研究某铅锌矿区污染农田土壤中水稻对 Cu 的累积与 6 种化学提取态 Cu 含量的相关性, 结果表明 NH<sub>4</sub>OAc 和 CaCl<sub>2</sub> 在 6 种化学提取剂中相关性表现最好。Wang 等<sup>[25]</sup>研究了我国西北绿洲土壤中小麦对 Cu 的累积与 8 种化学提取态 Cu 含量的相关性, 发现 NH<sub>4</sub>OAc 和柠檬酸提取态 Cu 相关性最好。本研究则将生菜这一敏感生态受体的 Cu 富集和毒性效应相结合, 通过不同化学提取剂的比较进一步证明



(A: 黑土; B: 潮褐土; C: 脱潜水稻土)

图 1 土壤中不同提取态 Cu 含量与生菜生物量、株高和根长的关系

Fig. 1 Relationship between soil extractable Cu and lettuce biomass, root length and plant height

表 4 不同化学提取态 Cu 含量与生菜 Cu 吸收和毒性效应的相关性  
Table 4 Correlation between soil extractable Cu and Cu accumulation and toxicity in lettuce

相关性系数( $R^2$ )	HNO <sub>3</sub> -Cu	EDTA-Na <sub>2</sub> -Cu	NH <sub>4</sub> OAc-Cu	CaCl <sub>2</sub> -Cu
生菜株高抑制率	0.64*	0.68*	0.61*	0.73**
生菜根长抑制率	0.29	0.40	0.60*	0.72**
生菜生物量抑制率	0.63*	0.71*	0.58	0.86**
生菜累积 Cu 含量	0.45	0.58	0.63*	0.63*

注：“\*”表示显著相关( $P < 0.05$ )；“\*\*”表示极显著相关( $P < 0.01$ )；下同。

CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量对土壤中 Cu 的植物有效性具有较好的指示。

### 2.3 农田土壤中基于土壤可提取态 Cu 的生菜毒性阈值

以不同提取剂提取的 Cu 含量作为剂量,生菜根伸长、株高和生物量作为效应,根据剂量-效应方程(Log-logistic 方程)拟合得到生菜根伸长、株高和生物量 20% 抑制率(EC20)和半抑制率(EC50)的毒性阈值(表 5),结果显示,在同种土壤中,生菜不同毒性终点的敏感性存在较大差异。在黑土和潮褐土中,敏感性顺序均为生物量>株高>根伸长,生物量是最敏感的评价指标;而在脱潜水稻土中则相反,敏感性顺序为根伸长>株高>生物量,根伸长是最敏感的评价指标。根据同一物种不同毒性指标的多个毒理数据选择最低值的毒性数据的筛选原则<sup>[26]</sup>,黑土和潮褐土以基于生物量的毒性数据为生菜毒性阈值,脱潜水稻土以基于根伸长的毒性数据为生菜毒性阈值。基于 4 种不

同提取态 Cu 含量对生菜敏感指标的毒性阈值 EC20 范围分别是 90.5 ~ 170 mg/kg(HNO<sub>3</sub>)、103 ~ 195 mg/kg(EDTA-Na<sub>2</sub>)、3.97 ~ 20.1 mg/kg(NH<sub>4</sub>OAc)和 0.21 ~ 8.68 mg/kg(CaCl<sub>2</sub>);EC50 范围分别是 110 ~ 188 mg/kg(HNO<sub>3</sub>)、119 ~ 230 mg/kg(EDTA-Na<sub>2</sub>)、5.69 ~ 32.2 mg/kg(NH<sub>4</sub>OAc)和 0.26 ~ 9.62 mg/kg(CaCl<sub>2</sub>)。

在不同土壤类型中,基于同种有效态 Cu 含量的毒性阈值 EC20 和 EC50 因提取剂提取能力差异而不同。HNO<sub>3</sub> 和 EDTA-Na<sub>2</sub> 提取态 Cu 的毒性阈值明显高于 NH<sub>4</sub>OAc 和 CaCl<sub>2</sub>,这与前文所述 EDTA-Na<sub>2</sub> 和 HNO<sub>3</sub> 对 3 种土壤中 Cu 的提取能力较强的结果一致。其中,潮褐土中基于有效态 Cu 含量的生菜毒性 EC20 和 EC50 显著低于其他土壤,这可能是由于潮褐土较高的 pH 造成的。Lin 等<sup>[27]</sup>通过陆生生物配体模型(t-BLM)研究土壤溶液中共存阳离子对 Cu 的大麦根伸长 EC50 的影响,结果发现土壤溶液中的阳离子如 H<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>可以减轻 Cu<sup>2+</sup>的毒性。

表 5 基于不同提取态 Cu 含量的土壤中 Cu 生菜毒性阈值(mg/kg)  
Table 5 Toxicity threshold values for lettuce based on different soil extractable Cu concentration

提取剂	毒性终点	黑土		潮褐土		脱潜水稻土	
		EC20	EC50	EC20	EC50	EC20	EC50
0.43 mol/L HNO <sub>3</sub>	根伸长	267	276	401	418	134	160
	株高	184	214	269	427	238	377
	生物量	170	188	90.5	110	593	627
0.05 mol/L EDTA-Na <sub>2</sub>	根伸长	348	398	401	478	151	230
	株高	201	281	305	4834	271	430
	生物量	195	207	103	119	585	607
1 mol/L NH <sub>4</sub> OAc	根伸长	18.9	20.2	49.2	51.6	20.1	32.2
	株高	9.61	12.7	33.9	56.8	33.1	52.6
	生物量	7.86	9.83	3.97	5.69	88.3	94.6
0.1 mol/L CaCl <sub>2</sub>	根伸长	19.5	21.0	0.81	0.95	8.68	9.62
	株高	8.85	12.3	0.59	0.94	36.1	57.3
	生物量	7.16	9.12	0.21	0.26	115	123

### 2.4 农田土壤中蚯蚓死亡率、Cu 累积量与土壤提取态 Cu 含量的关系

赤子爱胜蚓的急性毒性试验表明,当土壤中 Cu

含量较低时,蚯蚓的生长状态良好,未出现死亡或明显的中毒现象。随着 Cu 含量的增加,赤子爱胜蚓出现明显的回避反应,身体剧烈扭动或顺着塑料盒内壁

外逃，之后蠕动迟缓，蚯蚓出现明显中毒症状，表现为身体变软，体色渐白，环带充血肿大，并伴有分泌的黄色体液；严重时断节现象，并伴有血迹，甚至死亡。暴露时间 30 d 后，Cu 低剂量组赤子爱胜蚓也逐渐中毒死亡，未死亡的蚯蚓活性明显下降，蠕动变缓。Cu 的长期毒性需要一定的时间才可以表现出来。

图 2 显示了黑土、潮褐土和脱潜水稻土中提取态

Cu 含量与暴露 14 d 和 30 d 后蚯蚓死亡率的关系。当可提取态 Cu 含量较低时，3 种土壤中蚯蚓死亡率均较低，蚯蚓对重金属 Cu 污染有一定的耐受性。随着可提取态 Cu 含量的增加，蚯蚓的死亡率和 Cu 累积量均显著增加，3 种土壤 Cu 添加最高量处理组中的蚯蚓几乎全部死亡。不同土壤中蚯蚓死亡情况不同，相同提取态 Cu 含量下，黑土中蚯蚓死亡率最高，脱潜水稻土次之，潮褐土最低。

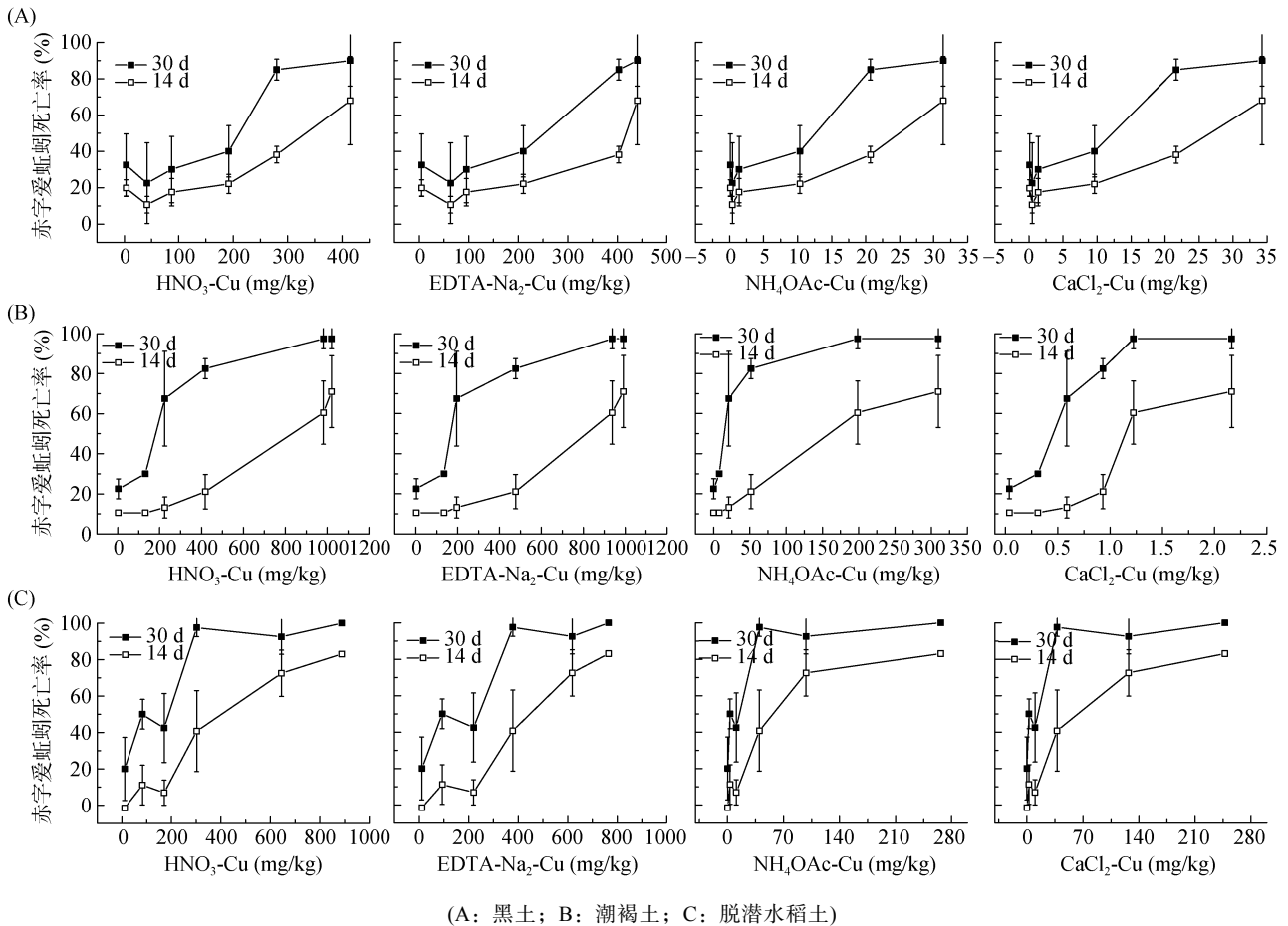


图 2 土壤中不同提取态 Cu 含量与蚯蚓死亡率的关系

Fig. 2 Relationship between soil extractable Cu and earthworms mortality

通过 Log-logistic 分析了不同提取态 Cu 含量与蚯蚓吸收 Cu 含量和死亡率的剂量-效应关系，其相关性系数如表 6 所示。土壤 CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量与蚯蚓的急性毒性死亡率(14 d)存在极显著相关，表明蚯蚓的急性毒性主要与土壤溶液中直接有效性 Cu 含量有关。慢性暴露过程中更多的潜在有效态 Cu 被释放出来，进一步对蚯蚓产生毒害。HNO<sub>3</sub>、EDTA-Na<sub>2</sub> 和 NH<sub>4</sub>OAc 提取态 Cu 含量均与蚯蚓的慢性毒性死亡率(30 d)和 Cu 累积量存在较好的相关性，其中与蚯蚓死亡率的相关性大小为 HNO<sub>3</sub> > NH<sub>4</sub>OAc > EDTA-Na<sub>2</sub>；与 Cu 累积量的相关性大小则为 HNO<sub>3</sub> > EDTA-

Na<sub>2</sub> > NH<sub>4</sub>OAc。综合来看，CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量与蚯蚓的急性毒性效应相关性最好，HNO<sub>3</sub> 提取态 Cu 含量则能很好地指示其蚯蚓 Cu 累积量和慢性毒性响应。

表 6 不同提取态 Cu 含量与蚯蚓死亡率和 Cu 累积的相关性

Table 6 Correlation between soil extractable Cu and earthworm mortality and Cu accumulation

相关性系数(R <sup>2</sup> )	HNO <sub>3</sub>	EDTA-Na <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> OAc	CaCl <sub>2</sub>
蚯蚓死亡率(14 d)	0.66*	0.65*	0.61*	0.70**
蚯蚓死亡率(30 d)	0.93**	0.89**	0.93**	0.40
蚯蚓累积 Cu 含量	0.74**	0.67**	0.58*	0.01

## 2.5 农田土壤中基于土壤可提取态 Cu 的蚯蚓毒性阈值

以不同提取剂提取 Cu 含量作为剂量,以蚯蚓暴露 30 d 后的死亡率作为效应,根据剂量-效应方程(Log-logistic 方程)拟合得到蚯蚓死亡率的 EC20 和 EC50 毒性阈值(表 7),结果显示,基于 4 种不同提取剂所测定的 Cu 对蚯蚓死亡率毒性阈值 EC20 范围分别是 138 ~ 193 mg/kg(HNO<sub>3</sub>), 108 ~ 226 mg/kg(EDTA-Na<sub>2</sub>), 8.92 ~ 11.6 mg/kg(NH<sub>4</sub>OAc)和 0.36 ~ 10.6 mg/kg(CaCl<sub>2</sub>);EC50 范围分别是 183 ~ 221 mg/kg(HNO<sub>3</sub>), 180 ~ 331 mg/kg(EDTA-Na<sub>2</sub>), 13.1 ~ 18.3 mg/kg

(NH<sub>4</sub>OAc)和 0.54~13.2 mg/kg(CaCl<sub>2</sub>)。3 种土壤中基于不同提取态 Cu 的毒性阈值不同,黑土有效态毒性阈值较高,而潮褐土的有效态毒性阈值则相对较低,这与生菜的毒性阈值结果一致。大量研究表明,土壤溶液中较高含量的 H<sup>+</sup> 浓度和可溶性有机碳(DOC)显著抑制 Cu 对生物的毒性效应<sup>[28-32]</sup>。本研究中黑土有机质含量明显较高,基于有效态含量的 Cu 对蚯蚓的 EC20 和 EC50 显著高于潮土和水稻土,可能与高有机质含量会在一定程度上缓解 Cu 对蚯蚓的毒性有关。因此,在进行毒性阈值研究时,在 Cu 有效态含量的基础上还应考虑土壤 pH 和有机质等性质的影响。

表 7 基于不同提取态 Cu 含量的土壤中 Cu 蚯蚓毒性阈值  
Table 7 Toxicity threshold values for earthworms based on different soil extractable Cu concentration

提取剂	毒性终点	黑土		潮褐土		脱潜水稻土	
		EC20	EC50	EC20	EC50	EC20	EC50
0.43 mol/L HNO <sub>3</sub>	死亡率	193	221	138	207	174	183
0.05 mol/L EDTA-Na <sub>2</sub>	死亡率	226	313	148	180	108	331
1 mol/L NH <sub>4</sub> OAc	死亡率	10.5	13.5	8.92	18.3	11.6	13.1
0.1 mol/L CaCl <sub>2</sub>	死亡率	9.80	13.2	0.36	0.54	10.6	11.9

## 3 结论

化学提取剂对不同性质土壤中 Cu 的提取能力存在显著差异。HNO<sub>3</sub> 和 EDTA-Na<sub>2</sub> 对土壤中 Cu 的提取率较高, NH<sub>4</sub>OAc 和 CaCl<sub>2</sub> 对土壤中 Cu 的提取率较低。生菜 Cu 富集量和毒性与土壤 CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cu 含量之间相关性较好, HNO<sub>3</sub> 提取态 Cu 含量能很好地指示蚯蚓 Cu 富集量和死亡率。不同性质土壤中基于化学提取有效态 Cu 含量的生物毒性阈值(EC20 和 EC50)存在较大差异,这与土壤 pH 和有机质等性质的影响有关。筛选对土壤重金属具有普适性的化学提取剂对于以有效态为基础的生态毒性阈值的制定具有重要意义,但对提取方法的优化和标准化是以后研究的重点。

### 参考文献:

- [1] 陈卫平, 杨阳, 谢天, 等. 中国农田土壤重金属污染防治挑战与对策[J]. 土壤学报, 2018, 55(2): 261-272.
- [2] 蒋逸骏, 胡雪峰, 舒颖, 等. 湖北某镇农田土壤-水稻系统重金属累积和稻米食用安全研究[J]. 土壤学报, 2017, 54(2): 410-420.
- [3] Harmsen J. Measuring bioavailability: from a scientific approach to standard methods[J]. Journal of Environmental Quality, 2007, 36(5): 1420-1428.
- [4] Monterroso C, Alvarez E, Fernández Marcos M L. Evaluation of Mehlich 3 reagent as a multielement extractant in mine

soils[J]. Land Degradation & Development, 1999, 10(1): 35-47.

- [5] Korzeniowska J, Stanislawska-Glubiak E. Proposal of new convenient extractant for assessing phytoavailability of heavy metals in contaminated sandy soil[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(17): 1-10.
- [6] 陈宏坪, 戴碧川, 杨新萍, 等. 土壤与水稻籽粒镉含量相关性分析及水稻产地土壤镉临界值的研究[J]. 土壤, 2018, 50(2): 361-368.
- [7] Matijevec L, Romić D, Romić M. Soil organic matter and salinity affect copper bioavailability in root zone and uptake by *Vicia faba* L. plants[J]. Environmental Geochemistry and Health, 2014, 36(5): 883-896.
- [8] Nguyen T X T, Amyot M, Labrecque M. Differential effects of plant root systems on nickel, copper and silver bioavailability in contaminated soil[J]. Chemosphere, 2017, 168:131-138.
- [9] 周启星, 王毅. 我国农业土壤质量基准建立的方法体系研究[J]. 应用基础与工程科学学报, 2012, 20(S1): 38-44.
- [10] 章海波, 骆永明, 李远, 等. 中国土壤环境质量标准中重金属指标的筛选研究[J]. 土壤学报, 2014, 51(3): 429-438.
- [11] 骆永明, 夏家洪, 章海波, 宋静, 滕应. 中国土壤环境质量基准与标准制定的理论和方法[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [12] Shi J Y, Peng C, Yang Y Q, et al. Phytotoxicity and accumulation of copper oxide nanoparticles to the Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens*[J]. Nanotoxicology, 2014, 8(2): 179-188.



- [13] Christiansen K S, Borggaard O K, Holm P E, et al. Experimental determinations of soil copper toxicity to lettuce (*Lactuca sativa*) growth in highly different copper spiked and aged soils[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(7): 5283–5292.
- [14] 卜元卿, 骆永明, 滕应, 等. 铜暴露对赤子爱胜蚓 (*Eisenia fetida*) 抗氧化酶活力的影响[J]. 环境化学, 2007, 26(5): 593–597.
- [15] ISO. Soil quality. Determination of the effects of pollutants on soil flora: ISO 11269-1[S]. BSI British Standards, 2012
- [16] ISO. Soil quality. Determination of the effects of pollutants on soil flora: ISO 11269-2 [S]. BSI British Standards, 2012. DOI:10.3403/30197451
- [17] ISO. Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*: ISO 11268-1 [S]. 2012
- [18] Wheeler J R, Grist E P M, Leung K M Y, et al. Species sensitivity distributions: data and model choice[J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, 45(1–12):192–202.
- [19] 夏增禄. 土壤环境容量及其应用[M]. 北京: 气象出版社, 1988.
- [20] 李发生, 韩梅, 熊代群, 等. 不同浸提剂对几种典型土壤中重金属有效态的浸提效率研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(6): 704–706.
- [21] 易磊, 张增强, 沈锋, 等. 浸提条件和浸提剂类型对土壤重金属浸提效率的影响[J]. 西北农业学报, 2012, 21(1): 156–160.
- [22] 周健, 金诚, 李晓林, 等. 不同浸提剂对干旱区黄土 Cu、Zn 的浸提[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2017, 53(1): 68–72.
- [23] 张晗, 靳青文, 黄仁龙, 等. 大宝山矿区农田土壤重金属污染及其植物累积特征[J]. 土壤, 2017, 49(1): 141–149.
- [24] Zhang M K, Liu Z Y, Wang H. Use of single extraction methods to predict bioavailability of heavy metals in polluted soils to rice[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2010, 41(7): 820–831.
- [25] Wang S L, Nan Z R, Liu X W, et al. Accumulation and bioavailability of copper and nickel in wheat plants grown in contaminated soils from the oasis, northwest China[J]. Geoderma, 2009, 152(3/4):290–295.
- [26] 王小庆, 韦东普, 黄占斌, 等. 物种敏感性分布法在土壤中铜生态阈值建立中的应用研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(6): 1787–1794.
- [27] Lin Y Q, Allen H E, di Toro D M. Validation of Cu toxicity to barley root elongation in soil with a Terrestrial Biotic Ligand Model developed from sand culture[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 148: 336–345.
- [28] Cooper C A, Tait T, Gray H, et al. Influence of salinity and dissolved organic carbon on acute Cu toxicity to the rotifer *Brachionus plicatilis*[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(2): 1213–1221.
- [29] de Schamphelaere K A C, Janssen C R. Effects of dissolved organic carbon concentration and source, pH, and water hardness on chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2004, 23(5): 1115–1122.
- [30] Ryan A C, Tomasso J R, Klaine S J. Influence of pH, hardness, dissolved organic carbon concentration, and dissolved organic matter source on the acute toxicity of copper to *Daphnia magna* in soft waters: Implications for the biotic ligand model[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2009, 28(8): 1663–1670.
- [31] Steenbergen N T T M, Iaccino F, de Winkel M, et al. Development of a biotic ligand model and a regression model predicting acute copper toxicity to the earthworm *Aporrectodea caliginosa*[J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(15): 5694–5702.
- [32] 和君强, 贺前锋, 刘代欢, 等. 土壤镉食品卫生安全阈值影响因素及预测模型——以长沙某地水稻土为例[J]. 土壤学报, 2017, 54(5): 1181–1194.