

## Originalarbeiten

## Veränderung der Zinktoxizität in Wässern geringer und hoher Wasserhärte unter dem Einfluß eines synthetischen Huminstoffes

Thomas Meinelt, Georg Staaks, Angelika Stüber

Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei Berlin-Friedrichshagen, Müggelseedamm 310, D-12587 Berlin

## Zusammenfassung

Im Ei-Brut-Test mit Zebraäbrblingen wurde die Wechselwirkung von Zink mit einem Huminstoff (HS) bei unterschiedlichen Wasserhärten untersucht. In weichem ungepuffertem Wasser reduziert sich die Toxizität von Zink durch die Zugabe von 5 mg HS/l extrem. Eine Nutzung von HS als Antidot bei Anwesenheit Fische gefährdender Zinkkonzentrationen in weichem Wasser ist somit möglich. In hartem Wasser vermag der Huminstoff durch Wechselwirkung mit den Härtebildnern seine entgiftende Wirkung und den protektiven Effekt hoher Wasserhärten gegen Schwermetalle durch Bindung härtebildender Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) an die Huminsäuren zu verändern. Die Toxizität von Zink gegen Embryonen und Larven des Zebraäbrblings wurde dabei erhöht.

**Schlagwörter:** Huminstoff; Zink; Ei-Brut-Test; Detoxifikation; Wasserhärte; Zebraäbrbling

## Abstract

Changes of Zinc Toxicity in Water of Different Hardness Influenced by a Synthetic Humic Substance

In soft water 5mg/l of a synthetic dissolved humic substance (HS) reduced the toxicity of zinc against zebrafish embryo and larvae. The application of this HS as an antidote against fish hazardous zinc concentrations particularly in soft water is possible. In hard water the HS is able to change the detoxification effect of high water hardness because of the interaction between the calcium and magnesium ions and the HS. In this case the protective effect of high water hardness against trace metals is reduced because of the adhesion of hardness producing ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) with the HS.

**Key words:** Humic substance; zinc; embryo-larval-test; detoxification; water hardness; zebrafish

## 1 Einführung

Zink ist ein Schwermetall, welches in geringen Konzentrationen essentiell ist. Größere Mengen dieses Metalls sind für aquatische Organismen toxisch. In Abwässern der Industrie sowie des Bergbaus, die in die Umwelt gelangen, kommt Zink häufig in potentiell toxischen, Schaden verursachenden Konzentrationen vor (HOLCOMBE et al. 1979). Über die akute und die subchronische Toxizität von Zink, seine Wechselwirkung mit chemisch-physikalischen Wasserparametern und anderen Schwermetallen liegen umfangreiche und zum Teil konträr lautende Ergebnisse vor. HOLCOMBE et al. (1979) weisen nach, daß Zinkkonzentrationen zwischen 2,6 und 534  $\mu\text{g/l}$  in weichem Wasser keine signi-

fikant nachteiligen Effekte auf *Salvelinus fontinalis* ausüben. Gegen Embryonen und Larven von *S. fontinalis* reduzieren 1368  $\mu\text{g Zn/l}$  das Überleben bis zur 12. Woche nach dem Schlupf, nicht jedoch das Wachstum allgemein. EVERALL et al. (1989) führen aus, daß die Verringerung der Zinktoxizität in hartem Wasser, verglichen mit der in weichem Wasser, der erhöhten externen Calciumkonzentration zuzuschreiben ist. Ein sinkender pH-Wert erhöht nach Ansicht dieser Autoren die Toxizität von Zink. Gegenteiles finden BRADLEY und SPRAGUE (1985) sowie CUSIMANO et al. (1986). Sie weisen nach, daß steigende pH-Werte und sinkende Gesamthärtewerte die Zinktoxizität erhöhen. Sowohl die Wasserhärte als auch der pH-Wert in Interaktion mit den Metallionen und den Verbindungen und Bindungsformen, in denen das Metall gegenwärtig vorliegt, verändern die Aufnahmefähigkeit, Metabolisierbarkeit und Exkretionsfähigkeit durch den Fisch. Dies ist auch ein Grund dafür, daß sich die Toxizität vieler Metalle durch die zunehmende Versauerung von Gewässern erhöht. Hohe Wasserhärten bieten deshalb einen gewissen Schutz gegen eine Schadmetalltoxizität (SPEAR 1981; ALABASTER and LLOYD 1982; BRADLEY and SPRAGUE 1985). Nach CALAMARI et al. (1980) scheint Calcium der Hauptmodifikator einer Schwermetalltoxizität zu sein. Der pH-Wert und die Wasserhärte werden weiterhin dafür verantwortlich gemacht, in welcher Zeit und in welchen Verbindungen Zink ausfällt. Die Präzipitate sind für Fische mindergiftig (SPEAR 1981; BRADLEY and SPRAGUE 1985). CAMPBELL und STOKES (1985) führen aus, daß der pH-Wert sowohl die Löslichkeit als auch die Erscheinungsform von Metallen bestimmt. Schwermetalle sind für aquatische Organismen am toxischsten, wenn sie in Ionenform vorliegen (HOWARTH and SPRAGUE 1978).

Von Huminen, gelöstem Detritus und anderen komplexen organischen, aus Humifizierungsprozessen stammenden Verbindungen (Humin- und Fulvosäuren) ist bekannt, daß sie durch ihre Fähigkeit, Metalle zu binden, in der Lage sind, diese zu entgiften bzw. zur Entgiftung von Schadmetallen beizutragen. Bei Anwesenheit komplexierender Verbindungen, insbesondere von Humin- und Fulvosäuren (SIGG und STUMM 1991), werden metallorganische Komplexe ausgebildet. Durch Austausch von Ionen und durch Chelatisierung werden Komplexe erzeugt, in denen die Metalle nicht mehr als Kationen in Erscheinung treten (STEINBERG und MELZER, 1992). Bekannt ist jedoch ebenfalls, daß

Humine in der Lage sind, ausgefällte und komplexierte Metalle zu remobilisieren und in Lösung zu halten.

Im Rahmen einer Mittelprüfung wurde 1991 ein synthetischer Huminstoff (HS) auf seine subchronische Toxizität und Wechselwirkung mit der Zinktoxizität unter Verwendung zweier Testwässer unterschiedlicher chemisch-physikalischer Zusammensetzung untersucht.

Die Aufgabenstellung lautete:

- Ermittlung der Toxizität von HS gegen Fischeier und -larven;
- Prüfung der Eignung von HS als Antidot gegen toxische Zinkkonzentrationen;
- Ermittlung des Einflusses chemisch-physikalischer Wasserparameter auf die Wirkungsweise von HS.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Vorversuche

In Vorversuchen erfolgte die Bestimmung der Toxizität des Huminates gegen Fische. Dazu wurde mit Hilfe eines Ei-Brut-Testes mit dem Zebraabärbling (*Brachydanio rerio* HAMILTON-BUCHANAN) die NOEC von HS ermittelt. Die Versuchsdurchführung verlief in Anlehnung an MEINELT und STÜBER (1991). Es wurden je 20 Eier des Zebraabärblings in 50 ml Testmedium über 144 h mit 20 verschiedenen HS-Konzentrationen dekadischer Abstufung zuzüglich einer Kontrollgruppe exponiert. Zur Sicherung eines ausreichenden Stichprobenumfangs erfolgte die Versuchsdurchführung vierfach. Als Testkriterien kamen die Anzahl lebender Embryonen und Larven sowie Abnormitäten in der Embryonalentwicklung in Betracht. Die Versuchsauswertung erfolgte alle 24 h. Als Verdünnungswasser wurde Berliner Trinkwasser verwendet (chemisch-physikalische Zusammensetzung siehe *Tabelle 1*).

Tabelle 1: Chemisch-physikalische Wasserparameter

	Berliner Trinkwasser	rekonstituiertes Wasser modifiziert nach ISO (1979)
O <sub>2</sub>	> 5 mg/l	> 5 mg/l
pH	7,3	6,75
T	26 ... 27 °C	26 ... 27 °C
Gesamthärte	17,3 °dH	3,5 °dH
	308,8 mg CaCO <sub>3</sub> /l	62,5 mg CaCO <sub>3</sub> /l
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,3 mg/l	0,2 mg/l
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	< 0,02 mg/l	< 0,02 mg/l
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	< 0,1 mg/l	< 0,05 mg/l

HS wurde über Papierfilter filtriert, um die partikulären Bestandteile weitestgehend zu entfernen.

Zur Ermittlung der Zinktoxizität gegen *B. rerio* wurden analog zum o.g. Versuchsansatz je 5 Gruppen von Zebraabärblingseiern mit verschiedenen Zinkkonzentrationen zuzüglich einer Kontrolle mit hartem Berliner Trinkwasser und weichem rekonstituiertem Wasser exponiert.

### 2.2 Hauptversuche

Nach der in den Vorversuchen gewonnenen Kenntnis der toxischen Konzentrationsstufen von Zink wurde in den fol-

genden Tests die entgiftende Wirkung des Huminates untersucht. Zur Prüfung des Einflusses chemisch-physikalischer Wasserparameter kamen zwei Testwässer folgender Charakteristik zum Einsatz:

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ermittlung der NOEC/LOEC

#### 3.1.1 Toxizität von HS

HS wirkt sich bis 900 mg/l nicht signifikant auf die Überlebens- und Schlupfrate von Embryonen und Larven des Zebraabärblings aus, dagegen werden ab 1 g HS/l die Überlebensraten von Embryonen und Larven signifikant verringert (→ *Abb. 1*). Die NOEC<sup>1</sup> von HS ist auf 900 mg/l festzusetzen (LOEC<sup>2</sup> 1000 mg/l).

In den exponierten Gruppen war eine erhöhte Anzahl an verpilzten toten Eiern feststellbar. Die Vermehrung (*Saprolegnia ssp.*) griff, wie auch in anderen Versuchen mit weichem rekonstituiertem Wasser zu beobachten, z.T. auf lebende Eier über. In Bereichen von 50 bis 600 mg/l flokkte der Huminstoff aus, blieb jedoch in Konzentrationen von über 600 mg/l in Lösung. Der pH-Wert erhöhte sich in den exponierten Gruppen von 7–7,5 auf 8–8,5.

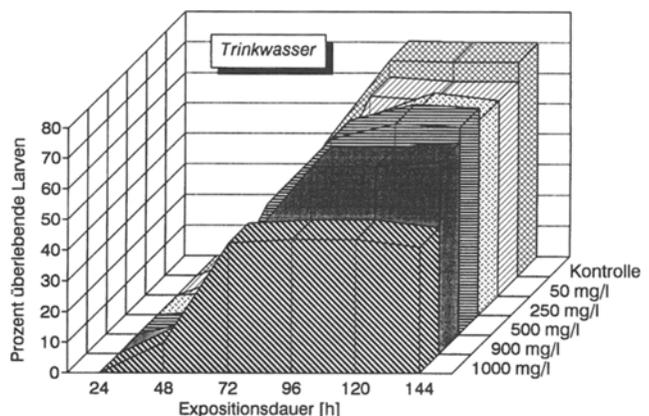
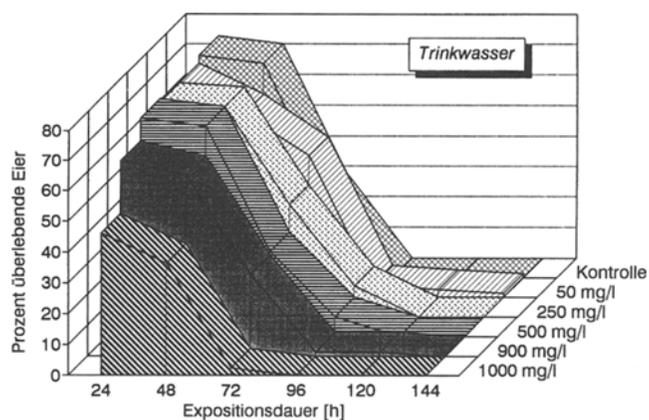


Abb. 1: Embryo-Brut-Test mit *Brachydanio rerio* gegen verschiedene HS-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle

<sup>1</sup> NOEC: No Observed Effect Concentration

<sup>2</sup> LOEC: Lowest Observed Effect Concentration

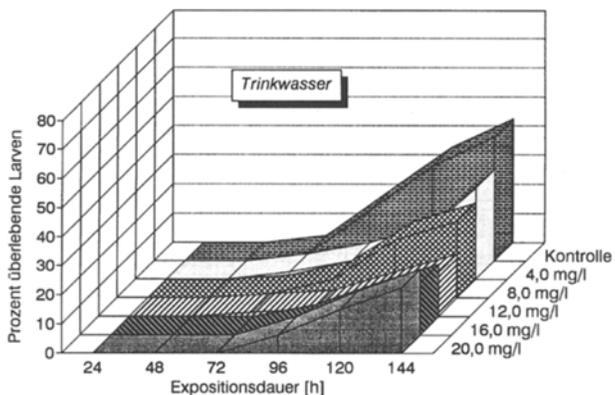
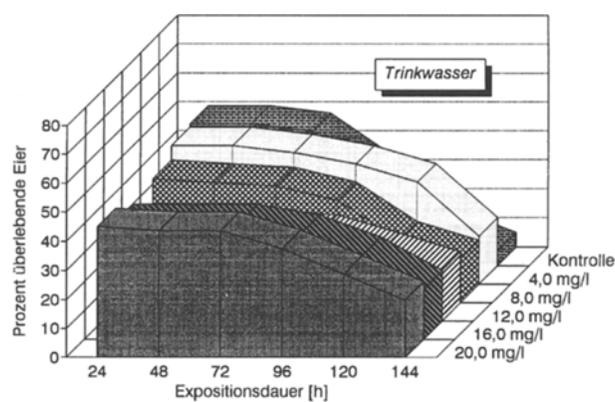


Abb. 2: Embryo-Brut-Test mit *Brachydanio rerio* gegen verschiedene Zink-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle

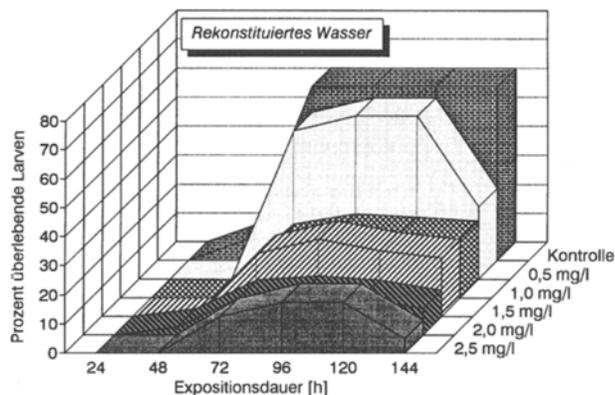
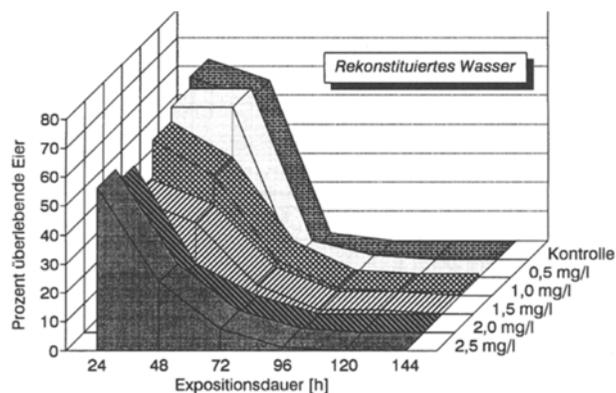


Abb. 3: Embryo-Brut-Test mit *Brachydanio rerio* gegen verschiedene Zink-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle

### 3.1.2 Toxizität von Zink

Zinksulfat war in Konzentrationen bis 20 mg Zn/l bei Verwendung des harten Testwassers gegen Zebraabblingseier und -larven nicht signifikant toxisch ( $\rightarrow$  Abb. 2). In höheren Zinkkonzentrationen waren am Boden der Versuchsgläser Präzipitate feststellbar, welche sich aus den Härtebildnern und Zink zusammensetzen dürften. Da die verwendeten Konzentrationen die von uns ermittelte 96-h-LC50 von 18,18 mg Zn/l (15,62 ... 21,72 mg Zn/l) gegen adulte Zebraabblinge überstieg, wurde von einer weiteren Erhöhung der Zinkkonzentration Abstand genommen.

In weichem rekonstituiertem Wasser erwiesen sich Zinkkonzentrationen von <0,5 mg/l als signifikant toxisch gegen Zebraabblinge ( $\rightarrow$  Abb. 3).

### 3.2 Antidotprüfung

Bei der gemeinsamen Exposition von 20 mg HS/l und verschiedenen Zink-Konzentrationen, welche sich in Vorversuchen als nichttoxisch erwiesen, ist eine Steigerung der Toxizität ab 4 mg Zn/l signifikant ( $\rightarrow$  Abb. 4). Dies äußerte sich durch eine geringere Schlupfrate sowie eine erhöhte Sterblichkeit der Larven nach dem Schlupf. Zinkpräzipitate, wie in den Vorversuchen aufgetreten, sind unter HS-Einfluß nicht zu beobachten.

Die Zugabe von verschiedenen HS-Konzentrationen zu den in Vorversuchen als (wenn auch nicht signifikant) toxisch

bestimmten 2,5 mg Zn/l in rekonstituiertem weichem Wasser zeigt dagegen eine eindeutig entgiftende Wirkung des Huminstoffes ( $\rightarrow$  Abb. 5). Eine Zugabe von nur 5 mg HS/l erhöhte die Überlebensrate der Embryonen und Larven gegen vor dem toxische 2,5 mg Zn/l in weichem Wasser signifikant. Eine weitere Erhöhung der HS-Konzentrationen führte zu keiner Verbesserung der Überlebensraten bei den Zebraabblingen.

## 4 Diskussion

Der synthetische Huminstoff ist nichttoxisch und übt keine negativen Effekte auf Eier und Larven von Zebraabblingen bis zu einer Konzentration von 900 mg/l (NOEC) aus. Der pH-Wert der Testlösung wird durch HS-Einfluß erhöht.

Zink ist in hartem Wasser bei neutralen pH-Werten in Konzentrationen bis 20 mg/l nicht signifikant toxisch und fällt z.T. mit den Härtebildnern aus. Diese Ausfällungen wurden von BRADLEY und SPRAGUE (1985) ebenfalls beobachtet. Unter dem Einfluß des Huminstoffes werden Metallionen der Härtebildner an die Huminkompartimente gebunden, wodurch einerseits das Bindungspotential der Huminkompartimente zu den Schadmetallen verringert und andererseits die Mobilität dieser Metalle erhöht wird.

SIGG und STUMM (1991) verweisen darauf, daß in vielen Wässern die Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen

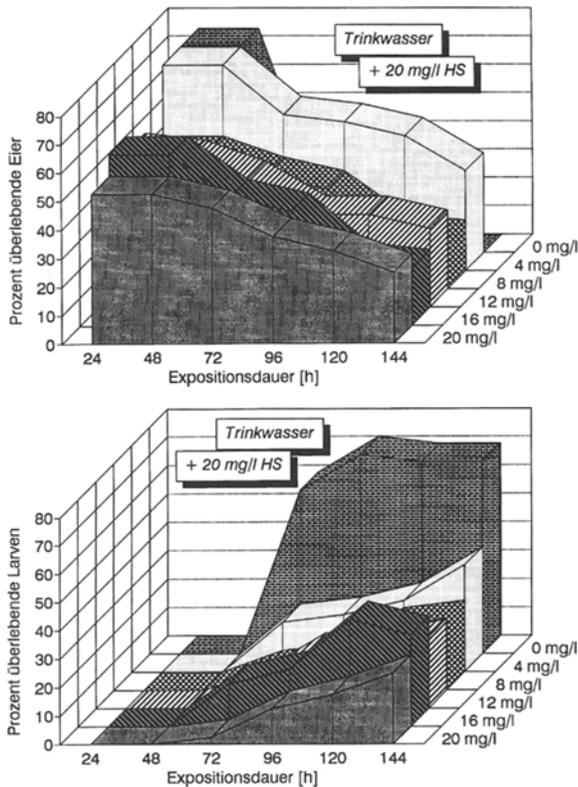


Abb. 4: Embryo-Brut-Test mit *Brachydanio rerio* gegen verschiedene Zink-Konzentrationen in Wechselwirkung mit 20 mg HS/l

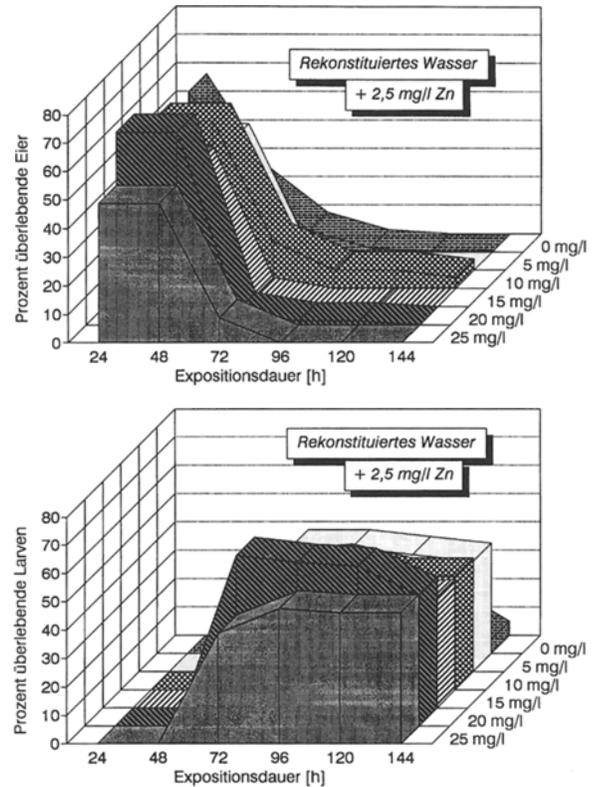


Abb. 5: Embryo-Brut-Test mit *Brachydanio rerio* gegen verschiedene HS-Konzentrationen in Wechselwirkung mit 2,5 mg Zn/l

um viele Größenordnungen höher sind als diejenigen von Spurenmetallen. Auf diesem Wege wird die Komplexbildung Ligand/Spurenmetall durch den Überschuss an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zurückgedrängt, obgleich eine höhere Affinität der Liganden zu anderen Metallionen besteht. Dieser Effekt tritt in weichem Wasser, in welchem nur geringe  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentrationen vorliegen, nicht auf. In hartem Wasser werden unter Anwesenheit von Liganden neben Schwermetallionen auch Härtebildner aus den Ausfällungen gelöst und an die funktionellen Gruppen der Humin- und Fulvosäuren gebunden, so daß höhere Konzentrationen an freien Zinkionen vorliegen. Dies erklärt die gesteigerte Toxizität von Zink und das Fehlen der Präzipitate in hartem Wasser unter HS-Einfluß. Die pH-Werterhöhung könnte zudem eine weitere Steigerung der Zinktoxizität hervorruufen (BRADLEY und SPRAGUE 1985).

In weichem Wasser, in dem bereits 0,5 mg Zn/l hochtoxisch auf Fische wirken, wird die Toxizität durch die HS-Zugabe verringert. Die Zinkionen werden, wie zu erwarten, durch die geringermolekularen funktionellen Gruppen der Humin- und Fulvosäuren komplexiert, verlieren bei der Reaktion mit der organischen Substanz ihren ionischen Charakter und damit einen Großteil ihrer Toxizität (RASHID 1971). Ionen der Härtebildner liegen in diesem weichen Wasser in geringeren Konzentrationen vor, so daß sie nicht in der Lage sind, die Bindungskapazität der HS zu erschöpfen. Die stattfindende pH-Wertsteigerung erhöht die Toxizität der Zinkionen in weichem Wasser nicht. Die Huminstoffe binden demzufolge die anwesenden Zinkionen.

## 6 Literatur

- ALABASTER, J.S.; R. LLOYD: Water quality criteria for freshwater fish. London Butterworths (1982)
- BRADLEY, R.W.; J.B. SPRAGUE: The influence of pH, water hardness, and alkalinity on the acute lethality of zinc to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42 (1985) 731–736
- CALAMARI, D.; R. MARCHETTI; G. VAILATI: Influence of water hardness on cadmium toxicity to *Salmo gairdneri*. Water Res. 14 (1980) 1421–1426
- CAMPBELL, P.G.C.; P.M. STOKES: Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42 (1985) 1497–1503
- EVERALL, N.C.; A.A. MACFARLANE; R.W. SEDGWICK: The interactions of water hardness and pH with the acute toxicity of zinc to the brown trout, *Salmo trutta* L.J. Fisch. Biol. 35 (1989) 27–36
- HOLCOMBE, G.W.; D.A. BENOIT; E.H. LEONHARD: Long term effects of zinc exposures on brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Trans. Amer. Fish. Soc. 108 (1979) 76–87
- HOWARTH, R.S.; J.B. SPRAGUE: Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. Water Res. 12 (1978) 455–462
- MEINELT, T.; A. STÜBER: Der Embryo-Larval-Test. Eine subchronische Testmethode für die Fischwirtschaft. Fischer und Teichwirt 42 (7) (1991) 247–249
- RASHID, M.A.: Role of humic acids of marine origin and their different molecular weight fractions in complexing di- and tri-valent metals. Soil Sci. 111 (1971) 289–306
- SIGG, L.; W. STUMM: Aquatische Chemie. Verlag der Fachvereine Zürich/Teubner Verlag Stuttgart, 2. Auflage (1991) 388
- SPEAR, P.A.: Zinc in the aquatic environment: chemistry, distribution, and toxicology. Nat. Res. Council Can., Assoc. Comm. Sci. Criteria Environ. Qual. Publ. No. 17589 (1981) 143
- STEINBERG, C.; A. MELZER: Stoffkreisläufe in Binnengewässern. In: BESCH, W.-K.; A. HAMM; B. LENHART; A. MELZER; B. SCHARF; C. STEINBERG: Limnologie für die Praxis. Grundlagen des Gewässerschutzes. ecomed-Verlag Landsberg/Lech, 3. Auflage (1992) 15–88