

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2016.05.2015112101

丁腾达, 阚啸林, 吴振华, 等. 砷对绿藻的毒性效应及氧化还原条件的影响[J]. 环境化学, 2016, 35(5): 1084-1089

DING Tengda, KAN Xiaolin, WU Zhenhua, et al. Toxicity of arsenic on green algae and its effect on redox conditions[J]. Environmental Chemistry, 2016, 35(5): 1084-1089

## 砷对绿藻的毒性效应及氧化还原条件的影响\*

丁腾达<sup>1</sup> 阚啸林<sup>2</sup> 吴振华<sup>3</sup> 冯雪娇<sup>4</sup> 尹 钢<sup>4</sup> 倪婉敏<sup>5\*\*</sup>

(1. 深圳大学化学与环境工程学院, 深圳, 518060; 2. 中钢集团马鞍山矿山研究院有限公司, 马鞍山, 243000;  
3. 东阳市环境保护监测站, 东阳, 322100; 4. 江西省科学院科技战略研究所, 南昌, 330096;  
5. 浙江外国语学院科学技术学院化学系, 杭州, 310012)

**摘 要** 选择绿藻中耐毒品种莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)为研究对象,分析三价砷加入对其体系氧化还原条件的影响,研究代表性绿藻莱茵衣藻*C. reinhardtii*对水体三价砷毒性的响应.结果表明,光照或黑暗条件下莱茵衣藻*C. reinhardtii*的生长都会使pH升高,氧化还原电位(Eh)减小.根据pH-Eh分析可知,水体三价砷As(III)大部分以 $H_2AsO_3^-$ 存在, $H_2AsO_3^-$ 加入后pH升高和Eh减小趋势更为明显,并随其浓度增大,Eh会出现缓慢上升趋势.同时,pH与Eh变化也会影响砷对藻类的毒效应,当pH值为10.0—10.5,Eh为-143—-136 mV时,三价砷浓度增大对藻类生长速率没有明显影响,但当pH值为9.5—10.1,Eh为-156—-143 mV时,三价砷浓度增大会明显降低了藻类生长速率.

**关键词** 三价砷, 莱茵衣藻, pH, Eh, 毒效应.

## Toxicity of arsenic on green algae and its effect on redox conditions\*

DING Tengda<sup>1</sup> KAN Xiaolin<sup>2</sup> WU Zhenhua<sup>3</sup> FENG Xuejiao<sup>4</sup>  
YIN Gang<sup>4</sup> NI Wanmin<sup>5\*\*</sup>

(1. College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, 518060, China;  
2. Maanshan Institute of Mining Research Co., SINOSTEEL, Maanshan, 243000, China; 3. Environmental Monitoring Station, Dongyang, 322100, China; 4. Institute of Science and Technology Strategy, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang, 330096, China;  
5. Department of Chemistry, College of Science and Technology, Zhejiang International Studies University, Hangzhou, 310012, China)

**Abstract:** Toxicity-tolerant algae *Chlamydomonas reinhardtii* was chosen to investigate the effect of arsenite As(III) addition on redox conditions of the cultures and its response to the arsenic toxicity in the freshwater system. The results indicated that the growth of *C. reinhardtii* was observed under the conditions of light or darkness, with increased pH values and decreased redox potential values (Eh). According to pH-Eh diagrams of arsenic, the dominant arsenic species in freshwater was  $H_2AsO_3^-$ . The tendency of pH elevation and Eh reduction was more obvious in the presence of As(III), and the Eh values rose slowly with the increased As(III) concentrations. Moreover, the variation of pH and Eh affected the toxic effect of As(III) on algae. Under the condition of pH 10.0 to 10.5 and Eh -143 to -136 mV, no obvious variation of algal growth rate was observed at different As(III) concentrations. However, under the condition of pH 9.5 to 10.1 and Eh -156 to -143 mV, the algal growth rate was evidently inhibited by increased As(III) concentration.

2015年11月21日收稿(Received: November 21, 2015).

\* 国家自然科学基金(41503082)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(41503082).

\*\* 通讯联系人, E-mail: niwanmin@zisu.edu.cn

Corresponding author, E-mail: niwanmin@zisu.edu.cn

**Keywords:** arsenite, *Chlamydomonas reinhardtii*, pH, redox potential, toxicity effects.

砷是自然水体中广泛存在的一种有毒准金属,主要以As(III)和As(V)形态存在<sup>[1]</sup>.近年来,由于人类活动干预,水体中砷浓度日趋增大,尤其是矿区附近水域砷浓度明显超过水体砷浓度标准( $>50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),威胁水生生物安全,甚至危害人类健康,从而引发了更多学者对水体砷安全的关注<sup>[2-3]</sup>.砷的毒性研究已涉及多种水生生物,如氧化/还原细菌、无脊椎动物等<sup>[4-5]</sup>,藻类作为水体重要的初级生产者以及引起水体富营养化的主要构成,其与砷的化学行为关系研究对水体生态系统的稳定安全尤为重要<sup>[6]</sup>.然而,不同藻类对砷毒性的响应也会有所差别.研究表明,砷酸盐浓度大于 $7.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,衣藻细胞 *Chlamydomonas* sp.的生长仅仅受到轻微的抑制作用<sup>[7]</sup>,但普通小球藻 *Chlorella vulgaris* 的生长却受到严重的抑制作用<sup>[8]</sup>.

另外,砷对水生生物的毒性还与其形态有关,而其形态则主要受水体 pH 和氧化还原电位(Eh)的影响<sup>[9]</sup>.已有研究表明,As(III)对藻类的毒性强于As(V),但不同藻类对不同形态砷的毒性响应也有所差别<sup>[10-11]</sup>.pH 会通过影响砷在水体中的离子形态而引起砷毒性的变化,氧化水体中,当  $\text{pH} < 6.9$  时砷主要以  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  形态存在, $\text{pH} > 6.9$  时则以  $\text{HAsO}_4^{2-}$  为主要形态;而还原性水体或厌氧环境中, $\text{pH} < 9.2$  时,砷主要以  $\text{H}_3\text{AsO}_3^0$  存在, $\text{pH} > 9.2$  时则以  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  形态存在<sup>[12]</sup>.Zhang 等<sup>[13]</sup> 研究表明  $\text{H}_3\text{AsO}_3$  对绿藻的毒性比  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  强.这些都表明水体 pH 及 Eh 的变化能够影响水体中砷的形态及离子形式,从而影响其对水生生物的毒性.

研究表明,莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) 具有预测痕量金属在水体环境中的毒性和生物利用性的作用,且对重金属具有很好的耐受性<sup>[14]</sup>.因此,为明确典型氧化还原条件对绿藻耐砷行为的影响,本研究以亚砷酸钠为代表化合物,选用水体中典型绿藻莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 为受试对象,通过观察水体 pH 及 Eh 变化和藻类生长速率来研究藻类对亚砷酸盐毒性的响应,为含砷水体水质监测及存在的生态风险预测提供基础资料.

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验材料

实验所用试剂均为分析纯.所有溶液均利用超纯水系统(密理博有限公司,美国)纯化后的超纯水进行配制.所用亚砷酸钠购自衡阳水口山矿务局有限公司,溶于超纯水后配制  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  储备液.其他配置培养基试剂均购自国药集团化学试剂有限公司.莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库.

### 1.2 藻类培养

将莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 接种于 500 mL 的 BG11 培养基中,培养条件为:光强 2000 lux,光暗比 12 h:12 h,温度  $22\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,pH 7.0,每天摇动锥形瓶 3 次.在藻类进入指数生长期时,向每只 150 mL 锥形瓶中加入同体积培养基和培养后处于对数增长期的藻液,使藻细胞浓度为  $1\times 10^5$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$  左右,再分别加入亚砷酸钠溶液(终浓度分别为 0、0.03、0.06、0.3、3、30、60  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液),并设置 3 个平行组,摇匀,置于光照培养室下培养 96 h,每 24 h 取样 1 次测定各项指标.

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 光照和黑暗条件下藻类生长试验

设置 3 组含莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 培养体系,每组设置 3 个平行,分别为对照组、光照组和黑暗组(用锡纸包裹).暴露在光照下 10 min、7 h 后,测定每组藻类培养体系中氧化还原条件的变化,研究藻类培养体系中氧化还原条件的变化.同时,加入  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  三价砷后,观察光照和黑暗条件下藻类培养体系中的氧化还原条件的变化.

#### 1.3.2 砷的绿藻毒性试验

设置 7 组含莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 培养体系,每组设置 3 个平行,向每组藻类培养体系中加入三价砷,最终形成浓度分别为 0、0.03、0.06、0.3、3、30、60  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液,分别在暴露 24、48、72 h 后测定藻类

生长速率和叶绿素 a 含量以及氧化还原条件的变化,分析莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 对三价砷的耐受性及其与氧化还原条件变化的关系.

#### 1.4 测定方法

##### 1.4.1 培养基中 pH 及 Eh 的测定

取 10 mL 藻样,利用氧化还原电位计( PHS-9V, 杭州华光电子厂)测定所有处理组中藻类培养基中的 pH 及 Eh 变化.

##### 1.4.2 藻生长量的测定

普通显微镜下利用血球计数板对莱茵衣藻细胞进行计数,每 24 h 测定 1 次.之后根据  $\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / (t - t_0)$  计算藻类生长速率  $\mu$ ,其中  $N_t$  为藻类生长  $t$  时间后的藻细胞数, $N_0$  为藻类在  $t_0$  时间的藻细胞数.

##### 1.4.3 叶绿素 a 的测定

叶绿素 a (Chl-a)的测定根据 Jespersen 和 Christoffersen<sup>[15]</sup>报道的热乙醇法进行测定,即藻液经过抽压设备在 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜上过滤后,在  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  下保存至少 24 h 后,利用热乙醇进行萃取后,在 665、750 nm 下运用分光光度计(UV2450, 岛津)进行测定.

## 2 结果与讨论(Results and discussion)

### 2.1 莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 培养体系中氧化还原条件的变化

光照会影响水体水生植物的光合作用从而改变水体氧化还原条件.表 1 是光照和黑暗条件下加入莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 后短时间内水体 pH 及氧化还原电位(Eh)的变化.从表 1 可以看出,光照条件下,当莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 加入 10 min 时水体 pH 上升了 3.2%,Eh 下降了 11.8%,7 h 后水体 pH 下降了 17.6%,Eh 上升了 65.3%;而在黑暗条件下,水体 pH 和 Eh 在两个时间段都分别呈现下降和上升的趋势.

表 1 莱茵衣藻培养体系中 pH 及 Eh 变化的影响

Table 1 The effect of *C. reinhardtii* on the variations of pH and Eh

莱茵衣藻 <i>C. reinhardtii</i>	Control		10 min		7 h	
	pH	Eh	pH	Eh	pH	Eh
光照 Light	9.86	-135.3 mV	3.2% $\uparrow$	11.8% $\downarrow$	17.6% $\downarrow$	65.3% $\uparrow$
黑暗 Dark	9.86	-135.3 mV	5.0% $\downarrow$	8.4% $\uparrow$	20.6% $\downarrow$	70.4% $\uparrow$

藻类在光照条件下会发生光合作用而改变水体氧化还原条件,其中光反应瞬时发生,而暗反应是酶促反应,时间较为缓慢.从图 1 中可以看出,光反应阶段利用  $\text{H}^+$  合成还原型辅酶 II (NADPH) 为暗反应提供能量<sup>[16]</sup>,这就解释说明了光照 10 min 时水体 pH 升高,而 NADPH 提供的还原反应导致水体 Eh 下降.当光照 7 h 后,水体氧气充足状态下氧化反应占主导地位,Eh 上升,而经过暗反应后  $\text{H}^+$  重新释放到水体中,导致水体 pH 下降.而在黑暗条件下,藻类光合作用不能进行,有氧条件下藻细胞内有机物在酶作用下氧化分解来释放能量,无氧条件下有机物也会通过脱氢脱羧等方式氧化分解,这也就解释了莱茵衣藻培养体系在黑暗条件下随着时间延长 Eh 上升越大,pH 下降也越大.

从上述分析中可知,长时间的光照或黑暗条件下莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 培养体系中的 pH 和 Eh 分别呈现下降和上升的趋势.而向莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 培养体系中加入亚砷酸钠后,由图 1 可以看出,光照条件下进入藻培养体系中的三价砷会与氧结合形成五价砷,从而致使培养体系中的 Eh 继续升高.通过 7 h 三价砷的暴露实验可以看出(图 2),三价砷加入后,pH 和 Eh 随时间分别呈现上升和下降趋势,且随着时间延长,上升和下降幅度加大,特别是在光照条件下更为明显.这是由于三价砷加入藻类培养体系后,会与氢离子结合而使体系 pH 升高.光照条件下形成的五价砷会因藻类体系始终处于还原条件下而再次被还原,从而随着时间的延长使含砷体系中 Eh 与对照相比下降趋势越明显.通过上述分析可知,若在正常光照黑暗交替条件下,藻液中加入三价砷后起先会由于光合作用产生的氧而被氧化,但随后仍然被还原成三价砷,主要以  $\text{H}_2\text{AsO}_3$  形态存在.

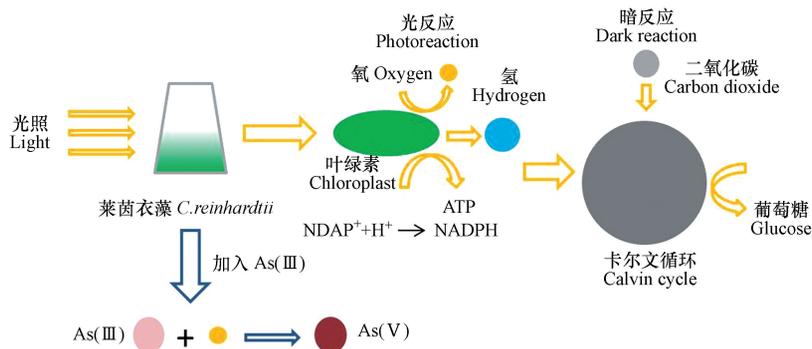


图 1 光照条件下莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 的光合作用流程

Fig.1 The photosynthesis of *C. reinhardtii* under the condition of light

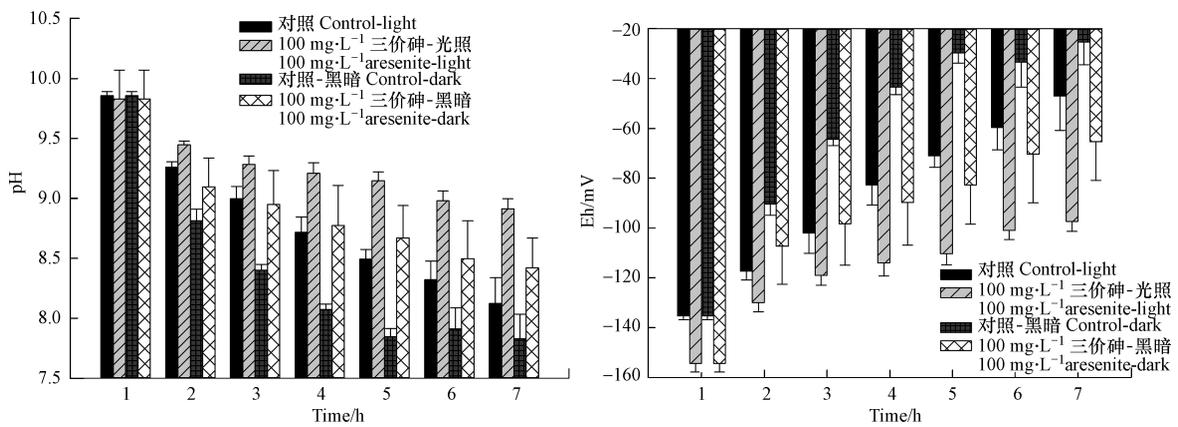


图 2 光照和黑暗条件下三价砷对培养基中 pH 及 Eh 的影响

Fig.2 Effects of arsenite on pH or Eh under the conditions of light and darkness

### 2.2 含砷藻类培养体系中氧化还原条件的变化

通过上述单独以光照和黑暗条件下培养基中 pH 及 Eh 变化研究可以得知,三价砷加入藻液体系后短时间内主要以  $H_2AsO_3^-$  形态存在,为了研究其对藻类生长的影响,在正常光照黑暗交替条件下研究不同浓度砷引起的氧化还原条件变化,分析氧化还原条件变化对砷形态的影响.图 3 是不同浓度三价砷加入莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 培养体系后引起的水体 pH 和 Eh 的变化.

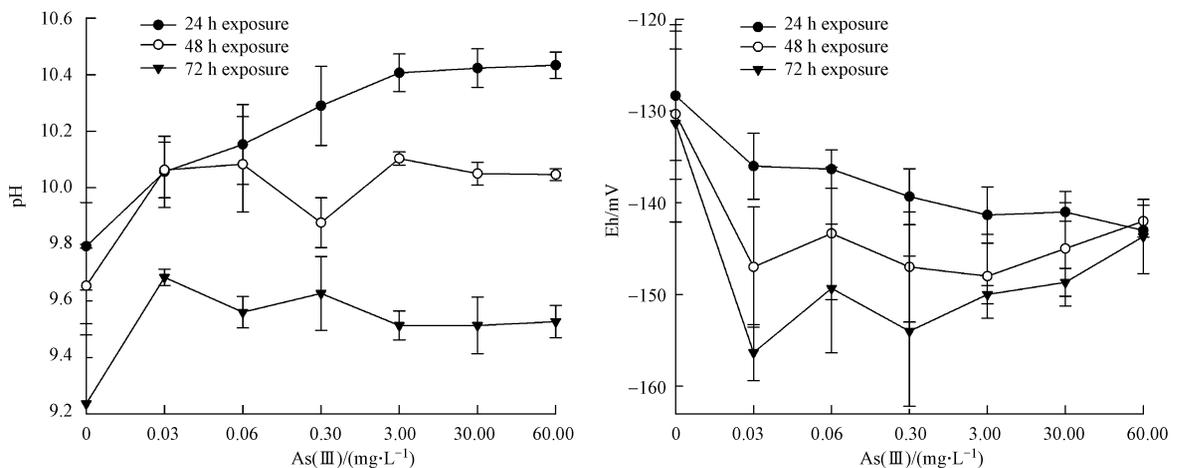


图 3 莱茵衣藻 (*C. reinhardtii*) 存在条件下  $As(III)$  加入培养基中 pH 及 Eh 变化

Fig.3 The variations of pH and Eh after the injection of  $As(III)$  in the presence of *C. reinhardtii*

结果表明,72 h 暴露时间内,培养基中 pH 值范围为 9.2—10.5, Eh 范围为-158—-127 mV,但 pH 和 Eh 随着砷浓度的增加呈现相反的趋势,其变化趋势随暴露时间的变化而变化.暴露 24 h 内,pH 随着砷浓度的增加而增加,而 Eh 却随着砷浓度增加而减小,随着暴露时间延长,pH 与 Eh 的变化趋势正好相反.水体 pH 及 Eh 的变化必然会影响到水体中砷形态而影响砷毒性<sup>[17]</sup>.根据水体砷形态分布的 pH-Eh 图<sup>[18]</sup>,该 pH 及 Eh 范围内三价砷主要以  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  形态存在,而五价砷则主要以  $\text{HAsO}_4^-$  形态存在.随着暴露时间的延长,水体 pH 及 Eh 再次发生变化.从砷处理组与对照组比较来看,pH 一直呈现上升的趋势,而 Eh 在暴露 48h 后在高浓度砷处理组 ( $> 0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 中呈现缓慢上升趋势,特别是在  $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  含砷处理组中,随着时间的延长 Eh 基本不变,说明低浓度砷在藻类培养体系中其五价砷形态易被还原而导致氧化还原电位下降.

### 2.3 三价砷对莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 生长的影响

从上述分析可以得知,三价砷加入藻液体系后主要以  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  形态存在,因此本文主要研究  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  对藻类生长的影响.莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 因其生长迅速、光合效率高而成为被广泛研究的典型绿藻之一,为了了解三价砷对水体水生生物的健康安全威胁,本文以莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 为例,研究不同浓度  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  的毒效应.图 4 从其生长速率及叶绿素 a (Chl-a) 含量两个方面阐述了不同浓度  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  对莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 的毒性效应.

结果表明,暴露 24 h 后,莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 的生长速率随着砷浓度增大而下降 (图 4,  $\text{EC}_{50} = 30.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).这与 Hoffmann 和 Schenk<sup>[19]</sup> 报道的亚砷酸对水稻毒性出现时的时间结果相一致.暴露 48 h 后,高浓度砷 ( $> 0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理下莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 生长速率的下降主要是由于砷的毒性引起而非 pH 的变化,因莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 生长对 pH 有很强的适应性,大约为 4—12<sup>[20]</sup>,但 pH 的变化会通过改变某些重金属形态而影响其毒性<sup>[21]</sup>.Wang 等<sup>[22]</sup> 表明正常条件下三价砷对莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 毒性的  $\text{EC}_{50}$  为  $1763 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $132.23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),同时发现三价砷浓度很低时其会大量氧化成五价砷.而五价砷对莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 毒性的  $\text{EC}_{50}$  为  $33.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[23]</sup>,表明在暴露 24 h 内培养体系中主要以三价砷为主,莱茵衣藻的耐受性比较强,而在 24 h 后,逐渐被氧化为五价砷,从而导致其  $\text{EC}_{50}$  升高.通过 SPSS 分析发现,Chl-a 含量与砷浓度没有显著性差异 (图 4),表明该浓度范围的三价砷对藻类叶绿体损伤较小.

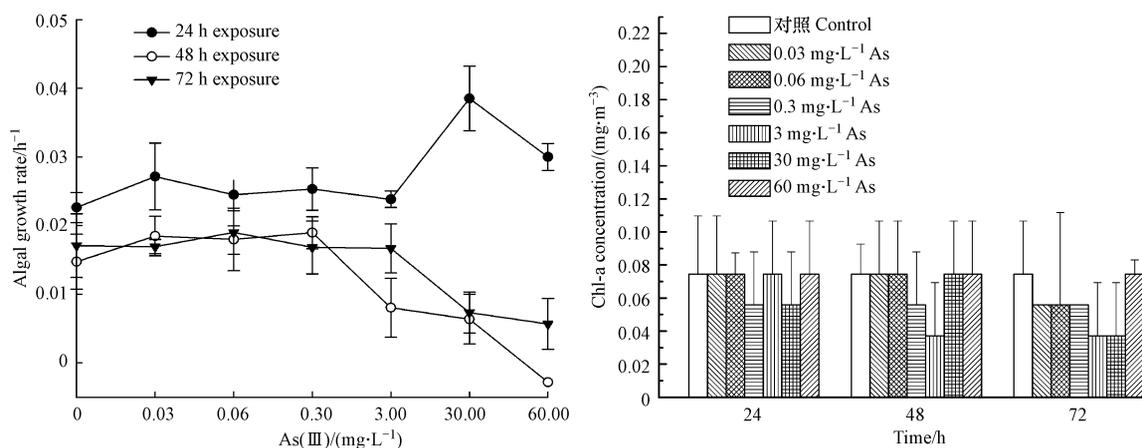


图 4 不同砷浓度暴露下莱茵衣藻生长速率及藻内叶绿素 a 含量

Fig.4 The growth rate and Chl-a content in *C. reinhardtii* at different arsenic concentrations

## 3 结论 (Conclusion)

采用水生态毒理学方法,选择典型绿藻莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 为研究对象,研究莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 对亚砷酸钠毒性的响应,重点阐明砷存在条件下氧化还原条件对莱茵衣藻生长行为的影响.

(1)光照或黑暗条件下莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 的生长都会使 pH 升高, Eh 减小, 并且加入三价砷 ( $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$ ) 后该趋势更为明显, 但随着三价砷浓度增大, Eh 出现缓慢上升趋势。

(2)砷污染下藻类的耐毒行为与水体砷形态相关. 随着三价砷 ( $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$ ) 浓度的增大, 其对莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 的生长速率抑制增大, 其  $\text{EC}_{50}$  为  $30.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

#### 参考文献 (References)

- [ 1 ] LIU C P, LUO C L, YUN G, et al. Arsenic contamination and potential health risk implications at an abandoned tungsten mine, southern China[J]. Environmental Pollution, 2010, 158: 820-826.
- [ 2 ] MANDAL S, PADHI T, PATEL R K. Studies on the removal of arsenic ( III ) from water by a novel hybrid material [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 192: 899-908.
- [ 3 ] 朱晓龙, 刘妍, 甘国娟, 等. 湘中某工矿区土壤及作物砷污染特征及其健康风险评估[J]. 环境化学, 2014, 33(9): 1462-1468.  
ZHU X L, LIU Y, GAN G J, et al. Arsenic contamination and assessment of potential human health risk of soil and crops systems at an industrial and mining area in central Hunan[J]. Environmental Chemistry, 2014, 33(9): 1462-1468 (in Chinese).
- [ 4 ] CHANG J S, REN X H, WOONG K K. Biogeochemical cyclic activity of bacterial arsB in arsenic-contaminated mines [J]. Journal of Environmental Science, 2008, 20: 1348-1355.
- [ 5 ] SCHALLER J, MKANDAWIRE M, DUDEL E G. Heavy metals and arsenic fixation into freshwater organic matter under *Gammarus pulex* L. influence [J]. Environmental Pollution, 2010, 158: 2454-2458.
- [ 6 ] HANSEN H K, RIBEIRO A, MATEUS E. Biosorption of arsenic ( V ) with *Lessonia nigrescens* [J]. Minerals Engineering, 2006, 19: 486-490.
- [ 7 ] TUZEN M, SARI A, MENDIL D, et al. Characterization of biosorption process of As( III ) on green algae *Ulothrix cylindricum* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 165: 566-572.
- [ 8 ] TUAN L Q, HUONG T T T, HONG P T A, et al. Arsenic ( V ) induces a fluidization of algal cell and liposome membranes [J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22: 1632-1638.
- [ 9 ] MUDHOO A, SHARMA S K, GARG V K, et al. Arsenic: an overview of applications, health, and environmental concerns and removal processes [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2011, 41: 435-519.
- [ 10 ] KARADJOVA I B, SLAVEYKOVA V I, TSALEV D L. The biouptake and toxicity of arsenic species on the green microalga *Chlorella salina* in seawater [J]. Aquatic Toxicology, 2008, 87: 264-271.
- [ 11 ] GUO P, GONG Y, WANG C, et al. Arsenic speciation and effect of arsenate inhibition in a *Microcystis aeruginosa* culture medium under different phosphate regimes [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2011, 30(8): 1754-1759.
- [ 12 ] WANG S, MULLIGAN C N. Occurrence of arsenic contamination in Canada: 3127 sources, behavior and distribution [J]. Science of the Total Environment, 2006, 366: 701-721.
- [ 13 ] ZHANG J Y, DING T D, ZHANG C L. Biosorption and toxicity responses to arsenite ( As [ III ] ) in *Scenedesmus quadricauda* [J]. Chemosphere, 2013, 92: 1077-1084.
- [ 14 ] FLOUTY R, ESTEPHANE G. Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: A comparative study [J]. Journal of Environmental Management, 2012, 111: 106-114.
- [ 15 ] JESPERSEN A M, CHRISTOFFERSEN K. Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent [J]. Archiv Fur Hydrobiologie, 1987, 109: 445-454.
- [ 16 ] WEISS-MAGASIC C, LUSTIGMAN B, LEE L H. Effect of mercury on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1997, 59: 828-833.
- [ 17 ] LU P, ZHU C. Arsenic Eh-pH diagrams at 25°C and 1 bar [J]. Environmental Earth and Science, 2011, 62: 1673-1683.
- [ 18 ] BARD AJ, PARSONS R, JORDAN J. Standard Potentials in Aqueous Solution [M], Marcel Dekker: New York, 1985.
- [ 19 ] HOFFMANN H, SCHENK M K. Arsenite toxicity and uptake rate of rice (*Oryza sativa* L.) *in vivo* [J]. Environmental Pollution, 2011, 159: 2398-2404.
- [ 20 ] LUSTIGMAN B, LEE LH, WEISS-MAGASIC C. Effect of cobalt and pH on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1995, 55: 65-72.
- [ 21 ] LEE L H, LUSTIGMAN B, CHU I, et al. Effect of aluminum and pH on the growth of *Anacystis nidulans* [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1991, 46: 720-726.
- [ 22 ] WANG N X, HUANG B, XU S, et al. Effects of nitrogen and phosphorus on arsenite accumulation, oxidation, and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 157: 167-174.
- [ 23 ] WANG N X, LI Y, DENG X H, et al. Toxicity and bioaccumulation kinetics of arsenate in two freshwater green algae under different phosphate regimes [J]. Water Research, 2013, 47: 2497-2506.