

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20180905003

梁丁元, 任金乾, 范文宏. 不同分子量的腐殖酸存在下2种无机砷的生物毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(2): 206-213

Liang D Y, Ren J Q, Fan W H. Arsenite and arsenate toxicity to *Daphnia magna* on the coexistence of humic acid with different molecular weights [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(2): 206-213 (in Chinese)

不同分子量的腐殖酸存在下2种无机砷的生物毒性效应研究

梁丁元¹, 任金乾¹, 范文宏^{1,2,*}

1. 北京航空航天大学, 空间与环境学院, 北京 102206

2. 北京航空航天大学, 大数据精准医疗高精尖创新中心, 北京 100191

收稿日期: 2018-09-05 录用日期: 2018-10-23

摘要: 水环境中天然有机质会与砷形成络合物, 进而影响砷的迁移、转化和生物毒性。研究利用超滤方法将腐殖酸(humic acid, HA)分为5个不同分子量的组分, 以大型溞为受试生物, 探究了不同分子量HA存在下砷对大型溞的毒性效应。结果表明, 不同分子量的HA均缓解了As(III)和As(V)对大型溞的氧化应激损伤和细胞膜损伤, 并降低了砷对MT的诱导量。其中1~30 kDa的HA对砷的缓解效果最好, <1 kDa的HA毒性缓解效果最差, 可能的原因是HA与砷的络合增加溶液中络合态砷的含量, 而络合态砷难以进入细胞并被生物利用。不同分子量的HA对砷毒性的缓解差异与其跟砷的络合比例不同有关。

关键词: 无机砷; 腐殖酸; 分子量; 氧化应激; 金属硫蛋白; 络合

文章编号: 1673-5897(2019)2-206-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Arsenite and Arsenate Toxicity to *Daphnia magna* on the Coexistence of Humic Acid with Different Molecular Weights

Liang Dingyuan¹, Ren Jinqian¹, Fan Wenhong^{1,2,*}

1. School of Space and Environment, Beihang University, Beijing 102206, China

2. Beijing Advanced Innovation Center for Big Data-Based Precision Medicine, Beihang University, Beijing 100191, China

Received 5 September 2018 accepted 23 October 2018

Abstract: Natural organic matter (DOM) may affect the migration, transformation and bioavailability of arsenic in aquatic environment by forming As-DOM complex. Using *Daphnia magna* as the case, humic acid (HA) was divided into 5 groups by ultrafiltration to determine the impacts from different molecular weights on arsenic toxicity in aquatic environment. The results indicated that all HA fractions can significantly alleviate the oxidative stress and membrane damage induced by As, and in the meanwhile reduce MT concentration. In particular, HA from 1-30 kDa fraction had the most remarkable alleviation effect, while the alleviation effect of HA (<1 kDa) was the lowest. The possible reason is that the complexation of HA with arsenic could increase As-DOM concentration in exposed medium, which is difficult to enter cells and be assimilated by organism. The effects of HA in alleviating arsenic toxicity with different molecular weights were related to complexation ratios.

基金项目: 国家自然科学基金(No.51778031)

作者简介: 梁丁元(1996-), 女, 硕士研究生在读, 研究方向为砷生态毒理, E-mail: aiychenhe@163.com;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: fanwh@buaa.edu.cn

Keywords: inorganic arsenic; humic acid; molecular weight; oxidative stress; metallothionein; complexation

砷作为一种在水环境中广泛存在的类金属污染物,可以对人和其他生物造成慢性和急性毒性影响^[1-2],慢性砷中毒更是严重的人类健康的公共卫生问题。砷的毒性与化学形态有很大关系,通常来说无机砷的毒性大于有机砷,三价砷的毒性大于五价砷。水环境中的砷主要以无机的砷酸盐(As(V))和亚砷酸盐(As(III))的形式存在^[3]。由于砷在分子水平上的毒性作用机制十分复杂,尚不完全明确,其中砷诱导的氧化应激、膜损伤、金属敏感蛋白等毒性作用一直受到广泛关注。砷可以通过干扰生物体的氧化/抗氧化平衡,产生过量的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),继而引发细胞内多条分子通路的改变,并最终导致细胞坏死或凋亡^[4]。例如, Kharroubi 等^[5]研究发现 As(V)可以增加活性自由基,使线粒体功能紊乱,并引发线粒体氧化损伤,最终导致细胞死亡。砷对水生生物毒性可能会受到诸多环境因素的影响,例如氧化还原电位、有机质、磷酸盐、胶体及水体中其他污染物等^[6]。

天然有机质作为一类成分复杂的有机混合物,包括大分子的蛋白、腐殖质类物质和小分子的脂质、氨基酸等^[7],广泛存在于水生生态系统中,浓度范围在 1~40 mg·L⁻¹之间^[8],有机质可以与水体中的重金属离子(Cu、Cd、Al 等)发生复杂的相互作用,从而影响重金属对水生生物的生物毒性^[9-10]。Dutton 和 Fisher^[11]发现随着腐殖酸(humic acid, HA)浓度的增加,As(V)在底鳉(*Fundulus heteroclitus*)体内的生物积累也随之增加,Zhang 等^[12]发现天然有机质还可能通过阻碍 As(III)在硅藻细胞的内化起到缓解毒性的效果。事实上有机质对金属毒性的影响除了与有机质浓度有关外,研究者们发现有机质的性质和来源对重金属的毒性影响程度有很大差异^[13-14],例如, Al-Reasi 等^[13]研究发现分子量更大的、颜色更暗的、更亲脂的、更多芳香族的陆源有机质对铜的毒性缓解作用更显著。在诸多的性质之中有机质分子量可能是影响重金属毒性程度的关键因素之一,而不同分子量的有机质对砷的毒性影响报道较为少见。

本研究利用超滤方法获得了5种不同分子量的HA,并以大型溞为受试生物,研究了不同分子量的有机质对2种无机砷的大型溞氧化应激、细胞膜损伤和金属硫蛋白等生物毒性效应的影响,探讨不同分子量的有机质对砷的生物毒性的影响机制,研究

结果可为水生态系统中砷的生态风险评估和污染控制提供指导。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 材料的来源、制备与表征

亚砷酸钠(NaAsO₂)(As(III))和砷酸氢二钠(Na₂HAsO₄·7H₂O)(As(V))购买自 Sigma-Aldrich 公司,精确称取 0.1 g 的亚砷酸钠和砷酸氢二钠溶于 100 mL 超纯水,配制成 1 g·L⁻¹的母液,在 4 °C 条件下避光保存备用。HA 购买自 Sigma-Aldrich 公司,精确称取 0.5 g HA 溶于 500 mL 0.02 mol·L⁻¹的氢氧化钾溶液。搅拌充分溶解后,用 0.45 μm 的滤膜(滤膜用前已烘干至恒重)过滤去除未溶解的有机质颗粒和杂质,将滤膜和残渣烘干后称重,差减法得到 HA 的浓度约为 0.66 g·L⁻¹,过滤后的 HA 溶液在 4 °C 条件下避光保存。

利用 Millipore 公司生产的 Amicon 8400 型超滤杯进行分级,采用 100、30、10 和 1 kDa 尺寸的滤膜。从高分子量(100 kDa)到低分子量(1 kDa)逐级过滤,浓缩因子均为 6:1,分级过程采用高纯氮气作为压力驱动,最大压力为 0.2 MPa。得到 5 种不同分子量的 HA 溶液,分别为>100 kDa(记为 UF1)、30~100 kDa(记为 UF2)、10~30 kDa(记为 UF3)、1~10 kDa(记为 UF4)和<1 kDa(记为 UF5),未分级的 HA 记为 UF0,溶液在 4 °C 条件下避光保存备用。测定得到的不同分子量的 HA 溶液中的有机碳含量。

1.2 受试生物大型溞的培养

实验采用大型溞(*Daphnia magna*)为受试生物,具有实验室内易培养,繁殖周期短,对毒物敏感度较高,毒理学数据充足等优点,是环境科学领域研究的一种重要模式生物。大型溞的培养温度为(23±1) °C,培养密度为 8~10 mL/只,光暗比为 16 h : 8 h,光照强度在 3 500~4 000 Lux 之间。大型溞用经过 1.2 μm 的玻璃纤维滤膜过滤的京密引水渠的水作为培养液。以莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)作为大型溞的食物,喂食频率为 1 次/天,每 2 d 换一次水。14 d 左右的大型溞用于接下来的实验。实验之前,采用国际标准《水质—大型蚤运动抑制的测定 ISO 6341:1982》中规定的方法对<24 h 的小溞进行灵敏性试验^[15]。

1.3 暴露实验

暴露溶液采用的是简化的 SM7 培养基(不包括

乙二胺四乙酸二钠、重金属和维生素),加入不同分子量 HA 溶液,浓度统一调整为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,2 种无机砷的浓度是 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。不同分子量的 HA 与砷混合孵育 24 h 后,利用微分脉冲极谱法测定溶液中不稳定态的 As(III)和 As(V)的浓度,通过差减法计算与 HA 络合的砷的浓度,同时在 100 mL 暴露液中加入 40 只 14 d 左右健康状况良好的大型蚤,以 SM7 培养基作为空白对照组,设置了砷单独暴露、不同分子量的 HA 与砷共存的实验组,每组设置 3 个平行,暴露时间 48 h,期间不换水,不喂食。暴露结束后,测定大型蚤体内的砷生物积累、金属硫蛋白(metallothionein, MT)含量、 Na^+/K^+ -ATP 酶(Na^+/K^+ -ATPase)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, T-SOD)活力,丙二醛(malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量等指标。MT 采用银饱和法测定; Na^+/K^+ -ATP 酶、T-SOD、MDA 和 GSH 采用从南京建成生物试剂公司购买的试剂盒测定。

1.4 统计学分析

实验数据利用 origin 8.0 进行绘图,并利用 SPSS statistics 22 进行统计分析,利用单因素方差分析(ANOVA)分析显著性差异, $P < 0.05$ 被认为具有统计学差异。

2 结果(Results)

2.1 不同分子量的 HA 对砷诱导 MT 含量的影响

暴露于不同无机砷 48 h 后,在不同分子量的 HA 存在/不存在时,大型蚤体内的 MT 含量如图 1 所示。与对照组相比,As(III)和 As(V)的单独暴露均能够显著诱导大型蚤体内 MT 的产生。在相同浓度下 As(III)暴露诱导的 MT 的含量显著高于 As(V)诱导产生的量($P < 0.01$)。未分级的 HA(UF0)和 5 种不同分子量的 HA(UF1 ~ UF5)的存在均显著降低了大型蚤体内砷诱导产生的 MT 含量。但 2 种砷的降低程度不同,As(III)和 HA 共同暴露诱导的 MT 显著高于空白水平,不同分子量的 HA 之间有一定差别,尽管 UF1 ~ UF5+As(III)暴露组 MT 的诱导量与 UF0 相比无显著性差异,但分子量在 10 ~ 30 kDa 的 HA(UF3)对砷诱导 MT 含量的降低显著,高于 <1 kDa(UF5)和 >100 kDa(UF1)的 HA 对砷诱导 MT 含量的影响。As(V)和 HA 共同暴露诱导的 MT 与空白对照组相比没有显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 不同分子量的 HA 对砷致大型蚤细胞膜损伤的影响

不同暴露组中大型蚤体内 Na^+/K^+ -ATP 酶的活

力如图 2 所示,As(III)和 As(V)的暴露显著降低了 Na^+/K^+ -ATP 酶的活力,有机质的存在能够缓解砷导致的 Na^+/K^+ -ATP 酶活力的抑制,其中 UF3 和 UF4

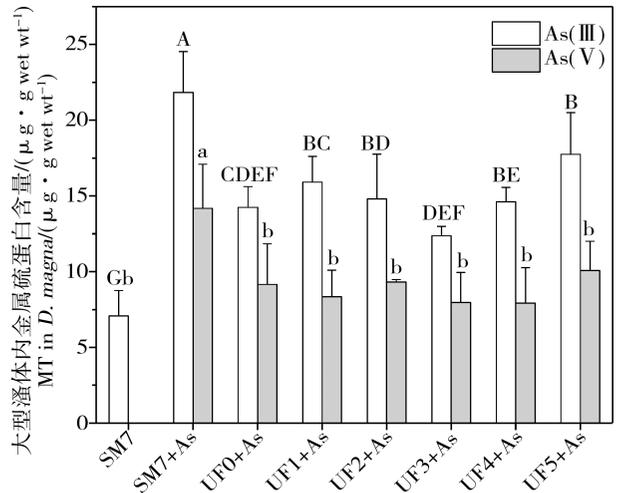


图 1 不同暴露组中大型蚤体内金属硫蛋白(MT)的含量注:SM7 为人工配制的背景水样,UFO、UF1、UF2、UF3、UF4 和 UF5 分别表示未分级的、>100 kDa、30~100 kDa、10~30 kDa、1~10 kDa 和 <1 kDa 的腐殖酸。不同小写字母表示五价砷暴露组别间的显著性差异,不同大写字母表示三价砷暴露组别间的显著性差异。下同。

Fig. 1 Metallothionein (MT) concentration of *D. magna* in different exposed groups

Note: The artificial background medium is SM7. The humic acid of unfractionated, >100 kDa, 30-100 kDa, 10-30 kDa, 1-10 kDa and <1 kDa are expressed as UF0, UF1, UF2, UF3, UF4 and UF5. Different lowercase letters indicate the significant differences between groups exposed to As(V) and different capital letters indicate the significant differences between groups exposed to As(III). The same below.

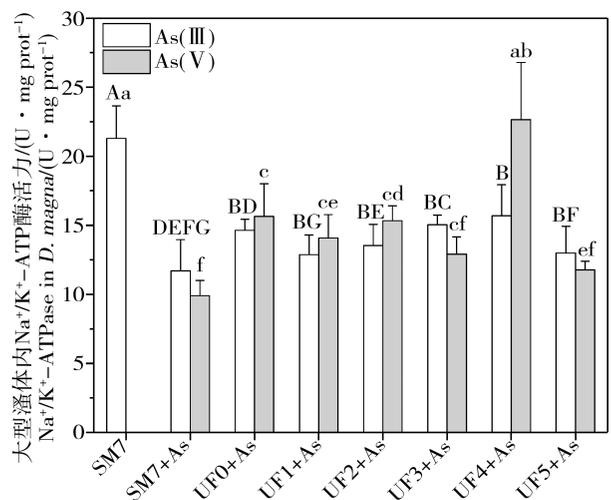


图 2 不同暴露组中大型蚤体内 Na^+/K^+ -ATP 酶的活力
Fig. 2 Na^+/K^+ -ATPase activity of *D. magna* in different exposed groups

显著缓解了 As(III)对 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力的抑制,而对 As(V),除 UF5 和 UF3 之外其余的 HA 均显著缓解了 Na⁺/K⁺-ATP 酶的活力,其中 UF4 与 As(V)共同暴露的组的 Na⁺/K⁺-ATP 酶的活力最高,与空白组之间无显著差别。相同暴露浓度下,2 种无机砷对大型溞体内 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力的抑制能力类似,UF3 和 UF4 这 2 种 HA 能够显著缓解 As(III)和 As(V)对 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力的抑制情况。

2.3 不同分子量的 HA 对砷致大型溞氧化应激的影响

不同实验组大型溞体内 T-SOD 活性、GSH 和 MDA 的含量如图 3 所示。单独 As(III)和 As(V)的暴露均显著降低了大型溞体内 SOD 的活力,有机质的加入没有缓解 As(III)对大型溞 SOD 的抑制情况。而 UF2、UF3 和 UF5 的加入显著缓解了 As(V)对 SOD 的抑制,相比于单独 As(V)暴露,UF2、UF3 和 UF5 的加入使得 SOD 的含量分别上调了 44.8%、59.3% 和 55.1%。且 UF3+As(V)、UF5+As(V)组的 SOD 活力与空白相比无显著差异。与 UF0 相比,UF3+As(V)、UF5+As(V)暴露组 SOD 的活力显著提高。

单独暴露的 As(III)和 As(V)均显著降低了大型溞体内 GSH 的含量,<1 kDa 的有机质分子的加入没有减少 As(III)和 As(V)对 GSH 的消耗。对其他几种分子量的有机质来说,UF0 ~ UF4+As(III)暴露组的 GSH 含量相比于单独 As(III)暴露有了显著的回升,其中 UF3+As(III)暴露组的恢复程度与 UF0 相比显著提高,UF5+As(III)暴露组与 UF0 相比则显著降低。对 As(V)来说,除 UF3+As(V)暴露组之外,其他几种有机质均没有缓解 As(V)对大型溞体内 GSH 含量的抑制。

MDA 的测定结果表明,48 h 的 As(III)/As(V)暴露显著促进了大型溞体内 MDA 的产生,与对照组相比,MDA 的含量从 9.0±1.9 升高至(24.4±1.8)/(21.9±1.9) nmol·mg prot⁻¹。与单独砷暴露相比,有机质的存在不同程度地降低了大型溞体内 MDA 的产生,缓解了 As(III)/As(V)的脂质过氧化损伤。与 UF0 相比,UF3 和 UF4 对 As(III)导致的脂质过氧化缓解效果更加显著。对 As(V)来说,除 UF5 对 As(V)导致的脂质过氧化缓解程度最低外,UF0 ~ UF4 对 As(V)导致的脂质过氧化损伤缓解程度均类似(P>0.05)。

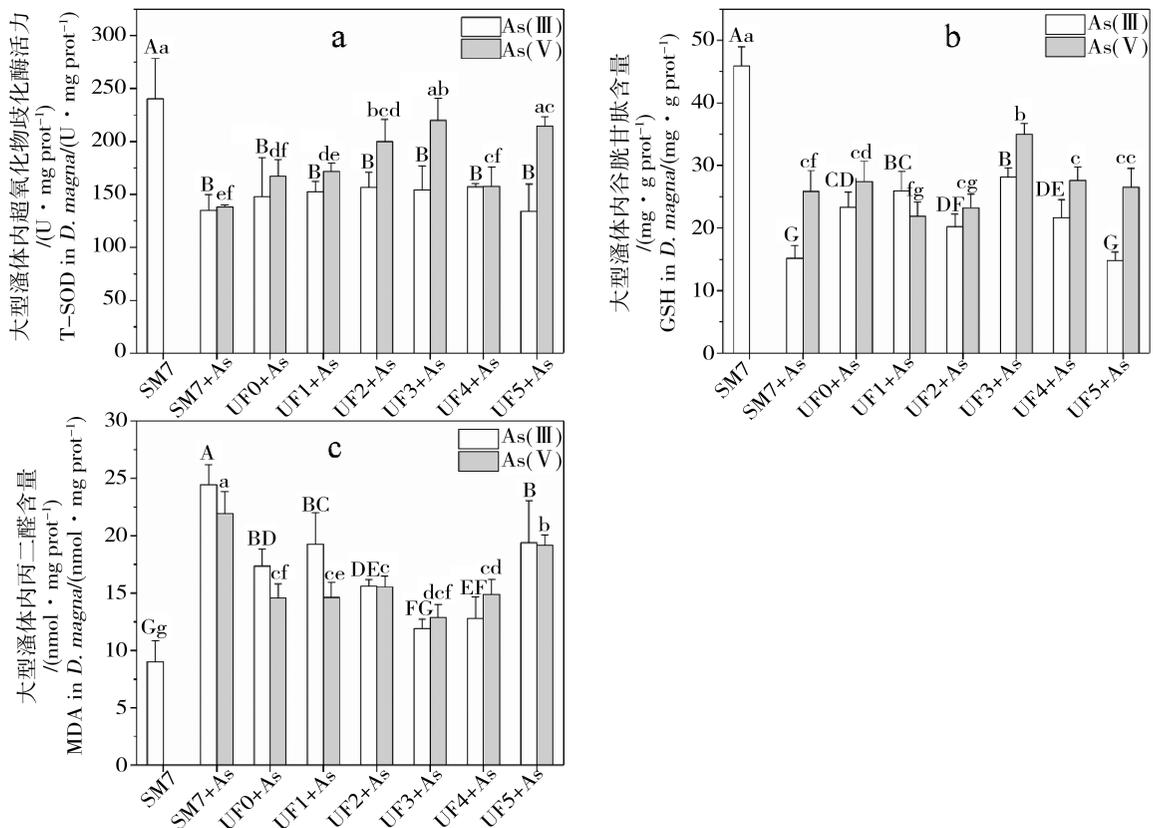


图 3 不同暴露组中大型溞体内总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 活力、谷胱甘肽 (GSH) 含量、丙二醛 (MDA) 含量
 Fig. 3 Total superoxide dismutase (T-SOD) activity, glutathione (GSH) concentration, malondialdehyde (MDA) concentration of *D. magna* in different exposed groups

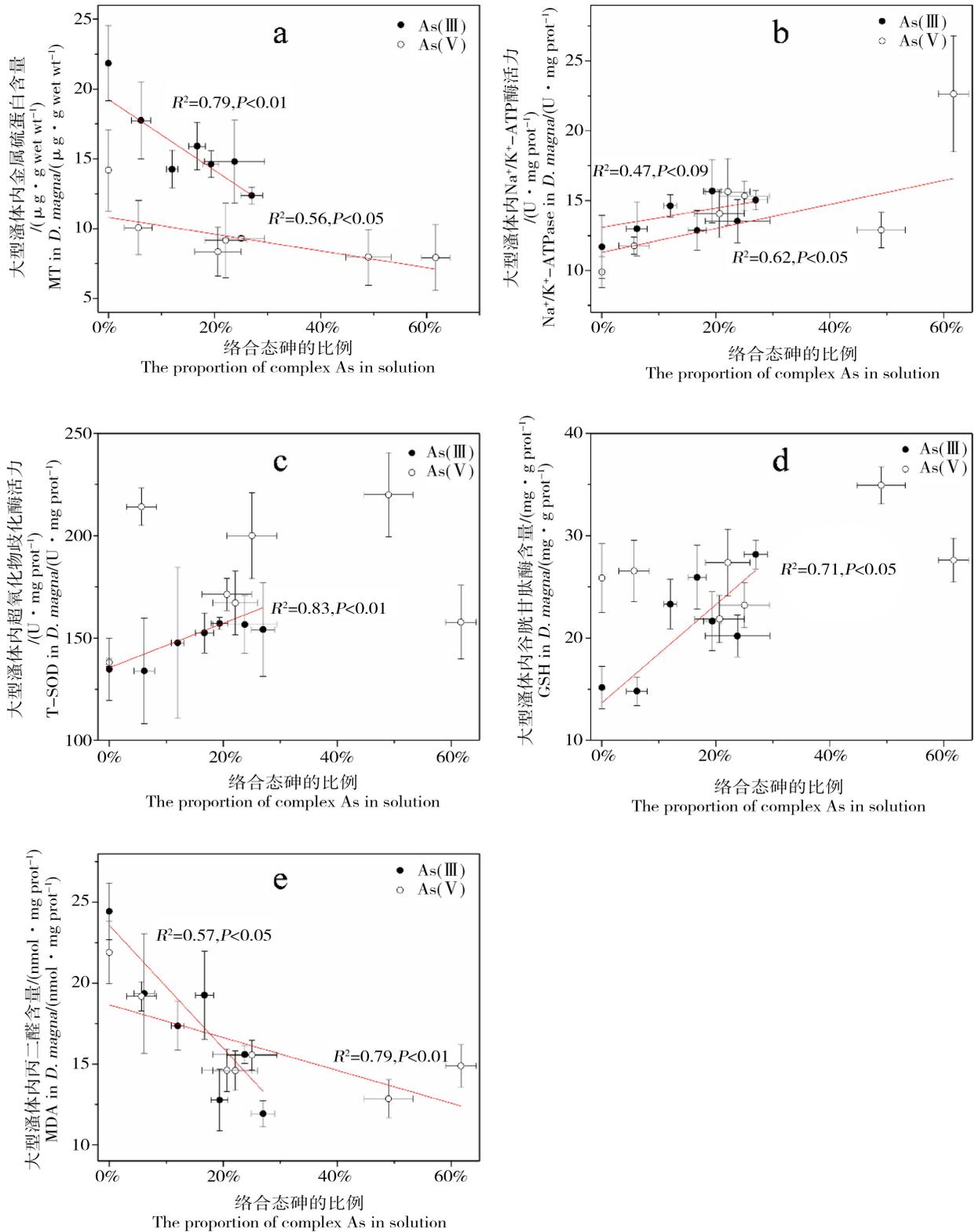


图4 溶液中络合态砷比例与大型溞体内 MT 浓度、 Na^+/K^+ -ATP 酶活力、T-SOD 活力、GSH 浓度、MDA 含量之间的相关关系分析

Fig. 4 Relationship between the proportion of complex As in solution and MT concentration, Na^+/K^+ -ATPase activity, GSH concentration, SOD activity, MDA concentration

3 讨论 (Discussion)

研究表明,As(III)和 As(V)的暴露诱导了大型溞体内 MT 的生成,导致了细胞膜损伤和氧化应激损伤,有机质的存在显著缓解了 As(III)和 As(V)对大型溞的毒性效应,但是不同分子量的有机质的影响存在差别。对 As(III)来说,UF3 和 UF4 对除 SOD 之外的 4 个生理指标的缓解效果最为显著;对 As(V)来说,UF3 对 Na^+/K^+ -ATP 酶、SOD 活性和 GSH 含量的缓解效果最为显著。与未分级的 HA 相比,UF5 对 As(III)导致的 MT 含量升高和氧化应激损伤的缓解情况减弱;同时也减弱了对 As(V)导致的膜损伤和氧化应激损伤的缓解。有一些研究得到了跟我们类似的结果,Wang 等^[16]报道称分子量 >1 kDa 的有机质与 Cu 离子有更高的络合稳定性,能够降低自由离子的浓度,最终降低 Cu 对生菜的生物有效性和毒性,Al-Reasi 等^[13]研究发现更大分子量的有机质更能有效缓解 Cu 对大型溞的毒性,可能的原因是小分子量的有机质与 Cu 的络合物可能可以被水生生物吸收,扩散进入细胞膜。

诸多研究表明,相比于自由离子,有机质络合态金属的生物有效性和生物毒性有明显的降低^[13,17-18]。之前的研究中也发现,大型溞的死亡率与溶液中自由砷离子浓度之间存在显著的正相关关系,而不同分子量有机质对砷致大型溞死亡的缓解作用,源于对暴露溶液中自由砷离子浓度的降低作用。因此为了进一步探讨不同分子量 HA 对 As(III)/As(V)的大型溞毒性的影响机制,我们分析了溶液中络合态砷比例与毒性指标(MT、 Na^+/K^+ -ATP 酶、SOD、GSH、MDA)之间的关系。结果如图 4 所示,不同分子量的 HA 对 As(III)/As(V)的毒性缓解作用可能与络合态砷的比例有关。对 As(III)和 As(V)而言,不同实验组的 Na^+/K^+ -ATP 酶活力,MT 和 MDA 浓度与暴露溶液中络合态砷比例之间存在显著的相关关系,与我们的研究结果类似,Lorenzo 等^[19]研究发现 Cu-HA 溶液对海胆的毒性与总 Cu 的浓度无关,而与伏安法测定的不稳定态 Cu 浓度有关;Poldoski^[17]发现有机质的存在降低了 Cd 在大型溞体内的积累,且降低的程度与 Cd 离子选择电极测定的 Cd^{2+} 活度一致;Fan 等^[18]发现大型溞体内 MT 的水平与自由 Cu 离子的浓度有显著的正相关关系($r^2=0.96$)。之前的研究中也发现不同大型溞的死亡率、砷积累量与自由砷离子浓度存在显著的相关关系,可以推测,不同分子量 HA 对砷的大型溞毒性缓解作用,源自

于 HA 对砷的络合最终导致了溶液中自由砷离子浓度的降低。As(III)暴露组的 SOD 活性和 GSH 含量与络合态砷比例之间也存在显著的相关关系($P<0.05$),也暗示了砷对大型溞的氧化应激损伤与自由砷离子的浓度有关。对 As(V)暴露组而言,大型溞体内的 SOD 活力和 GSH 含量与络合态砷的比例没有发现显著的相关关系($P>0.05$),一方面生物体内的 As(V)与 GSH 和 SOD 上的含硫键亲和力较弱,并且 As(V)在生物体内要先还原成三价砷,三价砷再进行接下来的转化或转出细胞,以达到解毒的目的^[20],这个过程会受到多种因素的影响,同时也需要 GSH 的参与,这可能导致了五价砷暴露组的大型溞 SOD 活力和 GSH 含量与络合态砷浓度没有显著相关关系。

综上,在不同分子量 HA 存在条件下,As(III)和 As(V)暴露后的 MT 及其他氧化应激指标与溶液中络合态砷的比例有显著的负相关关系,这说明我们的研究结果遵循自由离子活度模型,也就是重金属的毒性与自由离子的活度显著相关,之前已经有大量的研究将自由离子活度模型应用到重金属的毒性和生物有效性的预测之中,该模型适用于多种金属,包括 Au、Ag、Zn、Ni、Cd、Pb 和 Co 等,生物体包括植物、鱼类、溞类、藻类、细菌等。与重金属相比,类金属与生物配体之间的物理化学反应不同,所以自由离子活度模型很少被应用于类金属的预测中。一般来说,金属在生物体内的积累过程主要分为三步:金属从溶液中扩散到生物表面,金属与生物的细胞膜反应,以及金属穿过生物膜^[21]。水体中的 As(III)主要以中性分子 $\text{As}(\text{OH})_3$ 形态存在,As(V)主要以 HAsO_4^{2-} 和 H_2AsO_4^- 形态存在,当砷扩散到生物膜表面时,As(III)的化学结构与甘油及其他不带电荷的分子类似,水通道蛋白等可以加速其通过生物膜^[22-23],而 As(V)由于其与磷酸盐结构的相似性,可以通过磷酸盐转运蛋白进入生物体内^[24]。之前的研究中我们发现,由于 As-DOM 络合物在与细胞膜反应以及穿过细胞膜的过程会受到限制,因而 As-DOM 络合物很难在大型溞体内积累^[25],并最终降低了砷对大型溞的氧化应激损伤,降低了砷的生物毒性。

由此可见,单独的 As(III)/As(V)暴露导致了大型溞的氧化应激损伤、细胞膜损伤和 MT 的过量表达。不同分子量的 HA(UF0 ~ UF5)缓解了大型溞的氧化应激损伤和细胞膜损伤,并降低了 MT 的诱导

表达量,尤其是 UF3 和 UF4。可能的原因是 HA 与砷的络合降低了溶液自由砷离子的含量,并进一步降低了砷在大型溞体内的生物积累,最终降低了砷对大型溞的氧化应激损伤和 MT 的诱导表达,不同分子量的 HA 对砷毒性的缓解差异与其跟砷的络合比例不同有关。

通讯作者简介:范文宏(1971—),女,博士,教授,主要研究方向为环境污染化学、生态毒理学,已在国内外学术期刊发表论文 80 余篇。

参考文献(References):

- [1] Kotyzová D, Bludovská M, Eybl V. Differential influences of various arsenic compounds on antioxidant defense system in liver and kidney of rats [J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2013, 36(3): 1015-1021
- [2] Kumari B, Kumar V, Sinha A K, et al. Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2017, 15(1): 43-64
- [3] Sharma V K, Sohn M. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation [J]. *Environment International*, 2009, 35(4): 743-759
- [4] Flora S J. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2011, 51(2): 257-281
- [5] Kharroubi W, Haj Ahmed S, Nury T, et al. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptotic induction in microglial BV-2 cells treated with sodium arsenate [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 51: 44-51
- [6] Yan C Z, Yang F, Wang Z S, et al. Changes in arsenate bioaccumulation, subcellular distribution, depuration, and toxicity in *Artemia salina* nauplii in the presence of titanium dioxide nanoparticles [J]. *Environmental Science-Nano*, 2017, 4(6): 1365-1376
- [7] 王亚军, 马军. 水体环境中天然有机质腐殖酸研究进展[J]. *生态环境学报*, 2012, 21(6): 1155-1165
Wang Y J, Ma J. The research progress of humic acid in aquatic environment [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(6): 1155-1165 (in Chinese)
- [8] 吴丰昌, 王立英, 黎文, 等. 天然有机质及其在地表环境中的重要性[J]. *湖泊科学*, 2008, 20(1): 1-12
Wu F C, Wang L Y, Li W, et al. Natural organic matter and its significance in terrestrial surface environment [J]. *Lake Sciences*, 2008, 20(1): 1-12 (in Chinese)
- [9] Chappaz A, Curtis P J. Integrating empirically dissolved organic matter quality for WHAM VI using the DOM optical properties: A case study of Cu-Al-DOM interactions [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(4): 2001-2007
- [10] 刘广良, 蔡勇. 环境中砷与溶解有机质的络合作用[J]. *环境化学*, 2011, 30(1): 50-55
Liu G L, Cai Y. Complexation of arsenic with dissolved organic matter in environment [J]. *Environmental Chemistry*, 2011, 30(1): 50-55 (in Chinese)
- [11] Dutton J, Fisher N S. Influence of humic acid on the uptake of aqueous metals by the killifish *Fundulus heteroclitus* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, 31(10): 2225-2232
- [12] Zhang J Y, Ni Y Y, Ding T D, et al. The role of humic acid in the toxicity of arsenite to the diatom *Navicula sp* [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(6): 4366-4375
- [13] Al-Reasi H A, Smith D S, Wood C M. Evaluating the ameliorative effect of natural dissolved organic matter (DOM) quality on copper toxicity to *Daphnia magna*: Improving the BLM [J]. *Ecotoxicology*, 2012, 21(2): 524-537
- [14] Al-Reasi H A, Wood C M, Smith D S. Physicochemical and spectroscopic properties of natural organic matter (NOM) from various sources and implications for ameliorative effects on metal toxicity to aquatic biota [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 103(3): 179-190
- [15] ISO. Water Quality. Determination of the Acute Toxicity of Substance to *Daphnia* (*Daphnia magna* Strauss). ISO 6341. [S]. Geneva: ISO, 1982
- [16] Wang X D, Chen X N, Liu S A, et al. Effect of molecular weight of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper to lettuce [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22(12): 1960-1965
- [17] Poldoski J E. Cadmium bioaccumulation assays. Their relationship to various ionic equilibria in Lake Superior water [J]. *Environmental Science & Technology*, 1980, 14(6): 735
- [18] Fan W H, Yang X P, Shi Z W, et al. Effect of humic acid on copper uptake and metallothionein induction in *Daphnia magna* [J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2012, 21(8): 2056-2061
- [19] Lorenzo J I, Nieto O, Beiras R. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 58(1): 27-41
- [20] 王利红, 尹西翔, 段桂兰, 等. 生物体砷代谢解毒机制

- 的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 17(17): 8144-8147
- Wang L H, Yin X X, Duan G L, et al. Developments in understanding mechanisms of arsenic metabolism and detoxication in organisms [J]. Anhui Agriculture Science, 2009, 17(17): 8144-8147 (in Chinese)
- [21] Zhao C M, Campbell P G C, Wilkinson K J. When are metal complexes bioavailable [J]. Environmental Chemistry, 2016, 13(3): 425-433
- [22] Shen S, Li X F, Cullen W R, et al. Arsenic binding to proteins [J]. Chemical Reviews, 2013, 113(10): 7769-7792
- [23] Ajees A A, Rosen B P. As(III) S-adenosylmethionine methyltransferases and other arsenic binding proteins [J]. Geomicrobiology Journal, 2015, 32(7): 570-576
- [24] Roggenbeck B A, Banerjee M, Leslie E M. Cellular arsenic transport pathways in mammals [J]. Journal of Environmental Sciences, 2016, 49(11): 38-58
- [25] Ren J Q, Fan W H, Wang X R, et al. Influences of size-fractionated humic acids on arsenite and arsenate complexation and toxicity to *Daphnia magna* [J]. Water Research, 2017, 108: 68-77 ◆