

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20120904001

程金金, 宋静, 陈文超, 等. 镉污染对红壤和潮土微生物的生态毒理效应[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(4): 577-586

Cheng J J, Song J, Chen W C, et al. The Ecotoxicity Effects of Cadmium on Microorganism in Udic—Ferrosols and Aquic—Cambosols [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(4): 577-586 (in Chinese)

## 镉污染对红壤和潮土微生物的生态毒理效应

程金金<sup>1,2</sup>, 宋静<sup>1,2,\*</sup>, 陈文超<sup>2</sup>, 余海波<sup>1</sup>, 黄玉娟<sup>1</sup>, 吴龙华<sup>1,2</sup>, 骆永明<sup>2,3</sup>

1. 中国科学院南京土壤研究所 土壤环境与污染修复重点实验室, 南京 210008

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003

**摘要:** 以土壤微生物生物量碳( $C_{mic}$ )、土壤酶活性及微生物多样性为微生物学指标, 以  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$  作为 Cd 有效态提取剂, 以江西红壤和天津潮土为供试土壤, 在室内  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  连续培养 28 d 的条件下探讨了外源 Cd 对土壤微生物的生态毒理效应。结果表明: 1) 不同培养时间潮土  $\text{CaCl}_2$  提取态 Cd 含量均显著低于红壤, 潮土微生物受到 Cd 的抑制作用也明显小于红壤。2) 各微生物指标的敏感性不同, 并受土壤类型和培养时间的影响, 其中, 脱氢酶的敏感性强于脲酶, 微生物功能多样性指标中 Biolog Eco 板上每孔的平均吸光值(AWCD)的敏感性强于 Shannon 指数;  $C_{mic}$ 、脲酶、脱氢酶、AWCD 和 Shannon 指数均在红壤中更为敏感。选取的 5 个微生物指标对 Cd 污染都有良好的响应, 均可作为 Cd 污染土壤微生物生态毒理实验中的测试指标。在土壤酶指标中, 可优先选取脱氢酶作为测试指标。3) Cd 对  $C_{mic}$ 、土壤酶、微生物功能多样性的抑制作用存在时间效应。14 d Cd 对  $C_{mic}$  的抑制作用大于 28 d, 而对脲酶和脱氢酶的抑制作用小于 28 d。建议 Cd 污染土壤微生物生态毒理实验中将培养时间设置为 28 d 或适当延长。4) 28 d 时, 红壤中 Cd 对  $C_{mic}$ 、脱氢酶、脲酶、AWCD、Shannon 指数的  $EC_{10}$  分别为 1.31、0.26、0.93、0.08、22.71  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 而在潮土中分别为 1.97、0.69、13.12、0.09、 $> 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

**关键词:** Cd; 红壤; 潮土; 微生物; 生态毒理

文章编号: 1673-5897(2013)4-577-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## The Ecotoxicity Effects of Cadmium on Microorganism in Udic—Ferrosols and Aquic—Cambosols

Cheng Jinjin<sup>1,2</sup>, Song Jing<sup>1,2,\*</sup>, Chen Wenchao<sup>2</sup>, Yu Haibo<sup>1</sup>, Huang Yujuan<sup>1</sup>, Wu Longhua<sup>1,2</sup>, Luo Yongming<sup>2,3</sup>

1. Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China

**Received** 4 September 2012 **accepted** 17 December 2012

**Abstract:** Soil microbial biomass C ( $C_{mic}$ ), enzyme activities and microbial diversity were chosen as soil microbial indicators and the soil available Cd was determined by  $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{CaCl}_2$  extraction. A laboratory

收稿日期: 2012-09-04 录用日期: 2012-12-17

基金项目: 环保公益性行业科研专项经费项目(201009032); 农业 863 项目(2012AA101402-2); 国家自然科学基金重点项目(41230858)

作者简介: 程金金(1987-), 女, 硕士, 研究方向为污染物的环境生态效应, E-mail: jjcheng@issas.ac.cn;

\* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: jingsong@issas.ac.cn

incubation experiment was conducted to study toxic effects of Cd on soil microbial indicators in an udic-ferrosols from Jiangxi and an aquic-cambosols from Tianjin at 25°C for 28 days. The results showed that CaCl<sub>2</sub>-extractable Cd in aquic-cambosols was significantly lower than that in udic-ferrosols at different incubation time. And the microbial activity was less inhibited in the aquic-cambosols than that in the udic-ferrosols. The sensitivity of different microbial indicators to Cd was influenced by soil properties and incubation time. Dehydrogenase was more sensitive than urease. The average well color development (AWCD) was more sensitive as a microbial functional diversity index than Shannon index. All of the microbial indicators tested in aquic-cambosols were more sensitive in udic-ferrosols than these in aquic-cambosols, which showed good response to exogenous Cd and therefore can be used in the microbial toxicity test of Cd pollution. There was significant time effect of Cd toxicity to soil microbial indicators. The toxic effect of Cd on C<sub>mic</sub> at day 14 was greater than that at day 28, but the toxic effect on dehydrogenase and urease at day 14 was less than that at day 28. The 28-day incubation time was recommended for future microbial toxicity test of Cd pollution. At day 28, the EC<sub>10</sub> of Cd for C<sub>mic</sub>, dehydrogenase, urease, AWCD and Shannon index were 1.13, 0.26, 0.93, 0.08 and 22.71 mg·kg<sup>-1</sup> in udic-ferrosols, respectively. And in aquic-cambosols, the EC<sub>10</sub> of Cd for these tested microbial indicators were 1.97, 0.69, 13.12, 0.09 and > 200 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively.

**Keywords:** Cd; udic-ferrosols; aquic-cambosols; microbe; ecotoxicity

随着我国工业化和城市化的快速发展,大量 Cd 通过污水灌溉、污泥农用、含 Cd 农用化学品的使用等人类活动进入土壤环境,导致农田土壤 Cd 污染日趋加重,严重危害人体健康和生态安全<sup>[1]</sup>。重金属进入土壤后,其赋存形态、环境化学行为以及生物有效性和毒性受土壤性质影响,存在很大差异<sup>[2]</sup>。因此,在制定保护生态的土壤基准时,应充分考虑到同一污染物在不同类型的土壤中将产生不同的生态毒理效应。植物、土壤无脊椎动物以及土壤微生物等是制定土壤基准时需要关注的生态受体。其中,土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分之一,不仅在推动土壤养分的循环转化和土壤有机质的矿化分解等方面起到重要作用,还能较敏感地反映出土壤环境的细微变化<sup>[3]</sup>。因此,土壤微生物指标被认为是表征土壤质量变化最敏感、最有潜力的指标<sup>[4]</sup>。

应用于土壤生态风险评价的微生物学指标主要包括微生物生物量、酶活性和多样性等<sup>[5-13]</sup>。有研究发现,当土壤 Cd 浓度 $\geq 5$  mg·kg<sup>-1</sup>时,微生物量氮<sup>[14]</sup>和微生物量碳(C<sub>min</sub>)<sup>[15]</sup>显著低于对照,且随 Cd 浓度的增加而降低。研究发现,不同土壤酶的活性对外源 Cd 的响应方式及敏感性不同。于寿娜等<sup>[16]</sup>发现,土壤 Cd 浓度 $\geq 1$  mg·kg<sup>-1</sup>时,脲酶和磷酸酶活性受到明显抑制。黄冬芬等<sup>[17]</sup>研究表明,Cd 浓度为 0.5 mg·kg<sup>-1</sup>时,土壤过氧化氢酶和脲酶活性均显著增加,而土壤磷酸酶活性未受影响。吴桂荣等<sup>[18]</sup>研究发现,0.5 mg·kg<sup>-1</sup> Cd 对土壤脲酶有显

著的刺激作用,但对土壤过氧化氢酶和土壤蔗糖酶并无影响。在土壤生态风险评估中如何根据土壤性质及酶本身的特性等因素选择适宜的土壤酶指标也是需要进一步研究的问题。

不少欧美发达国家如美国、加拿大、英国和荷兰等都颁布了土壤生态风险评估技术导则,并利用生态毒理学效应制定了保护生态的土壤基准<sup>[19]</sup>。我国制定保护生态的土壤基准主要瓶颈在于缺乏用标准方法推导的陆地生态毒理学数据<sup>[20]</sup>。而多数现有研究仅对 Cd 污染产生的生态效应进行了现象描述,即使少数文献给出了生态毒理学数据,但未对其求解方法进行详细说明,使得数据的可靠性降低。此外,各文献选用了不同的 Cd 处理浓度、测试指标和测试时间,给出的评价终点也不同。例如,Chap-eron 等<sup>[21]</sup>、Gao 等<sup>[22]</sup>的研究给出了 Cd 对脲酶和脱氢酶的 EC<sub>50</sub> 值,张昀等<sup>[23]</sup>、Liao 等<sup>[24]</sup>给出了 Cd 对土壤脲酶、C<sub>mic</sub> 的 NOEC 值。以上这些原因导致在制定土壤生态基准时,现有的研究结果难以作为基础毒理学数据发挥作用。目前,国际上大部分国家使用 NOEC 或 EC<sub>10</sub> 制定基于生态毒理效应的土壤基准,而我国目前可用的数据非常有限。因此,对各种类型的土壤进行微生物生态毒理学实验,为制定基于生态毒理效应的土壤基准提供依据和基础数据是当前亟待解决的首要问题。

红壤和潮土分别是我国南方和北方典型的农田土壤,潮土有机质含量高且多为碱性而红壤有机质

含量低且多为酸性。由于 2 种土壤的基本理化性质差异较大,相同剂量的 Cd 进入这 2 种土壤,将表现出不同的生物有效性,并产生不同的生态效应。据此,以微生物量碳、微生物群落功能多样性、脱氢酶活性和脲酶活性为微生物学指标,采用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$  作为 Cd 有效态提取剂,对比研究室内培养 14 d、28 d 的 Cd 污染对红壤和潮土微生物的生态毒理效应,旨在探明土壤类型、培养时间对 Cd 污染生态毒理效应的影响以及各微生物指标敏感性的差异,为建立我国标准化的土壤微生物生态毒理实验提供依据。此外,应用数学模型对剂量效应关系进行拟合,求解出生态毒理参数  $EC_{10}$  和  $EC_{20}$ ,为这 2 类土壤中 Cd 的基于生态毒理效应的土壤基准的制定提供可靠的基础数据。

表 1 供试土壤基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the soils

土壤类型	pH	有机质/( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	全氮/( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	速效磷/( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	速效钾/( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	阳离子交换量/( $\text{Cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )
潮土	7.71	20.03	1.35	96.75	440	20.94
红壤	4.89	5.77	1.04	4.40	52	9.76

注:pH 土液比为 1:2.5。

## 1.2 实验处理

调节土壤含水量至 40% 最大田间持水量,在 25 °C 恒温条件下预培养 7 d。实验设 6 个 Cd 浓度处理,分别为 0、0.1、1、10、100、200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (以 Cd 计),每个处理设 4 次重复。根据实验的预设浓度,将分析纯  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  溶于去离子水中,然后以喷雾的形式将其均匀喷洒于土样中。调节土壤含水量至 60%,充分搅拌后将土样置于塑料烧杯中,盖上具有透气作用的封口膜以保持好氧条件,于 25 °C 条件下继续恒温培养。每隔 3 d 用称重法补充损失的水分。分别在培养第 14 天和 28 天取样测定土壤  $C_{\text{mic}}$ 、脱氢酶活性、脲酶活性和  $\text{CaCl}_2$  提取态,并在培养第 28 天取样测定土壤微生物群落功能多样性。

## 1.3 分析方法

土样的基本理化性质采用常规分析法<sup>[25]</sup>;Cd 全量采用  $\text{HCl}-\text{HNO}_3$  消化(体积比 4:1);Cd 有效态提取采用土壤鲜样,以  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$  为提取剂(土液比 1:10)<sup>[26]</sup>;Cd 浓度用原子吸收分光光度计(spectrAA 220FS(火焰)、220Z(石墨炉),Varian)测定;土壤微生物量碳采用氯仿熏蒸, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2 \text{SO}_4$  提取,TOC 分析仪(liquiTOCII, Elemental)测定<sup>[27]</sup>;土壤脲酶活性用苯酚钠比色法测

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 供试土壤

供试的 2 种土壤分别为采自中国科学院鹰潭红壤生态实验站的林地红壤(N:28°12',E:116°55')和天津市宁河县百利农业示范基地的潮土(N:39°23',E:117°51')。土样采自表层 0~20 cm,自然风干后过 2 mm 筛并去除植物根系,放置于 4 °C 冷库中保存备用。2 种土壤的初始微生物性质差异较大,红壤微生物量碳、脱氢酶活性、脲酶活性分别为  $77 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $16 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (以  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  计),潮土微生物量碳、脱氢酶活性、脲酶活性分别为  $228 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $33 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (以  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  计)。2 种土壤的基本化学性质也有较大差异,如表 1 所示。

定,脱氢酶活性用 2,3,5-三苯基四氮唑氯化物(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)比色法测定<sup>[28]</sup>;微生物群落功能多样性采用碳素利用法(BIOLOG)测定,所用 BIOLOG 微平板为含 31 种碳源的 BIOLOG ECO 板<sup>[29]</sup>。

### 1.4 数据处理

实验数据采用 SPSS17.0、Microsoft Excel 2000 以及 DPS 数据处理软件进行处理。用于分析的数据均经过异常值剔除,差异显著性检验采用最小显著性差异法(LSD)进行,显著性水平为  $P = 0.05$ 。

剂量效应方程是通过将 Cd 处理浓度对数化以后,采用常用的一元线性或非线性回归模型进行参数拟合,选择出最优的回归方程作为相应的剂量效应方程,并计算  $EC_{10}$  和  $EC_{20}$ 。

## 2 结果与讨论(Results and discussion)

### 2.1 土壤中有效态 Cd 浓度的变化

如表 2 所示,随着培养时间延长,红壤和潮土中有效态 Cd 浓度均逐渐减少,表明土壤对 Cd 有吸附和固定作用。在相同 Cd 处理浓度下,红壤有效态 Cd 浓度明显高于潮土,可能是由于红壤的 pH、有机质含量、阳离子交换量(CEC)均明显低于潮土,因此,红壤对 Cd

的吸附能力较弱。目前用于提取土壤中有效态 Cd 的提取剂主要包括弱酸类、络合剂类和中性盐类,  $\text{CaCl}_2$  作为中性盐类提取剂能较好的保持土壤溶液原有 pH 值, 并且  $\text{Cl}^-$  可与 Cd 形成稳定的配合物, 提取能力强, 因而更受重视<sup>[30]</sup>。王俊伟等<sup>[31]</sup>采用盆栽实验的方法研究了取自沈阳生态站的土壤, 结果表明,  $\text{CaCl}_2$  提取出的土壤有效态 Cd 含量与水稻糙米中 Cd 含量达到显著相关水平。尹君等<sup>[32]</sup>研究了河北的褐土, 得出了土壤  $\text{CaCl}_2$  提取态 Cd 含量与水稻籽粒中 Cd 含量达到极显著相关水平。因此,  $\text{CaCl}_2$  可以认为是比较理想的提取剂, 但土壤  $\text{CaCl}_2$  提取态 Cd 含量与微生物生态毒理效应之间是否具有相关性目前还缺乏研究。本实验得出红壤  $\text{CaCl}_2$  提取态 Cd 远远大于潮土, 可能表明, 相同剂量的外源 Cd 将在红壤中产生更大的生态毒理效应,  $\text{CaCl}_2$  提取态 Cd 与微生物生态毒理效应之间的相关性还需进一步验证。

表 2 土壤中有有效态 Cd 浓度

Table 2 Concentration of soil available cadmium

Cd 添加量	(mg·kg <sup>-1</sup> )			
	红壤有效态 Cd		潮土有效态 Cd	
	14 d	28 d	14 d	28 d
0	0.019±0.001 d	0.013±0.001 d	N. D	N. D
0.1	0.110±0.003 d	0.100±0.001 d	N. D	N. D
1	0.77±0.03 d	0.550±0.022 d	0.002±0.000 e	0.001±0.000 c
10	8.64±0.10 c	8.38±0.15 c	0.020±0.002 e	0.012±0.001 c
100	88.80±1.71 b	86.50±1.29 b	0.710±0.017 d	0.660±0.025 b
200	182.30±1.26 a	179.30±1.71 a	3.380±0.091 a	0.060±0.039 a

注: 不同小写字母表示处理间差异达显著水平 ( $P = 0.05$ ), 下同; N. D 表示低于 0.001 mg·kg<sup>-1</sup>。

## 2.2 Cd 对土壤微生物量碳 ( $C_{mic}$ ) 的影响

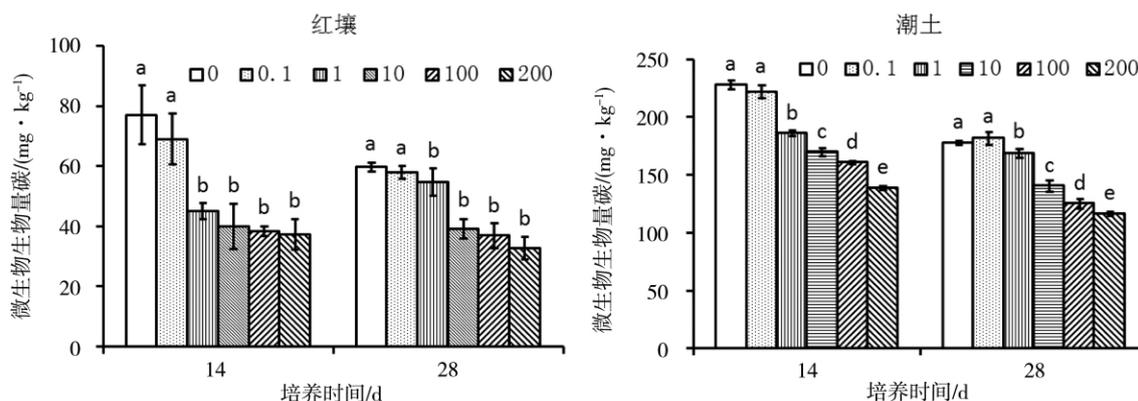


图 1 Cd 对土壤微生物量碳的影响

注: 竖线表示标准差; 同一培养时间不同字母代表处理间达 0.05 显著性差异, 下同。

Fig. 1 Effects of cadmium on soil microbial biomass carbon

当外源 Cd 浓度  $\leq 0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时, 红壤和潮土 14 d、28 d 的  $C_{mic}$  与相应对照之间差异均不显著; 当 Cd 浓度  $\geq 1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时, 红壤和潮土的  $C_{mic}$  受到抑制,  $C_{mic}$  随 Cd 浓度增加而降低, 且与对照之间差异显著; 当 Cd 浓度为  $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时, 红壤  $C_{mic}$  抑制率 14 d 为 52%、28 d 为 52%, 潮土  $C_{mic}$  抑制率 14 d 为 39%、28 d 为 34%。这一结果与许多研究相似, 例如, 谢晓梅<sup>[9]</sup>研究了培养 14 d 的采自浙江衢州的红壤中 Cd 对微生物生态特性的影响, 结果表明, 随 Cd 的浓度增加, 红壤  $C_{mic}$  迅速降低, 当 Cd 浓度为  $250 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时, 与对照相比  $C_{mic}$  下降了 50% 左右; 曾路生等<sup>[15]</sup>研究了水稻盆栽培养 30 d 的淹水黄红壤性水稻土, 结果为 Cd 浓度  $\geq 1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时  $C_{mic}$  开始与对照之间出现显著性差异, 当 Cd 浓度为  $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时, 与对照相比  $C_{mic}$  下降了 42%。各研究中  $C_{mic}$  抑制率不同可能与土壤性质、培养时间等因素有关。

Cd 对  $C_{mic}$  的生态毒理效应如表 3 所示。14 d 和 28 d 时, 红壤  $C_{mic}$  的  $EC_{10}$  和  $EC_{20}$  均低于潮土, 表明 Cd 对红壤  $C_{mic}$  的抑制作用大于潮土。造成上述现象的原因可能与土壤的基本性质有关。从表 1 可见, 红壤有机质含量、阳离子交换量等均比潮土低, 红壤对 Cd 的吸附和固定能力低, 增加了 Cd 的有效性(见表 2), 因此 Cd 对红壤  $C_{mic}$  的抑制作用相对较高。2 种土壤 28 d  $C_{mic}$  的  $EC_{10}$  和  $EC_{20}$  的值都大于 14 d 的对应值, 表明随培养时间的延长, Cd 对  $C_{mic}$  的抑制作用减小。这可能是由于 Cd 污染使土壤微生物群落结构发生变化、优势菌群大量繁殖, Cd 在土壤中的有效性随时间逐渐降低<sup>[33]</sup>。此外, 从  $C_{mic}$  的  $EC_{10}$  和  $EC_{20}$  还可看出, 2 种土壤 14 d  $C_{mic}$  的敏感性强于 28 d, 红壤  $C_{mic}$  的敏感性强于潮土。

表 3 Cd 对土壤微生物量碳的 EC 值  
Table 3 EC values of Cd for the soil microbial biomass carbon

土壤类型	培养时间/d	剂量效应回归方程	R <sup>2</sup>	P	EC <sub>10</sub> /(mg·kg <sup>-1</sup> )	EC <sub>20</sub> /(mg·kg <sup>-1</sup> )
红壤	14	$y=50.28/(1+EXP(-1.53-2.86lgx))$	0.9963	0.0037	0.10	0.21
	28	$y=42.41/(1+EXP(1.32-2.68lgx))$	0.9809	0.0191	1.13	2.82
潮土	14	$y=14.85+9.55x$	0.9371	0.0068	0.31	3.46
	28	$y=6.42+12.17x$	0.9832	0.0084	1.97	13.04

注:剂量效应方程中 $y$ 表示土壤微生物量碳与对照相比减少了 $y\%$ ;  $x$ 表示Cd的浓度,其范围为 $0.1\sim 200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;  $R^2$ 为确定系数, $P$ 表示回归方程统计检验的显著水平; $EC_{10}$ 、 $EC_{20}$ 分别表示 $y$ 等于10、20时对应Cd的浓度,下同。

2.3 Cd 对土壤酶活性的影响

2.3.1 脱氢酶

Cd 对土壤脱氢酶活性的影响如图 2 所示。在培养第 14 天,红壤中 Cd 对脱氢酶的抑制作用不明显,当 Cd 浓度为  $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时,与对照之间出现显著性差异;对于潮土,当 Cd 浓度为  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时,对照之间就出现显著性差异。培养第 28 天,红壤和潮土的脱氢酶活性均随 Cd 浓度增加而降低,红壤和潮土开始与对照之间出现显著性差异的 Cd 浓度分别为:  $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。上述现象说明 Cd 浓度高时抑制土壤脱氢酶活性,产生显著抑制效应的 Cd 浓度还受土壤类型和培养时间的影响。

Cd 对土壤脱氢酶活性的生态毒理效应如表 4 所示。本实验条件下,红壤脱氢酶活性的  $EC_{10}$ 、 $EC_{20}$  均低于潮土,表明 Cd 对红壤脱氢酶的抑制作用大于潮土。2 种土壤的 28 d 脱氢酶的  $EC_{10}$  和  $EC_{20}$  的值都小于 14 d 的对应值,表明在培养的 28 d 内,随着培养时间的延长,Cd 对脱氢酶的抑制作用不断增强。

2.3.2 脲酶

从图 2 可以看出,脲酶活性随 Cd 浓度增加而降低,表明随着 Cd 浓度增加,脲酶受抑制程度不断加强。产生对脲酶活性显著抑制的 Cd 浓度分别为:14 d 时,红壤  $0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、潮土  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 28 d 时,红壤  $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、潮土  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

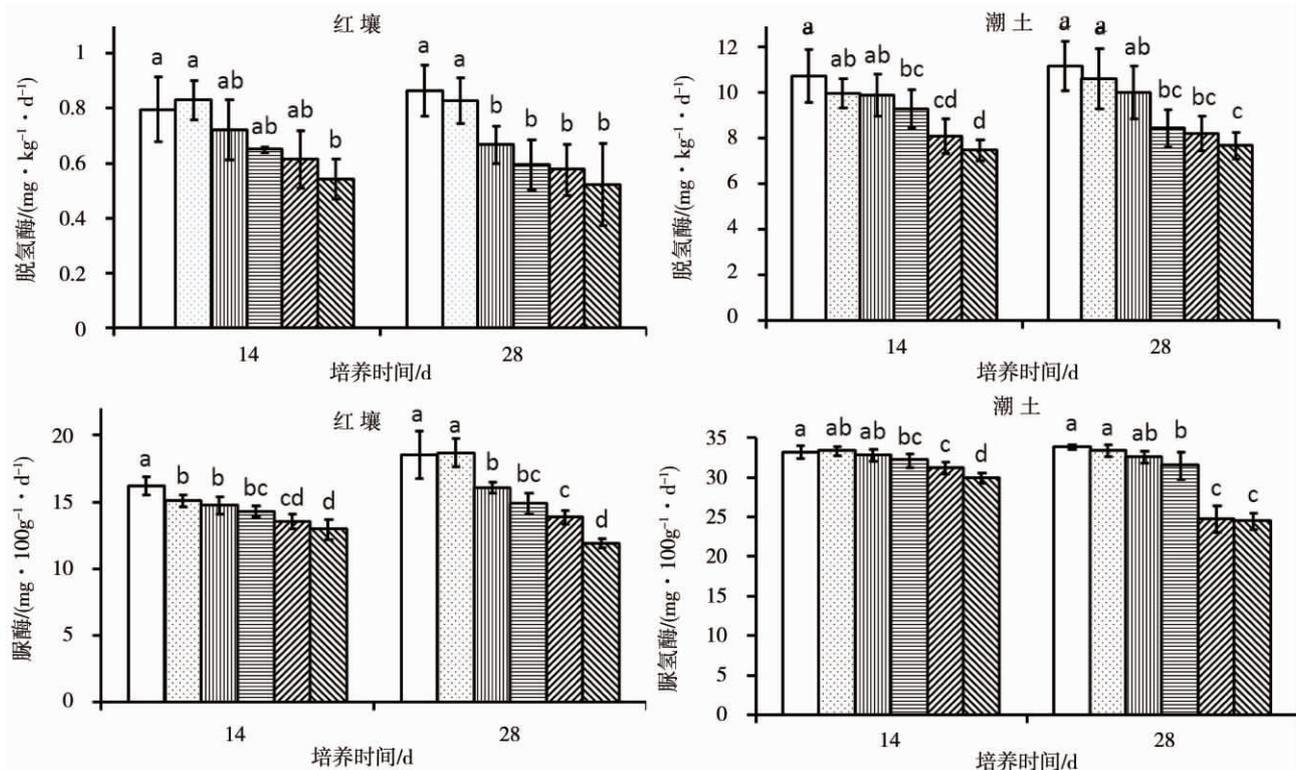


图 2 Cd 对土壤脱氢酶和脲酶活性的影响

Fig. 2 Effects of cadmium on soil dehydrogenase and urease activity

表4 Cd对土壤脱氢酶和脲酶活性的EC值

Table 4 EC values of Cd for the soil dehydrogenase and urease activity

指标	土壤类型	培养时间/d	剂量效应回归方程	$R^2$	$P$	$EC_{10}/(\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1})$	$EC_{20}/(\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1})$
脱氢酶	红壤	14	$y=0.069+0.098\lg x$	0.9617	0.0032	2.08	21.93
		28	$y=0.35/(1+\text{EXP}(-0.56-2.54\lg x))$	0.9591	0.0449	0.26	0.90
	潮土	14	$y=0.083\text{EXP}(0.55\lg x)$	0.9845	0.0008	2.21	39.54
		28	$y=0.31/(1+\text{EXP}(0.50-1.54\lg x))$	0.9705	0.0295	0.69	5.11
脲酶	红壤	14	$y=0.087\text{EXP}(0.34\lg x)$	0.9771	0.0015	2.57	>200
		28	$y=0.10+0.096\lg x$	0.9443	0.0057	0.93	10.23
	潮土	14	$y=0.0099+0.018\lg x+0.0033\lg x\times\lg x$	1	0.0047	>200	>200
		28	$y=0.32/(1+\text{EXP}(3.67-2.60\lg x))$	0.9787	0.0213	13.12	42.17

表4列出了Cd对土壤脲酶活性的生态毒理效应。与 $C_{\text{mic}}$ 和脱氢酶的生态毒理效应类似,红壤中脲酶的 $EC_{10}$ 和 $EC_{20}$ 低于潮土,表明Cd对红壤脲酶的抑制作用大于潮土。此外,红壤和潮土14d时脲酶的 $EC_{10}$ 和 $EC_{20}$ 明显高于28d,表明在28d的培养周期内,Cd对脲酶的抑制作用随着培养时间的增加而增大。

土壤酶活性反映了土壤中进行的各种生物化学过程的强度和方向。脱氢酶属于氧化还原酶类,能从一定的基质中析出氢而进行氧化作用。脲酶属于水解酶类,能促进有机质分子中肽键水解。土壤脱氢酶和脲酶被认为是土壤受重金属污染后反应比较敏感的酶类<sup>[34-36]</sup>。本研究显示,2种土壤14d、28d脲酶的 $EC_{10}$ 、 $EC_{20}$ 均大于脱氢酶的对值,表明在作为敏感指标指示土壤Cd污染时,脱氢酶的敏感性强于脲酶;14d时红壤和潮土中脱氢酶、脲酶的 $EC_{10}$ 、 $EC_{20}$ 均大于28d时的对值,表明28d脱氢酶和脲酶更为敏感一些;不同培养时间红壤脱氢酶、脲酶的 $EC_{10}$ 、 $EC_{20}$ 均低于潮土,表明红壤中脱氢酶和脲酶更为敏感。高大翔等<sup>[37]</sup>采用室内恒温培养的方法,研究了采自天津农学院实验田的土壤,结果发现脱氢酶活性对Cd污染比脲酶更敏感;曾路生等<sup>[15]</sup>在室内淹水恒温培养的黄松田水稻土和黄红壤性水稻土中同样发现了脱氢酶活性对Cd污染比脲酶敏感。以上研究均显示,胞内酶的脱氢酶对Cd污染的敏感性强于脲酶,可能的原因是Cd更容易进入微生物细胞内产生毒害作用。此外,高大翔等<sup>[37]</sup>的研究还发现在35d的培养时间内,随着培养时间的延长,Cd对脲酶和脱氢酶的 $ED_{50}$ 值不断下降,表明Cd对土壤脲酶和脱氢酶存在随时间增加抑制作用增强的效应。这与本文研究结果类似。

## 2.4 Cd对土壤微生物功能多样性的影响

### 2.4.1 Cd对BIOLOG板平均吸光值的影响

Biolog Eco板上每孔的平均吸光值(AWCD)是

反映土壤微生物群落代谢能力的一个重要指标。培养28d时各处理的AWCD变化曲线如图3所示。从图中可以看出,红壤和潮土的AWCD值在60h之前各浓度处理未表现出显著差异,120h后出现了显著差异,表现为随Cd浓度的增加,AWCD值不断降低。与对照相比,120h时,红壤各处理的AWCD值分别是对照的85%、70%、49%、34%、17%,潮土各处理的AWCD值分别是对照的90%、80%、69%、47%、33%。经多重比较得出各处理间差异达极显著水平( $P < 0.01$ ),表明Cd降

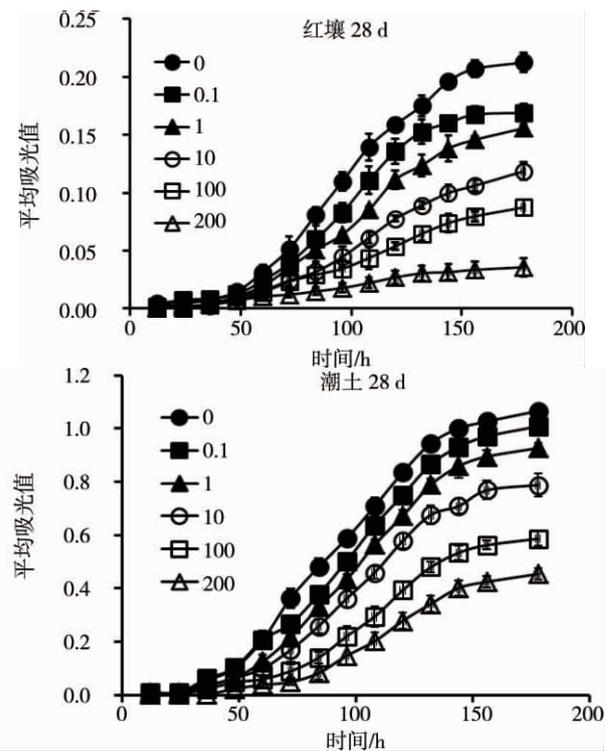


图3 Cd对平均吸光值的影响

Fig. 3 Effects of cadmium on average well color development

低了土壤微生物的整体代谢活性,Cd 污染会导致土壤微生物群落结构多样性下降,并且会降低土壤微生物对单一碳源底物的利用能力。

2.4.2 Cd 对土壤微生物多样性指数的影响

微生物多样性指数反映了土壤微生物群落的变化,不同的多样性指数体现了土壤微生物多样性的不同方面。Shannon 指数主要反映了土壤微生物群落物种丰富度,Simpson 指数侧重于反映群落中常见的物种,而 McIntosh 指数主要用于衡量土壤微生物群落物种的均一性<sup>[38]</sup>。从表 5 可知,红壤 Cd 浓度为 0.1 mg·kg<sup>-1</sup>时,Shannon 指数和 Simpson 指数高于对照且与对照之间差异显著,而 McIntosh 指数与对照之间差异不显著;当红壤 Cd 浓度 ≥ 1 mg·kg<sup>-1</sup>时,Shannon、Simpson、McIntosh 指数均随 Cd 浓度的增加而不断减小,且与对照之间差异显著。对于潮土,当 Cd 浓度为 0.1 mg·kg<sup>-1</sup>时,3 个指数与对照之间没有显著性差异;当 Cd 浓度 ≥ 1 mg·kg<sup>-1</sup>时,3 个指数均随 Cd 浓度的增加而不断减小,且与对照之间有显著性差异。以上现象表明,Cd 污染会导致土壤微生物群落结构发生变化,Cd 浓度 ≥ 1 mg

·kg<sup>-1</sup>会显著抑制和破坏土壤微生物群落的物种丰富度、常见物种以及物种均一性。

2.4.3 Cd 对土壤微生物功能多样性的生态毒理效应

AWCD 和 Shannon 指数是目前应用最为广泛的微生物多样性参数。Cd 对土壤微生物功能多样性的毒性效应如表 6 所示。对比 AWCD 和 Shannon 指数的生态毒理效应值 EC<sub>10</sub>、EC<sub>20</sub> 可以发现:2 种土壤中 AWCD 对应的 EC<sub>10</sub>、EC<sub>20</sub> 小于 Shannon 指数对应的 EC<sub>10</sub>、EC<sub>20</sub>,表明土壤微生物整体代谢活性受到 Cd 的抑制作用更大,并且 AWCD 比 Shannon 指数更为敏感。此外,潮土 AWCD 和 Shannon 指数对应的 EC<sub>10</sub>、EC<sub>20</sub> 均高于红壤,表明红壤微生物功能多样性受 Cd 污染抑制作用大于潮土,且 AWCD 和 Shannon 指数在红壤中敏感性强于潮土,这与土壤微生物生物量碳、脱氢酶、脲酶研究结果一致。

28 d 恒温恒湿培养实验结果表明,土壤类型对 Cd 的生态毒理效应及有效态影响较大。整个培养周期内潮土 CaCl<sub>2</sub> 提取态 Cd 含量显著低于红壤,潮土微生物受到 Cd 的生态毒理效应也明显小于红壤。有必要进行深入研究,探明土壤基本理化性质中影响土壤 Cd 的生态毒理效应及有效态的主控因子,为构建土壤性质与生态毒理效应之间的归一化模型提供数据支撑。

各微生物指标的敏感性不同,并受土壤类型的影响。脲酶被认为是指示土壤重金属污染的良好指标,本研究认为脱氢酶在 2 种土壤中的敏感性均强于脲酶。在微生物功能多样性指标中,AWCD 的敏感性强于 Shannon 指数。与潮土相比,C<sub>mic</sub>、脲酶、脱氢酶、AWCD、Shannon 指数的敏感性均在红壤中更强。本研究选取的 5 个微生物指标对 Cd 污染都有良好的响应,均可作为 Cd 污染土壤微生物生态毒理实验中的测试指标。在土壤酶指标中,建议优先选取脱氢酶作为测试指标。

表 5 土壤微生物多样性指数  
Table 5 Diversity indices of soil microbial communities

土壤类型	Cd 添加量 (mg·kg <sup>-1</sup> )	Shannon 指数	Simpson 指数	McIntosh 指数
红壤	0	1.57±0.07 b	0.73±0.02 b	0.24±0.05 a
	0.1	2.21±0.03 a	0.85±0.03 a	0.26±0.04 a
	1	1.48±0.03 b	0.66±0.02 c	0.89±0.04 b
	10	1.40±0.03 cd	0.66±0.02 d	0.78±0.09 c
	100	1.33±0.08 d	0.62±0.01 d	0.68±0.03 d
	200	1.10±0.09 e	0.53±0.01 e	0.75±0.01 e
潮土	0	2.87±0.03 a	0.93±0.00 a	0.17±0.08 a
	0.1	2.89±0.01 a	0.94±0.01 a	0.18±0.09 a
	1	2.79±0.03 b	0.92±0.01 b	0.53±0.15 b
	10	2.78±0.03 b	0.91±0.01 b	0.31±0.29 b
	100	2.72±0.03 c	0.90±0.00 c	0.69±0.08 c
	200	2.66±0.01 d	0.89±0.00 d	0.31±0.18 d

表 6 Cd 对土壤微生物功能多样性的 EC 值  
Table 6 EC values of Cd for the soil microbial functional diversity

指标	土壤类型	剂量效应回归方程	R <sup>2</sup>	P	EC <sub>10</sub> /(mg·kg <sup>-1</sup> )	EC <sub>20</sub> /(mg·kg <sup>-1</sup> )
AWCD	红壤	y=32.07+19.66lgx	0.9765	0.0015	0.08	0.24
	潮土	y=661095.05/(1+EXP(10.51-0.56lgx))	0.9955	0.0045	0.09	1.52
Shannon 指数	红壤	y=-14.33/(lgx-2.79)	0.9446	0.0281	22.71	118.17
	潮土	--	--	--	>200	>200

注:由于潮土中 Shannon 指数最大抑制效应 < 10%,故未给出剂量效应回归方程。

此外, Cd 对  $C_{mic}$ 、土壤酶、微生物功能多样性的生态毒理作用还存在时间效应。14 d Cd 对  $C_{mic}$  的毒性大于 28 d, 而对脲酶和脱氢酶的毒性小于 28 d。建议 Cd 污染土壤微生物生态毒理实验中将培养时间设置为 28 d 或适当延长, 这样既考虑到土壤微生物的自我调节能力, 又可以更全面的了解 Cd 对土壤微生物指标的抑制作用。

通讯作者简介: 宋静(1974—), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为污染土壤的生态风险评估和修复。

#### 参考文献:

- [1] 柳絮, 范仲学, 张斌, 等. 我国土壤镉污染及其修复研究[J]. 山东农业科学, 2007(6): 94—97  
Liu X, Fan Z X, Zhang B, et al. Cadmium pollution of soil and its remediation in China [J]. Shandong Agricultural Science, 2007(6): 94—97 (in Chinese)
- [2] Song J, Zhao F J, McGrath S P, et al. Influence of soil properties and aging on arsenic phytotoxicity [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006, 25(6): 1663—1670
- [3] Chander K, Brookes P C. Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludge to a sandy loam [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1995, 27(11): 1409—1421
- [4] 孙波, 赵其国, 张桃林, 等. 土壤质量与持续环境—III. 土壤质量评价的生物学指标[J]. 土壤, 1997, 29(5): 225—234  
Sun B, Zhao Q G, Zhang T L, et al. The soil quality and continuous environment—III. Biological indicator for soil quality assessment [J]. Soils, 1997, 29(5): 225—234 (in Chinese)
- [5] 王菲, 杨官品, 李晓军, 等. 微生物标志物在土壤污染生态学研究中的应用[J]. 生态学杂志, 2008, 27(1): 105—110  
Wang F, Yang G P, Li X J, et al. Application of microbial markers in the researches of soil pollution ecology [J]. Chinese Journal of Ecology, 2008, 27(1): 105—110 (in Chinese)
- [6] Van Beelen P, Doelman P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment [J]. Chemosphere, 1997, 34(3): 455—499
- [7] Wang Y P, Shi J Y, Wang H, et al. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass enzyme activity, and community composition near a copper smelter [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 67(1): 75—81
- [8] 闫晗, 吴祥云, 黄静, 等. 评价土壤质量的微生物指标及其研究方法[J]. 山西农业科学, 2010, 38(10): 78—81  
Yan H, Wu X Y, Huang J, et al. Microbial indicator of soil quality evaluation and its studying methods [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2010, 38(10): 78—81 (in Chinese)
- [9] 谢晓梅. 镉污染对红壤微生物生态特性的影响[J]. 广东微量元素科学, 2002, 9(9): 54—59  
Xie X M. Effect of cadmium on the microbial ecological characteristics in red soils [J]. Guangdong Trace Elements Science, 2002, 9(9): 54—59 (in Chinese)
- [10] 王秀丽, 徐建民, 姚槐应, 等. 重金属铜、锌、镉、铅复合污染对土壤环境微生物群落的影响[J]. 环境科学学报, 2003, 23(1): 23—27  
Wang X L, Xu J M, Yao H Y, et al. Effects of Cu, Zn, Cd and Pb compound contamination on soil microbial community [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2003, 23(1): 23—27 (in Chinese)
- [11] 滕应, 黄昌勇, 姚槐应, 等. 不同相伴阴离子对 Cd 污染红壤微生物活性的影响[J]. 土壤学报, 2003, 40(5): 738—741  
Teng Y, Huang C Y, Yao H Y, et al. Influence of accompanying anions on microbial activities in red soils polluted with cadmium [J]. Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(5): 738—741 (in Chinese)
- [12] Shweta S, Arvind M, Kayast ha, et al. Response of Rhizobium leguminosarum to nickel stress [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17(7): 667—672
- [13] Brookes P C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals [J]. Biology and Fertility of Soils, 1995, 19(4): 269—279
- [14] Khan K S, Xie Z M, Huang C Y. Effects of cadmium, lead and zinc on the size of microbial biomass in a red soil [J]. Pedosphere, 1998, 8(1): 27—32
- [15] 曾路生, 廖敏, 黄昌勇, 等. 镉污染对水稻土微生物量、酶活性及水稻生理指标的影响[J]. 应用生态学报, 2005, 16(11): 2162—2167  
Zeng L S, Liao M, Huang C Y, et al. Effects of Cd contamination on paddy soil microbial biomass and enzyme activities and rice physiological indices [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2005, 16(11): 2162—2167 (in Chinese)
- [16] 于寿娜, 廖敏, 黄昌勇. 镉、汞复合污染对土壤脲酶和酸性磷酸酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(8): 1841—1847  
Yu S N, Liao M, Huang C Y. Effects of cadmium and mercury combined pollution on soil urease and acid phosphatase activities [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(8): 1841—1847 (in Chinese)

- [17] 黄冬芬, 黄耿磊, 刘国道, 等. 重金属 Cd 处理对柱花草根际土壤酶活性的影响[J]. 热带作物学报, 2011, 32(4): 603-607  
Huang D F, Huang G L, Liu G D, et al. Effects of cadmium on the soil enzyme activity of *stylosanthes* at the rhizosphere zones [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(4): 603-607 (in Chinese)
- [18] 吴桂荣, 刘景春, 张鲁狄, 等. 重金属 Cd 对桐花树土壤酶活性的影响[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2008, 47(2): 118-122  
Wu G R, Liu J C, Zhang L D, et al. Effects of cadmium on the soil enzyme activity of *aegiceras corniculatum* seedlings [J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2008, 47(2): 118-122 (in Chinese)
- [19] 王国庆, 骆永明, 宋静, 等. 土壤环境质量指导值与标准研究 I. 国际动态及中国的修订考虑[J]. 土壤学报, 2005, 42(7): 666-673  
Wang G Q, Luo Y M, Song J, et al. Study on soil environmental quality guidelines and standards I. International trend and suggestions for amendment in china [J]. Acta Pedologica Sinica, 2005, 42(7): 666-673 (in Chinese)
- [20] 颜增光, 谷庆宝, 周娟, 等. 构建土壤生态筛选基准的技术关键及方法学概述[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(5): 417-427  
Yan Z G, Gu Q B, Zhou J, et al. A synoptic review of the technical tips and methodologies for the development of ecological soils screening benchmarks [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(5): 417-427 (in Chinese)
- [21] Chaperon S, Sébastien S. Toxicity interactions of cadmium, copper and lead on soil urease and dehydrogenase activity in relation to chemical speciation [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008, 70(1): 1-9
- [22] Gao Y, Zhou P, Mao L, et al. Assessment of effects of heavy metals combined pollution on soil enzyme activities and microbial community structure: Modified ecological dose - response model and PCR - RAPD [J]. Environmental Earth Sciences, 2010, 60(3): 603-612
- [23] 张昀, 可欣, 关连珠, 等. 镉对土壤脲酶动力学特征的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2010, 41(3): 299-303  
Zhang Y, Ke X, Guan L Z, et al. Effect of cadmium on kinetic characteristics of soil urease [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2010, 41(3): 299-303 (in Chinese)
- [24] Liao M, Xie X M, Ma A L, et al. Different influences of cadmium on soil microbial activity and structure with Chinese cabbage cultivated and non-cultivated [J]. Journal of Soils and Sediments, 2010, 10(5): 818-826
- [25] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 12-195  
Houba, V J G, Novozamsky I, Huybregts A W M, et al. Comparison of soil extractions by 0.01M CaCl<sub>2</sub>, by EUF and by some conventional extraction procedures [J]. Plant and Soil, 1986, 96(3): 433-437
- [26] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1987, 19(6): 703-707
- [27] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 268-278
- [28] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 等. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用[J]. 土壤学报, 2004, 41(3): 456-461  
Zheng H, Ouyang Z Y, Fang Z G, et al. Application of biollog to study on soil microbial community functional diversity [J]. Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(3): 456-461 (in Chinese)
- [29] McLaughlin M J, Zarcinas B A, Stevens D P, et al. Soil testing for heavy metals [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2000, 31(11-14): 1661-1700
- [30] 王俊伟, 纪淑娟, 王颜红, 等. 水稻重金属镉含量与土壤质量关系的研究[J]. 粮食加工, 2008, 33(4): 31-33  
Wang J W, Ji S J, Wang Y H, et al. Study on the relationship between the Cd content in *Oryza sativa* and the quality of soil [J]. Grain Processing, 2008, 33(4): 31-33 (in Chinese)
- [31] 尹君, 刘文菊, 谢建治, 等. 土壤中有效态镉、汞浸提剂和浸提条件研究[J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(2): 25-28  
Yin J, Liu W J, Xie J Z, et al. The study on extraction conditions and extractants of soil available Cd, Hg [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2000, 23(2): 25-28 (in Chinese)
- [32] 段学军, 闵航. 镉胁迫下稻田土壤微生物基因多样性的 DGGE 分子指纹分析[J]. 环境科学, 2004, 25(5): 122-126  
Duan X J, Min H. Diversity of microbial genes in paddy soil stressed by cadmium using DGGE [J]. Environmental Science, 2004, 25(5): 122-126 (in Chinese)
- [33] Marzadori C, Ciavatta C, Montecchio D, et al. Effects of lead pollution on different soil enzyme activities [J]. Biology and Fertility of Soils, 1996, 22(1-2): 53-58
- [34] Jing Pan, Long Yu. Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure [J]. Ecological Engineering. 2011, 37: 1889-1894
- [35] Khan S, Hesham A L, Qiao M, et al. Effects of Cd

- and Pb on soil microbial community structure and activities [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2010, 17(2): 288-296
- [36] 高大翔, 郝建朝, 金建华, 等. 重金属汞、镉单一胁迫及复合胁迫对土壤酶活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(3): 903-908
- Gao D X, Hao J C, Jin J H, et al. Effects of single stress and combined stress of Hg and Cd on soil enzyme activities [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(3): 903-908 (in Chinese)
- [37] 秦华, 林先贵, 陈瑞蕊, 等. DEHP 对土壤脱氢酶活性及微生物功能多样性的影响[J]. *土壤学报*, 2005, 4(25): 829-834
- Qin H, Lin X G, Chen R R, et al. Effects of DEHP on dehydrogenase activity and microbial functional diversity in soil [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 4(25): 829-834 (in Chinese) ◆

## 双酚 A 替代品会对斑马鱼生殖产生不良影响

2013 年 7 月 4 日 来源:环境科学与技术

根据韩国研究人员进行的一项研究,对双酚 S(双酚 A 的一种替代物质)的暴露会影响斑马鱼的性激素调节和生殖。

今年早些时候,德克萨斯大学的一项研究显示,较低浓度的双酚 S 可能中断激素传导。

韩国研究小组研究了双酚 S 暴露是否会影响成年斑马鱼的生殖,该研究重点关注使用甾体激素的下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴。暴露于“环境相关”浓度的双酚 S 的斑马鱼产的卵需要更长时间孵化,畸形率也更高。

不过,尽管一些研究已经显示双酚 A 会对雌激素受体作用,但下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴中的性激素调节的改变不可能由此类作用导致。双酚 S 似乎会影响甾类激素产生。

该研究将发表在《环境科学与技术》(*Environmental Science and Technology*)学报上。

引自《化学品安全信息周报》2013 年第 28 期总第 240 期(中国检验检疫科学研究院化学品安全研究所编译)  
[http://www.chinachemicals.org.cn/reported\\_detail.aspx?contentid=256&ClassID=229\(2013-07-15\)](http://www.chinachemicals.org.cn/reported_detail.aspx?contentid=256&ClassID=229(2013-07-15))