

行政院環境保護署

102 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

調查焚化爐周圍水稻田地土壤及作物受現地地質化學與微生物影響之總汞與甲基汞含量變化 期末報告

主辦單位： 行政院環境保護署

計畫執行單位：國立中央大學／環境工程研究所

計畫主持人：林居慶 助理教授

計畫執行期間：101年12月10日起至

102年12月09日

中華民國 102 年 12 月 印製

土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

☒ 達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以 100 字為限）

☐ 實驗失敗

☐ 因故實驗中斷

☐ 其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：☐已發表 ☐未發表之文稿 ☒撰寫中 ☐無

專利：☐已獲得 ☐申請中 ☒無

技轉：☐已技轉 ☐洽談中 ☐無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

水稻田此等陸地生態系統中的汞生地化循環為近年來極受矚目的課題，主要在於過去被認為可予以忽略的此甲基汞暴露途徑目前已證實需重新評估其可能性與重要性。雖然現階段對於甲基汞在稻作內的傳輸機制面上的理解陸續已有新的進展，但這方面的探討多只局限於礦區周圍的農地，對於幾個主要的汞排放源如焚化爐及燃煤電廠周圍的水稻田狀況所知有限。除此之外，無機汞於水稻田根系環境中的生物可利用性以及孔隙水內甲基汞的化學組成如何影響稻作對其的吸收累積仍不明瞭。本計畫的研究結果對於這些學術問題的回答以及風險評估上有所助益。

專案成果中文摘要(簡要版)

汞由於其獨特的化性，已被認定為全球性的污染物。目前已知釋放至環境中的汞，主要是人為活動所產生，由以焚化廠及燃煤發電廠的貢獻量為最大。氧化態的無機汞因其大氣停留時間相對短暫，被排放後將因沉降作用回到地表，並有機會被環境中的厭氧菌轉化成為毒性更強的甲基汞，之後再經由食物鏈的放大效應而對環境生態與人類健康造成威脅。以往的觀念中，甲基汞所帶來的毒害問題幾乎都是經由對魚蝦貝類的攝食而造成；然而，近期的文獻顯示，高濃度的甲基汞已從生長在離汞排放源相近之田地中的稻米被檢測出來，暗示著除了水相生態系統外，陸地生態系統中的食物也可能成為甲基汞的攝食途徑。由於稻米是台灣也是許多亞洲地區人民的主食，雖然藏於米粒內的汞濃度或許不高，但若以長期攝取的總量觀點來看，其對健康所帶來的影響值得關注。基於此，對於水稻田為何易成為甲基汞生成的環境，環境生物地化的作用與循環機制如何涉入其過程，以及排放源對於甲基汞在近區稻米的累積效應需進一步的調查研究。

本研究選用四處北投焚化廠周圍的水稻田進行採樣分析。所採集的樣品包含覆蓋於田地的表水、表土 (0-2 公分) 以及根系周圍的土壤。分析的項目除了總汞與甲基汞外，也涵蓋可能會影響無機汞在現地生物可得性分佈的地質化學參數，如土壤的有機質與鐵含量，以及孔隙水中的硫化物與鐵的含量。總汞和甲基汞的分析結果指出，北投焚化爐周圍水稻田的土壤及孔隙水，以及栽種在此區的稻米，其內的總汞與甲基汞含量皆與一般環境或農地的背景值相近，皆無超過法規所定的環境與食米標準，除顯示此區未受汞污染外，也間接代表焚化爐內運轉的空污防治措施可有效管控汞的排放，因其所排出之煙道氣體並未造成此區農地顯著的汞累積。根據現地地質化學與微生物族群的分析可知：(1)孔隙水中的甲基汞與無機汞濃度呈現顯著正相關，(2)硫與鐵的循環所造成的孔隙水化學造成此根系環境中無機汞的生物有效性偏高，(3)硫酸鹽還原菌極有可能是此區域最主要的汞甲基化微生物族群，而這些因素加總起來某種程度上暗示，若此區的總汞濃度增加，其根系土壤環境仍有可能具有促進甲基汞生成與累積的潛力。藉由不同形式的配位基的添加而改變甲基汞的孔隙水化學組成，測試結果顯示甲基汞的錯和化學將會造成稻作不同程度的甲基汞攝取與累積量，然此部分的機制原理仍需進一步的探究。

Abstract

Current inventories of mercury (Hg) emissions show that coal combustion and solid waste incineration account for more than half of the total emissions. Aside from intake of fish that has long been considered as the primary route for human and wildlife exposure to methylmercury (MeHg), recent studies have reported high levels of MeHg in the seed of rice grown in the vicinity of anthropogenic Hg emission sources, suggesting that ingestion of rice may be another important human exposure to MeHg. As a result, it is important to conduct thorough investigation of this exposure pathway by examining why rice paddies are conducive for Hg methylation, and also how additional inputs of Hg resulted from the combustion of municipal solid waste (MSW) may lead to the potential uptake and accumulation of Hg and MeHg in rice plants.

Four paddy sites were chosen within the agricultural land in the vicinity of the Beitou MSW incinerator. During the sampling trips, topsoil, surface water and root-soil cores were collected using ultra-clean sampling techniques in order to measure Hg levels in the parts-per-trillion range. Great care was also taken in laboratory processing to minimize external contamination. In addition to Hg and MeHg analysis, ancillary geochemical and microbiological parameters including pore water/sediment sulfide and iron concentrations were measured to probe potential factors that may control the bioavailability of inorganic Hg and the dominant Hg-methylating microbial species. Results show that concentrations of total Hg and MeHg in root-soil, porewater as well as rice grains collected from 4 rice paddy sites were in the range of background levels reported from other researchers and below the regulations for soil and edible rice, suggesting that this agricultural area near the Beitou incinerator is not polluted by Hg and the air control device employed in the incinerator has been efficient for control Hg emission. Geochemical and microbial analyses indicated that sulfate-reducing bacteria might be the principal anaerobic microbes for *in situ* MeHg formation in this root-soil area. In addition, geochemical conditions showed potential to enhance Hg methylation if elevated Hg inputs occurred. Data from MeHg chemical speciation experiments showed that complexation between MeHg and ligands might influence uptake of MeHg in rice.

報告大綱

本報告共分為四個章節，分別為計畫緣起與目的、研究方法與過程、主要發現與成果，以及結論與建議，其各章節的架構與內涵簡述如下。

- 壹、計畫緣起與目的：此章節藉由對相關文獻的回顧與整理導引出此計畫之研究動機及目的。
- 貳、研究方法與過程：此章節紀錄研究所用之方法與流程，涵蓋採樣場址與採樣時期的選擇及決定、現場採樣方法、樣品運送及保存之方法，樣品於實驗室的處理流程，各參數的分析方法，以及微生物甲基化汞的縮模試驗和稻作植栽試驗的架設等。
- 參、主要發現與成果：此章節除將本專案中的各執行項目所得之數據整理呈現外，也對其相關因素與機制進行探討。
- 肆、結論與建議：此章節綜合本計畫之成果說明結論，並就可能的後續執行工作項目提出建議。

專案成果摘要(詳細版)

前言

汞(Hg)是毒性最強的微量元素之一，已被國際公認為全球性的污染物。當其存在於環境和食品中時，對人類和野生動物將構成莫大威脅。由目前汞的排放源統計資料可知，釋放至環境中的汞主要是因人為活動所引起，且大多來自一些燃燒設備的運轉，包括都市固體廢棄物、污泥、醫院危害性廢棄物焚燒爐、工業製造工廠以及化石燃料的燃燒利用等。值得注意的是，這當中煤的燃燒使用和固體廢棄物的焚燒佔全部總排放量的一半以上。

汞自污染源排出後主要是以無機物的形式存在，其型態可分為(1)化性較為遲鈍的氣態元素汞(GEM 或 Hg^0)；(2)由二價汞所構成反應性相對為高的活性氣態汞(RGM)化合物；以及(3)與大氣中懸浮顆粒吸附或鍵結的汞(Hg_p)，此種型態的汞包含元素汞及二價汞物種。汞被釋出後，GEM 由於在大氣的平均停留時間約莫一年，故可漂流至離污染源極遠的地方，甚至遍及全球，因此可能影響一般被視為偏僻且原始的地區。相較之下，RGM 和 Hg_p 在大氣中的滯留時間偏短(約莫幾分、幾時到幾天)，排放後於短時間內可藉由乾式或濕式沉降的方式被帶回地表環境中。由此可知，當土壤表面特別是農業用土的植被位在燃燒設備的周圍時，除了其他潛在的汞來源外，極有可能額外獲得來自燃燒設備所排放出來的汞。

汞沉降至地表後，此時毒性相對較低的無機汞可能會因現地厭氧微生物的作用將之轉換成毒性較高的單甲基汞(MeHg)。甲基汞為一種強烈神經毒素，且在水相生態系統的食物網內極易產生生物累積與生物放大的效應，因此是所有汞化合物中最被關注的汞物種。然而，真正決定甲基汞在食物鏈中累積的因素並非此水相生態系統中的總汞濃度，而是當系統中的所有物理、化學、生物參數構成某種有利於當中的厭氧微生物進行甲基化作用時的環境條件最為關鍵。在不同的生態系統中，濕地由於具有來自腐敗植物所供給的豐富有機質和長期被水淹蓋而呈現厭氧環境的特性，已被視為是汞甲基化的高潛勢場址。而稻米在生長季節期間，因多數時間其環境皆被水淹蓋著，故從生態的角度來看，水稻田其實就屬於溼地場址。也因為如此，水稻田(尤其是低勢地區的稻田)已被認為是汞甲基化的「熱點」(hotspots)場址。事實上，除了攝食魚肉(特別是大型肉食性魚類)和海鮮已被認為是人類和野生動物接觸甲基汞的主要途徑外，近期的研究調查指出在人為汞排放源附近的稻米其植物體內也具有高甲基汞含量，暗示著攝食稻米很可能成為另一種重要的甲基汞暴露途徑。由於稻米是台灣也是許多亞洲地區人民的主食，雖然藏於米粒內的汞濃度或許不高，但若以長期攝取的總量觀點來看，對消費者及其後代健康所帶來的影響為何值得關注。基於此，對於鄰近焚化爐的水稻田土壤及作物中的汞含量變化，此農業生態系統為何易成為甲基汞生成與累積的環境，以及當中的生物地質化學的運種機制為何，實有需要進一步的調查與研究。

本研究旨在深入探究汞排放源周圍的稻田土壤與作物內，可能調控甲基汞生成與累積的生地化機制為何。計畫選擇鄰近北投焚化爐的稻田做為研究場址，除藉由現場採樣與實驗室的量測，了解場址內土壤與稻作中總汞與甲基汞的含量變化外，並搭配縮模試驗釐清水稻田裡主要促成甲基汞生成與累積的地質化學與微生物因素為何。具體的目標包括：(1)調查場址內汞與甲基汞濃度的空間與時間分布

變化，以及會影響現地稻田土壤與孔隙水中汞甲基化的相關微生物和地質參數因子；(2)分析甲基汞的化學組成對稻作攝取與累積甲基汞的影響。

研究方法

北投垃圾焚化爐位於北投區洲美街，接近基隆河和淡水河之交匯地區(即基隆河下游區段)，周圍被農業用地所圍繞，其灌溉水源可分別從五分港溪(焚化爐東邊；主要來源)、磺港溪(焚化爐北邊)以及雙溪(焚化爐南邊)所引來。本研究四個農地選在位於焚化爐煙囪的下風處，希望可探討因順風帶來的焚化廢氣對稻田的影響，但同時也希望與外圍道路保有一定的距離，以盡量減少道路廢氣所帶來的影響。四農地彼此間的距離相當接近(約為 1~2 公里)，其經緯度分別為 121°30'9"/25°6'20"；121°30'48"/25°6'1"；121°30'20"/25°6'30"；121°30'16"/25°6'43"。

為了可量測到濃度在 ppt 範圍的汞背景值，以及為了避免對樣品引進外來污染，採樣時嚴格遵守「超淨」(ultra-clean)採樣技術，且所用的器皿若無特別說明，皆事先做三段式清洗：先隔夜鹼洗(浸於 1 N NaOH 且 70°C 下)-以 18.2 MΩ 超純水潤洗-隔夜酸洗(1 N HCl)-以超純水潤洗-內壁隔夜浸於超純水-以超純水潤洗且自然風乾後，置於兩層夾鏈袋保存直到使用。此外，所用的藥劑最起碼為 ACS 等級，且所有的酸液皆為 trace-metal 等級。採樣時間涵蓋稻穗長出前與長出後，同個農地每次採樣的區域範圍約在 1x1 m² 內。根系土壤樣品以酸洗過的 PVC 塑膠管(約莫 30 公分)鑽芯收集，並用橡皮塞封住管柱頭尾端且保持直立以使內部土壤的氧化還原狀態得以維持。表面水樣及土樣則使用清洗過的棕色瓶收集。採樣完的樣品立即置於雙層夾鏈袋內避免外界污染，再置於內裝冰袋的保溫箱裡於 3 小時內送回實驗室做進一步處理。樣品帶回實驗室後必須依照分析項目做不同的前處理與分裝，過程全在厭氧操作箱內進行，步驟如下：將根系土壤樣品從鑽芯管內緩緩擠出，利用已酸洗過的塑膠刀將上部約莫 5 公分處與下部 1 公分處切除(橡膠塞子並未經過酸洗，因此靠近橡膠塞處必須切除)，並將土壤分裝給各不同參數分析所需用量，而剩餘土壤則利用離心機(10,000 rpm, 25 min, 20°C)將孔隙水分離出來，再利用 0.22 μm 針筒濾紙將水樣過濾後分裝給不同地質參數分析所需要量。液態樣品的部分(包括表面水和孔隙水)，分析汞與甲基汞的樣品經上述方法過濾後分裝到已酸洗的棕色瓶中，並加入 0.5%(體積比)的濃鹽酸，之後於 4°C 下冷藏保存；分析鐵的樣品則分裝至已酸洗的血清瓶後厭氧冷藏保存；分析硫的樣品則在當天於厭氧操作箱內分析完畢以防止樣品氧化。固態樣品則分裝至酸洗過的離心管後，以 -80°C 冷凍保存。以上水樣及土樣保存時皆需兩層夾鏈袋保護以防外界污染。

土樣與稻米的總汞分析參照 EPA Method 1631 Appendix，以 CVAFS 量測：土樣以濃鹽酸與硝酸常溫消化，但稻米則以濃硫酸與硝酸高溫消化以防止氣泡生成。水樣則以 EPA Method 1631 進行分析。而甲基汞的分析，固態樣品使用硫酸銅溶液與溴化鉀/硫酸混合液先將甲基汞自土壤或稻米介質溶出，再溶入二氯甲烷，最後透過反萃取程序將溶於二氯甲烷中的甲基汞移至水溶液後進行分析；水樣則參考 EPA Method 1630 並利用 CVAFS 偵測濃度。土壤有機質分析參考標準方法中的 Method 2540-E，溶解性有機碳則參考 Method 5310B。水樣硫化物的分析同樣參考標準方法(Method 4500-S2-D)，而土樣的酸揮發性硫化物(AVS)濃度則主要參照 Allen et al (1993)方法，兩者最後都以波長 662 nm 的吸光值定量。鐵的分析方法則

參考 Lovley et al. (1987) 的 ferrozine 比色法，以 562 nm 吸光值分析濃度。水樣的硫酸鹽濃度則以離子層析儀分析。

微生物縮模試驗部分，由於目前已知硫酸鹽還原菌、鐵還原菌以及甲烷生成菌為自然環境中主要的汞甲基化菌群，因此為探究計畫所選擇的農地其根系土壤不僅有這幾類菌群的存在，且其是否具有將汞甲基化的能力，將所採得的土壤當做植種源，針對不同菌群添加特定的電子接受者於已知成份的培養液中進行厭氧培養，待確定這些菌群的存在後，再根換培養液並於其中加入無機汞以進行甲基化試驗。此試驗以滅菌土作為控制(對照)組，並分析過濾後的培養液以決定甲基汞生成量。

稻作植栽試驗的部分，文獻雖已指出甲基汞一旦進入植物體後，將隨著植物的生長，透過營養傳輸使甲基汞最終累積於種子，但究竟是何種形態的甲基汞最容易進入植體且最後累積於米粒中，目前為止仍缺乏記載與探討。為此，本計畫亦同時以水耕的方式，藉由操作水中甲基汞的化學組成予以探究。育種前先進行消毒，之後再置於含有棉花片的培養液栽種。待稻種發芽後開始添加甲基汞以及不同型態不同濃度的配為基(ligands)，分別有 NaCl: 1 g/L、10 g/L; cysteine: 10 nM、100 nM; leucine: 10 nM、100 nM; methionine: 10 nM、100 nM; glutathione: 10 nM、100 nM; humic acid: 10 ppm、100 ppm。稻作栽種兩週半後，乾燥並進行甲基汞含量分析。

研究結果

本計畫的四個農地經五次採樣(3/22、4/25、5/31、7/16、9/3)分析所得之表土、根系土以及孔隙水中的總汞(HgT)與甲基汞(MeHg)的濃度皆不超過 600 ng g^{-1} (即 0.6 ppm)，低於法規標準(一般土壤 20 ppm，農地 5 ppm)，也與文獻所記載的未受污染的土壤汞濃度 $10\text{-}500 \text{ ng g}^{-1}$ 相近，顯示焚化廠的空污防治設備對汞的捕捉效率近年已顯著進步。此外，汞在土壤的分佈不隨距離焚化爐的遠近而有明顯的趨勢差異。土壤與孔隙水中的甲基汞濃度與文獻的背景濃度 $0.7\text{-}3.6 \text{ ng g}^{-1}$ 相比，計畫所測得的土壤甲基汞值偏高。甲基汞佔總汞的比例值也比文獻略高(本計畫之 2.26-3.60% vs. 文獻之 0.19-2.1%)。環境介質中的甲基汞與總汞的比值可約略說明此系統內的微生物對於汞的利用性或將汞甲基化的能力與程度為何，此數值從同一農地場址於表土時的最低值、根系土時的中間值到孔隙水的最大值的分佈趨勢可知，孔隙水是微生物最易生成甲基汞的環境介質，此也證明如要深入探究一生態系統的甲基汞生成與累積的問題時，分析孔隙水中相關生地化參數的重要性。

計畫採樣之農地所收成的米粒經分析後所得之稻米汞含量低於衛生署所定的 0.05 ppm (即 50 ng g^{-1}) 食米汞含量。總汞的測值與一般未受污染的農地所得之稻米總汞含量相近，然而甲基汞的含量卻偏高，甚至高於總汞含量。米粒略高的甲基汞含量推測可能是因「人工合成」作用(artifact formation)所造成。每日因進食稻米而攝入的甲基汞數量($\mu\text{g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$)利用以下公式計算求得：甲基汞每日進食率=稻米內甲基汞含量×每日稻米攝取量×體重⁻¹(式中稻米甲基汞的濃度單位為 $\mu\text{g g}^{-1}$)。若以一體重 60 kg 且每日進食 400 g d^{-1} 稻米量的消費者來看，當採用數值最保守的美國環保署建議之每日攝食量 $0.1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 來計算時，所得的米粒甲基汞允許濃度將為 $0.015 \mu\text{g g}^{-1}$ ，亦即 15 ng g^{-1} 。若將稻米甲基汞濃度和土壤甲基汞濃度或孔隙水甲基汞濃度的關經統計分析後可知，此區的稻米甲基汞含量與這兩者的相關性不

顯著($p>0.01$)，表示無法單獨以土壤甲基汞濃度或孔隙水甲基汞濃度來預測稻米甲基汞濃度。

根據土壤與稻米的總汞及甲基汞分析結果可知，本計畫位於北投焚化爐周圍的採樣農地其汞含量屬於一般常見的背景濃度，此資訊可做為未來環境變化時的基礎參考值。除了調查總汞與甲基汞的分佈外，為了解水稻田生態系統在汞的生化循環轉換上所扮演的角色，以進一步探討此類農地的土壤與孔隙水環境是否具有促進甲基汞生成的潛力，計畫亦同時進行相關的根系環境中的地質化學參數的量測與分析，尤以硫酸鹽/硫化物、三價鐵/亞鐵、土壤有機質/DOC，以及 pH 等分析最為重要。採樣分析結果顯示此根系區域之(1)孔隙水硫酸鹽/孔隙水硫化物/AVS 濃度皆低，但其(2)土壤不論二價或三價鐵的濃度都略高。若比較孔隙水中的甲基汞濃度與此些地化參數的相關性，發現孔隙水中的甲基汞含量與亞鐵或硫酸鹽含量無相關性，反而與孔隙水中的無機汞含量有顯著相關($p<0.01$)，某種程度上呼應根系土內目前無機汞仍屬低量狀態。

採樣所得之根系土壤以含有不同最終電子接受者(如硫酸鹽、晶相未定型之鐵礦、或高濃度之二氧化碳)之培養液培養數週後，發現不論從土壤顆粒型態的改變或相關的代謝產物分析結果均顯示各實驗瓶內相對應的微生物的存在。當將無機汞添加至此些血清瓶進行甲基化實驗後，所得的結果明確顯示焚化爐周圍稻田根系土壤中主要進行汞甲基化作用的微生物族群為硫酸鹽還原菌，其次為甲烷生成菌，而鐵還原菌可能因添加鐵礦作為電子接受者而使之後加入的無機汞吸附於鐵礦使其生物可利用性降低而造成甲基汞的生成不明顯。由於汞在此四農地根系環境中的 K_d 值相近(site-1 至 site-4 分別為 4.37、4.52、4.77 以及 4.64，與一般文獻中所記載的總汞 K_d 值相似)，如考慮其他地化條件，可知四農地根系土中汞甲基化作用的程度最終取決於可被微生物利用的汞量(目前的狀態顯示為低汞濃度)，以及可將汞甲基化的族群數量與活性(目前可看出主要為硫酸鹽還原菌)。

雖然文獻上尚缺植物體對於甲基汞吸收機制的探討，但目前已知與無機汞相比，稻作根部較缺乏對於甲基汞的防範機制，故甲基汞主要是由根部進入稻作植物體中，而非地上植物體部位，因此根系土壤的孔隙水化學在稻作吸收甲基汞的作用上是相對關鍵的因素之一。事實上，有學者利用基因工程所建構出可定量進入細胞內的甲基汞「微生物探針」(a *mer-lux* bioreporter)的研究結果指出，與無機汞進入微生物細胞的機制一樣，甲基汞在細胞外的化學組成將主導其被細胞攝入的難易度。為此，本計畫的稻作植栽試驗即根據此研究結果進行實驗設計，因土壤栽種不易操作孔隙水中的甲基汞化學組成，且因土壤屬不均質系統較難完全控制，故採水耕方式進行。初步試驗結果顯示在不考慮稻作生長期間對於營養液是否會有不同吸收速率的情況下，氯離子濃度越高，植體甲基汞的數量也越高；高濃度的腐質酸將抑制稻作的甲基汞吸收；cysteine 的添加對於稻作吸收甲基汞無任何助益；leucine、methionine 以及低濃度的 glutathione 添加則有助於稻作吸收甲基汞。此結果說明甲基汞的水化學效應值得深入研究。

結論

本研究選擇北投焚化廠周圍的水稻田進行採樣分析，分析的項目除總汞與甲基汞外，也涵蓋可能影響無機汞現地生物可得性的地化參數。分析結果指出焚化爐周圍的水稻田土壤與孔隙水，及栽種於此區的稻米，其內的總汞與甲基汞含量皆無超過環境與食米標準，顯示此區除未受汞污染外，也顯示焚化爐的空污防治

可有效管控汞排放。現地地質化學與微生物族群的分析則暗示若此區的總汞濃度增加，其根系土壤可能具有生成與累積甲基汞的潛力，且主要的汞甲基化菌群為硫酸鹽還原菌。最後，植栽試驗顯示改變孔隙水的甲基汞化學組成，將造成稻作不同程度的甲基汞攝取與累積。

建議事項

根據本研究最後所得之結果可歸納出下列幾項建議：

1. 針對此區水稻田農地於汞的生化循環轉換上的分析可知，其根系土壤具有高潛勢的汞甲基化能力，故焚化爐所設之空污控制設備運轉的良善與否雖為關鍵之一，但以目前的狀態來看，更為重要的應是注意灌溉水中的汞含量，此部分或有監測的必要。
2. 負責微生物甲基化汞的基因組已被鑑定並驗證出為值得信任的生物標記工具，故往後如能將此工具應用在調查工作上，對於判別特定生態系統內甲基汞的生成潛勢上將更具時效性。
3. 根據實驗觀察可知孔隙水中的甲基汞錯和作用可影響稻作吸收甲基汞的程度，其機制除具「被動擴散」的可能性外，根部對於小分子胺基酸的「主動運輸」機制似乎更為重要。若是如此，針對孔隙水中的小分子有機物的定性與定量或許將能更明確的預測與掌握甲基汞於稻作的累積程度。此部分的研究需更進一步的確認。

第一章 計畫緣起與目的

1.1 計畫由來

汞(Hg)是一種毒性很強的微量元素，已被國際公認為全球性的污染物。當其存在於環境和食品中時，對人類和野生動物將構成重大威脅(Mason *et al.*, 1995; Morel *et al.*, 1998.)。由目前汞的排放源統計資料可知，排放至環境中的汞主要是因人為活動所引起(Liu *et al.*, 2007)，且大多來自一些燃燒設備的運轉，包括都市固體廢棄物、污泥、醫院危害性廢棄物焚燒爐、工業製造工廠以及化石燃料的燃燒利用等(Landis *et al.*, 2004; Keeler *et al.*, 2006; UNEP, 2008)。值得注意的是，這些來源中煤的燃燒使用和固體廢棄物的焚燒佔全部總排放量的一半以上(Wang *et al.*, 2004)。

汞自污染源排出後主要是以無機物的形式存在，其型態可分為(1)化性較為遲鈍的氣態元素汞(gaseous elemental mercury, GEM 或 Hg^0)；(2)由二價汞所構成反應性相對為高的活性氣態汞(reactive gaseous mercury, RGM)化合物；以及(3)與大氣中懸浮顆粒吸附或鍵結的汞(particulate-bound mercury, Hg_p)，此種型態的汞包可包含元素汞 Hg^0 及二價汞 Hg(II) 物種(Schroeder and Munthe, 1998; Lin and Pehkonen, 1999)。汞被釋出後，GEM 由於在大氣的平均停留時間約莫一年，故可漂流至離污染源極遠的地方，甚至遍及全球，因此可能影響一般被視為偏僻且原始的地區。(Fitzgerald and Mason, 1997; Fitzgerald *et al.*, 1998)。相較之下，RGM 和 Hg_p 在大氣中的滯留時間偏短(約莫幾分，幾時到幾天)，排放後在短時間內可藉由乾式或濕式沉降的方式被帶回當地的地表環境中，如圖 1 所示(Carpi, 1997)。由此可知，當土壤表面特別是農業用土的植被位在燃燒設備的周圍時，除了其他潛在的汞來源外，極有可能額外獲得來自燃燒設備等污染源所排放出的汞。

汞沉降至地表後，此些毒性相對較低的無機 Hg(II) 可能會因現地厭氧微生物的作用將之轉換成毒性較高的單甲基汞(mono methyl mercury, MeHg)。甲基汞為一種強烈神經毒素，且在食物鏈中極易產生生物累積與生物放大的效應，因此是所有汞化合物中最被關注的汞物種(Bloom, 1992; Kraepiel *et al.*, 2003)。然而，真正決定甲基汞在食物鏈中累積的因素並非此生態系統中的總汞濃度，而是當系統中的所有物理、化學、生物參數構成某種有利於當中的厭氧微生物進行甲基化作用時的環境條件最為關鍵。在不同的生態系統中，濕地由於具有來自腐爛植物所供給的豐富有機質和長期被水淹蓋而呈現厭氧環境的特性，已被視為是汞甲基化的高潛勢場址(St. Louis *et al.*, 1994, 1996; Kelly *et al.*, 1997; Heyes *et al.*, 2000; Marvin-DiPasquale *et al.*, 2003)。而稻米在其生長季節期間內因其環境多數時間皆淹蓋著水，故從生態的角度來看，水稻田其實就屬於溼地場址(Molles Jr., 2010)。也

因為如此，水稻田(尤其是低地稻田)已被認為是汞甲基化的”熱點”場址(Qiu *et al.*, 2008)。事實上，除了魚肉(特別是大型食肉性魚類)和海鮮的攝食已被認為是人類和野生動物接觸甲基汞的主要途徑外(Kraepiel *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010)，近期的研究調查指出在人為汞排放源附近的稻米其植物體內亦具有高甲基汞含量(Feng *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2011; Søvik *et al.*, 2011)，暗示著稻米的攝食很可能是另一種人類暴露到甲基汞的重要途徑(Barrett, 2010; Meng *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010ab)。

由於稻米是台灣也是許多亞洲地區人民的主食(Li *et al.*, 2010)，雖然藏於米粒內的汞濃度或許不高，但若以長期攝取的總量觀點來看，對消費者及其後代健康所帶來的影響為何值得關注(Rothenberg *et al.*, 2011a)。基於此，對於鄰近焚化爐的水稻田土壤及作物中的汞含量變化，此農業生態系統為何易成為甲基汞生成與累積的環境，以及當中的生物地質化學的運種機制為何，實有需要進一步的調查與研究。

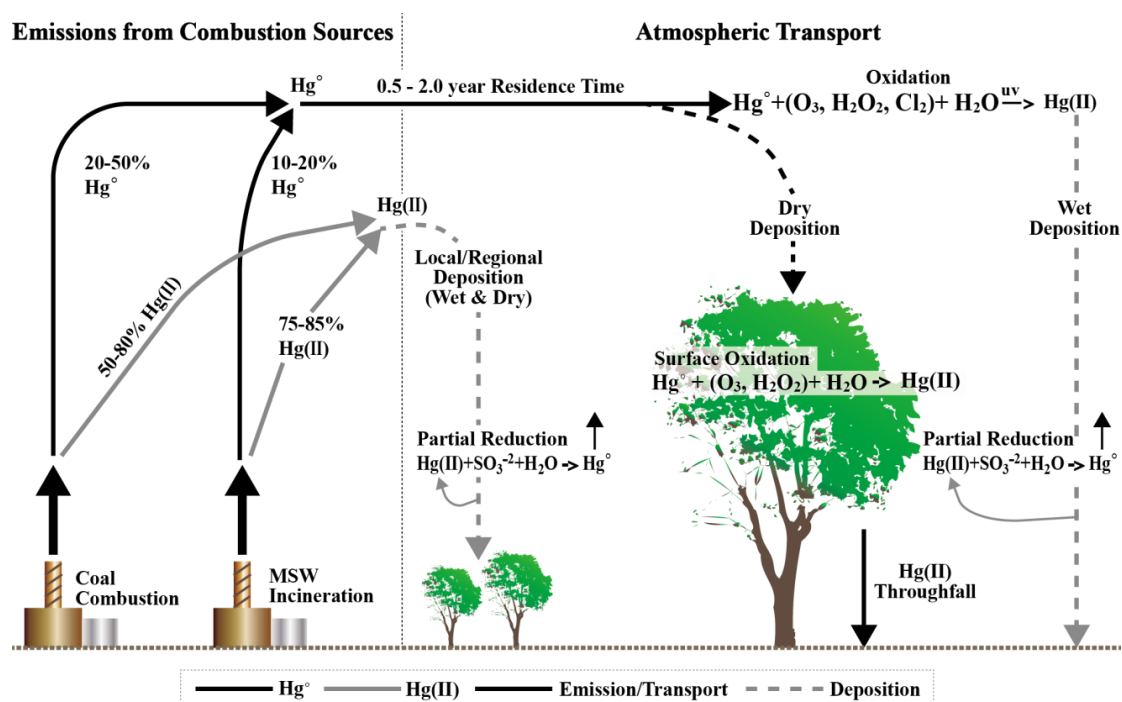


圖 1.1 汞自燃燒設備的釋放和大氣傳輸(Carpi, 1997)

1.2 計畫背景

1.2.1 燃燒設備的汞排放

汞中毒及其引起的健康危害等問題會受到關注，起因於 50 年代的日本水俣灣事件。此事件的發生乃是上游的乙醛工廠長期釋放含汞廢料至下游海灣，最後導致海灣附近漁村居民誤食其海鮮而造成嚴重的神經功能障礙以及後代的畸形(Abelson, 1970)。日本水俣灣事件外，歷史上在伊拉克也有另一件悲慘的因人為疏忽所造成的食用米受有機汞農藥中毒的事故(Bakir *et al.*, 1973)。兩事件皆證實在甲基汞的暴露下對人體健康的影響最為嚴重，此乃由於甲基汞具有穿越血腦和胎盤屏障的能力，使人體特別是幼童與發育中的胎兒造成不可逆的神經損害(Sweet and Zelikoff, 2001)。而這些事件也使得汞的廢水排放與管理法規更加嚴格，也讓汞的主要排放源和所引起的廣泛污染問題轉自於大氣的排放和交通運輸。

雖然大自然的一些活動如森林野火和火山爆發等也可能將汞自地殼釋放到各個環境介質(UNEP, 2002; Friedli *et al.*, 2007; Wiedinmyer and Friedli, 2007)，但自工業革命以來主要還是以人為的排放為環境中主要的汞污染源(特別是化石燃料的燃燒為最大宗)，大約占全球的 75% (Mason *et al.*, 1994; Fitzgerald *et al.*, 1998; Schuster *et al.*, 2002)。在近兩世紀中，從土壤沉澱物推斷出大氣中的汞濃度隨著時間有上升且累積的趨勢，除此之外亦可從冰芯中推斷出類似現象 (Heyvaert *et al.*, 2000; Schuster *et al.*, 2002)。除了燃煤電廠(目前全球汞最大的排放源)，其他主要汞排放到空氣的來源包括精煉廠和大規模黃金生產、金屬冶煉、水泥窯、氯鹼廠、廢棄物焚燒爐甚至是牙科用的汞合金(UNEP, 2008)。這些設施中，在缺少空氣污染控制設備(air pollution control device, APCD)的情況下，廢氣煙道中的汞釋放量和進入場址的汞量有著直接相關性；而當採用 APCD 時，燃燒設施所排放至大氣的汞含量與汞的形態、廢氣道的溫度和此設施所採用空氣污染控制設備的類型有著很大的關係(Carpi, 1997)。

在都市固體廢棄物中，汞主要來自於廢棄的含汞產品，包括電池、熒光燈管、油漆等(Carpi, 1997)。文獻推測由於高濃度的氯化氫包含在都市固體廢棄物焚燒爐的廢氣中，因此汞在廢氣道中主要以氧化形式存在(即，Hg(II))，只有小部分的汞以元素形式存在(即 Hg⁰) (Carpi, 1997; Fahlke and Bursik, 1995; Chang *et al.*, 2000)。據統計，從都市固體廢棄物焚燒爐中所排出的汞物種組成中，有 10-20%屬於 Hg⁰ 和 75-85%屬於 Hg(II)。因此，汞一旦被釋放後，大部分的 Hg(II)可能會在污染源週遭的地區藉由空氣中濕式和乾式的沉降效應而降至地表。目前所知都市固體廢棄物焚化爐所採用的定期通過靜電除塵器和袋式集塵器去除汞的效率並不高，僅能去除約 30-45%的汞(Chang *et al.*, 2000)。然而，如果這些空氣污染控制設備與二氧化碳和氮氧化物控制設備結合使用，對於汞的去除率可以高達 95%(UN report 2008)。事實上，自從與都市及醫療廢棄焚化爐相關的法規開始實施後，加上從這

些來源在施行回收政策後，汞的排放量明顯減少(Atkeson *et al.*, 2005)。儘管削減了這些排放量，但汞的濕式沉降效應仍被高度觀察到，且目前對於”本地 vs. 遠程運輸”兩者對排放量的相對影響力仍舊不甚清楚(Sherman *et al.*, 2011)。

1.2.2 濕地為汞甲基化之熱點場址

如上文所述，經焚化後的汞進入環境可分為三種不同物種且具有不同的大氣移動性(Schroeder and Munthe, 1998)，但需注意的是雖然RGM和Hg_p無法在排放後停留很久，但地表環境中的Hg(II)來源亦有可能來自於其他使用汞齊進行作業的地區之逕流廢水，如汞礦區以及金礦開採區和某些工業區(Gangull *et al.*, 2000; Suchanek *et al.*, 2000; Conaway *et al.*, 2003)。然而，不同於無機Hg(II)其污染源主要來自外部環境，大多數的甲基汞皆在現地場址產生，且微生物在此過程中扮演著關鍵的角色(Gilmour and Henry, 1991; St. Louis *et al.*, 1996; Branfireun *et al.*, 1998; Driscoll *et al.*, 1998)。甚者，有文獻指出與存在於現地較老舊的Hg(II)相比，新沉積的Hg(II)似乎具有更高的汞甲基化潛勢(Harris *et al.*, 2007)，推測是由於溶解態的汞在形成膠體或結晶的老化(aging)過程中的顆粒狀態差異所造成(Deonarine and Hsu-Kim, 2009)。

如同其他重金屬一樣，總汞的濃度往往被用來做為衡量毒性的一個參數，但此參數在大多數的生態系統中對於甲基汞濃度的推測常不精準，亦即此參數無法單獨做為預測甲基汞生成的工具(Benoit *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 1995)。舉例來說，1865到1957年間美國加州的Clear Lake湖水被含有汞礦的硫廢礦場嚴重污染，使得此地成為全世界總汞濃度最高的污染地區(Fleming *et al.*, 2006)。Suchanek等人在總共35個採樣點中測量地沉積物中的總汞濃度和甲基汞濃度，發現總汞的濃度分布在礦場附近最高而隨著離礦場距離的增加濃度呈指數型下降，因此顯示廢礦之汞污染濃度為一點源污染。然而，雖然沉積物中的甲基汞也隨著距離礦源的減少(下降的趨勢遠不及總汞陡峭)，但甲基汞和總汞的比例卻隨著距離的增加而增加，指出總汞濃度和甲基汞濃度之間不具有強烈的相關性。

St. Louis和其他人(1994)在4個不同的北方流域計算了甲基汞的質量平衡，發現濕地部分之甲基汞濃度較一般高地(high land)地形多了26~79倍。由於其實驗缺乏甲基汞與總汞的相關性數據，因此作者認為在濕地中汞甲基化率的增加主要受到環境因子的影響，包含較低的pH值、溫和的溫度和含有溶解性有機碳等。Hurley等人(1995)在美國威斯康辛州39條不同土地的河流比較甲基汞生成量(農業，農業/森林和濕地/森林)，發現甲基汞之產量與覆蓋的濕地比例呈現正相關，且最高的甲基汞濃度乃從濕地/森林地區測得。此外，加州聖保羅灣等地(San Pablo Bay, CA)曾經在1850年代之加州淘金熱事件中受過汞的污染，Marvin-DiPasquale等人比較3個開放水域和1個沼澤地區中甲基化/去甲基化之比值，發現沼澤地區之淨甲基化為

開放水域之25倍，說明了沼澤地區更利於甲基化，即使總汞濃度在4個測站的濃度皆差不多(Marvin-DiPasquale et al., 2003)。總結來說，濕地的出現對於汞的甲基化影響甚大，主要是因為濕地的特性增加了微生物的活性，此生態系統當中營養豐富的水、氣溫和腐爛的植物供應了可甲基化的異營微生物合適的生長環境。

1.2.3 汞的化學組成對微生物生成甲基汞的影響

甲基汞的生成除了與汞甲基化細菌的活性有關外，另一個決定汞甲基化潛勢的關鍵因素則是汞的生物可利用性(bioavailability) (Benoit et al., 2003; Ullrich et al., 2001)。目前已知河口與淡水沉積物中汞的甲基化作用主要是由硫酸鹽還原菌(sulfate-reducing bacteria, SBR)所造成(Compeau and Bartha, 1985; Gilmour et al., 1992)，此類細菌主要為厭氧異營菌，普遍集中在好氧與厭氧層的邊界。此外，鐵還原菌(iron-reducing bacteria, FeRB)也被確認為重要的汞甲基化菌(Warner et al., 2003; Fleming et al., 2006; Kerin et al., 2006; Mitchell and Gilmour, 2008)。近期的研究也發現在湖泊水生系統植物上的固著生物膜內的甲烷生成菌具有產生甲基汞的能力(Hamelin et al., 2011)，此類微生物也廣泛存在於稻田土中，使得稻田土壤為全球大氣層中的甲烷主要來源之一(Sakai et al., 2007)。儘管這三類細菌被視為環境中主要的甲基汞生成菌，但科學界對於為何這類的厭氧菌會演化成在其生長環境中擅於將毒性相對較低的無機汞轉換成毒性較高的甲基汞的原因尚不明瞭，主要乃是因為並非所有的SRB、FeRB或甲烷生成菌都能夠將汞甲基化，因此，上述三類微生物對於汞的甲基化之相對重要性尚未確定，仍然有待觀察(Lin et al., 2011)。

當在處理生物利用性的問題時，化學物種型態為一重要的決定因素。對於汞，由於目前還沒有發現其具有任何的生物作用(Wiatrowski et al., 2006)，因此許多學者認為此類物種主要藉由其不帶電的化學物種形式，經由被動擴散運輸的方式而進入細胞，因為如果是帶電物種，電荷將阻礙其通過脂質雙層膜(Barkay et al., 1997; Benoit et al., 2001; Jay et al., 2002; Benoit et al., 2003; Najera et al., 2005; Lin and Jay, 2007)。汞已知是個經典的親硫元素，故汞循環和硫循環有著密切的關係(Morel and Hering, 1993; Stumm and Morgan, 1996)。在厭氧、含低濃度硫化物且固定總汞濃度的環境下，汞主要會以 $\text{HgS}^0_{(\text{aq})}$ 的形態存在，而此汞-硫錯合物從被動擴散的理論解讀，對於能將汞甲基化之硫酸還原菌來說是最具生物利用性的物種(Jay et al., 2002; Benoit et al., 2003; Lin and Jay, 2007)。此外，實驗室的試驗亦發現汞的甲基化在固定硫化汞濃度下($\text{HgS}_{(\text{s})}$)是不受影響的(Jay et al., 2002)，即使汞多硫化物種濃度顯著的改變了溶解性的汞與被動擴散吸收模型是一致的(Paquette and Helz, 1997; Jay et al., 2000)。

汞和天然有機物(NOM)之間的相互作用也在汞的生物地球化學中扮演著重要的角色。從被動擴散的角度來看，汞結合到大的有機分子或溶解NOM，在特定

條件下，會阻礙細菌攝取二價汞(Hammerschmidt et al., 2004)。然而，汞的生物利用度在NOM之確切作用尚不清楚，同樣的甲基汞和NOM之間的相互作用亦需要被觀察(Schaefer and Morel, 2009; Gilmour et al., 2011; Schaefer et al., 2011)。無論如何，Hg和NOM之交互作用遜於無機硫化物與汞的作用由於汞與硫化物的親和力較汞與NOM的親和力要來的強(Schaefer and Morel, 2009)，說明了對於汞來說硫化還是為主要的地質參數在厭氧環境下。

1.2.4 稻田土中參與汞甲基化之微生物

遭水浸沒的稻田在缺氧條件下，會有一系列交替的電子接受者接續被利用完，直到甲烷的生成為主導反應(Sakai et al., 2007)。且如同一般的種植土地，稻田被劃分為三個區域，其劃分依據為氧氣量，分別為：好氧表面土壤，缺氧土壤(根下方)、和根圈區域(從植物的根大約1 mm的面積)(Liesack et al., 2000)。根圈由於根部會分泌其分泌物包含碳水化合物、有機酸和有機碳等提高了微生物的活性，故被認為不同於一般土壤，此外根也會散發出光合作用的副產物氧氣到根際。後者是由於通氣組織系統(即海綿，多孔材料)高度發達於濕地中，增加了氧氣擴散量並通過進入水體中，進而創造了一個有氧的環境在根尖區域(Madigan et al., 2002)。

氧氣若存在於好氧-厭氧之介面下，可能會使得硫氧化菌和硫酸鹽還原菌共存於根際(Scheld and Stubner, 2001)。在一個典型的厭氧環境下(非根際土中)，Stubner et al. (1998)分離並列舉了幾個硫氧化細菌的菌株，同樣也分離並列舉幾個硫氧化菌於好氧的根際。同樣地，Wind et al. (1999)的研究也指出SRB在典型好氧環境(在水稻田，unexpected)和在田間土壤(厭氧，expected)被發現。此外，硫酸鹽及硫代硫酸鹽濃度(即硫氧化物來說)在有栽種植物的部分較沒栽種部分的土壤，其孔隙水硫氧化物濃度高出了20~40倍，驗證了植被滲出液所排出的氧氣是可生物利用的(Wind and Conrad, 1995)。此外，縮模試驗也發現硫酸鹽還原率在離根部約0~1.5 mm時最高，說明根際中氧氣的可用性(Wind and Conrad, 1997)。上述觀測與縮模試驗證實了硫氧化菌和硫還原菌共存於根際和非根際的土壤中，且彼此間的共生關係很有可能是因為生物膜的形成。生物膜為附著於介質表面的微生物群落，已被認為是自然環境中微生物最主要的生活方式 (Costerton et al., 1995)。

在厭氧的地表下氧氣的可利用性對於汞的循環有著直接的影響。首先、在根際和非根際土壤之硫氧化菌和硫還原菌之共存使得硫酸鹽物種的再生，即更多的基質供給硫酸鹽還原菌行呼吸作用。再者、硫化物的氧化降低了硫化物的濃度，使得體積較小、不帶電荷的硫化汞物種產生，即前文所提之 $\text{HgS}^0_{(\text{aq})}$ ，進而提高了汞的生物利用性至硫酸鹽還原菌(Benoit et al. 1999)。因此，在厭氧和好氧微生物共存的特別條件下，由於硫的循環，可預期稻田土內會有更高的甲基汞產率。此外，鐵還原菌也在水稻根部附近被發現，而在稻田裡甲烷菌的重要性和普遍性亦已提

及(Sakai et al., 2007)。

1.2.5 水稻中的甲基汞含量

對於甲基汞的暴露，大多數人皆是透過攝食魚肉或其加工製品而接觸或暴露到甲基汞。然而，近期的研究已顯示在陸地生態系中，亦有可能透過稻米的攝食而暴露到甲基汞，這在先前一直被認為是可以忽略不計的暴露途徑之一(Barrett, 2010)。甲基汞在水相生態系中的生物累積和生物放大效應，可從食用肉食性魚類所造成的平均甲基汞生物累積因子(bioaccumulation factors, BAFs)高達 10^6 看出(USEPA, 2001)。相比之下，在污染區或在未受污染區中稻米的生物累積因子則減少許多，在大陸南部所測得的值約為0.71至50之間(Zhang et al., 2010b)。雖然稻米單位克重中的甲基汞濃度可能會比魚體中的含量要來的低，但由於亞洲人每日大量攝取的飲食習性，特別是在一些鮮少吃魚的內陸地區中，水稻這個途徑所造成的甲基汞暴露仍是不可忽視的。

稻米不像苔蘚類等植物所積累的汞幾乎全部從大氣中獲得，其植物體就如同一般的維管束植物，主要由運送水及營養的細胞構成其組織，故可經由三種方式累積汞於體內：通過從土壤中的根、通過氣孔吸收氣態 Hg^0 ，和通過葉面吸附的微粒和氣膠(Lindberg et al., 1979)。葉片中大多數的Hg主要是透過氣孔交換從大氣中獲得(Rea et al., 2002; Ericksen et al., 2003)，而根部已被認為是植物組織(根，莖，葉，種子)中對Hg的傳輸具有顯著的障礙(Lindberg et al., 1979; Cavallini et al., 1999; Feng et al., 2008)，暗示著土壤、根部和種子內的總汞含量缺乏相關性。然而，前期的研究主要集中在無機汞的吸收，而不是可能更容易在根部和種子之間傳輸的甲基汞。Schwesig和Krebs(2003)利用同位素標記無機汞和甲基汞化合物在3種植物中(*Vaccinium myrtillus*、*Deschampsia flexuosa*、*Calamagrostis villosa*)，發現其中的兩種植物中(唯一的例外：*Vaccinium myrtillus*)甲基汞在地面上的成分大部份是來自於根部。此傳輸不同於無機汞。Bishop等人(1998)也提出總汞和甲基汞在樹木的木質部運輸，且少有研究記載被植被所吸收的甲基汞。這些研究說明相較於無機汞，甲基汞可能更容易從根部運輸到種子，因此，在稻田土中甲基汞含量的增加可能會間接的增加稻米的攝取量，進而使人們暴露到更多的甲基汞。

部分研究指出種植在中國貴州礦區的水稻內甲基汞含量偏高，可高達144 ng/g (Meng et al., 2011)，遠高於大多數食物的汞含量(通常以無機形式存在)，通常低於20 ng/g (Feng et al., 2008; Li et al., 2010; Zhang et al., 2010; Rothenberg et al., 2011ab)。這些報告中米粒內甲基汞佔總汞的比例被發現高達66%，顯示在這些地區收穫的水稻，米粒內所累積的汞多為甲基汞。另一研究結果顯示，當地居民頭髮中甲基汞的含量與當地人從稻米中的攝取到甲基汞的量有顯著的關係，此乃由於當地飲用水中(雖然其水中之總汞濃度偏高)和其他的食物(包括豬肉和蔬菜)的單位甲基汞

濃度都偏低，證實了稻米確實是當地居民暴露甲基汞的主要途徑(Li et al., 2008)。根據這些研究，若以稻米平均攝取量620 g- rice/day和平均體重60 kg的居民做代表，並利用稻米平均所含之甲基汞的值去計算每日所的甲基汞攝取量，Rothenberg等人發現此地區大部分的居民每日所攝食的甲基汞濃度已經超出了不同機構所訂定的標準，例如USEPA的0.1、JECFA的0.23、FSC的0.29、以及ATSDR的0.3 (Rothenberg et al., 2011a)。此計算亦重新證實人們暴露甲基汞的途徑不單單是透過魚或海鮮產品，在某些狀況下，亦有可能來自於稻米，且當稻米中倘若有高濃度的甲基汞亦可能指出稻田土具有甲基汞生成的高潛勢。

值得注意的是，上述有關汞含量的水稻研究主要是針對未碾磨的糙米，但在亞洲地區白米才是一種較為常見的日常飲食。不同於魚的組織，稻米不包含些許有益的微量營養素(例如長鏈多不飽和脂肪酸，以及必需氨基酸)，且也只含極為有限的微量元素(如，鋅，鐵，硒，和碘)，暗示著在相同的暴露狀態下，食用稻米可能具有更高甲基汞暴露與累積的風險 (Rothenberg et al., 2011a)。

1.3 計畫目的

本研究旨在深入探究調控汞排放源周圍的稻田土壤與作物內，甲基汞生成與累積的生地化機制。計畫選擇鄰近北投焚化爐的稻田做為研究場址，除藉由現場採樣與實驗室的量測，了解場址內土壤與稻作中總汞與甲基汞的含量變化外，並搭配縮模試驗釐清水稻田裡主要促成甲基汞生成與累積的地質化學與微物因素為何。具體的目標包括：(1)調查場址內汞與甲基汞濃度的空間與時間分布變化，以及會影響現地稻田土壤與孔隙水中汞甲基化的相關微生物和地質參數因子；(2)分析甲基汞的化學組成對稻作攝取與累積甲基汞的影響。

1.4 章節摘要

本章節說明計畫緣起、背景和執行的計畫目的。

第二章 研究方法與過程

2.1 場址描述

北投垃圾焚化爐是位於北投區洲美街，接近基隆河和淡水河之交匯地區(即基隆河下游區段)，此交匯區地貌是以紅樹林覆蓋的河濱濕地所構成。焚化爐的周圍是被農業用地所圍繞(如圖 2-1 藍色圓圈部分)，農地的灌溉水源可能分別從五分港溪(焚化爐東邊；主要來源)、磺港溪(焚化爐北邊)以及雙溪(焚化爐南邊)所引來，如圖 2-1 標示。

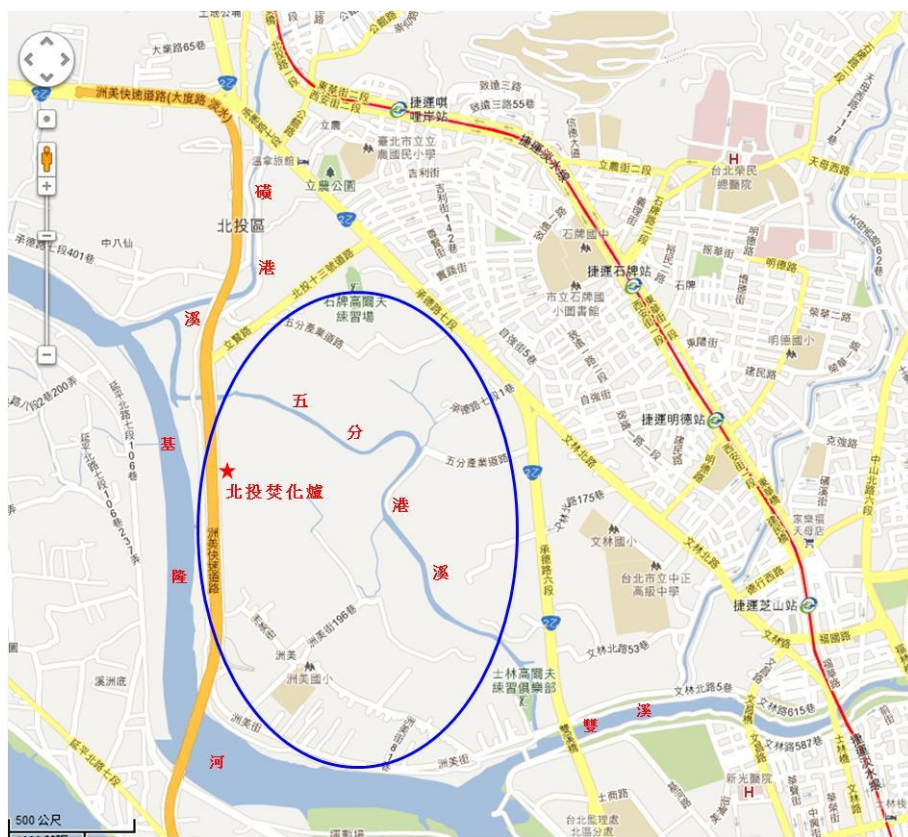


圖 2-1 北投垃圾焚化爐周圍地圖

本研究四個農地選在位於焚化爐煙囪的下風處，希望可探討因順風帶來的焚化廢氣對稻田的影響，但同時也希望與外圍道路保有一定的距離，以盡量減少道

路廢氣所帶來的影響(如圖 2-2 紅線部分)。四農地間的距離都相當接近(距約 1~2 公里)，其經緯度分別為，site-1： $121^{\circ}30'9''/25^{\circ}6'20''$ 、site-2： $121^{\circ}30'48''/25^{\circ}6'1''$ 、site-3： $121^{\circ}30'20''/25^{\circ}6'30''$ 、site-4： $121^{\circ}30'16''/25^{\circ}6'43''$ (如圖 2-2 所示)。

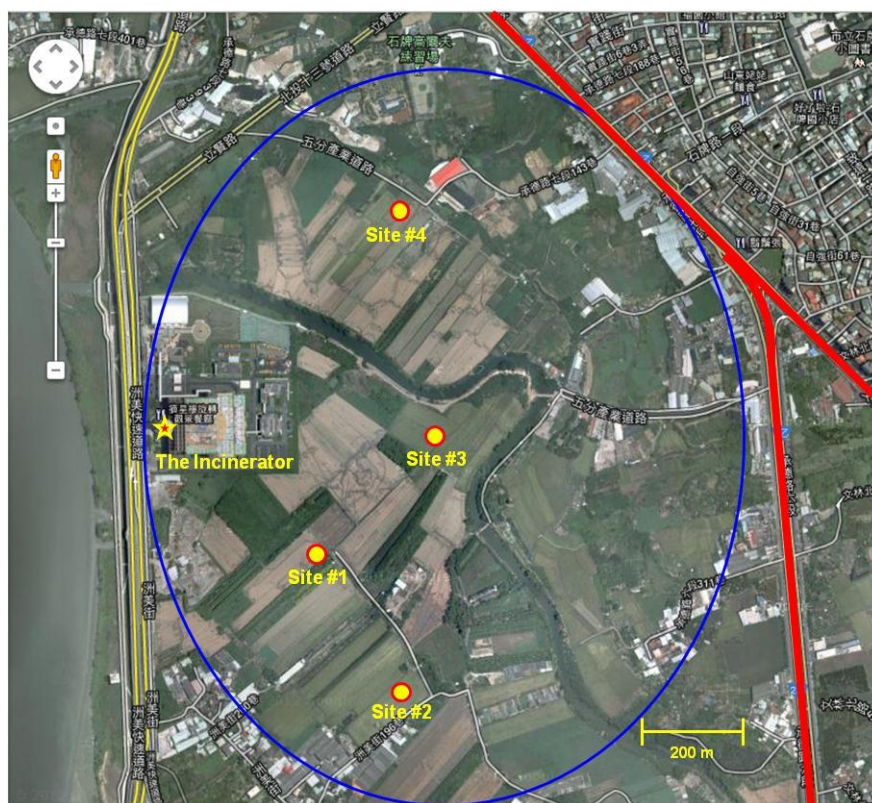


圖 2-2 四個採樣農地的相對位置

2.2 採樣規畫與方法

現地採樣時間為稻株稻穗長出前與長出後，並選擇不同位置的農地，以探討受農地是否隨著排放源距離梯度的不同對於其現地參數的影響。為了避免其他的污染因此不論乘載器皿或是採樣管柱皆經過完全的清洗。計畫在執行採樣前，事先取得地主的同意和許可才開始進行土樣與水樣的採集。首先在 2013 年 3 月 22 日先探勘了 site-1 和 site-2，發現此時為第一期稻栽種後的一個月(此區的稻作在農曆年元宵節過後才開始整地插秧)，故在考慮稻作尚未有明顯的成長現象後，僅利用經嚴格酸洗過的 BD 塑膠離心管採集表面土樣(約距地表 0~2 公分深)。2013 年 4 月 25 日的採樣範圍含四個農地，此時為稻作生長階段的中期，相較於上次已有明顯的生長(圖 2-3)，此次採樣採集表面土、表面水以及鑽芯土壤(soil cores, 圖 2-4)。2013 年 5 月 31 日再次前往四個場址採樣，此時稻作為中度生長階段的後期，相較

於上次採樣，稻作已有明顯長高且覆蓋水已退去，故只採集表面土和鑽芯土壤。2013 年 7 月 16 日進行第四次採樣，發現此時稻米已開始有結穗現象，推測已近稻米成熟期，將表面土和鑽芯土壤採集帶回分析。研究團隊在 7 月底時再度前往現場，將已成熟的稻穗採回分析。最後在 2013 年 9 月 3 日進行第五次採樣，此時第二期稻作生長期已開始，發現當地農民對於此期稻作並非重新整地插秧，而是將第一期稻的地上作物收割後，讓稻作根部與部分地上部位保留在原耕地使其重新生長。此次採樣採集表面土、表面水和鑽芯土壤。



圖 2-3 現場稻作生長情形(4 月 25 日)

為了可量測到濃度在 ppt 範圍的汞背景值，以及為了避免對樣品引進外來污染，採樣時嚴格遵守「超淨」(ultra-clean)採樣技術(Gill and Fitzgerald, 1985; USEPA 1996)。每次採樣的區域範圍大約在 $1 \times 1 \text{ m}^2$ 內，土壤樣品使用酸洗過的塑膠管(約莫 30 公分)來收集，並用橡皮塞封住管柱頭尾端保持內部厭氧。表面水樣品則使用酸洗過的離心管與棕色瓶來收集。採樣完的樣品將其 double bag 避免外界交互污染並冷藏至 4°C 並在 3 小時內送回實驗室做進一步處理。

樣品帶回實驗室後必須依照分析項目的不同做不同的前處理，分裝過程全程都在厭氧操作箱內進行，並確保管柱從採樣到分裝完的過程中皆未傾斜倒放以確保管柱下方土壤保持管柱內部的厭氧狀態。步驟如下：將土壤樣品從水管內緩緩擠出，利用已酸洗過的塑膠刀將上部約莫 5 公分處與下部 1 公分處切除(橡膠塞子並未經過酸洗，因此靠近橡膠塞處必須切除)(僅需下段厭氧之土壤樣本)，並將土壤分裝給各不同參數分析所需用量，而剩餘土壤利用離心機(10000 rpm, 25 min, 20°C)將孔隙水分離出來，再利用 $0.22 \mu\text{m}$ 孔徑過濾器將水樣過濾後分裝給不同地質參數分析所需要量。液態樣本包括表面水和孔隙水部分，分析汞與甲基汞的液態樣

本經由上述方法過濾後分裝到 20 ml 和 40 ml 經過酸洗的棕色瓶中，並加入 0.5% 體積的濃鹽酸冷藏於 4°C (USEPA, 2001; USEPA, 2002)。分析鐵的液態樣本則分裝至經過酸洗的血清瓶中，並利用封瓶器封住瓶口以確保器皿內厭氧，冷藏於 4°C 下。分析硫的樣品則在分裝樣品當天在厭氧操作箱內分裝並且當天分析以防止硫化物被氧化。分析溶解性有機碳的水樣品則添加硫酸至酸鹼值小於 2 後冷藏至 4°C 保存。分析汞、甲基汞、硫和鐵的土壤樣品部分則分裝至酸洗過的離心管中，並冷藏至 -80°C 保存。分析有機質的土壤樣品則分裝至一般離心管中，冷藏至 4°C 保存。(以上水樣及土壤樣品皆需要兩層夾鏈袋保護以防止外界的交互污染)。



圖 2-4 現場鑽芯土壤土壤採樣情形(上)與每管採集位置(下)

2.3 採樣用具的清洗

汞分析所使用的器具，會先以清潔液定期清洗，包括玻璃器皿和離心管，之後以 1N NaOH 在 70°C 下浸泡整夜，隔天用去離子水(DDI-H₂O, 18.2 MΩ)沖洗三次，再使用 1N HCl 浸泡整夜，隔天一樣用去離子水(DDI-H₂O, 18.2 MΩ)沖洗三次，自然風乾後用雙層夾鏈袋進行收藏(USEPA, 1996)。鑽芯土壤的塑膠管(PVC 材質、約 30 公分長直徑、約 5.5 公分)則使用 1N HCl 沖洗再使用去離子水沖洗，自然風乾再以兩層夾鏈袋收藏。

2.4 藥品

實驗中所有使用的化學藥品，為 Sigma-Aldrich、JT Baker 和 Fluka 皆是 ACS 等級的藥品，並在使用這些藥品配置時，避免使用刮勺等器具取藥，以減少外在因素影響。分析汞的藥品配置，是使用微量元素(JT Baker)的酸進行配置。

2.5 實驗室分析

2.5.1 總汞分析

主要參考 EPA Method 1631，分析方法如下所示。固體樣品分析時採取添加方是以檢驗其回收率，皆可達 95% 以上。

(1) 土壤汞分析:

秤取 0.5~1.5 g 的土壤樣品於鐵氟龍管後加入 8 ml 的濃鹽酸與 2 ml 的硝酸進行消化，放至隔夜後將消化後的樣本加入 0.07 N BrCl 25 ml 進行氧化(BrCl 可以使汞以 Hg²⁺ 存在，並防止汞於瓶壁上沾黏)，待其氧化一天後，取出 1ml 樣品並加入 0.2 ml hydroxylamine (將過量的氧化劑 BrCl 還原以防止總汞濃度的低估)，隨後將去除氧化劑的樣品加入適量值與加入 0.5 ml 的強還原劑 SnCl₂ 於 purge and trap 的系統中將二價汞還原成元素汞並利用汞齊進行捕捉，最後利用 CVAFS 儀器偵測總汞濃度。經由換算後可得到 ng Hg_T/g soil。

(2) 水溶液中汞分析:

取適量水樣，並加入 0.2 N BrCl (加入體積為 0.05 % 水樣體積)(將水樣中汞氧化成 Hg²⁺)氧化隔夜，氧化後水樣與土壤汞分析相似，加入 0.2 ml hydroxylamine 於樣品，並取 1 ml 樣品與 0.5 ml SnCl₂ 於 purge and trap 的系統中將二價汞還原成元素汞並利用汞齊進行捕捉，最後利用 CVAFS 儀器偵測總汞濃度。經由換算後可得到 ng Hg_T/L pore water。

(3) 稻米汞分析

將 0.5~1.5 g 稻米樣品消化於 10ml 的濃硝酸與濃鹽酸的混合液中(混合液配製: 加入 300 ml 濃鹽酸至 700 ml 的濃硝酸中), 靜至於室溫最少 4 小時, 之後將樣品加熱至 95 °C 約莫 2~3 小時使得樣品有機物能夠完全被氧化。待其氧化後, 加入 0.02 N BrCl 定量至 40 ml 並放置最少 4 小時以確保汞在氧化態下存在且不沾附於瓶壁。氧化後, 取出 1 ml 樣品並加入 0.2 ml hydroxylamine (將過量的氧化劑 BrCl 還原以防止總汞濃度的低估), 隨後將去除氧化劑的樣品加入適量值與加入 0.5 ml 的強還原劑 SnCl₂ 於 purge and trap 的系統中將二價汞還原成元素汞並利用汞齊進行捕最後利用 CVAFS 儀器偵測總汞濃度。經由換算後可得到 ng Hg_T/g rice。

2.5.2 甲基汞分析

主要參考 EPA Method 1630, 分析方法如下:

(1) 土壤和稻米甲基汞分析:

本研究室使用設備製造商 BrooksRand 實驗室與美國地質調查所(US Geological survey, USGS) 所公告前處理程序進行整合, 使用硫酸銅(CuSO₄) 溶液與溴化鉀/硫酸(KBr/H₂SO₄) 溶液先將甲基汞從土壤基質溶出, 再溶入二氯甲烷(Cl₂CH₂) 中。最後透過反萃取程序將溶於二氯甲烷(Cl₂CH₂) 中的甲基汞溶於水中後進行分析。

甲基汞分析程序為先將內含有甲基汞的試劑水調整至適合分析的酸鹼度, 再添加四乙基硼化鈉(sodium tetraethyl borate, NaBEt₄) 溶液使甲基汞進行乙基化反應置於密閉的反應瓶中。乙基化的甲基汞具有容易揮發特性, 藉著易揮發特性將反應後的甲基汞, 透過氣體攜帶製造出頂空(headspace) 環境進行分析。BrooksRand 利用 Tenax 吸收柱, 再加熱纏繞吸收柱旁的鎳鉻線圈, 使乙基化的汞物種脫附至等溫氣相質譜儀(gas chromatography)。如此一來便可利用 GC 進行物種分離, 欲測定的甲基汞在 900°C 下熱裂解成元素汞(Hg⁰) 蒸氣, 最後使用冷原子螢光光譜儀(cold vapor atomic fluorescence spectrophotometer, CVAFS) 定量分析。

(2) 孔隙水甲基汞分析:

使用方法參照環檢所 NIEA W540.50B, 於樣品中分別加入 0.2 mL 之 20% KCl / 0.2% L-Cysteine 溶液及 0.5 mL 9M H₂SO₄, 水樣中甲基汞經蒸餾, 調整 pH 值後, 置於密閉的反應瓶中, 與液態之四乙基硼化鈉 (NaBEt₄) 進行乙基化反應, 產生氣體經由惰性氣體將此氣體載送至 Tenax 吸收管柱捕捉。再熱脫附至等溫氣相分析儀, 經物種分離, 熱裂解成 (Hg⁰) 蒸氣, 由冷蒸氣原子螢光光譜儀(cold vapor atomic

fluorescence spectrometry, CVAFS)進行定量分析。

2.5.3 有機質分析

秤取約 1 g 土壤至氧化鋁坩鍋中，將其先至於 105°C 烘箱去除水分，拿出冷卻秤重後在放至於 550°C 高溫爐加熱約 2 小時去除有機質，分別秤皿重(W_0)、皿+土壤重(W_1)、皿+24 小時樣品烘乾重(W_3)與皿+去除有機質樣品重(W_4)，得到樣品固體物含量(TS)與揮發性固體物含量(VS) (Method 2540-E, APHA, 1998)。

2.5.4 溶解性有機碳(DOC)分析

主要參照 Method 5310B, APHA, 1998，溶解性有機碳分析方法如下：先將水樣樣品利用硫酸滴定使酸鹼值小於 2 使無機碳轉變為二氧化碳，在上機分析前利用純氧曝氣約 3 min 使二氧化碳(無機碳部分)與揮發性有機碳驅趕，由於水樣樣品已經事先經由 0.22 μm 過濾器過濾過，因此剩餘部分則為 DOC。將水樣添加 0.5 ml 至 analytik jena multi N/C 2100 儀器偵測得溶解性有機碳值(mg/L)。

2.5.5 鐵分析

主要是參考 Lovley *et al.* (1987) 的比色法進行分析，分析項目為土壤與孔隙水的總鐵濃度與二價鐵濃度，分析方法如下：

(1) 土壤總鐵分析

取 0.1 g 的土壤樣，加入 0.5 ml 0.25 M Hydroxylamine + 0.25 M HCl 溶液進行消化與還原 1 hr，消化後取樣品上層液 0.1 ml 加入 5 ml 的 ferrozine 等待 10 min，最後利用分光光度計(波長 562 nm)測其吸光值得總鐵濃度。

(2) 土壤二價鐵分析

取 0.1 g 的土壤樣本，加入 0.5 ml 0.5 M HCl 溶液進行消化，等待 1 小時後，將消化後樣本取上層液 0.1 ml 至 5 ml ferrozine 等待 10 min，最後利用分光光度計(波長 562nm)測其吸光值得二價鐵濃度。

(3) 水樣總鐵分析

取 0.5 ml 的水樣加入 5 ml 0.25 M Hydroxylamine + 0.25 M HCl 溶液進行還原(注意稀釋倍率)，靜置 1 hr 後，取 0.1 ml 樣品加入 5 ml 的 ferrozine 等待 10 min，最後利用分光光度計(波長 562 nm)測其吸光值得總鐵濃度。

(4) 水樣二價鐵分析:

取 0.1 ml 樣品(若樣品濃度太高,則可利用 0.5 M HCl 稀釋)(注意稀釋倍率)加入於 5 ml ferrozine 進行螯合等待 10 min,最後利用分光光度計(波長 562 nm)測其吸光值得二價鐵濃度。

2.5.6 孔隙水溶解性硫化物分析

主要參照 Method 4500-S2-D (APHA 1998), 方法如下:

在厭氧的條件下,取出 7.5 ml 的水樣品加入同時加入 0.5 mL 的 amine-sulfuric 和 0.15 mL 的 FeCl_3 並上下倒置後靜置 3 min,靜置 3 min 後樣品再加入 1.6 ml $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 並靜置 3 min 後取上澄液利用分光光度計(波長 662 nm)得水樣硫化物濃度。

2.5.7 酸揮發性硫化物(acid-volatile sulfide, AVS)分析

AVS 定義為含有還原態硫基的硫化合物(e.g. FeS , ZnS , PbS , MnS)何者在酸性條件下會轉換成具有揮發性的 $(\text{H}_2\text{S})_{\text{T}}$ 。主要參照 Sarah et al., (2008)固態硫分析法,分析方法如下:

將 1~2 g 土壤樣品加入用厭氧水配置成的 40 ml 1 N HCl 消化 1 hr,硫化物在酸性條件下會轉變成 H_2S ,消化期間利用 N_2 當作載流氣體將 H_2S 驅趕至 40 ml 含有捕捉溶液(0.3 M 醋酸鋅+0.12 醋酸鈉)的血清瓶中將硫化物捕捉形成 ZnS 後參照上述的液態硫分析方法分析捕捉液含有的硫化物濃度即得到固態硫化物濃度值。

2.5.8 孔隙水硫酸鹽分析

液態樣本硫酸鹽濃度測定主要參照離子層析法測定,使用的陰離子管柱為 IonPac AS9-HC, AG9-HC, 4mm、淋洗液為 9 mM Na_2CO_3 、流速為 1.0 ml/min 而單次進樣體積為 25 μL 。從離子層析儀所測得的樣品訊號值可在經由標準品所得到的檢量線求得水樣中硫酸鹽濃度。

2.6 微生物縮模試驗

目前已知在特定的自然環境下有部分的硫酸鹽還原菌、鐵還原菌甚至是近期

發現的甲烷菌都具有將無機汞還原成甲基汞的能力，為了證明我們所採樣的場址有此類的菌群存在且此類菌群確實能將汞甲基化，我們會將當地所採樣的土壤當做植種源，利用已知成份的培養液並添加硫酸鹽或鐵礦當做微生物的電子接受者去培養我們所需要的目標微生物。當確認廠址擁有能將硫酸鹽還原菌、鐵還原菌和甲烷菌培養出的潛勢後，我們會將上述的土樣當作植種源，並在新的一批培養液內添加無機汞去探討採樣廠址內是否含有能將汞甲基化成甲基汞的微生物。方法如下述：

探討場址土樣是否有能力孕育出具有甲基化能力厭氧微生物

總共有 4 個場址的土樣，由於過去文獻中提到硫酸鹽還原菌(SRB)、鐵還原菌(FeRB)與甲烷菌等厭氧菌群具有將汞甲基化的能力，因此每個場址試著利用血清瓶，在有土壤、具有足夠電子供給者和特定電子接受者與厭氧環境下試著培養出 SRB、IRB 與甲烷菌等菌群。

方法為每個血清瓶包含：

1. 20 mL 培養液(配製成分如下述)
2. 5 %體積的場址土壤
3. 電子供給者，包含 2 M 乳酸、2 M 乙酸與 2 M 丙酸分別各加入 0.1 ml 至含有 20 mL 培養液的血清瓶中
4. 電子接受者，在 SRB 的部分添加 0.1 ml 2 M Na_2SO_4 ，FeRB 部分則添加 0.8 ml 0.3 M ferrihydrite，而甲烷菌則可利用通入的 CO_2 當作電子接受者。
5. 通入 95 % N_2 + 5 % CO_2 氣體確保瓶中厭氧
6. 在室溫且不照光的環境下培養一段時間後，進一步分析血清瓶內的硫化物、二價鐵與甲烷濃度。

探討第一次試驗所馴養出的菌種是否有將汞甲基化能力：

由第一次試驗所得到的結果，由硫化物和二價鐵的濃度探討出場址的土樣具有將 SRB、FeRB 孕育出來的潛勢，但對甲烷菌來說，所偵測到的甲烷濃度並不高，因此第二次試驗我們將第一次的血清瓶反應後的土樣當做植種源，並加入無機汞探討所孕育出的菌種是否有將汞甲基化的能力，特別是 SRB 與 FeRB。

方法為每個血清瓶包含：

1. 培養液 20 ml
2. 5%體積之第一次試驗反應後血清瓶內的土樣(當做植種源)
3. 電子供給者:乳酸(2 M)、乙酸(2 M)、丙酸(2 M)各加入 0.1 ml 至含有 20 ml 培養液的血清瓶中
4. 電子接受者: $\text{SO}_4^{2-}=1 \text{ mM}$ Na_2SO_4 (SRB), $\text{Fe}^{3+}=10 \text{ mM}$ (fumarate) (FeRB), N_2 80% + CO_2 20% (二氧化碳可當做甲烷菌的電子接受者)
5. 每瓶添加 10 $\mu\text{g/L}$ 的無機汞

對於上述不同組別分別做出控制組，方法如上述但不同之處為土樣為滅過菌後的土壤。

表 2-1 微生物縮模試驗培養液組成 (1 L, pH=6.8~7.2):

化合物	含量
NaCl	1 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.4 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
NH_4Cl	0.25 g
KH_2PO_4	0.2 g
KCl	0.5 g
Buffer (NaHCO_3)	15 ml
Cystine (conc. 600 ppm)	5 ml
Molybdate (conc. 80 ppm)	5 ml
Trace element	1 ml
HCl (12N)	8.021 ml
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1500 mg
H_3BO_3	30 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	190 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	24 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	143.517 mg
Vitamine(10x)	0.5 ml
D-Ca-pantothenate	5 mg

	p-Aminobenzoic acid	5 g
	Liponic acid	5 mg
	Folic acid	2 mg
	Pyridoxine-HCl	10 mg
	Riboflavin	5 mg
	Nicotinic acid	5 mg
	vitamin B12	0.1 mg
	Biotin	2 mg
	Thiamine-HCl·2H ₂ O	5 mg
Selenite(10x)		0.1 ml
	Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	3 mg
	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	4 mg
	NaOH	0.5 g

2.7 稻米種植縮模試驗

縮模實驗—利用稻米的種植來分析甲基汞可能會以何種形式較易進入植物體內及最後甲基汞是否會累積到稻穗種子上。

2.7.1 方法概要:

文獻指出，甲基汞一旦進入植物體中，可能會隨著植物的生長，透過營養傳輸使甲基汞最終累積於種子上，且在環境中甲基汞離子容易與陰離子進行錯合，並進入植物體中。我們進行縮模試驗來觀察甲基汞的累積情形，並了解環境中何種錯合易與甲基汞錯合並吸收。

2.7.2 實驗耗材:

器具: 50 mL 離心管數個、醫療用棉花、稻米。藥品: 甲醛、甲醇、培養液*(後面說明成分)、氯化鈉(NaCl)、半胱胺酸(L-Cysteine)、亮胺酸(L-Leucine)、蛋胺酸(L-Methionine)、穀胱甘太氧化物(Glutathione oxidized from free acid*grade II)、腐植酸(Humic acid)、氯化甲基汞標準液(Methylmercury chloride)。

2.7.3 步驟流程:

步驟可分成稻種消毒、培養液配置、種植試驗。

稻種消毒: 在開始種植之前，我們要先確保使用的稻種是無菌的狀態，避免會有發霉的現象，因此須先將其泡配置消毒液中，係利用添加 0.32 mL 的甲醛和 0.08 mL 的甲醇並由滅菌過 DI 水定量至 20 mL 當中，浸泡 24 hr，最後再利用滅菌過 DI 水清洗沖洗數次便可使用。

表 2-2 稻作植栽培養液配置

所需元素	化合物	含量 (g / L)	
N	NH ₄ Cl	0.076	
	NaNO ₃	0.12	
P	NaH ₂ PO ₄	0.044	
K	K ₂ SO ₄	0.0893	
Ca	CaCl ₂	0.111	
Mg	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.405	
Mn	MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.5	
Mo	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.074	
B	H ₃ BO ₃	0.934	
Zn	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.036	
Cu	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.031	
Fe	FeCl ₃ · 6H ₂ O	7.7	
	Citric acid (monohydrate)	12.9	

先溶於 25 ml 的濃硫酸中並定量至 500 ml，再取 1.25 ml

種植試驗: 將已酸洗過的 50 mL 離心管添加些許棉花，並加入培養液將其定量約 15 mL 高，最後整個進行滅菌的動作，滅菌完成後待其待其冷卻，於每一離心管添加 3~5 顆的稻種進行種植。等待約一至兩天，稻種發芽後開始進行甲基汞與配位子化合物的添加，即先於每一管再添加約 5 mL 的培養液，之後扣除空白組五管以外，其餘 31 管均先加入約 5 nM 的甲基汞標準液，之後分別添加 NaCl: 1 g/L、10 g/L 三重複；Cysteine: 10 nM、100 nM 二重複；Leucine: 10 nM、100 nM 二重複；Methionine: 10 nM、100 nM 二重複；Glutathione: 10 nM、100 nM 二重複；Humic acid: 10 ppm、100 ppm 二重複，每一至兩天進行觀察。稻作生長兩周半後將其收穫下來再經乾燥研磨後進行甲基汞分析。

2.8 章節摘要

此章說明研究方法。

第三章 主要發現與成果

近期研究指出在汞污染排放附近種植的水稻(主要是中國大陸的廢礦區和某些內陸地區),其植物體內含有較高濃度的總汞和甲基汞濃度,而這些地區經調查發現,當地人民鮮少食用魚產及其他海鮮加工製品,故與一般所認知的甲基汞暴露途徑不同(Horvat et al., 2003; Feng et al., 2008; Zhang et al., 2010b)。為此,學者們提出了「這些地區居民主要的甲基汞暴露途徑乃為攝食稻米」的假設(Zhang et al., 2010a),而此陸域食物鏈的假設在過去一直被認為是可忽略不計的傳輸路線(Barrett, 2010)。後續的研究的確也證實當地居民頭髮內所含的汞濃度量與他們經由稻米所攝食到的甲基汞量呈一顯著的正相關性(Feng et al., 2008)。另一值得注意的是,當地水稻的穀粒部分相較於其他部位(如根、莖和葉等組織),甲基汞的累積能力最高(Meng et al., 2010),而當稻米進一步的與當地的其它作物包含玉米、油菜、煙草和白菜等植物相比,發現其他植物體內所含的甲基汞量比稻米內的含量低了約10~100倍(Qiu et al., 2008);不僅如此,甲基汞與無機汞兩相比較之下,稻米甲基汞的生物累積因子(BAFs)約為無機汞的800~40,000倍(Zhang et al., 2010b)。這些資料皆說明甲基汞極易累積在稻米的米粒之中,且攝取高甲基汞含量的稻米將增加其健康風險。

對於稻米內無機汞和甲基汞的生物累積和傳輸機制,根據現階段所得之資料可以總結如下:(1)雖然植物根部表面具有阻礙無機汞進入的屏障(或機制),但土壤汞仍被認為是植物體內無機汞的主要汞來源之一,即使如此,相較於土壤內的無機汞,空氣中的無機汞對在地表上的植物部位來說,扮演了更重要的角色(Meng et al., 2012);(2)而對於甲基汞來說,水稻植物在生長季節時主要由根部攝取土壤中的甲基汞,再轉運(translocate)到地表上的植物體部位,如莖和葉,最後當稻米結穗時,絕大多數的甲基汞濃度會傳輸到穀粒中並且儲存於此,這時候根部所含有的甲基汞濃度相較於生長期來說已非常少量(Meng et al., 2011)。儘管知道甲基汞的攝取是與稻米植物根部有關,但現今對於根際土壤是以何種生地化機制促進甲基汞的生成、進入及累積在稻米內的資訊依舊極為有限。為此,基於(i)都市固體廢棄物(MSW)的燃燒為環境中汞的主要排放源之一,以及(ii)環境中甲基汞的產生主要是因現地微生物的主導而生成,本計畫嘗試藉由對北投都市固體廢棄物焚化爐周圍的水稻田農地進行現地採樣調查,除了解此區的土壤及稻米內總汞與甲基汞的含量變化外,也針對與甲基汞生成有關的地質化學與微生物因子設計實驗室的縮模與植栽試驗,分析探討此區微生物合成甲基汞的潛勢,以及主要可能被稻作攝取的甲基汞化學組成,看可否驗證以下假設:「在稻田土中的甲基汞產率和稻作對甲基汞攝取程度取決於土壤孔隙水中的無機汞對甲基汞生成菌的生物可利用量、這些微生物在土壤根際區的數量與活性,以及甲基汞的化學組成」。

3.1 稻田土壤及孔隙水中總汞與甲基汞含量

本計畫的四個農地經五次採樣(分別為 2013/3/22、4/25、5/31、7/16、9/3)分析所得之表面土壤(地表以下 0-2 公分處)、根系土壤(地表以下 10-15 公分處)以及孔隙水中的總汞(Hg_T)與甲基汞(MeHg)的濃度整理如表 3-1 所示,所列數據為所有分析結果之平均值。由此表可得知不論是表土或是根系土,若以土壤濕重為基準來看,汞的含量皆不超過 600 ng g^{-1} (即 0.6 ppm)。此些數值即使將樣品的含水率(約 51-58%)考慮進去,依舊低於環保署所定之法規標準值(一般土壤 20 ppm,農地 5 ppm),顯示焚化廠這些年來的空污防治設備,與以往的效率相比(Chang et al., 2000),對於煙道內汞廢氣的捕捉已顯著進步且發揮一定的功效。這些數據也與文獻上所記載的未受污染的土壤汞濃度 $10\text{-}500 \text{ ng g}^{-1}$ 相近(Senesi et al., 1999)。

表 3-1 鄰近北投焚化爐四處水稻農地之表土(約地表下 0-2 公分處)、根部土(約地表下 5-15 公分處)以及孔隙水中的總汞與甲基汞平均濃度整理

Matrix		Units	Site-1	Site-2	Site-3	Site-4
Surface-soil						
	Hg_T	ng/g	155.92 ± 9.74 (n=5)	191.52 ± 2.13 (n=4)		
	MeHg	ng/g	1.10 ± 0.28 (n=5)	0.70 ± 0.01 (n=4)		
	%MeHg (of Hg_T)	%	0.71	0.37		
Root-soil						
	Hg_T	ng/g	365.70 ± 33.52 (n=48)	426.20 ± 65.84 (n=50)	412.37 ± 35.13 (n=48)	594.53 ± 425.82 (n=48)
	MeHg	ng/g	13.17 ± 1.82 (n=28)	14.63 ± 3.61 (n=30)	13.1 ± 3.94 (n=30)	13.41 ± 5.46 (n=48)
	%MeHg (of Hg_T)	%	3.60	3.43	3.18	2.26
Pore water						
	Hg_T	ng/L	39.26 ± 12.20 (n=48)	22.05 ± 7.45 (n=48)	15.90 ± 2.25 (n=48)	18.01 ± 3.18 (n=50)
	MeHg	ng/L	25.93 ± 4.94 (n=20)	17.77 ± 4.86 (n=24)	14.55 ± 7.46 (n=20)	3.70 ± 1.66 (n=24)
	%MeHg (of Hg_T)	%	66.05	80.59	91.51	20.54

進一步檢視數據後發現,汞在土壤的分佈不會隨著距離焚化爐的遠近而有明顯的趨勢差異,但根系土壤不論在總汞還是甲基汞的濃度上,皆高於表面土壤。由於文獻指出稻米穀粒中的甲基汞含量常與根系土壤或孔隙水中的甲基汞濃度成正相關(Zhang et al., 2010; Liu et al., 2012),所以本計畫除了總汞之外,土壤與孔隙水的甲基汞濃度也一併分析。由表 3-1 所整理的結果可知,與其他文獻 $0.7\text{-}3.6 \text{ ng g}^{-1}$ 的背景濃度相比(Zhang et al., 2010; Rothenberg et al., 2012b),四農地所測得的土壤甲基汞值偏高。甲基汞佔總汞的比例值也比文獻所記錄的值略高(即本計畫之

2.26-3.60% vs. 文獻之 0.19-2.1%)。環境介質中的甲基汞與總汞的比值可約略說明此系統內的微生物對於汞的利用性或將汞甲基化的能力與程度為何，表 3-1 中的此數值從同一農地場址(即 site-1 或 site-2)於表土時的最低值、根系土時的中間值到孔隙水的最大值的分佈趨勢可知，孔隙水是微生物最易生成甲基汞的環境介質，此也證明如要深入探究一生態系統的甲基汞生成與累積的問題時，分析孔隙水中相關生地化參數的重要性。各農地四次採樣的根系土壤與孔隙水中的總汞濃度示於圖 3-1，甲基汞濃度則示於圖 3-2。

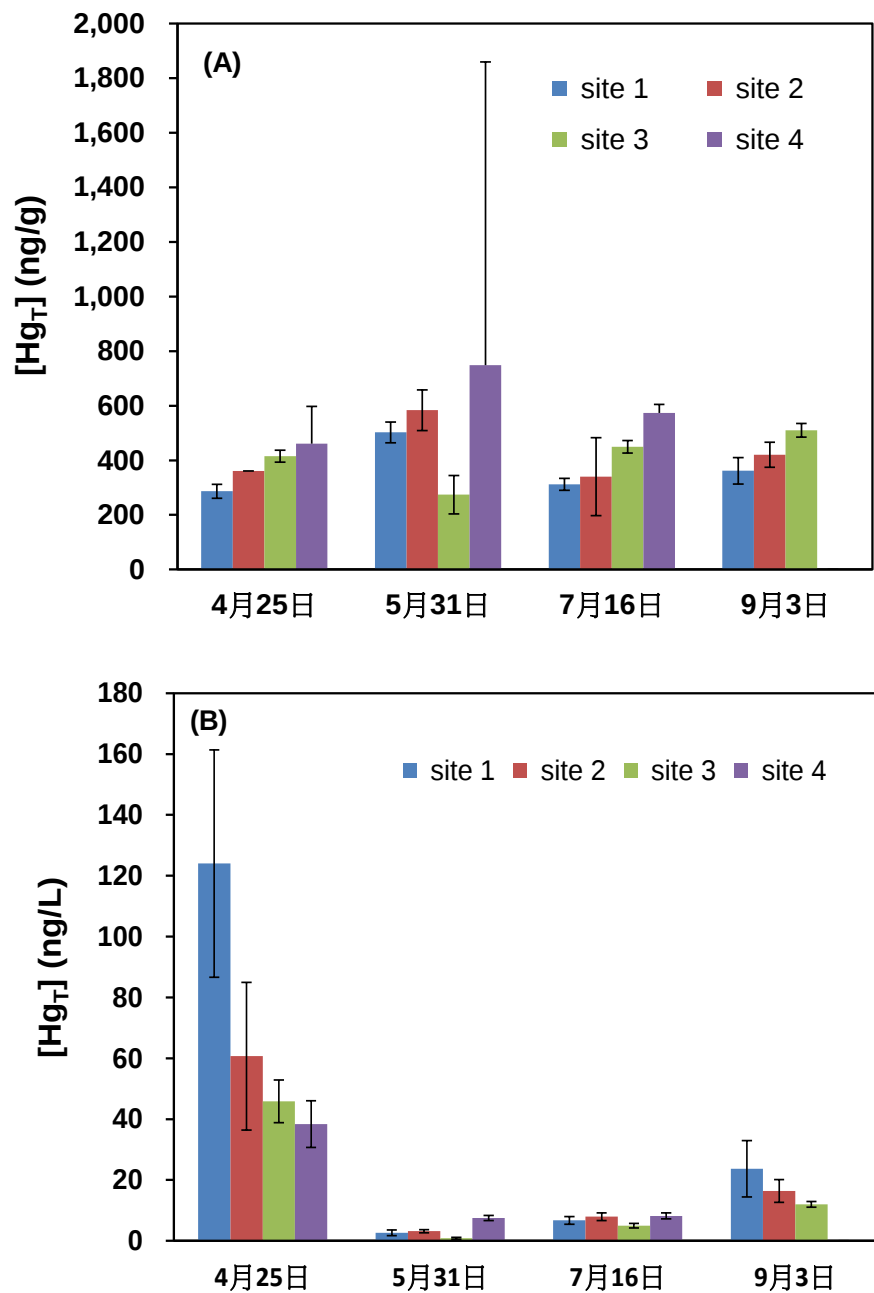


圖 3-1 各農地之(A)根系土壤與(B)根系土孔隙水中的總汞濃度隨採樣日期之變化

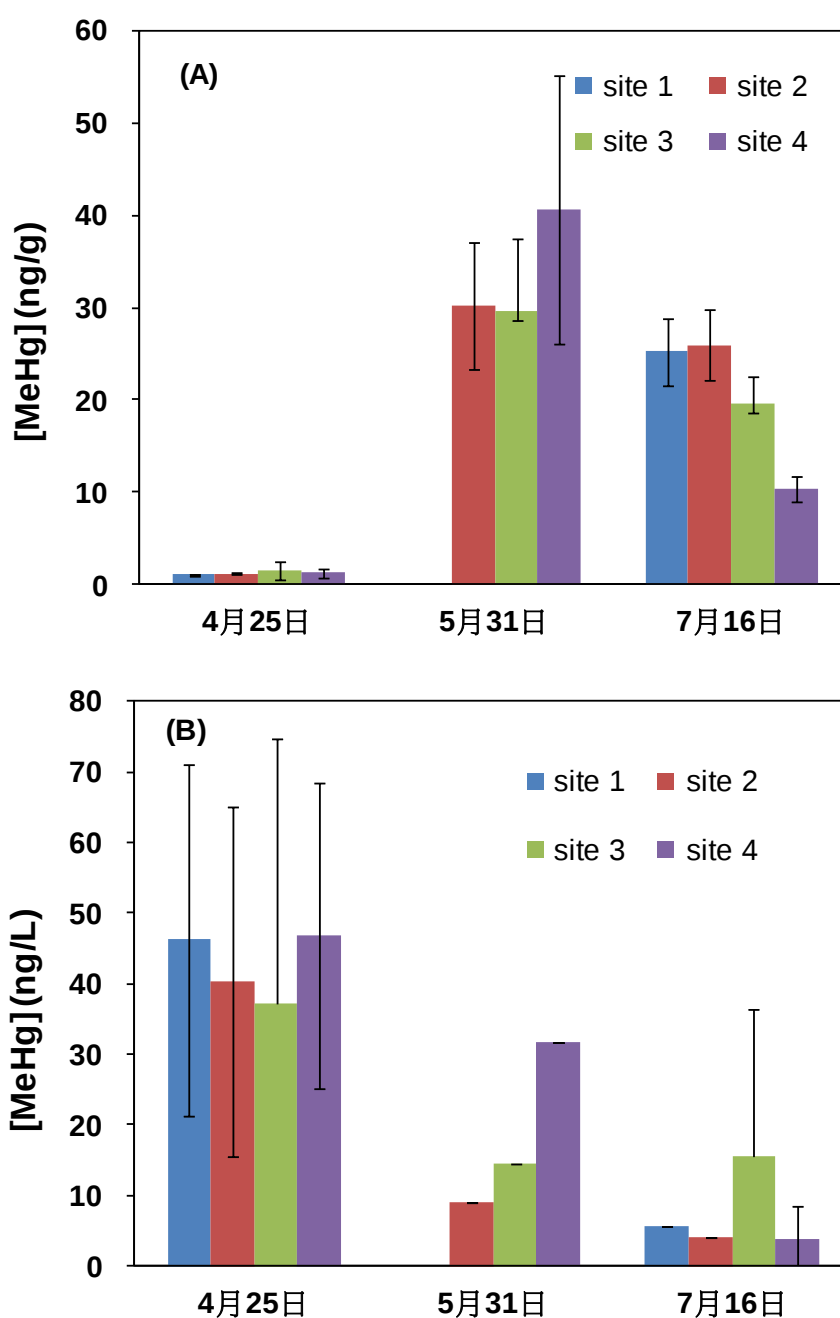


圖 3-2 各農地之(A)根系土壤與(B)根系土壤孔隙水中的甲基汞濃度隨採樣日期之變化

3.2 稻米內總汞及甲基汞含量

本計畫所選的四處農地內所收成的米粒(糙米，乾重)經分析後所得之總汞與甲基汞之數據如表 3-2 所示。一般而言，除了魚產外，絕大多數食物內的含汞濃度都低於 20 ng g^{-1} ，且主要以無機汞的形式存在(WHO, 1991)。至於稻米中的汞濃度，

Rothenberg 等人(2011b)發現在貴州地區以不同栽種方式(分成有/無節水灌溉栽培)收成而得之糙米，其內所含的總汞值在 $2.5\text{--}5\text{ ng g}^{-1}$ (乾重)，而甲基汞則在 $0.7\text{--}1.5\text{ ng g}^{-1}$ (乾重)之間。Zhang (2010a)等人的研究也發現，在貴州地區除了鄰近礦區的稻米總汞及甲基汞含量可高達 78 (總汞)與 9.3 (甲基汞) ng g^{-1} 外，其他地區的稻米總汞測值在 $2.3\text{--}5.5\text{ ng g}^{-1}$ 之間，甲基汞測值則在 $1.6\text{--}2.2\text{ ng g}^{-1}$ 之間。另一篇相關的研究也整理出由大陸境內不同城市的控制場址內(control sites 即未臨近污染源區域)採集分析而得的稻米甲基汞含量約在 $0.7\text{--}6.85\text{ ng g}^{-1}$ 之間(Rothenberg et al., 2011a)。事實上，種植於礦區周圍的稻作，其米粒的甲基汞曾被測得高到 140 ng g^{-1} (Horvat et al., 2003)。

表 3-2 三處稻田 sites 收成之米粒中所含總汞與甲基汞的平均濃度

Sampling site	Hg _T in rice (ng/g)	MeHg in rice (ng/g)
Site-1	3.73	6.78
Site-2	3.96	12.61
Site-3	4.41	17.11

由表 3-2 之數據可知總汞的測值與一般未受污染的農地所得之稻米總汞含量相近，然而甲基汞的含量卻偏高，甚至高於總汞含量。文獻已知分析甲基汞時，如果樣品的有機質含量偏高，將造成「人工」(artificial)的甲基汞產生。目前對於植作內的甲基汞測定尚無一標準方法，米粒略高的甲基汞含量推測可能是因此種「人工合成」作用所造成，然由於未有含汞或含甲基汞的稻米標準物質可供比對，故此問題尚需更進一步釐清。即使如此，目前所測得的稻米汞含量皆低於衛生署所定的 0.05 ppm (即 50 ng g^{-1}) 食米汞含量。

如果採用表 3-2 中的稻米甲基汞含量，則每日因進食稻米而攝入的甲基汞數量 ($\mu\text{g kg}^{-1}\text{ d}^{-1}$) 可利用以下公式計算求得(Rothenberg et al., 2012b)：

$$\text{甲基汞每日進食率} = \text{稻米內甲基汞含量} \times \text{每日稻米攝取量} \times \text{體重}^{-1}。$$

式中稻米甲基汞的濃度單位為 $\mu\text{g g}^{-1}$ 。若以一體重 60 kg 且每日進食 400 g d^{-1} 稻米量的消費者來看，當採用數值最保守的美國環保署建議之每日攝食量 $0.1\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}\text{ d}^{-1}$ 來計算時(Rothenberg et al., 2011a)，所得的米粒甲基汞允許濃度將為 $0.015\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ ，亦即 15 ng g^{-1} 。如果依此做評估，則顯示自農地 3 收割而來的米粒其甲基汞含量將高於此建議值。不過，若是將表中的總汞值完全以甲基汞來看待的話(亦即 $3.73\text{--}4.41\text{ ng g}^{-1}$)，此焚化爐周圍農地栽種出來的稻米則無甲基汞累積中毒的風險。由於此區

農地的土壤總汞及甲基汞含量皆屬於一般認定的背景值，上述的後項分析結果現階段來看較為合理。此外，如果由表 3-1 與表 3-2 的土壤與稻米汞含量合併計算，可知甲基汞的 BAFs 較高，與文獻所提相符。

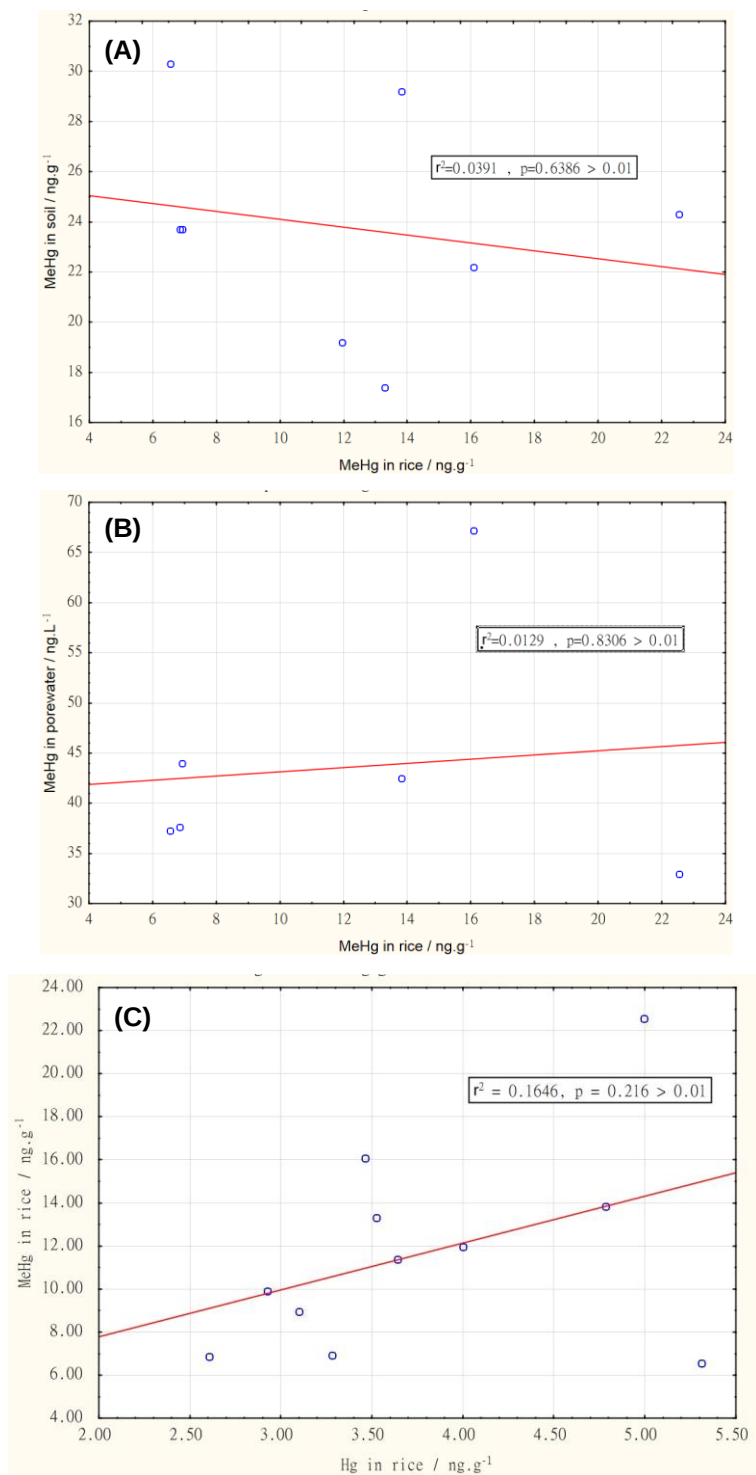


圖 3-3 稻米甲基汞含量與(A)土壤和(B)孔隙水甲基汞，以及(C)稻米總汞的相關性

將「稻米甲基汞濃度 vs. 土壤甲基汞濃度」、「稻米甲基汞濃度 vs. 孔隙水甲基汞濃度」，和「稻米甲基汞濃度 vs. 稻米總汞濃度」的關係示於圖 3-3 後可看出，此區域的稻米甲基汞含量與這三者的相關性不顯著，因 p 值皆大於 0.01，表示無法單獨以土壤甲基汞濃度，孔隙水甲基汞濃度或稻米總汞濃度預測稻米甲基汞濃度。

3.3 根系土壤區之地質化學參數

根據上述土壤與稻米的總汞及甲基汞分析結果可知，本計畫位於北投焚化爐周圍的採樣農地其汞含量屬於一般常見的背景濃度，即使與當初預設的狀況不同，但此資訊依然可做為未來環境變化時的基礎參考值。除了調查總汞與甲基汞的分佈外，為了解水稻田生態系統在汞的生地化循環轉換上所扮演的角色，以進一步探討此類農地的土壤與孔隙水環境是否具有促進甲基汞生成的潛力，計畫亦同時進行相關的根系環境中的地質化學參數量測與分析。

由於甲基汞一直以來被認為主要是由硫酸鹽還原菌(Gilmour et al., 1992)、鐵還原菌(Fleming et al., 2006)，以及甲烷生成菌(Hamelin et al., 2011)等厭氧微生物在其細胞內行特定的生化作用將無機汞轉化而來(Choi et al., 1994; Lin et al., 2013)，因此與這些微生物生長有關且又可以影響無機汞的生物可利用性的地質化學參數在環境汞甲基問題上即顯得相當重要，諸如硫酸鹽(sulfate)、硫化物(sulfide)、三價鐵礦(ferrous minerals)、亞鐵(ferrous iron)、有機質(organic matter/dissolved organic carbon)，以及 pH 等(Benoit et al., 2003)。

土壤與孔隙水中的鐵循環在汞的環境生地化循環上扮演著重要但極為微妙的角色。二價汞由於對於礦物顆粒表面的吸附親和力極強，因此鐵礦的存在容易使二價汞的生物可利用性降低，但三價鐵礦除了是環境中鐵還原菌的最終電子接受者外，也可將硫化物氧化而增加汞沉澱物的溶解性(Slowey and Brown, 2007)，導致鐵礦既可減弱也可提高甲基汞的生成，何者反應較為優勢需與其他微生物與地化條件搭配一起考慮(Mitchell and Gilmour, 2008; Yu et al., 2012)。在一般的稻田土裡，20-80%的鐵以三價鐵(氫)氧化物(即 Fe(III)-(oxyhydr)oxides)的形式存在，但此種形式的鐵化合物在厭氧含水的環境中卻是易被(可高達 90%)還原成硫化鐵 $\text{FeS}_{(s)}$ 或是二/三價混合之鐵沉澱(Kirk, 2004)。文獻已指出藉由硫化鐵的沉澱而降低水溶液相中硫化物 $\text{S}(-\text{II})$ 的含量，可因此使得 $\text{HgS}_{(\text{aq})}^0$ 在汞-硫的錯合系統中成為優勢物種。由於此種形式的汞-硫錯合物從「被動擴散」(passive diffusion)的觀點來看，已被廣泛認為最易進入微生物的汞物種，因此將使得甲基汞的生成率提高(Benoit et al., 1999; Benoit et al., 2001)。然而，當土壤或底泥中的亞鐵含量太高時，硫化鐵沉澱顆粒對於吸附溶解二價汞的作用將提高，造成二價汞的可利用性降低而削弱汞的甲基化速率(Mehrotra et al., 2003; Mehrotra and Sedlak, 2005; Ulrich and Sedlak, 2010)。

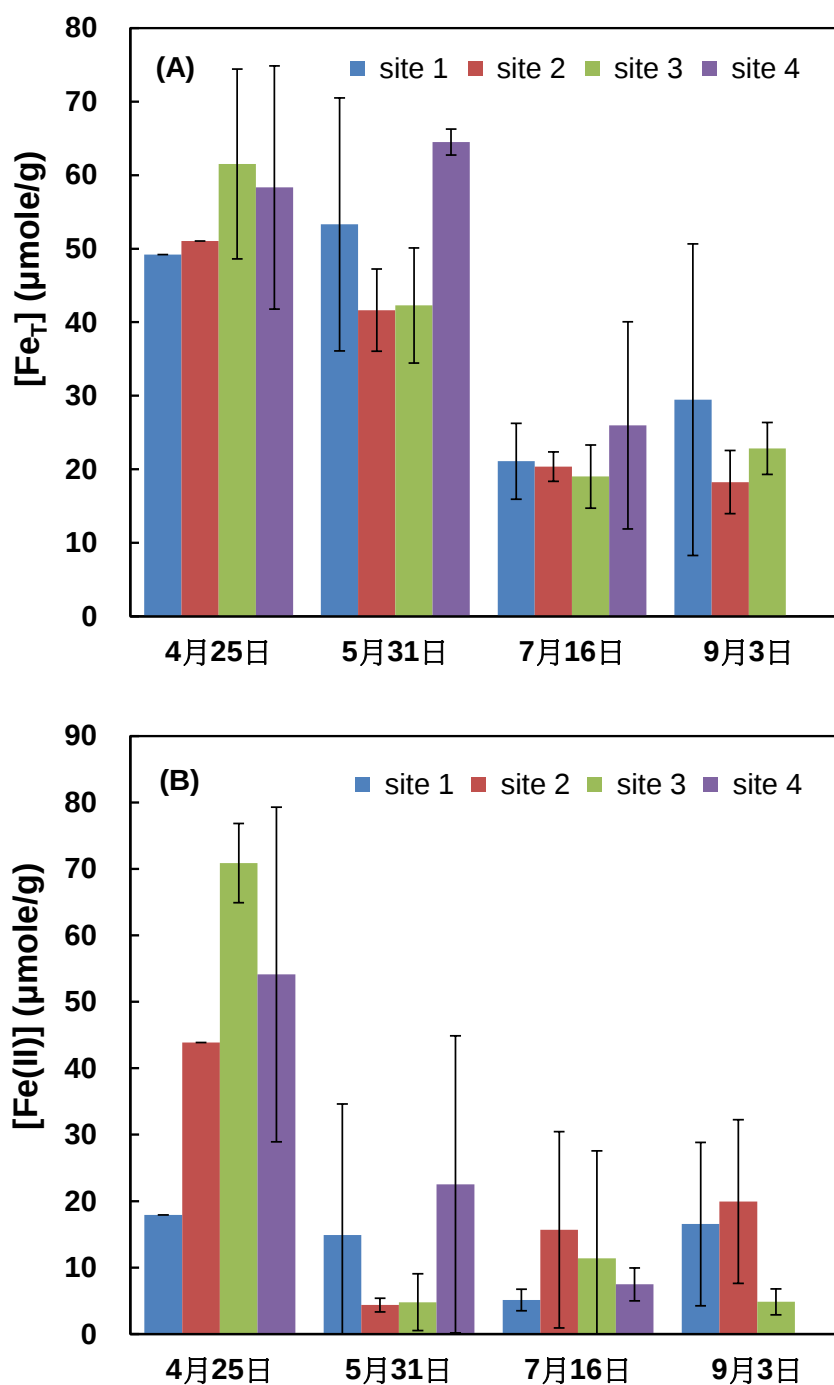


圖 3-4 各農地之根系土壤(A)總鐵與(B)亞鐵濃度隨採樣日期之變化

圖 3-4 與 3-5 分別為計畫四個採樣農地根系土壤(圖 3-4)及其孔隙水(圖 3-5)中的總鐵與亞鐵隨採樣日期的濃度變化。由圖形可看出在四月時因農地表面的覆水尚未消退，故不論是根系土或是孔隙水中的鐵絕大多數是以亞鐵的形式存在，代

表此時系統的厭氧狀態仍極為明顯，且因孔隙水中的亞鐵濃度極高，表示此時還原性溶解鐵的作用(reductive dissolution of iron)極為明顯，某種程度上來說，說明此環境中的鐵還原菌極為活躍。五月之後因為表土的覆水已退，因覆水所造成的厭氧效應也較不明顯，可從土壤中亞鐵所佔的比例下降，以及孔隙水中亞鐵濃度的降低看出。

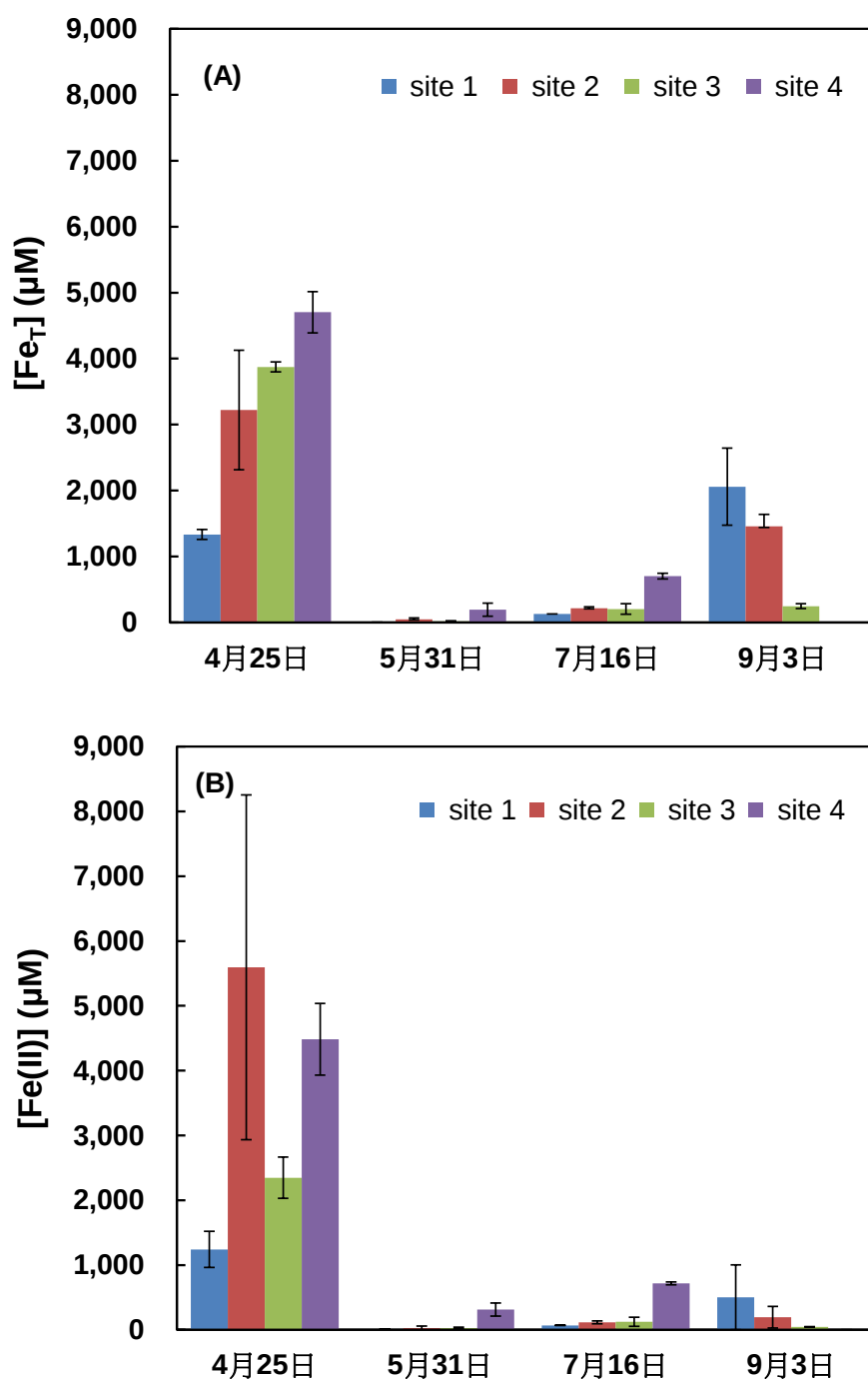


圖 3-5 各農地之根系土壤孔隙水中(A)總鐵與(B)亞鐵濃度隨採樣日期之變化

採樣期間根系土壤的 AVS (示於圖 3-6)除了 site-2 在後兩次的採樣分析偏高外 ($> 10 \mu\text{mol g}^{-1}$), 多落在 $0.3\text{--}5 \mu\text{mol g}^{-1}$ 之間, 屬於一般根系土壤或底泥中常觀察到範圍(Rothenberg et al., 2008; Rothenberg and Feng, 2012a), 但孔隙水中的硫化物濃度(total dissolved sulfide = $[\text{H}_2\text{S}] + [\text{HS}^-] + [\text{S}^{2-}]$)只有 site-1 在七月採回之樣品可被量測到(值為 $4 \mu\text{M}$), 其餘的樣品都低於偵測極限值(MDL = $0.8 \mu\text{M}$)。由於孔隙水樣品在處理過程皆於厭氧操作箱(即一般俗稱的手套箱)內嚴謹完成, 且與硫化物(即 sulfide 同樣對氧氣或溶氧極為敏感的亞鐵(即 ferrous iron)在分析上全落在可量測的範圍(圖 3-5), 顯示因實驗操作導入溶氧而造成硫化物消逝的可能性應該極低。

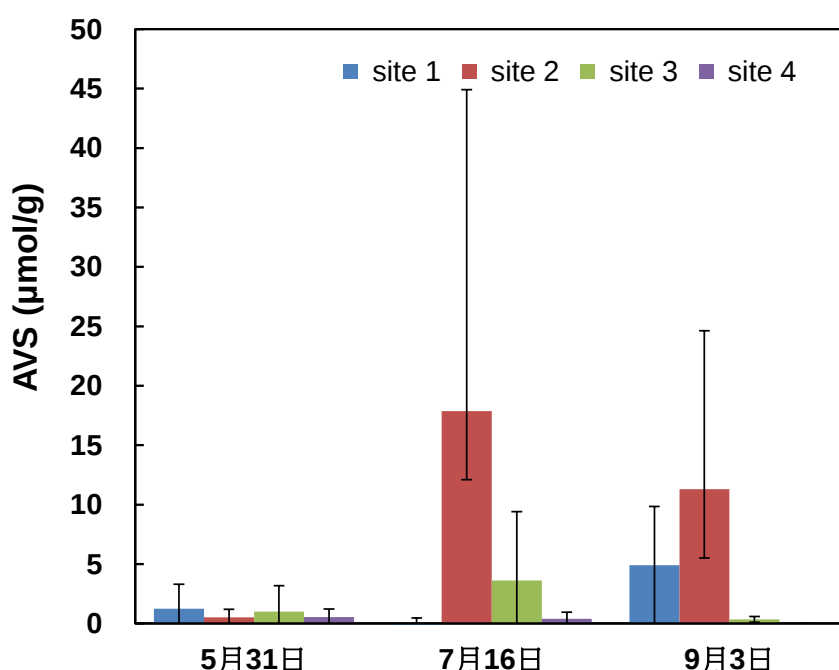


圖 3-6 各農地之根系土壤 AVS 濃度隨採樣日期之變化

硫的部分除了還原態的硫化物與 AVS 之外, 計畫亦對表水與孔隙水中的硫酸鹽濃度也進行量測, 發現其值皆低於 1 mM (最高為 0.9 mM , 但多座落在 $0.08\text{--}0.22 \text{ mM}$ 之間), 為一般農地常見的硫酸鹽濃度範圍(Rothenberg and Feng, 2012a)。由於硫酸鹽還原菌的關係, 在許多生態系統中, 硫酸鹽與硫化物兩者含量之間的平衡被視為是控制系統中汞甲基化程度最關鍵的因素之一。但就如同鐵的循環一樣, 硫酸鹽的存在雖然會刺激可將汞甲基化的硫酸鹽還原菌的生長而增加甲基汞的生成量, 但當此代謝作用產生過多的硫化物時, 將造成系統的化學組成往不適合被微生物利用的汞-硫錯合的形式存在, 最後導致甲基化程度的下降。此現象除了在許多調查中被証實外(Benoit et al., 2003), 也歸納出在現地環境中最適合汞甲基化作用的硫酸鹽濃度多介於 $10\text{--}300 \mu\text{M}$ 之間, 而最適合的硫化物濃度約在 $10 \mu\text{M}$

左右(Munthe et al., 2007)。不僅如此，偏酸的環境也被觀察有利於甲基汞的生成，雖然真正的機制目前仍不清楚(Munthe et al., 2007)。本計畫所選四農地根部土壤的孔隙水 pH 值恰巧分佈在 6.1-6.5 之間，再加上孔隙水中所測得的高溶解性有機碳濃度(11.2-27.5 ppm 之間；而土壤的有機質含量皆在 8-14% 之間)，此四農地的環境條件對於硫酸鹽還原菌甲基化汞的反應來說是偏向有利的。

值得一提的是，除了土壤總汞濃度遠低之外，本計畫所觀測到的(1)低孔隙水硫酸鹽/孔隙水硫化物/AVS 濃度，但(2)略高之根系土壤鐵濃度的農地地質化學條件與 Rothenberg & Feng (2012a)在貴州萬山礦區另一側的水稻田地所觀察到的雷同。依照他們的推論，這樣的環境條件乃是由於三價鐵 Fe(III)將硫化物(sulfide)氧化成如 polysulfide (此為硫化物與元素硫結合而成的錯合物)這般的硫中間產物後再進一步的形成硫酸鹽而非硫化鐵(FeS)沉澱，使硫酸鹽還原作用得以延續，進而促進農地汞甲基化的作用。

若將測得的孔隙水甲基汞濃度與其他地化參數彼此間的相關性作圖(示於圖 3-7)，發現本計畫所選的農地根系土壤系統中，孔隙水的甲基汞含量與孔隙水的亞鐵及硫酸鹽含量的相關性不明顯，反而與孔隙水中的無機汞含量在統計上有顯著的相關性($p < 0.01$)，某種程度上顯示出農地根系土目前無機汞量仍屬低濃度。

3.4 根系土壤潛在之汞甲基化微生物族群

由於文獻指出水稻田地特有類似濕地生態系統的環境條件極適合硫酸鹽還原菌、鐵還原菌以及甲烷生成菌這些厭氧菌的生長，因此水稻田已被視為陸地生態環境中甲基汞生成的「熱點」(hotspots)之一。然而需注意的是，並非所有這幾類的厭氧菌都能將汞予以甲基化，再加上長久以來對於汞甲基化微生物以何種基因組調控甲基汞在細胞內合成的生化機制不確定，造成在缺少可信賴的「生物標記」(biomarkers)基因做為針測工具下，有效預測某生態系統內甲基汞的生成潛力一直以來是汞研究領域裡希望可以首先被解決的難題之一(Lin et al., 2012)。

傳統上要判斷一生態系統內主要可將汞甲基化的微生物族群為何時，所用的方法乃是將無機汞加入環境介質(例如土壤或底泥)培養時，除對照組不額外添加基質外，其他實驗組別則需同時加入特定的基質，一般而言是指可當作最終電子接受者的基質如硫酸鹽(針對硫酸鹽還原菌)、鐵礦(針對鐵環原菌)以及二氧化碳或含甲基的小分子有機物(針對甲烷生成菌)，培養一段時間後再實驗組與對照組兩兩相較看是否添加某特定基質的組別內所生成的甲基汞數量或速率高於對照組(Mitchell and Gilmour, 2008; Yu et al., 2012)。除了此種「促進」(enhance)的方式外，也可利用「抑制」(inhibit)的方式，在培養過程中加入可針對性地抑制某類微生物代謝的化學品後(例如 molybdate 可抑制硫酸鹽還原菌進行硫酸鹽的還原作用，

2-bromoethane sulfonate 可抑制甲烷生成菌的生長等)，實驗組與對照組相較看何種微生物被抑制生長後其系統的甲基汞生成量有顯著減少而決定可甲基化汞的微生物族群(Compeau and Bartha, 1985; Fleming et al., 2006; Hamelin et al., 2011; Yu et al., 2012)。

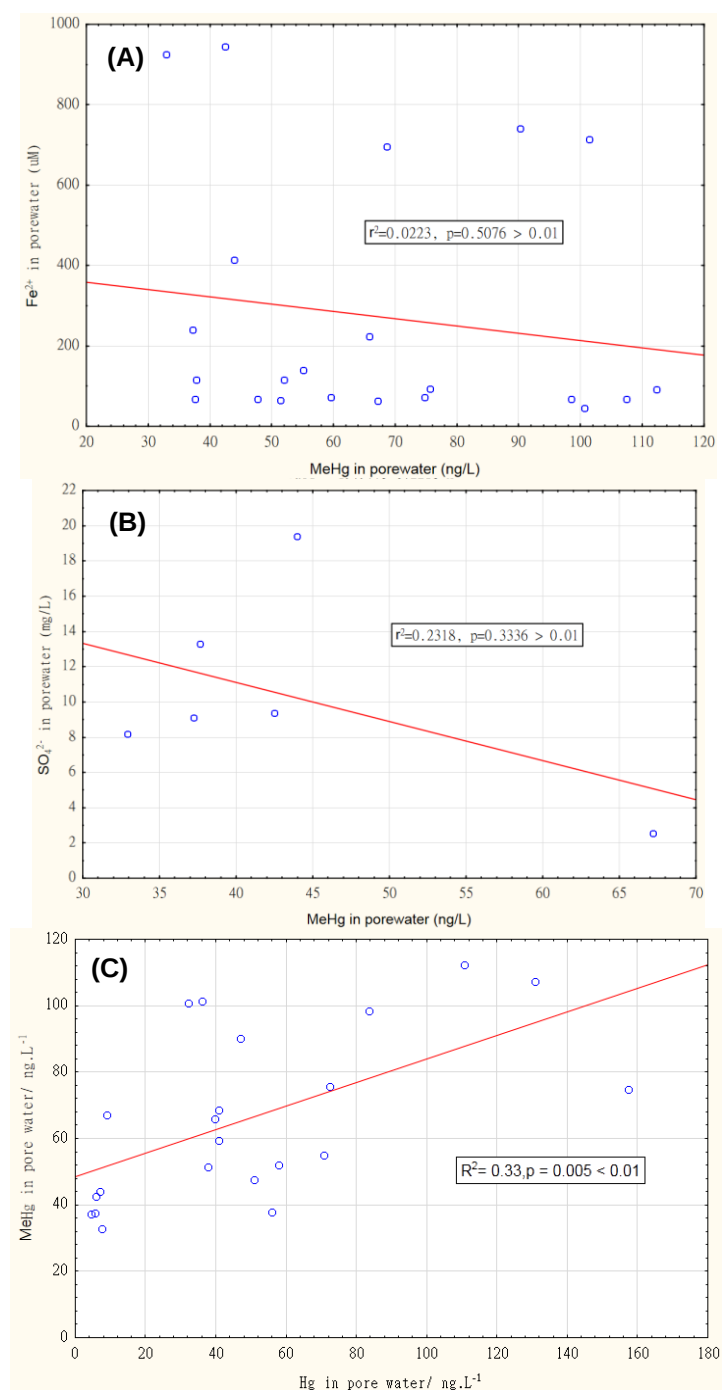


圖 3-7 孔隙水內甲基汞含量與(A)亞鐵，(B)硫酸鹽，及(C)無機汞的相關性

在決定本計畫所選農地根系土壤內何種厭氧菌族群為主要的汞甲基化菌之前，先判斷此根系土是否有硫酸鹽還原菌、鐵環原菌以及甲烷生成菌。相同克重的土壤樣品於厭氧操作箱內分裝在盛有除了最終電子接受者不同外，其餘組成分皆相同的培養液之血清瓶數週後(Fleming et al., 2006)，發現瓶內的礦物相明顯不同(圖 3-8)：除甲烷生成菌組瓶內的顆粒顏色與樣貌與其控制組(即所加土壤事先已用滅菌釜處理過)相似外，添加以 10 mM 硫酸鹽當作最終電子接受者的硫酸鹽還原菌組瓶內的顆粒已轉變成黑色沉澱，暗示瓶內可能含有大量的金屬硫化物沉澱；而添加以 10 mM 晶格較不成熟(即仍是 amorphous 狀態)但易被微生物行胞外呼吸作用的水鐵礦(即 ferrihydrite)當作最終電子接受者的鐵還原菌組瓶內的鐵礦礦物相，已從原本的稍暗紅棕色的水鐵礦樣貌轉變成暗黃褐色貌，暗示原本的水鐵礦可能已被利用而轉變成混有纖鐵礦(lepidocrocite)與針鐵礦(goethite)的礦物相，此為典型的鐵還原菌對水鐵礦行呼吸作用後礦物相的轉變。

(A)



(B)



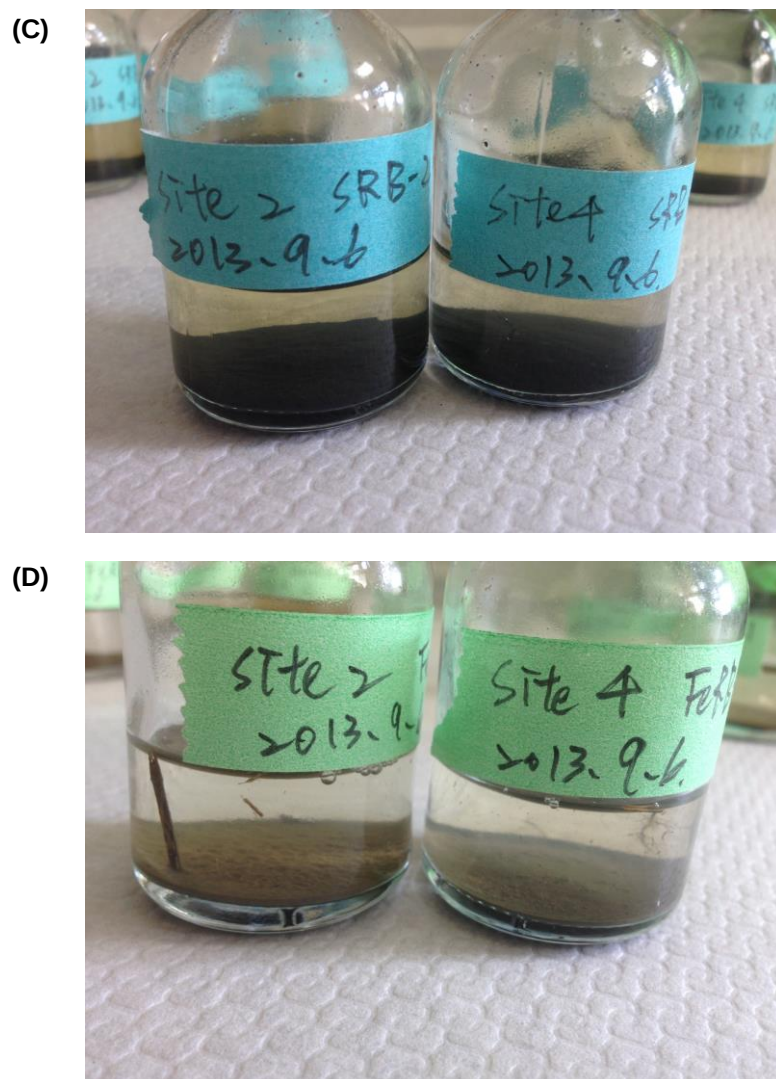


圖 3-8 採樣區農地根系土壤經培養數週後的血清瓶內土壤顆粒礦物相的改變情形：
(A)土壤經滅菌釜處理過的對照組瓶，由左而右分別為硫酸鹽還原菌組，甲烷生成菌組，以及鐵還原菌組；(B)甲烷生成菌實驗組瓶樣貌；(C)硫酸鹽還原菌實驗組瓶樣貌；(D)鐵還原菌實驗組瓶樣貌。

除了土壤礦物顆粒改變外，所有實驗組瓶稍作搖晃後都可觀察到有氣泡自瓶底土壤往上射出至水面。這些觀察皆顯示實驗組血清瓶內正進行某些生物轉化作用。事實上，將瓶內液體抽出過濾後或瓶內上部氣體抽出後量測也發現瓶中與最終電子接受者相對應的參數濃度的改變(圖 3-9)：硫酸鹽還原菌組產生平均濃度介於5-13 mM之間的硫化物；鐵還原菌組產生平均濃度介於0.8-3.3 mM之間的亞鐵；甲烷生成菌組雖受限於儀器的靈敏度，但仍可偵測到甲烷的存在。而控制(對照)組的這些參數則均低於偵測極限。這些觀察結果均顯示各實驗瓶內相對應的微生

物的存在。

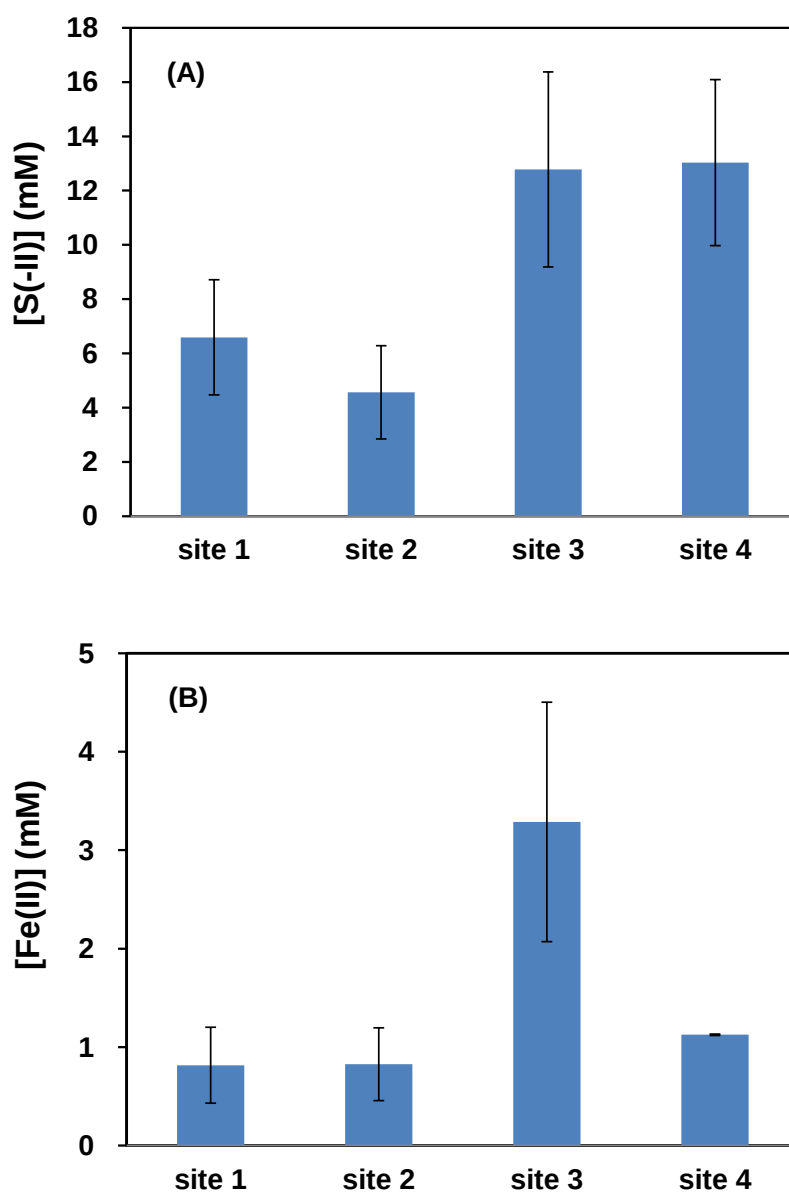


圖 3-9 採樣區各地農地根系土壤經培養數週後(A)硫酸鹽還原菌組瓶內液體之硫化物濃度及(B)鐵還原菌組瓶內液體之亞鐵濃度。

在確定根系土內含有這些可能將汞甲基化的微生物族群存在後，開始添加 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 高濃度的無機汞 $\text{Hg}(\text{Cl})_2$ 進行甲基化實驗，此時的電子接受者濃度則調整成與土壤或孔隙水樣品實測值相當的 1 mM 硫酸鹽於硫酸鹽還原菌組， 10 mM 的 fumarate 濃度於鐵還原菌組，甲烷生成菌則提供含有 20%-80% $\text{CO}_2\text{-N}_2$ 的混和氣體，

於 28°C 下靜置培養一週後分析培養液的甲基汞濃度，數據如表 3-3 所示。由表中 (2 或 3 重複組之平均值) 結果可知，從四農地取得之土壤所培養的硫酸鹽還原菌組皆呈現顯著地甲基汞生成；甲烷生成菌組當中，除了 site-2 所測得的值與控制組相近外，其餘 site-1 & 3 & 4 所得之甲基汞濃度均顯著增加；而所有鐵還原菌組分析所得之數據則與控制組相差無幾。

表 3-3 四農地根系土壤分別添加不同最終電子接受者及無機汞共培養一週後的甲基汞生成濃度(ng L^{-1})。控制組為已滅過菌之土壤。

Soil source	Methanogenic Group	Iron-reducing Group	Sulfate-reducing Group
Site-1	4890.04	126.17	10352.20
Site-2	147.15	128.36	5699.46
Site-3	1591.83	119.40	9074.03
Site-4	986.36	99.89	4944.47
Control	146.9	157.71	123.07

縮模實驗的結果明確的顯示焚化爐周圍稻田根系土壤中主要進行汞甲基化作用的微生物族群為硫酸鹽還原菌，再者為甲烷生成菌，而鐵還原菌可能由於前期添加固相鐵礦作為電子接受者而使得加入系統中的無機汞吸附於鐵礦使其生物可利用性降低而造成甲基汞的效應不明顯。一般而言，污染物於土壤溶液中(多指孔隙水環境)的 K_d 值可概括代表此污染物在不考慮其水溶液相的化學物種組成下(即 chemical speciation)，於此環境的生物可利用性為何。利用四農地根系土壤與孔隙水所測得的總汞濃度計算 $\text{Log}K_d$ 後，發現四處的差異不大，site-1 至 site-4 分別為 4.37、4.52、4.77 以及 4.64 (與一般文獻中所記載的總汞 K_d 值相似)，如再考慮四處的其他地化條件，代表存在於四處土壤的現地微生物可接觸到汞的機率相近，也可得知四農地根系土中汞甲基化作用的程度最終還是取決於可被生物利用的汞量(目前的狀態顯示為低汞濃度)，以及真正可將汞甲基化的族群數量與活性(此部分目前可看出主要為硫酸鹽還原菌的族群)。

不過，需額外提及的是，可用來監測汞甲基化作用的生物標記問題的解決之道在今年已有所進展，因為負責將汞甲基化的基因(即 *hgcA* 與 *hgcB*)已被橡樹嶺國家實驗室的研究團隊在經歷六年的努力後鑑定出來(Parks et al., 2013)，且後續的研究證實以這些基因做為基礎設計出的生物探針是可以被高度值得信賴的工具(Gilmour et al., 2013; Yu et al., 2013)。往後的研究在決定何者為主要的汞甲基化族群上，可利用此分生工具做更為快速且可信賴的篩選調查。

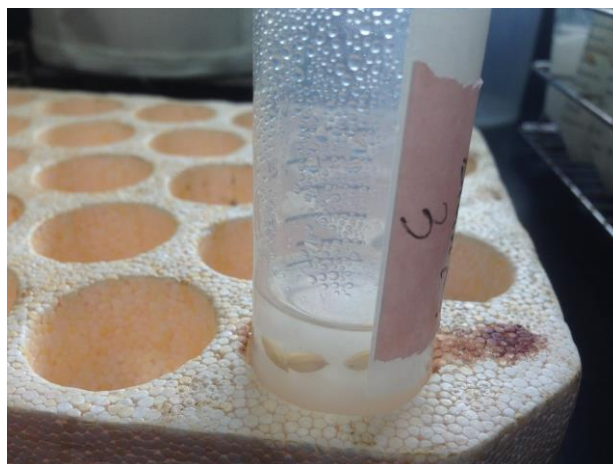
3.5 甲基汞化學組成對稻作攝取甲基汞之影響植栽試驗

目前所知可影響稻米中甲基汞累積量的因素除了有可能因為不同稻種而有所差異外(Rothenberg et al., 2012b)，根系土壤環境中的生地化條件是否會促進無機汞的生物可利用性以及具有將汞甲基化能力的微生物數量和活性為何，尚需考慮何種形態的甲基汞最容易進入植物體最後累積於米粒中(Zhang et al., 2010b)。然後項因素目前為止在文獻上的記載與探討仍然缺乏。為了進一步了解此項機制，本計畫亦進行稻作的水耕植栽試驗，希望藉由改變植種液體中甲基汞的化學組成而探究何種甲基汞錯合物較易被稻作的根部吸收。

雖然文獻上尚缺植物體對於甲基汞的吸收機制，但目前已知與無機汞相比，稻作根部較缺乏對於甲基汞的防範機制，故甲基汞主要是由根部進入稻作植物體中，而非地上植物體部位(Meng et al., 2011)，因此根系土壤的孔隙水化學在稻作吸收甲基汞的作用上是相對關鍵的因素之一。事實上，不同於無機汞，甲基汞對於土壤顆粒的吸附作用較不明顯，所以甲基汞在環境的移動性較無機汞為高。若由本計畫採樣分析所得的數據計算甲基汞在根系環境的 K_d 值，也可呼應此項觀點，因甲基汞 $\text{Log}K_d$ 值範圍介於 2.51-2.94 之間(此範圍與文獻記載相近)，而無機汞的 $\text{Log}K_d$ 值範圍落在 4.37-4.77。 K_d 值越大代表此化學物質越易傾向停留在固相介質而非水相介質。此外，Ndu 等人利用基因工程而建構出可偵測多少甲基汞進入細胞內的「微生物探針」(a *mer-lux* bioreporter)的研究結果指出，與無機汞進入微生物細胞的機制一樣，甲基汞在細胞外的化學組成將造成其是否容易被細胞攝入的因素，且(1)甲基汞與氯離子如能形成中性不帶電的錯合物，越易因「被動擴散」(passive diffusion)機制而進入微生物細胞(此與無機汞的作用相同)；(2)腐植酸的存在整體而言降低甲基汞的生物可利用性；(3)小分子的含硫有機物中(主要是氨基酸類)，只有 cysteine 與甲基汞所形成的錯合物容易被細胞吸收，其餘的像是 methionine、leucine 以及 glutathione 對於甲基汞的生物可利用性無任何顯著的影響(Ndu et al., 2012)。為此，本計畫的稻作植栽試驗即根據 Ndu 等人的結果進行實驗設計，因土壤栽種不易操作孔隙水中的甲基汞化學組成，且因土壤屬不均質系統較難完全控制，故採水耕方式進行。

在添加不同濃度之不同無機(氯離子)與有機(腐植酸與小分子有機硫)配位基化合物，及添加 $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 的甲基汞於稻作培養液並讓稻米直接從中發芽生長兩週半後(圖 3-10)，將稻作收成、乾燥、研磨並分析此時稻作植物體的甲基汞含量。由於文獻已記載稻作從根部吸收甲基汞後，雖然初期甲基汞會停留在植物體的不同部位如根、莖、葉等，但當稻作開始結穗時，幾乎稻作植物體內不同部位的甲基汞皆會轉移並累積在穀粒中(Zhang et al., 2010b; Meng et al., 2012)。由此可知，即使兩週半的生長期稻作尚未結穗，但分析此時植物體內的甲基汞量仍可評估後續甲基汞累積於米粒的程度，也藉此推估何種化學形式的甲基汞最易進入稻作體中。唯

一的不確定性在於如果是有機硫與甲基汞的錯合物最易被稻作吸收的話，稻作吸收甲基汞的程度是否因不同生長階段而有所不同，因為 Ndu 等人(2012)發現此形態的甲基汞是以「主動運輸」(active transport)的方式進入微生物細胞，並非以「被動擴散」。



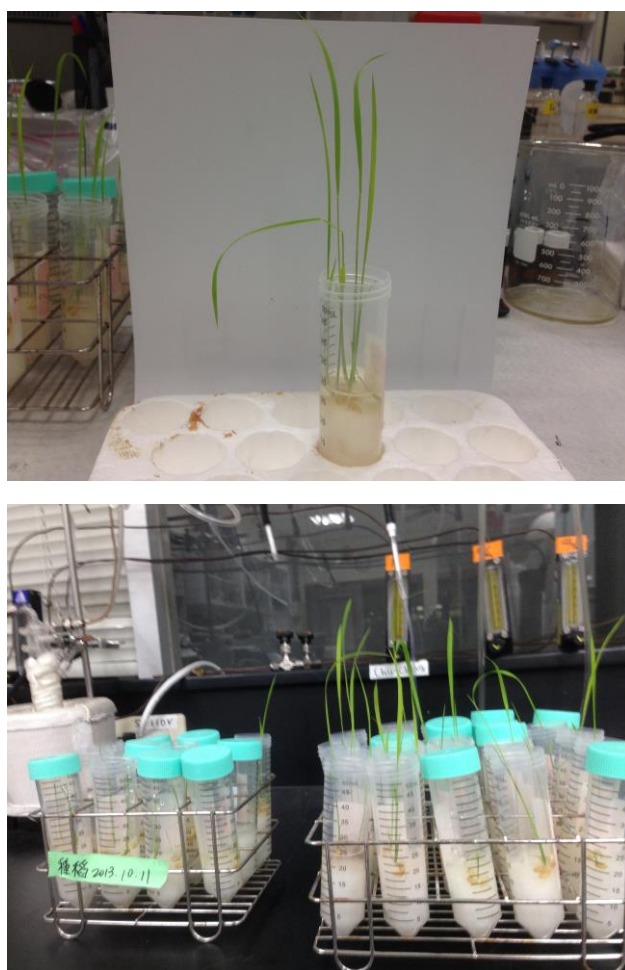


圖 3-10 稻作植栽試驗不同時間的稻作生長情形。由上而下為稻作生長期漸長之順序，最下端則為不同條件的植栽試驗試管配置。

此部分的試驗結果如圖 3-11 所示。圖中的 control 為只讓稻作水耕栽種於添加相同濃度的甲基汞培養液而不再額外添加有機或無機可與甲基汞錯合的配位基。需說明的是，此為初步的試驗結果，在不考慮稻作於生長期間對於營養液是否有不同的吸收速率情況下，由圖中可看出氯離子所造成的稻作對甲基汞的攝取趨勢與 Ndu 等人觀察到的微生物細胞攝取甲基汞的趨勢一致，亦即氯離子濃度越高，甲基汞進入細胞的速率與數量也越高，符合「被動擴散」的理論(Ndu et al., 2012)。有機配位基的部分則與 Ndu 等人利用微生物細胞系統所觀察到的差異極大。若單純只就此試驗結果來看，首先，高濃度的腐質酸對於稻作的甲基汞吸收有抑制效果(此與 Ndu 等人觀察相同)，但低濃度的腐質酸卻造成極佳的甲基汞吸收(此與 Ndu 等人觀察不同)；cysteine 的添加雖然高濃度 cycteine 組的甲基汞吸收量下降，但總的來說，不論其濃度高低，對於稻作吸收甲基汞皆無任何助益(此與 Ndu 等人觀察

不同)；leucine、methionine 以及 glutathione 的添加有助於稻作吸收甲基汞，但高濃度的 glutathione 最後反而抑制稻作吸收甲基汞。

由於這些算是極為初期的試驗結果，所觀察到的現象或許與根部細胞的「主動運輸」機制有所關聯，其真正所代表的意義與背後的機制尚有待進一步的釐清與探討，但整體而言，初步還是可以看出甲基汞在其水環境中的化學組成可能影響其進入稻作的速率與最後累積於稻作的數量。甲基汞的水化學效應值得深入研究。

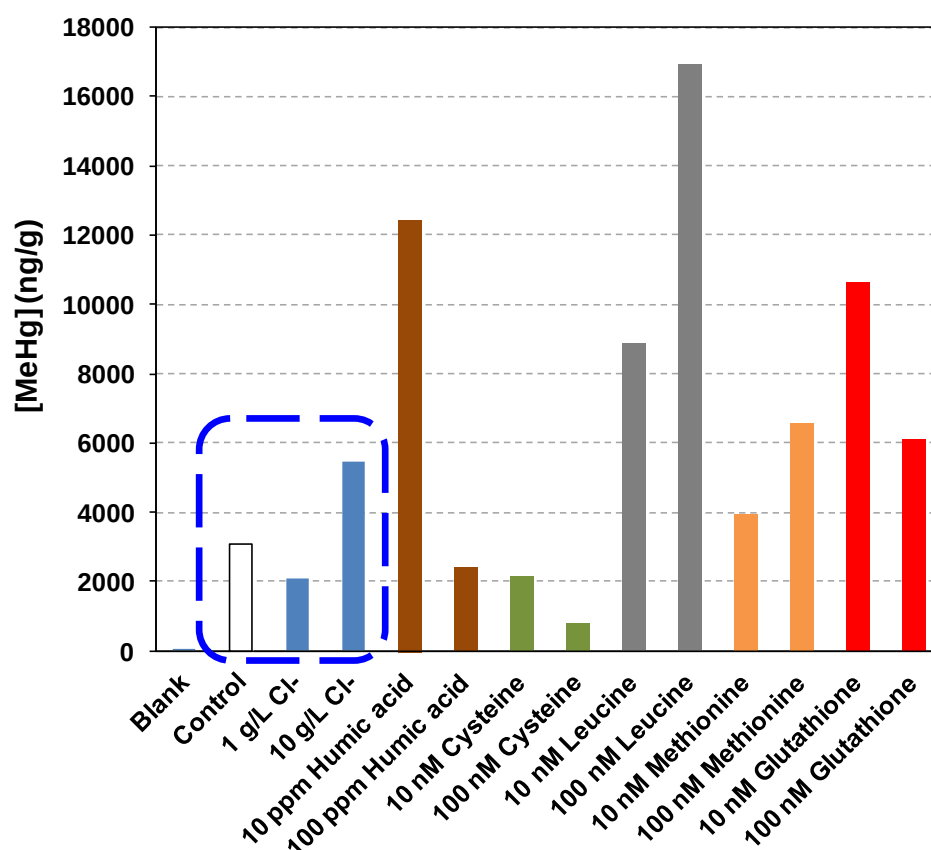


圖 3-11 添加不同濃度不同配位基(ligands)下的稻作植栽試驗(2 週半)累積於植物體內的甲基汞濃度。

3.6 章節摘要

本章節記錄並討論採樣分析及縮模試驗與植栽試驗的結果。稻作及根系土壤與其孔隙水的總汞和甲基汞的濃度分析結果指出，北投焚化爐周圍水稻田的土壤及孔隙水，以及栽種在此區農地收割而得的稻米，其內的總汞與甲基汞含量皆與

一般環境或農地的背景值相近，皆無超過法規所定的環境與食米標準，除顯示此區未受汞污染外，也間接代表焚化爐內運轉的空污防治措施可有效管控汞的排放，因其所排出之煙道氣體並未造成此區農地顯著的汞累積。根據現地地質化學與微生物族群的分析可知：(1)孔隙水中的甲基汞與無機汞濃度呈現顯著正相關，(2)硫與鐵的循環所造成的孔隙水化學造成此根系環境中無機汞的生物有效性偏高，(3)硫酸鹽還原菌極有可能是此區域最主要的汞甲基化微生物族群，而這些因素加總起來某種程度上暗示，若此區的總汞濃度增加，其根系土壤環境仍有可能具有促進甲基汞生成與累積的潛力。藉由不同形式的配位基的添加而改變甲基汞的孔隙水化學組成，將會造成稻作不同程度的甲基汞攝取與累積量，然此部分的機制原理仍需進一步的探究。

第四章 結論與建議

4.1 結論

本研究選擇北投焚化廠周圍的水稻田進行採樣分析，分析的項目除總汞與甲基汞外，也涵蓋可能影響無機汞現地生物可得性的地化參數。分析結果指出焚化爐周圍的水稻田土壤與孔隙水，及栽種於此區的稻米，其內的總汞與甲基汞含量皆無超過環境與食米標準，顯示此區除未受汞污染外，也顯示焚化爐的空污防治可有效管控汞排放。現地地質化學與微生物族群的分析則暗示若此區的總汞濃度增加，其根系土壤可能具有生成與累積甲基汞的潛力，且主要的汞甲基化菌群為硫酸鹽還原菌。最後，植栽試驗顯示改變孔隙水的甲基汞化學組成，將造成稻作不同程度的甲基汞攝取與累積。由於各地水稻田的現地地化與微生物條件皆有其獨特性，故計畫所得之結果雖不見得可以廣泛且立即的套用在國內其他焚化爐周圍的農地，但本計畫針對微量元素的生地化循環上所用的調查方法可適用於其他地區。不僅如此，如其他地區的焚化爐運轉嚴格遵守法規標準，本計畫的調查結果或可代表其他地區的農地與稻作間的汞循環與累積之狀況。

4.2 後續工作項目建議

根據本研究最後所得之結果可歸納出下列幾項建議：

1. 針對此區水稻田農地於汞的生地化循環轉換上的分析可知，其根系土壤具有高潛勢的汞甲基化能力，故焚化爐所設之空污控制設備運轉的良善與否雖為關鍵之一，但以目前的狀態來看，更為重要的應是注意灌溉水中的汞含量，此部分或有監測的必要。
2. 負責微生物甲基化汞的基因組已被鑑定並驗證出為值得信任的生物標記工具，故往後如能將此工具應用在調查工作上，對於判別特定生態系統內甲基汞的生成潛勢上將更具時效性。
3. 根據實驗觀察可知孔隙水中的甲基汞錯和作用可影響稻作吸收甲基汞的程度，其機制除具「被動擴散」的可能性外，根部對於小分子胺基酸的「主動運輸」機制似乎更為重要。若是如此，針對孔隙水中的小分子有機物的定性與定量或許將能更明確的預測與掌握甲基汞於稻作的累積程度。此部分的研究需更進一步的確認。。

4.3 章節摘要

本章節總結本研究觀察分析所得，並對後續相關研究提出建議。

參考文獻

- Abelson, P.H. "Methyl mercury", *Science*, 1970, 169: 237.
- APHA-ANWA-WPCF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Twentieth edition. 1998. Washington, D.C.
- Atkeson, T. D., Pollman, C. D., Axelrad, D. M. "Recent trends in mercury emissions, deposition, and biota in the Florida Everglades: a monitoring and modeling analysis", In *Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales: Atmospheric Processes and Human Exposures Around the World*. Pirrone, N. and Mahaffey, K. R., Eds., Springer, New York, 2005, 637-655.
- Barkay, T., Gillman, M., and Turner, R. R. "Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury", *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63: 4267-4271.
- Barkay, T., Turner, R. R., Rasmussen, L. D., Kelly, C. A., and Rudd, J. W. "Luminescence facilitated detection of bioavailable mercury in natural waters", *Methods Mol. Biol.* 1998, 102: 231-246.
- Bakir, F., Damluji, S.F., Amin-Zaki, L., Murtadha, M., Khalidi, A., Al-Rawi, N.Y., Tikriti, S., Dhahir, H.I., Clarkson, T.W., Smith, J.C., and Doherty, R.A." Methylmercury poisoning in Iraq", *Science*, 1973, 181: 230-241.
- Barrett, J.R. "Rice is a significant source of methylmercury", *Environ. Heath Persp.* 2010, 118: A398.
- Benoit, J. M., Mason, R. P., and Gilmour, C. C. "Estimation of mercury-sulfide speciation in sediment pore waters using octanol-water partitioning and implications for availability to methylating bacteria", *Environ. Toxicol. Chem.* 1999, 18: 2138-2141.
- Benoit, J. M., Gilmour, C. C., and Mason, R. P. "The Influence of sulfide on solid-phase mercury availability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3)", *Environ. Sci. Technol.* 2001, 35: 127-132.
- Benoit, J.M., Gilmour, C.C., Heyes, A., Mason, R.P., and Miller, C.L. "Geochemical and biological controls over methylmercury production and degradation in aquatic systems." In *Biogeochemistry of Environmentally Important Trace Metals*; ACS Symposium Series 835; Cai, Y., Braids, O.C., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 2003, pp 262-297.
- Bishop, K.H., Lee, Y.-H., Munthe, J., Dambrine, E. "Xylem sap as a pathway for total mercury and methylmercury transport from soils to tree canopy in the boreal forest", *Biogeochemistry*, 1998, 40: 101-113.
- Bloom, N.S. "On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate

tissue." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1992, 49: 1010-1017.

Bloom, N.S., and Fitzgerald, W.F. "Determination of volatile mercury species at the pictogram level by low temperature gas chromatography with cold vapor atomic fluorescence detection", *Anal. Chim. Acta.*, 1988, 208: 151-161.

Bloom, N.S., and von der Geest, E.J. "Matrix modification to improve recovery of MMHg from clear water using distillation", *Water Air Soil Pollut.*, 1995, 80: 1319-1323.

Bloom, N.S., Colman, J.A., and Barber, L. "Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 358: 371-377.

Branfireun, B. A., Hilbert, D., and Roulet, N. T. "Sinks and sources of methylmercury in a boreal catchment", *Biogeochemistry*, 1998, 41: 277-291.

Carpi, A. "Mercury from combustion sources: a review of the emical species emitted and their transport in the atmosphere." *Water, Air, Soil Pollut.* 1997, 98: 241-254.

Cavallini, A., Natali, L., Durante, M., and Maserti, B. "Mercury uptake, distribution, and DNA affinity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) plants", *Sci. Total Environ.* 1999, 243/244: 119-127.

Chang, M.B., Wu, H.T., and Huang, C.K. "Evaluation on speciation and removal efficiencies of mercury from municipal solid waste incinerators in Taiwan", *Sci. Total Environ.*, 2000, 246: 165-173

Choi, S-C, Chase Jr., T. and Bartha, R. "Enzymatic catalysis of mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS." *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60: 1342-1346.

Compeau, G.C. and Bartha, R. "Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment." *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, 50: 448-502.

Conaway, C.H., Squire, S., Mason, R.P., and Flegal, A.R. "Mercury speciation in the San Francisco Bay estuary", *Mar. Chem.* 2003, 80:199-225.

Cornwell, J.C. and Morse, J.W. "The characterization of iron sulfide minerals in anoxic marine sediments", *Mar. Chem.* 1987, 22: 193-206.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M. "Microbial biofilms", *Annu. Rev. Microbiol.* 1995, 49: 711-745.

Deonaraine, A. and Hsu-Kim, H. "Precipitation of mercuric sulfide nanoparticles in NOM-containing water: implications for the natural environment", *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43: 2368-2373.

Driscoll, C. T., Holsapple, J., Schofield, C. L. and Munson, R. "The chemistry and

transport of mercury in a small wetland in the Adirondack region of New York, USA", *Biogeochemistry*, 1998, 40: 137-146.

Driscoll, C.T., Han, Y.-J., Chen, C.Y., Evers, D.C., Lambert, K.F., Holsen, T.M., Kamman, N.C., and Munson, R.K. "Mercury contamination in forest and freshwater ecosystems in the Northeastern United States", *BioSci.* 2007, 57: 17-28.

Ericksen, J.A., Gustin, M.S., Schorran, D.E., Johnson, D.W., Lindberg, S.E., and Coleman, J.S. "Accumulation of atmospheric mercury in forest foliage", *Atmos. Environ.* 2003, 37: 1613-1622.

Fahlke, J. and Bursik, A. "Impact of the state-of-the-art of flue gas cleaning on mercury species emissions from coal-fired steam generators", *Water Air Soil Pollut.* 1995, 80: 209-215.

Feng, X., Li, P., Qiu, G., Wang, S., Li, G., Shang, L., Meng, B., Jiang, H., Bai, W., Li, Z., and Fu, X. "Human exposure to methylmercury through rice intake in mercury mining areas, Guizhou Province, China", *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42: 326-332.

Fitzgerald, W.F. and Mason, R.P. "Biogeochemical cycling of mercury in the marine environment." *Metal Ions in Biological Systems*. New York, Marcel Dekker Inc. 1997, 34: 53-111.

Fitzgerald, W.F., Engstrom, D.R., Mason, R.P., and Nater, E.A. "The case for atmospheric mercury contamination in remote areas." *Environ. Sci. Technol.* 1998, 32: 1-7.

Fleming, E.J., Mack, E.E., Green, P.G. and Nelson, D.C. "Mercury methylation from unexpected sources: molybdate-inhibited freshwater sediments and an iron-reducing bacterium", *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72: 457-464.

Friedli, H.R., Radke, L.F., Payne, N.J., McRae, D.J., Lynham, T.J., and Blake, T.W. "Mercury in vegetation and organic soil at an upland boreal forest site in Prince Albert National Park, Saskatchewan, Canada", *J. Geophys. Res.* 2007, 112:G01004, doi: 10.1029/2005JG000061.

Gangull, P.M., Mason, R.P., and Abu-Saba, K.E. "Mercury speciation in drainage from the New Idria mercury mine, California", *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34: 4773-4779.

Gill, G.A., and Fitzgerald, W.F. "Mercury sampling of open ocean waters at the picomolar level", *Deep-Sea Res.*, 1985, 32: 287-297.

Gilmour, C.C., Henry, E.A., and Mitchell, R. "Sulfate stimulation of mercury methylation in fresh-water sediments", *Environ. Sci. Technol.* 1992, 26: 2281-2287.

Gilmour, C. C., Henry, E. A., and Mitchell, R. "Sulfate stimulation of mercury methylation in fresh-water sediments", *Environ. Sci. Technol.* 1992, 26: 2281-2287.

Gilmour, C.C., Elias, D.A., Kucken, A.M., Brown, S.D., Palumbo, A.V., Schadt, C.W., and Wall, J.D. "Sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 as a model for understanding bacterial mercury methylation", *Appl. Environ. Microbio.* 2011, 77: 3938-3951.

Gilmour, C.C., Podar, M., Bullock, A.L., Graham, A.M., Brown, S.D., Somenahally, A.C., Johs, A., Hurt Jr., R.A., Bailey, K.L. and Elias, D.A. "Mercury methylation by novel microorganisms from new environments." *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47: 11810-11820.

Hamelin, S., Amyot, M., Barkay, T., Wang, Y., and Planas, D. "Methanogens: principal methylators of mercury in lake periphyton", *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45: 7693-7700.

Harris, R.C., Rudd, J.W.M., Amyot, M., Babiarz, C.L., Beaty, K.G., Blanchfield, P.J., Bodaly, R.A., Branfireun, B.A., Gilmour, C.C., Graydon, J.A., Heyes, A., Hintelmann, H., Hurley, J.P., Kelly, C.A.,

Krabbenhoft, D.P., Lindberg, S.E., Mason, R.P., Paterson, M.J., Podemski, C.L., Robinson, A., Sandilands, K.A., Southworth, G.R., St.Louis, V.L., and Tate, M.T. "Whole-ecosystem study shows rapid fish-mercury response to changes in mercury deposition", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104: 16586-16591.

Heyes, A., Moore, T.R., Rudd, J.W.M., and Dugoua, J.J. "Methyl mercury in pristine and impounded boreal peatlands, experimental Lakes Area, Ontario", *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2000, 57: 2211-2222.

Heyvaert, A.C., Reuter, J.E., Slotton, D.G., and Goldman, C.R. "Paleolimnological reconstruction of historical atmospheric lead and mercury deposition at Lake Tahoe, California-Nevada", *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34: 3588-3597.

Hovart, M., Bloom, N.S., and Liang, L. "Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples, part 1, sediments", *Anal. Chim. Acta.*, 1993a, 281: 135-152.

Horvat, M., Bloom, N.S., and Liang, L. "Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples, part 2, water", *Anal. Chim. Acta.*, 1993b, 282: 153-168.

Horvat, M., Nolde, N., Fajon, V., Jereb, V., Logar, M., Lojen, S., Jacimovic, R., Falnoga, I., Qu, L.Y., Faganeli, J., and Drobne, D. "Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China", *Sci. Total Environ.*, 2003, 304: 231-256.

Hurley, J., Benoit, J., Babiarz, C., Shafer, M., Andren, A., Sullivan, J., Hammond, R., and Webb, D. "Influence of watershed characteristics on mercury levels in Wisconsin rivers", *Environ. Sci. Technol.* 1995, 29: 1867-1875.

- Hurt, R. A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., and Zhou, J. "Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments", *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67: 4495-4503.
- Jay, J. A., Morel, F. M. M., and Hemond, H. F. "Mercury speciation in the presence of polysulfides", *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34: 2196-2200.
- Jay, J. A., Murray, K. J., Roberts, A. L., Mason, R. P., Gilmour, C. C., Morel, F. M. M., and Hemond, H. F. "Mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* ND 132 in the presence of polysulfides", *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68: 5741-5745.
- Keeler, G.J., Landis, M.S., Norris, G.A., Christianson, E.M., and Dvonch, J.R. "Sources of mercury wet deposition in eastern Ohio, USA", *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40: 5874-5881.
- Kelly, C.A., Rudd, J.W.M., St. Louis, V.L., and Heyes, A. "Is total mercury concentration a good predictor of methyl mercury concentration in aquatic systems", *Water Air Soil Pollut.* 1995, 80: 715-724.
- Kelly, C.A., Rudd, J.W.M., Bodaly, R.A., Roulet, N.P., St. Louis, V.L., Heyes, A., Moore, T.R., Schiff, S., Aravena, R., Scott, K.J., Dyck, B., Harris, R., Warner, B., and Edwards, G. "Increases in fluxes of greenhouse gases and methyl mercury following flooding of an experimental reservoir", *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31: 1334-1344.
- Kerin, E.J., Gilmour, C.C., Roden, E., Suzuki, M.T., Coates, J.D., and Mason, R.P. "Mercury methylation by dissimilatory iron-reducing bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72: 7919-7921.
- Kirk, G. 2004, *The Biogeochemistry of Submerged Soils*, John Wiley.
- Kraepiel, A.M.L., Keller, K., Chin, H.B., Malcolm, E.G., and Morel, F.M.M. "Sources and variations of mercury in tuna", *Environ. Sci. Technol.*, 2003, 37: 5551-5558.
- Landis, M.S., Keeler G.J., Al-Wali, K.I., and Stevens, R.K. "Divalent inorganic reactive gaseous mercury emissions from a mercury cell chlor-alkali plant and its impact on near-field atmospheric dry deposition", *Atmos. Environ.* 2004, 38: 613-622.
- Li, L., Wang, F., Meng, B., Lemes, M., Feng, X., and Jiang, G. "Speciation of methylmercury in rice grown from a mercury mining area", *Environ. Pollut.* 2010, 158: 3103-3107.
- Li, P., Feng, X., Qiu, G., Shang, L., and Wang, S. "Mercury exposure in the population from Wuchuan mercury mining area, Guizhou, China", *Sci. Total Environ.* 2008, 395: 72-79.
- Li, P., Feng, X., and Qiu, G. "Methylmercury exposure and health effects from rice and fish consumption: a review", *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2010, 7: 2666-2691.
- Liesack, W., Schnell, S., and Revsbech, N.P. "Microbiology of flooded rice paddies",

FEMS Microbiol. Rev. 2000, 24: 625-645.

Lin, C.-C. and Jay, J. A. "Mercury methylation by planktonic and biofilm cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*", *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41: 6691-6697.

Lin, C.-C., Yee, N., and Barkay, T. "Microbial transformations in the mercury cycle", In: *Advances in Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury*, Cai, Y., Liu, G., and O'driscoll, N. Eds., John Wiley & Sons, Inc. 2012: 155-192.

Lin, C.-J. and Pehkonen, S.O. "The chemistry of atmospheric mercury: a review", *Atmos. Environ.* 1999, 33: 2067-2079.

Lin, T.Y., Kampalath, R.A., Lin, C.-C., Zhang, M., Chavarria, K., Lacson, J. and Jay, J.A. "Investigation of mercury methylation pathways in biofilm versus planktonic cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*." *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47: 5695-5702.

Lindberg, S.E., Jackson, D.R., Huckabee, J.W., Janzen, S.A., Levin, M.J., and Lund, J.R. "Atmospheric emission and plant uptake of mercury from agricultural soils near the Almaden mercury mine", *J. Environ. Quality*, 1979, 8: 572-578.

Liu, B., Keeler, G.J., Dvonch, J.T., Barres, J.A., Lynam, M.M., Marsik, F.J., and Morgan, J.T. "Temporal variability of mercury speciation in urban air", *Atmos. Environ.*, 2007, 41, 1911-1923.

Liu, J., Feng, X., Qiu, G., Anderson, C.W.N., and Yao, H. "Prediction of methyl mercury uptake by rice plants (*Oryza sativa* L.) using the diffusive gradient in thin films technique", *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46: 11013-11020.

Lovley, D. and Phillips, E. "Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments", *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, 53: 1536-1540.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. Upper Saddle River (NJ), Prentice Hall, 2002.

Marsh, T. L. "Culture-independent microbial community analysis with terminal restriction fragment length polymorphism", *Methods in Enzymol.* 2005, 397: 308-329.

Marvin-DiPasquale, M., Agee, J., and Jaffe, B. "Microbial cycling of mercury in contaminated pelagic and wetlands of San Pablo Bay, California", *Environ. Geol.* 2003, 43: 260-267.

Mason, R. P., Fitzgerald, W. F., and Morel, F. M. M. "The biogeochemical cycling of elemental mercury: anthropogenic influences", *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1994, 58: 3191-3198.

Mason, R.P., Reinfelder, J., and Morel, F.M.M. "Bioaccumulation of mercury and methylmercury", *Water, Air, Soil Pollut.*, 1995, 80: 915-921.

- Mehrotra, A.S. and Sedlak, D.L. "Decrease in net mercury methylation rates following iron amendment to anoxic wetland sediment slurries", *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39: 2564-2570.
- Mehrotra, A., Horne, A.J. and Sedlak, D.L. "Reduction of net mercury methylation by iron in *Desulfobulbus propionicus* (1pr3) cultures: implications for engineered wetlands", *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37: 3018-3023.
- Meng, B., Feng, X., Qiu, G., Cai, Y., Wang, D., Li, P., Shang, L., and Sommar, J. "Distribution patterns of inorganic mercury and methylmercury in tissues of rice (*Oryza sativa* L.) plants and possible bioaccumulation pathways", *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58: 4951-4958.
- Meng, B., Feng, X., Qiu, G., Liang, P., Li, P., Chen, C., and Shang, L. "The process of methylmercury accumulation in rice (*Oryza sativa* L.)", *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45: 2711-2717.
- Meng, B., Feng, X., Qiu, G., Wang, D., Liang, P., Li, P., and Shang, L. "Inorganic mercury accumulation in rice (*Oryza sativa* L.)", *Environ. Toxicol. Chem.*, 2012, 31: 2093-2098.
- Mitchell, C.P.J. and Gilmour, C.C. "Methylation production in a Chesapeake Bay salt marsh", *J. Geophys. Res.* 2008, 113, G00C04, doi: 10.1029/2008JG00765.
- Molles Jr., M.C. *Ecology Concepts and Applications*. 5th Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2010.
- Morel, F.M.M. and Hering, J.G. *Principles and applications of aquatic chemistry*. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1993.
- Morel, F.M.M., Kraepiel, A.M.L., and Amyot, M. "The chemical cycle and bioaccumulation of mercury", *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 1998, 29: 543-566.
- Munthe, J., Bodaly, R.A., Branfireun, B.A., Driscoll, C.T., Gilmour, C.C., Harris, R., Horvat, M., Lucotte, M. and Malm, O. "Recovery of mercury-contaminated fisheries", *Ambio* 2007, 36: 33-44.
- Najera, I., Lin, C.-C., Kohbodi, G.A., and Jay, J.A. "Effect of chemical speciation on toxicity of mercury to *Escherichia coli* biofilms and planktonic cells", *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39: 3116-3120.
- Ndu, U., Mason, R.P., Zhang, H., Lin, S.J. and Visscher, P.T. "Effect of inorganic and organic ligands on the bioavailability of methylmercury as determined by using a *mer-lux* bioreporter", *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78: 7276-7282.
- Paquette, K. E. and Helz, G. R. "Inorganic speciation of mercury in sulfidic waters: the importance of zero-valent sulfur", *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31: 2148-2153.

Parkhurst, D.L. and Appelo, C.A.J. *User's guide to PHREEQC* (version 2). U.S. Geological Survey Water-Resources Investigation Report, 2000.

Parks, J.M., Johs, A., Podar, M., Bridou, R., Hurt, R.A., Smith, S.D., Tomanicek, S.J., Qian, Y., Brown, S.D., Brandt, C.C., Palumbo, A.V., Smith, J.C., Wall, J.D., Elias, D.A. and Liang, L.Y. "The genetic basis for bacterial mercury methylation." *Science* 339: 1332-1335, 2013.

Parker, J.L., and Bloom, N.S. "Preservation and storage techniques for low-level aqueous mercury speciation", *Sci. Total Environ.*, 2005, 337: 253-263.

Poulain, A. J., NíChadhain, S. M., Ariya, P. A., Amyot, M., Garcia, E., Campbell, P. G. C., Zylstra, G. J., and Barkay, T. "A potential for mercury reduction by microbes in the High Arctic", *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73: 2230–2238.

Qiu, G., Feng, X., Li, P., Wang, S., Li, G., Shang, L., and Fu, X. "Methylmercury accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) grown at abandoned mercury mines in Guizhou, China", *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56: 2465-2468.

Rea, A.W., Lindberg, S.E., Scherbatskoy, T., and Keeler, G.J. "Mercury accumulation in foliage over time in two northern mixed-hardwood forests", *Water Air Soil Pollut.* 2002, 133: 49-67.

Rothenberg, S.E., Ambrose, R.F. and Jay, J.A. "Mercury cycling in surface water, pore water and sediments of Mugu Lagoon, CA, USA", *Environ. Pollut.* 2008, 154: 32-45.

Rothenberg, S.E., Kirby, M.E., Bird, B.W., DeRose, M.B., Lin, C.-C., Feng, X., Ambrose, R.F., and Jay, J.A. "The impact of over 100 years of wildfires on mercury levels and accumulation rates in two lakes in southern California, USA", *Environ. Earth. Sci.* 2010a, 60: 993-1005.

Rothenberg, S.E., McKee, L., Gilbreath, A., Yee, D., Connor, M., and Fu, X. "Wet deposition of mercury within the vicinity of a cement plant before and during cement plant maintenance", *Atmos. Environ.* 2010b, 44: 1255-1262.

Rothenberg, S.E., McKee, L., Gilbreath, A., Yee, D., Connor, M., and Fu, X. "Evidence for short-range transport of atmospheric mercury to a rural, inland site." *Atmos. Environ.* 2010c, 44: 1263-1273.

Rothenberg, S.E., Feng, X., and Li, P. "Low-level maternal methylmercury exposure through rice ingestion and potential implications for offspring health", *Environ. Pollut.* 2011a, 159: 1017-1022.

Rothenberg, S.E., Feng, X., Dong, B., Shang, L., Yin, R., and Yuan, X. "Characterization of mercury species in brown and white rice (*Oryza sativa* L.) grown in water-saving paddies." *Environ. Pollut.* 2011b, 159: 1283-1289.

Rothenberg, S.E. and Feng, X. "Mercury cycling in a flooded rice paddy", *JGR* 2012a,

117, G03003, doi:10.1029/2011JG001800.

Rothenberg, S.E., Feng, X. Zhou, W., Tu, M., Jin, B., and You, J. “Environmental and genotype controls on mercury accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) cultivated along a contamination gradient in Guizhou, Chin”, *Sci. Total Environ.*, 2012b, 426: 272-280.

Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Ohashi, A., Harada, H., and Kamagata, Y. “Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: a novel isolate affiliated with the clone cluster rice cluster I”, *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73: 4326-4331.

Schaefer, J.K. and Morel, F.M.M. “High methylation rates of mercury bound to cysteine by *Geobacter sulfurreducens*”, *Nat. Geosci.* 2009, 2: 123-126.

Schaefer, J.K., Rocks, S.S., Zhang, W., Liang, L., Gu, B., and Morel, F.M.M. “Active transport, substrate specificity, and methylation of Hg(II) in anaerobic bacteria”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108: 8714-8719.

Scheld, D. and Stubner, S. “Structure and diversity of gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots”, *FEMS Microbiol.Ecol.* 2001, 36: 175-183.

Schroeder, W.H. and Munthe, J. “Atmospheric mercury- an overview”, *Atmos. Environ.* 1998, 32: 809-822.

Schwertmann, U., and Cornell, R.M. Iron oxides in the laboratory – preparation and characterization. 1991. New York: Wiley-VCH.

Schwesig, D. and Krebs, O. “The role of ground vegetation in the uptake of mercury and methylmercury in a forest ecosystem”, *Plant and Soil*, 2003, 253: 445-455.

Senesi, G.S., Baldassarre, G., Senesi, N., Radina, B. “Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health”, *Chemosphere*, 1999, 39: 343-377.

Sherman, L.S., Blum, J.D., Keeler, G.J., Demers, J.D., and Dvorchak, J.T. “Investigation of local mercury deposition from a coal-fired power plant using mercury isotopes”, *Environ. Sci. Technol.* ASAP (published on line on 11/21/2011).

Slowey, A.J., and Brown, G.E. “Transformation of mercury, iron, and sulfur during the reductive dissolution of iron oxyhydroxide by sulfide”, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2007, 71: 877-894.

Søvik, M.-L., Larssen, T., Vogt, R. D., Wibetoe, G., and Feng, X. “Potentially harmful elements in rice paddy fields in mercury hot spots in Guizhou, China”, *App. Geochem.* 2011, 26: 167-173.

St. Louis, V.L., Rudd, J.W.M., Kelly, C.A., Beaty, K.G., Bloom, N.S., and Flett, R.J. “Importance of wetlands as sources of methyl mercury to boreal forest ecosystems”,

Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1994, 51

St. Louis, V.L., Rudd, J.W.M., Kelly, C.A., Beaty, K.G., Flett, R.J., and Roulet, N.T. "Production and loss of methylmercury and loss of total mercury from boreal forest catchments containing different types of wetlands", *Environ. Sci. Technol.* 1996, 30: 2719–2729.

Stubner, S., Wind, T., and Conrad, R. "Sulfur oxidation in rice field soil: activity, enumeration, isolation and characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria", *Syst. Appl. Microbiol.* 1998, 21: 569-578.

Stumm, W. and Morgan, J. J. *Aquatic chemistry- Chemical equilibria and rates in natural waters*. New York, NY, John Wiley & Sons, Inc., 1996.

Suchanek, T. H., Mullen, L. H., Lamphere, B. A., Richerson, P. J., Woodmansee, C. E., Slotton, D. G., Harner, E. J., and Woodward, L. A. "Redistribution of mercury from contaminated lake sediments for Clear Lake, California", *Water Air Soil Pollut.* 1998, 104: 77–102.

Suchanek, T. H., Richerson, P. J., Flanders, J. R., Nelson, D. C., Mullen, L. H., Brister, L. L., and Becker, J. C. "Monitoring inter-annual variability reveals sources of mercury contamination in Clear Lake, California", *Environ. Monit. Assess.* 2000, 64: 299-310.

Sweet, L.I. and Zelikoff, J.T. "Toxicology and immunotoxicology of mercury: a comparative review in fish and humans", *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 2001, 4: 161-205.

Taypor, E.F., Hood, T.A., and Pope, L.A. "Assay of sulfur as triphenylphosphine sulfide by high performance liquid chromatography: application to studies of sulfur bioproduction and sulfur in marine sediments", *J. Microbiol. Methods*, 1989, 9: 221-231.

Ullrich, S., Tnton, T. and Abdrashitova, S. "Mercury in the environment: a review of the factors affecting methylation", *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2001, 31: 241-293.

Ulrich, P.D. and Sedlak, D.L. "Impact of iron amendment on net methylmercury export from tidal wetland microcosms", *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44: 7659-7665.

UNEP. "The global atmospheric mercury assessment: sources, emissionis and transport", 2008.

USEPA. Method 1669. "Sampling ambient water for trace metals at EPA water quality criteria levels." 1996, Washington, D.C.

USEPA. Method 1630. "Methyl Mercury in Water by Distillation, Aqueous Ethylation, Purge and Trap, and Cold Vapor Atomic Spectrometry." 2001, Washington, D.C.

USEPA. Method 1631. "Revision E: Mercury in water by oxidation, purge and trap, and

cold vapor atomic fluorescence spectrometry.” 2002, Washington, DC.

Wang, Q., Kim, D., Dionysiou, D.D., Sorial, G.A., and Timberlake, D. “Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems – a literature review”, *Environ. Pollut.* 2004, 131: 323-336.

Wang, Y., Boyd, E., Crane, S., Lu-Irving, P., Krabbenhoft, D., King, S., Dighton, J., Geesey, G., and Barkay, T. “Environmental conditions constrain the distribution and diversity of archaeal *merA* in

Warner, K.A., Roden, E.E., and Bonzongo, J.-C. “Microbial mercury transformation in anoxic freshwater sediments under iron-reducing and other electron-accepting conditions”, *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37: 2159-2165.

WHO, *International program on chemical safety: Environmental health criteria 118-inorganic mercury*; World Health Organization: Geneva, 1991.

Wiatrowski, H.W., Ward, P.M., and Barkay, T. “Novel reduction of mercury(II) by mercury-sensitive dissimilatory metal reducing bacteria”, *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40: 6690-6696.

Wind, T. and Conrad, R. “Sulfur compounds, potential turnover of sulfate and thiosulfate, and numbers of sulfate-reducing bacteria in planted and unplanted paddy soil”, *FEMS Microbiol. Ecol.* 1995, 18: 257-266.

Wind, T. and Conrad, R. “Localization of sulfate reduction in planted and unplanted rice field soil”, *Biogeochemistry*, 1997, 37: 253-278.

Wind, T., Stubner, S., and Conrad, R. “Sulfate-reducing bacteria in rice field soil and on rice roots”, *Syst. Appl. Microbiol.* 1999, 22: 269-279.

Windham-Kyers, L., Marvin-DiPasquale, M., Krabbenhoft, D.P., Agee, J.L., Cox, M.H., Heredia-Middleton, P., Coates, C., and Kakouros, E. “Experimental removal of wetland emergent vegetation leads to decreased methylmercury production in surface sediment”, *J. Geophys. Res.*, 2009, 114, G00CO5, doi:10.1029/2008JG00815.

Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H., and Gomez, K.A. “Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice.”, *The Int. Rice Res. Institute*. 1976, 60-65

Yu, R., Reinfelder, J., Mack, E.E., Turner, R., Mirza, M.B., and Barkay, T. “Contribution of coexisting sulfate and iron reducing bacteria to methylmercury production in freshwater river sediments”, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46: 2684-2691.

Yu, R., Reinfelder, J.R., Hines, M.E. and Barkay, T. “Mercury methylation by methanogen *Methanospirillum hungatei*.” *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, 79: 6325-6330.

Zhang, H., Feng, X., Larssen, T., Qiu, G., and Vogt, R. D. “In inland China, rice, rather

than fish, is the major pathway for methylmercury exposure”, *Environ. Health Persp.* 2010a, 118: 1183-1188.

Zhang, H., Feng, X., Larssen, T., Shang, L., and Li, P. “Bioaccumulation of methylmercury versus inorganic mercury in rice (*Oryza sativa* L.) grain”, *Environ. Sci. Technol.* 2010b, 44: 4499-4504.