

구리·아연과 비교한 보리 엽록체의 광합성 기구에 미치는 수은 이온의 특이한 효과

문병용·전현식*·이춘환**·이진범*

인제대학교 생물학과, *동의대학교 생물학과, **부산대학교 분자생물학과

(1992년 6월 8일 접수)

Mercury-Specific Effects on Photosynthetic Apparatus of Barley Chloroplasts Compared with Copper and Zinc Ions.

Byoung Yong Moon, Hyun Sik Chun*, Choon-Hwan Lee**
and Chin Bum Lee*

*Department of Biology, Inje University, Kimhae, * Department of Biology, Donggeui University,
and ** Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan, Korea*

(Manuscript received 8 June 1992)

Abstract

To find heavy metal-specific effects on the photosynthetic apparatus of higher plants, we investigated effects of CuCl_2 , HgCl_2 and ZnCl_2 on electron transport activity and chlorophyll fluorescence induction kinetics of chloroplasts isolated from barley seedlings. Effects on some related processes such as germination, growth and photosynthetic pigments of the test plants were also studied.

Germination and growth rate were inhibited in a concentration-dependent manner by these metals. Mercury was shown to be the most potent inhibitor of germination, growth and biosynthesis of photosynthetic pigments of barley plants. In the inhibition of electron transport activity, quantum yield of PS II, and chlorophyll fluorescence induction kinetics of chloroplasts isolated from barley seedlings, mercury chloride showed more pronounced effects than other two metals.

Contrary to the effects of other two metals, mercury chloride increased variable fluorescence significantly and abolished qE in the fluorescence induction kinetics from broken chloroplasts of barley seedlings. This increase in variable fluorescence is due to the inhibition of the electron transport chain after PS II and the following dark reactions. The inhibition of qE could be attributed to the interruption of pH formation and de-epoxidation of violaxanthin to zeaxanthin in thylakoids by mercury.

This unique effect of mercury on chlorophyll fluorescence induction pattern could be used as a good indicator for testing the presence and/or the concentration of mercury in the samples contaminated with heavy metals.

KEY WORDS: heavy metal, mercury, copper, zinc, growth, pigments, electron transport activity, chloroplasts, chlorophyll fluorescence, photochemical quenching, energy-dependent quenching, quantum yield

※ 본 연구는 1990년도 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비 지원에 의한 것임.
※ ABBREVIATIONS: Chl-chlorophyll; Hepes - N-2-hydroxyethyl piperazine sulfonic acid; DCMU - 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethyl urea; PS I and PS II - photosystem I and II; qQ and qNP - photochemical and nonphotochemical components of Chl fluorescence quenching; qE and qR - energy-dependent quenching coefficient and coefficient for relative contribution of other non-photochemical quenching; Q_A - primary quinone electron acceptor of PS II; Q_B - secondary quinone electron acceptor of PS II; Φ_s - quantum yield of photosystem II; Φ_p - the Φ_s :qQ ratio.

1. 서론

환경의 관점에서 중금속은 광범위한 연구 주제이다. 식물의 경우, 많은 고등식물과 녹조류의 광합성이 토양, 하천, 연안의 중금속 축적으로 인하여 저해되고 있다 (Stokes, 1983). 공업 지역에서는 중금속이 국지적으로 고농도로 존재하여 식물의 생산성과 작물의 상품적, 영양적 가치를 저하시키기도 한다 (Cottenie *et al.*, 1976). 식물의 광합성은 중금속에 특히 민감하다 (Clijsters and Van Assche, 1985).

생물학적 관점에서 중금속은 크게 2개의 범주, 즉, 필수 중금속과 비필수 중금속으로 구분된다. 필수 중금속은 미량으로 존재하여 생물의 대사 과정에 참여하나 비필수 원소는 생물에 필요치 않으며 낮은 농도에서도 독성으로 작용할 수 있다. 그러나, 필수 중금속 원소도 과량에서는 독성을 나타낸다 (Poole and Gadd, 1989).

수은(Hg)은 비필수 원소로서 금속, 이온 및 유기화합물 형태로 독성을 나타내지만 공업 제품의 생산에 광범위하게 사용되고 있기 때문에 오래 동안 환경 위해 물질로 인식되어져 왔다. 식물의 경우, 수은은 *Chlorella*의 성장을 저해하고(Kessler, 1986) 진핵성 고등식물과 (Tripathy and Mohanty, 1980) 원핵성 cyanobacteria에서 (Kojima *et al.*, 1987) 전자 전달계에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나 작용 양상과 작용 부위가 다양하게 나타난다. 구리(Cu)는 고등식물과 조류에서 필수 미량원소이고(Walker, 1953), 광합성 기구에서 plastocyanin의 성분으로 들어있으며 PSII 입자에도 상당량 존재하는 것으로 알려져 있다 (Goldfeld and Khalilov, 1979). 1 μ M 이상의 구리는 조류 세포와 분리 엽록체의 광합성을 저해하나 구리 역제의 기작이나 그 작용 부위에 대하여는 논란이 많다. 아연(Zn) 역시 필수 미량 원소이며 많은 효소의 보결 원자단을 구성하는데 중요하다. 아연은 특히 광산이나 제련소 등의 여러 방출원으로 부터 흘러나와 축적됨으로써 물과 토양을 오염시킨다. 아연이 보리의 성장과 건물 생산을 감소시키고 특히 폐수에서 녹조의 대발생시 녹조에 축적됨이 알려졌다(Davies and Sleep, 1979). 아연은 특히 광계 2의 oxidizing side에 작용하여 광합성의 전자 전달을 억제하고 광인산화 활성과 NADPH 생산을 감소시킨다(Van Assche and Clijsters, 1983a). 또한 RuBP

carboxylase에 직접 작용하기도 한다.

광합성에서 아직까지 중금속에 의해 영향을 받는 광화학 반응에 대하여 명확히 밝혀져 있지 않고 이들 중금속이 광합성기구에서 작용하는 부위와 작용 방식에 대하여 많은 논란이 있기 때문에 중금속의 영향에 관한 연구는 아직도 새로운 방법과 접근이 필요하다. 환경 stress에 의한 광합성 기구의 변화 연구에 있어서 최근 민감하고 시료에 거의 손상을 주지않고 측정할 수 있는 형광분석법이 널리 이용되고 있다 (Lee, 1990; Lichtenthaler, 1988).

본 연구에서는 구리, 수은, 아연이 식물체의 성장 및 광합성에 미치는 영향을 비교 조사하고, 아울러 분리한 엽록체가 엽록소 형광 유도 현상에 미치는 효과를 조사하여 각 중금속 이온의 특이적 억제 효과를 구명하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 식물 재료

재료로 사용한 보리 종자(*Hordeum vulgare* L. cv. Albori)는 영남 작물 시험장에서 분양받은 것을 실험에 사용하였고, 1% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 표면 살균한 후 암발아시켰다. 발아시킨 종자를 25°C, 6,000 lux (명주기 16 h:암주기 8 h)의 growth chamber에서 수경 재배하여 유식물을 얻었다. 성장 실험 시에는 cupric chloride, mercuric chloride, zinc chloride의 stock solution을 농도별로 배양액 (증류수)에 첨가하여 배양하였다.

2.2. 발아와 생장의 측정

증류수와 처리된 중금속 용액에서 암발아시킨 종자에 대하여 유근의 출현을 기준으로 발아 시험을 행하였고 성장을 조사하기 위하여 매일 일정한 시간에 초장을 측정하였다.

2.3. 광합성 색소와 단백질 함량의 측정

엽록소는 Arnon(1949)의 방법에 따라 80% acetone으로 추출하여 정량하였고 총 카로티노이드 함량은 Liajen-Jensen과 Jensen(1973)의 방법에 따라 추출 정량하였다. 또한, 수용성 단백질의 함량은 bovine se-

rum albumin을 표준물로 하여 Lowry *et al.*(1951)의 방법에 따라 측정하였다.

2.4. 분리 엽록체의 전자전달 활성의 측정

엽록체는 Lee *et al.*(1983)의 방법에 따라 7일간 성장한 보리 유식물의 제일엽에서 분리하여 사용하였으며, 분리한 엽록체의 전자 전달 활성은 Binder와 Bachofen(1979)의 방법을 수정하여 Clark-type 산소 전극으로 측정하였다. 반응용액은 1 mM $MnCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, 0.33 M sorbitol이 포함된 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6) 완충 용액을 사용하였다. 광계 1 (PS I)의 활성은 반응 용액과 10 μM DCMU의 존재하에서 0.3 mM 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP), 0.05 mM methyl viologen (MV)과 10 mM ascorbate를 첨가하여 나타나는 산소 흡수량으로 측정하였다. 단, 중금속으로 사용한 구리는 ascorbate를 산화시켜 광합성과 관계 없는 산소 흡수를 일으키므로 (Renganathan and Bose, 1990) 구리의 존재 하에서 광계 1의 활성은 측정하지 않았다. 광계 2 (PS II)의 활성은 0.3 mM p-phenyl benzoquinone(PBQ)을 전자 수용체로 하여 산소 발생량으로 측정하였고 whole chain (PS II % PS I)의 전자 전달 활성은 50 μM MV를 전자 수용체로하여 산소 흡수량으로 측정하였다. 이 때의 엽록소 함량은 40 $\mu g/ml$ 이 되게 하였다.

2.5. 엽록소 형광의 유도 분석

분리 엽록체의 엽록소 형광은 Horton과 Hague(1988)의 방법을 기본으로하여 Hansatech fluorometer (Hansatech Co., U.K.)로 유도하여 분석하였다. 형광 유도 과정은 whole chain의 전자 전달 활성 측정용 반응액과 동일하게 준비한 다음 여기에 measuring beam, actinic beam, pulsed saturation beam을 시간에 따라 조사하여 fluorometer에 나타나는 형광의 변화를 기록계에 기록하였다. 형광 유도 변화에 따른 형광 소멸 계수(quenching coefficient)는 Oxborough와 Horton(1988)의 방법에 따라 qQ, qE, qR, qNP를 계산하여 나타냈다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 발아와 생장에 미치는 영향

보리 종자의 발아에 미치는 중금속의 영향을 조사하기 위하여 농도별로 처리한 중금속 배양액에서 유근이 출현한 종자의 비율을 측정한 결과, Fig.1과 같은 결과를 얻었다. 발아율은 처리한 중금속의 농도가 증가함에 따라 점차 감소하다가 1 mM 이상의 농도에서는 급격한 저하를 보였으며 전체적으로 수은의 저해적 효과가 가장 현저하였고 상대적으로 아연의 억제 효과는 낮게 나타났다. 50 μM 의 농도에서는 수은, 구리, 아연의 순으로 각각 36%, 12%, 15%의 비교적 낮은 억제율을 보였으나 1 mM의 고농도에 각각 82%, 56%, 17%의 발아 억제율을 보여 수은이 가장 심한 억제를 나타내는 농도 의존성 현상을 보였다.

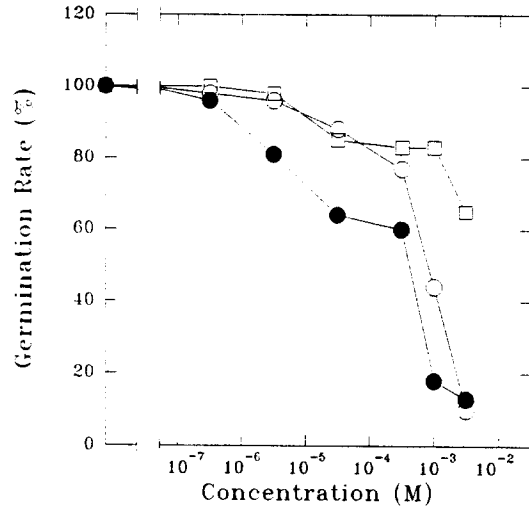


Fig. 1. Germination rate of barley seeds as affected by different concentrations of heavy metals.

○-○, $CuCl_2$; ●-●, $HgCl_2$; □-□, $ZnCl_2$.

보리 유식물의 생장에 미치는 중금속의 영향을 조사하기 위하여 성장 중인 유식물의 배양액에 중금속을 농도별로 첨가하여 이후의 생장을 측정하여 나타냈다 (Fig. 2). 그 결과 처리 농도가 증가함에 따라 생장의 초기에 심한 억제 현상을 보였고 특히 수은의 경우 10 μM 의 낮은 농도에서도 처리 3일 후에 이미 46% 정도의 현저한 성장 저하를 초래하였다. 그러나, 구리와 아연의 경우에는 동일한 농도와 처리 시간에서 각각 23.9%와 12.5%의 성장 저해율을 보여 수은에 비하여 성장 억제 효과는 낮은 것으로 나타났다. 또한, 0.5 mM 이상의 고농도에서는 처리한 모든 중금속이 급격한 성장 저

해를 초래하여 생리적 농도 이상에서의 독성 효과가 뚜렷함을 알 수 있었다. 수은과 구리는 처리 후 3일 부터 생장이 정지되었고 아연은 처리후 6 일째부터 생장이 정지됨이 관찰되어 처리한 중금속 중 아연은 독성이 비교적 덜하였다.

이상의 결과들은 구리, 수은, 아연의 중금속들이 유 식물의 발아와 생장에 대하여 농도 의존적 양상으로 독성 효과를 미쳤음을 말해준다. 구리, 아연, 수은 이온들은 비슷한 전자적 성질을 가지고 있으나 생물학적 ligand들에 대한 친화도가 다르기 때문에 작용 부위와 독성이 다르다. 중금속은 잎의 해부학적 구조를 변화 시키고 그 결과 CO₂에 대한 내부 저항이 증가함으로써 잎의 생장을 저해한다고 한다 (Van Assche and Clijsters, 1983b).

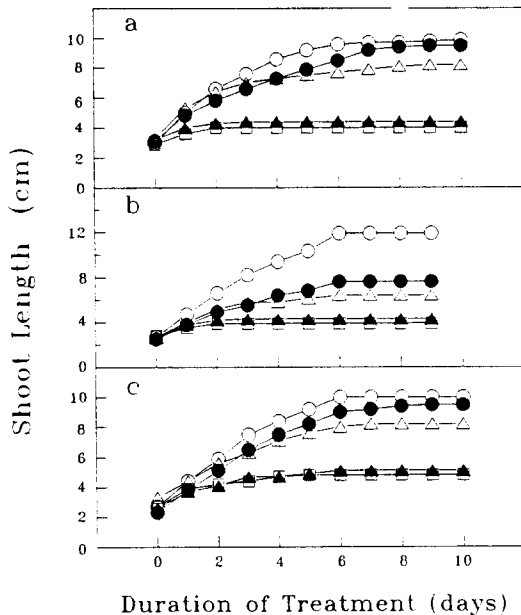


Fig. 2. Growth behavior of barley seedlings as affected by different concentrations of heavy metals. a) CuCl₂, b) HgCl₂, c) ZnCl₂ : control (○-○), 0.01mM (●-●), 0.1mM (△-△), 0.5mM (▲-▲), 1mM (□-□).

3.2. 광합성 색소 함량에 미치는 영향

생장 중인 보리 유식물에 중금속을 농도별로 처리 하여 중금속이 유식물의 광합성 색소와 단백질 함량에

미치는 영향을 조사하였다 (Table 1). 엽록소 a와 엽록소 b의 함량은 10μM의 농도에서 5일간 처리한 결과 수은의 경우, 각각 47.2%와 48.9%, 구리의 경우 37.5%, 39.2%, 아연의 경우 38.6%, 37.6%의 감소율을 보여 역시 엽록소 함량에 미치는 수은의 영향이 가장 큼을 알 수 있었다.

10μM의 처리 농도에서 중금속을 5일간 유식물에 처리한 결과 식물체의 카로티노이드 함량은 수은에서 46.5%, 구리에서 31%, 아연에서 32.4%로 나타났으나 0.5 mM의 고농도에서는 수은에서 87.3%, 구리에서 91.4%, 아연에서 67.0%로서 구리의 효과가 가장 크게 나타났고 아연의 효과가 가장 낮았다. 구리는 식물의 필수 미량원소이고 plastocyanin과 일부효소의 구성분이나 (Kato *et al.*, 1962) 식물체가 과량의 구리 이온에 노출될 때 생리적으로 중요한 부위에 있는 철(Fe) 이온이 구리로 치환되기 때문에 (Daniels *et al.*, 1972) 독성이 나타난다. 이것은 구리에 의한 황백화 현상이 철분 결핍시 나타나는 증세와 유사한 것으로 보아 알 수 있다. 카로티노이드는 중금속에 의하여 생합성이 억제되는 것으로 보이고 엽록소와 더불어 광수확 색소 계를 구성하는 이들 색소 함량이 감소하는 이유는 이들 중금속이 색소의 합성 반응계를 심하게 저해하거나 혹은 thylakoid membrane에 상해를 가함으로써 초래 되는 색소 분해 때문인 것 같다 (Rai *et al.*, 1991). Carotenoid:Chl의 함량비는 처리한 중금속 모두에 의하여 농도가 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였고 특히 아연에서 많이 감소하였다. 수용성 단백질 함량 역시 구리, 수은, 아연 순으로 감소 효과가 크게 나타났다 (Table 1).

3.3. 분리 엽록체의 전자 전달 활성과 엽록소 형광 유도에 미치는 영향

분리된 엽록체의 전자 전달계 활성에 미치는 중금속의 영향을 50μM의 비교적 낮은 농도에서 조사하여 비교하였다 (Table 2).

전자수용체를 MV로 하여 산소 흡수로 측정된 whole chain의 전자 전달 활성은(H₂O→MV) 수은 첨가에 의하여 48.3% 억제되었고 같은 농도의 구리, 아연에 의하여 각각 39.2%, 11.4% 억제율을 보여 수은이 엽록

Table 1. Effect of heavy metals on chlorophyll a, chlorophyll b, total carotenoids and protein contents of barley seedlings after 5 days of treatment.

Concentration (M)	Chl a ($\mu\text{g}/\text{leaf}$)	Chl b ($\mu\text{g}/\text{leaf}$)	Carotenoid ($\mu\text{g}/\text{leaf}$)	Carotenoid /Chl a	Protein ($\mu\text{g}/\text{leaf}$)	
Control	44.3(-)	18.6(-)	7.1(-)	0.19(-)	683(-)	
HgCl ₂	10 ⁻⁵	23.4(47.2)	9.5(48.9)	3.8(46.5)	0.16	557(18.5)
	10 ⁻⁴	12.7(71.3)	5.3(71.5)	2.1(70.4)	0.17	327(52.1)
	5×10 ⁻⁴	10.1(77.2)	4.0(78.5)	1.5(78.9)	0.15	265(61.2)
	10 ⁻³	4.7(89.4)	1.8(90.3)	0.9(87.3)	0.19	212(69.0)
CuCl ₂	10 ⁻⁵	27.7(37.5)	11.3(39.2)	4.9(31.0)	0.18	525(23.1)
	10 ⁻⁴	12.0(72.9)	4.9(73.7)	2.1(70.4)	0.18	275(59.7)
	5×10 ⁻⁴	4.0(91.0)	1.6(91.4)	0.6(91.5)	0.15	189(72.3)
	10 ⁻³	2.5(94.4)	1.0(94.6)	0.4(94.4)	0.16	146(78.6)
ZnCl ₂	10 ⁻⁵	27.2(38.6)	11.6(37.6)	4.8(32.4)	0.15	600(12.2)
	10 ⁻⁴	17.4(60.7)	7.0(62.4)	2.7(62.0)	0.10	450(34.1)
	5×10 ⁻⁴	17.4(60.7)	5.4(71.0)	2.3(67.6)	0.09	350(48.8)
	10 ⁻³	10.9(75.4)	4.7(74.7)	1.8(74.7)	0.08	308(54.9)

* Reduction percentages of the components are presented in the parentheses.

체의 전자 전달 활성을 가장 많이 억제하였고 아연이 가장 작게 억제하였다. 또, 광계 2의 활성은(H₂O→PBQ) 같은 농도에서 수은 처리에 의하여 73.3%, 구리, 아연 처리에 의하여 각각 46.7%, 23.3% 억제됨으로써 광계 2의 활성에 대한 수은의 억제 효과가 가장 컸으며 구리, 아연의 순이었다. 광계 1의 활성은 같은 농도의 수은 처리로 32.1% 억제되었고 아연에 의해서는 22.7% 억제되었다.

광계 1의 활성은 (Ascorbate + DCPIP → MV) 광계 2로부터의 전자 이동을 DCMU로 차단한 후 ascorbate로 환원된 DCPIP로부터 전자를 인위적으로 공급하여 MV에 수용하는 과정에서 Mehler 반응에 의해 흡수되는 산소의 양을 기준으로 측정한다. 이 때, 구리를 첨가하면 반응용 액에서 구리는 ascorbate를 산화시켜 비광합성적으로 산소를 급격하게 소모시키므로 구리의 존재하에서는 광계 1의 활성을 측정할 수 없었다 (Renganathan and Bose, 1990).

Table 2. Effects of heavy metals on the electron transport activity of chloroplasts isolated from barley seedlings

Heavy metals (50 μM)	H ₂ O→MV ($\mu\text{mol O}_2$ uptaken /mg chl/h)	H ₂ O→PBQ ($\mu\text{mol O}_2$ evolved /mg chl/h)	Ascorbate+DCPIP→MV ($\mu\text{mol O}_2$ uptaken /mg chl/h)
control	48.2	140.1	653.9
CuCl ₂	29.3	74.7	—*
HgCl ₂	24.9	37.4	443.7
ZnCl ₂	42.7	107.4	505.4

* PS I activity could not be measured in the presence of Cu²⁺ because Cu²⁺ oxidized ascorbate and consumed O₂ non-photosynthetically in the reaction medium.

광합성 기구에 대한 구리의 작용 표적 부위로서 여러가지가 제안된 바 있다. 즉, 광계 2의 oxidizing side (Samuelsson and Oquist, 1980), P680에 가까운 광계 2의 reducing side(Hsu and Lee, 1988), c-type cytochrome(Singh and Singh, 1987), 광계 2의 반응 중심(Sam-

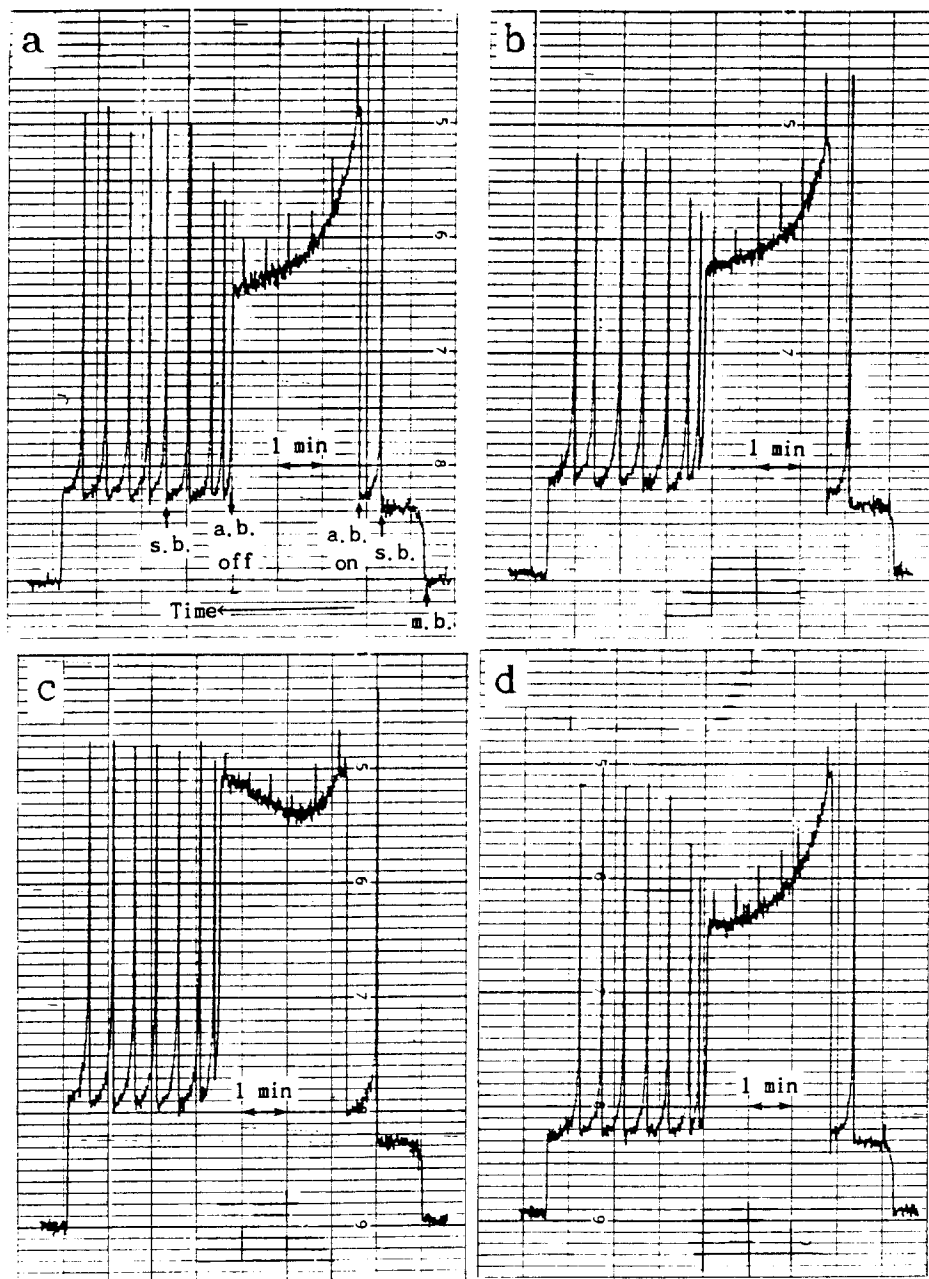


Fig. 3. Recording traces of chlorophyll fluorescence induction curves of barley chloroplasts in response to the application of $50\mu\text{M}$ heavy metals with actinic beam illumination of $1,330\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}$ PAR.

Fluorescence was measured in the medium of 0.33M sorbitol, 1mM MnCl_2 , 5mM MgCl_2 , $50\mu\text{M}$ methyl viologen with Hansatech fluorometer.

m.b.= measuring beam ; s.b.= saturation beam ; a.b.= actinic beam.

a) control, b) CuCl_2 c) HgCl_2 , d) ZnCl_2

son *et al.*, 1988), 광계 1의 reducing side(Bohner *et al.*, 1980) 및 ferredoxin (Shioi *et al.*, 1978) 등이다. 최근에는 광계 2의 reducing side에서 이차 quinone 수용체인 Q_B 에 작용한다는 보고도 있다(Mohanty *et al.*, 1989b). 본 실험에서 $50\mu\text{M}$ 의 구리는 광계 2의 활성화에 같은 농도의 수은이 미치는 억제 효과의 절반 수준이었다. 수은은 광계 2에 작용하여 plastoquinone과 cytochrome *f* 사이의 coupling site에서 작용하며(Braden and Wignat, 1973), 광계 2의 oxidizing side인 물 분해 기구의 활성을 저해하고(Samson and Popovic, 1990; Lee *et al.*, unpublished data) 광계 1의 전자 전달을 저해한다(Kojima *et al.*, 1987). 본 실험에서도 수은은 광계 2에 대한 저해 효과가 뚜렷하였으며 $50\mu\text{M}$ 의 농도에서도 광계 1을 상당히 억제하였다 (Table 2). 이는 Kojima *et al.*(1987)과 Sakurai *et al.*(1991)이 $100\mu\text{M}$ 농도의 수은이 Fe-S center에 작용하여 광계 1의 활성을 저해한다고 한 사실과 부합한다. 아연은 처리한 중금속 중 전자 전달계 활성화에 미치는 저해 효과가 가장 낮게 나타났다. 아연은 조류에서 광합성 기구에 작용할 때 광계 2의 oxidizing side에 있는 물분해 기구를 저해한다고 하나 (De Filippis *et al.*, 1981) 고등식물의 분리 엽록체에서는 광계 2의 반응 중심 (Tripathy and Mohanty, 1980), plastoquinone (Baker *et al.*, 1982)과 광계 2의 reducing side에 있는 이차 quinone 수용체(Q_B)라고 (Mohanty *et al.*, 1989a) 제시되고 있다. 본 실험에서 아연은 광계 2와 광계 1을 다 억제하였다.

이와같이 이들 중금속 이온들은 광합성 기구에서 여러 부위에 작용하기 때문에 각 중금속의 특이한 작용성을 비교 연구하기 위하여 엽록소에서 방출되는 형광유도현상을 연구하였다.

분리 엽록체 현탁액을 가한 전자 전달 활성 측정용 반응액에 $50\mu\text{M}$ 의 중금속을 첨가한 후 포화광의 actinic beam ($1,330\mu\text{mol quanta/m}^2\text{s}$)을 가함으로써 엽록소 형광을 유도하고 그 소멸요인을 분석 비교하였다 (Fig. 3, Fig. 4). Fig. 3의 경우, 특히 수은 처리구에서 형광 감소가 완만하게 나타나는 바 대조구와는 현저하게 다른 형광 패턴을 보이고 있으며 구리, 아연의 경우 그 변화의 정도가 덜하였다. 이는 같은 농도에서 광계 2의 전자 전달 활성화에 대한 수은의 저해율이 가장 크게 나타난 사실과 밀접히 관련된다 (Table 2). 주목할 만한 것은 수은 처리구에서 여기광 조사후 peak 이후에 완

만히 감소하던 variable fluorescence가 증가하였다 (Fig. 3c). 이는 energy-dependent quenching (qE)의 감소에 기인하며 그 결과 non-photochemical quenching (qNP)과 remainder quenching(qR)이 같게 나타났다 (Fig. 4).

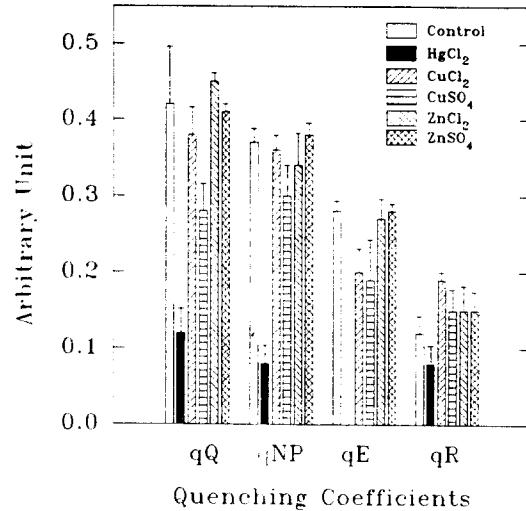


Fig. 4. Fluorescence quenching coefficients derived from chlorophyll fluorescence induction curves of barley chloroplasts in response to the application of $50\mu\text{M}$ heavy metals. Experimental conditions were the same as in Fig. 3. Quenching coefficients were calculated according to Oxborough and Horton(1988).

또한, actinic beam의 조사를 중단하고 포화광 pulse를 비추면서 relaxation되는 형광 패턴을 관찰할 때 (Fig. 3c) 수은 처리구에서는 거의 relaxation이 나타나지 않았다. 이는 actinic beam 조사시 thylakoid 막 내부에 형성되었던 수소 이온의 구배가 소멸됨에 따라(즉, qE, energy-dependent quenching이 소멸됨에 따라) 회복되는 형광이므로 (Briantais *et al.*, 1979), 수은 처리구에서 회복현상이 나타나지 않은 것은 수은이 thylakoid 내의 pH 형성을 억제하였기 때문이라고 해석된다. 이것은 분리 엽록체의 전자 전달계 활성이 억제된 결과와 합치되는 현상이다. 최근 qE가 thylakoid막에서 violaxanthin이 zeaxanthin으로 전환되는 반응에 의해서도 활성화된다고 알려졌다 (Horton *et al.*, 1991). 즉, energy-dependent quenching이 일어나려면 thylakoid

막에서 high-energy state 또는 ΔpH 의 형성과 함께 zeaxanthin이 존재하여야 한다. High-energy state의 thylakoid 막이 conformational change를 일으키면 zeaxanthin은 chlorophyll과 용이하게 결합함으로써 형광 quencher로 작용하는 것 같다 (Demming-Adams *et al.*, 1990). 이러한 관점에서 볼 때 수은 처리가 thylakoid 막에서 violaxanthin이 zeaxanthin으로 순환되는 반응을 억제하기 때문에 qE의 형성이 저해되었을 가능성이 있다. 저자들은 이러한 가능성을 확인하기 위하여 thylakoid막의 zeaxanthin 함량의 분석을 시도하고 있다.

위의 결과를 바탕으로 형광 소멸 요인의 분석을 실시한 결과(Fig. 4) photochemical quenching (qQ)은 수은 처리구에서 61.1% 감소하였으나 구리 ($CuCl_2$)와 아연 ($ZnCl_2$) 처리구에서는 각각 33.3%, 22.2% 감소함으로써 qQ에 대한 저해율이 적은편이었다.

수은 처리시 qE는 완전 억제되었고 따라서 qNP와 qR의 값은 같아졌으나 대조구에 비하면 그 수치는 85.7%나 감소된 값이었다 (Fig. 4). 반면, 동일한 농도의 구리 ($CuCl_2$) 첨가시 qE는 25.8% 감소하였으나 아연 ($ZnCl_2$) 첨가시에는 대조구와 같은 값이었다. 또, qNP는 구리 첨가시 14.3% 감소하였고 아연을 첨가한 경우에는 역시 대조구와 차이가 없었다.

분리 엽록체에 중금속을 처리하여 광계 2의 광합성 효율을 표시하는 양자수율 (quantum yield, Φ_s)을 산출하여 Fig. 5에 나타냈고 광계 2의 열린 반응 중심이 나타내는 양자 수율 Φ_p 를 산출하여 Fig. 6에 나타냈다. Φ_s 는 photon 당 방출 혹은 흡수하는 산소의 양 (전자 전달 활성)으로 표시하였고 Φ_p 는 qQ에 대한 Φ_s 의 비를 나타낸 것이다.

50 μM 의 수은을 첨가한 경우 Φ_s 는 47.2% 감소하였고 같은 농도의 $CuCl_2$, $ZnCl_2$ 을 첨가한 경우 각각 38.9%, 11.1% 감소하였다.

Φ_p 는 같은 농도의 수은을 처리한 경우 35.5% 증가하였고 같은 농도의 $CuCl_2$, $ZnCl_2$ 을 첨가한 경우 각각 8.5% 감소, 14.5% 증가하였다. 수은 첨가시 Φ_p 의 증가는 qQ의 감소가 현저하였기 때문이고 구리 첨가시 Φ_p 가 감소한 것은 qQ의 감소보다 Φ_s 의 감소가 더 컸기 때문으로 해석된다.

4. 결론

본 실험에 사용한 중금속이온들 중에서 수은 이온은

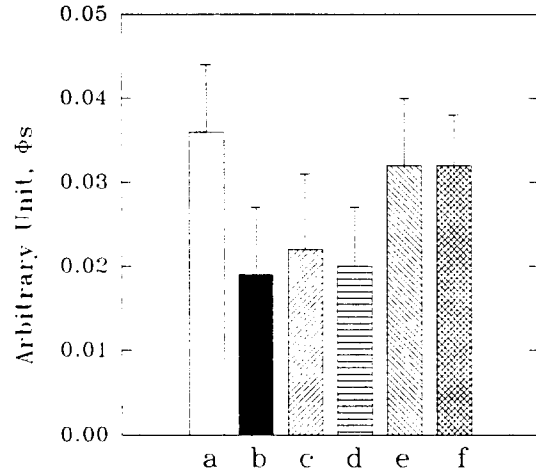


Fig. 5. Changes in the quantum yield of barley chloroplasts in response to the application of 50 μM heavy metals. The light intensity was 1,330 μmol quanta/ m^2/s of PAR. The experimental conditions were the same as in Fig. 4.

a) control, b) $HgCl_2$, c) $CuCl_2$, d) $CuSO_4$, e) $ZnCl_2$, f) $ZnSO_4$

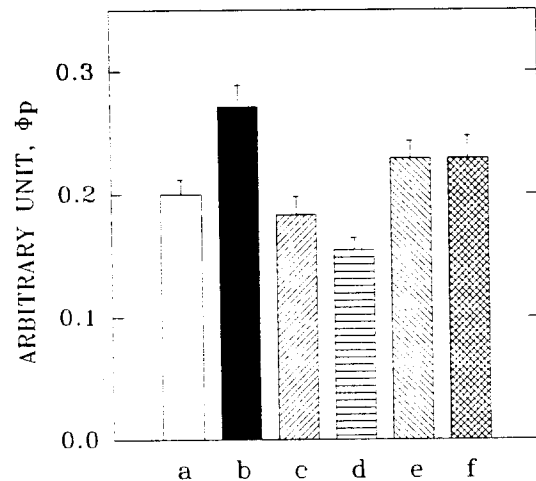


Fig. 6. Changes in the quantum yield of open PS II reaction centers of barley chloroplasts in response to the application of 50 μM heavy metals. a) control, b) $HgCl_2$, c) $CuCl_2$, d) $CuSO_4$, e) $ZnCl_2$, f) $ZnSO_4$

보리 종자의 발아, 유식물의 성장, 및 광합성 색소 합성에 대한 억제 효과가 가장 심하였고, 분리 엽록체 수준에서도 광계 1, 광계 2 및 whole chain의 전자 전달 활성, 광계 2의 양자 수율을 현저히 저해하였다.

특히 수은 이온은 구리 및 아연 이온들에 비하여 형광유도과정 중 variable fluorescence를 현저하게 증가시켰고, qE는 거의 나타나지 않았다. 즉 수은 이온은 광계 2 이후의 전자전달계와 광합성 암반응 과정을 다른 두 중금속에 비하여 크게 억제하며, 수은 이온에 의한 qE는 감소는 thylakoid 막의 수소 이온 구배의 형성을 저해하며, 이는 또한 막 내부의 zeaxanthin 색소의 형성의 억제가 수반됨을 시사한다.

이와같이 수은이온에 의한 특이한 엽록소 형광 유도 양상은 수은 이온 농도의 bioassay 또는 중금속 오염이 예상되는 환경 오염물에서 미량의 수은의 존재를 신속히 탐지할 수 있는 indicator로서 응용될 수 있으리라 보고 본다.

참고문헌

- Arnon, D.I., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24:1-15.
- Baker, N.R., P. Fernyhough, and I.T. Meek, 1982, Light-dependent inhibition of photosynthetic electron transport by zinc. Physiol. Plant. 56:217-222.
- Binder, A. and R. Bachofen, 1979, Oxygen evolution and uptake as a measure of the light-induced electron transport in spinach chloroplasts. In, Membrane Biochemistry: A laboratory manual on transport and bioenergetics. Carafori, E. and G. Semenza. eds., pp. 144-153. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Bohner, H., H. Böhme, and P. Böger, 1980, Reciprocal formation of plastocyanin and cytochrome c-553 and the influence of cupric ions on photosynthetic electron transport. Biochim. Biophys. Acta 592:103-112.
- Bradeen, D.A. and G.D. Wignet, 1973, Site-specific inhibition of photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts by mercuric chloride. Plant Physiol. 55:680-682.
- Briantais, J.M., C. Vernotte, G.H. Krause, and E. Weis, 1979, A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 548:128-138.
- Clijsters, H and F. Van Assche, 1985, Inhibition of photosynthesis by heavy metals. Photosynth. Res. 7:31-40.
- Cottenie, A., A. Dhaese and R. Camerlynck, 1976, Plant quality response to uptake of polluting elements. Qual. Plant Pl. Fds. Hum. Nutr. XXVI:293-319.
- Daniels, R.R., B.E. Stuckmeyer, and L.A. Peterson, 1972, Copper toxicity in *Phaseolus vulgaris* L. as influenced by iron nutrition. I. An anatomical study. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 9:249-254.
- Davies, A. G. and J. A. Sleep, 1979, Photosynthesis in some British coastal waters may be inhibited by zinc pollution. Nature 277: 292-293.
- De Filippis, L.F., R. Hampp and H. Ziegler, 1981, The effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on Euglena. II. Respiration, photosynthesis and photochemical activities. Arch. Microbiol. 128:407-411.
- Demming-Adams, B., W.W. Adams III, U. Heber, S. Neimanis, K. Winter, A. Krüger, F.-C. Czygan, W. Bilger, and O. Björkman, 1990, Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. Plant Physiol. 92: 293-301.
- Goldfeld, M.G. and R.I. Khalilov, 1979, Localization of copper in the photosynthetic apparatus of chloroplasts. Biofizika 24:762-764.
- Horton, P. and A. Hague, 1988, Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley chloroplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching. Biochim. Biophys. Acta 932:107-115.
- Horton, P., A.V. Ruban, D. Rees, A.A. Pascal, G. Noctor, and A.J. Young, 1991, Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHC II chlorophyll-protein complex.

- FEBS Lett. 292:1-4.
- Hsu, B.-D. and J.-Y. Lee, 1988, Toxic effects of copper on photosystem II of spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 87:116-119.
- Katoh, S., I. Shiratori, and A. Takamura, 1962, Purification and some properties of spinach plastocyanin. *J. Biochem.* 51:32-40.
- Kessler, E., 1986, Limits of growth of five *Chlorella* species in the presence of toxic heavy metals. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 73:123-128.
- Kojima, Y., T. Hiyama, and H. Sakurai, 1987, Effect of mercurials on iron sulphur centres of PSI of *Anacystis nidulans*. In, *Progress in Photosynthesis Research* (ed. J. Biggins), Nijhoff/Junk, The Hague, pp.57-60.
- Lee, C. B., Y. N. Hong, Y. D. Cho, S. H. Lee, and Y. M. Kwon, 1983, Development of electron transport and photophosphorylation in greening barley seedlings. *Korean Biochem. J.* 16(1): 61-71.
- Lee, C.-H, 1990, Application of chlorophyll fluorescence in photosynthetic research. *Saengwhahak nyusu*, 10:199-205.
- Liaajen-Jensen, S. and A. Jensen, 1971, Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. In, *Methods in Enzymol.* Vol. 23, (ed. A. San Pietro), pp.586-602. Academic Press, New York.
- Lichtenthaler, H. K., 1988, *Applications of Chlorophyll Fluorescence*, Kluwer Acad. Pub., Dordrecht, 366pp.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. F. Farr, and R. J. Randall, 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Mohanty, N., I. Vass, and S. Demeter, 1989a, Impairment of photosystem 2 activity at the level of secondary quinone electron acceptor in chloroplasts treated with cobalt, nickel and zinc ions. *Physiol. Plant.* 76:386-390.
- Mohanty, N., I. Vass, and S. Demeter, 1989b, Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor, Q_B . *Plant Physiol.* 90:175-179.
- Oxborough, K. and P. Horton, 1988, A study of the regulation and function of energy-dependent quenching in pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 934:135-143.
- Poole, R.K. and G.M. Gadd, 1989, *Metal Microbe Interactions*. IRL Press, p.133.
- Rai, L.C., A.K. Singh, and N. Mallick, 1991, Studies on photosynthesis, the associated electron transport system and some physiological variables of *Chlorella vulgaris* under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* 137:419-424.
- Renganathan, M. and S. Bose, 1990, Inhibition of photosystem II activity by Cu^{++} ion. Choice of buffer and reagent is critical. *Photosynth. Res.* 23:95-99.
- Sakurai, H., K. Inoue, T. Fujii, and P. Mathis, 1991, Effects of selective destruction of iron-sulfur center B on electron transfer and charge recombination in photosystem I. *Photosynth. Res.* 27:65-71.
- Samson, G., J.-C. Morissette, and R. Popovic, 1988, Copper quenching of the variable fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. New evidence for a copper inhibition effect on PS II photochemistry. *Photochem. Photobiol.* 48:329-332.
- Samson, G. and R. Popovic, 1990, Inhibitory effects of mercury on photosystem II photochemistry in *Dunaliella tertiolecta* under *in vivo* conditions. *J. Photochem. Photobiol.(B)* 5:303-310.
- Samuelsson, G. and G. Oquist, 1980, Effects of copper chloride on photosynthetic electron transport and chlorophyll-protein complexes of *Spinacia oleracea*. *Plant Cell Physiol.* 21:445-454.
- Shioi, Y., H. Tamai, and T. Sasa, 1978, Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 19:203-209.
- Singh, D.P. and S.P. Singh, 1987, Action of heavy metals on Hill activity and O_2 evolution in *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol.* 83:12-14.
- Stokes, P.M., 1983, Response of fresh water algae to metals. In, *Progress in Phycological Research*(eds. Round, F.E. and V.J. Chapman), Vol. 2, pp. 87-111.
- Tripathy, B.C. and P. Mohanty, 1980, Zinc-inhibited electron transport of photosynthesis in isolated bar-

- ley chloroplasts. *Plant Physiol.* 66:1174-1178.
- Van Assche, F. and H. Clijsters, 1983a, Multiple effects of heavy metal toxicity on photosynthesis. In, *Effects of Stress on Photosynthesis*, (ed. R. Marcelle, H. Clijsters and M. van Poucke), Martinus Nijhoff/Junk, the Hague. pp. 371- 382.
- Van Assche, F. and H. Clijsters, 1983b, Zinc mediated effects on leaf CO₂ diffusion conductances and net photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* L. *Photosynth. Res.* 1:171-180.
- Walker, J.B., 1953, Inorganic micronutrient requirements of *Chlorella* I. Requirements for calcium, copper and molybdenum. *Arch. Biochem. Biophys.* 46: 1-11.