

## 생분해되는 다양한 킬레이트들이 납에 노출된 식물의 성장에 미치는 영향

이상만\*

경북대학교 응용생명과학부  
(2010년 3월 9일 접수, 2010년 3월 19일 수리)

### Effect of Various Biodegradable Chelating Agents on Growth of Plants under Lead stress

Sangman Lee (School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea)

Phytoextraction is a method of phytoremediation using plants to remediate metal-contaminated soils. Recently, various chelating agents were used in this method to increase the bioavailability of metals in soils. Even though phytoextraction is an economic and environment-friendly method, this cannot be applied in highly metal-contaminated areas because plants will not normally grow in such conditions. This research focuses on identifying chelating agents which are biodegradable and applicable to highly metal-contaminated areas. Lead (Pb) as a target metal and cysteine (Cys), histidine (His), citrate, malate, oxalate, succinate, and ethylenediamine (EDA) as biodegradable chelating agents were selected. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was used as a comparative standard. Plants were grown on agar media containing various chelating agents with Pb to analyze the effect on root growth. Cys strongly increased the inhibitory effect of Pb on root growth of plants, while, His did not affect on it significantly. The inhibitory effect of oxalate is weak, and malate, citrate, and succinate did not show significant effects. Both EDTA and EDA diminished the inhibitory effect of Pb on root growth. The effect of EDA is correlated with decreased Pb uptake into the plants. In conclusion, as biodegradable chelating agents, EDA is a good candidate for highly Pb-contaminated area.

**Key Words:** Chelate, Heavy metal, Lead, Phytoextraction, Phytoremediation

### 서론

급격한 산업화와 현대적인 농업 기술의 발달로 인해서 환경오염의 문제가 심각하게 대두되었다. 이는 생태계를 파괴하고 생물의 안전을 위협하는 요소이기 때문에 오염된 환경을 정화하여야 한다. 기존에 알려진 물리적 화학적 방법의 환경정화는 빠르고 간편하다는 장점이 있는데 비해 비용이 비싸기 때문에 모든 오염지역을 정화하기란 현실적으로 어렵고 또한 토양을 황폐화시키는 단점이 존재한다 (Raskin and Ensley, 2000).

식물과 미생물을 이용한 생물학적 환경정화는 비용이 저렴해서 경제적이며, 폐기되는 슬러지 양을 최소화 시킬 수 있고 아주 적은 오염물질의 농도에서도 효과적으로 사용이 가

능하며 오염지역을 파괴하지 않는 친환경적 방법으로서 방사능물질, 중금속 및 유기오염물질을 정화하는데 관심을 갖게 되었다. 식물환경정화(phytoremediation)는 식물을 이용하여 오염된 토양과 수질을 정화하는 기술로서, 저렴한 비용과 친환경적이기 때문에 미래의 유망한 환경복원 기술이다 (Rausser, 1990; Cobbett, 2000). 식물환경정화는 phytoextraction, phytostabilization, phytovolatilization, rhizofiltration 등의 세부적인 방법으로 분류된다. Phytoextraction은 토양에 존재하는 금속이 식물의 뿌리를 통해서 식물 내로 들어와 식물의 잎이나 줄기에 축적이 되면 이를 수거해서 따로 처리하는 방법이다.

식물환경정화는 실제로 현장에 적용하여 효과적인 실효를 거둔 사례가 존재한다. 예를 들어 해바라기를 이용하여 수질에 존재하는 방사능 물질인 우라늄을 제거하는 rhizofiltration은 24시간 내에 95%를 제거하여 규정농도 이하로 줄였다 (Dushenkov and Kapulnik, 2000). 유채(Brassica juncea)를 사용하여 킬레이터와 동시에 수행된 phytoextraction은

\*연락처:

Tel: +82-53-950-7345 Fax: +82-53-950-7233  
E-mail: sangman@knu.ac.kr

토양에 존재하는 납(Pb)의 농도를 2055 mg/kg에서 960 mg/kg으로 줄이는데 성공하였다 (Blaylock, 2000). 인공습지에서는 수질에 존재하는 금속의 90% 이상을 제거하는 효과를 보였다(Horne, 2000). 미국의 경우, 복원을 필요로 하는 중금속 오염된 지역이 5만 곳 이상이며phytoremediation의 시장은 2000년도 \$20 million에서 2005년도에는 \$150 million으로 추정하고 있다 (Glass, 1999).

납은 토양오염의 대표적인 중금속으로서 일반적으로 사용되는 농경지에서의 농도는 50 mg/kg이하이며 여기서 재배된 농작물의 축적 농도는 대개 10 mg/kg이하 이지만 토양에 존재하는 납의 양의 농도가 300-500 mg/kg을 초과하는 경우에는 정화가 필요로 하는 것이다. 납은 토양에서 PbS, PbSO<sub>4</sub>, Pb<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, PbCO<sub>3</sub>, PbSiO<sub>3</sub> 등 여러 형태로 존재하지만 식물에 잘 흡수되는 특정한 형태가 존재하고 EDTA 같은 킬레이트를 처리하면 비록 자세한 기전을 알려져 있지 않으나 납은 킬레이트와 complex를 형성한 상태로 식물 내로 흡수된다고 보고 있다(Wu et al., 1999). EDTA는 phytoextraction에서 다양한 중금속 추출에 자주 사용되는 chelate로서의 장점이 있는데 비해서 환경에서 자연적인 분해가 잘 일어나지 않아 새로운 환경오염문제를 야기한다. 따라서 최근에는 자연적인 생분해가 잘 일어나는 친환경적인 킬레이트에 대한 연구가 활발히 일어나고 있으며 그 대표적인 것으로 식물의 뿌리에서 토양으로 분비되는 분자량이 적은 유기산 (LMWOA, low molecular weight organic acid)과 EDDS(ethylenediamine disuccinic acid) 이다 (Tandy et al., 2006).

현재까지의 phytoextraction에 관한 연구는 토양에 존재하는 금속을 식물 내로 흡수가 용이하도록 하는 것에 주력을 해 왔다. 하지만 생물학적정화의 단점은 오염물질의 농도가 너무 높으면 생물이 정화는 물론 성장도 불가능하다는 것이다. 따라서 본 연구는 고농도의 중금속이 오염된 지역에서도 생물학적정화가 가능하게 하는 것을 목적으로 대표적인 중금속 오염물질로 납을 선택하였으며 고농도의 납이 존재하는 조건에서도 식물이 성장이 가능하며 생분해가 잘 되는 친환경적인 킬레이트 선별에 연구 초점을 두었다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 성장조건

애기장대(*Arabidopsis thaliana* cv. Columbia)의 야생형(wild-type) 씨를 반 농도의 Murashige & Skoog 염, 2% (w/v) sucrose (pH 5.8)를 포함하는 100 × 100 × 15 mm square plates의 고체 배지에서 7일간 배양하였으며 배양 조건은 23°C에서 18시간 빛을 쬐었다. 배지에는 다양한 농도의 납 (PbCl<sub>2</sub>)과 여러 킬레이트 (Cys, His, malic acid, citric acid, succinic acid, oxalic acid, EDTA, EDA)를 조합하여 처리 하였으며 배양을 마친 후 식물의 뿌리 길이를 자를 이용하여 측정하였다.

### 납 농도 분석

배양을 마친 식물을 초순수로 5번 세척하였고 이를 70°C에서 식물 무게의 변화가 없을 때까지 오븐에서 건조시켰다. 건조된 샘플을 가루로 만든 후 HNO<sub>3</sub> (65%) 와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)를 포함하는 용액을 넣고 120°C에서 8 시간 배양하여 샘플을 분해시켰다. 분해를 마친 샘플은 140°C에서 건조를 시킨 후 희석된 질산용액으로 다시 용해시켰다. 납의 양 측정 은 inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES; Thermo Jarrell Ash, Franklin, MA)을 이용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

금속이온은 황, 질소, 그리고 산소 원자에 반응성이 크다. 따라서 아미노산 중에서 시스테인 (Cys)과 히스티딘 (His)은 중금속이온과 결합하는 경향이 강하다. 시스테인은 생물의 중금속 해독작용에서 중요한 역할을 하는 단백질 (예, metallothioneins) 또는 폴리펩타이드 (예, phytochelatin)의 주된 구성 성분으로서 카드뮴, 구리, 아연 등과 chelation 하는 데 관여를 하고 있다 (Stillman et al., 1992). 반면에 히스티딘은 니켈과 chelation에 관여하여 해독 작용에서 중요한 역할을 한다 (Kerkeb and Krämer, 2003). 따라서 이 두 아미노산이 식물이 납을 흡수하는데 있어 어떻게 영향을 미치는 지를 알아보았다 (Fig. 1). 히스티딘과 시스테인의 처리 농도를 200 μM로 설정하였는데 이는 이 농도에서 식물의 성장이 거의 영향을 받지 않기 때문이며 이러한 농도 이상으로 처리하면 식물의 성장은 점차적으로 억제된다. 식물의 성장이 납의 존재 하에서 억제되는데 200 μM 히스티딘 처리는

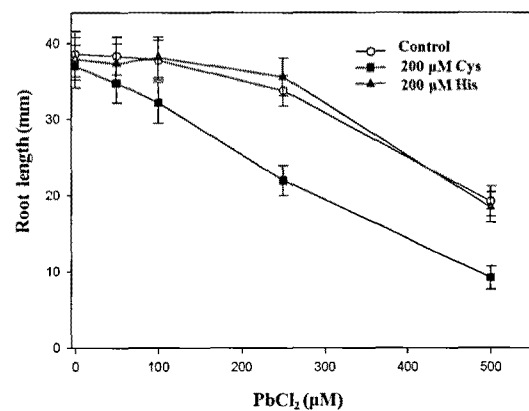


Fig. 1. Effects of cysteine and histidine on growth of *Arabidopsis* roots under lead stress. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing various concentrations of PbCl<sub>2</sub> (control, open circle) with either 200 μM cysteine (closed square) or 200 μM histidine (closed triangle). Afterward, root lengths were measured. Values are means ± SE of 30 seedlings.

이에 별다른 영향을 주지 않았지만 200  $\mu\text{M}$  시스테인을 처리한 경우에는 식물의 성장이 납만 처리한 대조구에 비해서 현저하게 억제 되었다. 이러한 결과는 시스테인에 의해서 식물 안으로 납 흡수가 많이 되어 식물의 성장이 더 억제되었다고 추정할 수 있다.

Citrate, malate, oxalate, 그리고 succinate 같은 저분자 형태의 유기산은 금속 스트레스에 대한 저항성에 관여 하는데 이는 이들이 여러 금속과 chelation을 하기 때문이다 (Mench et al., 1988). 예를 들어서 citrate는 카드뮴, 니켈, 아연에 대한 저항성에 관여를 하고 있으며, malate는 아연에 대해서 저항성을 갖고 있다. 따라서 저분자의 유기산이 납이 식물 내로 흡수되는 과정에서 어떠한 영향을 주는지 알아보았다 (Fig. 2). Malate는 처리 농도가 200  $\mu\text{M}$  되어도 식물의 성장에는 별다른 영향을 주지 않았으며 또한 100  $\mu\text{M}$  납도 본 연구의 조건에서는 식물의 성장에 미치는 영향이 미미한 것으로 나타났다 (Fig. 2 (a)). 이러한 조건에서 납 스트레스를 받고 있는 식물의 성장에 추가적인 200  $\mu\text{M}$  malate를 처리해도 별다른 영향을 나타내지 않았다. Oxalate도 처리

농도가 200  $\mu\text{M}$  되어도 식물의 성장에 별다른 영향을 주지 않았지만 100  $\mu\text{M}$  납이 식물에 미치는 영향을 크게 하여 결국 식물의 성장이 억제되는 결과를 보였다 (Fig. 2B). Citrate는 처리 농도가 200  $\mu\text{M}$  일 때 약간의 식물성장 억제를 보이지만 큰 영향은 없는 것으로 간주되며 또한 100  $\mu\text{M}$  납이 미치는 식물의 성장에도 별다른 영향이 없는 것으로 보인다 (Fig. 2C). Succinate는 처리 농도가 200  $\mu\text{M}$ 에서 식물의 성장 억제를 약하게 보였지만 100  $\mu\text{M}$  납이 식물 성장에 미치는 영향에는 별다른 효과를 보이지 않았다 (Fig. 2D). 이러한 결과들은 oxalate는 납이 식물 내로 흡수되는 것을 촉진시켜 100  $\mu\text{M}$  납 조건에서 식물의 성장을 억제하는데 비해 malate, citrate, 그리고 succinate는 납의 흡수에 미치는 영향은 미미한 것으로 보인다.

EDTA는 polyamino carboxylic acid로서 구조식은  $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$  이며  $\text{Ca}^{2+}$ 과  $\text{Fe}^{3+}$ 의 킬레이트로 잘 알려져 있다. EDA (ethylenediamine)의 구조식은  $\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$ 로 화학공장에서 여러 화학물질 생산에 사용되고 있으며  $[\text{Co}(\text{EDA})_3]^{3+}$ 형태로 전형적인 킬레이트 리간드로 작용한다. 비

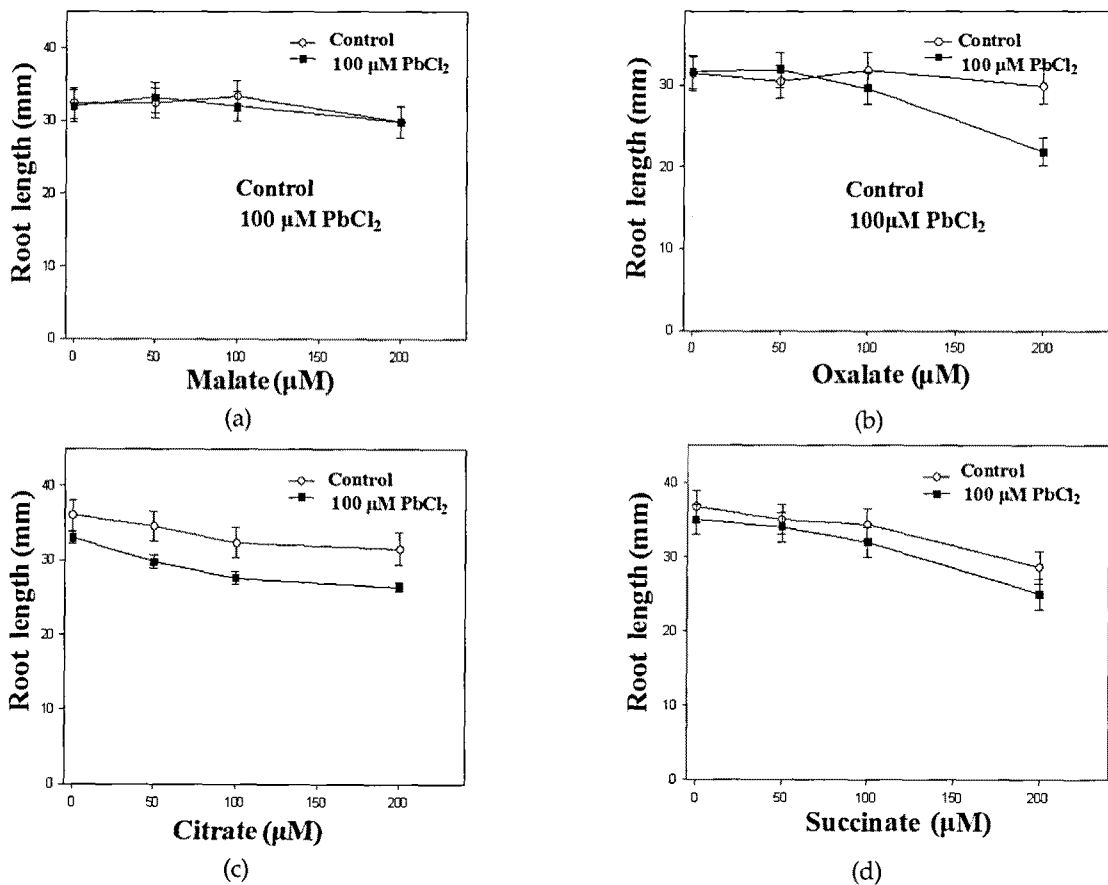


Fig. 2. Effects of citrate, malate, oxalate, and succinate on growth of *Arabidopsis* roots under lead stress. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing various combinations of both  $\text{PbCl}_2$  and chelating agents, A, malate; B, oxalate; C, citrate and D, succinate. Afterward, root lengths were measured. Values are means  $\pm$  SE of 30 seedlings.

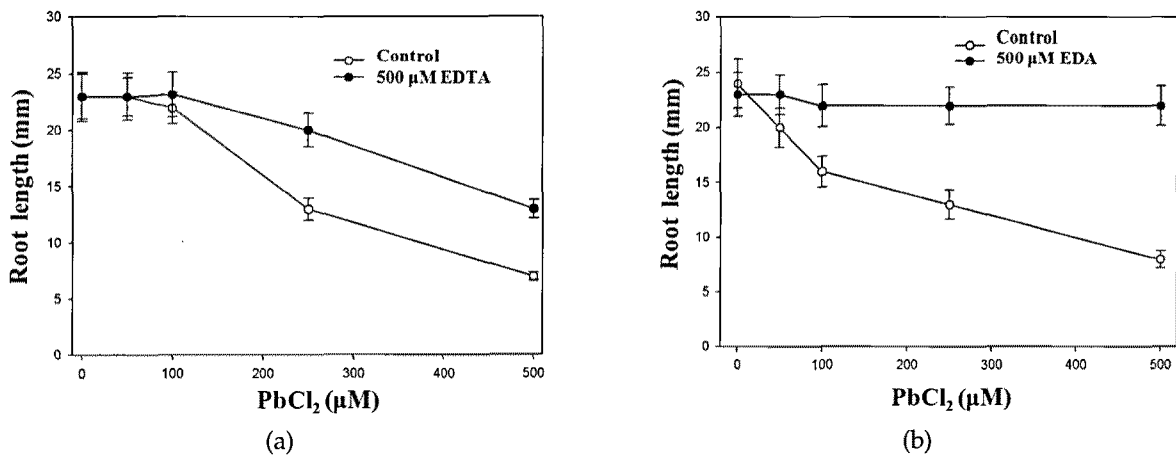


Fig. 3. Effects of EDTA and EDA on growth of *Arabidopsis* roots under lead stress. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing various concentrations of PbCl<sub>2</sub> with either 500 μM EDTA (A) or 500 μM EDA (B). Afterward, root lengths were measured. Values are means ± SE of 30 seedlings.

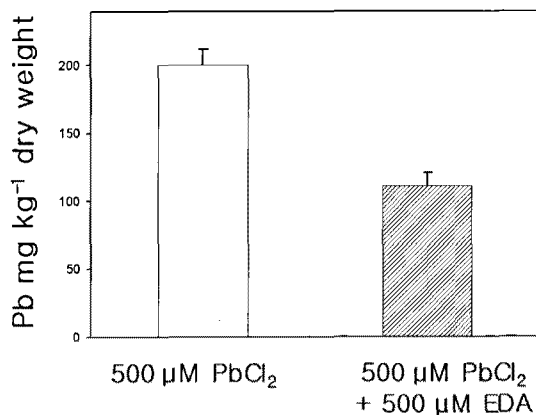


Fig. 4. Effects of EDA on lead concentrations in *Arabidopsis* seedlings. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing 500 μM PbCl<sub>2</sub> with 500 μM EDA. Afterward, lead concentrations were measured by ICP-AES. Values are means ± SE of 3 replicates.

록 EDTA는 생분해가 잘 되지 않는 물질이지만 다양한 금속에 강력한 킬레이트로 작용하는 것으로 잘 알려져 있어서 비교 대상으로 본 연구에 포함시켰다. EDTA는 처리 농도가 500 μM 되어도 식물의 성장에는 별다른 영향을 보이지 않았지만 고농도의 납의 처리에 의해서 식물의 성장이 억제되는 영향을 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 3 (a)). 이는 EDTA가 식물의 납 흡수를 억제한다고 추정할 수 있다. EDA도 처리 농도가 500 μM 에서 식물의 성장에 별다른 영향을 보이지 않았지만 EDTA 처리 경우와 유사하게 납에 의한 식물의 성장억제가 현저하게 줄어든 것으로 나타났다 (Fig. 3B). 납에 의한 식물의 성장 억제가 EDA에 의해서 감소되지만 이 효과는 EDTA에서 보여준 것보다 더 강력하게 나타났다. 이는 EDA가 식물에서 납 흡수를 억제하는 효과가 EDTA보다

더 강력하다는 것을 암시한다. EDA의 영향이 실제로 식물 내로 납이 흡수되는 것을 억제하였기 때문인지를 확인하기 위해서 식물 내 축적되는 납의 농도를 분석하였다 (Fig. 4). 실험 결과는 EDA가 식물 내로 흡수되는 납의 양을 현저하게 억제한 것으로 나타났다.

본 연구 결과는 고농도의 납으로 오염된 토양을 식물을 이용하여 정화할 때 식물이 오염된 지역에서 성장이 가능하고 정화도 가능하게 해주는 친환경적인 킬레이트로서 EDA가 강력한 후보임을 제시를 하며 실제로 현장에서 적용이 가능한지는 앞으로 더 연구가 수행되어야 할 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호: 200703010 33009)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사 드립니다.

## 참고문헌

- Blaylock, M.J., 2000. Field demonstration of phytoremediation of lead contaminated soils, pp. 1-12. In N. Terry, G. Banuelos (ed.) *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis Publ., Boca Raton, FL.
- Cobbett, C.S., 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification, *Cur. Opin. Plant Biol.* 3, 211-216.
- Dushenkov, S., Kapulnik, Y., 2000. Phytoremediation of metals, In: *Phytoremediation of Toxic Metals*. Raskin, I., Ensey, B.D., eds. John Wiley, New York.
- Glass, D.J., 1999. U.S. and international markets for phytoremediation, 1999-2000. Glass Associates, Needham, MA

- Horne, A.J., 2000. Phytoremediation by constructed wetlands, In: *Phytoremediation of contaminated soils and water*, pp. 13-40. Terry, N., Banuelos, G, Eds., Lewis, Boca Raton, Florida.
- Kerkeb, L., Krämer, U., 2003. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Asylum lesbiacum* and *Brassica juncea*, *Plant Physiol.* 131, 716-724.
- Mench, M., Morel, J.L., Guckert, A., Gruillet, B., 1988. Metal binding with root exudates of low molecular weight, *J. Soil Sci.* 39, 521-527.
- Raskin, I., Ensley, B.D., 2000. Phytoremediation of Toxic Metals: Using *Plants to Clean up the Environment*, John Wiley, New York.
- Rausser, W.E., 1990. Phytochelatins, *Annu. Rev. Biochem.* 59, 61-86.
- Stillman, M.J., Shaw, C.F., Suzuki, K.T., 1992. metallothioneins, synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatins and metal-thiolate complexes, VCH, New York
- Tandy, S., Schulin, R., Nowack, B., 2006. The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers, *Chemosphere* 62, 1454-1463.
- Wu, J., Hsu, F.C., Cunningham, S.D., 1999. Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake, and translocation constraints, *Environ. Sci. Technol.* 33, 1898-1904.
-