

ORIGINAL ARTICLE

## 담수산 클로렐라(*Chlorella vulgaris*)의 수은 스트레스에 대한 엽록소형광 반응

오순자 · 고석찬<sup>1)\*</sup>

농촌진흥청 국립원예특작과학원 온난화대응농업연구센터, <sup>1)</sup>제주대학교 생물학과

### Chlorophyll a Fluorescence Response to Mercury Stress in the Freshwater Microalga *Chlorella Vulgaris*

Soonja Oh, Seok Chan Koh<sup>1)\*</sup>

Agricultural Research Center for Climate Change, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

<sup>1)</sup>Department of Biology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

#### Abstract

The response of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* to mercuric ion ( $Hg^{2+}$ ) stress was examined using chlorophyll a fluorescence image analysis and O-J-I-P analysis as a way to monitor the toxic effects of mercury on water ecosystems. The levels of photosynthetic pigments, such as chlorophyll a and b and carotenoids, decreased with increasing  $Hg^{2+}$  concentration. The maximum photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm) changed remarkably with increasing  $Hg^{2+}$  concentration and treatment time. In particular, above 200  $\mu M Hg^{2+}$ , considerable mercury toxicity was seen within 2 h. The chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P was also remarkably affected by  $Hg^{2+}$ ; the fluorescence emission decreased considerably in steps J, I, and P with an increase in  $Hg^{2+}$  concentration when treated for 4 h. Subsequently, the JIP-test parameters (Fm, Fv/Fo, RC/CS, TRo/CS, ETo/CS,  $\Phi_{PO}$ ,  $\Psi_o$  and  $\Phi_{Eo}$ ) decreased with increasing  $Hg^{2+}$  concentration, while N, Sm, ABS/RC, DIo/RC and DIo/CS increased. Therefore, a useful biomarker for investigating mercury stress in water ecosystems, and the parameters Fm,  $\Phi_{PO}$ ,  $\Psi_o$ , and RC/CS can be used to monitor the environmental stress in water ecosystems quantitatively.

**Key words** : *Chlorella vulgaris*, Chlorophyll a fluorescence image, Fv/Fm, Mercury stress, O-J-I-P transients

#### 1. 서론

인구증가와 산업화, 그리고 도시화로 각종 오염물질이 증가하고 이로 인한 환경오염이 심각한 사회문제가 되고 있다. 특히, 물이나 토양 등에 포함된 중금속은 식물의 생육장해를 야기할 뿐만 아니라 먹이연쇄를 통해 생태계의 다양한 영양단계로 전이되어 인

간의 건강에도 심각한 영향을 미친다(Nriagu와 Panyna, 1988).

중금속 중 일부는 필수 미량원소로 식물에서 효소의 보조인자로 사용되기도 하지만, 세포 내에 일정 농도 이상으로 존재하게 되면 식물의 물질대사를 저해한다(Jarvis 등, 1976). 수은(Hg), 카드뮴(Cd), 납(Pb), 구리(Cu)와 같은 중금속들은 이온의 형태로 뿌리를

Received 15 November, 2012; Revised 24 January, 2013;

Accepted 25 February, 2013

\*Corresponding author : Seok Chan Koh, Department of Biology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea  
Phone: +82-64-754-3528  
E-mail: sckoh@jejunu.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.  
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

통하여 흡수되고 줄기나 잎으로 전이된다. 중금속에 대한 초본성 식물의 반응은 대부분 이온의 흡수저해, 엽록소 함량의 감소 및 측근과 뿌리의 생육저해 등으로 나타난다(Kahle, 1993; Kelly 등, 1979). 특히, 수은은 강력한 독성을 나타내는 중금속으로 다른 필수 금속이온들을 비가역적으로 치환한다(Prasad, 1995). 식물체 내에 흡수된 수은은 주로 액포 내에 고농도로 축적된 후에 체내에서 생리적인 대사체계의 혼란이나 형태적 변형을 야기하는 것으로 알려져 있다(Vögeli-Lange와 Wagner, 1990). 즉, 세포막 인지질의 산화적 인산화에 영향을 주며, 세포호흡의 손상, 효소활성의 억제와 단백질 변성의 원인이 될 뿐만 아니라, 양분 수송과정을 방해하며 식물 잎의 백화현상, 잎과 뿌리의 세포과괴 등을 야기하여, 식물의 생장에 영향을 준다(Aidid와 Okamoto, 1992; Clijsters와 Van Assche, 1985).

엽록소 a는 엽록체 틸라코이드 막에 존재하는 광계의 반응중심에 위치하고 있으며, 엽록소 b는 광수확 복합체(Light harvesting complex: LHC)에 주로 존재하는 광합성 색소이다(Leong과 Anderson, 1984). 중금속은  $\delta$ -aminolevulinic acid 탈수소효소와 protochlorophyllide 환원효소를 억제하여 엽록소의 생합성을 저해하는 것으로 보고되고 있다(Ouzounidou, 1995). 따라서 식물 잎의 백화현상과 같은 수은에 의한 독성이 엽록소 수준의 현저한 감소와 연관되어 있음을 짐작하게 한다. 또한 carotenoid는 안테나 색소-단백질 복합체로 존재하는 보조 색소로 엽록소의 광저해나 활성산소로부터 산화되는 것을 막는 기능을 한다(Rojkind, 2002). 몇몇 중금속 이온( $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  등)들은 엽록소 분자의 마그네슘 이온( $Mg^{2+}$ )과 치환되며, 이러한 과정에 의해 형광 양자수율의 저하와 형광 스펙트럼의 변화를 초래하게 된다(Küpper 등, 1996).

한편, 환경 스트레스에 대한 식물의 반응을 정확하게 간편하게 측정할 수 있는 방법으로는 엽록소형광 분석, 잎의 반사율 이미지 분석, 그리고 열이미지 분석 등이 있다. 이들 분석 방법을 통해 환경 스트레스에 의한 식물의 광합성 효율, 구조적인 변화, 수분 상태를 분석할 수 있어, 스트레스에 대한 식물의 생리적 상태를 조기에 진단할 수 있다(Lichtenthaler와 Mieh, 1997; Nilsson, 1995; Peuelas와 Filella, 1998). 특히,

엽록소형광을 이용한 분석은 광합성 기구 중에서도 광계II(Photosystem II; PS II)의 반응을 조사하기 위한 비파괴적이고, 객관적으로 신뢰할 수 있는 측정 방법 중에 하나이며, 광합성 기구에 대한 중요한 정보를 제공한다(Strasser와 Strasser, 1995). 그리고 O-J-I-P 분석은 환경 스트레스 하에서 광계II에서의 에너지 흐름의 변화와 전자수용체의 환원 반응에 대한 정보를 정량적으로 제시해준다. 한편, 수서생태계에서 중금속 스트레스를 모니터링하기 위해 *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Euglena* 등의 미세조류를 이용한 연구들이 수행되고 있다. 특히, *Chlorella*는 고등식물과 유사한 대사과정을 가지고 있고, 생장이 빠르며 비교적 균일한 생육과 반응을 나타낼 뿐만 아니라 세포배양 환경을 조절하기가 쉽기 때문에 수중 생태계의 환경오염을 평가하는데 적당하다(Ma 등, 2002; Plekhanov와 Chemeris, 2003). 따라서 본 연구에서는 담수산 녹조류인 *Chlorella vulgaris*를 대상으로 형광이미지와 O-J-I-P 분석을 통해 수서생태계에 미치는 수은의 영향을 평가하고 엽록소형광 변수들의 환경지표로서의 활용 가능성을 살펴보고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료 및 배양

본 실험에 사용한 담수산 녹조류인 *Chlorella vulgaris* (strain KMCC FC-012)는 부경대학교에 소재하는 한국해양미세조류은행(KMCC)에서 분양받았으며, 최적 배지로 알려진 JM(Jaworski's culture medium) 액체배지에서 배양하여 사용하였다(Thompson 등, 1988). 조제된 배지는 Millipore membrane filter (0.45  $\mu$ m)로 여과한 후 일정량씩 배양용기에 분주하여 121  $^{\circ}$ C, 15 psi 조건에서 15분간 멸균시켰다. 배양은 25 $\pm$ 1  $^{\circ}$ C의 온도조건과 약 30  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/sec (16 h)의 광조건 하에서 100 rpm으로 진탕배양하였으며 2주 간격으로 계대 배양하였다. JM 배지의 조성은 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (4 mg/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2.48 mg/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (10.0 mg/L), NaHCO<sub>3</sub> (3.18 mg/L), EDTA·FeNa (0.45 mg/L), EDTA·Na<sub>2</sub> (0.45 mg/L), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0.496 mg/L), MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0.278 mg/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (0.20 mg/L), cyanocobalamin (0.008 mg/L), thiamine HCl (0.008

mg/L), biotin (0.008 mg/L), NaNO<sub>3</sub> (16.0 mg/L), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (7.2 mg/L) 등으로 이루어졌다. 수은의 효과를 알아보기 위하여 배지에 염화수은(HgCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich Co., Ltd.)의 농도를 0, 50, 100, 200, 400 μM로 다양하게 처리하여 배양하였다.

2.2. 엽록소 형광이미지 분석

수은의 농도와 배양 시간에 따른 *Chlorella*의 반응을 신속하게 스크리닝하기 위해서 엽록소 형광이미지를 분석하였다. 형광이미지 분석은 Nedbal 등(2000)의 방법에 따라 Imaging Fluorometer (FluorCam 700MF, Photon System Instruments, Czech)를 이용하여 수행하였다. 즉, 수은의 농도(0, 50, 100, 200, 400 μM)를 달리하여 24시간 동안 배양하면서 배양 시간에 따라 일정량의 시료를 취하여 15분간 광을 차단하여 암적응시킨 후 1,500 μmole/m<sup>2</sup>/sec의 saturation light와 100 μmole/m<sup>2</sup>/sec의 actinic light를 조사하고 quenching analysis에 의해 유도하였다. 형광이미지는 saturation light를 켜진 후 1,000 ms와 3,960 ms에서 방출되는 형광을 CCD 카메라로 포획하여 각각 Fo와 Fm의 형광이미지로 나타내었으며, 이로부터 Fv/Fm의 형광이미지를 산출하여 제시하였다.

2.3. 엽록소 및 carotenoid 함량의 분석

수은의 농도를 달리하여 배양하였을 때 시료가 녹

색 상태를 유지하여 육안으로는 차이가 없으면서 형광이미지에서 검출이 가능한 시간대인 4시간 동안 배양하여 엽록소 및 carotenoid 함량을 분석하였다. 각각의 시료는 1 mL씩 취하여 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 모아진 세포에 80% 아세톤을 첨가하여 4°C의 암 조건에서 하루 밤 동안 둔 후, 상층액을 취하여 663 nm, 645 nm 및 470 nm에서 흡광도를 측정하고 엽록소 a와 b, carotenoid의 함량을 산출하였다(Aron, 1949; Lichtenthaler와 Wellburn, 1983).

2.4. 엽록소형광 O-J-I-P 곡선의 분석

엽록소형광 O-J-I-P 곡선은 Plant Efficiency Analyzer (PEA; Hansatech Instrument Ltd., UK)를 이용하여 Strasser와 Strasser(1995)의 방법에 따라 측정하였으며, 3회 반복하였다. 즉, 수은의 농도를 달리하여 배양 중인 시료를 시간별로 일정량씩 취하여 15분간 광을 차단하여 암적응시킨 후 1,500 μmole/m<sup>2</sup>/sec의 광량을 5초간 조사하여 Fo, Fm, Fv/Fm 등의 기본 형광변수와 O-J-I-P 곡선을 유도하였다. Time scale은 10 μs에서 1 s의 범위로 설정하고, 10 μs에서 2 ms까지는 1 μs 단위로, 2 ms에서 1 s까지는 1 ms 단위로 인식하도록 설정하고, 50 μs (O-단계), 2 ms (J-단계), 30 ms (I-단계), 300 ms (P-단계)에서 엽록소형광 밀도를 분석

Table 1. Short description of chlorophyll fluorescence parameters used in the study, according to the O-J-I-P test

Abbreviation	Description
Fo	Initial fluorescence in dark adapted tissue
Fm	Maximum fluorescence in dark adapted tissue
Fv/Fo	Ratio of photochemical and non-photochemical de-excitation fluxes of excited chlorophyll
Vt	Relative variable fluorescence at time t
Mo	Slope at the beginning of the transient Fo→Fm, maximal fractional rate of photochemistry
Sm	Normalized area
N	Turnover number of Q <sub>A</sub>
ABS/RC	Absorption flux of photons per active reaction center
TRo/RC	Trapping of electrons per active reaction center
ETo/RC	Electron flux per active reaction center beyond Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>
DIo/RC	Dissipation of electrons per active reaction center
Φ <sub>PO</sub>	Maximum yield of primary photochemistry, equal to Fv/Fm
Ψ <sub>O</sub>	Probability of a trapped exciton moving an electron beyond Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>
Φ <sub>EO</sub>	Probability of a absorbed exciton moving an electron beyond Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>
RC/CS	Active reaction center per cross section
ETo/CS	Electron flux per cross section
DIo/CS	Dissipation of electrons per cross section

하였다(Srivastava 등, 1997). O-J-I-P 곡선의 분석으로 8개의 기본적 형광변수( $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_v/F_o$ ,  $V_i$ ,  $V_i$ ,  $M_o$ ,  $S_m$ ,  $N$ )들을 제시하였으며, 이를 토대로 다시 구조적 변수(structural parameters:  $RC/CS$ ,  $\Phi_{PO}$ ,  $\Psi_o$ ,  $\Phi_{EO}$  등)와 기능적 변수(functional parameters:  $ABS/RC$ ,  $TRo/RC$ ,  $ETo/RC$ ,  $DIo/RC$ ,  $ETo/CS$ ,  $DIo/CS$  등)들을 산출하여 제시하였다(Table 1). 그리고, 측정된 형광 변수들을 토대로 광계II의 반응중심을 통한 활성 또는 불활성 상태의 반응중심의 밀도, 에너지 흐름의 변화 등을 pipeline model로 제시하였다.

### 2.5. 통계분석

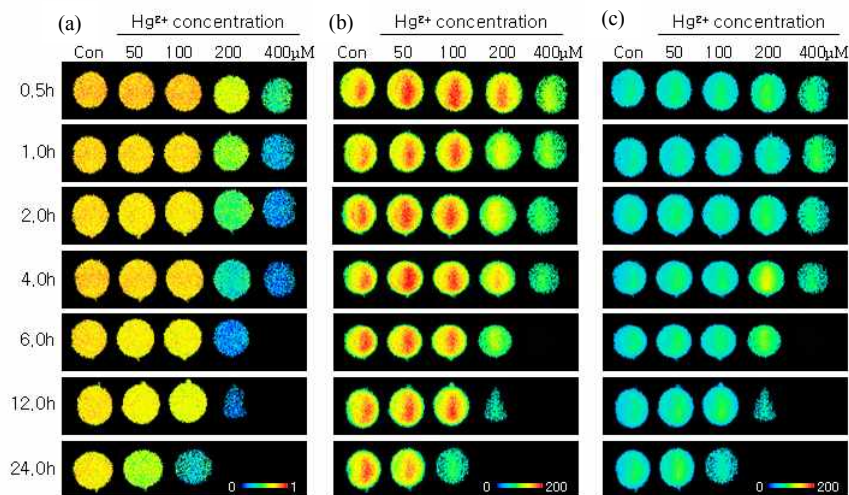
실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 통계 package (SPSS Inc., Release 7.5)를 이용하였으며, 분산분석에 의한 Duncan의 다중검정( $P < 0.01$ )으로 평균치간의 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 엽록소형광 특성의 변화

수은의 농도와 배양 시간에 따른 *Chlorella*의 반응을 신속하게 모니터링하기 위해서 엽록소형광 이미지 분석을 통하여 형광변수의 변화 양상을 살펴보았다. *Chlorella*에 수은의 농도를 달리하여 처리한 후 24시

간 동안 배양하면서 배양 시간에 따라  $F_v/F_m$ ,  $F_m$ 과  $F_o$  이미지의 변화를 살펴보았다(Fig. 1). 그 결과,  $F_v/F_m$  이미지를 보면 200  $\mu\text{M}$  이상의 수은에서는 30분 이후에 적색 이미지에서 노란색 또는 녹색 이미지로의 변화가 감지되어  $F_v/F_m$  값이 감소하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1(a)). 처리 후 1시간 이후에 200  $\mu\text{M}$  수은에서는 점차 녹색 이미지로 변화되었으며 6시간 이후에 전체적으로 파란색을 띠어 짧은 시간 이내에 수은이 스트레스로 작용하고 있음을 알 수 있다. 그리고 400  $\mu\text{M}$  수은에서는 1시간 이후에 전체적으로 파란색을 띠고, 6시간 이후에는  $F_v/F_m$  이미지가 나타나지 않았다.  $F_m$  이미지는 수은 농도가 증가할수록 그리고 배양 시간이 길어질수록 방출되는 형광이 큰 폭으로 적어져 황적색 이미지에서 녹색 이미지로의 변화를 감지할 수 있었으며(Fig. 1(b)), 이러한 변화는  $F_v/F_m$  이미지의 변화 패턴과 유사하였다.  $F_o$  이미지는 배양 4시간까지는 수은 농도에 관계없이 전체적으로 하늘색의 유사한 이미지로 나타났으며, 200  $\mu\text{M}$  이상의 수은 처리구에서는 배양 시간이 길어짐에 따라 형광 방출이 크게 줄어들어 이미지가 나타나지 않았다(Fig. 1(c)). 이처럼 수은 독성에 대한 형광이미지의 분석은 황백화 현상 등 가시적인 징후가 발생되기 전 단계에 신속하게 수은 독성을 평가할 수 있어 조기 진단에 유



**Fig. 1.** Chlorophyll fluorescence images ( $F_v/F_m$ ,  $F_m$  and  $F_o$ ) of *Chlorella vulgaris* exposed to mercury( $\text{Hg}^{2+}$ ) stress. The images were taken from 0.5 h to 24 h after the treatment of mercury( $\text{Hg}^{2+}$ ). Each image is colored in a relative way based on the values of the parameter such as  $F_v/F_m$ (a),  $F_m$ (b) and  $F_o$ (c).

용하게 활용될 수 있음을 보여주고 있다. 최소형광  $F_0$ 는 광계II에 있는 엽록소분자들이 들뜬 후 에너지가 반응중심으로 이동하기 이전에 나오는 형광을 말하며 (Bolhár-Nordenkampf와 Öquist 1993), 식물이 스트레스를 받으면 일반적으로  $F_0$ 가 증가한다. 그러나, *Chlorella*의  $F_0$  이미지는  $F_v/F_m$ 이나  $F_m$  이미지의 변화와는 달리 수은의 농도나 배양시간에 따라 뚜렷한 차이를 보이지 않아 수은 독성 여부를 가시적으로 판별하기에는 적합하지 않았다.

Fig. 1의 엽록소형광 이미지 분석으로는 짧은 시간 동안 *Chlorella*를 배양하였을 때  $100 \mu\text{M}$  이하의 수은 처리구에서 가시적인 구별이 쉽지 않아  $F_v/F_m$ ,  $F_m$ 과  $F_0$  값을 산출하여 정량적으로 제시하였다(Fig. 2). 광계II의 광화학적 효율, 즉  $F_v/F_m$ 의 변화로 살펴보면 수은의 농도가 높거나 배양 시간이 길어질수록 크게 감소하였다(Fig. 2A). 즉,  $50 \mu\text{M}$ 과  $100 \mu\text{M}$ 의 수은 처리구에서는 2시간까지는  $F_v/F_m$ 의 변화가 거의 없었다. 이후 점차 낮아져 처리 후 6시간이 경과하였을 때에는 대조구에 비해서 각각 87.6%와 67.1%로 낮아졌다. 그리고  $200 \mu\text{M}$  이상의 농도에서는 2시간이 경과하였을 때 60% 이하로 낮아져 아주 짧은 시간 이내에 큰 폭으로 감소하였음을 확인할 수 있다. 이는 Fig. 1

(a)에서 살펴본 바와 같이 고농도의 수은이 *Chlorella* 세포에 영향을 미쳐 엽록소를 분해하거나 합성을 저해하여 황백화 현상을 유도할 뿐만 아니라, 반응중심을 포함한 모든 엽록소분자들의 빛 흡수용량을 감소시킨 결과로 볼 수 있다. 또한 Fig. 1의 엽록소형광 이미지 분석에서  $50 \mu\text{M}$ 과  $100 \mu\text{M}$ 의 수은 처리구에서는 4시간까지는 대조구와 큰 차이를 감지할 수 없는데 반하여 짧은 시간 동안의 처리에서도 그 차이를  $F_v/F_m$  값의 변화로 정량적으로 나타낼 수 있었다(Fig. 2(a)).  $F_m$  값도 역시 수은의 농도가 증가할수록 그리고 배양 시간이 길어질수록 큰 폭으로 낮아졌으며 (Fig. 2(b)),  $F_v/F_m$  값의 변화 패턴과 유사하였다.  $F_m$ 은 quinone A( $Q_A$ )가 완전히 환원된 상태의 형광이며, 스트레스를 받은 식물에서는 보통  $F_m$ 의 감소가 나타난다(Oh 등, 2009). Fig. 1B에서  $100 \mu\text{M}$  이하의 수은 처리구에서는 12시간 이전에는 대조구와 비교하여  $F_m$ 의 변화를 감지할 수 없었으나 형광분석법에 의해 정량적으로 그 차이가 구별되었다.  $F_0$  값은 수은 농도와 배양 시간에 따라 다소의 변화가 감지되었으며 (Fig. 2(c)),  $100 \mu\text{M}$  이하의 수은 처리구에서는 4시간까지는 대조구와 차이를 보이지 않았으나, 이후에는 다소 증가하였다. 그리고  $200 \mu\text{M}$ 과  $400 \mu\text{M}$  수은 처

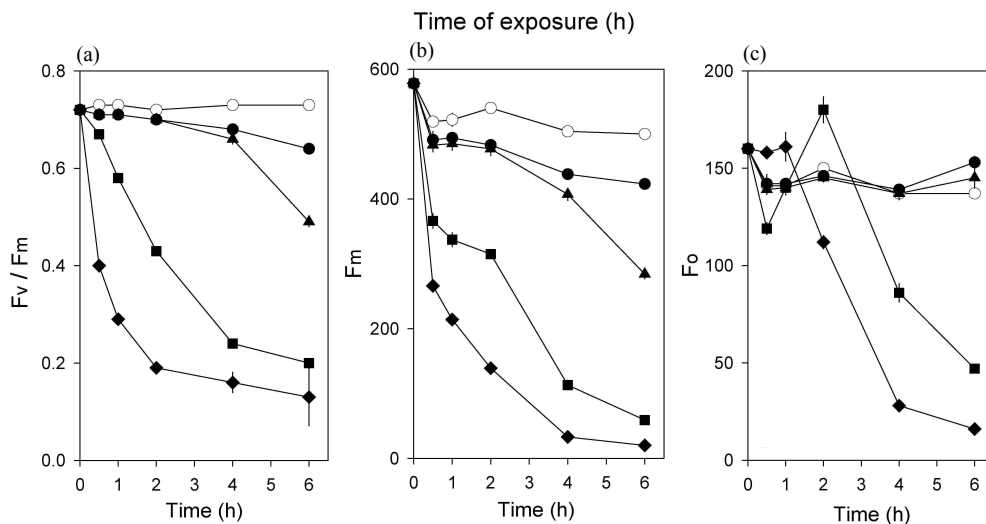


Fig. 2. Change of chlorophyll fluorescence ( $F_v/F_m$ ,  $F_m$  and  $F_0$ ) in *Chlorella vulgaris* exposed to mercury( $\text{Hg}^{2+}$ ) stress. Control, open circle;  $50 \mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ , solid circle;  $100 \mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ , solid triangle;  $200 \mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ , solid square;  $400 \mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ , solid diamond.

리구에서는 대조구에 비해 각각 처리 후 2시간과 1시간까지는 Fo 값이 증가하였으며, 이후에는 큰 폭으로 감소하였다. 이처럼 고농도의 수은에서 *Chlorella*는 짧은 시간 이내에 광계II의 반응중심이 불활성 상태로 존재하며 시간이 누적됨에 따라 반응중심이 점차 손상되어 Fo 값이 감소하는 것으로 보인다. 수은에 의한 수생생물의 엽록소형광 반응으로 cyanobacteria인 *Spirulina platensis*에서 Fv/Fm 값의 감소가 보고된 바 있으며(Lu 등, 2000), 녹조류인 *Scenedesmus*에서도 Fv/Fm 값이 감소하는데 광계II에서 광계I으로의 전자 전달이 감소하거나 부분적으로 차단됨으로써 QA의 재산화가 억제되는 때문으로 알려지고 있다(Mallick와 Mohn, 2003). 그리고 녹조류인 *Scenedesmus quadricauda*와 수생 관속식물인 *Elodea canadensis*, *Callitriche stagnalis*, 붕어마름(*Ceratophyllum demersum*)에서도 수은을 포함한 여러 가지 중금속 스트레스가 형광 양자수율의 저하와 형광 스펙트럼의 변화를 초래하는 것으로 보고된 바 있다(Küpper 등, 1996).

### 3.2. 엽록소 및 carotenoid 함량의 변화

엽록소와 carotenoid 등의 색소는 식물의 광합성 능력을 나타내는 지표가 된다. 따라서 엽록소를 포함한 광합성 색소의 함량은 환경 스트레스에 의한 식물의 영향을 평가하는데 사용할 수 있으며, 색소의 함량 변화는 식물 병의 가시적 징후와 생산성과도 관련되어 있다(Parekh, 1990). 따라서 *Chlorella*의 배양에서 중금속에 의해 야기된 손상을 예측하는 데에도 엽록소 함량의 변화로 나타낼 수 있다. Fig. 2에서 수은의 농도별 Fv/Fm의 차이가 뚜렷하게 나타나는 시간인 수은처리 후 4시간에서의 엽록소 및 carotenoid 함량의

변화를 살펴보았다(Table 2). 엽록소 a와 b의 함량은 대조구와 비교하여 수은에 노출되었을 때 수은의 농도가 높을 때에는 현저히 감소하였으며, 특히 400  $\mu\text{M}$ 의 수은에서 엽록소 a와 b의 함량이 각각 61.1%와 74.0%로 크게 감소하였다. 그리고 엽록소 a/b는 200  $\mu\text{M}$  이하의 수은에서는 대조구와 큰 차이가 없으나 그 이상의 농도에서 크게 감소하고 있음을 확인할 수 있다. 이는 대조구와 비교하여 고농도의 수은에서 엽록소 a의 감소폭이 엽록소 b의 감소폭에 비해 크게 나타났기 때문이다. 엽록소 a/b의 감소는 식물의 생장조건이 좋지 못하거나 또는 잎의 노화가 진행될 때 주로 나타날 수 있으며 스트레스를 감지하는 데 좋은 지표로 이용될 수 있다(Abreu와 Munné-Bosch, 2008). 그리고 수은 스트레스에 의한 엽록소 함량의 감소는 녹조류인 *Chlamydomonas*에서도 보고된 바 있다(Elbaz 등, 2010). Carotenoid 함량 또한 고농도의 수은에서 크게 감소하였으며, 400  $\mu\text{M}$ 의 수은에서 54.5%로 낮아졌다. Carotenoid는 엽록소와 더불어 광수확 색소계를 구성하는 색소로서 이들 색소 함량이 감소하는 것은 수은이 색소의 합성 반응계를 심하게 저해하거나 또는 틸라코이드 막에 상해를 가함으로써 초래되는 색소 분해 때문으로 보인다. 광합성에 미치는 수은의 영향은 광합성 색소들의 함량에 기인하는데, 본 연구에서도 대조구와 비교하여 수은 처리구에서의 엽록소 a와 b, 그리고 carotenoid의 함량이 높은 농도의 수은에서 현저히 감소하였다.

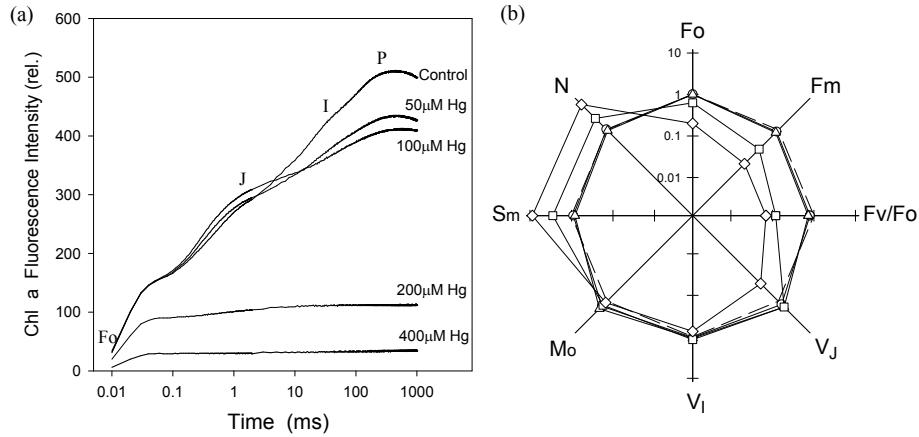
### 3.3. 엽록소형광 O-J-I-P 곡선의 변화

식물체가 빛, 온도, 건조 또는 화학적 스트레스 등에 의해 영향을 받았을 때, O-J-I-P 곡선의 패턴이 변

**Table 2.** Contents of photosynthetic pigments in *Chlorella vulgaris* after the treatment of mercury( $\text{Hg}^{2+}$ ) for 4 h

Hg concentration ( $\mu\text{M}$ )	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Carotenoid	Chl a/b ratio
	$\mu\text{g}/\text{mL}$ algal suspension			
0 (Control)	5.22±0.08 <sup>a</sup>	2.42±0.07 <sup>a</sup>	1.23±0.03 <sup>a</sup>	2.20±0.06 <sup>a</sup>
50	5.35±0.08 <sup>a</sup>	2.49±0.05 <sup>a</sup>	1.29±0.02 <sup>a</sup>	2.17±0.06 <sup>a</sup>
100	5.07±0.09 <sup>a</sup>	2.41±0.08 <sup>a</sup>	1.22±0.02 <sup>a</sup>	2.17±0.10 <sup>a</sup>
200	4.50±0.08 <sup>b</sup>	2.17±0.04 <sup>b</sup>	1.08±0.02 <sup>b</sup>	2.08±0.05 <sup>a</sup>
400	3.19±0.19 <sup>c</sup>	1.79±0.05 <sup>c</sup>	0.67±0.07 <sup>c</sup>	1.78±0.09 <sup>b</sup>

Each value was expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three replicates. Different letters within each column indicate significant differences between treatments ( $P < 0.01$ )



**Fig. 3.** Chlorophyll fluorescence O-J-I-P transients(A) and spider plots of selected parameters quantifying the behaviour of PS II (B) of *Chlorella vulgaris* exposed to mercury(Hg<sup>2+</sup>) stress for 4 h. Control, long dash; 50 μM Hg<sup>2+</sup>, circle; 100 μM Hg<sup>2+</sup>, triangle; 200 μM Hg<sup>2+</sup>, square; 400 μM Hg<sup>2+</sup>, diamond.

하게 된다. Fig. 1과 2에서 살펴본 바와 같이 수은의 농도별 차이가 뚜렷하게 나타나는 시간인 수은처리 후 4시간에서 *Chlorella*의 O-J-I-P 곡선의 패턴을 비교하고 이를 토대로 형광변수들을 산출하여 제시하였다(Fig. 3). *Chlorella*의 O-J-I-P 곡선을 살펴보면, 수은 농도가 증가할수록 J, I, P값이 크게 감소하고 있으며, 특히 P-단계에서 형광 세기가 크게 감소하였다(Fig. 3(a)). 이는 *Chlorella*가 수은에 의해 광계II 반응중심의 전자수용체 quinone이 환원상태에 있음을 의미하며, 광계II의 광화학적 효율, 즉 Fv/Fm의 감소를 야기하는 결과를 초래한다. 일반적으로 Fv/Fm값이 0.8보다 낮을 때는 광계II의 반응중심이 손상을 입은 상태이거나 불활성상태에 처해있다고 볼 수 있다. 200 μM 이상의 수은에서 0.05 ms 이후부터 점차적으로 낮아져 전자전달이 억제되었음을 확인할 수 있으며, Fig. 2에서 살펴본 바와 같이 Fv/Fm 값이 급격하게 감소하여 수은에 의한 영향을 받고 있음을 알 수 있다.

O-J-I-P 분석을 통해 산출된 형광변수들 중에 Fo, Fm, Fv/Fo는 수은 농도가 증가할수록 점차적으로 감소하였고, N과 Sm은 증가하였다(Fig. 3(b)). Fo는 Fig. 1(c)의 이미지에서는 그 차이가 미미하여 수은에 의한 영향을 평가하기가 어려웠으나 O-J-I-P 분석을 통해 낮은 농도의 수은에서도 영향을 받고 있음을 알 수 있

다. 이처럼 수은에 노출된 *Chlorella*의 Fo 값은 수은의 농도가 증가할수록 감소하는데 이는 수은이 식물체에 독성으로 작용하여 반응중심의 손상을 야기한 결과로 생각해 볼 수 있다. 그리고, 수은에 노출된 *Chlorella*의 Fm 값은 농도가 증가할수록 큰 폭으로 감소하는 것으로 나타나, 수은이 스트레스로 작용을 하고 있음을 알 수 있다. 이러한 Fm의 감소는 cyanobacteria인 *Spirulina platensis*에서도 나타나며(Lu 등, 2000), 분리한 시금치 잎의 틸라코이드 막에서도 수은 농도가 증가함에 따라 그 값이 크게 감소하였다고 보고되었다(Boucher와 Carpentier, 1999). Fv/Fo는 활성상태의 반응중심의 크기와 밀도를 나타내는 지표이며(Kriedemann 등, 1985), Fv/Fm과 마찬가지로 스트레스를 받은 식물에서는 감소하는데, 이는 광계II의 반응중심이 불활성상태에 처해 있음을 나타내며, 카드뮴 이온(Cd<sup>2+</sup>), 코발트 이온(Co<sup>2+</sup>) 등 다른 중금속에 노출된 녹조류에서도 이들 형광변수들이 감소하는 것으로 보고되었다(Mallick과 Mohn, 2003). QA의 회전수를 의미하는 N은 광계II 초기 전자수용체인 QA의 반복적인 산화에 의한 plastoquinone(PQ) pool의 환원을, Sm은 표준화된 면적을 나타내며(Strasser 등, 2000), 본 연구결과와 유사하게 스트레스를 받은 식물에서는 이들 형광변수들이 증가하는 것으로 보고되었

다. 광계II 활성을 나타내는 변수들 중  $\Phi_{PO}$ ,  $\Psi_O$ 와  $\Phi_{EO}$ 도 수은 농도가 증가할수록 크게 감소하였다(Fig. 4). 즉, 수은 농도가 증가할수록 불활성상태의 반응중심이 많아지고 포획된 에너지의 대부분이 전자전달로 보내어지지 않고 버려지고 있음을 간접적으로 보여주고 있다.

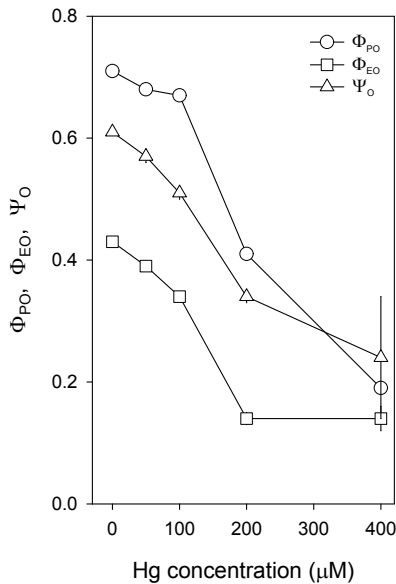


Fig. 4. Effects of mercury stress on  $\Phi_{PO}$ ,  $\Psi_O$ , and  $\Phi_{EO}$  of *Chlorella vulgaris* after the treatment of mercury ( $Hg^{2+}$ ) for 4 h.

### 3.4. 광계II에서의 에너지 흐름의 변화

수은 농도의 증가에 따라 RC/CS와 광계II에서의 에너지 흐름의 변화를 살펴보았다(Fig. 5). 먼저, RC/CS은 수은 농도가 증가할수록 점차적으로 감소하였으며, 400  $\mu M$ 의 수은 처리구에서는 대조구에 비해 21.8%로 크게 감소하였다(Fig. 5(a)). 이처럼 광계II의 반응중심은 수은과 같은 중금속에 의해 직접적으로 영향을 받는 부위로 생각되며, 이로 인해 Fig. 4와 Fig. 2에서 살펴본 바와 같이 전자전달의 저해와 Fv/Fm의 감소를 야기하는 결과를 초래하는 것으로 보인다. 이는 Table 2에서 살펴본 바와 같이 고농도의 수은에서 엽록소 a의 급격한 감소로도 추측해 볼 수 있다. 활성상태의 반응중심 당 에너지 흐름의 변화를 의미하는 변수들 중 ABS/RC와 DIO/RC는 수은 농도가 증가할수록 점차적으로 증가하였으며, TRo/RC와 ETo/RC는 조금 감소하였다(Fig. 5(b)). 광역제는 Fv/Fm의 감소보다  $\Psi_O$ 의 감소와 DIO/RC의 증가에 의해 확인할 수 있으며(Force 등, 2003), 본 연구에서도 수은에 노출된 *Chlorella*에서  $\Psi_O$ 의 감소와 DIO/RC의 증가를 동반하고 있어 광역제를 받고 있음을 확인할 수 있다. 엽면적 당 에너지 흐름의 변화를 의미하는 형광변수들 중 TRo/CS와 ETo/CS는 수은 농도가 증가할수록 점차 감소하였으며, DIO/CS는 증가하는 양상을 보였다(Fig. 5(c)).

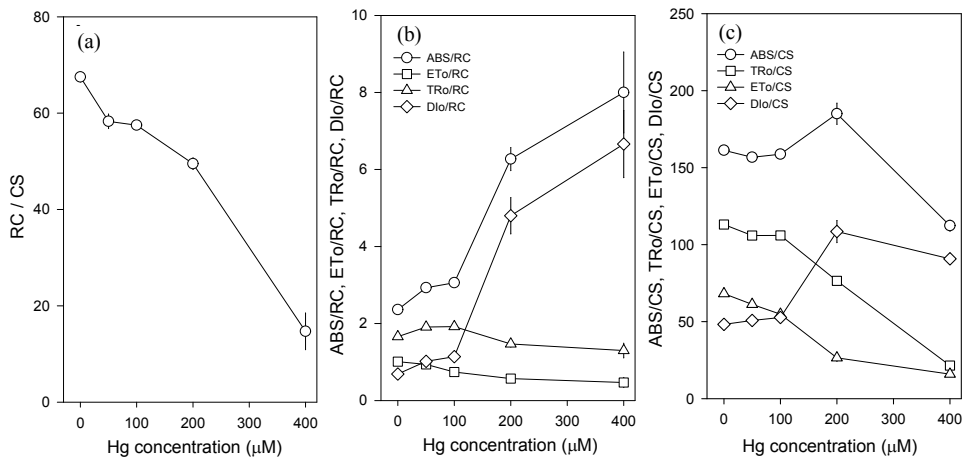


Fig. 5. Effects of mercury stress on the density of PS II reaction center(A) and energy fluxes at the reaction center through PS II (B and C) in *Chlorella vulgaris* after the treatment of mercury( $Hg^{2+}$ ) for 4 h.



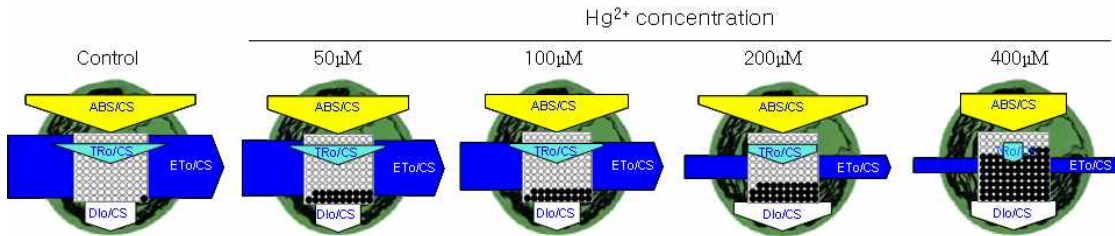


Fig. 6. The pipeline model showing the phenomenological energy fluxes in PS II of *Chlorella vulgaris* exposed to mercury ( $Hg^{2+}$ ) stress for 4 h. The solid and open circles show inactive and active RCs, respectively.

Fig. 5를 토대로 광계II에서의 에너지 흐름을 pipeline model로 나타내면(Fig. 6), 수은 농도가 증가할수록 RC/CS(하얀색 원)가 크게 감소하여 활성 상태의 반응 중심이 감소하고 불활성 상태의 반응 중심은 증가하고 있음을 알 수 있다. ABS/CS와 TRo/CS는 수은 농도가 증가할수록 점차 줄어들었으며 엽면적당 흡수되는 빛에너지 양과 광계II에서 포획되는 에너지가 모두 감소하고 있음을 알 수 있다. 특히 400  $\mu M$  수은 처리구에서 TRo/CS는 크게 감소하였다. 광계II에 포획된 에너지 중 ETo/CS도 수은 농도가 증가할수록 큰 폭으로 감소하여 전자전달로 전해되는 에너지가 줄어들고 있음을 알 수 있다. 200  $\mu M$  이상의 수은 처리구에서 40% 이하로 크게 감소하였다. 이에 반해 Dlo/CS는 수은 농도가 증가할수록 많아졌으며 이는 전자전달로 사용되지 않고 버려지는 에너지가 많음을 나타낸다. 대조구에 비해 200  $\mu M$ 과 400  $\mu M$  수은 처리구에서 각각 2.3배, 1.9배 증가하였다. 이처럼 광계II의 반응 중심은 수은과 같은 중금속에 의해 직접적으로 영향을 받는 부위로 생각되며, 이로 인해 전자전달 활성의 저해와 Fig. 2에서처럼 Fv/Fm의 감소가 야기되는 것으로 보인다.

이상의 결과를 토대로 *Chlorella*는 수은에 민감하게 반응하여 수서생태계의 환경지표 생물로 활용이 가능할 뿐만 아니라, 황백화 현상 등 가시적인 징후가 나타나기 전에 수은 독성을 조기에 진단하는 데 형광 이미지 분석이나 O-J-I-P 분석이 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

#### 4. 결론

본 연구는 수은이 수서생태계에 미치는 영향을 평가하기 위하여 담수산 녹조류인 *Chlorella*를 대상으로 수은의 농도와 배양 시간을 달리하여 엽록소형광 이미지 분석과 O-J-I-P 분석을 실시하였다. 엽록소 a와 b, carotenoid 함량은 높은 농도의 수은에서는 농도가 증가함에 따라 현저히 감소하였으나 낮은 농도에서는 변화가 거의 없었다. Fv/Fm 이미지는 수은 농도의 증가 또는 배양 시간이 길어질수록 크게 변화하였으나, 200  $\mu M$  이상의 고농도에서는 처리 후 2시간 이내에 형광이미지의 변화를 확인할 수 있었다. 수은 농도를 달리하여 4시간 동안 처리하였을 때 O-J-I-P 곡선의 패턴은 수은의 농도가 증가할수록 J, I, P값이 큰 폭으로 감소하였다. 그리고, O-J-I-P 분석으로부터 산출된 형광변수들 중에 Fm, Fv/Fo, RC/CS, TRo/CS, ETo/CS,  $\Phi_{PO}$ ,  $\Psi_O$ 와  $\Phi_{EO}$ 는 수은 농도가 증가할수록 점차적으로 감소하였고, N, Sm, ABS/RC, Dlo/RC, Dlo/CS는 증가하였다. 이러한 결과를 토대로 *Chlorella*는 낮은 농도의 수은에서도 4시간 이내의 짧은 시간 동안에 민감하게 반응하고 있어 수서생태계의 환경지표 식물로 활용할 수 있으며, 스트레스 하에서 뚜렷하게 증가하거나 감소하는 형광변수들(Fm,  $\Phi_{PO}$ ,  $\Psi_O$ , RC/CS 등)을 수은의 영향을 조기에 정량적으로 진단하는데 활용할 수 있을 것으로 보인다.

#### 감사의 글

이 논문은 2007년 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행되었으며(KRF-2007-532-D00010), 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Abreu, M. E., Munné-Bosch, S., 2008, Salicylic acid may be involved in the regulation of drought induced leaf senescence in perennials: A case study in field grown *Salvia officinalis* L. plants, *Environ. Exp. Bot.*, 64(2), 105-112.
- Aidid, S. B., Okamoto, H., 1992, Effects of lead, cadmium and zinc on the electric membrane potential at the xylem/symplast interface and cell elongation of *Impatiens balsamina*, *Environ. Exp. Bot.*, 32, 439-448.
- Amon, D., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.*, 24, 1-15.
- Bolhár-Nordenkamp, H. R., Öquist, G., 1993, Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*, in: Hall, D. O., Scurlock, J. M. O., Bolhár-Nordenkamp, H. R., Leegood, R. C., Long, S. P. (eds.), *A Field and Laboratory Manual*, Chapman and Hall, London, 193-206.
- Boucher, N., Carpentier, R., 1999, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Pb<sup>2+</sup>-induced changes in photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements, *Photosynth. Res.*, 59, 167-174.
- Clijsters, H., Van Assche, F., 1985, Inhibition of photosynthesis by heavy metals, *Photosynth. Res.*, 7, 31-40.
- Elbaz, A., Wei, Y. Y., Meng, Q., Zheng, Q., Yang, Z. M., 2010, Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ecotoxicol.*, 19, 1285-1293.
- Force, L., Critchley, C., Van Rensen, J. J. S., 2003, New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test, *Photosynth. Res.*, 78, 17-33.
- Jarvis, S. C., Jones, L. H. P., Hopper, M. J., 1976, Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots, *Plant Soil.*, 44, 179-191.
- Kahle, H., 1993, Response of roots of trees to heavy metals, *Environ. Exp. Bot.*, 33(1), 99-119.
- Kelly, J. M., Parker, G. R., McFee, W. W., 1979, Heavy metal accumulation and growth of seedlings of five forest species as influenced by soil cadmium level, *J. Environ. Qual.*, 8, 361-364.
- Kriedemann, P. F., Graham, R. D., Wiskich, J. T., 1985, Photosynthetic dysfunction and *in vivo* chlorophyll a fluorescence from manganese deficient wheat leaves, *Aust. J. Agric. Res.*, 36, 157-169.
- Küpper, H., Küpper, F., Spiller, M., 1996, Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants, *J. Exp. Bot.*, 47, 259-266.
- Leong, T. Y., Anderson, J., 1984, Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll protein complexes, *Photosynth. Res.*, 5, 105-115.
- Lichtenthaler, H. K., Mieh, J. A., 1997, Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress, *Trends Plant Sci.*, 2, 316-320.
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R., 1983, Determinations of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents, *Biochem. Soc. Trans.*, 603, 591-592.
- Lu, C. M., Chau, C. W., Zhang, J. H., 2000, Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium, *S. platensis* - assessment by chlorophyll fluorescence analysis, *Chemosphere*, 41, 191-196.
- Ma, J., Xu, L., Wnag, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S., Huang, Y., 2002, Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 51, 128-132.
- Mallick, N., Mohn, F. H., 2003, Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55, 64-69.
- Nedbal, L., Soukupová, J., Whitmarsh, J., Trtílek, M., 2000, Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality, *Photosynthetica*, 38(4), 571-579.
- Nilsson, H. E., 1995, Remote sensing and image analysis in plant pathology, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 33, 489-527.
- Nriagu, J. O., Pacyna, J. M., 1988, Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, *Nature*, 333, 134-139.

- Oh, S. J., Zhin, K. L., Koh, S. C., 2009, Characterization of Chl a fluorescence of hydrophytes under cadmium stress, *J. Environ. Sci.*, 18(12), 1361-1368 (in Korean).
- Ouzounidou, G., 1995, Cu-ions mediated changes in growth, chlorophyll and other ion contents in a Cu-tolerant *Koeleria splendens*, *Biol. Planta.*, 37, 71-79.
- Parekh, D., Puranik, R. M., Srivastava, H. S., 1990, Inhibition of chlorophyll biosynthesis by cadmium in greening maize leaf segments, *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 186(4), 236-242.
- Peuelas, J., Filella, I., 1998, Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status, *Trends Plant Sci.*, 3, 151-156.
- Plekhanov, S. E., Chemeris, Y. K., 2003, Early toxic effects of zinc, cobalt and cadmium on photosynthetic activity of the green alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39, *Biology Bulletin*, 30(5), 506-511.
- Prasad, M. N. V., 1995, Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants, *Environ. Exp. Bot.*, 35(4), 525-545.
- Rojkind, M., Domínguez-Rosales, J. A., Nieto, N., Greenwel, P., 2002, Role of hydrogen and peroxidative stress in healing responses, *Cell. Mol. Life Sci.*, 59, 1872-1891.
- Srivastava, A., Guissé, B., Greppin, H., Strasser, R. J., 1997, Regulation of antenna structure and electron transport in PS II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1320, 95-106.
- Strasser, B. J., Strasser, R. J., 1995, Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test, in: Mathis, P. (ed.), *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Kluwer Academic, Dordrecht, 977-980.
- Strasser, R. J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M., 2000, The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, in: Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P. (eds.), *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*. Taylor & Francis, London, 445 - 483.
- Thompson, A. S., Rhodes, J. C., Pettman, I., 1988, *Culture collection of algae and protozoa catalogue of strains*, Published by CCAP, Cumbria, UK, 164.
- Vögeli-Lange, R., Wagner, G. J., 1990, Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves, *Plant Physiol.*, 92(4), 1086-1093.