

무에서 니켈 독성검정을 위한 생육 및 생리반응 비교 II. 니켈에 의한 무의 생리반응

조재영* · 한강완

전북대학교 농화학과

초록 : 니켈독성의 생물검정에 있어서 지표식물로 무를 이용하였고 수경재배 조건하에서 니켈용액의 농도에 따른 무종자의 발아율, 세포신장, α -amylase 활성도, 엽록소, 단백질함량을 조사한 결과 니켈처리농도를 증가시키면 종자의 발아초기에는 농도의존적으로 α -amylase의 활성도가 크게 저해를 받기 시작하였으며, 발아 후 생장단계에서는 엽록소 b와 a의 함량이 크게 저해를 받았다.(1996년 6월 17일 접수, 1996년 7월 1일 수리)

서 론

중금속은 동식물계의 생화학적경로에 작용하여 surfurhydroxy기를 지닌 효소의 활성을 저해하거나, 핵산의 입체구조에 영향을 주기도 하며, 산화적 인산화과정의 경로를 교란시켜 정상적인 생장을 억제하는데 일부 효소에서는 오히려 중금속이온이 촉매활성을 높여 주기도 하는 것으로 보고되어 있다.¹⁻³⁾

식물생육에 영향을 미치는 중금속의 독성을 상대적으로 평가하는 지표로 아연당량계수(Zinc equivalent factor)를 사용하고 있는데 구리는 아연의 2배, 니켈은 아연의 8배나 되며, 여러 가지 중금속 오염물질 중에서도 특히 니켈은 식물에 용이하게 흡수되며 식물생육에 독성을 강하게 나타내는 원소로 알려져 있다.⁴⁻⁷⁾

본 연구는 니켈독성의 생물검정에 있어서 지표식물로서 무를 이용하였고 수경재배 조건하에서 처리된 니켈용액의 농도에 따른 무종자의 발아율, 세포신장, α -amylase 활성도, 엽록소, 단백질함량을 조사 비교하였다.

재료 및 방법

실험식물 및 재배환경

본 실험에 사용된 식물은 무(*Raphanus Sativus* L.)였으며, 1995년 6월 20일부터 9월 20일까지 3회 반복실험을 수행하였다. Petri dish에 여과지(Whatman No 2)를 깔고 1%-Sodium hypochlorite 용액으로 표면살균한 무종자를 20립씩 깔고 각 농도별로 조제한 니켈용액을 첨가하여 무종자의 발아율, 세포신장, α -amylase 활성도를 조사하기 위하여 암조건 25°C에서 재배하였으며, 단백질과 엽록소함량을 조사하기 위하여 25°C, 417 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광의 세기로 재배하였다.

무종자의 발아율

무종자 30립을 증류수에 넣어 25°C에서 암발아시킨

것을 대조구로 하여 니켈을 각각 1, 5, 10, 30, 50 mg/kg으로 처리하여 유근의 출현을 기준으로 발아율을 조사하였다.

무의 세포신장에 미치는 니켈의 영향

Ross⁸⁾의 방법에 따라 암조건 25°C에서 발아시켰고 초엽이 3~4 cm 정도 신장한 유식물을 초엽의 끝으로부터 0.3 mm 정도 절단 제거한 후 5 mm 크기로 잘라 니켈농도를 각각 1, 5, 10, 30, 50 mg/kg으로 처리한 pH 5.3인 인산완충용액에 초엽을 30개씩 petri dish에 넣은 후 알루미늄 호일로 광을 차단하였다. 이 petri dish를 25°C 정온기에서 1, 3, 5, 7일 배양 후 신장한 초엽길이를 Dial caliper(Mitutoyo社)로 0.01 mm 까지 길이를 측정하였다.

무의 발아과정에서 α -amylase 활성에 미치는 니켈의 영향

무종자 30립을 sea sand 30g씩 담은 petri dish에 파종한 후 니켈을 각각 1, 5, 10, 30, 50 mg/kg의 농도수준으로 20 ml씩 첨가하여 25°C 암조건에서 발아 생육시켰다. 니켈농도처리 1, 3, 5일 경과 후 무종자를 꺼내어 시료로 사용하였다.

α -amylase 활성도는 Carol⁹⁾의 방법에 따라 시료 1g을 0~4°C에서 pH 4.8의 acetate buffer용액 20 ml를 첨가하여 막자사발에서 마쇄한 다음 10분간 5,000 g로 원심 분리하여 조효소액으로 사용하였다.

조효소액 측정은 0.2 ml 조효소액, 0.8 ml의 전분용액, 1 ml의 발색제와 함께 시험관에 취하여 30°C 진탕항온수조에서 30분간 반응시킨 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준곡선과 비교하여 활성을 구하고 무처리구에 대한 상대활성으로 나타내었다.

무의 엽록소함량에 미치는 니켈의 영향

찾는말 : Nickel, α -amylase activity, Chlorophyll, Toxicity

*연락처

증류수에서 성장중인 무 유식물에 니켈을 각각 1, 5, 10, 30, 50 mg/kg으로 처리하여 1, 3, 5일 후에 무 유식물을 5개씩 채취하여 분석시료로 사용하였다.

엽록소 함량분석은 Arnon¹⁰⁾의 방법에 따라 시료 1g을 막자사발에서 분쇄한 다음 80% acetone으로 추출하여 663 nm, 645 nm에서 Spectrophotometer(Milton Roy Spectronic 601)로 흡광도를 측정하여 엽록소 a, 엽록소 b를 측정하였다.

무의 단백질함량에 미치는 니켈의 영향

증류수에서 성장중인 무 유식물에 니켈을 각각 1, 5, 10, 30, 50 mg/kg으로 처리하여 1, 3, 5일 후에 무 유식물을 5개씩 채취하여 분석시료로 사용하였다.

단백질 함량분석은 Lowry¹¹⁾법에 기준하여 식물재료를 acetone으로 건조시키고 1M-NaOH용액을 20 ml 가하여 85°C에서 90분간 가열하였다.

① 2% potassium sodium tartrate용액 10 ml에 1% CuSO₄·5H₂O를 10 ml 가하고 저으면서 0.1M-NaOH(2% Na₂CO₃ 함유) 1000 ml 첨가한다.

② Na₂WO₄·2H₂O 10 mg과 Na₂MoO₄·2H₂O 2.5 g, 물 70 ml를 섞어 넣고 H₃PO₄(85%) 5 ml, 진한 HCl 10 ml를 가한 후 환류냉각기를 붙여 10시간 동안 끓인 다음 Li₂SO₄ 15 g, 물 5 ml, 브롬수 1방울을 가하여 15분간 가열하였다. 냉각시킨 용액을 100 ml로 희석하여 사용하였다.

① 시약 5 ml와 ② 시약 0.5 ml에 시료 1 ml를 넣은 다음 30분간 방치하고 물을 바탕액으로 하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준곡선과 비교하여 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

무종자의 발아율

니켈처리농도 1, 5 mg/kg에서는 102.5~114.5%의 발아율을 나타내었으나 배양액의 니켈농도가 20 mg/kg에서 25.8%의 발아율을 보였다(Table 1).

무의 세포신장에 미치는 영향

니켈처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 세포신장의 저해정도가 증가하는 경향이 있었으며(Table 2), 처리 1일 후에는 10 mg/kg까지는 큰 영향이 없었으나 니켈처리농도 20 mg/kg의 경우 3일부터 50% 이상의 저해를 받기 시작하여 7일째에 70% 이상의 급격한 저해를 받아 정상적인 세포신장이 불가능한 상태였다. 또한 니켈처리농도 30 mg/kg의 경우 처리후 3일부터 약 85%이상의 저해를 받기 시작하여 5일후에는 세포신장이 정지되었다.

무의 발아과정에서 α-amylase의 활성에 미치는 영향

발아 과정은 종자내에 이미 존재하는 다양한 종류의 효소와 새로 합성된 효소작용의 증가를 수반하게 되는데 α-amylase의 경우 전분을 가수분해함으로써 생성된 가

Table 1. Germination rate of radish seeds as affected by different concentration of Ni in the water culture

Concentration (mg/kg)	Germination rate (% of control)
Control	100.0
1	114.5
5	102.5
10	84.5
20	25.8
30	23.2
40	9.6
50	0

Table 2. Effect of Ni on cell elongation of radish coleptile

Ni concentration (mg/kg)	Cell elongation (% of control)			
	1	3	5	7
Control	100.0	100.0	100.0	100.0
1	113.5	118.3	120.2	118.0
5	112.0	68.8	64.5	60.2
10	97.8	57.3	56.0	50.0
20	78.0	47.9	35.2	30.4
30	34.6	14.5	-	-

(-) Not determined

Table 3. Effect of Ni on α-amylase activity of radishes seeding after 1, 3, 5 days of treatment

Ni concentration (mg/kg)	α-amylase activity (% of control)		
	1	3	5(day)
Control	100.0	100.0	100.0
1	100.0	89.4	87.0
5	94.0	82.3	79.0
10	70.4	63.3	62.3
20	55.0	53.0	50.1
30	49.5	46.0	39.5

수분해물질들이 TCA회로와 전자전달계를 거쳐 ATP를 생성하는 기능을 한다.

본 실험에서 α-amylase 활성을 조사한 결과 대조구에 비하여 니켈처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 α-amylase의 활성이 감소하는 경향이 있었으며(Table 3), 니켈처리농도 20 mg/kg 1일째에서 45% 정도의 활성저해를 받았으며 시간이 경과함에 따라 α-amylase의 활성억제 정도가 조금씩 감소하는 경향이 있었다.

무의 엽록소함량에 미치는 영향

Assche 등¹²⁾은 중금속은 잎의 해부학적 구조를 변화시키고 그 결과 CO₂에 대한 내부저항이 증가함으로써 잎의 생장을 저해한다고 보고하였으며, Rai 등¹³⁾은 카로티노이드와 엽록소의 생합성이 중금속에 의해 저해되는 이유는 이들 중금속이 색소의 합성반응계를 심하게 저해하거나 혹은 thylakoid 막에 상해를 가함으로써 초래되는 색소분해 때문인 것 같다고 보고하였다.

Table 4. Effect of Ni on chlorophyll a and b contents of radishes seeding after 1, 3, 5days of treatment

Ni concentration (mg/kg)	Chlorophyll a			Chlorophyll b (% of control)		
	1	3	5	1	3	5(day)
Control	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	100.5	84.1	83.1	100.0	88.0	88.0
5	100.2	80.4	76.3	94.4	81.9	77.9
10	89.2	60.5	58.0	84.1	62.4	58.4
20	78.3	50.0	47.0	71.2	51.0	46.9
30	76.2	41.3	37.4	63.0	45.4	37.8

Table 5. Effect of Ni on protein contents of radishes seeding after 1, 3, 5days of treatment

Ni concentration (mg/kg)	Protein contents (% of control)		
	1	3	5(day)
Control	100.0	100.0	100.0
1	100.0	95.0	91.4
5	100.0	92.2	82.2
10	98.9	84.8	74.9
20	94.0	80.6	70.6
30	90.0	79.0	69.0

니켈처리농도에 따라 엽록소 a와 b의 함량변화를 조사한 결과(Table 4) 니켈처리농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 엽록소 a와 b의 함량이 감소하는 경향이었으며, 엽록소 a가 엽록소 b 보다 니켈에 의해 더 피해를 받는 것으로 나타났다.

무의 단백질함량에 미치는 영향

이¹⁴⁾는 보리종자를 가지고 수경재배의 조건에서 수온을 10⁻⁵M로 처리시 약 18.5%, 10⁻³M에서 약 69%의 단백질함량의 저해가 나타났으며, 아연을 10⁻⁵M로 처리시 약 12.2%, 10⁻³M에서 약 55%의 단백질함량의 저해가 나타났다고 보고하였는데 본 실험결과를 보면 니켈처리농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 단백질함량이 감소하는 경향이었으나(Table 5), 수온이나 아연보다는 단백질함량에 끼치는 영향이 작게 나타났다.

니켈농도를 0~30 mg/kg까지 상승시켰을 때 1일째 α-amylase, chlorophyll a와 b, protein과의 관계를 다중회귀분석한 결과 α-amylase>chlorophyll b>chlorophyll a >protein의 순서로 피해를 받은 것으로 나타났으며(526.86+2.5779·α-amylase-0.3506·chl a+1.4103·chl b-0.7759·protein. p<0.01), 3일째의 경우 chlorophyll b>chlorophyll a>α-amylase>protein의 순서로 피해를 받은 것

로 나타났으며(6.8324-0.0208·α-amylase-0.1039·chl a +0.1074·chl b+0.0027·protein. p<0.01), 5일째의 경우 chlorophyll b> chlorophyll a>protein>α-amylase의 순서로 피해를 받은 것으로 나타났다(16.92~0.0179·α-amylase-0.0368·chl a+0.0841·chl b-0.0249·protein p<0.01).

수경재배조건에서 니켈처리농도를 증가시키면 종자의 발아초기에는 α-amylase의 활성도가 크게 피해를 받기 시작하였으며, 발아후 성장단계에서는 chlorophyll b와 a의 함량이 크게 피해를 받은 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Vallee, B., and D. D. Ulmer (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Biochem.* **41**, p. 91-128.
2. Mengel Konrad and Ernest A. Kirkby (1987) Principles of plant nutrition. International Potash Institute. p. 594-596.
3. Jonathan R. Cummung and A. Brian Tomsett (1992) Biogeochemistry of Trace Metals. Lewis publishers. p. 329-364.
4. 梁運眞 (1989) 環境植物學. p. 121-198. 東和技術.
5. 趙成鎭, 朴天緒, 嚴大翼 (1993) 三訂土壤學. p. 317-328. 鄉文社.
6. 金福榮, 金才正, 嚴基泰, 李奎承, 李英煥, 許種秀, 慎齋昊 (1989) 農業環境化學. p. 198. 東和技術.
7. Essington, M. E., M. Elrashidi, and R. S. Bowman (1985) Nickel and Zinc Sorption in sludge amended soils. *J. Soil Sci.* **135**, p. 228-235.
8. Cleon W. Ross (1974) Plant Phys iology Laboratory Manual. p. 118-171. Wadsworth Publishing Company.
9. Carol Reiss (1994) Experiments in plant physiology. p. 71-79. Pretice-Hall, Inc.
10. Arnon, D. I (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology.* **24**, p. 1-15.
11. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. F. Farr, and R. J (1951) Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. chem.* **193**, p. 265-275.
12. Van Assche, F. and H. Clijsters (1983) Zinc mediated effects on leaf CO₂ diffusion conductances and net photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* L. *Photosynth. Res.* **1**, p. 171-180.
13. 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**, p. 419-424.
14. Lee. J. B (1993) The Effect and Degradation of Hazardation Pollutants in the Environment.: 高等植物의 光合成機構에 對한 重金屬의 影響.: 인제 大學校 附設 環境研究所 第 2回 심포지움. p. 109-127.

Comparison of Growth and Physiological Responses in Radish for Assay of Nickel Toxicity
II. Effect of Ni on Physiological Responses in Radish

Jae-Young Cho*, Kang-Wan Han (*Department of Agricultural Chemistry, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea*)

Abstract: The present study was carried out to investigate the effect of Ni on germination, cell elongation, α -amylase activity, contents of chlorophyll and protein in radish were determined in the water culture. As the concentration of Ni was increased in the water culture, germination of radish was 55% by Ni 10 mg/kg and 30% by Ni 20 mg/kg. The ratio of cell elongation injury was 50% by two days after Ni 20 mg/kg treatment. The injury ratio of α -amylase activity was 45% in the same condition and as the time goes on, inhibition of α -amylase activity were slightly decreased. Contents of chlorophyll a and b were decreased two days after treatment and chlorophyll a was more inhibited than chlorophyll b. Also changes of the protein contents was slightly decreased. Activity of α -amylase was decreased at germination stage, contents of chlorophyll a and b were decreased at growing stage.

*Corresponding author