

## Ethylenediamine as a Promising and Biodegradable Chelating Agent in Aluminum Phytoremediation

Sangman Lee\*

*Division of Applied Biology and Chemistry, School of Applied Biosciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*

Received March 18, 2010 / Accepted May 20, 2010

Phytoextraction is a technique which uses plants to clean up metal-contaminated soils. Recently, various chelating agents were introduced into this technique to increase the bioavailability of metals in soils. Even though the technique 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. Therefore, this research focuses on identifying chelating agents which are biodegradable and applicable to highly metal-contaminated areas. Aluminum (Al) 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 Al to analyze the effect on plant growth. His slightly diminished the inhibitory effect of Al on root growth of plants, whereas, Cys, citrate, malate, oxalate, and succinate did not show significant effects. Both EDTA and EDA strongly diminished the inhibitory effect of Al on root growth. The effect of EDA is correlated with decreased Al uptake into the plants. In conclusion, as a biodegradable chelating agent, EDA is a good candidate for highly Al-contaminated areas.

**Key words** : Aluminum, chelate, metal, phytoextraction, phytoremediation

### 서 론

빠르게 발전을 거듭하는 전 세계적인 산업화와 현대적인 농업 기술의 발달로 인해서 환경오염 문제는 심각하다. 이는 생태계를 파괴하고 생물의 안전을 위협하는 심각한 요소이기 때문에 오염된 환경은 정화되어야 한다[26]. 예전부터 사용된 물리적 화학적 방법의 환경정화는 빠르고 간편하다는 커다란 장점이 있는데 비해 비용이 비싸 오염된 모든 지역을 정화하기란 현실적으로 어렵고 또한 토양을 황폐화시키는 큰 문제점이 존재한다[23].

식물과 미생물을 이용한 생물학적 환경정화는 비용이 저렴해서 경제적이며, 아주 적은 오염물질의 농도에서도 효과적으로 사용이 가능하며 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[3,16]. 식물환경정화는 phytoextraction, phytostabilization, phytovolatilization, rhizofiltration 등의 세부적인 방법으로 분류되며 phytoextraction은 토양에 존재하는 금속이 식물의 뿌

리를 통해서 식물 내로 들어와 식물의 잎이나 줄기에 축적이 되면 이를 수거해서 따로 처리하는 방법이다[4,11,24].

알루미늄은 이온 상태인  $Al^{3+}$ 로 식물의 뿌리에서 흡수 되어 식물 내에 존재하는 oxalate와 결합하여 1:3 비율인 Al-oxalate로 안정화되어 식물에 직접적인 피해를 주지 않는다. 뿌리에서 흡수된 알루미늄은 잎으로 이동될 때 물관에서 Al-oxalate가 Al-citrate (1:1) 형태로 전환되어 이동하여 잎에 도착하게 되면 다시 Al-oxalate (1:3)로 형태가 바뀌게 된다[17]. 알루미늄은 식물대사에서 알려진 기능이 없는 불필요한 금속으로서 중성 토양에서는 물에 용해가 되지 않는 상태로 식물에 직접적인 피해를 주지 않는다. 하지만 토양의 pH가 4.5 이하로 내려가 산성이 되면 알루미늄은 급격한 변화를 일으켜 토양액에 용해되어 식물에게 심각한 해를 끼친다[18]. 실제 전 세계적으로 농경지의 40% 정도는 산성 토양이기 때문에 알루미늄에 의한 농작물의 피해는 작물 생산량에 걸림돌이 되는 주된 요소로 작용한다[13,20].

EDTA는 phytoextraction에서 다양한 중금속 추출에 자주 사용되는 chelate로서의 장점이 있는데 비해서[5] 환경에서 자연적인 분해가 잘 일어나지 않아 새로운 환경오염문제를 야기한다. 따라서 최근에는 자연적인 생분해가 잘 일어나는 친환경적인 킬레이트에 대한 연구가 활발이 일어나고 있으며 그 대표적인 것으로 식물의 뿌리에서 토양으로 분비되는 분자량이 적은 유기산(LMWOA, low molecular weight organic

#### \*Corresponding author

Tel : +82-53-950-7345, Fax : +82-53-953-7233

E-mail : sangman@knu.ac.kr

acid)과 EDDS (ethylenediamine disuccinic acid)이다[6,8,14, 15,19,21].

현재까지의 phytoextraction에 관한 연구는 토양에 존재하는 금속을 식물 내로 흡수가 용이하도록 하는 것에 주력을 해 왔다[1,2,9,10,27]. 하지만 생물학적정화의 단점은 오염물질의 농도가 너무 높으면 생물이 정화는 물론 성장도 불가능하다는 것이다. 따라서 본 연구는 고농도의 금속이 오염된 지역에서도 생물학적정화가 가능하게 하는 것을 목적으로 대표적인 금속 오염물질로 알루미늄을 선택하였으며 고농도의 알루미늄이 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 0.8% 고체 배지를 수직상태에서 7일간 배양하였으며 배양 조건은 23°C에서 18시간 빛을 쬐었다. 배지에는 다양한 농도의 알루미늄( $AlCl_3$ )과 여러 킬레이트(Cys, His, malic acid, citric acid, succinic acid, oxalic acid, EDTA, EDA)를 조합하여 처리하였으며 배양을 마친 후 식물의 뿌리 길이를 자를 이용하여 측정하였다.

#### 알루미늄 농도 분석

배양을 마친 식물을 초순수로 5번 세척하였고 이를 70°C에서 식물 무게의 변화가 없을 때까지 오븐에서 건조시켰다. 건조된 샘플을 가루로 만든 후  $HNO_3$  (65%)와  $H_2O_2$  (30%)를 포함하는 용액을 넣고 120°C에서 8 시간 배양하여 샘플을 분해시켰다. 분해를 마친 샘플은 140°C에서 건조를 시킨 후 희석된 질산용액으로 다시 용해시켰다. 알루미늄의 양 측정은 inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES; Thermo Jarrell Ash, Franklin, MA)을 이용하여 분석하였다.

### 결과 및 고찰

금속이온은 산소, 질소, 그리고 황 원자에 대해서 반응성이 크다[7]. 따라서 아미노산 중에서 시스테인(Cys)과 히스티딘(His)의 R기에 존재하는 황과 질소는 금속이온과 결합하는 경향이 강하다. 시스테인은 생물의 중금속 해독작용과 세포 내 금속의 항상성 유지에서 중요한 역할을 하는 단백질(예, metallothioneins) 또는 폴리펩타이드(예, phytochelatin)의 주된 구성 성분으로서 카드뮴, 구리, 아연 등과 chelation 하는데

관여를 하고 있다[23,25]. 반면에 히스티딘은 니켈과 chelation에 관여하여 해독 작용에서 중요한 역할을 한다[12,22]. 따라서 이 두 아미노산이 식물의 알루미늄 흡수하는데 있어 어떻게 영향을 미치는지를 알아보았다(Fig. 1). 히스티딘의 처리 농도가 500  $\mu M$  이하면 식물의 성장이 거의 영향을 받지 않으며 이러한 농도 이상으로 처리하면 식물의 성장은 점차적으로 억제된다. 식물의 성장은 고농도인 500  $\mu M$  알루미늄 존재 하에서 심하게 억제되었는데 이 조건에서 히스티딘 처리는 알루미늄에 의한 식물의 성장 억제가 약간 줄어드는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 시스테인은 처리 농도가 250  $\mu M$  이상이 되면 식물의 성장을 현저하게 억제하는데 이러한 억제는 200  $\mu M$  알루미늄이 존재하는 경우에서도 비슷한 패턴으로 나타났다(Fig. 1B). 이러한 결과는 히스티딘에 의해서 식물 안으로 알루미늄 흡수가 적게 되어 알루미늄에 의한 식물 성장 억제가 완화되었으며 시스테인은 식물의 알루미늄 흡수에 별다른 영

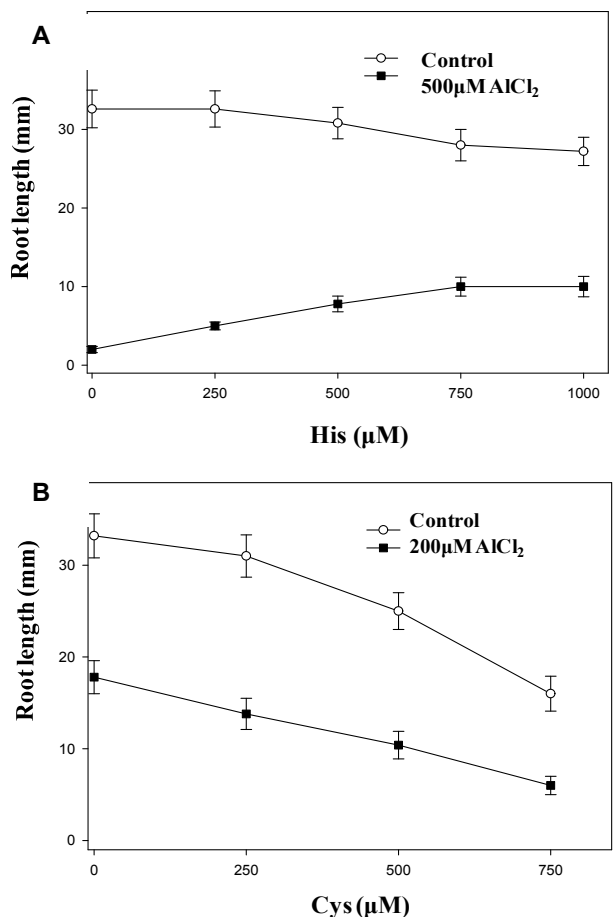


Fig. 1. Effects of histidine and cysteine on growth of *Arabidopsis* roots under aluminum stress. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing  $AlCl_3$  with various concentrations of either histidine (A) or cysteine (B). Afterward, root lengths were measured. Values are means±SE of 30 seedlings.

향을 주지 않는 것으로 추정할 수 있다.

생물의 세포에서 생성되는 citrate, malate, oxalate, 그리고 succinate 같은 저분자 형태의 유기산은 금속 스트레스에 대한 저항성에 관여 하는데 이는 이들이 여러 금속과 chelation을 하기 때문이다[6,15,19,21]. 예를 들어서 citrate는 카드뮴, 니켈, 아연에 대한 저항성에 관여를 하고 있으며, malate는 아연에 대해서 저항성을 가지고 있다. 따라서 저분자의 유기산이 알루미늄의 식물 내로 흡수되는 과정에서 어떠한 영향을 주는지 알아보았다(Fig. 2). 100  $\mu\text{M}$  citrate는 식물의 성장에 별다른 영향을 주지 않는 농도이지만 250  $\mu\text{M}$  citrate는 식물 성장을 억제하는 농도이다. 배지에 첨가된 100 또는 250  $\mu\text{M}$  Citrate는 알루미늄에 의한 식물 성장 억제 효과에 별다른 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2A). Malate는 처리 농도가 250  $\mu\text{M}$  되어도 식물의 성장에는 별다른 영향을 주지 않았지만 농도가 500  $\mu\text{M}$ 이 되면 식물의 성장을 억제한다. 배지에 첨가한 malate는 citrate 경우처럼 알루미늄에 의한 식물 성장 억제에 별

다른 영향을 주지 않았다(Fig. 2B). Oxalate도 처리 농도가 250  $\mu\text{M}$  되어도 식물의 성장에 별다른 영향을 주지 않았으며 알루미늄에 의한 식물 성장 억제에 미치는 효과도 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 2C). Citrate도 처리 농도가 250  $\mu\text{M}$  일 때 식물 성장에 큰 영향은 없는 것으로 간주되며 또한 알루미늄이 미치는 식물의 성장에도 별다른 영향이 없는 것으로 보인다(Fig. 2D). 이러한 결과들은 식물이 알루미늄 스트레스를 대처하기 위해서 여러 유기산을 뿌리를 통해 분비하고 알루미늄이 식물 내로 흡수되는 것을 억제하여 알루미늄에 의한 식물의 성장 억제를 덜 받는다는 사실과 부합되지 않지만 본 실험 조건에서는 유기산이 알루미늄 스트레스를 완화시켜주는 결과를 볼 수 없었다[13,17,20]. 본 연구 결과들이 기존의 알려진 결과들과 차이를 나타내는 정확한 이유는 모르지만 아마도 기존의 실험 조건들은 pH4.5인 수용액을 사용한 것과 처리한 알루미늄의 농도는 대개 20  $\mu\text{M}$  정도로 낮게 처리하였는데 이러한 조건이 본 실험조건과 차이가 있어 결과도 차이를 보

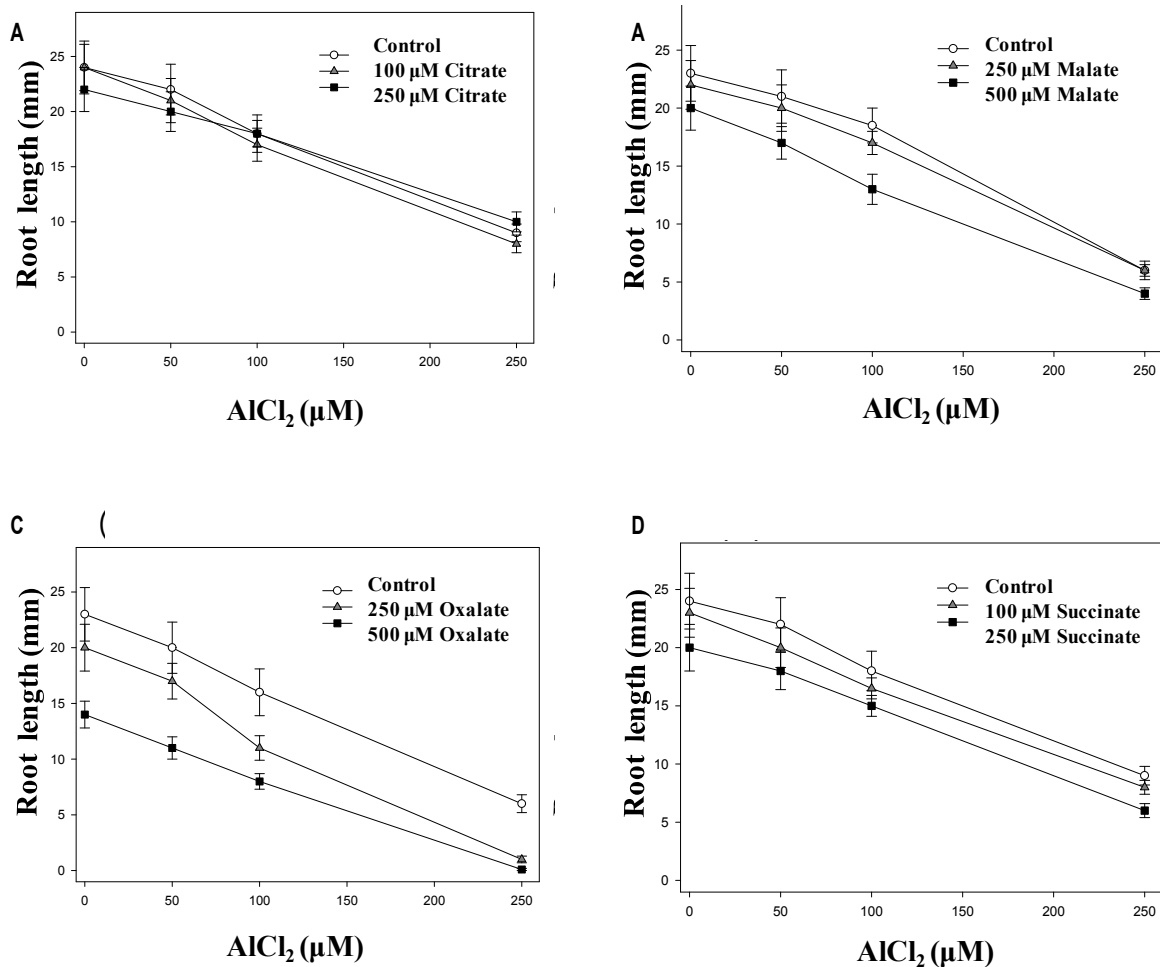


Fig. 2. Effects of citrate, malate, oxalate, and succinate on growth of *Arabidopsis* roots under aluminum stress. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing various combinations of both AlCl<sub>3</sub> and chelating agents, (A), citrate; (B), malate; (C), oxalate and (D), succinate. Afterward, root lengths were measured. Values are means $\pm$ SE of 30 seedlings.

였을 거라고 추측한다.

EDTA는 polyamino carboxylic acid으로서 구조식은  $[CH_2N(CH_2CO_2H)_2]_2$ 이며  $Ca^{2+}$ 과  $Fe^{3+}$ 의 킬레이트로서 잘 알려져 있다. EDA (ethylenediamine)의 구조식은  $C_2H_4(NH_2)_2$ 로 화학공장에서 여러 화학물질 생산에 사용되고 있으며  $[Co(EDA)_3]^{3+}$  형태로 전형적인 킬레이트 리간드로 작용한다. 비록 EDTA는 생분해가 잘 되지 않는 물질이지만 다양한 금속에 강력한 킬레이트로 작용하는 것으로 잘 알려져 있어 비교 대상으로 본 연구에 포함시켰다. EDTA는 처리 농도가 500  $\mu M$  되어도 식물의 성장에는 별다른 영향을 보이지 않았지만 고농도의 알루미늄의 처리에 의해서 식물의 성장이 억제되는 영향을 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 3A). 이는 EDTA가 식물의 알루미늄 흡수를 강하게 억제한 결과라고 추정된다. EDA도 처리 농도가 500  $\mu M$ 에서 식물의 성장에 별다른 영향

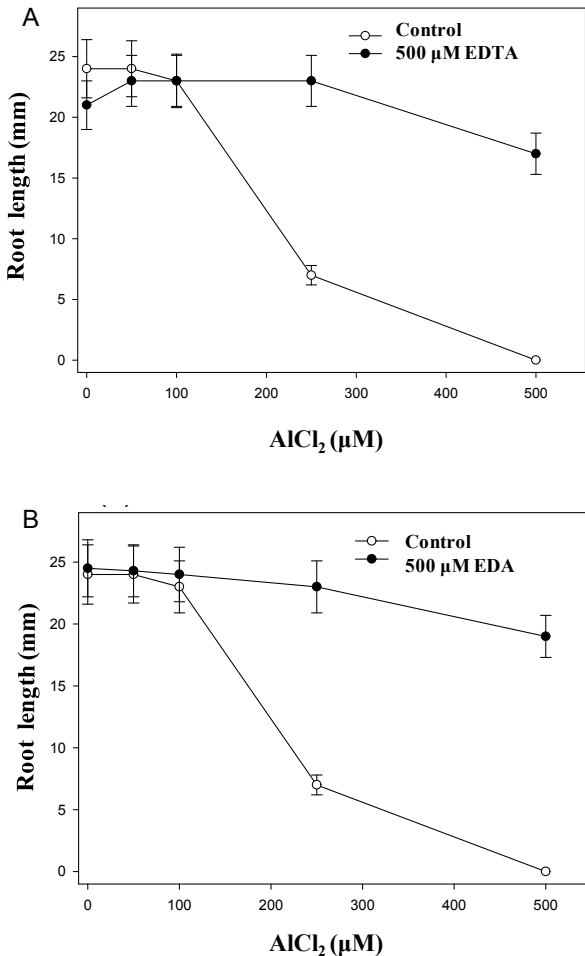


Fig. 3. Effects of EDTA and EDA on growth of *Arabidopsis* roots under aluminum stress. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing various concentrations of  $AlCl_3$  with either 200  $\mu M$  EDTA (A) or 200  $\mu M$  EDA (B). Afterward, root lengths were measured. Values are means $\pm$ SE of 30 seedlings.

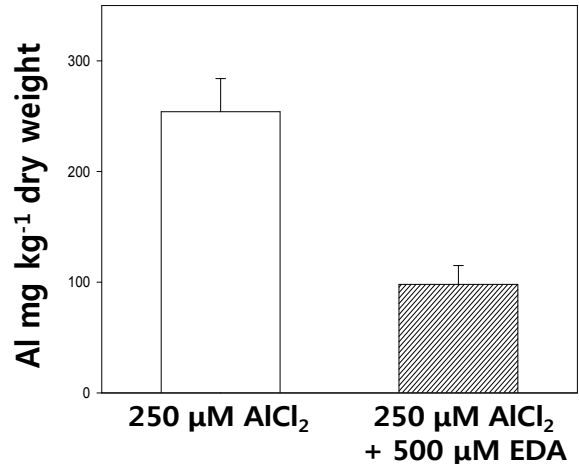


Fig. 4. Effect of EDA on aluminum concentration in *Arabidopsis* seedlings. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing 250  $\mu M$   $AlCl_3$  with or without 500  $\mu M$  EDA. Afterward, aluminum concentrations were measured by ICP-AES. Values are means $\pm$ SE of 3 replicates.

을 보이지 않았지만 EDTA 처리 경우와 유사하게 알루미늄에 의한 식물의 성장억제가 현저하게 줄어든 것으로 나타났다 (Fig. 3B). 알루미늄에 의한 식물의 성장 억제 효과가 EDA 처리에 의해서 감소되지만 이 효과는 EDTA에서 보여준 것보다 약간 더 효과적인 것으로 나타났다. 이는 EDA가 식물에서 알루미늄 흡수를 억제하는 효과가 EDTA보다 약간 더 강력하다는 것을 암시한다. EDA의 영향이 실제로 식물 내로 알루미늄이 흡수되는 것을 억제하였기 때문인지 확인하기 위해서 식물 내 축적되는 알루미늄의 농도를 분석하였다(Fig. 4). 실험 결과는 EDA가 식물 내로 흡수되는 알루미늄의 양을 현저하게 억제한 것으로 나타났다.

본 연구 결과는 고농도의 알루미늄으로 오염된 토양을 식물을 이용하여 정화할 때 식물이 오염된 지역에서 생장이 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: 20070301033009)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사 드립니다.

### References

- Blaylock, M. J., D. E. Salt, S. Dushenkov, O. Zakharova, C. Gussman, Y. Kapulnik, B. D. Ensley, and I. Raskin. 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 860-865.

2. Cooper, E. M., J. T. Sims, J. W. Cunningham, J. W. Huang, and W. R. Berti. 1999. Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *J. Environ. Qual.* **28**, 1709-1719.
3. Cunningham, S. D. and D. W. Ow. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* **110**, 715-719.
4. Ebbs, S. D. and L. V. Kochian. 1998. Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*), and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ. Sci. Technol.* **32**, 802-806.
5. Epstein, A. L., C. D. Gussman, M. J. Blaylock, U. Yermiyahu, J. W. Huang, Y. Kapulnik, and C. S. Orser. 1999. EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant Soil* **208**, 87-94.
6. Godbold, D. L., W. J. Horst, J. C. Collins, D. A. Thurman, and H. Marschner. 1984. Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. *J. Plant Physiol.* **116**, 59-69.
7. Goyer, R. A. 1997. Toxic and essential metal interactions. *Annu. Rev. Nutr.* **17**, 37-50.
8. Grčman, H., D. Vodnik, Š. Velikonja-Bolta, and D. Leštan. 2003. Ethylenediaminedisuccinate as a new chelate for environmentally safe enhanced lead phytoextraction. *J. Environ. Qual.* **32**, 500-506.
9. Hong, J. and P. N. Pintauro. 1996. Selective removal of heavy metals from contaminated kaolin by chelators. *Water Air Soil Pollut.* **87**, 73-91.
10. Huang, J. W., J. J. Chen, W. R. Berti, and S. D. Cunningham. 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 800-805.
11. Kayser, A., K. Wenger, A. Keller, W. Attinger, H. R. Felix, S. K. Gupta, and R. Schulin. 2000. Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd, and Cu from calcareous soil: the use of NTA and sulfur amendments. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 1778-1783.
12. Kerkeb, L. and U. Krämer. 2003. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Asylum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiol.* **131**, 716-724.
13. Kochian, L. V. 1995. Cellular mechanisms of Al toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 237-260.
14. Kos, B. and D. Leštan. 2003. Influence of biodegradable ([S,S]-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogen modified soil water sorption capacity on Pb phytoextraction and leaching. *Plant Soil* **253**, 403-411.
15. Krishnamurti, G. S. R., G. Cielinski, P. M. Huang, and K. C. J. vanRees. 1998. Kinetics of cadmium release from soils as influenced by organic acids: Implementation in cadmium availability. *J. Environ. Qual.* **26**, 271-277.
16. Lombi, E., F. J. Zhao, S. J. Dunham, and S. P. McGrath. 2001. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *J. Environ. Qual.* **30**, 1919-1926.
17. Ma, J. F. and S. Hiradate. 2000. Form of aluminum for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) *Planta* **211**, 355-360.
18. MacDonald, T. and R. B. Martin. 1988. Al ion in biological systems. *Trends Biol. Sci.* **13**, 15-19.
19. Mathys, W. 1977. The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants. *Physiol. Plant* **40**, 130-136.
20. Matsumoto, H. 2000. Cell biology of aluminium toxicity and tolerance in higher plants. *International Rev. Cytol.* **200**, 1-46.
21. Mench, M., J. L. A. MorelGuckert, and B. Gruillet. 1988. Metal binding with root exudates of low molecular weight. *J. Soil Sci.* **39**, 521-527.
22. Sagner, S., R. Kneer, G. Wanner, J. P. Cosson, B. Deus-Neumann, and M. H. Zenk. 1998. Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* **47**, 339-347.
23. Salt, D. E., R. D. Smith, and I. Raskin. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **49**, 643-668.
24. Shen, Z. G., X. D. Li, C. C. Wang, H. M. Chen, and H. Chua. 2002. Lead phytoextraction from contaminated soil with high-biomass plant species. *J. Environ. Qual.* **31**, 1893-1900.
25. Stillman, M. J., C. F. Shaw, and K. T. Suzuki. 1992. metallothioneins, synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatins and metal-thiolate complexes, VCH, New York
26. Wagner, G. J. 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agra* **51**, 173-212.
27. Wu, J., F. C. Hsu, and S. D. Cunningham. 1999. Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake and translocation constraints. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 1898-1904.

초록 : 알루미늄 식물학적정화에 사용 가능하고 생분해 되는 킬레이트로 후보로서의 ethylenediamine

이 상 만\*

(경북대학교 응용생명과학부)

Phytoextraction은 식물을 이용하여 환경 정화하는 한 기술로서 금속으로 오염된 토양을 정화하는 것이다. 토양에 존재하는 금속의 추출을 용이 하기 위해서 현재 다양한 킬레이트가 사용되고 있다. Phytoextraction이 경제적이고 친환경적인 장점이 있지만 고농도로 오염된 지역에서는 적용이 어려운데 이는 식물이 이러한 지역에서 살아남기 어렵기 때문이며 이러한 문제점을 해결하는 것이 본 연구의 목적이다. 연구 대상의 금속으로서 알루미늄을 선택하였고, 킬레이트는 아미노산인 시스테인과 히스티딘, 작은 크기의 유기산으로서 citric acid, malic acid, succinic acid, oxalic acid, 그리고 ethylenediamine (EDA)를 선택하였으며, EDTA는 비교 대상으로 본 연구에 사용되었다. 다양한 농도의 알루미늄을 포함하는 배지에 식물을 키우면서 여러 킬레이트가 식물의 뿌리 성장에 미치는 영향을 분석하였다. 알루미늄에 의한 식물의 성장 억제에 히스티딘에 의해서 약간 완화되었으며 시스테인, citrate, malate, oxalate, 그리고 succinate는 별 다른 영향이 없었다. EDTA와 EDA는 알루미늄에 의한 식물 성장 억제를 강력하게 억제하였으며 이는 알루미늄의 식물 내 흡수를 억제에 의한 것이다. 따라서 알루미늄의 식물성장억제를 강력하게 완화시켜주는 EDA는 고농도의 알루미늄으로 오염된 지역에 식물의 성장이 가능하도록 유용하게 사용될 수 있을 것이다.