

Original Article

## Effect of Various Biodegradable Chelating Agents on Root Growth of Plants under Mercury Stress

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*

### 생분해되는 다양한 킬레이트들이 수은에 노출된 식물의 뿌리성장에 미치는 영향

이상만\*

*경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부*

Received: May 19 2014 / Revised: July 9 2014 / Accepted: July 9 2014

**Abstract** Phytoextraction is a technique that uses plants to remediate metal-contaminated soils. However, this technique cannot be applied in highly metal-contaminated areas, as plants cannot normally grow under such conditions. Therefore, this study investigated the introduction of various biodegradable chelating agents to increase the bioavailability of metals in highly metal-contaminated areas. Mercury (Hg) was selected as the target metal, while cysteine (Cys), histidine (His), malate, succinate, oxalate, citrate, and ethylenediamine (EDA) were used as biodegradable chelating agents. Plants were grown on agar media containing various chelating agents and Hg to analyze the effect on plant root growth. Cys and EDA were both found to diminish the inhibitory effect of Hg on plant root growth, whereas His, citrate, and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) did not show any significant effects, and malate, succinate, and oxalate even promoted the inhibitory effect of Hg on plant root growth. Thus, Cys and EDA would seem to be promising biodegradable chelating agents for highly Hg-contaminated areas.

**Keywords:** chelate, mercury, metal, phytoextraction, phyto-remediation

## 서론

전 세계적으로 급속하게 발전을 거듭했던 산업화와 현대적인 농업 기술의 발달로 인해서 부수적으로 배출되는 환경오염물질의 문제는 심각한 상태에 이르렀다. 정도의 차이는 있겠지만 환경오염물질은 생태계를 파괴하고 생물의 안전성을 위협하는 심각한 요소이기 때문에 가급적 빠른 시일 내에 오염된 물질을 독성을 제거하거나 약화시키는 정화의 과정이 필수적이다(Wagner, 1993). 일반적으로 사용되는 물리화학적 방법의 환경정화는 고농도의 오염물질을 단기간에 정화하는데 적합한 반면에 비용이 크기 때문에 저 농도로 오염된 지역까지 정화하기란 현실적으로 어렵고 또한 이차적으로 토양을 황폐화시키는 단점이 존재한다(Shen et al., 2002).

생물학적 환경정화는 식물 및 미생물을 이용하며 기존의 물리화학적 방법과 비교하여 비용이 저렴하고 저 농도의 오염물질 정화에 적합하며 오염지역을 파괴하지 않는 친환경적이다. 식물을 이용하여 오염된 토양과 수질을 정화하는 식물환경정화(phytoremediation)는 친환경적으로 정화하는 환경복원 기술이다(Ebbs et al., 1998; Salt et al., 1999). 식물환경정화의 한 부분인 phytoextraction은 토양에 오염된 독성 금속이 식물의 뿌리를 통해서 흡수되어 식물의 잎이나 줄기에 축적이 되면 이를 수거해서 안전하게 처리하는 방법이다(Epsteine et al., 1999; Wu et al., 1999).

수은(Hg)은 일반적으로 독성이 없는 mercuric sulfide (HgS) 형태로 자연에 존재하지만 주로 화석연료와 의료 폐기물 연

\*Corresponding author: Sangman Lee  
Tel: 82-53-950-7345; Fax: 82-53-953-7233  
E-mail: sangman@knu.ac.kr

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.

© 2014 Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University

소에 의해서 오염물질로 배출된다. 오염지역에 존재하는 수은은 mercuric form ( $Hg^{2+}$ ), mercurous form ( $Hg_2^{2+}$ ), elemental mercury ( $Hg^0$ ), methyl 또는 ethyl mercury (alkylated form) 형태로 존재하나 methyl mercury는 methylating bacteria에 의해서 생성되며 독성이 강해서 인간에게 심각한 악 영향을 준다 (Boening, 2000).

EDTA는 다양한 중금속을 추출하는 chelate로 효과는 크지만 자연 환경에서 분해가 잘 되지 않는 단점이 존재하여 새로운 환경오염문제를 유발한다(Kos and Leštan, 2003). 이러한 문제를 해결하기 위해서 자연적인 생분해가 잘 일어나는 chelate에 대한 연구가 도입되었으며 그 예로서 식물의 뿌리에서 토양으로 분비되는 분자량이 적은 유기산(LMWOA, low molecular weight organic acid)과 EDDS (ethylenediamine disuccinic acid)이다(Godbold et al., 1984; Mench et al., 1988; Krishnamurti et al., 1997; Grčman et al., 2003; Kos and Leštan, 2003).

토양에 존재하는 금속을 정화하는 phytoextraction의 주된 연구는 식물이 뿌리를 통해서 금속 흡수를 잘하도록 하는 것이지만(Cooper et al., 1999; Kayser et al., 2000) 오염물질의 농도가 너무 높으면 식물이 정화는 물론 성장도 불가능하다는 것이다. 따라서 본 연구는 고농도의 금속이 오염된 지역에서도 phytoextraction이 가능하게 하는 것을 목적으로 상대적으로 연구가 미흡한 수은을 선택하였으며 고농도의 수은이 존재하는 조건에서도 식물이 성장이 가능하며 생분해가 잘 되는 친환경적인 chelate 선별에 연구 초점을 두었다.

**재료 및 방법**

**식물재료 및 성장조건**

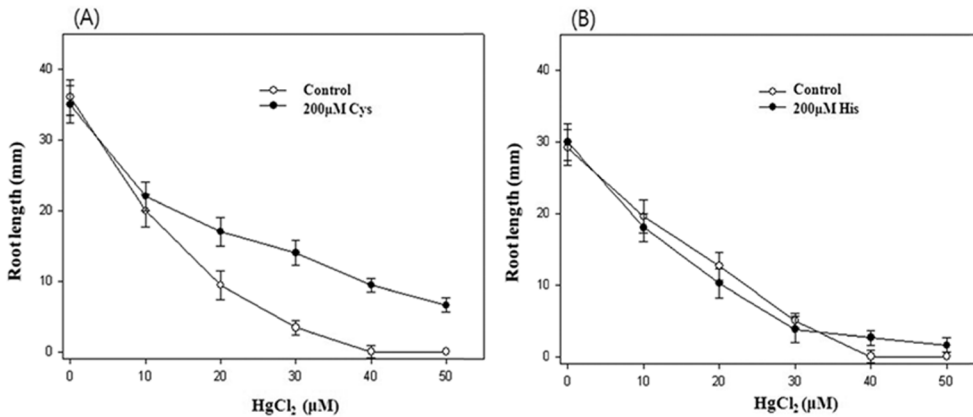
애기장대(*Arabidopsis thaliana* cv. Columbia)의 야생형(wild-type) 씨를 반 농도의 Murashige & Skoog 염, 2%(w/v) sucrose(pH 5.8)를 포함하는  $100 \times 100 \times 15 \text{ mm}^2$  plates의 0.8% agar 배지를 수직상태에서 7일간 배양하였으며 배양 조건은 23°C에서 18시간 빛을 쬐었다. 배지에는 다양한 농도의 수은( $HgCl_2$ )과 여러 chelate (Cys, His, malic acid, citric acid, succinic acid, oxalic acid, EDTA, or EDA)를 조합하여 처리

하였으며 배양을 마친 후 식물의 뿌리 길이를 자를 이용하여 측정하였다.

**결과 및 고찰**

일반적으로 금속이온은 산소, 질소, 그리고 황 원자에 대해서 반응성이 큰 것으로 알려졌다 (Grčmanman et al., 2003). 아미노산인 시스테인(Cys)과 히스티딘(His)의 R기에 존재하는 황과 질소는 금속이온과 결합하는 경향이 강하다. 특히 시스테인은 세포의 중금속 해독작용과 세포 내 금속의 항상성 유지에서 중요한 역할을 하는 단백질(예, metallothioneins) 또는 폴리펩타이드(예, phytochelatin)의 주된 구성 성분으로서 대표적 중금속인 카드뮴(Cd), 구리(Cu), 아연(Zn) 등과 chelation에 관여한다(Cunningham and Ow, 1996). 히스티딘은 니켈(Ni)과 결합하여 니켈 해독 작용에서 중요한 역할을 한다고 알려졌다(Kerkeb and Krämer, 2003). 따라서 이러한 두 종류의 아미노산이 뿌리를 통한 식물의 수은 흡수에 어떻게 영향을 미치는지를 알아보았다. 실험 조건에서 시스테인과 히스티딘의 처리 농도가 200  $\mu\text{M}$ 에서 식물의 성장은 거의 영향을 받지 않았다. 식물의 뿌리 성장은 수은의 농도가 10  $\mu\text{M}$  이상에서 현저하게 억제되었지만 동시에 처리된 시스테인에 의해서 억제 정도가 완화되었음을 알 수 있다(Figure 1A). 하지만 동시에 처리한 히스티딘은 별다른 영향을 보이지 않았다(Figure 1B). 이러한 결과는 시스테인이 수은과 결합하여 수은이 식물 뿌리로 흡수되는 것을 억제하지만 히스티딘은 그러하지 못함을 추정할 수 있다.

Citrate, malate, oxalate, succinate 등의 저분자 형태의 유기산은 금속과 결합하여 금속 때문에 발생하는 스트레스에 대한 저항성 증가에 관여한다(Mench et al., 1988; Krishnamurti et al., 1997). 예를 들어서 citrate는 카드뮴, 니켈, 아연에 대한 저항성에 관여를 하고 있으며, malate는 아연에 대해서 저항성을 가지고 있다. 따라서 저분자의 유기산이 수은의 식물 내로 흡수되는 과정에서 어떠한 영향을 주는지 알아보았다. 이번 실험에서 처리한 4종류의 유기산의 농도가 200  $\mu\text{M}$  되어도 식물의 성장에는 별다른 영향을 주지 않았다. 배지에 첨가한

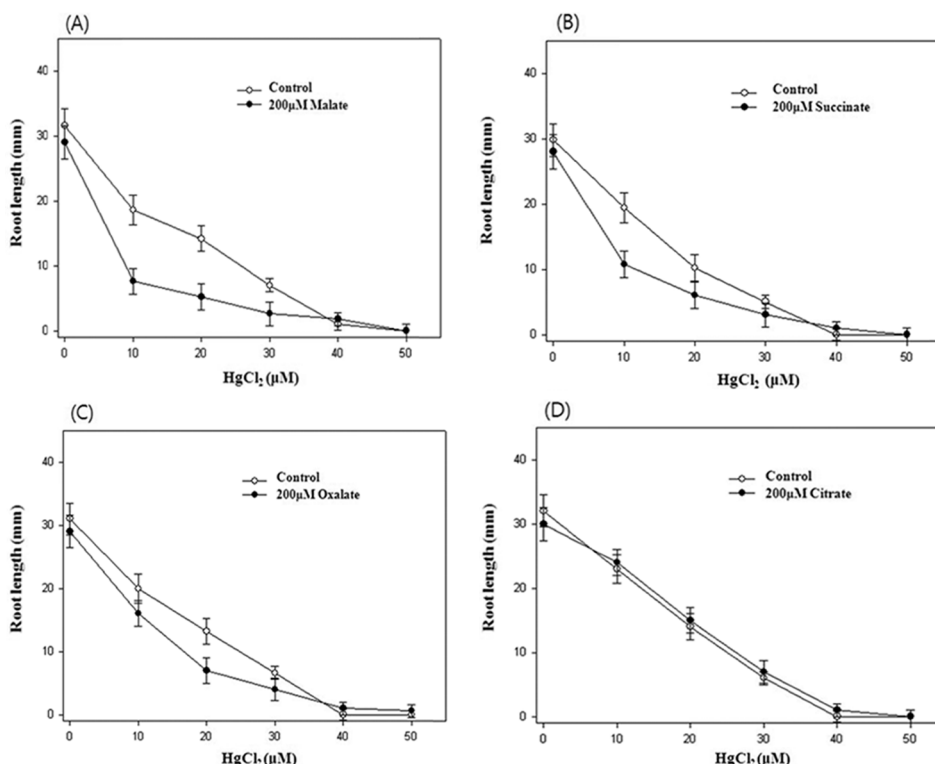


**Figure 1.** Effects of cysteine and histidine on growth of *Arabidopsis* roots under mercury stress. The *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing  $HgCl_2$  with various concentrations of cysteine (A) or histidine (B). Values are means  $\pm$  SE of 30 seedlings.

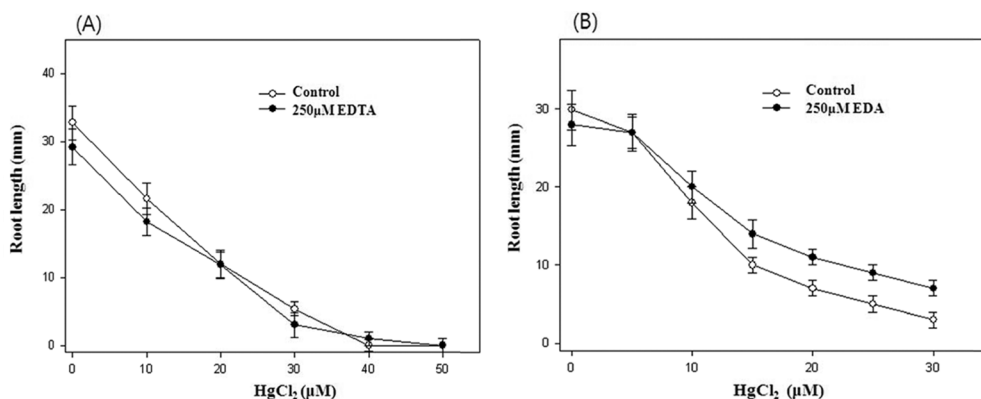
200  $\mu\text{M}$  malate는 수은에 의한 식물의 뿌리성장 억제효과를 더 심화시켰으며 특히 수은 농도가 10  $\mu\text{M}$ 에서 두 배 정도 더 억제된 것으로 나타났다(Figure 2A). 배지에 200  $\mu\text{M}$  succinate를 첨가한 경우도 수은에 의한 식물의 뿌리성장 억제 효과를 증대하였지만 malate 경우와 비교하여 억제 정도는 약간 덜한 것으로 나타났다(Figure 2B). 배지에 200  $\mu\text{M}$  oxalate를 첨가한 경우도 수은에 의한 식물의 뿌리성장 억제 효과를 증대하였지만 succinate 경우와 비교하여 억제 정도는 약간 덜한 것으로 나타났다(Figure 2C). 배지에 200  $\mu\text{M}$  citrate를 첨가한 경우는 수은에 의한 식물의 뿌리성장 억제 효과에 별다른 영향을 보이지 않았다(Figure 2D). 이러한 결과들은 citrate를 제외한

나머지 malate, succinate, oxalate 유기산이 수은의 식물 뿌리 성장 억제를 더 심화시키는 것은 수은이 식물 뿌리로 흡수되는 것을 더 촉진 시키는 것으로 추정된다.

EDTA는 인간에 의해서 인위적으로 합성된 polyaminocarboxylic acid으로서 구조식은  $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$ 이며 일반적으로 칼슘과 철의 chelate로서 알려져 있다. EDA(ethylenediamine)는 구조식은  $\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$ 로서 EDTA의 일부분이며 화학공장에서 여러 화학물질 생산에 사용되며 전형적인 chelate ligand로 작용한다. 비록 EDTA는 생분해가 잘 안 되는 물질이지만 다양한 금속에 강력한 chelate로 작용하는 것으로 잘 알려져 있어 참고 대상으로 본 연구에 포함시켰다. 본 실험조건에서 EDTA와 EDA



**Figure 2.** Effects of malate, succinate, oxalate, and citrate on growth of *Arabidopsis* roots under mercury stress. The *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing various combinations of  $\text{HgCl}_2$  and chelating agents: (A) malate, (B) succinate, (C) oxalate, and (D) citrate. Values are means  $\pm$  SE of 30 seedlings.



**Figure 3.** Effects of EDTA and EDA on growth of *Arabidopsis* roots under mercury stress. The *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing various concentrations of  $\text{HgCl}_2$  and 250  $\mu\text{M}$  EDTA (A) or 200  $\mu\text{M}$  EDA (B). Values are means  $\pm$  SE of 30 seedlings.

는 처리 농도가 250  $\mu\text{M}$  되어도 식물의 뿌리성장에는 별다른 영향을 보이지 않았다. 배지에 250  $\mu\text{M}$  EDTA를 첨가한 경우 수은에 의한 식물의 뿌리성장 억제 효과에 별다른 영향을 보이지 않았다(Figure 3A). 배지에 250  $\mu\text{M}$  EDA를 첨가한 경우에는 시스테인 효과와 유사하게 수은에 의한 식물의 뿌리성장 억제를 완화시키는 것으로 나타났다(Figure 3B). 이는 EDA가 시스테인 경우처럼 정도는 덜하지만 식물에서 수은 흡수를 억제하는 효과 있다는 것을 암시한다.

본 연구 결과는 고농도의 수은으로 오염된 토양을 식물을 이용하여 정화할 때 식물이 오염된 지역에서 성장이 가능하고 정화도 가능하게 해주는 친환경적인 킬레이트로서 시스테인과 EDA가 또한 저 농도의 수은으로 오염된 지역은 malate, succinate, oxalate가 적절한 후보임을 제시를 하며 실제로 현장에서 적용이 가능한지는 앞으로 더 연구가 수행되어야 할 것이다.

## 요 약

Phytoextraction은 식물을 이용하여 환경 정화하는 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 수은을 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 수은을 포함하는 배지에 식물을 키우면서 여러 킬레이트가 식물의 뿌리 성장에 미치는 영향을 분석하였다. 수은에 의한 식물의 성장 억제는 시스테인과 EDA에 의해서 완화되었으며 히스티딘과 citrate는 별 다른 영향이 없었다. Malate, succinate, 그리고 oxalate는 수은에 의한 식물 성장 억제를 더 촉진시켰다. 따라서 수은의 식물성장억제를 완화시켜주는 시스테인과 EDA는 고농도의 수은으로 오염된 지역에서 식물의 성장이 가능하도록 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

**주요 추가어:** 킬레이트, 수은, 금속, 식물금속추출, 식물환경정화

## References

- Boening DW (2000) Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* 40: 1335-1351.
- Cooper EM, Sims JT, Cunningham JW, Huang JW, Berti WR (1999) Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *J Environ Qual* 28: 1709-1719.
- Cunningham SD, Ow DW (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol* 110: 715-719.
- Ebbs SD, Kochian LV (1998) Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*), and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ Sci Technol* 32: 802-806.
- Epstein AL, Gussman CD, Blaylock MJ, Yermiyahu U, Huang JW, Kapulnik Y, Orser CS (1999) EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant Soil* 208: 87-94.
- Godbold DL, Horst WJ, Collins JC, Thurman DA, Marschner H (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.
- Grčman H, Vodnik D, Velikonja-Bolta Š, Leštan D (2003) Ethylenediaminedisuccinate as a new chelate for environmentally safe enhanced lead phytoextraction. *J Environ Qual* 32: 500-506.
- Kayser A, Wenger K, Keller A, Attinger W, Felix HR, Gupta SK, Schulin R (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.
- Kerke L, Krämer U (2003) The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiol* 131: 716-724.
- Kos B, Leštan D (2003) Influence of a biodegradable ([S,S]-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogel modified soil water sorption capacity on Pb phytoextraction and leaching. *Plant Soil* 253: 403-411.
- Krishnamurti GSR, Cieslinski G, Huang PM, van Rees KCJ (1997) Kinetics of cadmium release from soils as influenced by organic acids: Implication in cadmium availability. *J Environ Qual* 26: 271-277.
- Mench M, Morel JL, Guckert A, Guillet B (1988) Metal binding with root exudates of low molecular weight. *J Soil Sci* 39: 521-527.
- Salt DE, Smith RD, Raskin I (1998) Phytoremediation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 643-668.
- Shen ZG, Li XD, Wang CC, Chen HM, Chua H (2002) Lead phytoextraction from contaminated soil with high-biomass plant species. *J Environ Qual* 31: 1893-1900.
- Wagner GJ (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agro* 51: 173-212.
- Wu J, Hsu FC, Cunningham SD (1999) Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake, and translocation constraints. *Environ Sci Technol* 33: 1898-1904.