

ORIGINAL ARTICLE

엽록소형광분석을 이용한 담수산 클로렐라(*Chlorella vulgaris*)에 미치는 중금속의 영향 평가

오순자¹⁾ · 고석찬*

제주대학교 생물학과 · 기초과학연구소, ¹⁾농촌진흥청 온난화대응농업연구소

Assessment of Heavy Metal Effects on the Freshwater Microalga, *Chlorella vulgaris*, by Chlorophyll Fluorescence Analysis

Soon-Ja Oh¹⁾, Seok-Chan Koh*

Department of Biology and Research Institute for Natural Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

¹⁾Research Institute of Climate Change and Agriculture, RDA, Jeju 690-150, Korea

Abstract

The response of the freshwater microalga, *Chlorella vulgaris*, to heavy metal stress was examined based on chlorophyll fluorescence analysis to assess the toxic effects of heavy metals in freshwater ecosystems. When toxic effects were analyzed using regular chlorophyll fluorescence analysis, photosystem II activity (F_v/F_m) decreased significantly when exposed to Cu^{2+} and Hg^{2+} for 12 h, and decreased in the order of $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+}$ when exposed for 24h. The effective photochemical quantum yield (Φ'_{PSII}), chlorophyll fluorescence decrease ratio (R_{Fd}), minimal fluorescence yield (F_o), and non-photochemical quenching (NPQ), but not photochemical quenching (qP), responded sensitively to Hg^{2+} , Cu^{2+} , and Cd^{2+} . These results suggest that F_v/F_m , as well as Φ'_{PSII} , R_{Fd} , F_o , and NPQ could be used to assess the effects of heavy metal ions in freshwater ecosystems. However, because many types of heavy metal ions and toxic compounds co-occur under natural conditions, it is difficult to assess heavy metal toxicity in freshwater ecosystems. When *Chlorella* was exposed to heavy metal ions for 12 or 24h, F_v/F_m and maximal fluorescence yield (F_m) changed in response to Hg^{2+} and Cu^{2+} based on image analysis. However, assessing quantitatively the toxic effects of several heavy metal ions is challenging.

Key words : *Chlorella vulgaris*, Heavy metal ions, Image analysis, Photosystem II activity (F_v/F_m)

1. 서론

중금속은 바위나 토양 광물의 풍화에 의해서 자연적으로도 발생되지만 대부분의 경우 생물이 이용할 수 없는 형태이며 낮은 농도로 존재한다. 그러나 공장에서 발생하는 산업폐기물이나 폐수를 비롯한 인간의 활동에 의해서 방출되는 중금속들은 농도가 높은 상태로 존재한다.

특히 수은(Hg), 카드뮴(Cd), 납(Pb) 등의 식물체 내 독성 작용은 잘 알려져 있다. 이들 중금속은 세포 내에 일정 농도 이상으로 존재하게 되면 식물의 물질대사와 생장을 저해하고, 심각한 경우 식물의 고사를 야기한다(Jarvis *et al.*, 1976). 그리고, 이들 중금속들은 엽록소 분자의 마그네슘(Mg^{2+})과 치환되며, 이러한 과정에 의해 형광 양자 수율의 저하와 형광 스펙트럼의 변화를 초래하기도 한다

Received 26 July, 2015; Revised 16 November, 2015;

Accepted 26 November, 2015

*Corresponding author : Seok-Chan Koh, Department of Biology and Research Institute for Natural Sciences, 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.

(Küpper *et al.*, 1996). 또한 중금속은 세포의 구조적 이상과 효소활성의 억제와 단백질 변성 등을 초래하고, 중요한 미량원소의 흡수기작을 교란시키기도 한다(Clijsters and Van Assche, 1985; Aidid and Okamoto, 1992).

중금속의 위해성은 이화학적 분석 방법을 통해 특정 유해물질을 정량하고 기준치와 비교하여 정밀하게 평가할 수 있으나, 이 방법은 측정과정이 복잡할 뿐만 아니라 비용이 많이 들고, 생물체에 미치는 영향을 직접적으로 판단하는데 어려움이 있다. 따라서 유해물질이 생물체에 미치는 영향은 생물검정법을 이용하여 직접적으로 평가되고 있으며, 주로 먹이사슬 내 하위 생산자나 소비자 생물종들을 대상으로 조사되고 있다(Blinova, 2004; Aruoja *et al.*, 2009). 특히, 미세조류는 생태계의 먹이사슬에서 하위단계에 속하는 식물종으로 중금속에 민감하게 반응하여 OECD(Organisation for Economic Co-Operation and Development, 1984)와 US EPA (US Environmental Protection Agency, 1996)에서도 독성영향을 평가하는데 사용되고 있다. 수생태계의 독성 평가에 사용되고 있는 주요 생물군은 규조류 9종, 녹조류 15종, 대형수생식물 3종이 있으며(An *et al.*, 2007), *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Euglena* 등의 미세조류를 이용한 연구들이 활발히 수행되고 있다. 특히, *Chlorella*는 고등식물과 유사한 대사과정을 가지고 있으면서 세포 분열 능력이 뛰어나 빠른 속도로 증식할 뿐만 아니라, 중금속 제거 효과도 높고 담수 또는 해수 등의 다양한 서식처에서 생활을 하기 때문에 수생태계의 환경오염을 평가하는데 있어 유용하다(Oh and Koh, 2013; Plekhanov and Chemeris, 2003; Travieso *et al.*, 1999).

한편, 엽록소형광 분석법은 광합성 기구 중에서도 광계II(Photosystem II; PSII)의 반응을 비파괴적으로, 그리고 객관적으로 신뢰할 수 있는 측정 방법 중 하나이며, 광합성 기구에 대한 여러 가지 중요한 정보를 제공한다(Strasser and Strasser, 1995; Serôdio *et al.*, 1997). 본 연구자들은 전보에서 *Chlorella*를 대상으로 형광이미지와 O-J-I-P 분석 등을 통해 Hg^{2+} 의 영향을 평가하고 *Chlorella*의 환경지표 생물로의 활용 가능성과 수는 독성을 초기에 진단하는 데 있어 형광분석의 유용함을 제시한 바 있다(Oh and Koh, 2013). 그러나 수생태계 내에는 Hg^{2+} 이외에도 다양한 중금속들이 용해되어 존재할 수 있는 바, 다양한 중금속을 대상으로 생물체에 미치

는 그 위해 효과를 신속하게 평가할 필요가 있다.

본 연구는 엽록소형광 분석법을 통해 6종의 중금속 이온이 담수산 녹조류인 *Chlorella vulgaris*(strain KMCC FC-012)에 미치는 영향을 조사하고 중금속의 영향을 신속하게 평가할 수 있는 형광변수들을 살펴보았다.

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 *et al.*, 1988; Oh and Koh, 2013). 조제된 배지는 Millipore membrane filter(0.45 μ m)로 여과한 후 일정량씩 배양 용기에 분주하여 121 $^{\circ}$ C, 15 psi 조건에서 15분간 멸균시켰다. 배양은 25 \pm 1 $^{\circ}$ C의 온도조건과 약 50 μ mole/m²/sec(16h)의 광조건 하에서 100 rpm으로 진탕 배양하였으며 2주 간격으로 계대 배양하였다. 중금속의 영향을 살펴보기 위해서는 배양액에 최종농도가 0, 100, 200 μ M 이 되도록 다양한 중금속 이온(Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+})을 첨가하여 배양하였다. 중금속 이온은 염화염 형태를 사용하였으며, 모든 실험은 4회 실시하였고 매 회마다 3-4 반복씩 수행하였다.

2.2. 엽록소형광 분석

중금속 독성에 대한 *Chlorella*의 미세한 반응을 정량적으로 제시하고 중금속 간의 차이를 비교하기 위하여 중금속의 종류와 농도를 달리하여 *Chlorella*를 배양한 후, Imaging Fluorometer(FluorCam 700MF, Photon System Instruments, Czech)를 이용하여 quenching analysis를 수행하였다. 즉, 각각의 시료를 일정량 취하여 15분간 광을 차단하여 암적응시킨 후 100 μ mole/m²/sec의 actinic light와 1,500 μ mole/m²/sec의 saturation light를 조사하고 F_v/F_m 을 비롯한 다양한 형광변수(F_o , Φ'_{PSII} , R_{Fd} , qP , NPQ)들을 산출하였다(Table 1). 그리고 형광이미지는 위와 동일한 방법으로 암적응시키고 빛을 조사한 후 방출되는 형광을 CCD 카메라로 포획하였으며(Nedbal *et al.*, 2000), saturation light 조사 후 1,000

Table 1. Definition of Chlorophyll fluorescence parameters determined from the chlorophyll fluorescence induction kinetics measured with the imaging fluorometer

Parameter	Equation	Definition	Reference
F_o		Minimal fluorescence yield of dark-adapted PSII	Serôdio <i>et al.</i> , 1997 Rysgaard <i>et al.</i> , 2001
F_m		Maximal fluorescence yield of dark-adapted PSII	Serôdio <i>et al.</i> , 1997 Rysgaard <i>et al.</i> , 2001
F_v/F_m	$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$	Maximum quantum yield of dark-adapted PSII	Schreiber <i>et al.</i> , 1986 Genty <i>et al.</i> , 1989
F_o'		Minimal fluorescence yield of light-adapted PSII	Serôdio <i>et al.</i> , 1997 Rysgaard <i>et al.</i> , 2001
F_m'		Maximal fluorescence yield of light-adapted PSII	Serôdio <i>et al.</i> , 1997 Rysgaard <i>et al.</i> , 2001
F		Steady-state fluorescence at any light level ($F = F_s'$)	
Φ'_{PSII}	$\Phi'_{PSII} = (F_m' - F)/F_m'$	Effective photo-chemical quantum yield	Schreiber <i>et al.</i> , 1986 Genty <i>et al.</i> , 1989
R_{Fd}	$R_{Fd} = (F_m' - F) - 1$	Chlorophyll fluorescence decrease ration	Lichtenthaler <i>et al.</i> , 2005
qP	$qP = (F_m' - F)/(F_m' - F_o')$	Photochemical quenching	Schreiber <i>et al.</i> , 1986 Horton <i>et al.</i> , 1999
NPQ	$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$	Non-photochemical quenching	Bilger and Björkman, 1990

ms와 3,960 ms에서 방출되는 형광으로부터 각각 초기형광수율(F_o)과 최대형광수율(F_m) 이미지를 얻었고, 이로부터 광계II 활성(F_v/F_m)의 이미지를 산출하였다.

2.3. 통계분석

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 통계 package(SPSS Inc., Release 7.5)를 이용하였으며, 분산분석에 이은 Duncan의 다중검정($P < 0.05$)으로 평균치 간의 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 중금속의 종류와 처리시간에 따른 광계II 활성의 양적 변화

본 연구는 수생태계 내에서 생물체에 미치는 중금속의 독성을 정량적으로 나타내기 위하여 수행되었으며, 이를 위해 *Chlorella vulgaris*(strain KMCC FC-012)를 대상으로 중금속의 종류와 처리시간에 따라 광계II 활성, 즉 F_v/F_m 값을 산출하여 제시하였다(Table 2). 여섯

가지 중금속 이온에 대한 *Chlorella*의 F_v/F_m 값의 변화를 살펴보면, Hg^{2+} 의 독성이 가장 높았으며, 뒤이어 $Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+}$ 순으로 나타났다. 처리시간에 따른 차이를 보면, 중금속에 노출시킨 후 12시간이 경과하였을 때에는 Hg^{2+} , Cu^{2+} 와 Cd^{2+} 에서는 각각의 농도에 따라 F_v/F_m 값이 다소 감소하였으며, Mg^{2+} , Ni^{2+} 와 Zn^{2+} 에서는 F_v/F_m 값의 변화가 없거나 미미하였다. 그러나, 24시간이 경과하였을 때에는 Hg^{2+} , Cu^{2+} 와 Cd^{2+} 에서는 F_v/F_m 값이 크게 감소하였으며 다른 중금속에서도 다소 감소하여 미약하게나마 *Chlorella*가 중금속의 영향을 받고 있음이 확인되었다. 특히, Hg^{2+} 에서는 농도가 높거나 배양 시간이 길어질수록 F_v/F_m 값이 크게 감소하여 Hg^{2+} 의 독성이 가장 높은 것으로 나타났다. 이는 고농도의 Hg^{2+} 이 *Chlorella* 세포에 영향을 미쳐 엽록소를 분해하거나 합성을 저해하여 황백화 현상을 유도할 뿐만 아니라, 반응중심을 포함한 모든 엽록소분자들의 빛 흡수용량을 감소시킨 결과로 볼 수 있다(Oh and Koh, 2013). 또한 F_v/F_m 값은 Cu^{2+} 를 첨가한 배지에서도 농도가 높거

Table 2. The maximal quantum yield of dark-adapted PSII (F_v/F_m) of *Chlorella vulgaris* exposed to six heavy metal ions

Metal concentration	Maximal quantum yield of dark-adapted PS II (F_v/F_m)					
	Cd ²⁺	Cu ²⁺	Hg ²⁺	Mg ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺
(A) Before exposure (0h)						
Control	0.75±0.01 ^a	0.75±0.01 ^a	0.75±0.01 ^a	0.75±0.01 ^{ab}	0.75±0.01 ^{ab}	0.75±0.01 ^a
(B) After 12h exposure						
Control	0.76±0.01 ^a	0.76±0.01 ^a	0.76±0.01 ^a	0.76±0.01 ^a	0.76±0.01 ^a	0.76±0.01 ^a
100µM	0.71±0.02 ^{ab}	0.70±0.02 ^{ab}	0.62±0.02 ^b	0.75±0.01 ^{ab}	0.75±0.01 ^{ab}	0.75±0.01 ^a
200µM	0.68±0.02 ^{bc}	0.65±0.03 ^{bc}	0.54±0.03 ^c	0.75±0.01 ^{ab}	0.75±0.01 ^{ab}	0.75±0.01 ^a
(C) After 24h exposure						
Control	0.75±0.01 ^a	0.74±0.01 ^a	0.75±0.01 ^a	0.74±0.01 ^{ab}	0.75±0.01 ^{ab}	0.75±0.01 ^a
100µM	0.70±0.02 ^b	0.63±0.03 ^c	0.46±0.01 ^d	0.73±0.01 ^b	0.73±0.01 ^{bc}	0.73±0.01 ^b
200µM	0.65±0.03 ^c	0.57±0.04 ^d	0.35±0.01 ^e	0.74±0.01 ^{ab}	0.72±0.01 ^c	0.73±0.01 ^b

The results are expressed as means ± SDs. The values represent the mean of 3-4 repetitions. Different letters superscripted on each column represent significant differences among treatments by Duncan's multiple test ($p < 0.05$).

나 배양 시간이 길어질수록 점차적으로 감소하였으며, Cd²⁺ 처리구에서도 Cu²⁺에서의 반응과 유사하게 나타났다.

광계II 활성은 생체막이 고농도의 유해물질에 노출되거나 또는 저농도이더라도 장기간 동안 노출되면 광합성 기구의 구조적인 변화가 초래되어 낮아질 수 있다. 담수산 *Chlorella*를 중금속의 종류와 농도별로 비교적 짧은 시간인 12시간 동안 노출시켰을 때에도 Hg²⁺, Cu²⁺와 Cd²⁺에서는 F_v/F_m 값이 농도에 따라 감소하였다(Table 2). 녹조류인 *Scenedesmus obliquus*에서도 Cu²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺, Cr²⁺ 등에 의해 F_v/F_m 이 감소하는데, 이는 광계II에서 광계I으로의 전자전달이 감소하거나 부분적으로 차단됨으로써 Q_A의 재산화율이 낮아져 전자전달이 저해되기 때문이다(Mallick and Mohn, 2003). 남세균인 *Spirulina platensis*에서도 Hg²⁺에 노출되었을 때 F_v/F_m 이 감소된다고 보고된 바 있다(Lu *et al.*, 2000). 그리고, 녹조류인 *Scenedesmus quadricauda*와 수생 관속 식물인 *Callitriche stagnalis*, 붕어마름(*Ceratophyllum demersum*), *Elodea canadensis*에서도 Hg²⁺을 포함한 여러 가지 중금속이 엽록소의 분해, 순광합성률의 저하, 형광 스펙트럼의 변화를 초래하는 것으로 보고되었다

(Küpper *et al.*, 1996). Cu²⁺는 필수원소로 잘 알려져 있으며 상대적으로 생물체에 불필요한 Cd²⁺이 독성이 강할 것으로 예측했으나, Fig. 3과 Table 2에서 살펴본 바와 같이 *Chlorella*는 Cu²⁺에 의한 광합성 기구 억제 효과가 더 높은 것으로 나타났다. 이와 유사하게 규조류인 *Skeletonema costatum*의 개체군 성장률을 이용한 연구에서도 Cu²⁺가 Cd²⁺보다 독성이 더 높은 것으로 보고되었다(Hwang *et al.*, 2014). 또한 녹조류인 *Scenedesmus obliquus*에서도 Cd²⁺보다 Cu²⁺에 대한 독성이 더 높은 것으로 보고되었는데, F_v/F_m 이 Cd²⁺에서는 500 µM 일 때 대략 50% 감소한데 반해 Cu²⁺에서는 200 µM 이상의 농도에서 대조구에 비해 40% 이하로 감소하였다(Mallick and Mohn, 2003). 한편, Mg²⁺과 Zn²⁺에서는 *Chlorella*의 F_v/F_m 값이 변화가 없거나 감소 정도가 미미한 것으로 나타났다. Zn²⁺은 효소의 보조인자로서 중요한 기능을 담당하고 있어 미세조류를 포함한 모든 생명체의 정상적인 생장에 필요한 필수 미량원소이며(Chaoui *et al.*, 1997), 결핍시 빈약한 성장과 낮은 건조 중량으로 나타난다(Shrotri *et al.*, 1981). 그러나 다른 중금속과 마찬가지로 고농도로 존재할 때에는 Zn²⁺도 세포막에 영향을 주며 결국에는 투과성 증가, 전해질의 용

출을 초래할 수 있다. Mg^{2+} 도 적절한 농도로 배지에 첨가하였을 때 미세조류의 성장을 촉진시키는 것으로 보고되었다(Ulloa *et al.*, 2012). *Monoraphidium* sp. FXY-10도 100 μM 의 Mg^{2+} 을 첨가하여 배양하였을 때 대조구보다 더 크게 성장하여 Mg^{2+} 이 조류의 세포성장 및 지질 축적에 중요한 기능을 갖고 있음을 알 수 있다(Huang *et al.*, 2014). Mg^{2+} 은 광합성 기구에서 클로로필 분자의 중심원자로서 광합성 활성의 주요 기능을 갖고 있을 뿐만 아니라 세포막의 안정성을 유지하는데 있어서도 중요한 인자이다. 따라서 본 연구에서 *Chlorella* 배양에 첨가한 Mg^{2+} 과 Zn^{2+} 의 농도는 독성을 유발할 정도가 아닌 것으로 사료된다.

3.2. 중금속의 종류에 따른 엽록소형광 변수의 양적 변화

광계II 활성을 의미하는 F_v/F_m 이외에도 여러 가지 엽록소형광 변수들이 독성물질들의 영향을 평가하는데 이용될 수 있다(Oh and Koh, 2013). 본 연구에서는 중금속의 종류와 농도를 달리하여 12시간 동안 배양한 후 초기형광수율(F_0), 광계II의 광화학적 양자수율(Φ'_{PSII}), 형광감소량(R_{Fd}), 광화학적 소멸(qP), 비광화학적 소멸(NPQ) 등의 형광변수들을 산출하여 제시하였다(Fig. 1과 2).

먼저 F_0 값은 중금속의 종류와 농도에 따라 다소의 변화가 감지되었다(Fig. 1A). 즉, Cu^{2+} 와 Hg^{2+} 처리구에서는 대조구에 비해 F_0 값이 감소하였으며, Cd^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} 처리구에서는 오히려 다소 증가하였다. 다만 Cu^{2+} 처리구에서는 농도에 관계없이 F_0 값이 감소하였으나, Hg^{2+} 처리구에서는 100 μM 에서는 대조구에 비해 F_0 값이 증가하였으며, 200 μM 에서는 크게 감소하였다. Φ'_{PSII} 는 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 처리구에서 감소하였다(Fig. 1B). 그리고 R_{Fd} 는 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 처리구에서 감소하였으며, Ni^{2+} 처리구에서도 미약하게나마 감소하였다(Fig. 1C). Φ'_{PSII} 은 빛에 노출된 상태에서 열린 광계II 반응중심이 포획한 여기에너지의 효율성을 의미하며, 이 값의 감소는 중금속이나 제초제와 같은 광계II를 저해하는 독성물질에 의해 전자전달이 차단됨으로써 광계II에서의 전자 흐름이 감소하고 있음을 나타낸다(Schreiber *et al.*, 1986; Genty *et al.*, 1989). Fig. 1B에서 보는 바와 같이 *Chlorella*에 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 을 낮은 농도로 짧

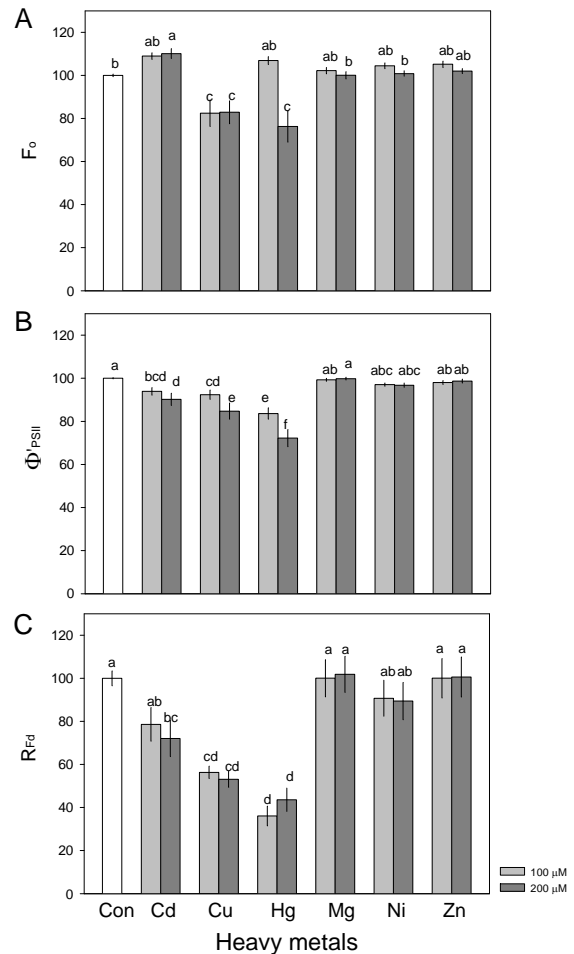


Fig. 1. Fluorescence parameters (F_0 , Φ'_{PSII} , and R_{Fd}) of *Chlorella vulgaris* exposed for 12h to six heavy metal ions. The results are expressed as means \pm SDs. Each value represents the mean of 3-4 repetitions. Different letters on the column represent significant differences among treatments by Duncan's multiple test ($p < 0.05$).

은 시간 동안 노출시켰을 때에도 Φ'_{PSII} 이 낮아지는 것이 확인되었다. 완두(*Pisum sativum* L.)의 유식물체에서도 Cd^{2+} 을 처리하였을 때 Φ'_{PSII} 가 감소하였으며, 이는 안테나 복합체의 기능적 장애의 결과인 것으로 알려지고 있다(Balakhina *et al.*, 2005). R_{Fd} 는 광합성능 또는 CO_2 고정률을 반영하며(Lichtenthaler *et al.*, 2005), 포화광하에서 측정된 R_{Fd} 값이 CO_2 고정률과 유의성 있는 상관관계를 보이는 것으로 보고되었다(Lichtenthaler *et al.*,

2005). Fig. 1C에서 보는 바와 같이 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 을 낮은 농도로 짧은 시간 동안 노출시켰을 때에도 R_{Fd} 값이 크게 감소하였다. 이로부터 *Chlorella*가 이들 중금속에 노출되었을 때 광합성능이 영향을 받고 있음을 알 수 있다. 그리고, Fig. 1A에서 보는 바와 같이 12시간으로 짧은 시간동안 노출시켰음에도 불구하고 초기형광수용 F_o 도 또한 Cu^{2+} 와 Hg^{2+} 처리구에서 감소하였다. F_o 는 광계 II에 있는 기저상태의 엽록소분자들이 들뜬 후 에너지가 반응중심으로 이동하기 이전에 나오는 형광을 의미하는데(Bolhàr-Nordenkamp and Öquist 1993), 이 값은 총 엽록소 함량에 비례하기 때문에 미세조류의 연구에서 바이오매스를 추정하는 척도로 이용되고 있다(Rysgaard *et al.*, 2001). 따라서, 초기형광 F_o 의 감소는 Cu^{2+} 와 Hg^{2+} 에 의해 세포가 사멸되었거나 엽록소 함량이 감소한 때문이라고 할 수 있다. 이는 선행연구에서 200 μM 이상의 Hg^{2+} 처리구에서 4시간 동안 *Chlorella*를 배양하였을 때, F_o 와 F_v/F_m 값의 감소와 더불어 엽록소 함량이 크게 감소한 사실로도 알 수 있다(Oh and Koh, 2013). 따라서 Fig. 1B와 1C에서 100 μM 이상의 Cu^{2+} 또는 200 μM 이상의 Hg^{2+} 에 12시간 동안 노출된 *Chlorella*에서 관찰되는 Φ'_{PSII} 나 R_{Fd} 의 감소는 세포의 구조적 손상이나 사멸 또는 엽록소 함량의 감소에 의한 결과일 수 있다.

qP는 중금속 처리에 의해 다소 감소하기는 하였으나 그 정도가 미미하였으며 특이적으로 200 μM Hg^{2+} 에서는 다소 증가하는 양상을 보였다(Fig. 2A). NPQ는 Cu^{2+} 와 Hg^{2+} 처리구에서는 감소하였으며, Cd^{2+} 처리구에서는 다소 증가하였다(Fig. 2B). qP는 광계II의 초기 전자수용체인 Q_A 의 redox상태에 의해 결정되며 전자전달에 사용되는 에너지를 의미한다(Horton *et al.*, 1999). Fig. 2A에서 살펴본 바와 같이 qP는 12시간 중금속 처리에 의해 다소 감소하기는 하였으나 그 정도가 미미하였다. 애기장대(*Arabidopsis thaliana* L. cv. Heynh) 유묘에서도 100 μM 의 Cu^{2+} 와 Cd^{2+} 에 노출되었을 때 qP가 15시간까지는 변화가 없다가 48시간이 경과하였을 때 감소하기 시작하여 144시간이 경과되었을 때 크게 감소하였다(Maksymiec *et al.*, 2007). NPQ는 Cu^{2+} 와 Hg^{2+} 처리구에서는 감소하였으며, Cd^{2+} 처리구에서는 다소 증가하였다(Fig. 2). 따라서 중금속 이온의 영향을 신속하게 평가하는 데 있어서는 NPQ가 qP에 비해 유용한 변수인

것으로 보인다. NPQ의 감소는 광합성 색소의 손상과 관련되어 있으며, 유독성 화학물에 노출되었을 때 나타난다(Ricart *et al.*, 2010; Bilger and Björkman, 1990). 따라서, Fig. 2B의 Cu^{2+} 와 Hg^{2+} 처리구에서 NPQ의 감소는 광합성 색소의 손상에 의한 결과로 해석할 수 있다. 이는 Fig. 1A에서 Cu^{2+} 와 Hg^{2+} 처리시 초기형광 F_o 의 감소는 세포가 사멸되었거나 엽록소 함량이 감소한 결과라고 본 해석과도 일치한다. 그리고 Cd^{2+} 에 노출되었을 때 *Chlorella*의 NPQ 값이 증가하여 Cd^{2+} 처리 농도가 전자전달을 제한하지만 광계II의 반응중심과 광합성 색소의 손상을 야기할 정도가 아닌 것으로 보인다. 유채(*Brassica napus* L.)의 유묘에 500 μM Cd^{2+} 을 처리하였을 때에도 *Chlorella*의 Cd^{2+} 에 대한 반응과 유사하게 F_v/F_m , Φ'_{PSII} , qP, R_{Fd} 가 감소하고 NPQ가 증가하였다(Wan *et al.*, 2011).

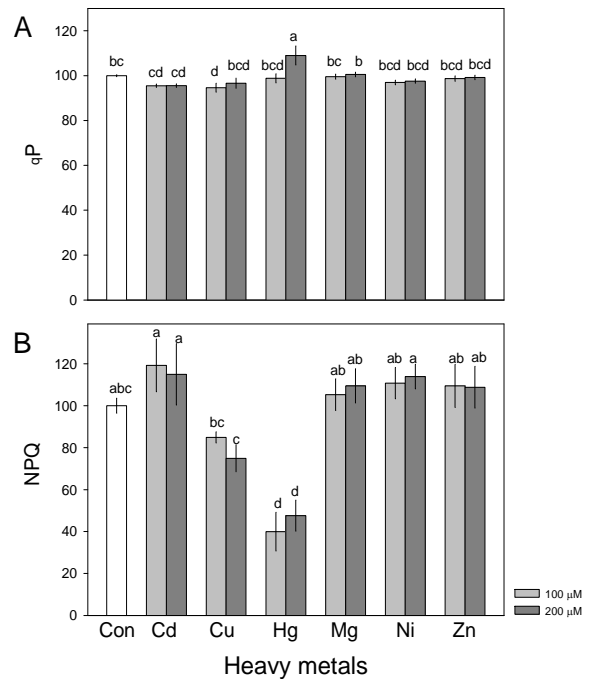


Fig. 2. Fluorescence parameters (qP, and NPQ) of *Chlorella vulgaris* exposed for 12h to six heavy metal ions. The results are expressed as means \pm SDs. Each value represents the mean of 3-4 repetitions. Different letters on the column represent significant differences among treatments by Duncan's multiple test ($p < 0.05$).

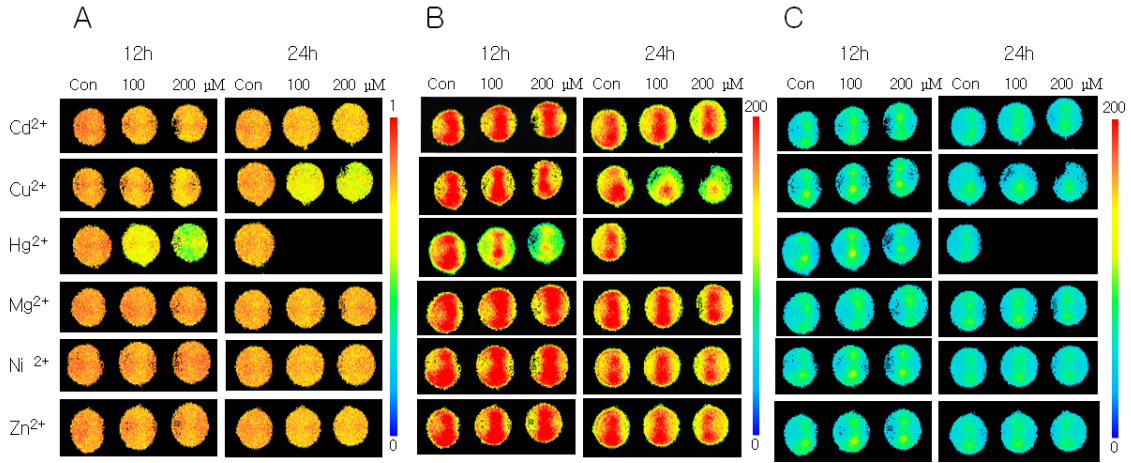


Fig. 3. Chlorophyll fluorescence images (F_v/F_m , F_m , and F_o) of *Chlorella vulgaris* exposed to six heavy metal ions. The images were taken 12h and 24h after the exposure to six heavy metal ions. The Chl fluorescence intensity are given in the changes of false colors as shown in right-sided bars. A, photosystem II activity (F_v/F_m); B, maximal fluorescence yield (F_m); C, minimal fluorescence yield (F_o)

따라서, 중금속 이온의 독성을 짧은 시간 내에 정량적으로 파악하는데 있어 F_v/F_m 을 포함하여 Φ_{PSII} , R_{Fd} , F_o , NPQ와 같은 형광변수들은 유용한 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다.

3.3. 중금속의 종류와 처리시간에 따른 엽록소형광 이미지의 변화

엽록소형광 이미지 분석은 황백화 현상 등 가시적인 징후가 발현되기 전에 시각적으로, 그리고 신속하게 중금속의 독성을 평가할 수 있어 중금속의 영향을 진단하는데 유용하게 활용될 수 있다(Oh and Koh, 2013). 담수종인 *Chlorella*를 대상으로 중금속의 종류와 농도를 달리하여 24시간 동안 배양하면서 배양 시간에 따라 광계II 활성(F_v/F_m), 최대형광수율(F_m), 초기형광수율(F_o) 이미지의 변화를 살펴보았다(Fig. 3). F_v/F_m 이미지는 12시간이 경과하였을 때에는 Hg^{2+} 을 첨가한 배지에서 자란 *Chlorella*만이 Hg^{2+} 농도에 따라 적색에서 노란색 또는 녹색으로의 변화가 감지되었다. 그보다 긴 시간인 24시간이 경과하였을 때에는 Hg^{2+} 을 첨가한 배지에서는 F_v/F_m 이미지가 전혀 감지되지 않았으며, Cu^{2+} 를 첨가한 배지에서는 서서히 노란색 또는 녹색으로의 변화가 감지되었다(Fig. 3A). 그러나 Cd^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} 을 첨가한 배지에서 자란 *Chlorella*에서는 F_v/F_m 이미지가 24시

간 처리시에도 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. F_m 이미지도 F_v/F_m 이미지와 마찬가지로 12시간 동안 중금속에 노출시킨 *Chlorella*에서는 Hg^{2+} 에서만 녹색 이미지의 변화가 감지되나 24시간이 경과하였을 때에는 이미지가 전혀 감지되지 않았으며, Cu^{2+} 를 첨가한 배지에서 서서히 F_m 이미지의 가시적인 변화가 관찰되기 시작하였다(Fig. 3B). F_o 이미지는 F_v/F_m 이나 F_m 이미지의 변화와는 달리 12시간 처리시에는 모든 처리구에서 뚜렷한 차이가 감지되지 않았으며, 24시간이 경과하였을 때에는 Hg^{2+} 을 첨가한 배지에서 뚜렷한 차이를 보이나 다른 중금속에서는 그 변화를 가시적으로 판별하기가 쉽지 않았다(Fig. 3C).

따라서 Fig. 3의 엽록소형광 이미지 분석은 Hg^{2+} 과 Cu^{2+} 처럼 독성이 강한 중금속의 영향을 가시적으로 신속하게 파악하는데 있어 유용할 것으로 보인다. 그러나, 형광이미지 분석은 정량적이지는 못하여 중금속의 위해 효과를 객관적으로 제시할 수 없다는 한계가 있었다. 더군다나, Hg^{2+} 과 Cu^{2+} 이외의 중금속에 대해서는 짧은 시간에 그 위해 효과를 가시적으로 파악하기가 쉽지 않았다. 그러나 F_v/F_m 을 포함하여 Φ_{PSII} , R_{Fd} , F_o , NPQ와 같은 형광변수들은 중금속 이온의 독성을 신속하게 정량적으로 평가하는데 있어 유용할 것으로 보인다.

4. 결 론

본 연구는 담수산 녹조류인 *Chlorella vulgaris*(strain KMCC FC-012)를 대상으로 엽록소형광 분석을 수행하여 수생태계에 미치는 중금속 이온들의 영향을 평가하고 형광변수들의 환경지표로서의 활용 가능성을 살펴보았다. 광계II 활성(F_v/F_m)은 중금속 이온에 12시간 동안 노출시켰을 때에 Hg^{2+} 과 Cu^{2+} 에서 뚜렷한 감소를 보였지만, 24시간 노출시켰을 때에는 $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+}$ 순으로 감소하였다. 그리고, 중금속에 12시간 동안 노출시켰을 때 광화학적 소멸(qP)을 제외한 모든 형광변수들, 즉 광화학적 양자수율(Φ'_{PSII}), 형광감소량(R_{Fd}), 초기형광수율(F_0), 비광화학적 소멸(NPQ)들도 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 에 민감하게 반응하였다. 따라서, F_v/F_m 을 포함하여 Φ'_{PSII} , R_{Fd} , F_0 , NPQ와 같은 형광변수들은 중금속 이온의 독성을 짧은 시간 내에 정량적으로 파악하는데 있어 유용한 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다. 엽록소형광 이미지 분석은 Hg^{2+} 과 Cu^{2+} 처럼 독성이 강한 중금속의 영향을 가시적으로 판별하는데 용이하였다. 그러나, 다른 중금속을 동일 농도로 첨가한 배지에서 자란 *Chlorella*에서는 그 변화가 가시적으로 판별되지 않았다. 이들 중금속에 대해서는 차후에 고농도로 처리하거나 또는 장시간의 노출을 통해 중금속의 위해 효과를 가시적으로 살펴볼 필요가 있을 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2015학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었습니다.

REFERENCES

- 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.
- An, Y. J., Nam, S. H., Lee, J. K., 2007, Domestic test species for aquatic toxicity assessment in Korea, Korean J. Limnol., 40, 1-13 (in Korean).
- Aruoja, V., Dubourguier, H. C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009, Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*, Sci. Total Environ., 407, 1461-1468.
- Balakhnina, T., Kosobryukhov, A., Ivanov, A., Kres-lauskii, V., 2005, The effect of cadmium on CO₂ exchange, variable fluorescence of chlorophyll and the level of antioxidant enzymes in pea leaves, Russian J. Plant Physiol., 52, 15-20.
- Bilger, W., Björkman, O., 1990, Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*, Photosynth. Res., 25, 173-185.
- Blinova, I., 2004, Use of freshwater algae and duckweeds for phytotoxicity testing, Environ. toxicol., 19, 425-428.
- Bolhär-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., Scurluck, J. M. O., Bolhär-Nordenkamp, H. R., Leegood, R. C., Long, S. P., (eds.), A Field and Laboratory Manual, Chapman and Hall, London, 193-206.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H., Elferjani, E., 1997, Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Plant Sci., 127, 139-147.
- Clijsters, H., Van Assche, F., 1985, Inhibition of photosynthesis by heavy metals, Photosynth. Res., 7, 31-40.
- Genty, B., Briantais, J. M., Baker, N. R., 1989, The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, Acta Biochim. Biophys., 99, 87-92.
- Gilmore, A. M., 1997, Mechanistic aspects of xanthophyll cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves, Physiol. Plant., 99, 197-209.
- Horton, P., Ruban, A. V., Young, A. J., 1999, Regulation of the structure and function of the light harvesting complexes of photosystem II by the xanthophyll cycle. In the photochemistry of carotenoids, in: Frank, H. A., Young, A. J., Cogdell, R. J., (eds.), Kluwer, Dordrecht, 271-291.
- Huang, L., Xu, J., Li, T., Wang, L., Deng, T., Yu, X.,

- 2014, Effects of additional Mg^{2+} on the growth, lipid production, and fatty acid composition of *Monoraphidium* sp. FXY-10 under different culture conditions, *Ann. Microbiol.*, 64, 1247-1256.
- Hwang, U. K., Ryu, H. M., Lee, J. W., Lee, S. M., Kang, H. S., 2014, Toxic effects of heavy metal (Cd, Cu, Zn) on population growth rate of the marine diatom (*Skeletonema costatum*), *Korean J. Environ. Biol.*, 32, 243-249 (in Korean).
- 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.
- 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.
- Lichtenthaler, H. K., Langsdorf, G., Lenk, S., Buschmann, C., 2005, Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system, *Photosynthetica*, 43, 355-369.
- 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.
- Maksymiec, W., Wójcik, M., Krupa, Z., 2007, Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate, *Chemosphere*, 66, 421-427.
- 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, 571-579.
- Oh, S., Koh, S. C., 2013, Chlorophyll a fluorescence response to mercury stress in the freshwater microalga *Chlorella vulgaris*, *J. Environ. Sci.*, 22, 705-715 (in Korean).
- Organisation for Economic Cooperation and Development, 1984, Algal growth inhibition test. OECD guidelines for testing of chemicals 201, Paris, France.
- 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, *Biol. Bul.*, 30, 506-511.
- Ricart, M., Guasch, H., Barceló, D., Brix, R., Conceição, M. H., Geislinger, A., López de Alda, M. J., López-Doval, J. C., Muñoz, I., Postigo, C., Romani, A. M., Villagrana, M., Sabater, S., 2010, Primary and complex stressors in polluted Mediterranean rivers: pesticide effects on biological communities, *J. Hydrol.*, 383, 52-61.
- Rysgaard, S., Kühl, M., Glud, R. N., Hansen, J. W., 2001, Biomass, production and horizontal patchiness of sea ice algae in a high-Arctic fjord (Young Sound, NE Greenland), *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 223, 15-26.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W., 1986, Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer, *Photosynth. Res.*, 10, 51-62.
- Serôdio, J., Silva, J. M., Catarino, F., 1997, Nondestructive tracing of migratory rhythms of intertidal benthic microalgae using in vivo chlorophyll a fluorescence, *J. Phycol.*, 33, 542-553.
- Shrotri, C., Rathore, V., Mohanty, P., 1981, Studies on photosynthetic electron transport, photophosphorylation and CO_2 fixation in Zn^{2+} deficient leaf cells of *Zea mays*, *J. Plant Nutri.*, 3, 945-954.
- 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.
- Thompson, A. S., Rhodes, J. C., Pettman, I., 1988, Culture collection of algae and protozoa catalogue of strains, Published by CCAP, Cumbria, UK, 164.
- Travieso, L., Canizares, R. O., Borja, R., Benitez, F., Dominguez, A. R., Dupeyron, R., Valiente, V., 1999, Heavy metal removal by microalgae, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62, 144-151.
- Ulloa, G., Otero, A., Sánchez, M., Sineiro, J., Núñez, M. J., Fábregas, J., 2012, Effect of Mg, Si, and Sr on growth and antioxidant activity of the marine

- microalga *Tetraselmis suecica*, J. Appl. Phycol., 24, 1229-1236.
- US Environmental Protection Agency, 1996, Algal toxicity tiers I and II. Series 850—Ecological effects test guidelines, Washington DC.
- Wan, G., Najeeb, U., Jilani, G., Naeem, M. S., Zhou, W., 2011, Calcium invigorates the cadmium-stressed *Brassica napus* L. plant by strengthening their photosynthetic system, Environ. Sci. Pollut. Res., 18, 1478-1486.