

Cu 내성 근권 세균 *Alcaligenes* sp. KC-1의 분리 및 성장특성

홍선화 · 신기철 · 이은영*
수원대학교 환경에너지공학과

Received: May 23, 2011 / Revised: June 11, 2011 / Accepted: June 12, 2011

Characterization of Growth Inhibition and Isolation of a Copper-Resistant Rhizobacterium, *Alcaligenes* sp. KC-1. Hong, Sunhwa, Ki Chul Shin, and Eun Young Lee*. Department of Environmental and Energy Engineering, University of Suwon, Gyeonggi-do, 445-743, Korea – In this study, A bacterium with an ability to resist toxic heavy metals was isolated from reeds in wetland. The isolated strain was identified to *Alcaligenes* sp. KC-1 by 16S rDNA sequencing. Heavy metals such as Pb, Cr⁶⁺, Cd, Zn and Cu were supplied to media. The ecotoxic treat of the heavy metals on the growth of strain KC-1 was performed when the isolated strain *Alcaligenes* sp. KC-1 cultured with Cu ranging from 0 mM to 20 mM. It showed the resistance of EC₅₀(7.34 mM) and cell growth (OD_{600 nm} : 0.83 after 42 hours) when it was cultured in Cu.

Key words: *Alcaligenes* sp., EC₅₀, heavy metal, Cu-resistant bacterium

중금속은 높은 밀도의 화학적 성상을 나타내고 그로 인해 살아있는 유기체에 강한 독성 물질로 작용한다[32]. 이러한 독성은 중금속의 고유한 성질에 의해 작용하는 것이 아니다. 몇몇의 중금속은 낮은 수준의 영양분을 가지면서 강한 독성을 나타내는 중금속도 있다[32]. 예를 들어 Cu는 단백질 합성을 할 때 산화환원전위를 유도할 시에 미량의 영양소로 작용한다. 그러나 과도한 Cu는 높은 히드록실라디칼을 발생시키고 이는 지방질 과산화, 효소의 불활성화 그리고 DNA 절단 등을 야기시킨다[27]. Hg이나 Pb과 같은 다른 중금속은 유기체에 이로운 영향을 주는지에 대해 알려져 있지 않고, Cd은 신진대사를 손상시키는 독성물질로 알려져 있고, Cd과 비슷한 화학적 성질을 가지고 있는 Zn의 경우 필수 금속 대신 Zn이 결합하여 효소의 활성을 방해하는 독성 물질로 알려져 있다[14]. 이러한 중금속은 산업현장과 폐광산 주변에서 많이 배출되며[16, 21], 토양 입자에 흡착되어 장기간 생태계에 머무르며 고농도로 축적 된다[19].

생태독성을 평가하는 방법 중 미생물을 이용한 독성평가는 빠르고, 간단하며 비용이 적게 들고, 결과해석이 비교적 용이하며 적은 양의 시료를 이용하는 장점이 있다. 지금까지 알려진 미생물을 이용한 생태독성평가의 종류는 효소활성 저해평가, 유전질 손상평가, 영양소 순환을 기본으로 하는 독성평가, 생물발광 측정평가 그리고 성장 저해평가 등이 있다[11]. 이중에서도 미생물의 독성물질에 의한 성장저해의 원리를 이용한 성장저해 독성평가는 유독물질에 의해

미생물의 수가 달라지게 되기 때문에 EC₅₀, EC₂₀ 그리고 EC₁₀ 값 등과 농도에 따른 독성물질과의 반응관계로 많이 평가한다[11]. EC₅₀, EC₂₀ 그리고 EC₁₀ 값 등은 미생물성장 곡선으로부터 오염물질의 노출에 따른 성장저해 정도를 백분율로 나타낸다[22]. 지금까지 알려져 있는 독성평가에 이용되는 미생물은 *Pseudomonas putida*[1, 6], *Bacillus cereus*[22], *Methylobacterium* sp.[13], *Escherichia coli*[3] 등이 보고되고 있다. *Pseudomonas putida*는 토양과 물 그리고 슬러지에서 사는 중속영양세균으로 하수슬러지나 토양에 [1, 6], *Bacillus cereus*는 퇴적물에 존재하는 독성물질에 대한 성장저해평가에 많이 이용된다. 이 평가는 성장저해구간의 수치를 측정하여 평가한다[22]. 이와 같이 오염물질의 독성에 대한 내성평가는 오염된 지역과 종류에 따라 미생물의 종류가 달라지며, 동일 종의 미생물에서도 독성을 평가하는 방법에 따라 독성물질의 민감도와 EC₅₀, EC₂₀ 그리고 EC₁₀ 값이 달라진다[3, 11].

이에 본 연구에서는 습지에서 서식하는 갈대의 근권에서 분리한 *Alcaligenes* sp. KC-1의 중금속 내성 평가를 하고 배양 시간 별로 EC₅₀값을 조사하여 KC-1의 중금속에 대한 내성 평가를 수행하여 *Alcaligenes* sp. KC-1가 독성평가에 유용한 미생물인지 평가하고자 하였다.

중금속 내성 미생물 분리 및 동정

균주를 분리하기 위한 시료채취는 경기도 A습지의 갈대 근권토양 그리고 식물이 서식하고 있는 호수 물로부터 질소 고정능력 또는 식물성장촉진능력이 우수한 균주를 분리한 후 그 균주를 대상으로 중금속이 첨가된 배지에 배양하여 중

*Corresponding author

Tel: +82-31-220-2614, Fax: +82-31-220-2533

E-mail: ley@suwon.ac.kr

중금속에 내성이 강한 균주를 분리하였다. 균주의 질소고정 능력 및 식물성장 촉진 능력 평가는 Hong 등[7, 8, 12]의 논문을 참고하여 평가하였다. 분리된 균주는 16S rDNA 부분 염기서열을 분석하였다[12].

습지에서 서식하는 갈대를 채취하여 250 mL 삼각플라스틱에 멸균수 90 mL를 넣고 뿌리 또는 근권토양을 10 g을 넣은 후 혼합하여 진탕배양기에 15분간 배양하였으며, 진탕 배양기는 30°C, 180 rpm으로 운전하였다. 15분간 진탕 배양된 시료 중 혼합액 5 mL을 분취하여 250 mL 삼각플라스틱에 넣은 후 50 mL의 액체 배지(Burk's, Congo Red 그리고 NFB)에 넣은 후 일주일간 농화배양 하였다[8]. 농화배양은 모두 4번의 새 배지로의 계대배양을 진행하였으며, 이중 순수 분리를 하기에 앞서 각각의 배양액의 질소고정능력을 평가하였다. 질소고정능력을 가지고 있는 배양액을 고체배지(Burk's Agar, Congo Red Agar, NFBA)에 도말 하였다. 균주는 아세틸렌 활성도를 1 nmole h⁻¹ mg protein⁻¹ 이상 나타냈던 샘플에 대해서 고체배지에 도말 하였다. 배지의 종류에 따라서, Burk's Agar 배지에 도말한 균주의 경우 7일 동안 배양하고, Congo Agar 배지 그리고 NFB agar 배지에 도말한 균주는 3일 동안 배양하였다. 배양된 균주는 색과 모양에 따라 분리되어 새 배지에 도말 하였고, 각 colony의 질소고정 능력을 평가하였다. KC-1균주는 식물성 호르몬인 인돌아세트산(IAA)의 생산능력과 식물의 스트레스성 물질인 에틸렌 전구체인 카복실레이트(1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC)) 분해효소인 ACC deaminase생성하였다(특허).

분리된 균주는 the National Center for Biotechnology Information(NCBI) website의 basic Local Alignment Search Tool(BLAST) algorithm을 통해 GenBank database와 비교하여 동정하였다. 식물성장촉진능력이 있으면서 동시에 중금속에 내성을 가지고 있는 미생물인 KC-1균주의 16S rDNA 부분 염기서열분석결과, 분석된 KC-1의 DNA 염기서열은 총 1,501 bp였고, Betaproteobacteria의 *Alcaligenes* sp. F78(accession no. EU443097)와 유사도가 99%(1488/1501), 해수의 퇴적물에서 분리한 *Alcaligenes* sp. CO14(accession no. DQ643040)와 유사도가 99%(1486/1500)로 나타났다. KC-1균주를 Genbank에 등록하였다(accession no. JF303893). *Alcaligenes* 속의 미생물은 호기성, 그람음성 세균으로 지금까지 보고된 중금속에 내성을 가진 *Alcaligenes* 속의 미생물로는 쌍떡잎식물인 꽃향유의 근권에서 분리한 2EBS14균주로서 Cu에 강한 내성을 가지는 것으로 보고되었고[28], Cd으로 오염된 토양에서 분리한 *Alcaligenes faecalis* strain J08Cd의 경우는 최종농도가 0.01 mM, 0.1 mM과 0.5 mM가 되도록 첨가된 배지에서 48시간 동안 강한 내성을 보이며 성장하였다고 보고되었다[31].

Alcaligenes sp. KC-1의 단일 중금속 내성능 평가

분리한 균주의 중금속 내성을 평가하기 위해 Congo 배지에 유일 탄소원으로 Malic acid을 공급하여 평가하였다. 각각의 중금속 농도는 환경부에서 지정한 나지역의 중금속 대책기준을 기준으로 Pb, Cu, Cd, Cr⁶⁺, 그리고 Zn을 0~4.8, 0~20, 0~0.09, 0~0.6 그리고 0~15.6 mM로 첨가하여 평가하였다. 중금속을 첨가한 배지에 KC-1균주를 접종하고(10%, v/v, OD_{600 nm}: 1.6), 30°C, 180 rpm인 배양기에서 20시간 동안 배양하였다. 배양하는 동안 흡광도계를 이용하여 3 시간 간격으로 흡광도를 측정(600 nm)하여 KC-1의 중금속 내성 능력을 평가하였다.

Pb, Cu, Cd, Cr⁶⁺, 그리고 Zn이 첨가된 무기염 배지를 이용하여 KC-1균주의 내성을 농도 별로 평가하여 Fig. 1에 도시하였다. 그 결과 Pb는 농도가 0~4.8 mM일 때 흡광도 값이 0.86~0.81로 첨가되는 Pb의 농도가 증가해도 KC-1균주의 성장은 크게 저해 받지 않았고(Fig. 1A), Cr⁶⁺과 Cu도 각각의 농도에서 흡광도 값이 0.80~0.90, 1.05~1.12로 중금속의 농도가 증가하더라도 KC-1균주의 성장은 저해되지 않았다(Fig. 1B, Fig. 2). 하지만 Cd와 Zn의 경우는 저농도의 중금속이 존재할 경우에도 KC-1균주가 성장하지 못하였다(Fig. 1C, 1D). 이 밖에도, KC-1균주는 다른 중금속이 존재할 경우에는 배양시작 후 25시간이 되었을 때 정체기에 진입하였지만 Cu가 존재할 경우에는 42시간까지 계속 성장하였으며, 42시간 이후가 되어서야 더 이상 균주가 성장하지 않았다(Fig. 2). KC-1균주가 Cd와 Zn에서 성장하지 못했던 이유는 균주의 중금속에 대한 선택적 내성에 의해 Cd와 Zn에 내성이 없었기 때문이라 생각된다.

중금속에 강한 내성이 있는 미생물로 보고된 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1는 Cd 0.6 mM, Cr 0.15 mM, Cu 1.0 mM, Ni 4 mM, Pb 1.0 mM, Zn 5 mM의 농도 범위까지 생장이 가능하였다고 보고되었고[13], 조 등(2004)은 *Escherichia coli*가 5종의 중금속(Cu, Cd, Cr⁶⁺, Hg, Zn)에 노출되었을 때 생장이 완전히 억제되는 농도가 각각 Cu 3.5 mM, Zn 2.5 mM, Cd 1.5 mM, Cr⁶⁺ 1.2 mM, 그리고 Hg 0.12 mM이라고 보고하였다[3]. 이 밖에도 *Pseudomonas putida*[1, 6], *Bacillus cereus*[22], *Pseudomonas fluorescens* [18], *Tetrahymens pyriformis*[24], *Methylobacterium mesophilicum*, *Methylobacterium goesingense*[9] 그리고 *Caulobacter crescentus*[32] 등의 다양한 미생물들이 중금속에 강한 내성이 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서 분리한 *Alcaligenes* sp. KC-1균주 역시, 다양한 중금속(Cr⁶⁺, Cu, 그리고 Pb)에 대하여 내성을 가지고 있었다. 특히, Cu가 존재하는 환경에서는 Cu의 농도가 1.2~7.9 mM까지는 흡광도 값이 1.09±0.03으로 Cu가 존재하지 않는 환경에서와 거의 비슷하게 KC-1균주가 성장하였고, Cu의 농도가 9~12 mM일

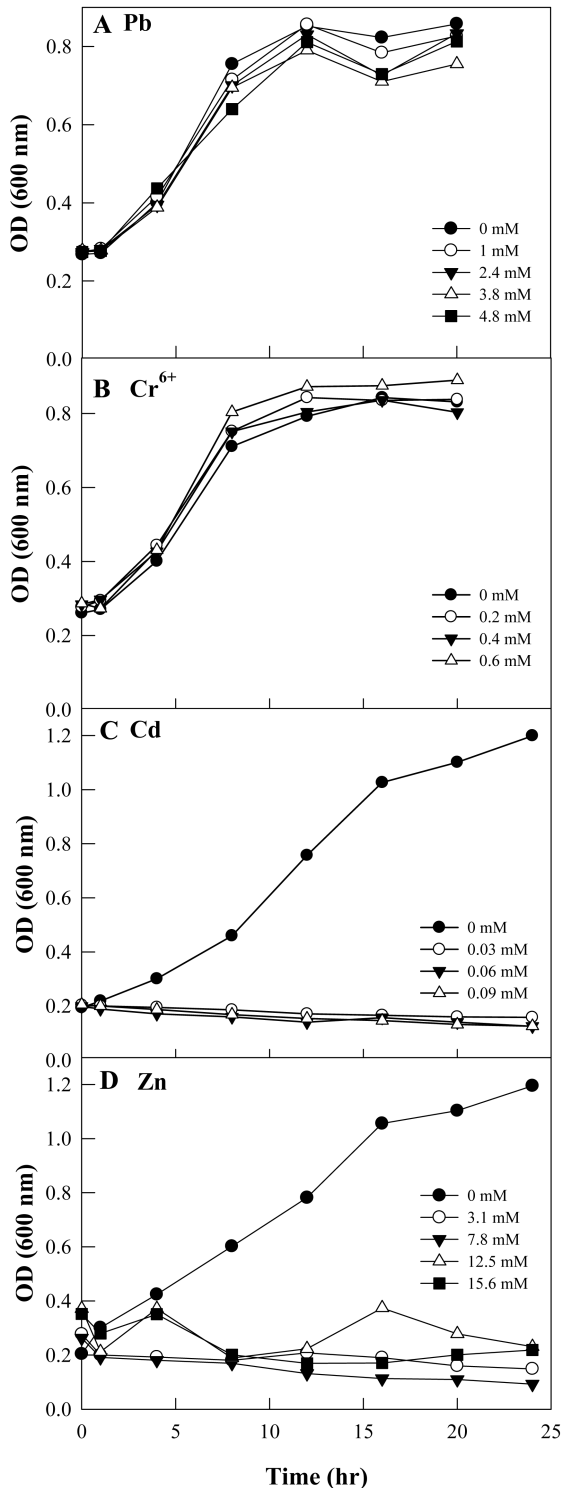


Fig. 1. Growth curve of *Alcaligenes sp. KC-1* in congo medium containing heavy metals such as (A) Pb, (B) Cr, (C) Cd and (D) Zn.

때에는 0.82 ± 0.08 로 균주의 성장이 약간 감소하였다. 또한 Cu의 농도가 15와 20 mM에서는 흡광도 값이 0.06 ± 0.00 로 저농도의 Cu가 존재하는 조건에 비해 성장이 다소 감소

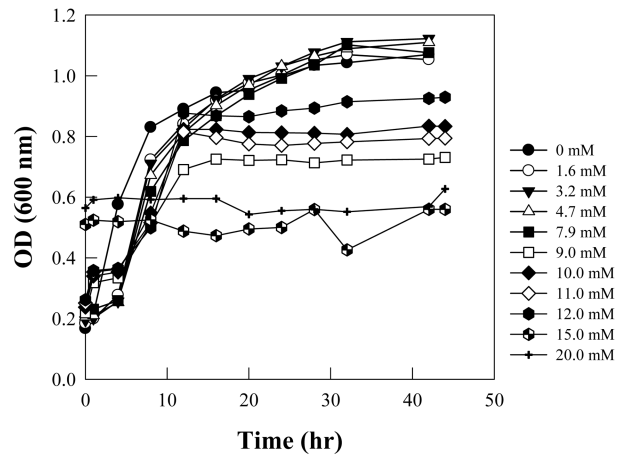


Fig. 2. Growth curve of *Alcaligenes sp. KC-1* in congo medium supplemented with Cu.

하였다. 하지만 KC-1 균주는 다른 중금속에 비해 Cu에 대한 내성이 가장 높았다(Figs. 1, 2).

중금속은 낮은 농도로도 강한 독성을 나타내는 물질로 자연계에 노출 되면 food-chain에 의해 생태계에 농축된다[17]. 농축된 중금속은 생물학적 처리방법을 이용해 제거가 되는 경우가 있는데 생물학적 처리로 중금속을 제거 하기 위해서는 (1) 배양이 용이하고, (2) 생태계에서 잘 분리가 되어야 하며, (3) 중금속에 강한 내성을 가지고 있어야 한다[32]. 지금까지 보고된 Cu 내성 균주 중 *Methylobacterium sp. SY-NiR1*는 Cu 1.0 mM까지 내성을 가지는 식물성장 근권세균으로 Cu로 오염된 토양의 식물상 정화에 유용하게 이용될 균주라고 보고하였다[13]. 이 밖에도 중금속으로 오염된 퇴적물에서 분리한 Cu내성 혼합균주는 Cu의 농도가 0.4 mM[10], *Pseudomonas aeruginosa*는 Cu 8 mM까지 내성을 가지고 성장하였다[29]. 지금까지 보고된 다양한 Cu 내성 균주는 낮은 농도의 Cu에 내성을 가지거나 높은 농도에 내성을 가지더라도 Cu 내성능력 이외의 다른 능력이 없는 균주가 많았다. 하지만 본 연구에서 분리한 *Alcaligenes sp. KC-1*균주는 식물성장촉진능력을 가지는 동시에 Cu의 농도가 20 mM일 때에도 강한 내성을 가지고 있다. 또한, 무기염 배지에 탄소원만 제공해 주면 빠른 시간에 성장하는 특징을 가지고 있었다.

KC-1균주의 생체 내의 중금속 축적농도는 평가해보지 않았지만 아마도 중금속에 내성이 강한 미생물은 중금속에 민감한 미생물에 비해 중금속에 대한 방어기작이 활발하게 이루어져 생체내의 중금속 축적을 줄이고 생장률 감소가 적게 일어날것으로 사료된다. 이는 KC-1균주가 고농도의 Cu로 오염된 토양에서 장기간 생존할 수 있다고 생각할 수 있다. 결론적으로 미생물은 중금속으로 오염된 토양의 생태독성을 측정하는 생물지표로 이용될 수 있으며, 특히 중금속 KC-1 균주는 Cu로 오염된 토양의 생태독성 평가나 복원에 유용

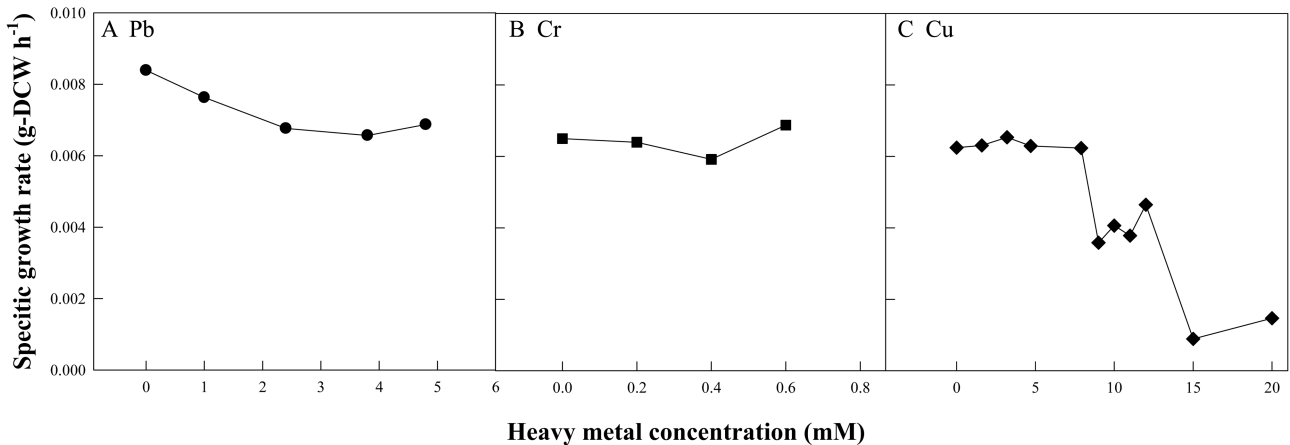


Fig. 3. Specific growth rate of *Alcaligenes sp.* KC-1 in congo medium containing heavy metals such as (A) Pb, (B) Cr and (C) Cu.

하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

중금속에 의한 성장 저해 평가

각 배지 조건에서 중금속이 균주 성장에 미치는 영향을 평가하기 위해 비성장속도(specific growth rate)를 계산하였다. 비성장속도는 균주의 건조 중량(dry cell weight, DCW)과 탁도 사이의 관계를 도출하고 KC-1의 성장속도를 건조 중량으로 환산하였다. 또한, KC-1 균주의 성장에 미치는 중금속 저해를 정량적으로 평가하기 위하여, 균체의 성장량으로부터 성장저해(growth inhibition, GI)를 계산한 후, 배양 20시간을 기준으로 KC-1의 성장을 50%까지 저해하는 각 중금속 농도(EC₅₀)를 내삽법(interpolation regression analysis)을 이용하여 구하였다[3].

Alcaligenes sp. KC-1균주의 중금속 종류에 따른 비성장속도는 Fig. 3에 나타내었다. Pb이 있는 조건에서의 KC-1균주의 성장속도는 첨가한 중금속의 농도가 증가 할수록 감소하였고, Cr⁶⁺은 큰 변화가 없었다. Cu가 존재하는 조건에서는 농도가 7.9 mM까지는 성장속도가 큰 변화가 없었다가 Cu의 농도가 9 mM일 때부터 KC-1의 크게 감소하였다. 이는 *Alcaligenes sp.* KC-1이 Cu에 강한 내성을 가지고 성장하고 있다는 것을 다시 한번 보여주는 결과이다. 또한, KC-1의 성장을 저해하는 50%의 중금속의 농도(EC₅₀)는 Pb, Cr⁶⁺, Cd, Zn 그리고 Cu이 각각 2.37, 0.19, 0.00, 0.00 그리고 7.34 mM로서, Cu에서 가장 높게 나타났다(Table 1). Cr⁶⁺의 경우 농도가 0.6 mM일 때까지 균주가 성장하였지만 EC₅₀값이 낮은 이유는 KC-1이 Cr⁶⁺의 농도가 0.4 mM까지 성장에 저해를 받았고, 0.6 mM일 때 오히려 Cr⁶⁺이 존재하지 않는 조건에서보다 KC-1이 성장을 더욱 잘해 실험 시에 배지가 오염되었을 확률이 높아 EC₅₀값을 구할 때에는 0.6 mM의 값은 빼고 평가하였다.

중금속에 대한 미생물의 내성 정도는 그 종류에 따라 매

Table 1. EC₅₀ of *Alcaligenes sp.* KC-1 for each heavy metals.

Heavy metal	EC ₅₀ (mM)
Pb	2.37
Cr	0.19
Cd	0.00
Zn	0.00
Cu	7.34

우 다르다. 또한, 동일 종의 미생물에서도 배양조건이나 중금속의 종류에 따라 중금속에 대한 민감도나 EC₅₀값이 상이하게 나타난다[3]. 본 연구에서도 중금속의 종류에 따라 KC-1의 EC₅₀이 다양하게 나타났다. 이는 중금속의 종류에 따라 서식지에 따른 생태독성 평가를 할 때 *Alcaligenes sp.* KC-1은 중금속으로 오염된 습지의 생태독성평가에 유용하게 사용될 수 있을 것이라고 사료된다.

Cu에 내성을 가지고 Cu를 대상으로 미생물을 이용한 생태독성 평가는 많이 이루어지지 않았으며, 지금까지 보고된 미생물을 대상으로 한 Cu의 EC₅₀은 *E. Coli*는 2.00~2.50 mM[3], *Pseudomonas putida*는 0.01~0.02 mM[20, 26], *Pseudomonas fluorescens*는 0.20~0.27 mM[25, 4], *Vibrio fischeri*는 0.58~0.61 mM[4, 5], *Tetrahymena pyriformis*는 0.83 mM[24], *Methylobacterium sp.*는 0.89 mM[13]로 보고되었다. 이밖에도 황산화 세균을 대상으로 Cu의 EC₅₀값이 0.19 mM[30]로 평가되었고 중금속으로 장기간 오염된 토양에 서식하고 있는 토착 미생물을 대상으로 EC₅₀값을 평가한 결과 0.45~1.42 mM로 평가되었다[2]. 지금까지 보고된 균주들과 비교하였을 때 Cu에 강한 내성을 가지고 동시에 질소고정능력을 가지고 있는 KC-1은 식물에게 성장촉진자를 공급해 줄 수 있고, 중금속 독성에 대한 스트레스에 대항할 수 있기 때문에 생태독성평가 지표 이외에도 오염된 습지토양의 생물상 복원에도 사용 할 수 있다고 기대된다.

요 약

습지의 갈대토양으로부터 중금속에 내성이 있는 세균이 분리되었다. 분리된 균주는 16S rDNA 염기서열분석에 의거하여 *Alcaligenes* sp.로 동정되었다. 납, 크롬, 카드뮴, 아연 및 구리와 같은 중금속을 배지에 첨가하였다. 분리균주 *Alcaligenes* sp. KC-1을 구리가 0 mM에서 20 mM의 농도로 첨가된 배지에서 배양하였을 때 균주의 생장에 미치는 독성을 알아보았다. 분리균주는 구리가 존재할 때 42시간 배양된 후 7.34 mM의 EC₅₀값과 OD_{600 nm}에서 0.83의 흡광도 값을 보여주는 구리 내성균주였다.

Acknowledgment

We thank for the help of An na Oh to investigate this research.

REFERENCES

- Brinkmann, G. and R. Kuhn. 1977. Limiting values for damaging action of water pollutants to bacteria *Pseudomonas putida* and green algae *Scenedesmus quadricauda* in cell multiplication inhibition test. *Z. Wasser Abwassert-Forschung* **10**: 87-98.
- Carbonell, G., M. V. Pablos, P. García, C. Ramos, P. Sánchez, C. Fernández, and J. V. Tarazona. 2000. Rapid and cost-effective multiparameter toxicity tests for soil microorganisms. *Sci. Total Environ.* **20**: 143-150.
- K. S. Cho, S. Y. Koo, J. Y. Kim, and H. W. Ryu. 2004. Quantification of inhibitory impact of heavy metals on the growth of *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 341-346.
- Duttka, J. and K. Kwan. 1981. Comparison of three microbial toxicity screening tests with the microtox test. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **27**: 753-757.
- Gellert, G., A. Stommel, and A. Trujillano. 1999. Development of an optimal bacterial medium based on the growth inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* **39**: 467-476.
- Haigh, S. D. and A. F. K. Rennie. 1994. Rapid methods to assess the effects of chemicals on microbial activity in soil. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **9**: 347-354.
- S. H. Hong, H. Ryu, J. Kim, K. S. Cho. 2010b. Rhizoremediation of diesel-contaminated soil using the plant growth-promoting rhizobacterium *Gordonia* sp. S2RP-17. *Bio-degradation.* **22**: 593-601.
- S. H. Hong, K. C. Shin, and E. Y. Lee. 2010a. Characterization of a nitrogen fixing bacteria *Mycobacterium hominis* sp. AKC-10 isolated from the wetland. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 302-307.
- Idris, R., R. Trifonova, M. Puschenreiter, W. W. Wenzel, and A. Sessitsch. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2667-2677.
- Jin, S., J. I. Drever, and P. J. Colberg. 2007. Effects of copper on sulfate reduction in bacterial consortia enriched from metal-contaminated and uncontaminated 토작물. *Environ. Toxicol. Chem.* **26**: 225-230.
- Kapanen, A. and M. ItaKvaara. 2001. Ecotoxicity Tests for Compost Applications. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **49**: 1-16.
- Koo, S. Y. and K. S. Cho. 2009. Isolation and characterization of a plant growth promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 1431-1438.
- Koo, S. Y. and K. S. Cho. 2007. Characterization of a heavy metal-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium, *Methylobacterium* sp. SY-NiR1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 58-65.
- Lane, T. W. and F. M. Morel. 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 4627-4631.
- Li, X. Y., X. Xu, K. Wu, J. Liu, and S. Chen. 2008. Toxic heavy metal waste exposure and abnormal birth outcomes in an electronic waste recycling town of China. *Toxicol Lett.* **180**:185.
- Margesin, R., D. Labbe, F. Schinner, C. W. Greer, and L. G. Whyte. 2003. Characterization of hydrocarbon-degrading-microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3085-3092.
- Nassar, N., P. Abeywardana, A. Barker, and C. Bower. 2009. Parental occupational exposure to potential endocrine disrupting chemicals and risk of hypospadias in infants. *Occup Environ Med.* **67**: 585-589.
- Paran, J. H., S. Sharma, and A. A. Quershi. 1990. A rapid and simple toxicity assay based on growth rate inhibition of *Pseudomonas fluorescens*. *Toxic. Assess.* **5**: 351-365.
- Rajkumar, M., R. Nagendran, K. J. Lee, W. H. Lee, and S. Z. Kim. 2005. Influence of plant growth promoting bacteria and Cr⁶⁺ on the growth of Indian mustard. *Chemosphere* **62**: 741-748.
- Reinke, M., G. Kalnowski, and W. Dott. 1995. Evaluation of an automated, minituarized *Pseudomonas putida* growth inhibition assay. *Vom Wasser* **85**: 199-213.
- Riis, V., W. Babel, and O. H. Pucci. 2002. Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. *Chemosphere* **49**: 559-568.
- Ronco, A. E., M. C. Sorbero, G. D. B. Rossini, P. R. Alzuet, and B. J. Dutka. 1995. Screening for 토작물 toxicity in the Rio Santiago basin: A baseline study. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **10**: 35-39.
- Rong, P. R., L. Cao, and R. Zhang. 2009. Combined effects of Cu, Cd, Pb, and Zn on the growth and uptake of consortium of Cu-resistant *Penicillium* sp. A1 and Cd-resistant *Fusarium* sp. A19. *J. Hazard Mater.* **171**: 761-766.
- Sauvant, M. P., D. Pepin, J. Bohatier, and C. A. Groliere. 1995. Microplate technique for screening and assessing cytotoxicity of xenobiotics with *Tetrahymena pyriformis*.

- Ecotoxicol. Environ. Saf.* **32**: 159-165.
25. Schmitt, M., G. Gellert, J. Ludwig, and H. Lichtenberg-Frate. 2004. Phenotypic yeast growth analysis for chronic toxicity testing. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **59**: 142-150.
 26. Schmitz, R., A. Eisenträger, and W. Dott. 1998. Miniaturized kinetic growth inhibition assays with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida*. *J. Microbiol. Methods* **31**: 159-166.
 27. Solioz, M. and J. V. Stoyanov. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Rev.* **27**: 183-195.
 28. Sun, L., L. He, Y. Zhang, W. Zhang, Q. Wang, X. Sheng. 2009. Isolation and biodiversity of copper-resistant bacteria from rhizosphere soil of *Elsholtzia splendens*. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* **49**: 1360-1366.
 29. Teitzel, G. M., A. Geddie, D. S. K. Long, M. J. Kirisits, M. Whiteley, and M. R. Parsek. 2006. Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**: 7242-7256.
 30. Utgikar, V. P., B. Y. Chen, N. Chaudhary, H. H. Tabak, J. R. Haines, and R. Govind. 2001. Acute toxicity of heavy metals to acetate-utilizing mixed cultures of sulfate-reducing bacteria: EC100 and EC50. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 2662-2669.
 31. Xiao, J., L. Guo, S. Wang, and Y. Lu. 2010. Comparative impact of cadmium on two phenanthrene-degrading bacteria isolated from cadmium and phenanthrene co-contaminated soil in China. *J. Hazard Mater.* **15**: 1741-1743.
 32. Zhaohui, X., Y. Lei, and J. Patel. 2010. Bioremediation of soluble heavy metals with recombinant *Caulobacter crescentu*. *Bioeng. Bugs.* **1**: 207-212.