

중금속 및 디젤 오염 토양에서 분리한 중금속 내성 식물 성장 촉진 근권세균의 특성

이수연, 이윤영, 조경숙*
이화여자대학교 환경공학과

Received: June 26, 2021 / Revised: August 5, 2021 / Accepted: August 5, 2021

Characterization of Heavy Metal Tolerant and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from Soil Contaminated with Heavy Metal and Diesel

Soo Yeon Lee, Yun-Yeong Lee, and Kyung-Suk Cho*

Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 03760, Republic of Korea

In order to enhance rhizoremediation performance, which remediates contaminated soils using the interactions between plants and microorganisms in rhizosphere, it is required to develop effective microbial resources that simultaneously degrade contaminants and promote plant growth. In this study, heavy metal-resistant rhizobacteria, which had been cultivated in soils contaminated with heavy metals (copper, cadmium, and lead) and diesel were isolated from rhizospheres of maize and tall fescue. After that, the isolates were qualitatively evaluated for plant growth promoting (PGP) activities, heavy metal tolerance, and diesel degradability. As a result, six strains with heavy metal tolerance, PGP activities, and diesel degradability were isolated. Strains CuM5 and CdM2 were isolated from the rhizosphere soils of maize, and were identified as belonging to the genus *Cupriavidus*. From the rhizosphere soils of tall fescue, strains CuT6, CdT2, CdT5, and PbT3 were isolated and were identified as *Fulvimonas soli*, *Cupriavidus* sp., *Novosphingobium* sp., and *Bacillus* sp., respectively. *Cupriavidus* sp. CuM5 and CdM2 showed a low heavy metal tolerance and diesel degradability, but exhibited an excellent PGP ability. Among the six isolates, *Cupriavidus* sp. CdT2 and *Bacillus* sp. PbT3 showed the best diesel degradability. Additionally, *Bacillus* sp. PbT3 also exhibited excellent heavy metal tolerance and PGP abilities. These results indicate that the isolates can be used as promising microbial resources to promote plant growth and restore soils with contaminated heavy metals and diesel.

Keywords: Rhizobacteria, plant growth-promoting traits, heavy metals, tolerance, contaminated soil

서론

토양은 생태계를 구성하는 필수 요소로, 토양 내에는 미량의 중금속이 식물의 생장에 유해하지 않은 농도로 존재한다. 그러나 산업활동의 증가와 도시 개발로 인해 토양 내 축적되는 중금속으로 인한 오염이 심화되고 있다. 토양 내 중금속의 독성은 자연 생태계 및 환경에 유해한 영향을 끼쳐 잠재적인 위협이 된다. 토양에 축적된 중금속은 토양에 잔류

하는 시간이 길며, 식물에 흡수된 후 이를 섭취한 동물 및 인간의 체내로부터 배출되지 않고 먹이사슬의 상위단계로 올라감에 따라 고농도로 생물농축 된다. 또한 중금속은 토양 내에서 살아가는 미생물 군집의 자유로운 활동을 저해할 뿐만 아니라, 군집 다양성 감소 및 기능 저해 등 다양한 영향을 미친다.

우리는 식물 생장에 필수미량원소이며, 자연적으로 토양 내에 3–4 mg·kg⁻¹, 식물 체내에서 5–30 mg·kg⁻¹ 정도의 존재한다[1]. 광업, 화석연료 연소 및 폐기물 소각 등 인위적인 활동으로 인해 배출된 많은 양의 구리는 엽록소 농도를 감소시켜 잎의 황화를 촉진하며 세포 독성을 유발하여 식물 생장을 저해한다[1]. 카드뮴은 화석연료 연소, 야금 산업 및 인

*Corresponding author

Tel.: +82-2-3277-2393, Fax: +82-2-3277-3575
E-mail: kscho@ewha.ac.kr

산비료의 과다 사용 등으로 배출되어 토양을 오염시킨다[2]. 카드뮴에 의해 식물은 시들고 고사하며 무기영양분 및 탄수화물 대사 장애로 인해 생체량 생성이 감소된다[2]. 납은 일반적으로 농업 토양에서 50–300 mg·kg⁻¹, 식물 체내에서 2 mg·kg⁻¹ 이하로 존재하고, 광업, 인쇄업, 화석 연료 사용 및 살충제 사용 등에 의해 배출된다[3]. 납에 의한 식물의 영양소 흡수 장애, 뿌리 성장 감소 및 광합성 작용 저해 등으로 인해 궁극적으로 작물 수확량도 감소된다[3].

중금속으로 오염된 환경을 정화하기 위해 화학적 침전, 이온교환, 전기화학적 처리, 필터링 및 부유물 침전 등과 같은 물리화학적 방법들이 존재하나[4], 상대적으로 적은 비용으로 높은 처리효율을 얻을 수 있는 근권미생물을 이용한 rhizoremediation 방법이 최근 주목받고 있다[4]. 식물과 근권미생물 사이의 상호작용은 rhizoremediation 효율에 긍정적인 영향을 미친다. 근권미생물 중 식물 성장을 향상시키는 미생물을 ‘식물 성장 촉진 근권미생물(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)’이라고 한다. 이들은 indole-3-acetic acid (IAA)와 같은 식물 성장 촉진 호르몬을 분비하거나, 킬레이트제 역할을 수행하는 siderophore 생성하기도 하며, 여러 스트레스에 저항성을 갖는 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase를 생성하는 등의 다양한 메커니즘을 통해 식물의 성장을 증진시킨다.

대부분 산업지역의 토양은 중금속에 의한 단일 오염보다는 중금속과 유류가 함께 복합적으로 오염되는 경우가 많다. 유류의 경우, 막대한 규모의 석유 산업이 발전함에 따라 주요 토양 오염물질 중 하나로 대두되었다. 유류는 많은 독성물질을 함유하고 있어 고농도로 오염될 경우 토양 생태계 파괴에 주원인이 될 수 있다. 대부분의 토양 오염 복원기술은 중금속 혹은 유류의 단일 오염 정화에 초점이 맞추어져 있다. 그러나 중금속 및 유류 등의 복합 오염 토양의 경우, 단일 오염 토양에 비해 정화 시간 및 비용이 많이 소모되기 때문에, 이를 처리하는 기술에 대한 요구가 증가하고 있다. 따라서 복합 오염 토양 정화에 대한 다양한 연구가 진행되어 많은 정보를 구축하는 것이 필요하다.

Rhizoremediation을 이용하여 중금속과 유류로 오염된 토양의 정화 효율을 향상시키기 위해서는, 오염물질을 정화함과 동시에 식물 성장을 촉진시킬 수 있는 근권세균 자원 개발이 필요하다. 따라서, 본 연구에서는 중금속 및 유류 복합 오염 토양에서 서식하고 있는 옥수수과 툴페스큐의 근권 토양으로부터 중금속(구리, 카드뮴 및 납)에 내성을 가진 근권세균을 순수분리하여 동정하였다. 순수분리한 중금속 내성 근권세균을 대상으로 식물 성장 촉진 활성과 유류 분해능을 평가하여 우수한 균주를 선별하였다.

재료 및 방법

중금속 stock 용액 및 중금속 함유 배지 제조

중금속 내성 근권세균을 분리하기 위해 필요한 중금속(구리, 카드뮴 및 납) stock 용액을 다음과 같이 제조하였다. CuSO₄·5H₂O, CdCl₂·H₂O 및 Pb(NO₃)₂ 시약을 이용하여 각각의 농도가 1 M이 되도록 stock 용액을 만들었다. 멸균한 여과필터(0.45 μm)와 실린지를 이용해 중금속 stock 용액은 제균처리 하였다.

1/10 희석 Luria-Bertani (LB) 배지(Difco, USA) [5]는 trytone 1 g/l, yeast extract 0.5 g/l, NaCl 1 g/l에 한천 15 g/l를 첨가한 후 120°C에서 15분 간 멸균하였다. 멸균한 1/10 LB 배지를 60°C 전후로 냉각한 후, 최종 중금속 농도가 각각 0.01, 0.1, 0.5, 1 mM이 되도록 중금속 stock 용액을 첨가한 후, 페트리디쉬에 분주하였다.

중금속 내성 근권세균의 분리

이화여자대학교 신공학과 옥상(37°57'N, 126°95'E)에서 중금속(구리 500, 카드뮴 20 및 납 500 mg·kg⁻¹)과 디젤(25,000 mg·kg⁻¹) 복합오염 토양에서 재배한 옥수수(*Zea mays*, Maize)와 툴페스큐(*Festuca arundinacea*, Tall fescue)의 근권토양을 채취하였다. 근권토양 채취를 위해 뿌리에 느슨하게 붙어 있는 토양을 식물을 흔들어서 제거한 후, 뿌리에 단단히 붙어있는 토양을 털어내었다. 이렇게 채취한 근권토양을 2 mm 체에 거른 후 실험에 사용하기 전까지 4°C에서 보관하였다.

시험관에 근권토양 1 g과 9 ml의 멸균수를 넣어 1,200 rpm에서 1분 동안 교반하였으며, 15분 간 정지한 후 상등액을 채취하였다. 상등액을 10⁻⁴까지 단계별로 희석한 후, 구리, 카드뮴 및 납(0.01, 0.1, 0.5, 1 mM)이 각각 첨가된 1/10 LB 배지에 200 μl씩 분주하여 도말하였다. 이후 30°C에서 48–72시간 동안 배양하였으며, 배양 후 생육한 콜로니 수를 측정하였다. 또한, 콜로니의 색과 모양에 따라 총 108개의 균주를 선별하였다.

1차 선별 중금속 내성 근권세균의 식물 성장 촉진(Plant growth-promoting, PGP) 활성 평가

5 ml의 1/10 LB 배지에 1차 선별한 중금속 내성 균주를 접종하여 30°C에서 48시간 동안 진탕배양(100–120 rpm)하여 배양액을 준비한 후 PGP 활성을 다음과 같이 정성평가 하였다. 모든 평가실험은 3반복으로 수행하였다.

IAA 생성능. 1차 선별균주의 식물성 호르몬인 IAA 생성능을 평가하기 위해[6, 7], 2 ml의 배양액이 들어있는 시험관에 phosphate buffer (pH7.5) 6 ml, L-tryptophane (0.06%, w/v)

4 ml를 주입한 후 37°C의 암조건에서 24시간 동안 배양하였다. Phosphate buffer의 조성은 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 22.81 g/l, glucose 10 g/l이다. 배양 종료 후 배양액을 4,000 rpm에서 5분 간 원심분리하여 얻은 상등액 3 ml와 Salkowski's reagent (HClO_4 (35%, v/v) 98 ml, 0.2 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 ml를 혼합한 용액) 2 ml를 혼합하였다. 암조건의 25°C에서 30분 동안 정치시킨 후 분홍색~자주색으로 발색되는 정도를 535 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Siderophore 생성능. 1차 선별균주의 금속 성분과의 결합 물질인 siderophore 생성 여부 측정을 위해 [8, 9], 배양액 5 ml에 1 M HCl 용액을 50 μl 씩 첨가하여 pH를 2-3 사이로 맞춰 주었다. 배양액 및 첨가한 1 M HCl 용액과 동일한 양의 ethyl acetate ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Ethyl alcohol, 99.9%)를 첨가하여 천천히 흔들어서 유기상과 수용액상이 분리되도록 정치시켰다. 상층의 유기상 2 ml를 회수하여 새로운 시험관에 분주한 후, Hathway reagent (0.1 M potassium ferricyanide 1 ml, 0.1 M FeCl_3 in 0.1 M HCl 1 ml, 증류수 98 ml를 혼합한 용액)를 2 ml 첨가하고 30°C에서 30분 동안 정치하였다. 하층의 수용액상이 청록색으로 발색되는 정도를 700 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

ACC deaminase 활성능. 1차 선별균주의 환경 스트레스에 대한 저항성 기작의 주요 지표인 ACC deaminase 활성능은 다음과 같이 평가하였다 [10-12]. 균주를 tryptic soy broth (TSB, Difco) 배지에 접종하여 30°C, 120 rpm 조건에서 24시간 배양하였다. TSB 배지 조성은 pancreatic digest of casein 17.0 g/l, papaic digest of soybean 3.0 g/l, dextrose 2.5 g/l, sodium chloride 5.0 g/l, dipotassium phosphate 2.5 g/l이다. 이 배양액을 질소원으로서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 대신에 ACC를 함유한 DF 배지에 접종한 후, 30°C, 200 rpm에서 48시간 동안 배양하였다. DF 배지 조성은 Na_2HPO_4 5.8 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 0.5 g/l, NH_4Cl 1 g/l, CaCl_2 0.25 mM, MgSO_4 1 mM, glucose 0.15%, biotin 0.3 mg/l이다. ACC (98%, Sigma-Aldrich, Israel)는 0.5 M stock 용액으로 제조하고 제균처리 (Minisart[®] Syringe filter, 0.2 μm)한 후 DF 배지에 최종농도가 3 mM이 되도록 첨가하였다. 대조균의 경우, 동일하게 질소원이 없는 DF 배지에 균주를 접종하고 10일 동안 배양하였다. 실험균과 대조균 모두 600 nm 파장에서 흡광도 측정된 값을 비교하여 ACC deaminase 활성을 평가하였다.

중금속 내성 및 PGP 활성이 우수한 균주 2차 선별 및 동정

1차 선별 균주의 PGP 활성을 비교 평가하여 상대적으로 우수한 균주 6종을 2차 선별하였다. 16S rRNA의 부분 염기서열을 분석하여 6종의 균을 동정하였다. 멸균한 이쑤시게

를 사용해 2차 선별균주의 콜로니를 1.5 ml microcentrifuge tube에 넣고 3차 증류수를 30 μl 주입하여 충분히 현탁시킨 다음 11,000 rpm에서 5초 간 원심분리하였다. 균체를 lysis시키기 위해 heat block을 이용하여 95°C에서 15분 간 열처리한 후, 11,000 rpm에서 5초 간 원심분리하였다. 이러한 Lysis 과정을 3번씩 반복하고 추출된 genomic DNA를 주형(template)으로 하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 총 박테리아의 16S rRNA 유전자를 타겟으로 하는 340 f (5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')과 805 r (5'-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3') 프라이머를 사용하였다 [13]. DNA 주형 2 μl , 10 μM 의 각 프라이머 1 μl , dNTPs (2.5 mM) 4 μl , PCR buffer (with MgCl_2) 5 μl , Taq polymerase를 0.25 μl 를 넣고 멸균한 증류수로 최종부피를 50 μl 로 하였다. PCR 조건은 94°C에서 3분 동안 pre-denaturation한 후, denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초, extension 72°C 30초 과정을 30 cycle 반복하였으며, 72°C에서 5분 동안 최종 extension을 진행하고 4°C에서 holding 하였다. 증폭된 PCR 산물을 전기영동 분석으로 길이를 확인한 다음 동결하여 (주)마크로젠에 분석 의뢰하였다. 염기서열이 분석된 균주는 The National Center for Biotechnology Information (NCBI) website의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용하여 GenBank database와 비교하여 동정하였다.

동정한 균주의 염기서열 이외에도 중금속 내성이 뛰어난 균주, 유사한 염기서열을 가진 균주 등의 16S rRNA 염기서열을 비교분석 하고자 다음의 프로그램들을 사용해 계통도를 작성하였다. BioEdit 프로그램 (BioEdit sequence alignment editor, version 7.0.5.3)을 사용하여 염기서열을 fasta 파일로 변환하였으며 DNA baser (DNA baser, version 5.15.0.0BT)로 균주들의 염기서열을 정렬해 주었다. ClustalX 프로그램 (ClustalX2.1, version 2.0)을 활용해 phb 파일 생성 후 최종적으로 MEGA-X (MEGA-X, version 10.2.2)을 이용하여 계통도를 작성하였다.

2차 선별균주의 고농도 중금속에 대한 내성 평가

2차 선별한 균주의 고농도 중금속에 대한 내성은 고농도 중금속이 함유된 1/10 LB 배지에서의 균주의 성장 여부로 평가하였다. 구리, 카드뮴 및 납 stock 용액을 이용하여 최종농도가 0.5, 1, 5 및 10 mM가 되도록 1/10 LB 배지에 첨가하였다. 세 종류의 중금속을 첨가한 1/10 LB 고체배지에, 앞서 동정한 8종의 균주를 각각 접종한 후 30°C에서 48-72시간 동안 배양한 뒤 성장여부를 관찰하였다.

2차 선별균주의 디젤 분해능력 평가

2차 선별한 8종의 균주들의 디젤 분해능을 평가하기 위해

[13], 시험관에 무기염 배지를 5 ml씩 주입한 후 균주를 접종하였다. 무기염 배지 조성은 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17.09 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 0.5 g/l, CaCl_2 0.01 g/l, NH_4Cl 1 g/l이다. 멸균한 디젤을 0.15 ml (3%, v/v)를 주입한 후 30°C에서 2주 동안 진탕배양(120 rpm)하였다. 대조균은 균주를 접종하지 않은 무기염 배지에 동일한 양의 디젤을 첨가한 후 동일 조건에서 배양하였다. 배양액 5 ml에 추출용매인 hexane 5 ml를 넣은 후 30°C, 120 rpm의 조건에서 30분간 교반하여 추출하였다. 그 후 시험관을 실온에서 30분간 정지한 후 상등액(hexane 용매층)을 채취하여 잔류 총 석유화합물(total petroleum hydrocarbons, TPHs)의 농도를 불꽃 이온화 검출기와 HP-5 capillary column (30 m × 0.320 mm × 0.25 μm, Agilent Technologies, USA)가 장착된 가스크로마토그래피(GC 6980N system, Agilent Technologies, USA)를 이용하여 분석하였다. 가스크로마토그래피의 주입기와 감지기 작동 온도는 각각 300°C와 320°C였다. 또한 가스크로마토그래피의 오븐 온도는 3분 동안 60°C로 유지하고, 4°C·min⁻¹ 속도로 260°C까지 상승한 다음 84°C·min⁻¹ 속도로 310°C로 상승한 후 5분간 유지되었다. 디젤 제거효율은 초기농도와 2주 후 농도를 비교하여 백분율로 환산하여 평가하였다.

결 과

중금속 함유 배지에서 근권세균의 생균수 비교

옥수수과 톨페스큐 근권토양 현탁액을 중금속 함유 1/10 LB 배지에 도말하여 배양한 후 측정된 생균수 결과를 Table 1에 나타내었다. 중금속 종류에 관계없이 전체적으로 중금속

농도가 증가할수록 생균수가 점점 감소하는 경향을 나타내었다. 구리의 경우, 0.01 mM 농도조건에서 톨페스큐 근권세균은 다른 조건에 비해 콜로니가 과도하게 성장하여 정확한 생균수를 측정할 수 없었다. 0.1 mM 농도에서 측정된 옥수수 근권세균에서 가장 많은 콜로니 수를 보였으며 다른 조건과 큰 차이를 보였다. 반면 0.5 mM와 1 mM의 비교적 높은 중금속 농도조건에서는 톨페스큐 근권세균의 콜로니가 옥수수 근권세균보다 더 많이 성장하였음을 알 수 있었다. 카드뮴의 경우, 1 mM 농도조건을 제외하고 모든 농도에서 옥수수보다 톨페스큐에서 유래한 근권세균에서 더 많은 생균수가 측정되었다. 납의 경우, 0.01 mM 농도조건에서 옥수수 근권세균이 가장 많은 생균수를 보였으며 톨페스큐 근권세균과도 유의한 차이를 보였다. 마찬가지로 0.5 mM 농도에서도 옥수수 근권세균이 톨페스큐 근권세균보다 더 많은 생균수를 보였다. 반면에 0.1 mM, 1 mM 농도에서는 톨페스큐 근권세균의 생균수가 더 많이 측정되었으며 옥수수 근권세균과의 유의한 차이를 나타내었다.

생균수 측정 배지에 생육한 콜로니의 색과 모양, 특성에 따라 옥수수 근권토양 유래 Cu 내성 근권세균 8종(CuM1-CuM8), 카드뮴 내성 세균 6종(CdM1-CdM6), 납 내성 세균 6종(PbM1, PbM3-PbM7)을 선별하였다. 또한, 톨페스큐 근권토양 유래 구리 내성 근권세균 6종(CuT2-CuT7), 카드뮴 내성 세균 7종(CdT1-CdT7), 납 내성 세균 9종(PbT1-PbT9)을 선별하였다.

1차 선별 중금속 내성 근권세균의 PGP 활성능

1차 선별 총 42종의 중금속 내성 근권세균의 식물 성장 향상 능력 평가 결과를 Table 2에 나타내었다. 42종 균주 모두

Table 1. Comparison of viable cell numbers grown on heavy metal-containing plates inoculated with the rhizospheric soil suspensions.

Heavy metal	Concentration (mM)	Bacterial number (CFU/g-dry soil)	
		Maize	Tall Fescue
Cu	0.01	$4.59 \times 10^7 \pm 0.45 \times 10^3$ B ^a	TMTC ^b
	0.1	$5.04 \times 10^7 \pm 0.44 \times 10^3$ A	$3.29 \times 10^7 \pm 0.46 \times 10^3$ C
	0.5	$2.21 \times 10^7 \pm 0.34 \times 10^3$ E	$2.75 \times 10^7 \pm 0.24 \times 10^3$ D
	1	$3.02 \times 10^6 \pm 0.40 \times 10^3$ G	$8.19 \times 10^6 \pm 0.85 \times 10^3$ F
Cd	0.01	$1.08 \times 10^7 \pm 0.28 \times 10^3$ B	$5.04 \times 10^7 \pm 0.62 \times 10^3$ A
	0.1	$4.95 \times 10^6 \pm 0.41 \times 10^3$ D	$8.24 \times 10^6 \pm 0.61 \times 10^3$ C
	0.5	$6.30 \times 10^5 \pm 0.36 \times 10^3$ F	$1.08 \times 10^6 \pm 0.13 \times 10^3$ E
	1	$3.83 \times 10^5 \pm 0.45 \times 10^3$ G	$3.74 \times 10^5 \pm 0.23 \times 10^3$ H
Pb	0.01	$4.05 \times 10^7 \pm 0.40 \times 10^3$ A	$3.51 \times 10^7 \pm 1.34 \times 10^3$ B
	0.1	$6.71 \times 10^6 \pm 0.86 \times 10^3$ D	$6.98 \times 10^6 \pm 0.22 \times 10^3$ C
	0.5	$5.40 \times 10^6 \pm 0.53 \times 10^3$ E	$4.91 \times 10^6 \pm 2.26 \times 10^3$ F
	1	$1.05 \times 10^4 \pm 0.13 \times 10^3$ H	$5.36 \times 10^4 \pm 0.12 \times 10^3$ G

^aDifferent letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

^bToo many colonies to count.

Table 2. Plant growth promoting activities of heavy metal-tolerant rhizobacteria isolated from the rhizosphere soils.

Isolation source	Strain no.	Plant growth promoting activity		
		IAA (OD _{535nm})	Siderophore (OD _{700nm})	ACC deaminase (OD _{600nm})
Maize rhizosphere	CuM1	0.097	0.085	0.067
	CuM2	0.127	0.000	0.000
	CuM3	0.180	0.012	0.070
	CuM4	0.008	0.000	0.300
	CuM5	0.096	0.110	0.430
	CuM6	0.177	0.063	0.180
	CuM7	0.162	0.000	0.000
	CuM8	0.117	0.000	0.000
	CdM1	0.105	0.000	0.000
	CdM2	0.103	0.013	0.054
	CdM3	0.097	0.000	0.000
	CdM4	0.094	0.000	0.000
	CdM5	0.211	0.000	0.115
	CdM6	0.162	0.000	0.059
	PbM1	0.099	0.000	0.000
	PbM3	0.141	0.000	0.372
	PbM4	0.129	0.000	0.000
	PbM5	0.183	0.000	0.063
	PbM6	0.038	0.011	0.350
PbM7	0.122	0.052	0.489	
Tall fescue rhizosphere	CuT2	0.109	0.000	0.000
	CuT3	0.109	0.000	0.000
	CuT4	0.131	0.012	0.067
	CuT5	0.150	0.039	0.175
	CuT6	0.109	0.097	0.129
	CuT7	0.174	0.011	0.146
	CdT1	0.111	0.000	0.052
	CdT2	0.111	0.000	0.051
	CdT3	0.101	0.000	0.340
	CdT4	0.076	0.000	0.164
	CdT5	0.217	0.054	0.000
	CdT6	0.161	0.000	0.000
	CdT7	0.187	0.000	0.000
	PbT1	0.203	0.121	0.000
	PbT2	0.248	0.000	0.193
	PbT3	0.175	0.163	0.153
	PbT4	0.145	0.000	0.064
	PbT5	0.103	0.000	0.121
	PbT6	0.161	0.000	0.000
PbT7	0.078	0.011	0.000	
PbT8	0.155	0.000	0.000	
PbT9	0.107	0.118	0.000	

IAA를 생성하는 능력을 보유하고 있었으나, 옥수수 근권에 비해 톨페스큐의 근권에서 분리한 균주들의 활성이 더 우수함을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 CdT5과 PbT2 균주의 IAA 생성능이 우수하였다.

Siderophore 생성능의 경우, IAA 생성능에 비해 활성을 가진 균주의 비율이 낮았다. CuM5, PbT1, PbT3 및 PbT9 균주에서 가장 높은 활성을 보였으며, 대부분 납 함유 배지에서 분리한 균주들의 siderophore 생성능이 높았다.

ACC deaminase 활성능은 44종 세균 중 26종이 활성을 보였는데, siderophore 생성능과 유사하게 납 함유 배지에서 분리한 균주(PbM3, PbM6 및 PbM7)의 ACC deaminase 활성이 상대적으로 높았다. 또한, 구리 함유 배지에서 분리한 CuM5와 CdT3 균주의 ACC deaminase 활성도 상대적으로 우수하였다. PGP 활성을 종합적으로 분석하여 중금속 내성과 PGP 능력이 상대적으로 우수한 6종 근권세균(CuM5, CuT6, CdM2, CdT2, CdT5 및 PbT3 균주)을 2차 선별하였다.

2차 선별균주의 동정

2차 선별한 8종 균주의 동정결과 및 계통발생학적 특성을 Fig. 1에 도시하였다. CuM5 (Accession no. MW407068), CdM2 (Accession no. MW407022) 및 CdT2 (Accession no. MW407064)의 세 균주는 중금속에 내성을 지닌 균으로 알려진 *Cupriavidus* sp.와 유사도가 각각 100%, 99.1% 및 99.6%이었다[14]. CdT5 (Accession no. MW407024) 균주는 *Novosphingobium* sp.와 유사도가 100%로, 이 종은 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)를 분해하는 것으로 알려져 있다[15]. CuT6(Accession no. MW407070) 균주는 *Fulvimonas soli*와 유사도가 높았고(100%), *Fulvimonas* 속의 균주는 공기 중 질소를 고정시킬 수 있고 토양 내 중금속을 감소시킬 수 있으며 BTEX와 같은 방향족 화합물을 분해할 수 있다고 보고된 바 있다[16]. PbT3 (Accession no. MW407072) 균주의 경우 *Bacillus* sp.와 높은 유사도(82.5%)을 보였으며 폐광지역에서 중금속 오염 토양에서 중금속을 완화함과 동시에 식물 성장을 촉진하는 능력이 있다는 연구 결과가 존재한다[17].

2차 선별균주의 중금속 내성 및 TPHs 분해능

2차 선별한 6종 균주의 중금속(구리, 카드뮴 및 납)에 대한 내성과 TPHs 분해능을 평가한 결과를 Table 3에 나타내었다. 0.5 mM 구리 함유 배지에서는 CdM2 균주를 제외한 5종 모두 성장하였고, 1 mM 구리 함유 배지에서는 3종(CuT6, CdT5, PbT3), 5 mM 구리 함유 배지에서는 CuT6 균주만이 성장하였다. 10 mM 구리 함유 배지에서는 성장할 수 있는 균주는 없었다. 동일 농도 조건에서 비교해보면, 구

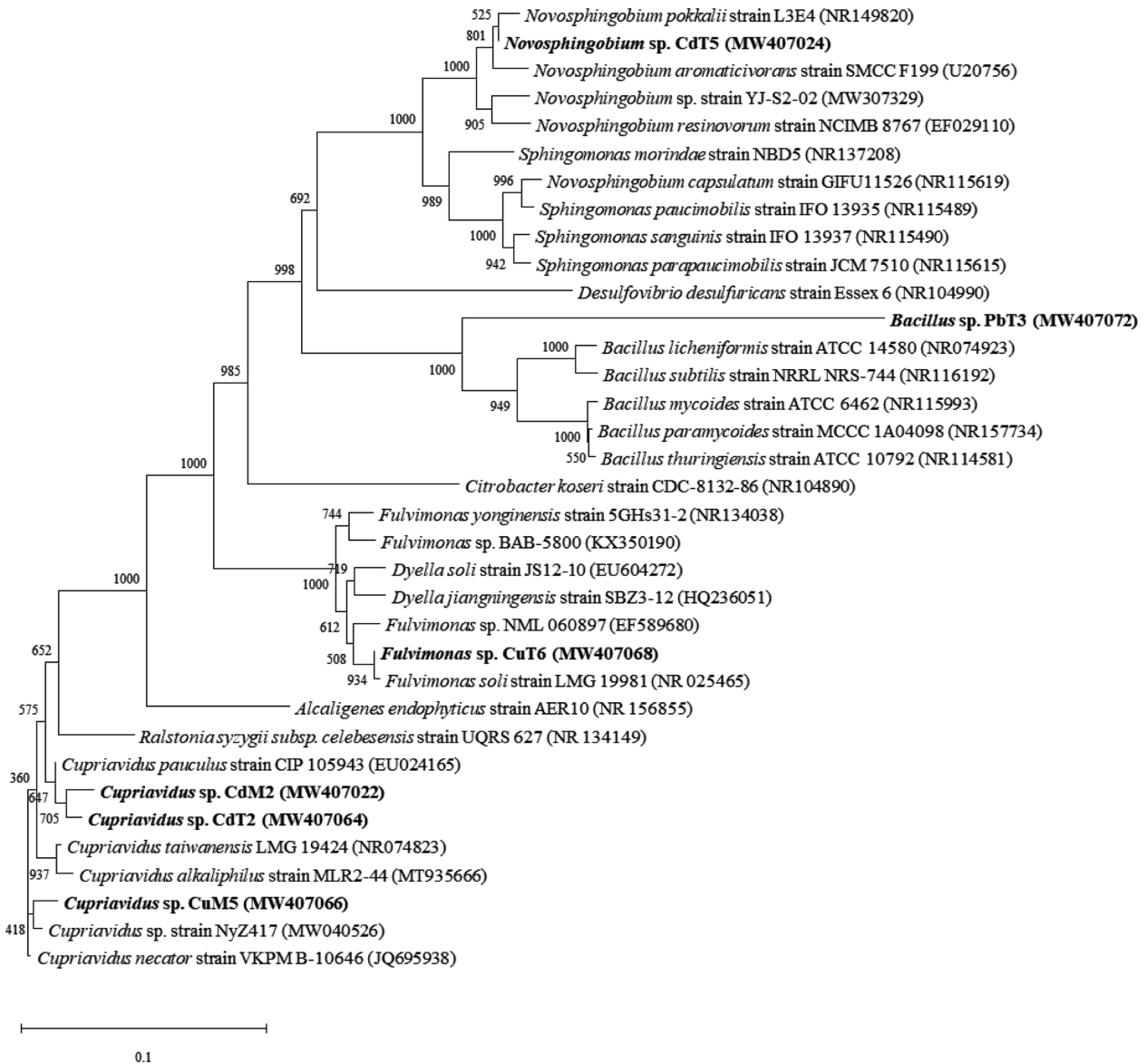


Fig. 1. Neighbor-Joining Phylogenetic trees of the strains CuM5, CdM2, CuT6, CdT2, CdT5 and PbT3 estimated from 16S rRNA sequence. Bootstrap values (percentages of 1,000 replications) are shown at the branch points. The scale bar represents 0.1 substitutions per site. The 16S rRNA gene sequence of heavy metal tolerance bacteria and similar bacteria to six strains were used as out-group.

리와 납에 비해 카드뮴이 함유된 배지에서 각 균주의 생장이 크게 저해되었다. 6종 균주 모두 5 mM 이상 카드뮴을 함유한 배지에서 성장하지 못했고 1 mM 카드뮴 함유 배지에서는 CdM2 및 PbT3 균주만 성장할 수 있었다. 0.5 mM 납 함유 배지에서는 6종 균주 모두 성장하였고 1 mM에서 또한 CuM5 균주를 제외한 5종 모두 성장하였다. 5 mM 이상의 납 함유 배지에서는 PbT3 균주만이 성장하였으며 10 mM에서는 성장 가능한 균주는 없었다. 종합적으로 PbT3 균주

의 중금속 내성이 가장 우수하였고, 그 다음으로 CuT6와 CdT5 균주의 중금속 내성이 우수함을 알 수 있었다. TPHs 분해능 평가 결과, PbT3와 CdT2 균주에서 각각 77.65%와 72.88%의 제거효율을 보였으며 6종의 균주 중 가장 높은 TPHs 분해능력을 보유하고 있었다. CuM5, CdM2 및 CuT6의 TPHs 제거효율은 각각 23.69%, 19.40% 및 14.89% 이었다. CdT5 균주의 경우 2.68%로 TPHs 분해능력이 6종의 균주 중 가장 낮음을 알 수 있었다.

Table 3. Activities of heavy metal tolerance and PGP by eight identified strains.

Identify	Heavy metal tolerance												TPHs degrading	PGP activity		
	Cu conc. (mM)				Cd conc. (mM)				Pb conc. (mM)					IAA (OD _{535nm})	Siderophore (OD _{700nm})	ACC deaminase (OD _{600nm})
	10	5	1	0.5	10	5	1	0.5	10	5	1	0.5				
<i>Cupriavidus</i> sp. CuM5 (MW407068)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	23.69%	0.096	0.110	0.430
<i>Cupriavidus</i> sp. CdM2 (MW407022)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	19.40%	0.103	0.013	0.054
<i>Fulvimonas soli</i> CuT6 (MW407070)	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	14.89%	0.109	0.097	0.129
<i>Cupriavidus</i> sp. CdT2 (MW407064)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	72.88%	0.111	0.000	0.051
<i>Novosphingonium</i> sp. CdT5 (MW407024)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	7.22%	0.217	0.054	0.000
<i>Bacillus</i> sp. PbT3 (MW407072)	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	77.65%	0.175	0.163	0.153

^a -: no activity, +: activity

고찰

일반적으로 고정 농도 이상의 중금속은 미생물을 비롯한 생물에 독성 영향을 미치지만, 일부 중금속에 내성을 가진 미생물은 이러한 환경조건에서도 성장하면서 생물학적 정화 능력을 갖거나 및 식물의 생장을 향상시킬 수 있다[18, 19]. 본 연구에서는 중금속 3종(구리, 카드뮴 및 납)에 내성 능력을 가지며 PGP 능력과 유류 분해능을 보유한 8종의 균주를 옥수수과 톨페스큐 근권토양에서 분리하였다.

토양에 식재된 식물 뿌리에서 분비되는 삼출물은 미생물 군집 및 활성에 변화를 야기하기도 하며 근권미생물은 식물의 생육상태, 토양 내 유기물 분해 등에 영향을 미칠 수 있다[20]. 또한 근권미생물 간의 상호작용은 서로의 군집 형성에 변화를 일으키기도 한다[20]. 본 연구에서는 옥수수와 톨페스큐 근권토양에서 중금속 내성 세균 특성을 조사하기 위해 중금속 함유 배지에서 생균수를 측정하였다. 그 결과 근권세균 수는 중금속 농도가 증가할수록 감소하는 것이 명확히 관찰되었다(Table 1). 기존에 보고된 연구에 따르면, 비오염 토양에서 옥수수 근권토양 세균의 생균수는 6.14×10^8 CFU/g-soil [21], 길보리속 식물의 근권에서는 5.05×10^8 CFU/g-soil, 밀의 근권에서는 7.10×10^8 CFU/g-soil, 붉은토끼풀의 근권에서는 32.55×10^8 CFU/g-soil이었다[21]. 또한 바나나 근권에서 서식하는 세균의 생균수는 3.00×10^8 CFU/g-soil이었다. 이와 같이 비오염 토양의 근권세균의 생균수가 10^8 CFU/g-soil 수준임을 고려하면, 본 연구에서 0.1 mM의 중금속 오염 조건에서의 근권세균 생균수는 비오염 조건에서의 생균수에 비해 1/18-1/100 수준으로 감소하였으며, 1 mM 구리, 카드뮴 및 납 오염 조건에서는 1/100-1/10,000

수준으로 감소하였다(Table 1).

본 연구결과와 유사하게 중금속 농도에 따라 토양 세균의 생균수가 감소하는 결과는 기존 연구에서도 보고되었다. 납 오염 토양에서의 생균수는 납농도에 비례하여 감소하였다 [22]. 또한 수은으로 오염된 토양에서도 유사한 결과가 관찰되었다[22]. 그러나 아연 오염 토양에서의 생균수는 비오염 토양의 생균수와 유의미한 차이는 없었는데, 이는 납과 수은에 비해 아연 독성이 낮기 때문으로 고찰되었다[22]. 그 밖에도 구리로 오염된 토양에서 측정된 생균수는 비오염 토양의 생균수에 비해 현저히 감소하였고[23], 0.8 mM의 구리가 함유된 배지에서의 생균수는 대조군(구리 무첨가 배지)에 비해 최대 1/100 수준으로 감소하였다[24]. 카드뮴 오염 토양에서 카드뮴 농도에 비례하여 생균수가 감소함이 여러 연구에 의해 보고되고 있다[25, 26].

본 연구에서 순수 분리한 6종의 균주 중 3종의 CuM5, CdM2 및 CdT2 균주는 *Cupriavidus* sp.로 동정되었다 (Table 3, Fig. 1). *Cupriavidus* 속 세균은 다양한 식물의 근권세균으로 알려져 있다. 본 연구와 동일한 옥수수 근권을 포함하여 선인장, 수수의 근권에서도 분리되었으며[27], 이외에도 인삼[28], 미모사[29], 사다리발의 꼬리[30]와 같이 다양한 식물의 근권세균으로 보고되었다. *Cupriavidus* 속의 세균은 다양한 오염물질 분해 균주로 알려져 있으며[31] 카드뮴을 비롯한 여러 중금속의 독성을 해독할 수 있는 능력을 보유하는 대표적인 중금속 내성 균주로 알려져 있다[31]. 또한 *Cupriavidus* 속 세균은 아연, 비소, 구리 및 코발트의 존재하에서도 생장이 가능하다고 보고되었다[27]. 특히, *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 균주는 카드뮴 9.0 ppm, 구리 4.6 ppm 및 아연 3.2 ppm 농도의 중금속을 세포 내 축

적할 수 있었고, 카드뮴은 세포벽과 세포막에 흡착하는 것으로 밝혀졌다[32]. 또한, *Cupriavidus basilensis* r507 균주는 비소 산화 유전자인 arsenite oxidase-like (*aioA*-like) 유전자를 지니고 있어 비소를 산화하는 능력을 보유하고 있었다[30].

Cupriavidus taiwanensis KKKU2500-3 균주는 단백질 3차 구조에 관여하는 샤페론 단백질인 GroEL을 보유함으로써 카드뮴 독성 스트레스 속에서도 생장이 가능한 것으로 보고 되었다[33]. *Cupriavidus metallidurans* CH34 균주는 납 내성 유전자(*Pbr*)를 보유하고 있어 납으로 오염된 환경에서도 생장이 가능하였다[34]. 또한 *Cupriavidus metallidurans* 로 동정된 균주는 중금속에 대한 내성을 가진 유전자를 가장 많이 보유하고 있었다[31]. *Cupriavidus gilardii* CR3 균주는 구리 내성 오페론 유전자(*cus* 및 *cop*)를 가지고 있어 구리 1가 이온을 독성이 적은 구리 2가 이온으로 산화시키며 구리이온에 대한 내성을 보였다[35]. *Cupriavidus taiwanensis* TJ208의 생장을 억제하는 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 구리 5.0 mM, 카드뮴 2.5 mM, 납 15 mM로 비교적 높은 농도의 중금속에 대해 내성을 보였다[36].

Cupriavidus 속 세균의 식물 성장 촉진 능력에 대한 연구 결과도 쉽게 찾아볼 수 있다. 중금속 오염 농업토양에서 분리한 *Cupriavidus* sp. 395/10 균주는 식물 성장 촉진 호르몬인 IAA 생성능이 우수하였고, 토양 내 크롬 제거율이 60%로 생물학적 정화기술에 유용한 균주로 밝혀졌다[37]. 또한, 카드뮴에 내성을 지닌 *Cupriavidus necator* 균주는 IAA, siderophore 및 ACC deaminase 등의 식물 성장 촉진 능력을 가지고 있었다[38]. 갯(*Brassica juncea* L)의 근권과 뿌리에서 분리된 균주인 *Cupriavidus* sp. SaCRH1과 SaCR1은 IAA, siderophore 생성능 및 인산염 가용화를 보였다[39]. *Cupriavidus* sp. DCY86^T 균주는 인산염 가용화능 및 siderophore 생성능을 가지고 있음이 확인되었다[28].

Cupriavidus 속 세균에 의한 석유계 탄화수소화합물 분해능도 보고되고 있다. *Cupriavidus* sp. MTS-7 균주는 PAHs를 분해하였으며[40], *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 균주는 살리실산, 페닐 아세트산과 같은 방향족 화합물의 분해를 돕는 유전자를 보유하고 있어 우수한 유류 분해능을 보였다[41].

본 연구에서 순수분리된 CdT5 균주는 *Novosphingobium* sp.로 동정되었다(Table 3, Fig. 1). 본 연구와 마찬가지로, 기존 연구에서 역시 식물의 근권으로부터 *Novosphingobium* 속 세균이 분리되었는데, *Novosphingobium rhizosphaerae* 균주는 옥수수의 근권에서[42], *Novosphingobium pokkali* 균주는 수중 연안지역에서 재배되는 식염수 내성을 가진 벼과 식물의 근권에서 분리되었다[43]. *Novosphingobium*

*pokkali*는 IAA 및 siderophore 생성능을 지니고 있어[43], 본 연구에서 분리한 CdT5 균주의 식물 성장 촉진 능력과 유사한 특성을 보였다. 질소고정능력을 가진 *Novosphingobium* sp. RFNB21는 토마토와 고추의 생장을 유의하게 증가시켰으며, IAA와 ACC deaminase 생성하였다[44]. *Novosphingobium* sp. HR1a 균주는 염분 스트레스에 영향을 받는 감귤류 식물에 염분 스트레스로 인한 손상을 최소화하며 식물 생장을 촉진하였다[45].

Novosphingobium 속의 세균은 방향족 화합물을 분해할 수 있었다[15]. *Novosphingobium panipatense* P5:ABC는 망간, 알루미늄, 크롬, 납, 아연 및 니켈과 같은 중금속에 내성을 지니며 탄화수소 분해효소를 가지고 있어 PAHs 및 원유를 분해하였다[46]. 이 균주는 alkane hydroxylase, catechol 1,2-dioxygenase 및 catechol 2,3-dioxygenase 등의 탄화수소 분해효소를 보유한 것으로 평가되었다[46]. 또한 *Novosphingobium* 속의 세균은 PAHs를 분해하는 유전자(PAH-RHD α)를 보유하고 있음이 보고되었다[47]. *Novosphingobium* sp. HR1a는 식물 성장 촉진 능력뿐만 아니라 PAHs를 분해하는 유전자(PahT)를 보유하고 있어 PAHs 및 방향족 화합물을 분해할 수 있었다[48]. 또한, *Novosphingobium* sp. HS2aR 균주는 페난트렌(phenanthrene)의 분해 유전자(*phnA1f*)를 보유하고 있었다[49].

본 연구에서 분리한 PbT3 균주는 *Bacillus* sp.로 동정되었으며, 본 연구 결과와 유사한 기존 연구들을 쉽게 찾을 수 있다[17, 50–53]. *Bacillus* 속의 세균은 다양한 식물의 근권에서 분리되었고, 벼과 식물인 *Oryza sativa* L.에서 분리된 *Bacillus cereus* M4 균주는 카드뮴에 내성을 지니고 있을 뿐만 아니라 IAA 생성능력을 보유하여 식물 생장을 유의하게 촉진시켰다[54]. *Bacillus thuringiensis* GDB-1는 세포 표면에 흡착하는 기작을 통해 고농도의 중금속인 납, 아연, 비소, 카드뮴, 구리 및 니켈을 제거할 수 있었으며, IAA, siderophore 생성능 및 ACC deaminase 활성을 가짐과 동시에 사방오리(*Alnus firma*)의 생장을 유의하게 촉진시켰다[17]. 구리 오염 토양에서 분리한 *Bacillus toyonensis* EhS7 균주는 구리에 대해 높은 내성을 가지고 있고, IAA, siderophore 및 질소 고정능을 통해 식물 생장을 촉진해서 수확량을 증가시켰다[50]. 까마중(*Solanum nigrum* L.)의 근권에서 분리된 *Bacillus* sp. L14는 카드뮴, 납 및 구리에 내성을 보였으며, 이 균주의 ATPase 활동이 양이온 배출을 통해 중금속의 독성으로부터 세포를 보호하는 금속 내성 기작을 가지고 있음이 밝혀졌다[55]. 또 다른 중금속 내성 균주인 *Bacillus* sp. Q3 및 Q5는 카드뮴을 세포벽에 축적하고 불용성 형태로 세포 표면에 수송 후 납의 침전을 유도하여 중금속 오염 토양을 생물학적으로 정화하는 기작이 밝혀졌다[56].

Bacillus thuringiensis PS-1 균주는 중금속 오염 토양에서 siderophore, IAA 활성 및 인산 가용화능 등의 식물 생장 촉진능을 통해 완두콩(*Pisum sativum* L.)의 생장을 유의하게 증가시켰다[57]. 납에 내성을 지닌 *Bacillus* sp. PbSP6 균주는 siderophore 생성능은 가지고 있진 않았으나 catalase 및 protease의 효소 활성 및 ACC deaminase 활성을 보유함으로써 식물 생장을 촉진할 수 있었다[58].

Bacillus 속의 세균의 유류 분해능력에 관한 다양한 연구 결과 역시 보고되었는데, *Bacillus subtilis* AHI 및 AHII 균주는 디젤이나 나프탈렌(naphthalene) 계열의 탄화수소를 유일한 탄소 에너지원으로 이용하였다[59]. 정유공장 토양에서 분리한 *Bacillus* sp. TMY-2 균주는 10,000 mg/l의 디젤을 80% 분해하였으며[60], 이와 마찬가지로 본 연구의 PbT3 균주는 30,000 mg/l의 고농도 디젤을 분해할 수 있었다(Table 3). 바이오 계면활성제를 생성할 수 있는 *Bacillus pumilus* KS2 균주는 TPHs를 최대 80% 이상 제거하였고, 원유에 존재하는 PAH도 분해할 수 있었다[61].

본 연구에서 분리한 CuT6 균주는 *Fulvimonas soli*로 동정되었다(Table 3, Fig. 1). *Fulvimonas* sp. CuNFbM 4.1는 구리, 카드뮴 및 납에 대해 내성을 가지고 있었다[62]. 또한, 이 CuNFbM 4.1 균주는 구리로 오염된 광산지역에서 자라는 사탕수수(talahib grass)의 근권토양에서 분리되었다[62]. 또한, 호기성 조건에서 나프탈렌을 포함한 벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠 및 자일렌을 생분해할 수 있었다[16, 63]. *Fulvimonas* 속의 세균에 대해 아직까진 식물 생장 촉진 능력이 보고된 바는 없다. 따라서 본 연구에서 처음으로 *Fulvimonas* 속에 속하는 CuT6 균주의 식물 생장 촉진 능력이 평가되었으며, 추가적인 후속 연구를 통해 이에 대해 자세히 규명할 필요가 있다.

본 연구에서 분리된 6종의 균주는 중금속 저항성, 식물 생장 촉진능을 비롯하여 유류 분해능까지 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 본 연구의 결과는 중금속 및 유류 복합 오염 토양을 정화시키며 식물 생장을 촉진시키는 새로운 미생물 자원 개발에 기여할 수 있으며, 또한 이러한 신규 미생물 자원을 활용하여 생물학적 정화기술의 혁신 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 추가적으로 본 연구에서 분리한 균주를 중금속 및 유류 복합 오염 토양에 직접 접종하여 오염 토양의 정화효율 및 식물 생장에 미치는 효과를 조사하고, 정화 과정에서 분리균주의 생태학적 거동 특성을 모니터링하는 후속 연구가 필요하다.

요 약

식물과 근권미생물을 이용해 토양 오염물질을 제거하는 rhizoremediation의 효율을 높이기 위해서는 오염물질을 제

거함과 동시에 식물 생장을 촉진시키는 미생물 자원 개발이 필요하다. 본 연구에서는 중금속 및 유류 복합 오염 토양에서 서식하고 있는 옥수수과 톨페스큐의 근권으로부터 중금속(구리, 카드뮴 및 납) 내성을 가진 근권세균을 순수분리하였고, 식물 생장 촉진능, 중금속 내성능 및 디젤 분해능을 정성적으로 평가하였다. 그 결과 중금속 내성, 식물 생장 촉진 활성 및 디젤 분해능을 가진 6종의 균주를 분리하였다. 옥수수 근권에서 분리한 CuM5와 CdM2 균주는 *Cupriavidus* sp.로 동정되었다. 톨페스큐 근권에서 분리한 CuT6, CdT2, CdT5 및 PbT3는 각각 *Fulvimonas soli*, *Cupriavidus* sp., *Novosphingonium* sp. 및 *Bacillus* sp.로 동정되었다. *Cupriavidus* sp. CuM5와 CdM2는 중금속 내성과 디젤 분해능은 상대적으로 낮았으나, 식물 생장 촉진능이 상대적으로 우수하였다. 6종 중에서 디젤 분해능이 가장 우수한 균주는 *Cupriavidus* sp. CdT2와 *Bacillus* sp. PbT3이었다. 특히, *Bacillus* sp. PbT3는 3종의 중금속에 대해 상대적으로 우수한 내성을 가졌고 식물 생장 촉진능도 우수하였다. 본 연구에서 분리한 근권세균은 유류와 중금속 복합 오염 토양을 정화시키며 식물 생장을 촉진시키는 새로운 미생물 자원으로 활용 가능하다.

Acknowledgments

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science and ICT (NRF-2019R1A2C2006701).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Kumar V, Pandita S, Singh Sidhu GP, Sharma A, Khanna K, Kaur P, et al. 2021. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: a comprehensive review. *Chemosphere* **262**: 127810.
2. Dias MC, Monteiro C, Moutinho-Pereira J, Correia C, Gonçalves B, Santos C. 2013. Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiol. Plant.* **35**: 1281-1289.
3. Zulfiqar U, Farooq M, Hussain S, Maqsood M, Hussain M, Ishfaq M, et al. 2019. Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *J. Environ. Manage.* **250**: 109557.
4. Joo JO, Kim IH, Oh B-K. 2014. Removal of Copper(II), Zinc(II) in marine environment by heavy metal resistant *Desulfovibrio desulfuricans*. *KSBBJ.* **29**: 139-144.
5. Koo S, Cho K. 2007. Characterization of a heavy metal-resistant

- and plant growth-promoting rhizobacterium, *Methylobacterium* sp. SY-NiR1. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 58-65.
6. Benitez E, Melgar R, Nogales R. 2004. Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* **36**: 1615-1623.
 7. Wöhler, I. 1997. Auxin-indole derivatives in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. *Microbiol. Res.* **152**: 399-405.
 8. Nagarajkumar M, Bhaskaran R, Velazhahan R. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* **159**: 73-81.
 9. Hwang JS, Song HG. 2020. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* isolates against toxigenic fungi. *Korean J. Microbiol.* **56**: 28-35.
 10. Grobelak A, Kokot P, Świątek J, Jaskulak M, Rorat A. 2018. Bacterial ACC deaminase activity in promoting plant growth on areas contaminated with heavy metals. *J. Ecol. Eng.* **19**: 150-157.
 11. Dell'Amico E, Cavalca L, Andreoni V. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 153-162.
 12. Barrado LN. 2018. Isolation and characterisation of endophytes from *vitis vinifera*. *Univ Politècnica València*, pp. 1-25.
 13. Lee YY, Seo Y, Ha M, Lee J, Yang H, Cho KS. 2021. Evaluation of rhizoremediation and methane emission in diesel-contaminated soil cultivated with tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Environ. Res.* **194**: 110606.
 14. Hajdu R, Slaveykova VI. 2012. Cd and Pb removal from contaminated environment by metal resistant bacterium *Cupriavidus metallidurans* CH34: Importance of the complexation and competition effects. *Environ. Chem.* **9**: 389-398.
 15. Lyu Y, Zheng W, Zheng T, Tian Y. 2014. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. *PLoS One* **9**: 101438.
 16. Deng Y, Yang F, Deng C, Yang J, Jia J, Yuan H. 2017. Biodegradation of BTEX aromatics by a haloduric microbial consortium enriched from a sediment of Bohai Sea, China. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **183**: 893-905.
 17. Babu AG, Kim JD, Oh BT. 2013. Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDB-1. *J. Hazard Mater.* **250**: 477-483.
 18. Jiang C, Sheng X, Qian M, Wang Q. 2008. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere* **72**: 157-164.
 19. Hong S, Cho K-S. 2007. Effects of plants, rhizobacteria and physicochemical factors on the phytoremediation of contaminated soil. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 261-271.
 20. Oh SD, Ahn BO, Kim MK, Sohn SI, Ryu TH, Cho HS, et al. 2010. Effects of protox herbicide tolerance rice cultivation on microbial community in paddy soil. *Korean J. Env. Agric.* **32**: 95-101.
 21. Dotaniya ML, Meena VD. 2015. Rhizosphere effect on nutrient availability in soil and its uptake by plants: a review. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol Sci.* **85**: 1-12.
 22. Ashraf R, Ali TA. 2007. Effect of heavy metals on soil microbial community and mung beans seed germination. *Pakistan J. Bot.* **39**: 629.
 23. Wang L, Wang J, Zhu L, Wang J. 2018. Toxic effects of oxytetracycline and copper, separately or combined, on soil microbial biomasses. *Environ. Geochem. Health* **40**: 763-776.
 24. Kabagale AC, Cornu B, Van Vliet F, Meyer CL, Mergeay M, Simbi JBL, et al. 2010. Diversity of endophytic bacteria from the cuprophytes *Haumaniastrum katangense* and *Crepidiorhopalon tenuis*. *Plant Soil* **334**: 461-474.
 25. Xiao L, Yu Z, Liu H, Tan T, Yao J, Zhang Y, et al. 2020. Effects of Cd and Pb on diversity of microbial community and enzyme activity in soil. *Ecotoxicology* **29**: 551-558.
 26. Prapagdee B, Watcharamusik A. 2009. Adaptive and cross-protective responses against cadmium and zinc toxicity in cadmium-resistant bacterium isolated from a zinc mine. *Braz. J. Microbiol.* **40**: 838-845.
 27. Estrada-De Los Santos P, Solano-Rodríguez R, Matsumura-Paz LT, Vásquez-Murrieta MS, Martínez-Aguilar L. 2014. *Cupriavidus plantarum* sp. nov., a plant-associated species. *Arch Microbiol.* **196**: 811-817.
 28. Liu X, Wei S, Wang F, James EK, Guo X, Zagar C, et al. 2012. *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in Southern China. *FEMS Microbiol. Ecol.* **80**: 417-426.
 29. Yang C, Ho YN, Makita R, Inoue C, Chien MF. 2020. *Cupriavidus basilensis* strain r507, a toxic arsenic phytoextraction facilitator, potentiates the arsenic accumulation by *Pteris vittata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **190**: 110075.
 30. Siripornadulsil S, Siripornadulsil W. 2013. Cadmium-tolerant bacteria reduce the uptake of cadmium in rice: potential for microbial bioremediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **94**: 94-103.
 31. Vicentin RP, Santos JV, Labory CRG, Costa AM, Moreira FMS, Alves E. 2018. Tolerance to and Accumulation of Cadmium, Copper, and Zinc by *Cupriavidus necator*. *Rev. Bras. Cienc do Solo.* **42**: 1-12.
 32. Siripornadulsil S, Thanwisai L, Siripornadulsil W. 2014. Changes in the proteome of the cadmium-tolerant bacteria *Cupriavidus taiwanensis* KGU2500-3 in response to cadmium toxicity. *Can J. Microbiol.* **60**: 121-131.
 33. Taghavi S, Lesaulnier C, Monchy S, Wattiez R, Mergeay M, van der Lelie D. 2009. Lead(II) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: Interplay between plasmid and chromosomally-located functions. *Antonie Van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **96**: 171-182.
 34. Huang N, Mao J, Hu M, Wang X, Huo M. 2019. Responses to copper stress in the metal-resistant bacterium *Cupriavidus gilardii* CR3: a whole-transcriptome analysis. *J. Basic Microbiol.* **59**: 446-457.

35. Chen WM, Wu CH, James EK, Chang JS. 2008. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. *J. Hazard Mater.* **151**: 364-371.
36. Minari GD, Saran LM, Constancio MTL, da Silva RC, Rosalen DL, de Melo WJ, et al. 2020. Bioremediation potential of new cadmium, chromium, and nickel-resistant bacteria isolated from tropical agricultural soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **204**: 111038.
37. Li X, Yan Z, Gu D, Li D, Tao Y, Zhang D, et al. 2019. Characterization of cadmium-resistant rhizobacteria and their promotion effects on *Brassica napus* growth and cadmium uptake. *J. Basic Microbiol.* **59**: 579-590.
38. Wang Q, Ma L, Zhou Q, Chen B, Zhang X, Wu Y, et al. 2019. Inoculation of plant growth promoting bacteria from hyperaccumulator facilitated non-host root development and provided promising agents for elevated phytoremediation efficiency. *Chemosphere* **234**: 769-776.
39. Singh P, Kim YJ, Nguyen NL, Hoang VA, Sukweenadhi J, Farh MEA, et al. 2015. *Cupriavidus yeoncheonense* sp. nov., isolated from soil of ginseng. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **107**: 749-758.
40. Kuppusamy S, Thavamani P, Megharaj M, Lee YB, Naidu R. 2016. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) degradation potential of a new acid tolerant, diazotrophic P-solubilizing and heavy metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. MTS-7 isolated from long-term mixed contaminated soil. *Chemosphere* **162**: 31-39.
41. Ledger T, Zúñiga A, Kraiser T, Dasencich P, Donoso R, Pérez-Pantoja D, et al. 2012. Aromatic compounds degradation plays a role in colonization of *Arabidopsis thaliana* and *Acacia caven* by *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**: 713-723.
42. Kämpfer P, Martin K, McInroy JA, Glaeser SP. 2015. Proposal of *Novosphingobium rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 195-200.
43. Krishnan R, Menon RR, Busse HJ, Tanaka N, Krishnamurthi S, Rameshkumar N. 2017. *Novosphingobium pokkali* sp. nov., a novel rhizosphere-associated bacterium with plant beneficial properties isolated from saline-tolerant pokkali rice. *Res. Microbiol.* **168**: 113-121.
44. Islam MR, Sultana T, Joe MM, Yim W, Cho JC, Sa T. 2013. Nitrogen-fixing bacteria with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. *J. Basic Microbiol.* **53**: 1004-1015.
45. Vives-Peris V, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM. 2018. Salt stress alleviation in citrus plants by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Novosphingobium* sp. *Plant Cell Rep.* **37**: 1557-1569.
46. Chettri B, Singh AK. 2019. Kinetics of hydrocarbon degradation by a newly isolated heavy metal tolerant bacterium *Novosphingobium panipatense* P5:ABC. *Bioresour. Technol.* **294**: 122190.
47. Liu X, Liu M, Chen X, Yang Y, Hou L, Wu S, et al. 2019. Indigenous PAH degraders along the gradient of the Yangtze Estuary of China: Relationships with pollutants and their bioremediation implications. *Mar. Pollut. Bull.* **142**: 419-427.
48. Segura A, Udaondo Z, Molina L. 2021. PahT regulates carbon fluxes in *Novosphingobium* sp. HR1a and influences its survival in soil and rhizospheres. *Environ. Microbiol.* **23**: 2969-2991.
49. Rodriguez-Conde S, Molina L, González P, García-Puente A, Segura A. 2016. Degradation of phenanthrene by *Novosphingobium* sp. HS2a improved plant growth in PAHs-contaminated environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 10627-10636.
50. Ke T, Zhang J, Tao Y, Zhang C, Zhang Y, Xu Y, et al. 2021. Individual and combined application of Cu-tolerant *Bacillus* spp. enhance the Cu phytoextraction efficiency of perennial ryegrass. *Chemosphere* **263**: 127952.
51. Kamaruzzaman MA, Abdullah SRS, Hasan HA, Hassan M, Othman AR, Idris M. 2020. Characterisation of Pb-resistant plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from *Scirpus grossus*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **23**: 101456.
52. Saharan BS, Verma S. 2014. Potential plant growth promoting activity of *Bacillus licheniformis* UHI(II)7. *Int. J. Microb. Resour. Technol.* **2**: 22-27.
53. Akhtar N, Ilyas N, Yasmin H, Sayyed RZ, Hasnain Z, Elsayed AE, et al. 2021. Role of *Bacillus cereus* in improving the growth and Phytoextractability of *Brassica nigra* (L.) K. Koch in chromium contaminated soil. *Molecules* **26**: 1569.
54. Wang C, Liu Z, Huang Y, Zhang Y, Wang X, Hu Z. 2019. Cadmium-resistant rhizobacterium *Bacillus cereus* M4 promotes the growth and reduces cadmium accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **72**: 103265.
55. Guo H, Luo S, Chen L, Xiao X, Xi Q, Wei W, et al. 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulator endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresour. Technol.* **101**: 8599-8605.
56. Heidari P, Panico A. 2020. Sorption Mechanism and Optimization Study for the Bioremediation of Pb(II) and Cd(II) Contamination by Two Novel Isolated Strains Q3 and Q5 of *Bacillus* sp. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**: 4059.
57. Singh S, Kumar V, Sidhu GK, Datta S, Dhanjal DS, Koul B, et al. 2019. Plant growth promoting rhizobacteria from heavy metal contaminated soil promote growth attributes of *Pisum sativum* L. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **17**: 665-671.
58. Pandey S, Ghosh PK, Ghosh S, De TK, Maiti TK. 2013. Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. *J. Microbiol.* **51**: 11-17.
59. Al-Sharidah A, Richardt A, Golecki JR, Dierstein R, Tadros MH. 2000. Isolation and characterization of two hydrocarbon-degrading *Bacillus subtilis* strains from oil contaminated soil of Kuwait. *Microbiol. Res.* **155**: 157-164.
60. Kebria DY, Khodadadi A, Ganjidoust H, Badkoubi A, Amoozegar MA. 2009. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **6**: 435-442.

61. Patowary K, Saikia RR, Kalita MC, Deka S. 2015. Degradation of polyaromatic hydrocarbons employing biosurfactant-producing *Bacillus pumilus* KS2. *Ann. Microbiol.* **65**: 225-234.
62. Yuniarti E, Dalmacio IF, Paterno ES. 2019. Heavy metal-resistant rhizobacteria from gold mine in Pongkor Indonesia and copper mine in Marinduque Philippines. *J. ILMU Pertan.* **31**: 75-88.
63. Huang Y, Li L. 2014. Biodegradation characteristics of naphthalene and benzene, toluene, ethyl benzene, and xylene (BTEX) by bacteria enriched from activated sludge. *Water Environ. Res.* **86**: 277-284.