

Biolog Ecoplate와 DGGE 방법을 이용한 알칼리화 토양의 미생물군집 변화 평가

이은영*, 홍선화

Assessment of the Changes in the Microbial Community in Alkaline Soils using Biolog Ecoplate and DGGE

Eun Young Lee* and Sun Hwa Hong

접수: 2013년 9월 9일 / 게재승인: 2013년 10월 23일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Soil microbial community analysis of farmland soil sprayed with lye in order to use fertilizer in Nigeria was performed. As a control, two kinds of soils not sprayed with lye, located in Eungo and Lagos with general practice in agriculture was selected. Soil sprayed with lye was pH 8.25 through alkalization reaction, while the other soil samples were pH 6.22 and 5.94. Substrate utilization and species diversity index of soil sprayed with lye were low than that of the other soils with the analysis of Biolog ecoplate. As a result of principal component analysis, the relationship between three samples was low. Microbial community analysis was performed by DGGE and most of them were soil uncultured bacterium. Especially, Uncultured *Acidobacteria* and Uncultured *Methylocystis* sp., which had been isolated from the rhizosphere of soybean grown in that site were discovered in the soil sprayed with lye.

Keywords: Ash, Alkaline soil, Microbial community, Ecoplate, DGGE

1. 서론

오늘날의 농업분야에서는 화학비료나 화학농약의 과다사용으로 인하여 토양의 산성화와 부영양화 등이 초래되고 있고 그 결과 작물의 품질이 저하되어 농가 소득 감소와 환경오염 등 심각한 문제가 발생되고 있다 [1-3]. 토양에는 산성을 중화시키는 산중화능 (acid neutralization capacity; ANC)이 있지만, 그 이상의 산성물질이 토양에 유입되면 토양은 급격히 산성화된다 [4]. 산성화가 진행된 토양에서 생장한 식물은 염기 용탈로 인한 영양상태 악화와 광합성 속도 저하, 그리고 토양으로부터 용출된 Al, Mn 등에 의한 식물의 세균 발생이나 신장생장이 억제되는 등의 복합적인 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다 [5-7]. 토양 산성화를 방지하기 위해서는 화학비료나 화학농약의 사용을 줄이거나 대체할 수 있는 생물학적 처리가 대두되고 있는데, 특히 토양 생태계의 변화로 인한 작물 생산성의 향상이나 생물학적 방제가 다양한 미생물에 의하여 가능하다는 것이 국내외 여러 연구자들에 의하여 입증되어지고 있다 [1-3]. 이밖에도 식물의 재를 비료로 사용하여 토양을 알칼리화 하는 방법이 있는데 이는 과학적 입증이 이루어지지 않은 방법이다. 특히, 알칼리화된 토양은 Mg, B, Fe의 흡수를 억제하여 식물의 성장을 저해시키며, 미생물 성장에 영향을 미친다.

토양 미생물상은 육안으로 관찰이 어려우므로 다양한 방법을 이용하여 토양미생물상을 분석한다. 미생물 군집을 측정하는 방법에는 탄소원 이용도를 이용한 community-level physiological profiling (CLPP), 인지질막의 다양성을 기본으로 이용한 phospholipid fatty acid analysis (PLFA) 등이 있다.

수원대학교 환경에너지공학과
Department of Environmental and Energy Engineering, The University of Suwon, Suwon 445-743, Korea
Tel: +82-31-220-2614, Fax: +82-31-220-2533
e-mail: ley@suwon.ac.kr

군집의 종류를 분석하고 정량화하기 위한 가장 객관적이고 정확한 동정 방법으로는 16S rRNA 유전자 분석인 denaturing and thermal gradient gel electrophoresis (DGGE, TGGE), single strand conformation polymorphism (SSCP), amplified ribosomal DNA rRestriction analysis (ARDRA), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 등이 있다 [8-12]. 이 중에서도 Biolog Eco plate를 활용한 CLPP방법은 31기질을 유일 탄소원으로 이용하여 미생물에 의한 이용도를 평가하는 방법으로, 측정법이 매우 간단하고 편리한 장점이 있다 [13]. 또한 분자생물학적 기법 중의 하나인 DGGE 방법은 전기 영동시 gel 내에 존재하는 denaturant의 gradient에 따른 핵산의 이중나선 구조와 변성 구조, 즉 염기서열이 가지는 T_m 값의 차이에 의해 핵산의 이동속도가 달라지는 점을 이용한 것이다. 이 방법은 전체적인 DNA에 대한 질적 그리고 양적 변화를 하나의 gel 상에서 관찰할 수 있는 장점이 있으며, 또한, DGGE fingerprint 상의 band로부터 직접 DNA를 회수한 후 염기서열을 확인할 수 있는 장점을 가지고 있어 환경시료의 미생물 군집 분석에 유용하게 활용 가능하다 [10,14-16].

이에 본 연구에서는 식물의 깻물을 비료로 이용하여 토양의 알카리화가 진행되고 있는 나이지리아의 발토양 한지역과 그렇지 않은 토양을 두 지역을 대상으로 미생물 군집의 변화를 알아보기 위해서 CLPP와 DGGE 방법을 이용하여 토양 미생물 군집 특성을 조사하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 토양의 시료채취와 pH 측정

시료 A는 나이지리아의 Abia공대 안의 작물을 재배하고 있는 토양으로 주변 잡초를 태워 만든 깻물을 비료로 사용하고 있는 지역으로부터 토양을 채취한 것이다. 시료 B는 나이지리아의 Lagos에서 채취한 시료로 깻물을 비료로 사용하지 않는 작물 재배지에서 채취하였으며, 시료 C는 시료 B와 마찬가지로 깻물을 사용하지 않는 Eungu에서 작물을 재배하고 있는 토양을 채취하였다. 각각 채취된 토양의 pH는 토양과 3차 증류수를 1:5 (w/v)로 혼합한 후 30분간 교반하고 30분간 정지한 후 상등수를 pH meter (Thermo Benchtop, USA)로 측정하였다.

2.2. Community-level physiological profiling (CLPP) 분석

Community level assay에서 이용하는 Biolog Ecoplate는 31종의 다양한 기질이 3 set 씩 microplate 96 well 내에 건조된 상태로 채워져 있다 (기질이 들어가 있지 않은 3 well 3 sets 포함). 각각의 well에 환경 시료 현탁액을 접종하고 배양한 후, 기질에 대한 색상변화 및 탁도를 측정하여 기질 이용성을 분석함으로써 각 환경 시료내의 미생물 군집 특성을 비교할 수 있다. 나이지리아에서 채취한 토양 시료를 가지고 실험을 수행하였다. 토양 시료와 멸균수를 1:10 (w/w)의 비율로 희석한 후 200 rpm으로 10분간 교반한 후 정지시켜 상등액만 Eco

plate (Biolog, USA)의 각각의 well에 150 μ L씩 접종한 후, 20°C에서 배양하면서, 24시간 간격으로 각 well의 색 변화를 595 nm 파장에서 측정하여 분석 하였다. 흡광도는 Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Finland)을 이용하여 측정된 후, average well color development (AWCD)를 다음의 식으로 계산하였다 [17].

$$AWCD = \Sigma(C - R)/n \quad (1)$$

C : 각 well의 OD_{595nm} 값

R : Control well의 OD_{595nm} 값

n : 기질의 수 (31)

생태학에서 종 다양성을 나타내는 지수인 Shannon index 값을 다음과 같은 식으로 계산하였다 [18].

$$H = -\Sigma P_i \ln P_i \quad (2)$$

H : Shannon Index

P_i : 전체 OD_{595nm} 값에 대한 각각의 기질 OD_{595nm} 값

또한, 배양 4일과 6일의 각 well의 OD값은 아래의 식을 이용하여 계산한 후, SPSS 18.0ko (SPSS Inc. Korea)을 이용하여 principal components analysis (PCA)를 수행하였다.

$$(C_{id} - R_{id})/AWCD_{id} \quad (3)$$

C_{id} : 배양 i 일째의 각 well의 OD_{595nm} 값

R_{id} : 배양 0일째의 각 well의 OD_{595nm} 값

$AWCD_{id}$: 배양 i 일째 AWCD 값

2.3. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 기법을 이용한 미생물 군집 분석

Genomic DNA 시료를 template로 하여 PCR (TaKaRa PCR thermal cycle, JAPAN)을 수행하였다. PCR에 사용한 primer는 Br518f (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')과 341fGC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')을 사용하였다. PCR조건은 pre-denaturation은 95°C에서 10분, denaturation은 96°C에서 30초, annealing은 56°C에서 30초, extension은 70°C에서 30초로 28 cycle 실행한 후에 72°C에서 5분 동안 final extension을 하였다. PCR amplicon 시료를 이용하여 Bio-Rad (USA) decode 시스템을 이용하여 DGGE를 수행하였다. Gradient gel의 농도는 각각 35~70%로 농도 구배가 연속적으로 형성되게 gel을 제작하여 사용하였다. 제작된 gel에 PCR product을 20 μ L에 2X loading buffer 20 μ L 첨가하여 로딩하고 TAE 1X buffer(Tris-Acetate 2 M, EDTA 50 mM, pH 8.0)에서 60°C에서 50 V로 14시간 전기영동하였다. DGGE fingerprint로부터 대표적인 band 14개를 잘라내어 DNA를 추

출한 후, 341f, Br518 primer 를 사용해 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 pGEM-T Vector System (Promega, USA)을 이용해 cloning한 후 *E. coli* DH5α에 형질 전환하였다. 형질전환된 14개의 clone으로부터 plasmid를 추출하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool (Blast) algorithm을 사용하여 GenBank database와 비교하였다. 계통수 (Phylogenetic Tree)를 그리기 위하여 Bioedit 프로그램으로 염기서열들을 편집한 다음, Clustal X 프로그램으로 염기서열을 정렬하였다. 계통수는 MEGA 4 프로그램을 사용하여 구축하였다 [19].

3. 결과 및 고찰

3.1. 토양의 pH

토양시료는 여러 작물을 혼작하면서 식물의 잿물을 비료로 사용하는 시료 A, 그리고 잿물을 사용하지 않는 시료 B, C, 두종류를 포함하는 총 3가지 시료를 사용하였다. 3지역의 시료의 pH를 측정 한 결과, 시료 A는 8.25, 시료 B와 C는 각각

6.22와 5.94로 나타났다. 이는 식물의 잿물을 사용하여 토양의 알칼리화가 진행되고 있는 것으로 사료된다.

3.2. Community-level physiological profiling (CLPP) 분석

Ecoplate는 1991년 처음 이용하기 시작하여 현재는 배양된 세균을 대상으로 빠르고 간편하게 기능적 다양성을 조사하는 토양미생물 분석법이 되었다 [17,20]. 나이지리아에서 채취한 각 토양 미생물의 기질 이용성의 다양성에 미치는 효과를 보기 위해 CLPP 분석을 수행하였다. Ecoplate에서 배양 기간 중 6일을 기준으로 31가지의 기질이용도를 Table 1에 나타내었다. 그 결과, 토양의 알칼리화가 진행되고 있는 A지역의 토양은 Phenolic compound 계열의 기질이용도가 특히 낮았다. 일반적으로 Phenolic compound는 compound내에 존재하고 있는 카복실기와 수산화기에 의해 이온화가 잘 이루어지지 않아 산성을 띠는 경우가 많은데, A시료로 이루어진 토양은 알칼리화가 진행되면서 산성 토양에서 서식할 수 있는 미생물의 수가 감소하고 알칼리성 미생물이 주로 서식하고 있기 때문이라 사료된다. 또한, amino acid 계열의 L-Phenylalanine 기질을 가장 잘 이용하였다. B와 C토양은 전체적으로 모든

Table 1. substrate utilization after 5 days in soil samples (OD < 0.5: -, 0.5 < OD < 1.0: +, 1.0 < OD < 1.5: ++, 1.5 < OD < 2.0: +++, OD > 2.0: +++)

	Substrate	A	B	C
Polymer	Tween 40	++	++++	+++
	Tween 80	++	+++	++
	α-Cyclodextrin	+++	++	+++
	Glycogen	-	+++	++
Carbohydrate	D-Cellobiose	++	++	++++
	α-D-Lactose	-	+	++++
	β-Methyl-DGlucoside	+	+++	++++
	D-Xylose	++	+++	+++
	i-Erythritol	+++	++++	++++
	D-Mannitol	+++	++++	+++
	N-Acetyl-DGlucosamine	+	++++	+++
	Glucose-1-Phosphate	+++	++++	++++
	D,L-α-Glycerol Phosphate	++	+++	+++
	D-Galactonic Acid γ-Lactone	+++	++++	++++
Carboxylic acid	Pyruvic Acid Methyl Ester	+++	++++	+++
	D-Galacturonic Acid	++	+++	+++
	D-Glucosaminic Acid	-	++++	++++
	γ-Hydroxybutyric Acid	-	-	+
	Itaconic Acid	+++	++++	+++
	α-Ketobutyric Acid	+	++++	+++
	D-Malic Acid	-	+++	++++
Phenolic compound	2-Hydroxy Benzoic Acid	+	++	+++
	4-Hydroxy Benzoic Acid	-	+++	+++
Amino acid	L-Arginine	+++	+++	++++
	L-Asparagine	+++	+++	++++
	L-Phenylalanine	++++	++++	+++
	L-Serine	-	+	+
	L-Threonine	++	++++	++++
Amine	Glycyl-L-Glutamic Acid	+	+++	+++
	Phenylethyl-amine	+	+++	++++
	Putrescine	++	+	++

기질을 골고루 이용하였지만, carboxylic acid 계열의 γ -Hydroxybutyric Acid와 amino acid 계열의 L-Serine은 이용하지 못하거나 매우 적게 이용하였다. 이 두 기질은 본 연구에서 사용한 모든 토양이 같은 경향을 나타냈다. 각각의 토양 미생물 군집의 기질 이용도를 각 well의 평균 색 발달 정도 (average well color development; AWCD)로 비교 분석한 결과 (Fig. 1), A 토양은 0.95, B 토양은 1.59 그리고 C 토양은 1.57로 전체적인 기질 이용도는 B, C 토양이 유사한 결과를 보였고, A 토양이 낮았다. 이는 미생물의 기질이용도에 토양의 pH가 직,간접적인 영향을 미치기 때문이라 사료된다. 일반적으로 pH는 식물의 성장, 생물학적 이용가능성 (bioavailability), 물질이동 그리고 미생물신진대사와 관계가 있다 [21,22]. 특히, pH의 변화는 식물 성장에 중요한 요소로 작용하며, pH가 변화하면 이온결핍현상이 일어나 식물의 생체중이 감소

하게 된다 [22]. 이는 결과적으로 식물과 함께 공생하는 다양한 미생물의 수, 종류, 그리고 활성 등에 영향을 미치게 되기 때문에 중성토양이 아닌 다른 조건이 pH를 가진 토양의 경우는 미생물의 기질이용도가 감소할 수밖에 없다고 사료된다. 미생물의 종 다양성을 알아보기 위해 ecoplate에서의 배양 마지막 날 (6일)을 기준으로 각 시료의 Shannon index를 계산한 결과 A, B 및 C 토양은 각각 3.13, 3.38 및 3.39로 토양 A가 AWCD와 마찬가지로 가장 낮게 계산되어 가장 낮은 종 다양성을 보여주었다. Ecoplate에서 얻은 결과값을 가지고 주성분분석 (PCA; Principal component analysis)를 분석하였다 (Fig. 3). PCA는 일반적으로 서로 연관이 있는 변수들이 가지고 있는 정보들을 최대한 확보하여 적은 수의 새로운 변수를 생성해 연관성을 예측하는 통계적 기법이다. PC는 시료들 사이의 기질이용 값으로 각 시료들 사이의 첫 번째 principal component (PC 1)의 변이는 각각 4와 6일째 각각 66.7%, 57.5%였고, 두 번째 principal component(PC 2)의 변이는 27.5%, 32.1%로 나타났고 모든 변이는 PC 1이 PC 2보다 높게 나타났다. 또한, 배양 4일째에는 B와 C토양이 그룹화를 이루었지만, 배양 마지막 날인 6일째에는 모든 토양이 분산되었다.

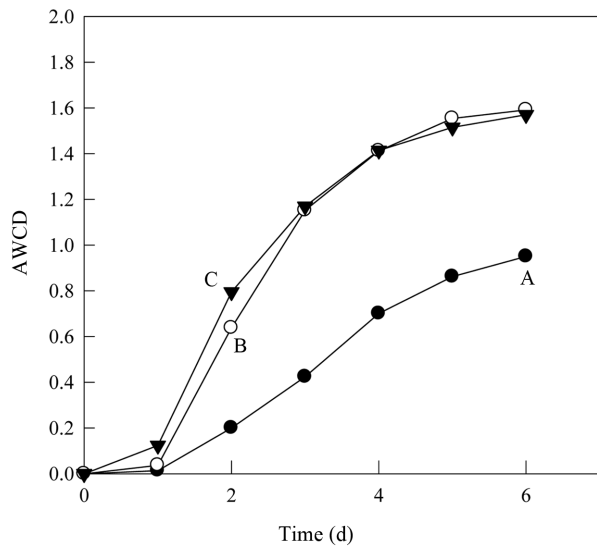


Fig. 1. Time course of average well color development in soil (n=3).

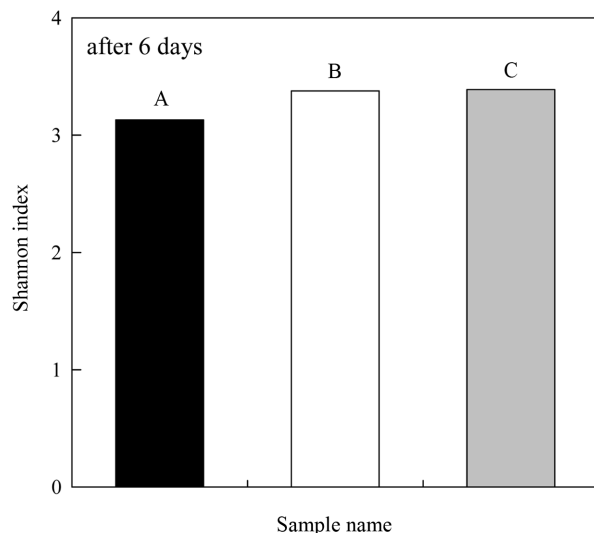


Fig. 2. The comparison of Shannon index (n=3).

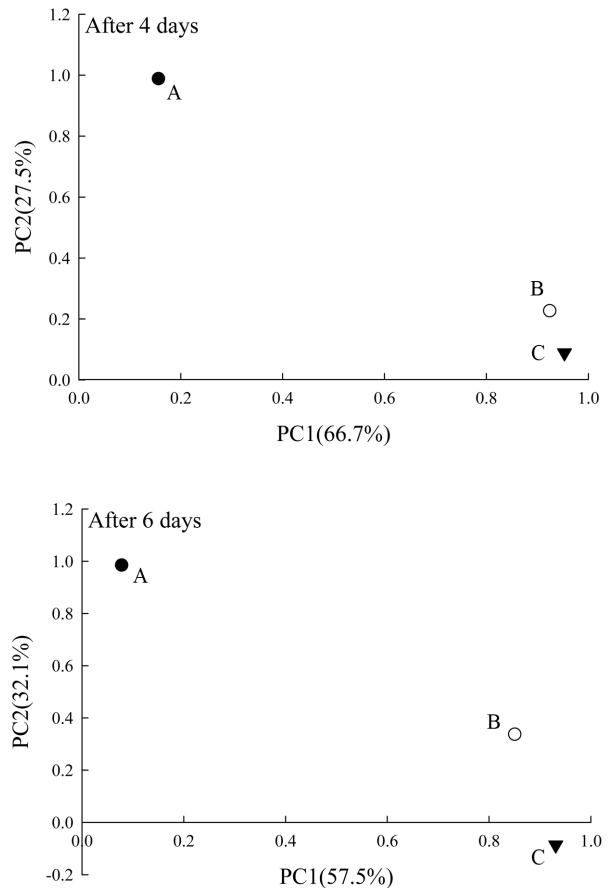


Fig. 3. Principal component analysis of average well color development. (a) 2 day, (b) 6 day, (c) 8 day.

3.3. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 기법을 이용한 미생물 군집 분석

각 토양시료의 genomic DNA를 추출하여 16S rDNA-PCR 산물의 DGGE를 수행하였고, DGGE fingerprints로부터 14개의

band를 선택하여 (Fig. 4) 동정한 결과, Clone들은 대부분은 토양에서 나오는 균으로서 아직 uncultured bacterium이 대부분이었다. DGGE fingerprint의 전체적인 경향은 3시료가 비슷하게 나타났지만 이미 알칼리화가 진행되기 시작한 A 토

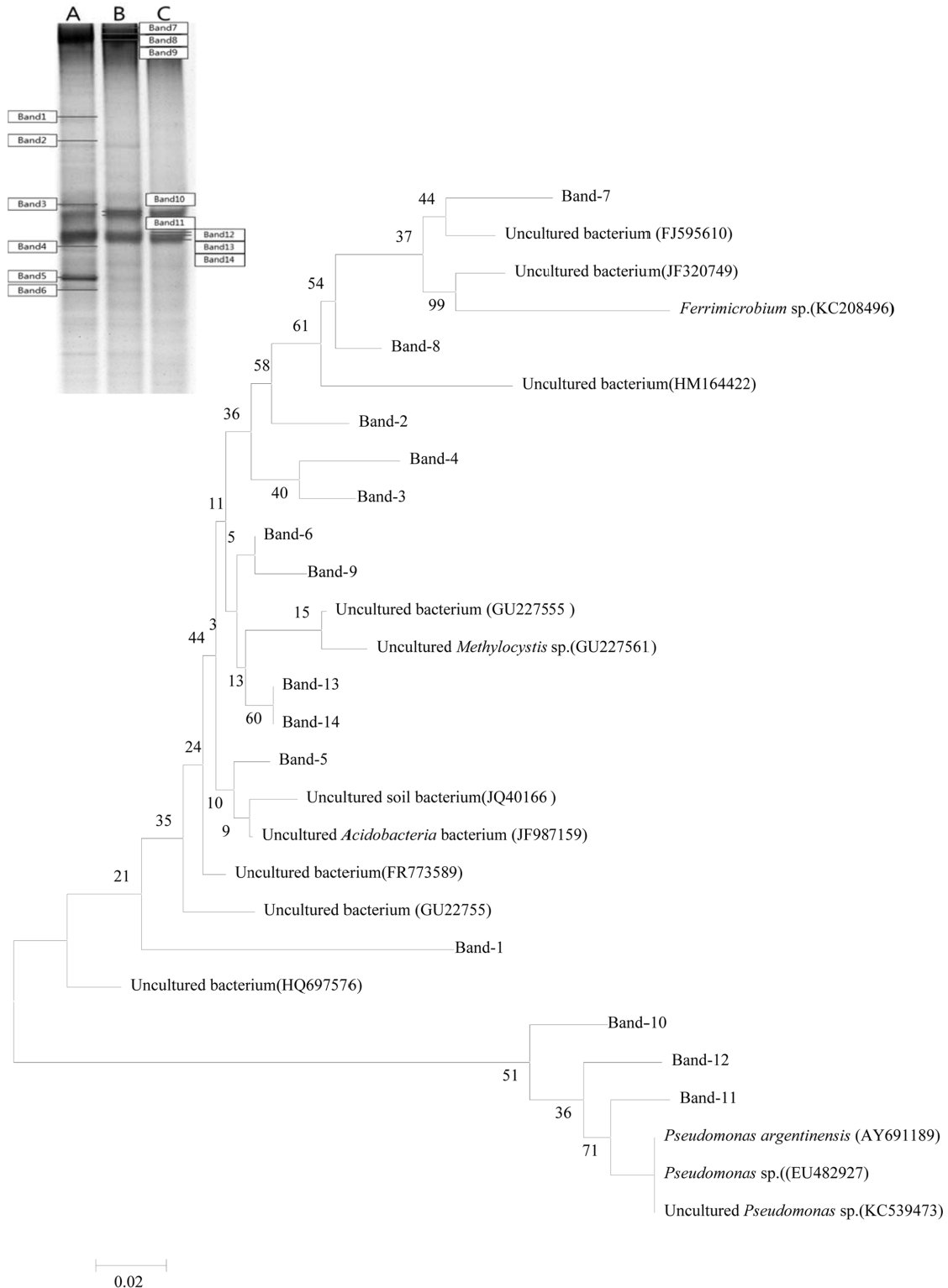


Fig. 4. Phylogenetic tree illustrating the relationships among the closest relatives in the GenBank database and the clones.

양에는 특이적인 band가 2개 나타났으며 이들을 동정한 결과, 농경토양에서 발견된 Uncultured *Acidobacteria* bacterium [23]과 대두의 근권에서 서식하는 Uncultured *Methylocystis* sp. [23]와 유사도가 가장 높게 나타났다. 모든 토양 시료에는 *Ferrimicrobium* sp., *Pseudomonas* sp., 그리고 *Pseudomonas argentinensis*가 공통적으로 포함되어 있었다.

4. 결론

오늘날의 농업분야에서는 화학비료나 화학농약의 과다사용으로 인하여 토양의 산성화가 초래되고 그 결과 작물의 품질이 저하되어 농가 소득 감소와 환경오염 등 심각한 문제가 발생되고 있다. 이러한 토양의 산성화 방지 방법 중 하나로 잿물을 토양에 살포 후 비료로 사용하는 전통적인 농업기법이 있는데, 이 농법을 사용하는 나이지리아의 농경지로부터 토양시료를 채취하여 토양미생물의 군집구조를 알아보았다. 비교를 위하여 인근 지역으로부터 잿물을 살포하지 않은 채 일반 관행농법으로 재배를 하는 농경지 두 지역으로부터 각기 다른 시료를 채취하였다. 잿물을 살포한 지역은 토양의 알칼리화가 진행되어 pH가 8.25로 측정되었으며, 다른 지역은 각각 pH 6.22와 5.94였다. 미생물 군집분석을 위해 biolog ecoplate를 수행한 결과 A 시료의 기질 이용도가 가장 낮게 나타났으며, 종다양성 지수도 낮았다. 주성분 분석결과 세 개의 토양 사이에 연관성은 낮았다. DGGE를 이용하여 미생물 군집을 분석한 결과 대부분 토양에서 발견되는 uncultured bacterium가 주종이었으나, 특이적으로 A 시료에서는 Uncultured *Acidobacteria* 및 그 지역에서 재배되는 대두의 근권에서 서식하는 Uncultured *Methylocystis* sp.가 발견되었다. 시료 A는 작물을 재배하고 있는 토양으로 주변 잡초를 태워 만든 잿물을 비료로 사용하고 있는 토양이고 시료 B와 C는 잿물을 사용하지 않는 토양이다. 잿물을 살포하는 방식은 토양의 산성화를 방지하는 농업방식이지만 오히려 미생물 상을 단순하게하고 미생물의 활성을 저해시킬 수 있다.

사사

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술개발사업 (Eco-technopia 21 project)” (Project No. E213-00013-3001-1)으로 지원 받은 과제입니다.

REFERENCES

1. Shoda, M. (2000) Bacterial control of plant diseases. *J. Biosci. Bioeng.* 89: 515-521.
2. Sholberg, P. L., A. Marchi, and J. Bechard (1995) Biocontrol of postharvest diseases of apple using *Bacillus* spp. isolated from

- stored apples. *Can. J. Microbiol.* 41: 247-252.
3. Subhash, C. V., K. L. Jagdish, and K. T. Anil (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91: 127-141.
4. Fisher, R. F. and D. Binkley (2000) *Ecology and management of forest soils.* pp. 489. John Wiley & Sons, New York.
5. Choi, D. S., H. O. Jin, D. J. Chung, K. Sasa, and T. Koike (2008) Growth and physiological activity in *Larix kaempferi* seedlings inoculated with ectomycorrhizae as affected by soil acidification. *Trees* 22: 729-735.
6. Izuta, T., T. Yamaoka, T. Nakaji, T. Yonekura, M. Yokoyama, H. Matsumur, S. Ishida, K. Yazaki, R. Funada, and T. Koike (2001) Growth, net photosynthetic rate, nutrientstatus and secondary xylem anatomical characteristics of *Fagus crenata* seedlings grown in brown forest soil acidified with H₂SO₄ solution. *Water Air Soil Pollut.* 130: 1007-1012.
7. Krause, G. H. M., U. Arndt, G. J. Brandt, J. Bucher, G. Kent, and E. Matzner (1986) Forest decline in Europe: Development and possible causes. *Water Air Soil Pollut.* 31: 647-668.
8. Giovannoni, S. J., T. B. Brischgi, C. L. Moyer, and K. S. Field (1990) Genetic Diversity in Sargasso Sea Bacterioplankton. *Nature (London)* 345: 60-63.
9. Ward, D. M., R. Weller, and M. M. Bateson (1990) 16S rRNA Sequences Reveal Numerous Uncultured Microorganisms in a Natural Community. *Nature* 345: 63-65.
10. Muyzer, G, E. C. De-Waal, and A. G. Uitterlinden (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
11. Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer (1995) Phylogenetic Identification and in Situ Detection of Individual microbial Cells Without Cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
12. Head, I. M., J. R. Saunders, and R. W. Pickup (1998) Microbial evolution diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbiol. Ecol.* 35: 1-21.
13. Knight, B.P., S. P. McGrath, and A. M. Chaudri (1997) Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper or zinc. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 39-43.
14. Bruns, M. A., J. R. Stephen, G. A. Kowalchuk, J. I. Prosser, and E. A. Paul (1999) Comparative Diversity of Ammonia Oxidizer 16S-rRNA Gene Sequences in Native, Tilled, and Successional Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2994-3000.
15. Duineveld, B. M., A. S. Rosado, J. D. Elsas, and J. A. Veen (1998) Analysis of the Dynamics of Bacterial Communities in the Rhizosphere of the Chrysanthemum via Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Substrate Utilization Pattern. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4950-4957.
16. Heuer, H. M., K. P. Baker, K. Smalla, and E. M. H. Wellington (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S-rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3232-3241.
17. Garland, J. L. and A. L. Mills (1991) Classification and character-

- ization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2351-2359.
18. Ian F. S. and J. F. Peter (2003). A Tribute to Claude Shannon (1916-2001) and a Plea for More Rigorous Use of Species Richness, Species Diversity and the Shannon-Wiener Index. *Global Ecol. Biogeog.* 12: 177-179.
 19. An, Y. J., Y. H. Joo, I. Y. Hong, H. W. Ryu, and K. S. Cho (2004) Microbial characterization of toluene-degrading denitrifying consortia obtained from terrestrial and marine ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 611-619.
 20. Preston-Mafham, J., L. Boddy, and P. F. Randerson (2002) Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - A critique. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42: 1-14.
 21. Betancur-Galvis, L. A., D. Alvarez-Bernal, A. C. Ramos-Valdivia, and L. Dendooven (2006) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline-alkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere* 62: 1749-1760.
 22. Bao, T., L. Sun, T. Sun, P. Zhang, and Z. Niu (2008) Iron-deficiency induces cadmium uptake and accumulation in *Solanum nigrum* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82: 338-342.
 23. National Center for Biotechnology Information. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>