

16S rDNA 염기서열에 의한 청정지역 및 공단지역 내 식물잎권의 내산성세균 군집의 다양성

정필문¹ · 신광수^{1,2} · 임종순^{2,3} · 이인수⁴ · 박성주^{1,2*}

¹대전대학교 생명과학부, ²대전대학교 동서생명과학연구원, ³대전대학교 한의학과, ⁴한남대학교 미생물학과

깨끗한 대기가 유지되는 청정지역 및 산성강하물의 영향을 받는 공단지역에서 자라는 떡갈나무(*Quercus dentate* Thunb.) 잎표면에서 분리한 내산성세균 배양액으로부터 16S rDNA를 추출하여 모두 444개의 clone을 얻었으며, 이를 대상으로 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)을 실시한 결과 총 17종류의 계통형(phylogroup)이 나타났다. 두 지역에서 나타난 대표적인 내산성 잎권세균 군집은 매우 단순하여 γ -Proteobacteria와 low-G+C gram-positive bacteria의 2개 group이었다. 식물 잎의 나이가 들수록 내산성 잎권세균 계통형의 다양성은 현저하게 증가하였다. 내산성 잎권세균 군집 구조는 γ -Proteobacteria에 속하는 *Pseudomonas* group과 Enterobacteriaceae, 그리고 low-G+C gram-positive bacteria 즉 *Bacillus/Clostridium* group에 속하는 Streptococcaceae와 *Staphylococcus* group이 우점하였다. 산성강하물에 따른 내산성 잎권세균 군집 구조의 변화는 상위 계통분류군(subphylum 수준)에서는 뚜렷이 볼 수 없었지만 보다 하위분류군에서 볼 때 γ -Proteobacteria의 Xanthomonadales group은 공단지역에서만, 그리고 α -Proteobacteria의 Acetobacteraceae는 청정지역에서만 각각 검출되었으므로 이들 세균집단을 산성강하물에 대한 지표세균으로서 사용할 수 있는 가능성을 남겨 놓았다.

Key words □ 16S rDNA, acid-tolerant epiphytic bacteria, phylogroup, restriction fragment length polymorphism (RFLP)

식물의 잎권(phyllosphere)은 시간적 및 공간적으로 독특하며 환경의 변화가 심한 동적인 미생물 서식지로서 기온, 바람, 습도, 강수, 먼지와 같은 화합물의 침적에 따른 영향이 크다. 잎권에서의 미생물 군집 구조를 살펴보면 때때로 토양미생물 군집이 검출되기는 하지만 토양이나 뿌리권(rhizosphere) 미생물과는 차이가 많다(3). 식물 잎권에서 수많은 종류의 미생물이 확인되고는 있지만 주요 연구대상으로서 잎권미생물 군집 구조가 아니라 대개 식물 병원체나 이러한 병원체에 대하여 길항작용을 나타내는 미생물, 그리고 빙핵세균 등의 분포와 성장 특성에 대하여 초점이 맞추어져 있는 실정이다(9). 따라서 대상이 되는 식물도 야채나 작물과 같은 농작물로 국한되어 있다. 하지만 산성비나 산성강하물이 내릴 가능성이 높은 공단지역에는 농작물이 아닌 나무가 주로 심어져 있으며 이 나무들은 산성의 대기오염물질에 의하여 잎권이 산성화됨으로써 결국 잎권미생물 군집 구조가 변화될 우려가 있다. 더욱이 잎권미생물들은 잎권 강하물에 의하여 유입되고 유출되므로(13) 잎권 위에 산성강하물이 침적되고 이로 인한 잎권의 산성화는 특히 내산성 잎권세균의 비율을 증가시킬 가능성이 크다.

따라서 대기오염이 상대적으로 심한 공단지역의 나무 잎권에서 서식하는 내산성세균의 다양성을 평가하여 공기가 깨끗한 청정지역의 나무 잎권 내산성세균의 다양성과 비교함으로써 산성

오염물질에 의한 영향을 판단할 수 있을 것으로 생각된다. 식물의 잎권은 식물체의 조직 가운데서도 가장 먼저 산성강하물의 영향을 받을 뿐 아니라 토양이나 수계 생태계보다도 먼저 산성강하물과 접촉하므로 공단지역의 내산성 잎권세균의 특징을 파악하게 되면 이를 산성강하물에 의하여 영향을 받고 있다는 지표로 삼을 수 있으므로 토양이나 식물, 수계의 산성화를 예보하고 방지할 수 있는 밑바탕이 될 수 있는 것으로 판단된다.

식물잎표면 미생물의 역할은 확실하게 밝혀져 있지는 않지만 식물병원체인 것은 많지 않으며 식물의 정상 서식균으로서 편리공생 및 상리공생하면서(4) 식물체와의 상호작용을 통하여 생지화학적 물질순환에 관계하고 있다. 주로 현재까지 식물잎권세균의 분포를 조사한 연구는 더러 있지만(8,14,16,17) 내산성세균의 종류나 분포에 대한 연구는 거의 없는 실정이며 다만 Ahn *et al.* (1)이 본 연구와 비슷한 목적으로 공단지역과 청정지역 밤나무 잎권의 내산성세균 수를 측정한 바 있으며, 이 논문에는 다양성이나 군집 구조 분석은 되어 있지 않다.

잎권의 내산성세균의 다양성을 밝히는 기법으로는 잎권세균의 다양성 연구기법과는 약간 달리 기본적으로 산성의 배지에서 잎권세균을 배양하는 배양기법으로부터 시작할 필요가 있다. 왜냐하면 내산성에 관여하는 유전자가 확실하게 알려져 있지 않기 때문에 분자적 방법의 적용이 곤란하기 때문이다. 이렇게 배양된 내산성 잎권세균의 다양성은 16S rRNA 유전자(rDNA)의 증폭과 cloning, 그리고 sequencing을 거치는 분자적 기법을 통하여 그 다양성을 연구하는 것이 효과적일 것이다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-280-2441, Fax: 042-280-2608
E-mail: psjj@dju.ac.kr

본 연구의 목적은 첫째, 나무 잎권에 서식하는 내산성세균 군집의 다양성을 분석하는 것이고 둘째, 산성강하물이 내산성세균 군집의 다양성에 미치는 영향을 평가하며 셋째, 산성강하물에 의하여 식물잎권이 영향을 받고 있는지를 알려주는 지표 내산성세균 집단을 밝히는 것이다.

재료 및 방법

시료 채취

1999년 4월(봄)과 8월(여름)에 대기오염이 없이 청정한 공기를 유지하고 있는 대전광역시 계족산 자연휴양림 내의 떡갈나무 잎과, 산성강하물의 영향을 받는 것으로 추정되는 대전공단지역 남쪽과 북쪽에서 자라는 떡갈나무 잎을 채취하였으며, 각 시료의 번호는 4월에 채취한 공단지역 잎은 P1-r, P2-r, 청정지역 잎은 C-r로, 그리고 8월에 채취한 공단지역 잎은 P1-g, P2-g, 청정지역 잎은 C-g로 표기하였다. 그런데 이 가운데 4월의 공단남쪽지역 잎(P1-r)에서는 PCR 산물을 얻는데 실패했기 때문에 자료에서 제외하였다. 잎을 채취한 떡갈나무의 키는 2 m 내외, 줄기의 지름은 5 cm 정도로서 수령이 2년 정도인 떡갈나무 잎 가운데 대기 중의 물질이 직접 침전되는 식물의 상부 캐노피(canopy)에서 잎을 채취하였다. 채취된 잎 시료는 멸균된 polyvinyl bag에 넣고 냉장 보관하여 실험실에 운반한 후 채취 2시간 이내에 실험을 실시하였다.

잎권세균의 분리

잎표면에서 세균을 분리하기 위해서 여과멸균된 인산완충용액(10 mM, pH 7.2)으로 3번 세척하여 쉽게 분리되는 가역적 흡착 세균을 제거한 다음 10-20개의 잎을 인산완충용액 100 ml에 담고 여기에 1차로 음파를 조사하여 잎표면세균을 분리하였다. 음파분리(sonication)는 1분 동안 3회, 30초 간격으로 실시하였다(7). 1차 음파분리용액을 따라내어 다른 용기에 보관하고 잎이 남아 있는 용기에 인산완충용액 100 ml을 추가로 더 넣어 같은 방법으로 2차 음파분리를 실시하였다. 1차와 2차 음파분리용액을 완전 혼합하여 후속실험에 이용하였다.

내산성세균의 배양

pH 4.0과 5.6에서 성장하는 내산성세균을 배양하기 위하여 잎권세균의 분리된 용액 시료를 1 ml을 균류의 성장을 억제하기 위한 항균제인 cycloheximide (Sigma) 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 이 첨가된(9) tryptic soy broth (TSB) 배지(1)가 든 시험관에 접종하여 25°C에서 3일간 배양하였다.

DNA 추출

내산성 세균이 배양된 용액 1 ml을 4°C에서 10,000×g로 10분 동안 원심분리하여 세포 침전물을 얻었다. 농축된 세포 침전물의 DNA 추출을 위해서 lysozyme, freeze-thawing, phenol-chloroform 처리과정을 거쳤다(12). DNA 정제 키트(DNA PrepMate; Bioneer Co., Chungbuk, Korea)를 써서 정제한 다음 멸균된 Tris-EDTA buffer 30 μl 로 용출시켜 PCR용 DNA

template로 사용하였다.

PCR, cloning 및 sequencing

세균의 16S rDNA를 증폭하기 위하여 세균의 공통 primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGYTA-CCTTGTACGACTT-3')의 2종류를 사용하였다(11). PCR 증폭을 위하여 thermal cycler (PTC-100™, MJ Research, Inc., USA)를 사용하였으며 운전조건은 최초 변성은 94°C에서 3분, 다음 35 cycle 동안은 변성에 94°C에서 1.5분, annealing에 50°C에서 1분, 복제에 72°C에서 2분, 그리고 마지막 복제는 72°C에서 30분이었다. Reaction mixture의 총량은 50 μl 로 하였고 여기에 들어갈 reaction buffer 조성은 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (25°C에서 pH 8.8), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 200 ng μl^{-1} bovine serum albumin, 200 μM dNTPs, 0.2 μM oligonucleotide primers, 2 U DynaZyme (Finnzymes Oy., Espoo, Finland)으로 하고 여기에 50 ng의 DNA template를 첨가하였다(6). PCR 산물은 1.2% agarose gel에 걸어서 약 1.5 kb에 해당하는 DNA band로서 확인하였다. 크기가 확인된 PCR 산물을 분리, 정제, 농축하여 cloning에 사용하였다. 정제 농축된 16S rDNA PCR 산물의 cloning은 pGEM-T vector system (Promega Co., Madison, Wis.)을 사용하였다. 형질전환된 *Escherichia coli* DH5 α competent cell은 blue/white screening을 하여 white clone만을 선별하여 농화배양한 뒤 -70°C에서 장기 보관하였다.

Sequencing을 위해서는 우선 white clone에 16S rDNA가 결합된 plasmid의 삽입이 확인되어야 하며 다음으로 삽입이 확인된 clone들에 대하여 restriction fragment length polymorphism (RFLP)을 실시하여 그 패턴이 다른 clone만을 대상으로 sequencing을 실시하게 된다. White clone에 plasmid가 삽입되었는지에 대한 확인 실험은 white clone을 대상으로 pGEM-T primers인 T7과 SP6을 사용하여 직접 PCR을 실시하고 그 산물을 1.5% agarose gel 전기영동하여 1.6 kb 크기의 16S rDNA band가 나타나는 것으로 하였다. 이때 사용된 reaction mixture와 PCR 조건은 DNA 증폭 때와 같다. 16S rDNA의 삽입이 확인된 clone만을 가지고 16S rDNA 유사성에 따라 clone을 분류하는 RFLP 실험을 실시하였다. RFLP 패턴의 확인은 증폭된 PCR 산물에 두 종류의 제한효소인 *Hae*III를 2 U씩 별도로 첨가하고 37°C에서 3시간 반응시킨 후 4% NuSieve 3:1 agarose (FMC Bioproducts) gel 전기영동을 거쳤다(6). 이렇게 하여 나타난 RFLP 패턴을 모두 비교하여 패턴이 같은 clone을 동일한 계통형(phylotype)으로 분류하였으며 계통형별로 2개 이상의 clone을 대상으로 sequencing을 실시하였다. 16S rDNA sequencing을 위한 plasmid 분리 및 정제는 Wizard Mini-Preps (Promega Co.)를 사용하였다. Automated DNA Sequencer (ABI PRISM™ 377, Perkin Elmer)를 사용하여 sequencing하였으며 이때 사용한 primer는 27F, 1492R, M13F, 또는 M13R이다.

계통분류(Phylogenetic analysis)

Sequencing을 통하여 얻은 clone들의 염기서열 가운데 V3

region이 포함된 500개 이상을 BLAST network service를 이용하여 EMBL/GenBank database의 염기서열(2), 그리고 SEQUENCE_MATCH (version 2.7)를 이용하여 Ribosomal Database Project II (RDP) database의 염기서열과 비교함으로써 clone들의 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 먼저 CLUSTAL W 프로그램을 사용하여 서열을 배열한 다음(22) RDP의 대표적인 세균의 염기서열을 참조하여 재배열하였다. Clone의 염기서열은 RDP의 CHIMERA_CHECK를 이용하여 키메라 여부를 확인하였다. 계통수 (phylogenetic tree)는 PHYLIP version 3.5 package (J. Felsenstein, 1993, Department of Genetics, University of Washington, Seattle)에서 neighbor-joining method (18)를 이용하는 프로그램인 NEIGHBOR를 사용하여 그렸다. 그리고 이 package의 SEQBOOT 프로그램을 사용하여 100번의 bootstrapped replicate resampling data set을 분석하여 bootstrap value를 계산하였다. 계통형 사이의 염기서열 유사도는 Jukes-Cantor distance 공식(10)의 역공식인 DNADIST 매트릭스를 이용하였다.

핵산 염기서열 번호(Nucleotide sequence accession numbers)

본 연구에서 분석된 17종류의 16S rDNA 계통형에 대한 부분 염기서열을 GenBank database에 제출한 결과 AF448262~

AF448278까지의 승인번호(accession number)를 부여받았다.

결 과

계통형(Phylotype), 유사도 및 다양성 지수

모두 5개의 clone library에서 나타난 16S rDNA가 삽입된 444개의 clone을 제한효소인 *Hae*III으로 잘라 나타난 RFLP 양상(pattern)을 분석한 결과 모두 17개의 독특한 진정세균 RFLP 양상으로 분류되었다(Fig. 1). 이것을 내산성 일련세균으로 간주하여 16S rDNA 계통형(phylogtype)으로 결정하였으며 각 clone library의 다양성 지수를 계산하였다(Table 1). 5개의 clone library에서 나온 17종류의 계통형 가운데 공단지역 및 청정지역 앞에서 모두 검출된 것은 8종류이며, 앞이 난 지 얼마 되지 않은 4월에는 다양성이 극히 낮았다가 일이 한창 자라는 때인 8월에는 다양성이 현저하게 증가하였다(Table 1). 8월의 공단지역 일련(P1-g 및 P2-g)에서 모두 12개의 계통형에(P1-g에서 8개, P2-g에서 10개) 284개의 clone이(P1-g에서 137개, P2-g에서 147개) 검출되어 같은 시기의 청정지역 일련(C-g)의 9종류 134개 clone에 비하여 계통형에서의 다양성이 약간 높았다. 그렇지만 계통형의 종류와 clone 수로서 계산하는 Shannon-Weaver 종 다양성지수는 공단 및 청정지역 일련이 거의 비슷한 수준이었지만 청정지역의

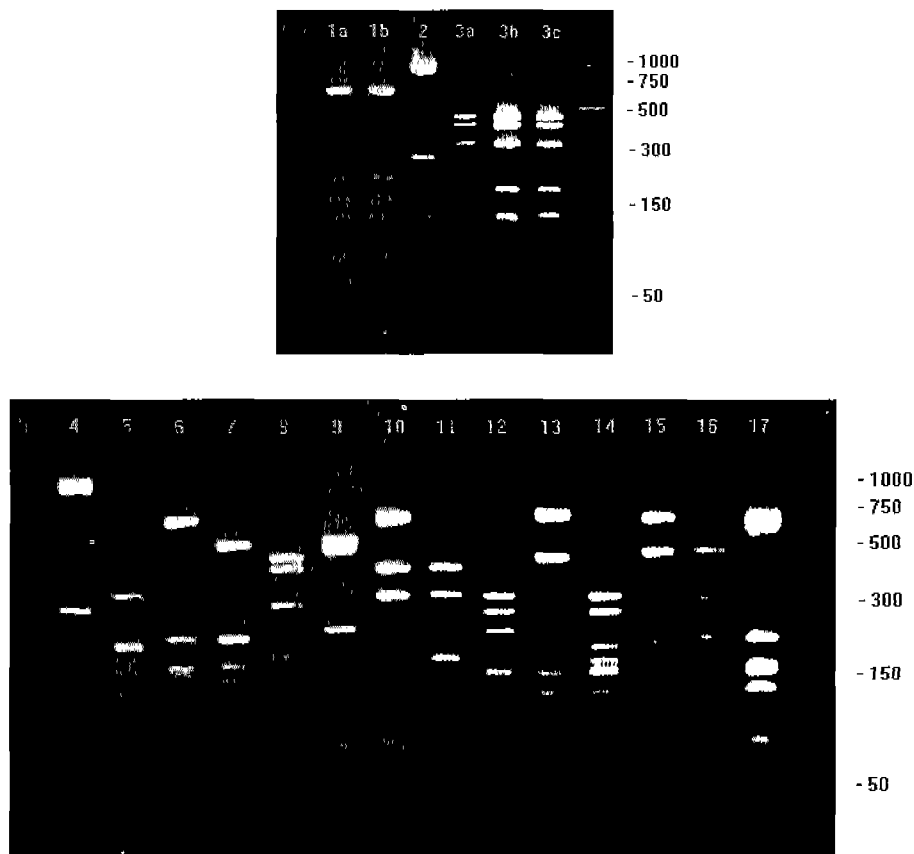


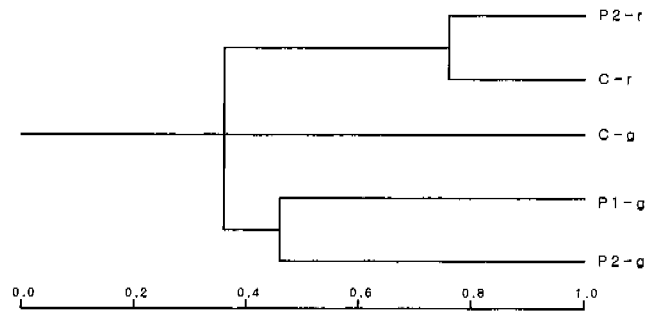
Fig. 1. Phylotypes or RFLP patterns by *Hae*III digestion of representative clones. Lane SM, size marks; 1a and 1b, DJAT-1; 2, DJAT-23; 3a, 3b, and 3c, DJAT-25; 4, DJAT-124; 5, DJAT-290; 6, DJAT-292; 7, DJAT-430; 8, DJAT-431; 9, DJAT-433; 10, DJAT-436; 11, DJAT-440; 12, DJAT-442; 13, DJAT-443; 14, DJAT-217; 15, DJAT-286; 16, DJAT-17; 17, DJAT-434.

Table 1. Numbers of phylotypes and diversity indices of 16S rDNA clone libraries from acid-tolerant epiphytic bacteria on deciduous oak tree leaf surfaces in Daejeon

Parameter	Clone libraries ^a					Total
	P2-r	C-r	P1-g	P2-g	C-g	
No. of phylotypes	2	2	8	10	9	17
Total no. of clones	12	14	137	147	134	444
Shannon-Weaver diversity index (H) ^b	0.566	1.061	1.421	1.202	1.498	

^aSymbols of clone libraries: P2-r, April in P2 pollution site; C-r, April in C clean site; P1-g, August in P1 pollution site; P2-g, August in P2 pollution site; C-g, August in C clean site.

^bCalculated as $H = -\sum(P_i \cdot \ln P_i)$, where P_i is the proportion of number of clones in the i th RFLP pattern.

**Fig. 2.** Dendrogram of 16S rDNA phylotype similarities among five clone libraries calculated on the basis of similarity coefficient with the clustering algorithm of UPGMA. Refer to Table 1 for symbols of clone libraries.**Table 2.** Relative abundance of acid-tolerant bacterial clones among unique phylogenetic groups from oak tree leaf surfaces in Daejeon

Phylogenetic group	Number and percentage of clones in clone libraries ^a				
	P2-r	C-r	P1-g	P2-g	C-g
α -Proteobacteria	0	0	0	0	1(0.7%)
γ -Proteobacteria					
<i>Pseudomonas</i>	2(16.7%)	6(42.9%)	83(60.6%)	68(46.3%)	60(44.8%)
Enterobacteriaceae group	0	0	41(29.9%)	4(2.7%)	18(13.4%)
Xanthomonadales group	0	0	1(0.7%)	0	0
Subtotal	2(16.7%)	6(42.9%)	125(91.2%)	72(49.0%)	78(58.2%)
Low-G+C gram-positive bacteria					
<i>Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus</i> group-Streptococcaceae	0	3(21.4%)	12(8.8%)	75(51.0%)	55(41.1%)
<i>Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus</i> group <i>Bacillus/Staphylococcus</i> group	10(83.3%)	5(35.7%)	0	0	0
Subtotal	10(83.3%)	8(57.1%)	12(8.8%)	75(51.0%)	55(41.1%)
Total	12(100.0%)	14(100.0%)	137(100.0%)	147(100.0%)	134(100.0%)

^aSymbols of clone libraries: refer to Table 1.

지수가 약간 높게 나타났다. 이런 결과로 미루어 16S rDNA 계통형에 의한 청정지역과 공단지역의 내산성 일권세균의 군집 다양성은 거의 비슷한 수준인 것으로 나타났다.

5개의 clone library에서 나타난 계통형의 수와 계통형별로 얻어진 clone 수를 이용하여 library 사이의 유사도를 dendrogram으로 평가하였다(Fig. 2). Library 사이의 유사도를 보면 잎이 나기 시작하는 초기인 4월에는 장소에 따른 차이가 별로 없어 P2-r과 C-r의 유사도지수가 0.765로서 가장 높았으며 점점 잎의 나이가 들어 한창 자라는 시기인 8월에는 장소에 따라서도 계통형의 종류가 현저히 달라져 P1-g 및 P2-g와 C-g와의 유사도 지수가 0.353으로 현저히 감소하였다. 이런 결과로 미루어 내산성 일권세균의 천이는 시간이 경과하면서 지역적인 차이 즉 산성강하물과 같은 대기오염물질에 의하여 영향을 받을 가능성을 시사해주는 것이다.

지역별 및 계절별 내산성 일권세균 군집 구조

Table 1에서 비교한 공단지역과 청정지역에서 분리한 5개의

clone library에서 추출한 17종류의 계통형에 대하여 16S rDNA의 부분적인 염기서열을 이용하여 계통분류를 실시한 결과를 표와 계통수로서 각각 Table 2와 Fig. 3에 나타내었다. 이들 자료에서 보는 바와 같이 내산성 일권세균의 군집구조는 매우 단순하여 두 지역 및 두 계절에 α - 및 γ -Proteobacteria와 low-G+C gram-positive bacteria의 3종류의 subphylum만 나타났으며, 이 가운데 1개의 계통형에서 단 1개의 clone만이 나타난 α -Proteobacteria를 제외하면 내산성 일권세균 군집은 γ -Proteobacteria와 low-G+C gram-positive bacteria의 단 2개 group으로 구성되었다.

계절별 군집 구조를 보면 시간이 경과할수록 두 지역 모두 내산성 일권세균의 계통형 종류 및 clone 수가 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 즉 4월과 8월에 각각 채취한 공단의 P2지역 일권시료를 비교해 보면 4월(P2-r)에는 γ -Proteobacteria에 속하는 *Pseudomonas*와 low-G+C gram-positive bacteria(혹은 *Bacillus/Clostridium* group)에 속하는 *Bacillus/Staphylococcus* group의 2개 군집에서 모두 12개의 clone만이 검출되었다. 반면, 8월(P2-g)에는 4월에 검출되었던 *Pseudomonas*외에 같은 γ -Proteobacteria

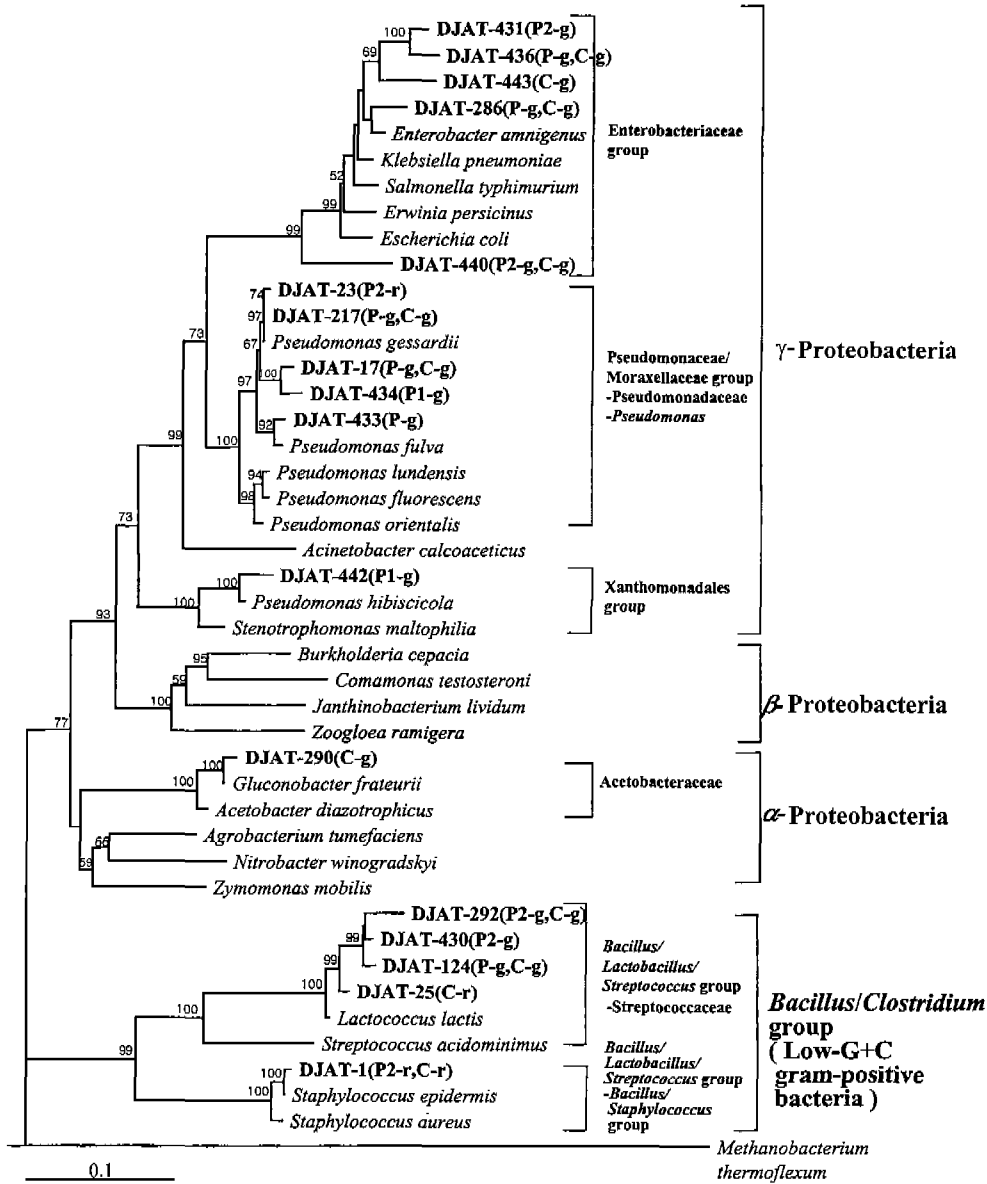


Fig. 3. Phylogenetic tree showing the relationships among RFLP phylotypes of acid-tolerant epiphytic bacteria on deciduous oak tree leaves to the major lineages within the domain *Bacteria* based on analysis of 513 bases of aligned 16S rDNA sequences. Sequences obtained from samples are designated in boldface by the prefix DJAT, followed by clone numbers. The clone libraries from which the individual 16S rDNA clone sequences came are given in parentheses (P- means both P1- and P2-). *Methanobacterium thermoflexum* in the domain *Archaea* served as the outgroup organism. The scale bar represents 0.1 substitutions per base position.

의 Enterobacteriaceae group이 추가로 나타났으며, 4월에 검출되었던 *Bacillus/Staphylococcus* group은 검출되지 않은 대신 같은 low-G+C gram-positive bacteria에 속하는 Streptococcaceae가 나타났다. 그리고 8월에 공동지역에서 채취된 다른 잎권(P1-g)에서는 P2-g에서 검출된 군집 외에 γ-Proteobacteria에 속하는 Xanthomonadales group이 추가로 검출되었다.

산성강하물의 영향을 파악하기 위한 지역별 내산성 잎권세균 군집 구조를 서로 비교한 결과 청정지역의 내산성 잎권세균 군집 구조는 4월과 8월 모두 공동지역과 거의 비슷하였다. 다만

공동지역에서는 검출되지 않았던 집단으로서 low-G+C gram-positive bacteria의 Streptococcaceae가 4월에(C-r), 그리고 α-Proteobacteria의 Acetobacteraceae가 8월에(C-g) 각각 확인되었으며, 4월에 검출되었던 *Bacillus/Staphylococcus* group은 검출되지 않았고 대신 같은 low-G+C gram-positive bacteria의 Streptococcaceae가 나타났다. 이런 결과로 미루어 초기 내산성 잎권세균에는 low-G+C gram-positive bacteria에서도 *Bacillus/Staphylococcus* group이 우점하는 반면 점차 시간이 경과하면서 Streptococcaceae로 천이되는 것으로 보인다.

고 찰

본 연구에서는 떡갈나무 잎표면에 서식하는 세균(epiphytic bacteria)을 완충용액에 분리시킨 다음 이를 내산성 액체배지(pH 4.0 및 5.6)에 접종하여 얻은 배양액을 대상으로 Bacteria domain의 16S rDNA를 증폭하고서 분석된 부분적 염기서열을 가지고 계통분류를 실시하였다. 따라서 검출된 clone들은 우선적으로 산성조건에서 내성을 가지면 배지에서 생장률이 빠른 세균 집단들이 확률적으로 많이 검출될 수 있을 것이다. 이것은 내산성을 나타내는 특정 유전자를 알지 못하는 현 상황에서 부득이한 실험이며 생장률이 빠른 집단 뿐만 아니라 생장률이 느린 세균 집단도 검출한계 이상의 밀도로 배지 내에 존재한다면 PCR에 의하여 충분히 검출될 수 있을 것으로 판단된다.

Clone library에서 얻어진 clone별 RFLP 양상 즉 계통형(phylotype)을 가지고 pairwise comparison에 의하여 library 사이의 유사도를 분석하는 것은 종 다양성지수보다 더욱 확실한 방법이다. 이 기법에 의한 5개의 clone library의 유사도 분석 결과 공간적인 변화보다는 시간적인 변화에 의하여 군집구조의 변화가 보다 심한 것으로 나타났다(Fig. 2). 즉 잎이 피기 시작하는 4월의 청정지역(C-r) 및 공단지역(P2-r) 잎권의 내산성세균 군집의 유사도 지수는 0.765로서 공단지역의 4월(P2-r)과 잎이 한창인 8월(P2-g)의 유사도 지수 및 청정지역의 4월(C-r)과 8월(C-g)의 유사도 지수인 0.353에 비하여 2배 이상이었다. 그러나 8월의 공단지역(P2-g)과 청정지역(C-g)의 유사도 지수 역시 0.353으로서 매우 낮았다. 이것은 잎이 나기 시작하는 계절인 봄 즉 4월에는 지역에 관계없이 비교적 비슷한 내산성 잎권세균이 콜로니를 형성하며 성장이 한창 진행되는 여름 즉 8월에는 대기오염과 같은 지역의 환경조건에 따라 내산성세균의 천이과정이 현저히 달라진 결과로 설명할 수 있다. 이렇게 기온에 따라 잎권세균의 천이가 일어나는 것은 물론(17) 대기오염과 같은 환경조건에 의해서도 일어날 수 있음을 본 연구 결과에서 알 수 있다.

내산성 잎권세균 군집의 다양성은 토양이나 수계를 비롯한 다른 환경에 비해서는 현저히 낮은 편이다. 이것은 잎권자체가 햇빛에 노출되어 있을 뿐 아니라 영양소나 수분 등과 같은 생장에 필요한 환경조건이 다른 생태계에 비하여 훨씬 열악하므로 충분히 예상되는 결과이다. 본 연구는 특히 산성강하물의 영향을 많이 받는 공단지역 내 식물 잎권의 내산성세균 군집 구조를 밝히는 것이 주된 목적의 하나이므로 깨끗한 공기 중에서 서식하는 식물 잎권의 내산성세균 군집과 비교함으로써 이런 목적을 달성하고자 하였다. 본 연구에서 조사된 내산성 잎권세균들은 시간이 지남에 따라서 산(acid)을 대사산물로서 만들어냄으로써 환경에서 잘 성장하는 *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*와 같은(5) low-G+C gram-positive bacteria가 대부분을 차지하고 있다는 사실이다(Table 2, Fig. 3). 이들 세균 집단들은 공단지역의 잎권에서 뿐만 아니라 청정지역의 잎권에서도 다수 검출됨으로써 산성강하물에 대한 영향은 알 수가 없다.

그러나 비록 검출된 계통형이나 clone의 수가 미미하기는 하지만 공단지역이나 청정지역의 잎권에서만 검출된 내산성 세균 집

단들이 있어(Table 2 및 Fig. 3) 이들이 산성강하물에 의한 영향을 판단할 수 있는 지표세균으로서의 사용 가능성을 배제할 수는 없다. 즉 공단지역의 잎권에서만 검출된 내산성 세균집단으로서 계통형 DJAT-442의 16S rDNA 염기서열은 γ -Proteobacteria subphylum에 속하는 Xanthomonadales group으로서 *Stenotrophomonas maltophilia* (혹은 *Xanthomonas maltophilia*, *Pseudomonas hibiscicola*)와의 유사도가 98%로서 가장 유연관계가 높았다(Fig. 3). 이 세균은 원래 식물의 병원성 세균으로 분리되었으나 비병원성 세균으로서 식물과 토양에서도 널리 분포하고 있으며 특히 열악한 환경조건 즉 고온, 고염도, 산성 조건에서도 내성을 나타낼 수 있는 다당류로 구성된 점액성 물질(poly-saccharide slime: 다당류로 구성된 xanthan gum이 대표적)을 대량 생산하는 종류가 많은 것으로 알려져 있다(19). 이러한 계통형의 검출은 분석에 사용한 잎이 질병에 걸린 잎일 수도 있고 비병원성의 잎권세균이 검출된 것일 수도 있지만 분석에 사용된 모든 잎이 탈색되거나 상한 흔적이 없는 건강한 잎인 것으로 미루어 비병원성의 내산성 잎권세균일 가능성이 매우 높다. 따라서 이 세균 집단이 점액성 다당류를 대량 분비하여 세포를 보호한다면 산성강하물의 영향을 받는 잎권에서도 충분히 생장할 수 있을 것으로 보인다. 이것은 Meth and Zehr (15)가 미국의 산성 호수에 대하여 16S rDNA 염기서열로 군집 다양성을 평가한 결과 세포외 매트릭스(extracellular matrix) 즉 세포 바깥에 glycocalyx를 형성하는 능력이 있는 β 및 γ -Proteobacteria에 속하는 세균 집단들이 산성호수에서 많이 검출된 것에서도 뒷받침된다. 이러한 다당류 점액질을 분비할 수 있는 계통형이 공단지역의 잎권에서만 검출되었기 때문에 공단지역 뿐만 아니라 청정 지역에서도 동시에 검출된 다른 종류의 내산성 잎권세균 군집들이 갖는 내산성 메커니즘과는 다를 가능성이 있기 때문에 이 세균집단이 산성강하물을 가리키는 지표세균이 될 수 있는 여지가 남아 있으며 따라서 이 세균 집단에 대한 연구가 보다 진행될 필요가 있는 것이다.

또한 청정지역에서만 검출된 내산성 세균 계통형 DJAT-290은 염기서열 분석 결과 α -Proteobacteria subphylum에 속하는 Acetobacteraceae group의 *Gluconobacter frateurii* 및 *Acetobacter diazotrophicus* (*Gluconobacter diazotrophicus*)와의 서열 유사도가 97%로 나타났다. 이 세균 집단들은 초산세균(acetic acid bacteria)으로서 대사산물로서 초산을 생성하기 때문에 역시 산성 조건에서 생장이 가능하다(20). 따라서 이들이 청정지역에서만 검출된 것은 low-G+C gram-positive bacteria나 공단지역에서만 검출된 Xanthomonadales group과는 대조적으로 산성강하물과 같은 산성 조건에는 매우 민감한 집단일 수도 있어 역시 산성강하물의 영향을 알려주는 지표세균으로서 연구할 가치가 있는 것으로 평가된다.

내산성 잎권세균은 아니지만 지금까지 식물의 잎권에서 분리된 적이 있는 세균 집단으로는 gram-negative bacteria로서 *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, Enterobacteriaceae 등이 있고, gram-positive bacteria로서 *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* 등으로서(8,16,17,21), 본 연구에서 분자적

기법으로는 검출된 내산성 세균 집단과 비교했을 때 Acetobacteraceae group이 본 연구에서 추가로 확인된 것을 알 수 있다.

한편 Meth and Zehr (15)가 미국 호수의 산성화에 따른 세균 군집 다양성을 16S rDNA 부분 염기서열을 이용하여 분석한 결과에 의하면 호숫물의 산성화를 나타내는 직접적인 수질지표인 pH 및 acid neutralizing capacity (ANC)와의 직접적인 상관성은 subphylum 수준 즉 넓은 범위의 분류군에 대해서는 찾을 수가 없었지만 보다 좁은 하부분류군에 대해서는 어느 정도의 상관성을 나타낸다고 하였다. 즉 산성호수에서만 특징적으로 많이 검출되는 세균 군집은 점액질의 세포외 다당류를 생산하는 능력이 있어 산성화에 따른 독성을 중화할 수 있는 β 및 γ Proteobacteria subphylum이며, 산성화된 호수에서 증가되는 독성에 민감하여 산성화된 호수에서는 거의 검출되지 않는 세균 군집은 *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids* (CFB) group과 high-G+C gram-positive bacteria group인 것을 알아내었다. 본 연구에서도 내산성 원편세균 군집 가운데 *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids* (CFB) group과 high-G+C gram-positive bacteria group에 속하는 것은 전혀 검출되지 않았으며, 내산성이 강한 것으로 알려진 β -Proteobacteria group도 검출되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부의 기초과학연구소 학술연구조성비 및 1998년도 한국학술진흥재단 기초과학연구소지원 학술연구비(사업코드번호 015)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Ahn, J.-H., S.-J. Bang, N.-J. Han, W.-Y. Song, S. Hwang, I.-S. Lee, and S.J. Park. 1997. Distribution of epiphytic bacteria and acid-tolerant bacteria in the phyllosphere in the industrial and clean areas. *Kor. J. Microbiol.* 33: 262-266.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schöffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Andrews, J.H. 1996. Phyllosphere ecology, p. 285-294. In C.E. Morris, P.C. Nicot, and C. Nguyen-The (eds.), *Aerial plant surface microbiology*. Plenum Press, New York and London.
- Beattie, G.A. and S.E. Lindow. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 145-172.
- Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed., 1994. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Cho, J.-C. and S.-J. Kim. 2000. Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 956-965.
- Herbert, R.A. 1990. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments, p. 1-39. In R. Grigovrova and J. R. Norris (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 22. Academic Press, London.
- Jacques, M.-A., and C.E. Morris. 1995. A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18: 1-14.
- Jacques, M.-A., L.L. Kinkel, and C.E. Morris. 1995. Population sizes, immigration, and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-grown endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 899-906.
- Jukes, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, N.Y.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- Lec, D.-H., Y.-G. Zo, and S.J. Kim. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3112-3120.
- Lindemann, J., H.A. Constantinidou, W.R. Barchett, and C.D. Upper. 1982. Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation-active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1059-1063.
- Magnuson, J.A., A.D. King, Jr., and T. Török. 1990. Microflora of partially processed lettuce. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3851-3854.
- Méthé, B.A. and J.P. Zehr, 1999. Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes: do species assemblages reflect lake water chemistry? p. 77-96. In J. P. Zehr and M. A. Voytek (eds.), *Molecular ecology of aquatic communities*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Morris, C.E., M.-A. Jacques, and P.C. Nicot. 1994. Microbial aggregates on leaf surfaces: characterization and implications for the ecology of epiphytic bacteria. *Mol. Ecol.* 6: 613.
- Périsol, C., M. Roux, and J.L. Petit. 1993. Succession of bacteria attached to evergreen oak leaf surfaces. *Eur. J. Soil. Biol.* 29: 167-176.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Starr, M.P., 1981. Chapter 62: The genus *Xanthomonas*, p. 742-763, In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel (eds.), *The prokaryotes*, Volume I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Swings, J. and J.D. Ley, 1981. Chapter 64: The genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*, p. 771-778. In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel (eds.), *The prokaryotes*, Volume I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Thompson, I.P., M.J. Bailey, and P.B. Rainey. 1994. Phenotypic and genotypic diversity of fluorescent pseudomonads isolated from the phyllosphere of field-grown sugar beet. *Mol. Ecol.* 6: 613-614.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

(Received November 21, 2001/ Accepted December 1, 2001)

ABSTRACT: Diversity of Acid-Tolerant Epiphytic Bacterial Communities on Plant Leaves in the Industrial Area and the Natural Forest Area Based on 16S rDNA**Pil-Mun Joung¹, Kwang-Soo Shin^{1,2}, Jong-Soon Lim^{2,3}, In Soo Lee⁴, and Seong Joo Park^{1,2a}**
(¹Division of Life Science, ²Institute of Traditional Medicine and Bioscience, and ³Department of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea; and ⁴Department of Microbiology, Hannam University, Daejeon 300-791, Korea)

The diversity of acid-tolerant epiphytic bacterial communities on deciduous oak tree (*Quercus dentata* Thunb.) leaves was examined both in the natural forest area with a clean air and in the industrial estate to assess effects of acidic depositions to the phyllosphere using 16S rDNA sequence data. A total of 444 acid-tolerant epiphytic bacterial clones were obtained, resulting in 17 phlotypes by performing a analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) for PCR-amplified 16S rDNA products. A very low diversity of dominating acid-tolerant bacterial communities in both areas was found, just 2 subphyla groups, γ -Proteobacteria and low-G+C gram-positive bacteria. As tree leaves grow older, diversities of acid-tolerant bacteria on them significantly increased. The community structure of acid-tolerant epiphytic bacteria consisted of *Pseudomonas* and Enterobacteriaceae groups in the γ -Proteobacteria subphylum, and *Streptococcaceae* and Staphylococcus groups in the low-G+C gram-positive bacteria subphylum. The direct influence of acidic depositions on bacterial phylogenetic composition could not be detected especially when higher taxonomic levels such as subphylum, but at narrower or finer levels it could be observed by a detection of Xanthomonadales group belonged to the γ -Proteobacteria only in the industrial area and of Acetobacteraceae group belonged to the α -Proteobacteria. There remains that these specific acid-tolerant epiphytic bacterial groups could be used as indicators for assessing effects of acidic depositions on the phyllosphere.