

[SIV-5]

Diversity of Epiphytic and Acid-tolerant Epiphytic Bacterial Communities on Plant Leaves

Pil-Mun Joung¹, Kwang-Soo Shin^{1,2}, Jong-Soon Lim^{2,3}, and Seong Joo Park^{1,2*}

¹Division of Life Science, ²Institute of Traditional Medicine and Bioscience, and

³Department of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

Abstracts

The diversity of epiphytic bacterial communities on deciduous oak tree (*Quercus dentate* Thunb.) leaves was examined both in the natural forest area with a clean air and in the industrial estate to assess effects of acidic deposition to the phyllosphere using 16S rDNA sequence data. In addition, acid-tolerant epiphytic bacterial communities were compared. A total of 78 epiphytic and 444 acid-tolerant clones were obtained from clone libraries, resulting in 20 and 17 phlotypes by analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) for PCR-amplified 16S rDNA products. A low bacterial diversity in both areas was found. As tree leaves grow older, bacterial diversities were slightly increased in the level of subphylum. The community structure of epiphytic bacteria in both areas in April consisted of only two subphyla, β - and γ -*Proteobacteria*. In August two additional subphyla in both areas were found, but the composition was a little different, Acidobacteria and *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids* (CFB) group in the industrial estate and α -*Proteobacteria* and CFB group in the natural area, respectively. Acidobacteria could be an indicator of epiphytic bacteria for acidic deposition on plant leaves, whereas α -*Proteobacteria* be one of epiphytic bacteria that naturally survive on leaves that are not affected by acidic deposition. The acid-tolerant bacterial communities in April were composed of two subphyla, γ -*Proteobacteria* and Low G+C gram-positive bacteria in both areas, and in August α -*Proteobacteria* was added to the community just in the natural forest area. The direct influence of acidic deposition on the acid-tolerant bacterial phylogenetic composition could not be detected in higher taxonomic levels such as subphylum, but at narrower or finer levels it could be observed by a detection of Xanthomonadales group of γ -*Proteobacteria* just in the industrial estate.

서 론

현재까지 16S rDNA 염기서열을 확인하여 세균군집 구조를 밝히는 이른바 계통분류 (phylogenesis)에 의한 군집 구조 분석은 연구된 적이 없다. 16S rDNA cloning 과 sequencing 을 통한 계통분류기법은 시간과 노력이 많이 들어 빠른 시간 안에 군집구조를 파악하기가 어렵다는 단점은 있지만 지금까지 알려지지 않고 있는 세균군집의 종류를 확인하는데 있어서 아주 유용한 방법이다(2). 특히 생긴 지 얼마 되지 않은 어린 잎권의 세균군집은 식물의 성장과 더불어 형성

될 정상서식군(normal microflora)의 1 차 콜로니형성자로서 병원성 미생물의 침입을 방지하는 식물의 보호메커니즘으로서 중요한 것으로 생각되고 있다(4). 이런 배경에서 본 연구의 첫째 목표는 나무 잎권을 대상으로 잎권세균 및 내산성 잎권세균 군집의 16S rDNA 염기서열을 결정하고 이를 토대로 한 계통분류기법으로 군집의 다양성을 밝히는 것이다.

한편 잎권세균 군집에 영향을 미치는 환경요인으로는 많은 것이 알려져 있는데 대기오염으로 인한 산성비와 같은 산성강하물에 의한 영향은 거의 알려진 바가 없다. 이런 분야에 대한 기존 연구로는 인공 산성비가 자작나무 잎 내부 균류집단에 미치는 영향 평가와(3) 공단지역 및 청정지역 식물 잎권 세균의 수를 세어 산성 대기오염물질의 영향을 간접적으로 확인한 것이 있다(1). 하지만 산성비와 같은 산성강하물이 잎권세균이나 내산성 잎권세균 군집 구조에 미치는 영향을 평가한 논문은 현재까지는 없는 실정이다. 본 연구의 두 번째 목표는 산성강하물이 많은 공단지역에서 자라고 있는 잎권세균 군집 구조를 16S rDNA 염기서열을 이용하여 밝히고 이를 청정지역 잎권세균과 비교함으로써 산성강하물이 세균군집 구조의 다양성에 미치는 영향을 평가하는 것이다. 그리고 마지막 목표는 산성강하물에 의한 영향을 알려주는 지표가 되는 잎권세균 및 내산성 잎권세균 집단을 찾는 것이다.

결 과

계통형(Phylotype), 유사도 및 다양성 지수

A. 잎권세균

4 개의 clone library 에서 얻은 16S rDNA 가 삽입된 213 개의 clone 을 *Hae*III으로 잘라 나타난 RFLP 양상을 분석한 결과 모두 30 개의 독특한 진정세균 양상으로 분류되었다. 이 가운데는 *Bacteria* 의 염색체 16S rDNA 외에도 잎의 엽록체나 미토콘드리아도 잎권에서 나타날 수 있으므로 양상별로 대표 clone 을 한 개씩 선정하여 sequencing 을 실시하였다. 그 결과 20 개만이 *Bacteria* 염색체 DNA 이었으며 이것만을 잎표면세균으로 간주하여 16S rDNA 계통형(phylogroup)으로 결정하였으며, 여기에는 모두 78 개의 clone(symbols: DJEB-)이 검출되었다. 4 개의 clone library 에서 나온 20 개의 계통형 가운데 공단지역 및 청정지역에서 공통적으로 나온 것은 1 개에 불과하여 두 잎권의 세균군집 계통형이 뚜렷이 구별되었다(Fig.1).

B. 내산성 잎권세균

모두 5 개의 clone library 에서 나타난 16S rDNA 가 삽입된 444 개의 clone(symbols: DJAT-)을 제한효소인 *Hae*III으로 잘라 나타난 RFLP 양상을 분석한 결과 모두 17 개의 독특한 진정세균 RFLP 양상으로 분류되었다. 이것을 내산성 잎권세균으로 간주하여 16S rDNA 계통형으로 결정하였으며 각 clone library 의 다양성 지수를 계산하였다. 5 개의 clone library 에서 나온 17 종류의 계통형 가운데 공단지역 및 청정지역 잎에서 모두 검출된 것은 8 종류이며, 잎이 난 지 얼마 되지 않은 4 월에는 다양성이 낮았다가 잎이 한창 자라는 때인 8 월에는 다양성이 증가하였으며, 특히 공단지역 잎권의 다양성 증가는 현저하였다. 8 월의 공단지역 잎권(P1-g, P2-g)에서 모두 12 개의 계통형에 284 개 clone 이 검출되어 같은 시기의 청정지역 잎권(C-g)의 9 종류 134 개 clone 에 비하여 계통형 다양성이 약간 높았다. 그렇지만 계통형의 종류와 clone 수로서 계산하는 Shannon-Weaver 종 다양성지수(H)는 공단지역 및 청정지역이 거의 비슷한 수준이었지만 청정지역의 지수가 약간 높게 나타

났다. 이런 결과로 미루어 16S rDNA 계통형에 의한 8 월 청정 및 공단지역의 내산성 옫권세균의 군집 다양성은 거의 비슷한 수준인 것으로 나타났다.

지역별 및 계절별 내산성 옫권세균 군집 구조 및 계통분류

A. 옫권세균

공단과 청정지역 4 개의 옫권세균 clone library 에서 얻은 20 개의 계통형만을 대상으로 계통분류를 실시한 결과를 계통수로서 나타내었다 (Fig. 1). 옫이 피기 시작하는 4 월의 공단 및 청정 옫권 clone library(P1-r, C-r) 모두가 subphylum 수준에서 분류한 결과 세균군집 구조가 매우 단순하게 β -와 γ -*Proteobacteria* 의 두 무리만이 나타났다. 특히 γ -*Proteobacteria* 는 공단과 청정 옫권에서 각각 85.7%과 90.9%를 나타내어 대부분을 차지하였다.

4 월과 8 월의 옫권세균 군집의 계통형 다양성을 clone library(P1-g, C-g)별로 Shannon-Weaver 다양성 지수(H)로서 평가한 결과 공단옫권은 별다른 변화가 없었던 반면 청정옫권의 다양성은 2 배 이상 현저하게 증가되었다. 이러한 계절별 다양성의 변화를 clone 의 염기서열을 가지고 subphylum 수준에서 평가한 결과 공단옫권(P1-g)에서는 4 월에 비하여 Acidobacteria 와 *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids*(CFB) group 의 두 개의 subphyla, 청정옫권(C-g)에서도 α -*Proteobacteria* 와 CFB group 의 두 개의 subphyla 가 각각 추가로 확인되었다. 그리고 4 월의 공단 옫권에서 대부분을 차지하였던 γ -*Proteobacteria* 의 비율이 8 월에는 4 월의 절반 수준으로 감소하였으며, 청정옫권 역시 그 비율이 감소되었다.

Fig. 1 의 계통수 dendrogram 은 20 개 계통형에 속하는 대표적인 clone 의 partial sequencing 결과(500~600bp)를 가지고 그린 것이다. 이 그림이 보여 주듯이 공단 및 청정 옫권 library 에서 공통적으로 검출된 clone 은 단 1 개(DJEB-1)에 불과할 정도로 두 library 의 옫권세균 군집에서 차이를 보였다. 하지만 이것은 종(species) 수준에서의 차이일 뿐이며 속(genus) 수준에서 볼 때 두 library 모두에서 공통적으로 검출되었다. 4 월의 옫권에서 확인된 세균집단으로는 공단옫권에서 subphylum γ -*Proteobacteria* 에 속하는 *Pseudomonas* group 과 Enterobacteriaceae, 그리고 subphylum β -*Proteobacteria* 에 속하는 *Oxalobacter* group, *Rhodocyclus* group, Comamonadaceae 등이었다. 이 가운데 *Oxalobacter* 및 *Rhodocyclus* groups 은 공단옫권에서만, Enterobacteriaceae 와 Comamonadaceae 는 청정옫권에서만 각각 검출되었다.

B. 내산성 옫권세균

5 개의 clone library 에서 추출한 17 종류의 계통형에 대하여 16S rDNA 의 부분적인 염기서열을 이용하여 계통분류를 실시한 결과를 Fig.2 에 나타내었다. 내산성 옫권세균 군집구조는 옫권세균보다 훨씬 단순하여 두 지역 및 두 계절에 α - 및 γ -*Proteobacteria* 와 Low G+C gram-positive bacteria 의 3 종류의 subphyla 만 나타났으며, 이 가운데 1 개의 계통형에서 단 1 개의 clone 만이 나타난 α -*Proteobacteria* 를 제외하면 내산성 옫권세균 군집은 γ -*Proteobacteria* 와 Low G+C gram-positive bacteria 의 단 2 개 group 으로 구성되어 있었다.

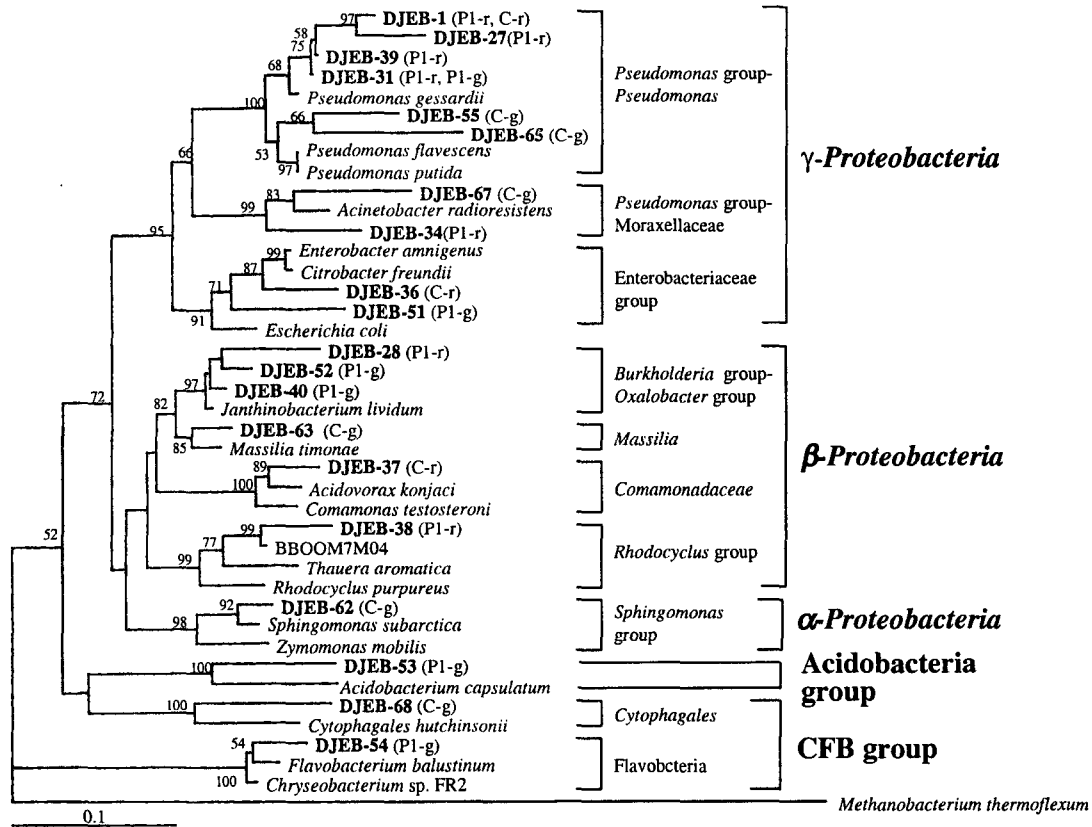


Fig. 1. Phylogenetic tree showing the relationships among RFLP phylotypes of epiphytic bacteria on oak tree leaves to the major lineages within the domain *Bacteria* based on analysis of about 500 bases of aligned 16S rDNA sequences. Sequences obtained from samples are designated in boldface by the prefix DJEB-, followed by clone numbers. The clone libraries from which the individual 16S rDNA clone sequences came are given in parentheses. *Methanobacterium thermoflexum* in the domain *Archaea* served as the outgroup organism. The scale bar represents 0.1 substitutions per base position

계절별 군집 구조를 보면 앞권세균에서와 마찬가지로 시간이 경과할수록 두 지역 모두 계통형 종류 및 clone 수가 현저하게 증가되었다. 즉 4 월과 8 월에 각각 채취한 공단의 P2 지역 앞권 시료를 비교해 보면 4 월(P2-r)에는 γ -Proteobacteria 에 속하는 *Pseudomonas* 와 Low G+C gram-positive bacteria(혹은 *Bacillus/Clostridium* group)에 속하는 *Bacillus/Staphylococcus* group 의 2 개 군집에서 모두 12 개의 clone 만이 검출되었다. 반면, 8 월(P2-g)에는 4 월에 검출되었던 *Pseudomonas* 외에 같은 γ -Proteobacteria 의 Enterobacteriaceae group 이 추가로 나타났으며, 4 월에 검출되었던 *Bacillus/Staphylococcus* group 은 검출되지 않은 대신 같은 Low G+C gram-positive bacteria 에 속하는 Streptococcaceae 가 나타났다. 그리고 8 월에 공단지역에서 채취된 다른 앞권(P1-g)에서는 P2-g 에서 검출된 군집 외에 γ -Proteobacteria 에 속하는 Xanthomonadales group 이 추가로 검출되었다.

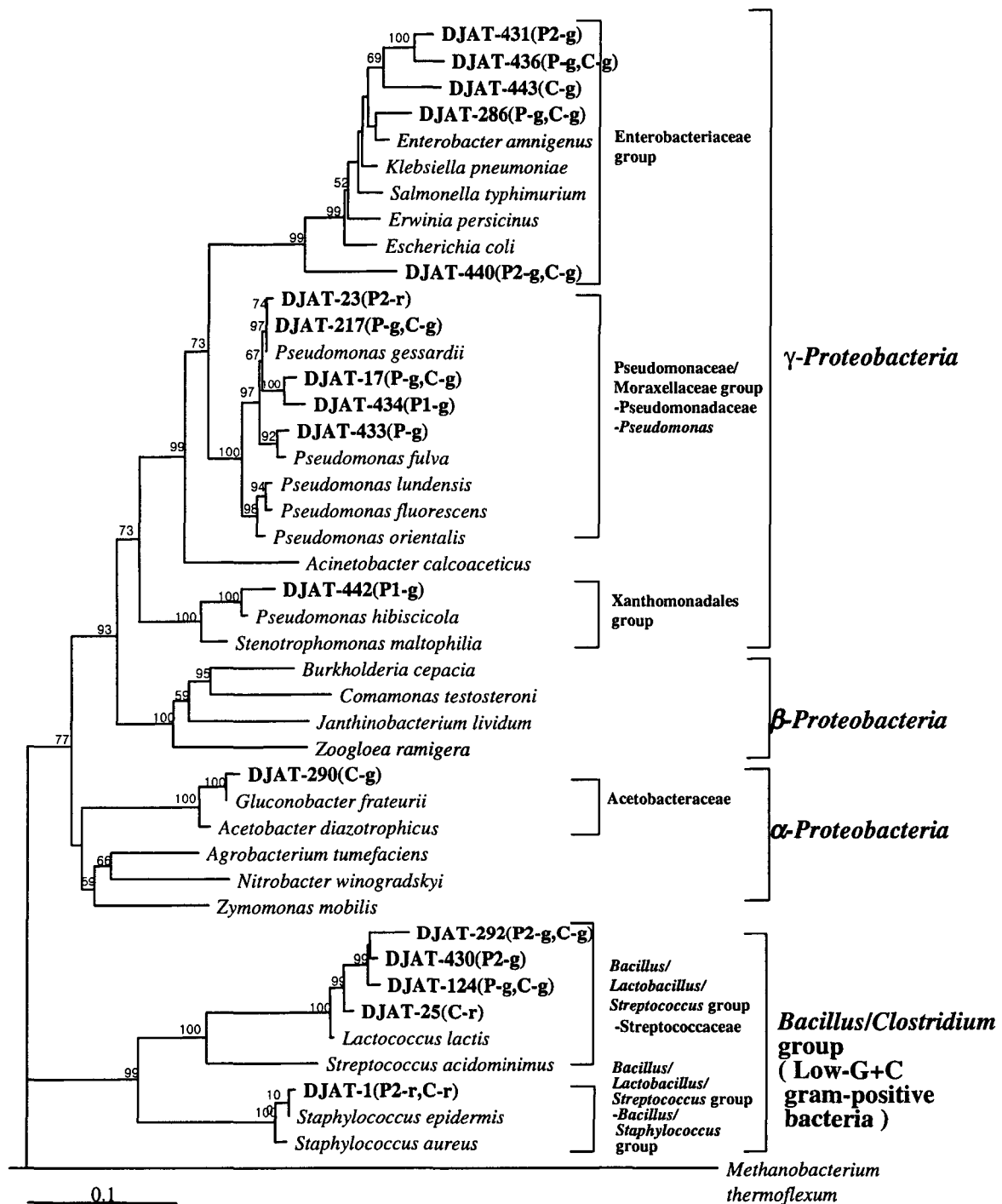


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the relationships among RFLP phylotypes of acid-tolerant epiphytic bacteria on deciduous oak tree leaves to the major lineages within the domain *Bacteria* based on analysis of 513 bases of aligned 16S rDNA sequences. Sequences obtained from samples are designated in 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.

산성강하물의 영향을 파악하기 위한 지역별 내산성 잎권세균 군집 구조를 서로 비교한 결과 청정지역의 내산성 잎권세균 군집 구조는 4월과 8월 모두 공단지역과 거의 비슷하였다. 다만 공단지역에서는 검출되지 않았던 집단으로서 Low G+C gram-positive bacteria 의 Streptococcaceae 가 4월에(C-r), 그리고 α -Proteobacteria 의 Acetobacteraceae 가 8월에(C-g) 각각 확인되었으며, 4월에 검출되었던 *Bacillus/Staphylococcus* group 은 검출되지 않았고 대신 같은 Low G+C gram-positive bacteria 의 Streptococcaceae 가 나타났다. 이런 결과로 미루어 초기 내산성 잎권세균에는 Low G+C gram-positive bacteria 에서도 *Bacillus/Staphylococcus* group 이 우점하는 반면 점차 시간이 경과하면서 Streptococcaceae 로 천이되는 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부의 기초과학연구소 학술연구조성비 및 1998년도 한국학술진흥재단 기초과학연구소지원 학술연구비(사업코드번호 015), 그리고 1999년도 대전대학교 교내학술비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. 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 on the phyllosphere in the industrial and clean areas. *Kor. J. Microbiol.* 33:262-266.
2. 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.
3. Helander, M. L., S. Neuvonen, T. Sieber, and O. Petrini. 1993. Simulated acid rain effects birch leaf endophyte populations. *Microbiol. Ecol.* 26:227-234.
4. P rissol, C., M. Roux, and J. L. Petit. 1993. Succession of bacteria attached to evergreen oak leaf surfaces. *Eur. J. Soil. Biol.* 29:167-176.