

잎권세균에 대한 개선된 형광현미경 관찰법

정필문 · 신광수 · 이인수¹ · 박성주*

대전대학교 미생물학과, ¹한남대학교 미생물학과

식물잎권의 잎표면세균에 대한 직접관찰과 이들을 분리시킨 용액 내 세균에 대한 간접관찰을 위하여 형광염료인 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)와 acridine orange(AO)로 염색한 후 형광현미경을 사용하였다. AO로 염색한 잎표면은 배경형광이 진한 주홍색이나 적색을 띠어 잎표면세균의 관찰 및 계수가 극히 힘들었으나 DAPI로 염색된 잎권세균은 뚜렷한 형광 영상을 나타내었다. 반면 잎표면세균 분리용액의 여과지에 대한 형광염색 결과는 DAPI와 AO 모두가 관찰이 가능하였다. 다만 DAPI가 AO에 비하여 형광 영상이 좀 더 뚜렷하였고 AO 염색과정에서는 염색된 여과지에 대한 세척과정이 필수적이었다. 최적의 DAPI 염색법은 잎과 여과지 모두가 5 µg/ml의 농도에서 5분 동안 염색하는 것이었다. 잎권의 형광현미경 관찰에 있어서 핵심적인 요소는 잎에서 나오는 수분을 최소화하는 것으로서 염색된 잎 시료를 거름종이 위에 올려놓고 공기 중에서 말리는 대신 70°C를 유지한 건조기에서 2분 동안 말린 다음 바로 현미경으로 관찰하는 것이 가장 좋은 방법인 것으로 확인되었다. 이렇게 확립된 형광현미경 관찰법을 떡갈나무의 잎권세균을 성공적으로 관찰하고 계수할 수 있었다.

Key words □ acridine orange, DAPI(4'-6-diamidino-2-phenylindole), epifluorescence microscopy, phyllosphere bacteria

잎을 포함하는 식물의 지상구조에 서식하는 미생물로는 세균, 효모, 사상균류가 주류를 이룬다. 이 가운데 세균이 최초의 잎권 콜로니 형성자이며 이어서 효모와 사상균류가 콜로니를 형성하는 것으로 알려져 있다(11). 지금까지의 잎권미생물에 대한 연구는 식물의 병원체인 병원성 균류에 대한 것이 주류를 이루고 있으며, 많지 않은 세균에 대한 연구도 채소나 작물(8), 낙엽(13) 등을 대상으로 하고 있다. 잎권세균을 분리한 다음 분리용액에 든 세균을 배양한 다음 형성되는 콜로니를 세거나(2) MPN법으로 계수하는 배양계수법(9) 부적절한 분리 및 배양법, 그리고 배양불가능세균(viable-but-nonculturable cell)의 존재로 인하여 과소평가되는 것이 보통이다. 따라서 잎권세균을 보다 정확히 계수하고 관찰하기 위해서는 배양계수법이 아닌 현미경을 통한 직접 계수법이 바람직한 것으로 알려지고 있다(6).

기존 연구에서 사용한 잎권세균의 직접계수법으로서 주로 형광염료인 acridine orange [3,6-bis(dimethylamino)acridium chloride](AO)가 사용되었다(1,8,10). 하지만 AO는 배경물질은 물론 세균 세포까지도 붉은 색으로 나타나는 경우가 많기 때문에 세포를 쉽게 구별할 수 없을 뿐만 아니라 형광이 쉽게 사라진다는 단점을 가지고 있다(5). 이러한 단점을 극복하기 위하여 수계세균에 대해서 AO 대신 형광이 보다 안정적이며 세포벽과 세포막을 효과적으로 통과하는 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 형광염료로 사용하는 방법이 제시되었다(14,15). 이 DAPI는 현재까지 잎권세균을 관찰하는데는 사용된 적이 없으며 다만 Fisher

등 (3)이 수중 녹조류에 부착성장하는 표면세균의 관찰에 DAPI를 사용한 적이 있을 뿐이다.

본 연구는 식물의 잎권에 콜로니를 형성하고 있는 생물막 및 잎표면세균과 분리용 용액에 부유하고 있는 잎표면세균을 직접 관찰하는데 있어 효과적인 형광염료 선정 그 염색법을 확립하고 이렇게 확립된 형광현미경 관찰법을 사용하여 잎표면세균을 계수하는 것이다.

재료 및 방법

시료 채취 및 준비

1999년 4월에 채취한 장미(*Rosa hybrida*) 잎과 떡갈나무(*Quercus dentata*) 잎을 대상으로 실험하였다. 잎표면세균의 직접 관찰을 위해서 멸균한 가위로 두 종류의 잎을 1.0×0.5 cm 크기로 자른 다음 여과멸균된 인산완충용액(10 mM, pH 7.2)에 담구어 잎을 3번 세척하였다. 이 잎 시료를 각각 2.5 및 5.0 µg/ml DAPI 용액에 담구어 5분 동안, 그리고 0.05% AO 용액에 담구어 3분 동안 염색한 다음 인산완충용액에 담구어 세척하고 공기 중에서 말린 다음 각각 2개씩의 잎 시료를 slide glass에 올려놓고 cover slip으로 덮은 다음 cover slip 주위를 접착 테이프를 붙여 slide glass와 고정시켰다.

잎표면세균의 분리를 위해서 인산완충용액으로 3회 세척한 떡갈나무 잎 10개(한 면의 평균 표면적은 75 cm²)를 멸균한 가위로 1×1 cm 크기로 자른 후 멸균된 인산완충용액 50 ml에 담구어 음파를 조사하였다. 음파분리는 1분 동안 3회, 30초 간격으로 실시하였다(5). 음파분리용액을 따라내어 다른 용기에 보관하고

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-280-2441, Fax: 042-280-2608,
Email: psjj@dragon.taejon.ac.kr

남은 잎 조각이 들어 있는 용기에 인산완충용액 50 ml를 추가로 더 넣어 같은 방법으로 음과분리를 재 실시하였다. 얻어진 2개의 음과분리용액을 완전 혼합한 후 10 ml의 시료를 Sudan Black B로 염색된 polycarbonate 여과지(지름 25 mm, 구멍 크기 0.22 μm)로 여과한 다음 각각의 여과지를 2.5 및 5.0 $\mu\text{g/ml}$ DAPI 용액에 담구어 5분 동안, 그리고 0.05% AO 용액에는 3분 동안 담구어 염색한 후 인산완충용액으로 세척하여 여과지를 공기 중에서 말렸다. 이런 방법으로 각 염색법 당 2개씩 모두 6개의 여과지를 얻은 동일한 염색법이 적용된 2개의 여과지를 같은 slide glass에 올려놓고 cover slip으로 덮고서 관찰하였다.

형광현미경 관찰 및 총세균수 계수

형광현미경(Axioskop 50, Carl Zeiss, Germany) 관찰은 DAPI 시료의 경우 1번 필터를, AO 시료의 경우 9번 필터를 이용하였으며 1600 \times 의 배율로 관찰하여 나타나는 형광 상을 서로 비교하였다.

잎표면에 부착성장하는 총세균수의 직접계수는 가장 형광 상이 뚜렷하고 세균의 확인이 가능한 염색법을 사용하였으며 떡갈나무 잎을 대상으로 하였다. 2개의 시료에 대하여 시료 당 30 field의 세균수를 센 후 이를 산술 평균하여 총세균수를 계산하였으며 효모나 균류로 보이는 세포는 모두 제외하였다. 총세균수는 잎의 양쪽 면에 균일하게 분포하는 것으로 가정하고 cells/cm² 단위로 나타내었다.

결과 및 고찰

잎표면세균의 직접관찰

잎표면세균의 직접관찰법을 확립하기 위해서 잎에 붉은 색을 띠는 장미 잎과 붉은 색이 전혀 없이 녹색인 떡갈나무 잎을 대상으로 하여 3가지 염색법을 비교 관찰하였다. 먼저 장미 잎의 경

우 AO 0.05%로 염색하였을 때 세균과 주변배경이 모두 붉은 색의 형광을 띠어 세균을 식별하기가 극히 어려웠다(Fig. 1A). 이와는 달리 DAPI는 세균의 형광이 배경과 뚜렷이 구별됨으로써 세균을 쉽게 확인하고 계수할 수 있었다(Fig. 1B, C). 특히 5.0 $\mu\text{g/ml}$ DAPI 농도에서는 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 에 비하여 세균의 형광이 한층 더 강하여 배경과의 뚜렷이 구별됨으로써 가장 좋은 현미경 상을 얻을 수 있었다(Fig. 1C). 그리고 떡갈나무 잎은 장미 잎과는 달리 AO로 염색한 경우에도 세균이 배경과 구별되는 뚜렷한 주황색의 형광을 강하게 띠어 직접관찰이 가능하였다(Fig. 1D). 하지만 DAPI와 비교하면 상대적으로 영상의 뚜렷함이 덜한 편이었다. 장미 잎의 경우와 마찬가지로 2.5에 비하여 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 보다 뚜렷한 영상을 보여 주었다(Fig. 1E, F).

안 등(1)은 밤나무 잎에서 잎권세균을 분리시킨 용액을 0.05% AO로서 7분간 염색하여 밤나무 잎표면의 총세균수를 계수하였고, Morris 등(11)은 상추, 시금치, 배추와 같은 야채 잎을 0.01% AO로서 2분간 염색하여 잎표면의 생물막을 성공적으로 관찰한 바 있으며, Mercier와 Lindow(10)는 콩, 옥수수, 오이와 같은 농작물의 잎에 배양한 *Pseudomonas fluorescens*를 접종한 후 잎에 부착한 세균을 관찰하는데 역시 AO로서 염색한 바 있기 때문에 본 연구에서도 AO를 실험 대상으로 삼았다. 본 연구에서는 잎표면에서 부착성장하는 세균을 계수하는 것이 주 목적으로 세포의 중합체(EPS, extracellular polymeric substances)와 같은 생물막 구성성분의 배경형광을 최대한 줄이기 위하여 Herbert(5)가 제시한 3분의 AO 염색시간을 적용하였다. Fry(4)는 AO로 염색된 세균은 주로 연녹색의 형광을 띠며 주황색의 형광을 띠는 세균의 수는 5% 미만이라고 하였지만 본 연구에서는 AO로 염색된 잎표면세균 가운데 연녹색을 띠는 것은 전혀 없이 모두가 주황색을 띠므로써 배경과의 구별이 거의 불가능하였다.

한편 DAPI는 잎권세균의 직접관찰에 사용한 연구는 없지만 수중세균에 대해서는 현재 널리 사용되어 왔다. DAPI는 형광이

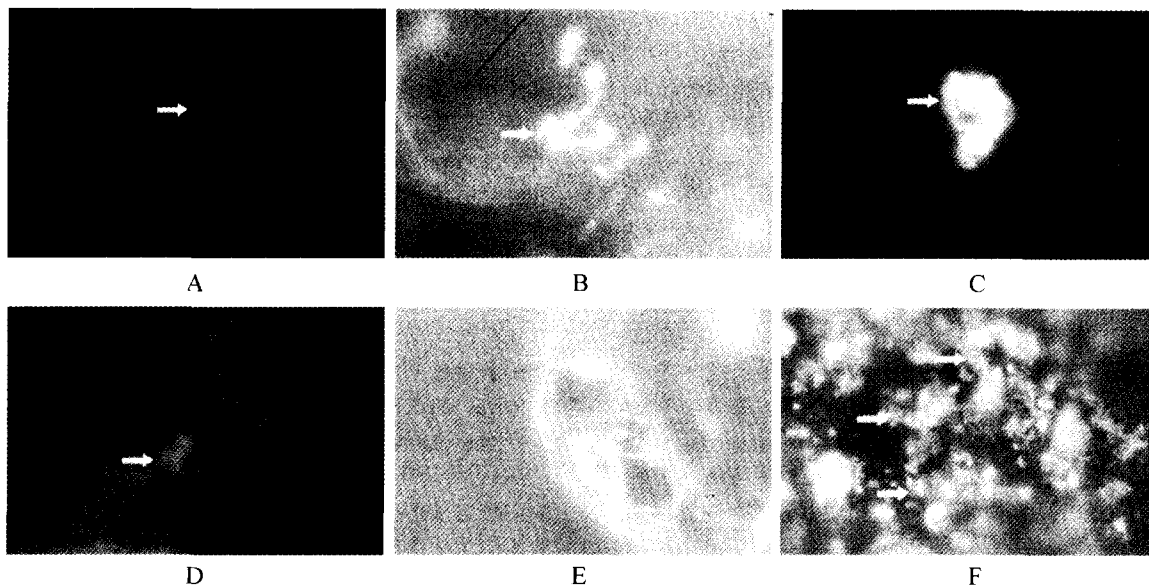


Fig. 1. Epifluorescence photomicrographs (magnification, $\times 1600$) of epiphytic bacteria stained with 0.05% acridine orange, 2.5 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$ DAPI on rose leaves (A, B, and C, respectively) and on oak tree leaves (D, E, and F, respectively).

매우 안정적이어서 쉽게 퇴색되지 않을 뿐만 아니라 DNA에 대한 특이성이 높아 수계에 존재하는 배양불가능세균까지도 효과적으로 관찰할 수 있는 것으로 알려졌다(14). 기존의 수계세균에 대한 DAPI 염색법으로 보면 *E. coli* 배양액은 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 용액에 10분 염색(15), 연안해수는 5 $\mu\text{g/ml}$ 용액에, 그리고 호숫물은 0.05 및 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 용액에 5분 염색하였다(4). 그리고 Hoff(7)는 수중 부유세균의 직접계수를 위하여 시료의 종류에 따라 1-10 $\mu\text{g/ml}$ DAPI 용액을 1~5분 동안 염색하도록 권장하고 있다. 이렇게 DAPI의 염색법은 시료의 종류에 따라 크게 다르므로 잎권에 가장 적합한 염색법을 개발할 필요가 있는 것이다. 본 연구에서 사용되는 잎은 물에 비하여 형광을 방해하는 배경물질이 많기 때문에 오염된 연안해수와 퇴적토의 직접관찰에 적용되었던 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 용액에 5분 동안 염색하는 것을 기본으로 하고 이 농도의 절반인 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 에 대해서도 실험을 실시하였다. 한편 Fischer 등(3)은 소택지에서 자라는 사상녹조류 표면의 부착세균에서 분리한 16S rDNA의 염기서열을 가지고 계통분류를 실시하여 부착세균군집구조를 확인하였는데 이때 녹조류 세포를 DAPI로 염색한 결과 부착세균이 효과적으로 분리된 것으로 확인하였다.

이렇게 AO와 DAPI를 가지고 잎을 형광염료로 염색하여 현미경으로 잎표면을 직접 관찰한 결과 AO를 적용할 수 있는 식물은 제한된 반면 DAPI는 거의 모든 종류의 식물에 적용 가능한 것으로 나타났다. 또한 AO보다는 DAPI의 현미경 영상이 더 뚜렷하여 세균 관찰이 용이하였다. 더구나 총세균수를 세기 위해서는 30개의 field를 관찰하여야 하는데 AO가 내는 붉은 색의 형광은 DAPI의 푸른 색 형광에 비하여 눈의 피로를 쉽게 가져오기 때문에 그만큼 관찰하는데 노력과 시간이 더 많이 들었다. 따라서 잎표면세균을 형광현미경으로 직접 관찰하여 총세균수를 세기 위해서는 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 용액에서 5분 동안 염색하는 방법이 최적인 것으로 판단되었다.

잎표면세균을 직접 관찰하기 위한 방법을 확립하는 본 연구에서 밝혀진 중요한 사실 가운데 하나는 형광 염색된 잎 시료에서 시간이 지남에 따라 많은 수분이 잎표면으로 용출되어 작은 물방울이 맺히기 때문에 현미경으로 잎표면세균의 관찰이 불가능하게 된다는 점이다. 이를 극복하기 위하여 시료 건조시간 및 현미경 관찰시간을 최소화하였다. 따라서 염색된 잎 시료의 수분을 빨리 제거하기 위하여 시료를 거름종이 위에 올려놓고 수분을 흡수시키는 한편 공기 중에서 5분 동안 말리던 것을 70°C의 건조기에서 2분 동안 말리는 방법을 사용하였다. 이 방법은 건조시

간을 줄여 줄뿐만 아니라 잎에서 수분이 용출되어 나오는 시간을 늦게 해주는 효과도 있는 것으로 확인되었다. 즉 공기 중 건조는 현미경 관찰 시작 후 5분 이내에 잎에서 물방울이 용출되어 30개의 field 관찰이 불가능하였던 반면 건조기로 건조된 잎 시료는 10분 이상이 지나도 물방울이 용출되지 않아 30개의 field 관찰이 가능하였다. 이렇게 건조기에서 건조된 잎 시료는 즉시 slide glass 위에 고정시킨 후 바로 형광현미경으로 관찰하였다. 이런 방법으로 준비된 시료에서 관찰된 잎표면세균은 공기 중에서 말린 시료에 비하여 현미경 상이 더욱 뚜렷하였으며 물방울 용출시간을 지연시켜 더 오랜 시간동안 현미경 관찰이 가능하였다.

이상과 같은 결과를 종합하여 확립된 형광현미경을 이용한 최적의 잎권세균 관찰법은 잎 조각을 5.0 $\mu\text{g/ml}$ DAPI 용액으로 5분 동안 염색한 다음 여과멸균된 인산완충용액으로 2번에 걸쳐 세척한 뒤 이 여과지를 거름종이 위에 놓고 70°C에서 2분 동안 말려 즉시 slide glass 위에 고정시킨 다음 바로 현미경으로 관찰하는 것이다.

용액 속으로 분리된 잎표면세균의 간접관찰

떡갈나무 잎에 음파(sonication)를 쬐어 잎권세균을 인산완충용액 속으로 분리한 후 이 용액을 여과시킨 여과지를 앞에서 결정한 3종류의 염색법으로 염색하여 형광현미경으로 관찰한 결과 잎표면의 직접관찰 때와는 달리 모든 염색법에서 여과지 표면의 세균이 배경과는 뚜렷이 구별되는 형광을 나타냄으로써 쉽게 관찰할 수 있었다(Fig. 2). AO로 염색한 여과지의 세균(Fig. 2A)은 잎을 직접 AO로 염색하여 관찰한 시료(Fig. 1A, D)에 비하여 뚜렷한 현미경 영상을 나타내어 계수가 가능하였다. 그러나 DAPI로 염색한 여과지의 세균이 AO로 염색한 시료보다 더 뚜렷한 형광을 나타내었으며, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에 비하여 세균의 형광이 더 뚜렷하였다. AO와 DAPI 염색에 있어 또 하나의 차이는 AO로 염색한 여과지를 형광현미경으로 관찰하기 위해서는 배경 형광을 제거하기 위한 여과지 세척과정이 필수적인 반면 DAPI로 염색한 여과지는 세척과정에 따른 현미경 영상의 차이는 거의 없었다. 이 결과는 Fry(4)가 필수적인 과정으로서 제안하였던 형광 염색된 여과지의 세척과정이 AO에 대해서만 타당하다는 것을 말해주는 것이다.

결론적으로 본 연구에서 용액 속으로 분리된 잎권세균을 여과한 여과지의 형광현미경 관찰을 위해서는 DAPI 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 5분 동안 염색한 후 세척과정을 거치지 않고 바로 공기 중

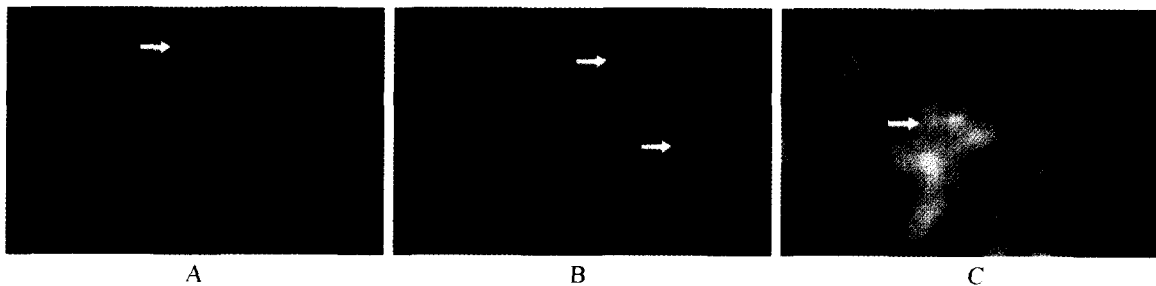


Fig. 2. Epifluorescence photomicrographs (magnification, $\times 1600$) of filtered epiphytic bacteria from oak tree leaves on polycarbonate filters stained with 0.05% acridine orange (A), 2.5 (B) and 5.0 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (C).

Table 1. Direct count of epiphytic bacteria on oak tree leaves by epifluorescence microscopy

Staining method	0.05% acridine orange for leaves	2.5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI for leaves	5.0 $\mu\text{g/ml}$ DAPI		
			Leaves before detachment	Leaves after detachment	Filters of detached bacteria
Total bacterial number (cells/cm ²)	4.55×10^3	2.08×10^5	3.80×10^5	8.55×10^3	1.84×10^5

에서 말려 slide glass에 올려놓고 관찰 계수하는 방법이 가장 좋은 것으로 나타났다.

잎표면세균의 직접계수

앞에서 확립된 잎표면세균의 형광현미경 관찰법을 적용하여 1998년 4월 대전대학교 교내 떡갈나무 잎을 대상으로 잎표면세균을 계수하였는데 2개의 잎 조각 시료에 대하여 각각 30 field에서 세 세균수를 산출 평균하였다. 그 결과 떡갈나무 잎표면에는 0.05% AO로 염색하였을 때는 평균 4.55×10^3 , 2.5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI로 염색하였을 때는 2.08×10^5 , 그리고 5.0 $\mu\text{g/ml}$ DAPI로 염색하였을 때는 평균 3.80×10^5 cells/cm²의 세균이 존재하는 것으로 나타남으로써(Table 1) DAPI에 의한 염색법이 AO에 비하여 우수한 것으로 나타났다. 여기서 DAPI에 의한 총세균수는 안 등(1)이 1996년과 1997년 사이에 채취한 공단지역 및 청정지역 밤나무 잎에서 분리한 용액을 여과한 여과지를 AO로 염색하여 형광현미경으로 관찰한 평균 총세균수(AODC)인 9.9×10^5 및 6.6×10^5 cells/cm²와 같은 지수값이었다. Jacques와 Morris(8)는 잎 표면의 현미경 직접관찰에 있어서는 관찰 부위에 따라 분포하는 세균수가 크게 다를 수 있으므로 최소 20 field 이상을 관찰하여야 하며 생물막 및 결집된 세포의 존재 등의 제한으로 인하여 최대 2×10^4 cells/cm²의 세균이 계수된다고 하였는데 이것은 본 연구에서 개발된 직접관찰법이 기존의 방법보다 우수함을 말해주는 것이다.

용액 속으로 분리한 잎표면세균의 간접계수

잎 시료의 음파조사를 통하여 용액 속으로 분리한 후 polycarbonate 여과지에 걸러진 세균을 형광 염색하여 잎표면세균을 간접적으로 계수한 결과 평균 1.84×10^5 cells/cm²의 세균이 존재하는 것으로 확인되었다(Table 1). 이는 직접계수된 잎표면세균수의 약 48%에 해당한다. 용액 속에 분리된 세균의 간접계수치는 사용된 분리방법에 따라 달라진다(8,12). 많이 사용되는 분리방법으로는 본 연구에서 사용된 음파분리(sonication) 외에 분쇄(grinding, blending), 분쇄기계(Stomacher Lab-Blender)를 이용한 stomacher blending, 세척(washing)의 4가지가 있는데 Donegan 등(2)이 이 4가지 방법의 분리효율을 콩과 귀리의 잎을 이용하여 실험한 결과 잎표면세균의 분리효율의 우수성은 stomacher blending > grinding > sonication > washing의 순으로 나타났다. 이 실험에서 가장 분리효율이 우수한 stomacher blending은 본 연구에서 사용된 음파분리의 3.9배였다. 하지만 stomacher blending은 잎표면세균은 물론 잎내부세균까지도 검출될 수 있으므로 잎표면세균만을 세는 본 연구목적에는 음파분리가 최적인

것으로 판단된다. 실제로 본 연구에서 음파분리의 효율을 측정하기 위하여 음파조사에 의하여 잎표면세균의 분리가 일어난 잎표면을 5.0 $\mu\text{g/ml}$ DAPI로 염색하여 관찰한 결과 잎표면세균수가 8.55×10^3 cells/cm²로서 분리 전의 총세균수인 3.80×10^5 cells/cm²의 2% 정도에 불과하여(Table 1) 우리가 사용한 음파분리방법의 효율이 아주 좋은 것으로 나타났다. 그럼에도 불구하고 여과지 위의 세균수가 훨씬 적게 검출된 것은 잎표면세균의 분리 과정에서 잎표면에 존재하는 많은 다른 물질도 같이 분리되어 여과지 위에 걸러지기 때문에 이러한 방해물질에 의해 관찰되는 세균수가 실제보다 훨씬 적은 것으로 보인다. 이런 사실은 여과지 위에 많은 입자성분이 나타나는 것으로 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 한국학술진흥재단 기초과학연구소지원 학술연구비(사업코드번호 015)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. 안종훈, 방승진, 한남정, 송왕영, 이인수, 박성주. 1997. 공단지역 및 청정지역 식물 잎권의 잎표면세균 및 내산성세균의 분포. 미생물학회. 33, 262-266.
2. Donegan, K., C. Matyac, R. Seidler, and A. Porteous. 1991. Evaluation of methods for sampling, recovery, and enumeration of bacteria applied to the phylloplane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 51-56.
3. Fisher, M.M., L.W. Wilcox, and L.E. Graham. 1998. Molecular characterization of epiphytic bacterial communities on Charophycean green algae. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4384-4389.
4. Fry, J. C. 1990. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments, p. 41-85. In R. Grigorova and J.R. Norris (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 22, *Techniques in microbial ecology*. Academic Press, London.
5. Herbert, R.A. 1990. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments, p. 1-39. In R. Grigorova and J.R. Norris (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 22. Academic Press, London.
6. Hobbie, J.E., P.R. Colwell, M. O'Brien, E. Weiss, A.D. Pearson, R.M. Weiner, and W.D. Burge. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
7. Hoff, K.A. 1993. Total and specific bacterial counts by simultaneous staining with DAPI and fluorochrome-labeled antibodies, p. 149-154. In P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr and J.J. Cole (ed.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Pub-

- lishers.
8. 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.
 9. 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.
 10. Mercier, J. and S.E. Lindow. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 369-374.
 11. Morris, C.E., J.-M. Monier, and M.-A. Jacques. 1997. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1570-1576.
 12. Morris, C. E., J.-M. Monier, and M.-A. Jacques. 1998. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4789-4795.
 13. Palumbo, A.V., P.J. Mulholland, and J.W. Elwood. 1989. Epilithic microbial populations and leaf decomposition in acid-stressed streams, p. 69-90. In S.S. Rao (ed.), *Acid stress and aquatic microbial interactions*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
 14. Porter, K.G. and Y.S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943-948.
 15. Saby, S., I. Sibille, L. Mathieu, J.L. Paquin, and J.C. Block. 1997. Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1564-1569.

(Received February 12, 2001/Accepted February 27, 2001)

ABSTRACT : Improved Epifluorescence Microscopy for Observation of Phyllosphere Bacteria on Leaf Surfaces

Pil-Mun Jung, Kwang Soo Shin, In Soo Lee¹, and Seong Joo Park*(Department of Microbiology, Daejeon University, Daejeon 300-716; ¹Department of Microbiology, Hannam University, Daejeon 300-791, Korea)

Epifluorescence microscopy was used to observe epiphytic bacteria directly on plant leaf surfaces as well as indirectly in the leaf liberating solution by staining with fluorochromes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and acridine orange(AO). Epiphytic bacteria could not be well observed on the leaf surface by staining with AO due to an intrusive orange or red background fluorescence. However, DAPI gave us clear epifluorescent images of the bacteria on the leaf. On the contrary, epiphytic bacteria in the liberating leaf solution were well observed on filters stained by both types of fluorochrome, although DAPI showed better fluorescent images than AO and not necessarily required a washing step of the filters stained. The optimum conditions of the DAPI stains were 5 $\mu\text{g/ml}$ for 5 min both for leaves and for filters of the liberating solution. It was confirmed that a critical step in the epifluorescence microscopy of leaf surfaces was to minimize release of water from the leaf. For this, the stained leaf samples were put on a filter paper, kept in a dry oven at 70°C for 2 min instead of air-drying, and then immediately observed by epifluorescence microscopy. The established technique was applied to enumerate epiphytic bacteria on oak tree leaf surfaces.