

환경 유형에 따른 바이오에어로졸 중 배양성 세균 동정 및 계통분석

이시원[†], 정현미, 박수정, 최별[†], 김지혜[†], 이보람[†], 주윤리[†], 권오상, 정원화*
국립환경과학원 환경기반연구부

Received: March 31, 2015 / Revised: April 28, 2015 / Accepted: April 28, 2015

Identification and Phylogenetic Analysis of Culturable Bacteria in the Bioaerosol from Several Environments

Siwon Lee[†], Hyen-Mi Chung, Su Jeong Park, Byeol Choe[†], Ji Hye Kim[†], Bo-Ram Lee[†], Youn-Lee Joo[†], Oh Sang Kwon, and Weon Hwa Jheong*

Environmental Infrastructure Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 440-170, Republic of Korea

Bioaerosols are comprised of particles 0.02–100 μm in size that originate in natural and artificial environments, and as a result of human activities. They consist of microorganisms including viruses, bacteria, fungi, and protozoa; fungal spores; microbial toxins; pollen; plant or animal material; expectorated liquid from humans; and glucans (peptidoglycan and β -glucan). Bioaerosols can cause respiratory and other diseases in humans and animals. In this study, bioaerosol samples acquired from agricultural sources, livestock, a sewage treatment plant, a beach, and a pristine area were analyzed to identify and phylogenetically characterize culturable microorganisms. The isolated bacteria exhibited regional differences, with different species dominating. However, *Bacillus cereus* was isolated in all samples, with a total of 31 strains isolated from all areas, and *Acinetobacter baumannii* was isolated from an indoor poultry farm. In addition, bacteria determined to be of novel genus or species of the genera *Domibacillus*, *Chryseobacterium*, *Nocardioides* and family *Comamonadaceae* were isolated from the agricultural, livestock and beach environments.

Keywords: Bioaerosols, culturable microorganisms, phylogenetic analysis

서론

인간이 평생 동안 흡입하는 약 50억 리터 정도의 공기 안에는 다양한 미생물이 부착된 입자인 바이오에어로졸(bioaerosol)이 포함되어 있다[10]. 바이오에어로졸은 0.02–100 μm 정도의 크기로, 미생물(바이러스, 세균, 곰팡이 및 원생생물 등), 곰팡이 포자, 미생물 독소, 동·식물 유래 알러젠과 꽃가루, 사람의 기침, 체액 및 글루칸 등의 구성성분으로 실내·외 대기환경에 존재한다[5, 27]. 바이오에어로졸은 생물 다양성과 같은 긍정적 측면도 보고되고 있으나, 활동에 제한을 주고 면역 기능 저하와 각종 호흡기 질환의 원인으로 작용하는 등 대부분 부정적 측면이 보고되고 있다[2, 3, 6, 9, 14, 20].

최근 관심이 집중되고 있는 미세먼지는 우리의 건강과 일상생활에 많은 영향을 주고 있다. 이에 따라 세계보건기구와 유럽연합에서는 미세먼지에 대한 관리기준을 설정하여 관리하고 있고, 국내에서도 1995년 PM10에 대한 기준을 일평균 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 와 연평균 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 로 설정하여 관리하고 있으며 [7], 2014년 2월부터 미세먼지 예·경보제를 시행하는 등의 노력을 하고 있다. 한편 미세먼지는 생물학적 입자인 바이오에어로졸도 포함하고 있어 이들에 대한 연구가 추가적으로 이루어져야 한다. 그러나 바이오에어로졸에 대한 연구는 국제 표준화기구나 미국 환경보호국에서도 표준화된 방법을 정하지 않고 있어 연구자가 목적에 맞게 적절한 방법을 선택해야 하며[26], 환경 유형 별 종의 구성이 달라질 수 있어 다양한 환경에 대한 연구가 필요하나 유관연구는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 환경 여건이 다른 몇 개의 지점을 대상으로 바이오에어로졸 시료를 채취하여 배양성 세균을 분리, 동정 및 계통분석을 수행하고 그 특성을 비교하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel: +82-82-32-560-8353, Fax: +82-32-563-4085

E-mail: purify@korea.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

재료 및 방법

조사지점 및 바이오에어로졸 시료채취

농업지역, 축산지역, 하수처리장, 해변 및 청정지역 등 다양한 환경여건을 갖는 지역을 대상으로 바이오에어로졸 시료를 채취하였다. 농업지역은 퇴비를 많이 사용하는 마늘밭과 농경지가 밀집되어 있는 지역을 선정하였고, 축산지역은 양계장, 소와 송아지 우리 및 양돈장을 대상으로 하였으며, 하수처리장은 국립환경과학원 인근에 위치한 지점을 대상으로 시료를 채취하였다. 해변지역은 서해안의 해수욕장과 동해안에 위치한 항구에서 각각 시료를 채취 하였으며, 청정지역은 자연휴양림에서 시료를 채취하였다(Supplementary Fig. S1). 조사지점의 세부 내용은 Table 1에 기재하였다.

시료 채취는 MAS-100 NT[®] (Merck, Germany) 또는 낙하세균 방법[20, 25]을 사용하여 각각 20초와 1분간 채취하였으며, 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양 후 카운팅하여 colony forming unit (cfu) 값으로 계산하였다. 사용된 배지는 1/10 희석한 Tryptic soy agar (Difco, USA)였으며, 조성은 증류수 1 L를 기준으로 pancreatic digest of casein 8.5 g, peptic digest of soybean meal 1.5 g, dextrose 1.3 g, sodium chloride 5.0 g, dipotassium hydrogen phosphate 2.5 g 및 agar 15 g이었다. 또한 시료 채취 당시의 온도와 습도는 LSIDNA821 (LSI LASTEM, Italy)를 이용해 자동으로 측정하였으며, 기기를 설치할 수 없는 곳은 휴대용 온습도계를 사용하여 측정하였다. 구름량, 강수량 및 미세먼지 농도는 기상청(www.kma.go.kr)과 에어코리아(www.airkorea.or.kr)

Table 1. Information of several environments in this study.

Environments	Detail Site (surrounding)	Sampling date	Location descriptions
Agricultural region	- Garlic field (Midist, edge, compost)	October 7-8	· 36°47'N 126°24'E · Using a lot of compost for fertilizer · Temperature 6.7-21.6°C, humidity 34.7-99.8% (Temp. avg. 12.8°C, humidity avg. 78.4%)
	- Rice paddy (Midist)	September 25	· 37°36'N 126°24'E · Many agricultural areas exist · Temperature 25.9°C, humidity 55.0%
Livestock region	- Poultry farm (Indoor, farm gate)	October 14-15	· 36°47'N 126°55'E · Indoor kennels, approximately over 2,000 chick · A lot of fine dust observed (with the naked eye) · Temperature 25.3°C, humidity 43.0%
	- Cattle & Calf farm	October 15	· 36°47'N 126°55'E · Approximately 100 cattle or calf bred · Temperature 22.1°C, humidity 35.0%
	- Pig farm (Indoor, outside of pig farm, office, farm gate)	October 16	· 36°48'N 126°54'E · Indoor kennels, approximately over 2,000 sow · Temperature 22.0°C, humidity 21.0%
Sewage treatment plant	- Indoor (Swing zone, stinking place, secondary settling, ventilation, effluence)	September 22-23	· 37°21'N 126°37'E · Approximately 30,000,000 m ² sewerage per year · Sewage treatment progress at indoor basement · Temperature 24.6-27.5°C, humidity 34.8-72.5% (Swing zone humidity avg. 72.5%, other place avg. 34.8-52.0%)
	- Outdoor (Outside)		
Beach	- West coast (Beach, rest site)	September 24-25	· 37°35'N 126°27'E · Windbreak forest and eatery are near
	- East coast (Harbor)	November 14	· 38°12'N 128°35'E · Congestion (many people moving), smell of fish · Temperature 7.0°C, humidity 25.0%
Pristine area	- Recreational forest	October 16-17	· 36°29'N 127°47'E · Lonesome and placidity · Felt fresh air compared to other regions

홈페이지를 참조하였다(Supplementary Table S1).

미생물 분리 및 보존

미생물이 배양된 각각의 plates에서 색깔, 모양, 광택 및 투명도 등이 다르다고 판단되는 집락을 임의적으로 순수분리하였다. 분리된 집락들은 20% glycerol을 사용하여 -80°C 초저온냉동고에서 보존하였다.

세균 동정

분리된 미생물의 DNA를 추출하기 위하여, InstaGene™ Matrix (Bio-Rad, USA)를 사용하였으며, 제품의 프로토콜에 따라 수행하였다[15]. 분리된 미생물 중 세균의 DNA만을 특이적으로 증폭할 수 있는 bacteria 16S rDNA polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다[16]. PCR 조성은 2X type의 EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara, Japan)를 사용하여 주형 DNA 1 µl, 27F-1492R 프라이머 각 10 pmol 1 µl 및 nucleic acid free water 7 µl를 첨가하여 총 20 µl로 수행하였다. PCR 조건은 95°C 3분 반응 후, 95°C 1분, 55°C 1분 및 75°C 1분 30초를 30회 반복한 뒤, 최종적으로 72°C 8분 동안 종결 반응을 수행하였다[15]. PCR 산물은 TopRed nucleic acid gel stain (Biopure, United Kingdom)이 포함된 1% agarose gel (Sigma Aldrich, USA)에서 135 V, 30분간 전기영동 후 AlphaImager™ 2200 (Alpha innotech, USA) gel documentation system을 사용하여 형성된 밴드를 확인하였다. 특정 밴드가 형성된 산물들은 마크로젠(Macrogen, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 이후 phylogenetic editor (PHYDIT) ver. 3.2 [1]를 사용하여 염기서열의 peak를 분석하였으며, EzTaxon-e 서버[12]에서 세균을 동정하였다.

계통분석

세균의 계통분석을 위하여 관련된 염기서열들을 미국 국립생물정보센터(NCBI)와 EzTaxon-e 서버에서 수집한 뒤 BioEdit를 사용하여 multiple sequence alignment하였다. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) ver. 5.1 [25] software를 사용하여, maximum likelihood (ML) 및 neighbor joining (NJ)를 구축하였다. ML은 distance model로 Tamura-Nei를, NJ는 Kimura 2 parameter를 사용하여, bootstrap 1,000 반복으로 tree를 구축하였다[13].

결과 및 고찰

환경 유형별 바이오에어로졸 중 배양성 미생물 측정

농업지역의 바이오에어로졸 중 배양성 미생물 검출 농도는 마늘밭 중앙 1.7×10^3 – 2.0×10^3 cfu/m³, 두엄 주변 1.5×10^2 cfu/m³ 및 가장자리 6.0×10^2 cfu/m³로 마늘밭 중

양에서 상대적으로 높게 측정되었다. 축산지역의 바이오에어로졸 중 미생물을 분당 낙하집락 수로 분석한 결과, 양계장 내부 485–498 cfu/min, 소와 송아지 우리 주변 80–94 cfu/min, 양계 농장 대문 5 cfu/min, 양돈장 내부 385–471 cfu/min, 양돈장 외부와 사무실 주변 49–50 cfu/min 및 양돈장 외부 출입문 밖 11 cfu/min으로 측정되었다. 축산지역은 사육장 내부(양계장 및 양돈장)에서 높게 측정되었다. 양계장 실내는 먼지가 많아 육안으로도 관찰되는 정도였고, 양계장과 양돈장 모두 특유의 악취가 나는 등 실내에서 특정 환경이 일정하게 유지됨에 따라 바이오에어로졸 중 배양성 미생물이 높게 측정되었을 것으로 추정된다. 하수처리장의 바이오에어로졸 중 배양성 미생물 검출 농도는 하수 유입부인 swing zone 주변 3.1×10^3 cfu/m³, 지하2층 악취가 나는 작업장 주변 5.4×10^2 cfu/m³, 방류지점 및 2차 침전지 6.1×10^2 – 7.0×10^2 cfu/m³ 및 처리장 외부 환풍기 주변에서는 5.3×10^2 cfu/m³가 측정되었다. 하수처리장 주변에서는 대체적으로 유사한 값이 측정되었으나 하수 유입부인 swing zone 주변에서 약 5–10배 정도 높게 측정되었는데, 이것은 다른 지점에 비해 약 20–38% 높은 공기 중 습도(Supplementary Table S1)로 인하여 미생물의 검출농도가 높아진 것으로 사료된다. 또한 서해안의 해수욕장 해변은 1.5×10^2 – 1.5×10^2 cfu/m³, 해변 인근 휴식터인 방풍림에서는 1.6×10^3 cfu/m³ 및 동해안 항구 해변에서 8.1×10^2 cfu/m³의 배양성 미생물이 측정되었으며, 바람이 많이 부는 해변보다 바람의 양이 적고 상가 인접하고 방풍림이 둘러싸인 휴식터에서 상대적으로 많이 측정되었다. 한편 청정지역인 자연휴양림에서는 4 cfu/min로 다른 환경에 비해 낮게 분석되었다(data not shown).

지역별 바이오에어로졸 중 배양성 미생물 동정

농업지역에서는 마늘밭과 농지에서 총 51개의 strains가 분리되었으며 이 중 45개 strain이 동정되었다. 분리된 strain 중 13종이 *Bacillus* spp.로 동정되어 바이오에어로졸 중의 배양성 미생물 중 가장 많은 수를 차지하였으며, 그 밖에도 *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevundimonas*, *Cellulosimicrobium*, *Deinococcus*, *Domibacillus*, *Exiguobacterium*, *Flavobacterium*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Phycoccus*, *Planococcus*, *Planomicrobium*, *Psychrobacillus*, *Psychrobacter* 및 *Rhodococcus* spp. 등 19개 속이 분리·동정되었다(Supplementary Table S2). 특히 분리된 균주들 중 strain 17-1, 17-2, 17-3, 17-4 및 17-5는 *B. cereus* ATCC 14579^T와 99.9–100.0% 유사성이 있는 것으로 분석되었다. *B. cereus*는 자연계(토양, 먼지 및 하수)에 널리 분포하면서 주로 음식류에 오염되어 부패, 변패 및 식중독을 유발할 가능성이 있는 세균으로 *Staphylococcus*

aureus, *Clostridium perfringens* 식중독과 유사한 감염 증상이 보고되는 세균이다. 과거 유럽과 미국에서 발병 보고가 있었으며, 우리나라에서도 2003년 건당 66명의 환자가 발생한 사례가 있었으나[18], 최근 *B. cereus*에 대한 검출기법 개발되는 등 철저한 식품 위생관리로 발생 보고가 현저하게 줄어들고 있는 추세이다[18]. 또한 strain 16-7은 다양한 환경에 존재하면서 생물막 형성[12] 등 중요한 역할을 수행하고 있을 것으로 추정[16]되는 *Flavobacterium*속으로 동정(*F. oceanosedimentum* 99.23%) 되었으며, strain 22-1이 *Deinococcus-Thermus*문에 포함된 *Deinococcus ficus*와 100% 유사성이 분석되어 농업지역에의 바이오에어로졸에는 더욱 다양한 배양성 미생물이 존재할 것이라고 추정되었다. 한편, strain 21-2는 *Domibacillus robiginosus*와 96.52% 유사성을 나타내어, *Domibacillus* spp.의 신종으로 추정되었다. *Domibacillus*속은 Seiler 등에 의해 최초 보고되었으며[21], 현재 전 세계적으로 2종 밖에 존재하지 않는 균주이다. 보고된 2개의 균주들은 *D. robiginosus*와 *D. indicus* [22]로 이들은 각각 해양 저질토와 의약품 클린룸에서 분리된 바 있으나 대기환경 중에서는 최초로 분리되었다.

축산지역에서는 총 65개의 strains가 분리되었으며 이 중 60개의 isolates가 동정되었다. 동정된 isolates 중 21종이 *Staphylococcus* spp.로 바이오에어로졸 중 배양성 미생물 중 가장 많이 나타났으며, 특히 양계장 내부에서 분리된 13개의 isolates 중 12개(약 92.3%)가 *Staphylococcus* spp.로 동정되어 *Staphylococcus*가 우점하고 있는 것으로 분석되었다. 그 밖에도 양계장 내부에서 *Acinetobacter*속, 소와 송아지 우리 주변에서는 *Bacillus*와 *Prolinoborus*속이 동정되었으며, 양계 농장 대문에서는 *Brevibacterium*, *Cellulomonas* 및 *Janibacter* spp.가 동정되었다. 본 연구에서 양계장을 중심으로 동정된 바이오에어로졸 중 배양성 미생물을 기초한다면 실내 양계장으로부터 외부로의 미생물학적 오염은 없는 것으로 분석되었으나, 주변 농경지역 또는 바람의 영향 등을 고려하고 분자생물학적 미생물 다양성을 분석하는 등 정밀분석이 필요할 것으로 사료되었다. 양돈장 내부에서는 *Achromobacter*, *Aerococcus*, *Bacillus*, *Candidatus Amoebinator*, *Chryseobacterium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Exiguobacterium*, *Kocuria*, *Kurthia*, *Microbacterium*, *Nocardioidea*, *Pantoea*, *Prolinoborus*, *Psychrobacter*, *Stenotrophomonas* 및 *Streptococcus* spp. 등 20개 속이 동정되었다(Supplementary Table S3). 양돈장 내부는 같은 실내 사육장이지만 양계장에 비해 매우 다양한 종류의 바이오에어로졸 중 배양성 미생물이 분석되었다. 특히 양돈장에서 분리된 strain 30-1, 30-2, 30-3 및 30-5는 *Escherichia coli* KCTC 2441^T와 99.4-99.8%의 유사성이 분석되어 공기 중 대장균 오염이 추정되었으나, 대장균은 16S rDNA만으로는 중

동정이 매우 어려워, 표준분석 방법을 통한 확정 다상 동정이 필요할 것으로 사료되었다. 또한 양돈장에서 분리된 strain 29-4는 *Acinetobacter baumannii*와 99.66%의 유사성이 분석되었다. *Acinetobacter* spp.는 주로 토양 환경에서 방향족 화합물을 광물화하는 세균으로 많이 알려져 있고 병원성은 명확하게 알려진 바 없으나, 이 중 *A. baumannii*는 면역력이 약한 환자에게 감염될 가능성이 있다고 보고되어 있다[17]. 한편, 양계장 내부에서 분리한 strain 26-4는 *Staphylococcus gallinarum*과 96.34%, 양돈장에서 분리한 strain 33-2는 *Nocardioidea alpinus*와 95.64% 및 strain 33-4는 *Chryseobacterium hominis*와 96.70%의 유사성이 분석되어 각각 *Staphylococcus* spp., *Nocardioidea* spp. 및 *Chryseobacterium* spp.의 새로운 종으로 추정되었다.

하수처리장에서는 총 32개의 isolates가 분리되었으며, 이 중 26개가 동정되었다. 분리된 isolates들은 모두 *Bacillus*와 *Brevibacillus* spp.로 동정되었고, *Bacillus* spp.가 23종으로 바이오에어로졸 중의 배양성 미생물 중 우점속으로 나타났으며, 이 중 16종이 *B. cereus* ATCC 14579^T와 99.9-100.0% 유사성이 분석되었다. 또한 strain 6-1과 8-3은 *B. toyonensis*와 99.7-99.8% 유사성이 분석되었다. *B. toyonensis*는 1996년 일본에서 최초로 보고되었고, 처음에는 *B. cereus*의 그룹으로 *B. cereus* var. *toyoï*로 명명 되었다가 Jiménez 등(2013)이 ANI calculations에 의해 *B. toyonensis*로 재분류하였다[8]. *B. toyonensis*는 돼지, 가금류, 소, 토끼 등 동물의 영양제 중 생균제(Toyocerin powder)로 첨가 되는 허가를 획득하였으며 많은 연구가 이루어진 유익한 세균 중 하나이다. 분리된 2개의 균주가 2차 침전지 주변과 지하2층 악취가 나는 작업장 주변에서 분리된 것으로 보아 처리장 내부 또는 출입하는 사람을 통해 주변 환경으로부터 오염되었을 것이라고 추정된다. 한편, strain 6-5와 7-3은 *B. tequilensis* 99.8%, strain 6-2, 6-3 및 6-4는 *B. aerophilus*와 약 99.8%의 유사성이 분석되었다. *B. tequilensis*는 멕시코에서 2,000년 전의 것으로 추정되는 무덤의 통풍구[4]에서, *B. aerophilus*는 대류권과 성층권 사이인 24-41 km 지점에서 풍선(balloon)에 의해 채취된 시료에서 분리[23]되는 등 모두 대기환경에서 분리된 바 있다. 이 중 *B. aerophilus*는 소와 송아지 울타리 주변에서도 분리되는 등 대기환경에서 일반적으로 서식 또는 존재하는 균집 중 하나일 것으로 추정된다(Supplementary Table S4).

해변에서는 총 44개의 isolates가 분리되었으며, 이 중 42개가 동정되었다. 분리된 isolates들 중 18종이 *Bacillus* spp.로 동정되어 바이오에어로졸 배양성 미생물 중 우점하였고, 추가적으로 *Arthrobacter*, *Deinococcus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Paenibacillus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus*,

Tepidicella 및 *Terrabacter*속으로 동정되었다(Supplementary Table S5). 특히 분리된 strains 중 7종이 *B. cereus* ATCC 14579^T와 99.4–1010.0% 유사성이 분석되었으며, 동해 항구에서 분리된 strain 44-6은 *Deinococcus radiopugnans*와 99.86%로 분석되어 농업 지역과 함께 다양한 문(phylum)들이 존재할 가능성을 보여주었다. 한편, strain 44-5는 *Tepidicella xavieri*와 95.12%의 유사성이 분석되어 *Tepidicella* spp.의 새로운 종으로 추정되었다.

청정지역의 바이오에어로졸 중 배양성 미생물은 총 5개의 strains를 분리 하였으며, 3개의 straindms *B. cereus* ATCC 14579^T와 99.8–100.0%, 다른 2개의 straindms *B. pseudomycooides*와 97.4–97.9%가 분석되는 등 모두 *Bacillus* spp.로 동정되었다(Supplementary Table S6).

신종 추정균주 정밀동정

환경유형 별로 분리한 배양성 세균 중, 신종으로 추정되는 5종을 대상으로 16S rDNA 염기서열을 추가적으로 분석한 결과, 1,390–1,460 bp의 염기서열이 분석되었다. 염기서열들을 EzTaxon-e 서버[12]를 통해 분석한 결과, 양계장에서 분리한 strain 26-4는 *Staphylococcus gallinarum*와 99% 이상의 염기서열이 분석되어 신종 추정균주에서 제외하였다. 항구에서 분리한 strain 44-5는 1,428 bp의 염기서열이 분석되었으며 *Comamonas koreensis*와 96.5%의 유사성이 분석되었으며, 계통분석 결과 신속으로 추정되었다(data not shown). Strain 21-2, 33-2 및 33-4는 각각 *Domibacillus*, *Nocardioides* 및 *Chryseobacterium*속의 신종으로 추정되었다(data not shown).

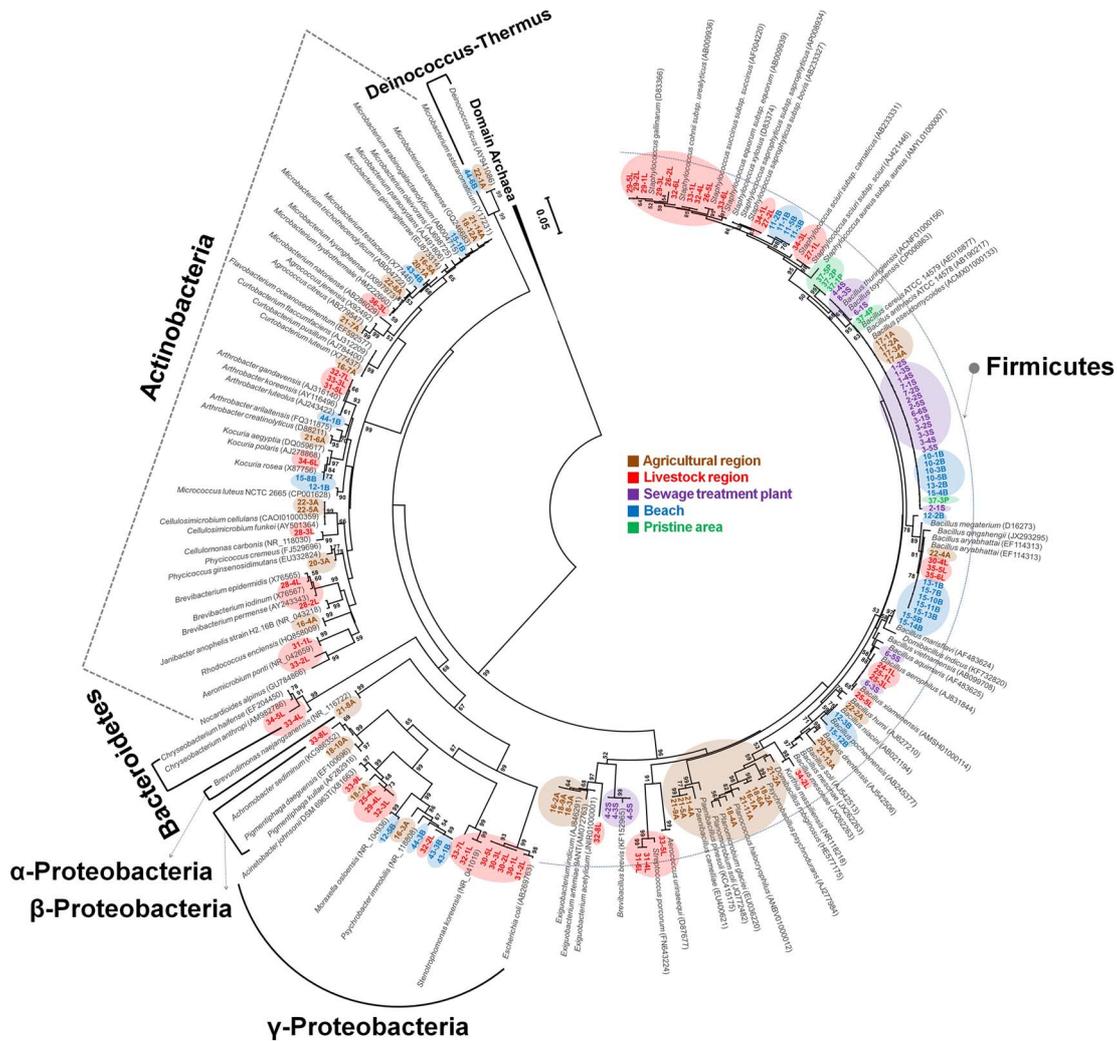


Fig. 1. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic position of isolates based on 16S rRNA gene sequences in the bioaerosols from several environments. Distance model was using by Kimura 2-parameter. Bootstrap values (>50%) based on 1000 replications are shown. Phylum archaea was used as an out-group. Bar, 0.05 nucleotide substitutions per nucleotide position.

Table 2. Comparison of cultural bacteria for genus level from different area.

No	Genus	Agricultural region	Livestock region				Sewage treatment plant	Beach		Clean area
			Pol.	Ca.	Pig	Out.		WB	EH	
1	<i>Achromobacter</i>	○			○					
2	<i>Acinetobacter</i>	○	○		○					
3	<i>Aerococcus</i>			○						
4	<i>Aeromicrobium</i>			○						
5	<i>Arthrobacter</i>	○		○				○		
6	<i>Bacillus</i>	○		○	○	○	○	○		○
7	<i>Brevibacillus</i>						○			
8	<i>Brevibacterium</i>					○				
9	<i>Brevundimonas</i>	○								
10	<i>Candidatus Amoebinatus</i>			○						
11	<i>Cellulomonas</i>				○					
12	<i>Cellulosimicrobium</i>	○								
13	<i>Chryseobacterium</i>			○						
14	<i>Corynebacterium</i>			○						
15	<i>Deinococcus</i>	○							○	
16	<i>Domibacillus</i>	○								
17	<i>Escherichia</i>			○						
18	<i>Exiguobacterium</i>	○		○						
19	<i>Flavobacterium</i>	○								
20	<i>Janibacter</i>					○				
21	<i>Kocuria</i>	○		○			○			
22	<i>Kurthia</i>			○						
23	<i>Microbacterium</i>	○				○	○	○		
24	<i>Micrococcus</i>						○			
25	<i>Moraxella</i>						○			
26	<i>Nocardioides</i>			○						
27	<i>Paenibacillus</i>	○							○	
28	<i>Pantoea</i>			○						
29	<i>Paracoccus</i>								○	
30	<i>Phycoccus</i>	○								
31	<i>Planococcus</i>	○								
32	<i>Planomicrobium</i>	○								
33	<i>Prolinoborus</i>			○	○					
34	<i>Pseudomonas</i>								○	
35	<i>Psychrobacillus</i>	○								
36	<i>Psychrobacter</i>	○		○					○	
37	<i>Rhodococcus</i>	○								
38	<i>Staphylococcus</i>		○	○			○			
39	<i>Stenotrophomonas</i>			○						
40	<i>Streptococcus</i>			○						
41	<i>Tepidicella</i>								○	
42	<i>Terrabacter</i>							○		
	Total	19	2	2	20	5	2	7	8	1
			24*					14*		

*Overlapping circles of genus were counted one.

Highlight, showed local specificity for genus levels.

Pol., Poultry farm (indoor); Ca., Cattle & Calf farm; Pig, Pig farm (indoor); Out., Outside of all livestock region (Poultry, Cattle, Calf and Pig); WB, west coast beach; EH, east coast harbor.

계통분석을 이용한 지역별 바이오에어로졸 중 배양성 미생물 분석

농업지역, 축산지역, 하수처리장, 해변 및 청정지역을 대상으로 분리된 바이오에어로졸 중 배양성 미생물은 총 197 strains였으며, 계통분석 결과 genus 수준에서 농업지역 19개, 축산지역 24개, 하수처리장 2개, 해변 14개 및 청정지역 1개의 속이 분석되어 총 42개의 속으로 분석되었다(Table 2). 바이오에어로졸 중 배양성 미생물 다양성이 높게 나타난 축산지역은 양돈장 내부에서 20속으로 대부분을 차지했으나, 양계장 내부(2개속), 소와 송아지 우리(2개속) 및 외부 주변 환경(양계장 외부, 양돈장 외부, 사무실 주변 및 양돈장 외부 출입문 밖)에서는 5속으로 낮은 다양성이 분석되었다. 비교적 높은 다양성을 보인 양돈장 내부에서는 타 지역에서 나타나지 않은 *Aerococcus*, *Candidatus Amoebivorus*, *Chryseobacterium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Kurtzia*, *Nocardioideae*, *Pantoea*, *Prolinoborus*, *Stenotrophomonas* 및 *Streptococcus* 속이 특이적으로 분리·동정되었다. 또한 19개의 속이 분석되어 높은 다양성을 보인 농업지역에서는 타 지역에서 동정되지 않은 *Brevundimonas*, *Cellulosimicrobium*, *Domibacillus*, *Flavobacterium*, *Phycoccus*, *Planococcus*, *Planomicrobium*, *Psychrobacillus* 및 *Rhodococcus* 속이 특이적으로 분리·동정되었으며, 14개 속의 배양성 미생물이 동정된 해변에서는 타 지역에서 분석되지 않은 *Micrococcus*, *Moraxella*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Tepidicella* 및 *Terrabacter* 속이 특이적으로 분리·동정되는 등 지역적 특이성이 분석되었다(Table 1, Fig. 1). 또한 고세균을 out-group으로 구축한 계통분석 결과, 대기 환경에서는 총 5개의 phylum (Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes/Fibrobacteres-Chlorobi 및 Deinococcus-Thermus)에 속하는 세균이 분리되었다(Fig. 1). 그 중 Firmicutes와 Actinobacteria 문이 우점하였고, Proteobacteria 문은 α , β 및 γ -proteobacteria 강에 속하는 세균이 분리되었다(Fig. 1). 한편 대기 환경에서는 분리된 세균 중 속 수준에서는 *Bacillus* spp.가 가장 많은 수를 차지하였고, 농업지역, 하수처리장, 해변 및 청정지역에서 분리한 31개 균주는 *B. cereus* ATCC 14579^T (AE016877)와 유연관계가 분석되어(Fig. 1) 추가적인 계통 분석을 수행하였다. 그 결과 29개의 균주가 *B. cereus*와 유연관계가 분석되었다. *B. cereus*와 유연관계가 분석되지 않은 2종 중 strain 4-4는 *B. toyoensis* 또는 *B. thuringiensis*와 유연관계가 보여졌으며, 다른 한 종인 strain 37-1은 특정 종과 유연관계가 없이 *B. cereus* group과의 유연관계가 분석되었다(Supplementary Fig. S2). 또한 농업 및 축산지역에서 분리한 5개의 isolates가 *Acinetobacter* spp.와 유연관계가 분석되어 추가 계통분석을 수행한 결과 strain 29-4는 *Acinetobacter baumannii*와 strain 33-9는 *A. schindleri*

CIP 107287^T와 유연관계가 분석되었고, 다른 3종의 strain들은 *Acinetobacter baumannii*와 유연관계가 나타나지 않았으며 오히려 *Prolinoborus fasciculus* CIP 103579^T (JN175353)와 유연관계가 분석되었다(Supplementary Fig. S3).

결론

본 연구에서는 조건이 다른 몇몇의 환경(농업지역, 축산지역, 하수처리장, 해변 및 청정지역)을 대상으로 시료를 채취하였으며, 바이오에어로졸 중 배양성 미생물의 환경 유형별 특성을 분석하였다. 바이오에어로졸 중 배양성 미생물의 농도는 농업지역 밭 가운데와 습도가 높은 실내 조건(축사내부 및 하수처리장)의 바이오에어로졸에서 높게 측정되었고, 하수처리장에서는 *Bacillus*속과 축산지역(특히 양계장 내부)에서는 *Staphylococcus*속이 우점하였으며, 양돈장 내부와 농업지역에서는 타 지역에 비해 많은 종이 출현하는 등 환경 유형별 특성이 나타났다. 또한 농업지역, 축산지역(양돈장 내부), 하수처리장, 해변 및 청정지역에서 분리한 총 31개의 균주가 *B. cereus*로 동정되었으며, 양계장 내부에서는 *Acinetobacter baumannii*가 분리되었다. 한편 농업지역, 축산지역 및 해변에서 채취한 바이오에어로졸 중 *Domibacillus*, *Chryseobacterium*, *Nocardioideae*속 및 Comamonadaceae에 속하는 신종 또는 신속균주가 분리되었다. 바이오에어로졸은 환경 중 더욱 다양하게 분포할 것이라고 추정되며, 향후 바이오에어로졸의 미생물학적 특성을 평가하기 위해서는 유전자 분석법 등을 이용하여 보다 많은 미생물 정보를 획득하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

요약

바이오에어로졸은 0.02–100 μm 입자로, 자연 및 인위적 환경 또는 사람의 활동에 의해 발생된다. 바이오에어로졸은 바이러스, 세균, 곰팡이, 원생동물, 곰팡이 포자, 미생물 독소, 꽃가루, 동식물 기원의 물질, 타액 또는 글루칸 등으로 구성되며, 인간과 동물에게 호흡기 등의 질환을 유발한다. 본 연구에서는 농업, 축산, 하수처리장, 해변 및 청정지역의 바이오에어로졸 시료에서 분리한 배양성 미생물을 동정 및 계통분석을 수행한 결과, 우점 및 종의 구성 등 환경 유형 별 차이가 분석되었다. 한편 모든 시료에서 31 분리주가 *Bacillus cereus*로 동정되었고, 실내 양계장에서 *Acinetobacter baumannii*가 분리되었다. 또한 농업, 축산 및 해변에서 분리한 미생물 중 *Domibacillus*속, *Chryseobacterium*속, *Nocardioideae*속 및 Comamonadaceae과에 속하는 새로운 종 또는 속이 분리되었다.

Acknowledgments

The present research was conducted by a grant from the National Institute of Environmental Research, Ministry of Environment, Republic of Korea (grant no. NIER-RP2014-309), and this study was supported by Post-Doctoral Fellowships Program of National Institute of Environmental Research, Republic of Korea.

References

- Chun J, Bae KS. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences, *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**: 123-127.
- Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D. 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Anns. Occup. Hyg.* **47**: 187-200.
- Fung F, Hughson WG. 2003. Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **18**: 535-544.
- Gatson JW, Benz BF, Chandrasekaran C, Satomi M, Venkateswaran K, Hart ME. 2006. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1475-1484.
- Hong SG, Jang JS. 2013. Mechanical engineering research of the bioaerosol. *Machine J.* **53**: 41-44.
- Hua NP, Kobayashi F, Iwasaka Y, Shi GY, Naganuma T. 2007. Detailed identification of desert-originated bacteria carried by Asian dust storms to Japan. *Aerobiologia* **23**: 291-298.
- Hyeon DR. 2014. Chemical composition comparison of fine particulate matter in accordance with meteorological phenomena at background area of Korea during 2012-2013. Master thesis. Jeju National University, Jeju-do, Korea.
- Jiménez G, Urdiain M, Cifuentes A, López-López A, Blanch AR, Tamames J, et al. 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**: 383-391.
- Kellogg CA. 2006. Aerobiology and the global transport of desert dust, *Trends Ecol. Evol.* **21**: 638-644.
- Ko GP. Exposing of the bioaerosols and risk assessment of human health, *Air Cleaning Technology* **20**: 50-56.
- Kim GS, Min BD, Park SJ, Oh JH, Cho IH, Jang SJ, et al. 2013. Comparison of biofilm formed on stainless steel and copper pipe through the each process of water treatment plant. *Korean J. Microbiol.* **49**: 313-320.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 716-721.
- Kim WH, Lee S, Ahn TY. 2014. *Flaviumibacter cheonanensis* sp. nov., isolated from sediment of a shallow stream. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 3235-3239.
- Lee S, Choi B, Yi SM, Ko G. 2009. Characterization of microbial community during Asian dust events in Korea. *Sci. Total Environ.* **407**: 5308-5314.
- Lee S, Oh HW, Lee KH, Ahn TY. 2009. *Methylobacterium dankookense* sp. nov. isolated from drinking water. *J. Microbiol.* **47**: 716-720.
- Lee S, Weon HY, Han K, Ahn TY. 2012. *Flavobacterium dankookense* sp. nov., isolated from a freshwater reservoir and emended descriptions of *Flavobacterium cheonanense*, *F. chungnamense*, *F. koreense* and *F. aquatile*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 2378-2382.
- Leila S, Mohammad R, Mohammad-Zadeh M, Saadat M. 2013. Comparison of CHROMagar™ acinetobacter and conventional methods for isolation *Acinetobacter baumannii* from tracheal aspirates patients with ventilator-associated pneumonia (VAP). *Ann. Biol. Res.* **4**: 46-52.
- Nam YH, Ahn YC, Park SM, Cho MH, Seo JW, Yoon IK, et al. 2008. Comparison of chip-base real-time PCR and tube-base real-time PCR methods for detection of *B. cereus*. *J. Korean Chem. Soc.* **52**: 203-206.
- Rho GH, Nam HK. 1983. Studies on the influence of air-borne microbes on air pollution. *J. Gwangju Health* **8**: 27-35.
- Robbins CA, Swenson LJ, Nealley ML, Gots RE, Kelman BJ. 2000. Health effects of mycotoxins in indoor air. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **15**: 773-784.
- Seiler H, Wenning M, Scherer S. 2013. *Domibacillus robiginosus* gen. nov., sp. nov., isolated from a pharmaceutical clean room. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 2054-2061.
- Sharma A, Dhar SK, Prakash O, Vemuluri VR, Thite V, Shouche YS. 2014. Description of *Domibacillus indicus* sp. nov., isolated from ocean sediments and emended description of the genus *Domibacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**: 3010-3015.
- Shivaji S, Chaturvedi P, Suresh K, Reddy GSN, Dutt CBS, Wainwright M, et al. 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1465-1473.
- Steffen E, Axel G, Arne S, Martin E. 2006. Air sampling of *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi: Comparative performance of the Sartorius MD8 airport and the Merck MAS-100 portable bioaerosol sampler. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **210**: 733-739.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731-2739.
- Xu Z, Wu Y, Shen F, Chen Q, Tan M, Yao M. 2011. Bioaerosol science, technology, and engineering: past, present, and future. *Aero. Sci. Tech.* **45**: 1337-1349.