Microbiol. Biotechnol. Lett. (2016), 44(1), 84–88
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1510.10009
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

파이로시퀀싱 분석법을 이용한 주거 환경 중 거실과 화장실의 세균 특성

이시원, 정현미, 박응로*
국립환경과학원 상하수도연구과

Received: October 27, 2015 / Revised: January 8, 2016 / Accepted: January 8, 2016

Characteristics of Bacteria in the Living Room and Bathroom of a Residential Environment Using the Pyrosequencing Method

Siwon Lee, Hyen-Mi Chung, and Eung-Roh Park*
Water Supply & Sewerage Research Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Republic of Korea

In this study, bacterial diversity in the living room and bathroom of a residential environment was analyzed using the pyrosequencing method. There was no difference in the diversity index of bacteria between the 2 rooms; however, differences were noted in the composition of bacteria. The classes β-Proteobacteria and δ-Proteobacteria were found in the bathroom at higher abundances than in the living room. The phyla Acidobacteria, Chlorobi, Chloroflexi, Fusobacteria, Nitrospirae, and Planctomycetes were found in the bathroom, but not in the living room, indicating a broader range of bacteria. However, the living room showed a more diverse range of bacterial genera than the bathroom did. In both the living room and the bathroom, the genus *Methylobacterium* was dominant.

Keywords: **Bacterial diversity, bathroom, living room, pyrosequencing, residential environment**

최근 실내 공간에서 생활하는 시간이 늘어남에 따라 실내 공기 중 존재하는 미생물에 대한 공중보건학적 관심도 함께 증가하고 있다[4]. 실내 환경은 실외에 비해 공기의 순환이 제한적이고 자외선에 대한 노출이 적어서 공기 중에 존재하는 미생물이 상대적으로 장기간 생존 할 수 있는 특징이 있으며[12], 이들은 대부분 미세입자나 수증기에 부착된 상태인 바이오에어로졸 형태로 존재한다[16]. 바이오에어로졸 중 미생물은 인체 면역기능 저하 및 각종 호흡기 질환의 원인으로 작용하는 등 대부분 부정적 측면이 보고됨에 따라[2–6, 15, 20], 병원 환경, 요양 시설, 지하철 역사 및 학교 등 다중이용시설을 중심으로 연구가 수행되어 왔으나[1, 9, 12–14], 주거 환경에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

한편 바이오에어로졸 중 미생물에 대한 분석법은 국내, 국제표준화기구 및 미국 환경보호국 등에서도 표준화된 방법이 정해지지 않아 연구자가 목적에 맞게 적절한 방법을 선택해 왔다[16]. 지금까지 실내 환경에서 바이오에어로졸 중 미생물에 대한 연구들은 대부분 MAS-100 NT®(Merck, Germany) 또는 Andersen sampler 등으로 공기를 미생물 배지에 충돌시켜 세균 또는 곰팡이를 계수하거나 API 또는 Vitek 등의 kit를 사용하여 동정하는 연구들이 수행되어왔다[10, 13]. 그러나 충돌법은 실내 미생물 측정 시 약 10% 정도의 오차가 발생할 수 있고[23], 배양에 의존한 방법은 바이오에어로졸 중 존재하는 미생물 군집을 설명하는데 어려움이 있다. 또한 물이나 토양과 같은 매질에 비해 공기 중 미생물은 안정적인 상태를 유지하지 않고 시간 및 공간적 변화의 폭이 크므로[11], 일시적으로 채취한 충돌법으로 분석한 미생물 모니터링은 한계가 있다. 이러한 방법을 해결하기 위하여 필터를 활용하여 시료를 포집하고, 핵산을 추출한 후 cloning, denaturing gradient gel electrophoresis 또는 terminal-restriction fragment length polymorphism 등의 분석 방법이 적용되었으며[8], 최근에는 파이로시퀀싱 분석법이 많이 활용되고 있으나[21, 24], 주거 환경을 대상으로

***Corresponding author**
Tel: +82-32-560-8353, Fax: +82-32-563-7085
E-mail: erpark@korea.kr
© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

한 보고는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는, 파이로시퀀싱 분석법을 활용하여 주거 환경 중 생활 빈도가 높은 거실과 상대적으로 특이적 환경인 화장실을 선정하여 공기 중 세균의 다양성을 분석하였다.

실험에 사용된 장소는 2012년에 지어진 빌라 3층으로 실내 주거공간은 약 12평이었고, 독립되어 있는 방 2, 주방과 통합되어 있는 거실 및 화장실이 분리되어 있었다. 투룸형 빌라이지만 독립되어 있는 2개의 방과 거실은 문으로 공간에 대한 분리되어 있었고, 주방과 통하는 거실 사이에는 문이 없었으나 구조적으로 분리가 잘 되어 있는 형태였다. 화장실은 공간 분리가 지속적으로 이루어진 상태였으나, 시료 포집 장치를 설치한 후 추가적 공간 분리를 위하여 10분 후부터 시료를 포집하였다. 포집 시간 동안 외부 환기를 차단하였으며, 포집시간 동안 지속적으로 각 공간에 대한 분리가 이루어 졌다. 또한 사람에 의한 영향을 줄이기 위해 포집기기 설치 후 집을 비운 상태로 시료를 포집하였다. 시료 채취는 2014년 9월 24일 13시부터 15시 30분(2.5시간)까지 수행하였고, 2대의 Mini volume sampler PAS201(Airmetrics, USA)에 pore size 1 μm의 멸균된 Glass microfiber Filter/circles(GF/c; Whatman®, USA)를 각각 결합하여 분당 5 L의 속도로 동시에 포집하였다. 한편 휴대용 온습도계를 사용하여 시료 채취 전과 후 거실과 화장실에서 온습도의 평균값을 측정한 결과, 거실은 27.4°C, 61%였으며, 화장실은 26.8°C, 73%였다.

포집한 필터를 무균적으로 20–30 조각낸 후 0.033%의 Tween 80이 포함된 PBS 45 ml에 10분간 진탕하였으며, PowerWater® DNA Isolation Kit(UK)를 사용하여 total DNA를 추출하였다. 추출한 핵산에서 세균 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 27F(AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG)-518R(GTA TTA CCG CGG CTG CTG G)을 타겟프라이머로 사용하였으며, 마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 파이로시퀀싱 분석을 수행하였다. 또한 파이로시퀀싱 분석은 GS-FLX Titanium(Roche, Switzerland)을 사용하였으며, 분석은 GS-FLX 소프트웨어 3.0을 활용하여 데이터 프로세싱을 진행하였다.

거실과 화장실에서 각각 5,566개와 5,804개의 reads가 분석되었으며, rarefaction curve 분석 결과 미생물 다양성을

Table 1. Comparison of the species richness estimates in the living room and bathroom.

Diversity index	Living room	Bathroom
Number of reads	5,566	5,804
Number of OTUs*	45	40
Shannon index	2.97	2.96
Simpson index	0.10	0.09

*97% cut off.

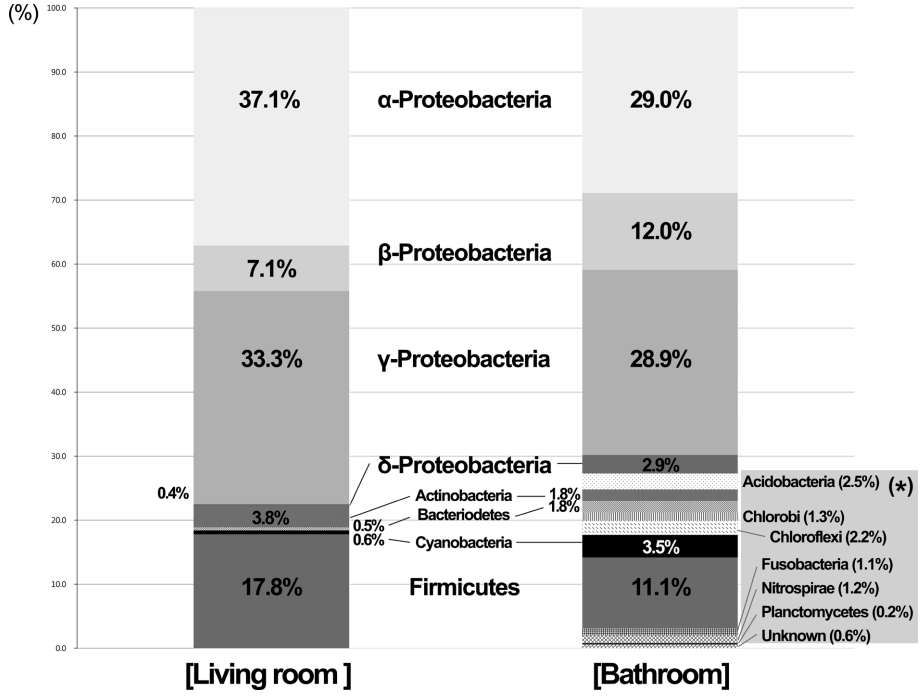

Fig. 1. Comparison of the bacterial diversity in the living room and bathroom at the phylum and class-level. *Phyla have been analyzed only in the bathroom.

설명하기에 적합한 것으로 분석되었다(data not shown). 우선 Shannon index는 거실(2.97)과 화장실(2.96), Simpson index는 거실(0.10)과 화장실(0.09)에서 차이가 없었으나, 97%에서 cut off한 operational taxonomic units(OTUs) 분석 결과 거실이 45 OTUs로 40 OTUs인 화장실에 비해 상대적으로 높게 나타났다(Table 1).

세균 다양성에 대한 pylum-level 분석 결과 거실(77.8%)과 화장실(72.8%) 모두 Proteobacteria문이 우점하였으나, 거실은 Firmicutes(17.8%), Actinobacteria(3.2%), Cyanobacteria (0.6%) 및 Bacteroidetes문(0.5%)로 나타났으며, 화장실은 Firmicutes(11.0%), Cyanobacteria(3.5%), Acidobacteria (2.5%), Chloroflexi(2.2%), Actinobacteria(1.8%), Bacteroidetes (1.8%), Chlorobi(1.3%), Nitrospirae(1.2%), Fusobacteria(1.1%), Unknown(0.6%) 및 Planctomycetes문(0.2%)의 순으로 나타났다(Fig. 1).

Class-level에서 분석해본 결과 α-Proteobacteria강 및 γ-Proteobacteria강은 거실이 화장실보다 약 8.1% 및 4.4% 높은 비율로 나타났으며, β-Proteobacteria강 및 δ-Proteobacteria강은 화장실이 거실보다 약 4.9, 2.5% 높게 분석되었다.

또한 genus-level의 분석 결과 거실과 화장실에서 모두 *Methylobacterium*속이 각각 25.0% 및 21.3%로 우점하였다. 거실에서는 *Acinetobacter*(11.2%), *Klebsiella*(8.7%), *Stenotrophomonas*(8.1%), *Alicyclobacillus*(8.0%), unknown (6.9%) 및 *Brevundimonas*(5.1%)의 순으로 나타났고, 나머지속은 모두 5.0% 미만으로 총 34개 속이 분석되었으며, 화장실에서는 unknown(14.0%), *Stenotrophomonas*(13.9%), *Acinetobacter*(9.5%), *Naxibacter*(8.6%) 및 *Alicyclobacillus* (7.9%)의 순이었고, 및 나머지는 모두 5.0% 미만으로 총 25개 속이 분석되었다(Table 1). 특히 *Klebsiella*와 *Brevundimonas* 속은 거실에서 높게 분석되었으며, *Naxibacter*, unknown 및 *Stenotrophomonas*속은 화장실에서 높게 분석되었다. 한편, 거실에서만 특징적으로 나타난 속은 다음과 같다; *Enterococcus* (3.4%), *Pelomonas*(1.7%), *Orbus*(1.4%), *Enterobacter*(1.2%), *Rhizobium*(1.1%), *Paracoccus*(1.0%), 1% 미만(*Sphingopyxis*, *Leucobacter*, *Rhodobacter*, *Janibacter*, *Streptococcus*, *Porphyrobacter*, *Pseudobutyrivibrio*, *Prevotella*, *Caulobacter*, *Sporolactobacillus*, *Bacillus* 및 *Streptomyces*). 또한 화장실에서만 특징적으로 나타난 속은 다음과 같다; *Filomicrobium* (2.0%), *Corynebacterium*(1.7%), *Candidatus* Chloracidobacterium(1.3%), *Edaphobacter*(1.2%), *Nitrospira*(1.2%), *Fusobacterium*(1.1%), 1% 미만(*Thiobacillus* 및 *Halomonas*) (Table 2).

거실과 화장실에서 공통적으로 우점한 *Methylobacterium* 속은 식물(잎표면과 뿌리), 음식(젓갈) 및 환경(토양, 민물, 호수저질토, 바닷물, 병원환경 및 먹는물) 등 다양한 환경에서 서식하는 빈영양성 세균으로[17], 국내에서도 먼지에서 분리된 사례가 있으며[22], 국외에서도 병원 공기와 샤워 커튼에서도 보고된 바 있었으나[7], 현재까지 인체에 대한 위험성은 보고된 바 없었다.

한편, 학교 등 국내 실내 환경에서 우점이 보고된 바 있는 *Micrococcus* spp.[10, 13]는 이번 연구에서는 분석되지 않았다. 또한 학교 실내 환경 중 그람음성 세균(16%) 보다 그람양성 세균(84%)의 비율이 높다고 보고된 바 있고[10], 학교 교실[그람양성 세균(62.5–88.2%), 그람음성 세균(10.3–29.2%)]과 복도[그람양성 세균(61.5–90.9%), 그람음성 세균(9.1–33.3%)]에서 모두 그람 양성세균이 높은 비율로 분석되었다. 그러나 주거 환경에서는 미 동정[거실(6.9%), 화장실(14.0%)]을 제외하고, 거실[그람양성 세균(19.7%), 그람음성 세균(73.3%)]과 화장실[그람양성 세균(13.7%), 그람음성 세균(71.0%)]에서 모두 그람음성 세균이 높은 비율로 나타났

Table 2. Comparison of the bacterial genera in the living room and bathroom.

Composition (genus-level, %)	Living room	Bathroom
Acinetobacter	11.2	9.5
Alicyclobacillus	8.0	7.9
Aquabacterium	0.6	2.5
Bosea	0.4	2.2
Brevundimonas	5.1	0.6
Clostridium	2.9	2.6
Enhydrobacter	0.7	1.1
Klebsiella	8.7	1.5
Leuconostoc	1.1	0.5
Methylobacterium	25.0	21.3
Naxibacter	1.3	8.6
Propionibacterium	1.4	0.1
Pseudomonas	0.3	0.9
Sphingomonas	1.6	2.5
Stenotrophomonas	8.1	13.9
Unknown	6.9	14.0
Only living room (%)		
Enterococcus (3.4), *Pelomonas* (1.7), *Orbus* (1.4), *Enterobacter* (1.2), *Rhizobium* (1.1), *Paracoccus* (1.0), *Bacillus*, *Caulobacter*, *Janibacter*, *Leucobacter*, *Porphyrobacter*, *Prevotella*, *Pseudobutyrivibrio*, *Rhodobacter*, *Sphingopyxis*, *Sporolactobacillus*, *Streptococcus* and *Streptomyces* (>1%)		
Only bathroom (%)		
Filomicrobium (2.0), *Corynebacterium* (1.7), *Candidatus* Chloracidobacterium (1.3), *Edaphobacter* (1.2), *Nitrospira* (1.2), *Fusobacterium* (1.1), *Halomonas* and *Thiobacillus* (>1%)		

다. Lee 등(2015)에 의하면, 실외 환경 유형에 대한 배양성 세균 분석 시 그람 양성인 *Bacillus* spp.가 높게 나타났으나[16], 파이로 시퀀싱 등 유전자를 기초로한 미생물 다양성 분석의 경우 *Bacillus* spp.의 유전자는 나타나지 않거나 또는 낮은 비율로 분석되었으며[19], 본 연구에서도 분석된 결과들이 간접적으로 설명되었다.

한편, Moon 등(2012)에 의하면 거실에 비해 화장실에서 상대적으로 높은 농도의 세균 수가 측정된 바 있다[18]. 본 연구에서 사용한 파이로시퀀싱은 배양이라는 특수한 조건을 주지 않고 직접적으로 그 공간에 존재하는 미생물에 대한 다양성을 설명하기에 적합한 방법이지만, 국립환경과학원 실내환경 부유 미생물에 관련된 고시 등에서 필요한 배양성 미생물 수를 설명할 수는 없었다. 또한 실질적으로 살아있는 세포인가에 대한 유무를 설명을 할 수 없는 분자생물학적 방법의 한계가 존재하므로, 장단점을 이용한 연구전략이 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 주거 환경 중 거실과 화장실을 대상으로 분자생물학적 세균 다양성을 비교하였다. 이번 연구는 실내 공간 중 미생물에 대한 분석 방법적인 측면 및 연구 결과는 일반 주거환경 중 세균 다양성에 대한 기초자료로 활용될 수 있을 것이라고 기대된다.

요 약

본 연구에서는 파이로시퀀싱 분석법을 이용하여 주거 환경 중 거실과 화장실의 세균 다양성을 분석하였다. 주거 환경 중 거실과 화장실에 존재하는 세균의 총 유전자량과 다양성 지수는 차이가 없었으나, 존재하는 세균의 종류에서는 차이가 나타났다. Phylum-level에서는 거실에서 나타나지 않은 Acidobacteria, Chlorobi, Chloroflexi, Fusobacteria, Nitrospirae 및 Planctomycetes문이 화장실 공기중에서 분석되어 상대적으로 넓은 영역의 세균 분포가 추정되었으며, class-level에서는 우점하는 Proteobacteria문 중 β-Proteobacteria와 δ-Proteobacteria강이 거실에 비해 화장실에서 높은 비율로 분석되었다. 한편 genus-level에서는 거실이 화장실에 비해 상대적으로 다양한 속이 분석되었으나, 모두 *Methylobacterium* 속이 우점하였으며 두 주거 환경에서 각각 특징적으로 분포하는 미생물이 존재하였다.

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

1. Chen PS, Li CS. 2008. Concentration profiles of airborne *Mycobacterium tuberculosis* in a hospital. *Aerosol Sci. Technol.* **42**: 194–200.
2. Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D. 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* **47**: 187–200.
3. Fung F, Hughson WG. 2003. Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **18**: 535–544.
4. Gravesen S. 2000. Microbiology on indoor air '99--what is new and interesting? An overview of selected papers presented in Edinburgh, August, 1999. *Indoor Air* **10**: 74–80.
5. 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.
6. Kellogg CA, Griffin DW. 2006. Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends Ecol. Evol.* **21**: 638–644.
7. Kelley ST, Gilbert JA. 2013. Studying the microbiology of the indoor environment. *Genome Biol.* **14**: 202–210.
8. Kim DH, Lee SH, Cho JC. 2008. Evaluation of various oligotrophic media for cultivation of previously uncultured soil bacteria. *Korean J. Microbiol.* **44**: 352–357.
9. Kim JH. 2010. Study on the distribution of bacteria and fungi in indoor air in subway station. Master thesis. Cheonan, Dankook University.
10. Kim N, Kim YR, Kim MK, Cho DW, Kim J. 2007. Isolation and characterization of airborne bacteria and fungi in indoor environment of elementary schools. *Korean J. Microbiol.* **43**: 193–200.
11. Kim MW. 2012. Assessment and quality control of indoor microbial parameters. *J. Korean Soc. Indoor Environ.* **9**: 161–171.
12. Kim SH, Kim YK. 2009. A study on microbial pollution of indoor air at elderly care facilities. *J. Acad. Indoor Technol.* **10**: 2485–2491.
13. Lee A, Kim N, Kim S, Kim J. 2005. Distribution and characteristics of airborne microorganisms in indoor environment of schools. *Korean J. Microbiol.* **41**: 188–194.
14. Lee CM, Kim YS, Lee TH, Park WS, Hong SC. 2004. Characterization of airborne bioaerosol concentration in public facilities. *J. Environ. Sci.* **13**: 215–222.
15. 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.
16. Lee S, Chung HM, Park SJ, Choe B, Kim JH, Lee BR, *et al.* 2015. Identification and phylogenetic analysis of culturable bacteria in the bioareosol from several environments. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**: 142–149.
17. Lee S, Oh HW, Lee KH, Ahn TY. 2009. *Methylobacterium dankookense* sp. nov., isolated from drinking water. *J. Microbiol.* **47**: 716–720.
18. Moon HJ, An KA, Choi MS. 2012. The status and caused of indoor airborne micro-organisms activities in residential buildings. *J. Korean Soc. Living Environ. Sys.* **19**: 669–675.
19. National Institute of Environmental Research. 2015. Study on the Microorganisms of Bioaerosol for Surroundiings(II). Research

report.
20. 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.
21. Wang X, Hu M, Xia Y, Wen X, Ding K. 2012. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 7042–7047.
22. Weon HY, Kim BY, Joa JH, Son JA, Song MH, Kwon SW, *et al.* 2008. *Methylobacterium iners* sp. nov. and *Methylobacterium aerolatum* sp. nov., isolated from air samples in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 93–96.
23. Yoo J, Jang SK, Seo SY, Youn TI, Kim HD. 2008. A study on error of the impaction method for indoor bioaerosol. Proceeding of the 47th Meeting of Korean Society for Atmospheric Environment.
24. Zhang T, Shao MF, Lin Y. 2012. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J.* **6**: 1137–1147.

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1510.10009