

국내 호소에서 남세균의 geosmin 생합성 유전자 분석을 위한 지표의 개발 및 유전자 염기서열 다양성 분석[§]

이재훈¹ · 유미나^{1,2} · 조영철^{1*} 

¹충북대학교 공과대학 환경공학과, ²국립환경과학원 한강물환경연구소

Development of molecular marker for detection of geosmin synthesis gene in cyanobacteria and analysis of gene sequence diversity in Korean reservoirs[§]

Jae-Hun Lee¹, Mi-Na Yu^{1,2}, and Young-Cheol Cho^{1*} 

¹Department of Environmental Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

²Han River Environment Research Center, National Institute of Environmental Research, Yangpyeong 12585, Gyeonggi, Republic of Korea

(Received August 3, 2023; Revised October 30, 2023; Accepted October 31, 2023)

Geosmin is a substance that causes an unpleasant earthy odor in drinking water and appears in water environments where cyanobacterial blooming occurs. In this study, PCR primers were designed to detect geosmin synthase gene of cyanobacteria, and their suitability was evaluated. The PCR primers were designed from the *geoA* sequences of the genera *Anabaena* and *Nostoc*. The designed primers were found to be suitable for selectively amplifying geosmin synthase when applied to geosmin-producing cyanobacteria from Korean reservoirs and environmental samples in which geosmin was detected. The sequence diversity of *geoA* was analyzed for samples collected from five points in Paldang and Daechung Reservoirs where geosmin was detected at high concentrations. Most of the clones were similar to *geoA* of the genus *Anabaena*, indicating that these cyanobacteria are the major producers of geosmin at these sites. The dominant clones differed by reservoir, and clones with different sequences were dominant at different time periods in Paldang Reservoir. To investigate the relationship between sequence differences of *geoA* and geosmin-producing ability, it is considered necessary to isolate and culture geosmin-

producing cyanobacteria from water samples. The results of this study can be used for developing a monitoring system through molecular methods that can detect the generation of odorous substances in raw water at an early stage.

Keywords: cyanobacteria, Daechung Reservoir, geosmin, Paldang Reservoir, PCR primer, sequence diversity

호소 내·외부로부터 오염물질의 유입에 의한 부영양화는 수자원 이용에 어려움을 일으키기도 하며 남세균의 과다증식(이하, 녹조)을 유발하기도 한다. 녹조의 발생은 수체의 착색 뿐 아니라 냄새물질을 발생시켜 음용수의 가치를 떨어뜨리기도 하며, 독소를 생산하는 남세균에 의한 녹조가 발생할 경우 인간이나 가축에 해를 끼치기도 한다(Oh *et al.*, 2022).

Geosmin (trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol)은 호소에서 발생하는 냄새물질 중 대표적인 것으로 남세균(*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Phormidium* 등), 방선균(*Actinomyces*, *Streptomyces* 등), 수생곰팡이(*Basidiobolus ranarum*), 또는 myxobacteria (*Nannocystis exedens*)에 의해 합성된다(Sinclair *et al.*, 2008). 이는 물에서 흙냄새를 나게 하고 10 ng/L 이하의 낮은 농도에도 후각에 감지가 가능하며, 음용수 이용 시 심미적으로 불쾌

*For correspondence. E-mail: choy@chungbuk.ac.kr;
Tel.: +82-43-261-3577; Fax: +82-43-264-2465

[§]Supplemental material for this article may be found at
<http://www.kjom.org/main.html>

감을 느끼게 하지만 인체에는 무해하다(Giglio et al., 2008; Mochida, 2009; Tunç et al., 2021).

우리나라에서는 1980년도부터 남세균에 의한 냄새물질의 발생이 보고되기 시작했으며, 2011년 겨울에 북한강 수계에서 *Anabaena spiroides*의 과다증식으로 인하여 고농도의 geosmin이 발생(삼봉리 지점에서 최대 3,934 ng/L)한 이후 냄새물질에 대한 민원이 지속적으로 발생하고 있다(You et al., 2013; Lee et al., 2020a, 2020b). 이러한 피해를 방지하기 위하여 환경부는 『먹는물 수질감시항목 운영 등에 관한 고시』를 통하여 geosmin과 2-MIB를 먹는물 수질감시항목으로 지정하여 시설규모 50,000 m³/day 이상인 정수장에서 이들의 농도를 주기적으로 모니터링하고 있다(Kim et al., 2015).

남세균에서 geosmin은 geosmin synthase (germacradienol synthase)에 의해 합성되며, 합성된 geosmin은 조체 내에 축적되었다가 남세균이 사멸하면 수체로 방출된다(Giglio et al., 2008). Geosmin은 용존성 물질로 약품-응집-침전-여과-소독을 기본공정으로 하는 일반적인 정수처리공정에서는 제거율이 매우 낮으며(Whelton and Dietrich, 2004; Lee et al., 2020b), 활성탄 흡착, 오존 산화 등의 고도정수처리공정을 통하여 제거해야 하므로 이를 도입하지 않은 정수장에서 geosmin 문제를 완전히 해결하기는 힘들다(Kim et al., 2009; Mustapha et al., 2021).

Geosmin은 남세균이 생산하는 간독소인 microcystins와 달리 독성이 없기 때문에 세계적으로 먹는 물에서 건강과 관련된 관리기준이나 규제기준이 설정되어 있지 않을 뿐 아니라(Giglio et al., 2008; Mochida, 2009; Lvova et al., 2020), 남세균 독소에 비해 연구 결과가 많지 않다. Geosmin에 대한 기존 연구는 주로 이의 분포, 생산 미생물의 종류, 정량법 및 이를 제거하기 위한 정수처리공정의 개발에 대해 수행되었으며(Ho et al., 2012; Antonopoulou et al., 2014; Callejón et al., 2016; Mustapha et al., 2021), 국내에서는 수환경에서 냄새물질의 분포, 정수처리공정에서 geosmin 제거 및 효율성을 평가하는 연구가 주로 이루어졌다(Son et al., 2009; Lee et al., 2013, 2020a; You et al., 2013; Han et al., 2015).

국외에서 geosmin의 생합성 대사 과정이나 이에 관여하는 효소 유전자에 대한 분자생물학적 연구가 매우 제한적으로 수행되었다(Giglio et al., 2008, 2011; Watson et al., 2016; Wang et al., 2019). 다수의 연구에서 geosmin synthase 유전자를 증폭할 수 있는 지표가 개발되었으나, 이들은 분리된 geosmin 생산 남세균의 geosmin synthase 유전자 염기서열 분석에 활용되었으며 환경시료에서 geosmin 생산 유전자의 염기서열 다양성을 분석한 연구는 많지 않다(Ludwig et al., 2007; Agger et al., 2008; Giglio et al., 2008). 국내에서는 방선균에서

geosmin 생합성에 관여하는 효소 유전자의 특성을 규명한 연구(Ghimire et al., 2008; Lee et al., 2011; Park et al., 2016)와 팔당호에서 분리된 *Anabaena circinalis*의 geosmin synthase의 염기서열 분석에 국한되어 있다(Kim et al., 2014, 2018). 팔당호에서 분리된 geosmin 생산 남세균에 대한 연구에서는 geosmin 생합성 유전자를 검출하여 생산 잠재성을 확인하였지만 우리나라 중 실정에 맞는 유전자 지표 개발에 관한 연구는 선행되지 않았다. 본 연구에서는 국내 수시료에서 남세균의 geosmin synthase 유전자를 검출할 수 있는 유전자 지표를 설계하고, 분리 남세균 및 환경 시료를 사용하여 이의 타당성을 검토하였으며, 국내 호수 시료에서 geosmin 생산 유전자의 염기서열 다양성을 분석하였다.

재료 및 방법

시험대상 남세균 및 배양

Geosmin 생산 유전자 증폭을 위한 primer의 적합성을 평가하기 위하여, geosmin을 생산하는 3종의 *Anabaena* 속 남세균과 1종의 비생산 남세균을 사용하였다. Geosmin 생산 남세균은 각각 대청호(*Anabaena* sp. CBE-07)와 강정고령보(*Anabaena* sp. CBE-17, *Anabaena* sp. CBE-28)에서 분리되었으며, 비생산종인 *Anabaena circinalis* NIER10002는 국립환경과학원에서 분양받아 사용하였다. 남세균의 배양은 BG-11 배지(Rippka, 1988)를 사용하였으며, 25°C의 조도배양기에서 14시간의 명기(~40 µE/m²/sec)와 10시간의 암기를 교대로 반복하여 배양하였다. Geosmin 생산 남세균의 geosmin 합성 여부는 배양액의 headspace를 고체상 미세추출법(solid-phase microextraction, SPME)으로 농축한 후, 가스크로마토그래피-질량분석법을 사용하여 분석(Sung et al., 2005)함으로써 확인하였다.

유전자 지표의 설계

Geosmin synthase 유전자를 증폭하기 위한 PCR primer는 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 내려 받은 geosmin synthase에서 *geoA*의 염기서열을 BioEdit Program을 사용하여 alignment를 한 후, 일치되는 염기서열로부터 설계하였다(Hall, 1999). 설계된 primer가 2차 구조를 생성하는지 여부를 확인하기 위하여, OligoCalc 프로그램을 사용하였다(Kibbe, 2007). 또한 기존에 개발된 PCR primer가 국내 호수 시료에서 geosmin 생산 남세균의 geosmin 생합성 유전자의 검출에 적합한지 알아보기 위하여 Giglio et al. (2008)이 발표한 primer (250F/971R)를 사용하여 PCR을 수행하였다(Table 1).

였다(Table 1; Oh, 2009). 증폭된 DNA의 DGGE 분석은 Ishii and Fukui (2001)와 Oh (2009)에서 제시한 방법에 따라 수행하였다. DGGE gel 제작 및 전기영동은 Universal Mutation Detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc.)을 사용하였다. Gel은 8% (w/v) polyacrylamide (acrylamide:bis-acrylamide = 37.5:1)로 제조하였으며, 변성제는 7 M urea와 40% (w/v) formamide를 사용하여 30~45%로 농도구배를 주었다.

염색 후 gel 상에서 우점하는 것으로 판단되는 band를 잘라낸 후, DNA를 추출하고, 16SCF/16SCR를 사용하여 PCR 증폭을 하였다. PCR 산물은 GeneAll Expin™ PCR SV (GeneAll Biotechnology Co.)로 정제하고, T-blunt vector (Solgent Co)

에 삽입하여 cloning을 한 후 염기서열 분석을 의뢰(Solgent Co.)하였다.

결과 및 고찰

유전자 지표의 설계

Geosmin 생합성에 관여하는 geosmin synthase는 두 가지 반응을 촉매하는 효소(bifunctional enzyme)로 N-말단은 전구체인 farnesyl diphosphate (FPP)의 고리화 반응을 통해 germacradienol을 합성하며, C-말단은 germacradienol로부터

Table 2. Number of geosmin synthase gene sequences by taxa deposited in GenBank database (Based on sequences available on May 2023)

Class & Genus	No. of sequences	Class & Genus	No. of sequences
Actinomycetes	528	Cyanophyceae	112
<i>Actinacidiphila</i>	1	<i>Anabaenopsis</i>	1
<i>Actinokineospora</i>	1	<i>Aphanizomenon</i>	6
<i>Actinomadura</i>	1	<i>Calothrix</i>	1
<i>Actinophytocola</i>	1	<i>Coelosphaerium</i>	2
<i>Actinopolyspora</i>	2	<i>Cylindrospermum</i>	1
<i>Actinosynnema</i>	2	<i>Dolichospermum (Anabaena)</i>	37
<i>Amycolatopsis</i>	23	<i>Geitlerinema</i>	2
<i>Embleya</i>	1	<i>Leptolyngbya</i>	3
<i>Frankia</i>	10	<i>Lyngbya</i>	1
<i>Kibdelosporangium</i>	2	<i>Microcoleus</i>	7
<i>Kitasatospora</i>	9	<i>Neowollea</i>	2
<i>Kribbella</i>	1	<i>Nodosilinea</i>	1
<i>Kutzneria</i>	1	<i>Nodularia</i>	2
<i>Lentzea</i>	2	<i>Nostoc</i>	29
<i>Microbispora</i>	1	<i>Phormidium</i>	4
<i>Nocardia</i>	6	<i>Planktothrix (Oscillatoria)</i>	7
<i>Nocardiopsis</i>	1	<i>Scytonema</i>	4
<i>Nonomuraea</i>	3	<i>Tolypothrix</i>	1
<i>Parafrankia</i>	2	<i>Tychonema</i>	1
<i>Planomonospora</i>	1	Myxococcia	6
<i>Prauserella</i>	4	<i>Archangium</i>	2
<i>Protofrankia</i>	2	<i>Cystobacter</i>	2
<i>Saccharomonospora</i>	2	<i>Melittangium</i>	2
<i>Saccharopolyspora</i>	1	Polyangia	9
<i>Saccharothrix</i>	5	<i>Nannocystis</i>	1
<i>Spongiactinospora</i>	1	<i>Sorangium</i>	8
<i>Streptomonospora</i>	1	Gammaproteobacteria	3
<i>Streptomyces</i>	437	<i>Nitrosococcus</i>	1
<i>Streptosporangium</i>	3	<i>Pseudomonas</i>	2
<i>Wenjunlia</i>	1		

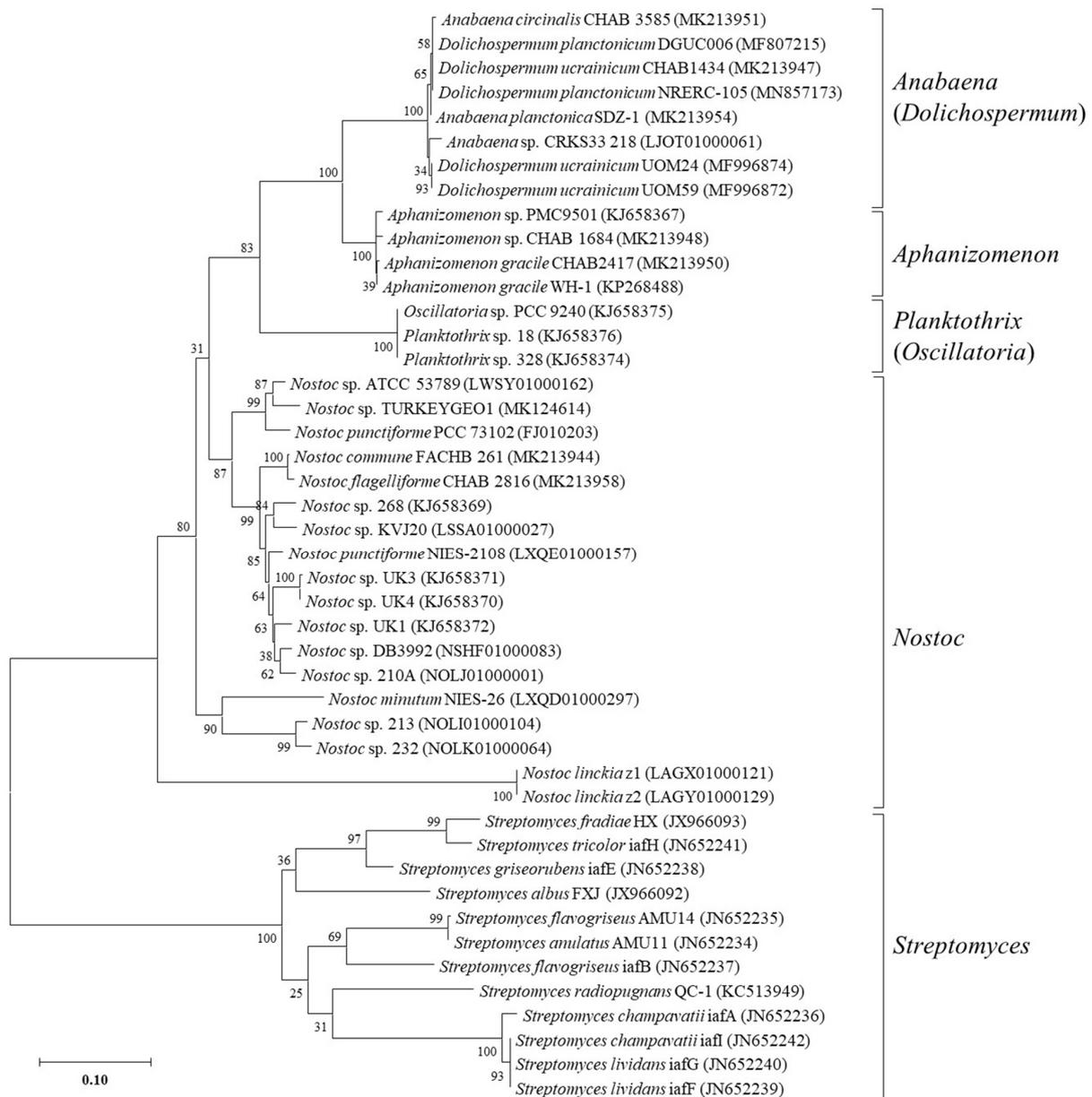


Fig. 1. Distance tree of sequences of *geoA* gene involved in geosmin synthesis. The tree was constructed by using the neighbor-joining method. Local bootstrap probabilities are indicated at nodes.

geosmin을 합성한다(Giglio *et al.*, 2008). GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 “geosmin synthase”로 검색한 결과 658개의 염기서열(2023년 5월 기준, uncultured bacterium 및 uncultured cyanobacterium 염기서열 제외)이 있었으며, 이들의 대부분은 phylum Actinomycetes (80.2%, 528개)에 속한 세균의 것이었다. 남세균(phylum Cyanophyceae)의 경우에는 112개의 염기서열이 검색되었으며, *Dolichospermum* (*Anabaena*, 37개), *Nostoc* (29개), *Planktothrix* (*Oscillatoria*, 7개), *Microcoleus* (7개), *Aphanizomenon* (6개) 속에 속한 남세균이 주로 차지하

였고, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Nodularia* 속의 염기서열도 일부 발표되었다(Table 2). 검색된 geosmin synthase의 염기서열 다양성을 분석한 결과, *Streptomyces* spp.와 남세균의 염기서열 차이가 큰 것으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 환경 시료로부터 geosmin 생산 남세균을 검출하기 위하여 이들 유전자에 특이적인 primer의 개발이 필요할 것으로 판단되었다.

선행 연구에서 남세균의 geosmin synthase를 검출하기 위하여 개발된 primer (250F/971R)의 경우, *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (ATCC 29133)의 geosmin synthase 염기서열로

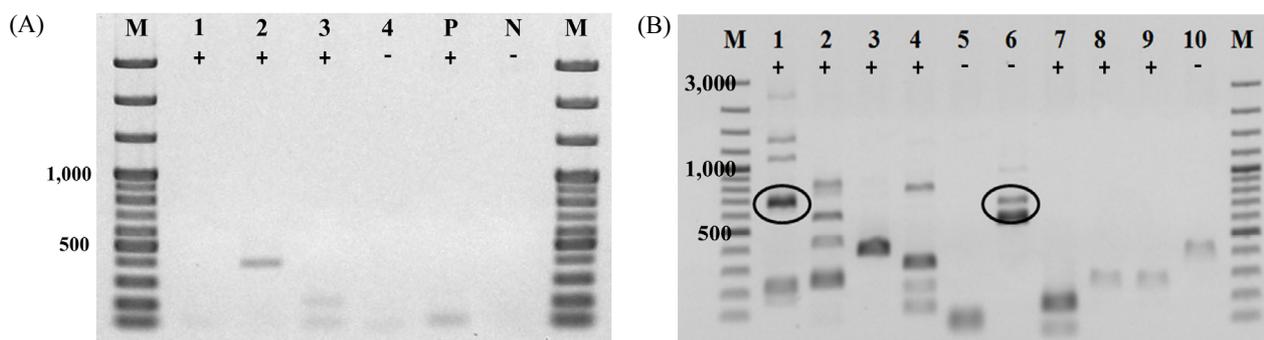


Fig. 2. Gel image of results from PCR amplification with the 250F/917R primers for geosmin synthase gene of cyanobacteria. The +/- signs in the images indicate whether or not geosmin is detected, respectively. (A) Lanes: M, size marker; 1, *Anabaena* sp. CBE-07; 2, *Anabaena* sp. CBE-17; 3, *Anabaena* sp. CBE-28; 4, *Anabaena circinalis* NIER10002; P, positive control, environmental sample taken from the Daechung Reservoir on Jun. 13, 2011 in which high level of geosmin was detected; N, no template negative control. (B) Lanes: M, size marker; 1-4, environmental samples taken from Han River basin on Jul. 1, 2011; 5, samples from the Boryeong Reservoir on Sep. 16, 2011; 6-9, samples from the Daechung Reservoir on Sep 17, 2010 (lane 6) and Jun. 13, 2011 (lanes 7-9); 10, no template negative control.

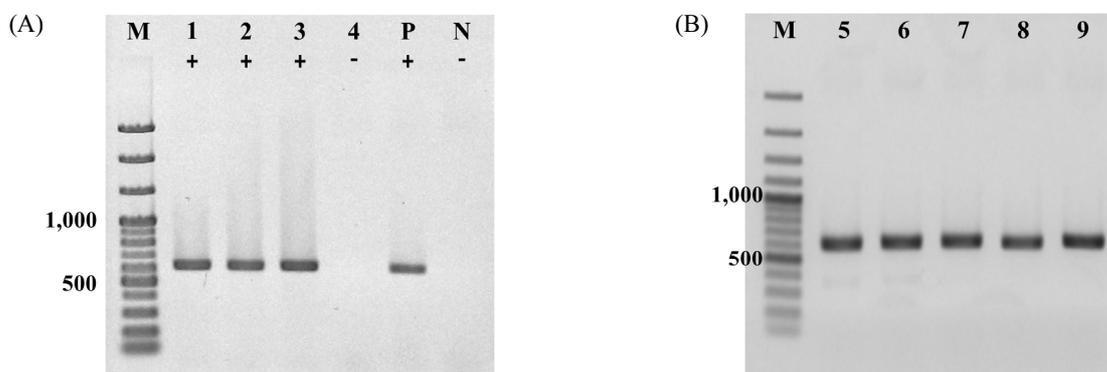


Fig. 3. Gel image of results from PCR amplification with the GA792F/GA1409R primers for geosmin synthase gene of cyanobacteria (A) and of environmental samples (B). (A) The +/- signs above the images indicate whether or not geosmin is detected, respectively. Lanes: M, size marker; 1, *Anabaena* sp. CBE-07; 2, *Anabaena* sp. CBE-17; 3, *Anabaena* sp. CBE-28; 4, *Anabaena circinalis* NIER10002; P, positive control, environmental sample taken from the Daechung Reservoir on Jun. 13, 2011 in which high level of geosmin was detected; N, no template negative control. (B) Samples taken from Cheongpyeong (PD-CP; lane 5) and Hwado Water Intake Tower (PD-WD; lane 6) on Nov. 25, 2011, and Yangsuri (PD-YS, lane 7) on Aug. 06, 2012 in Paldang Reservoir, and from Chusori (DC-CS, lane 8) and Seohwacheon-Wetland (DC-WL, lane 9) in Daechung Reservoir on Jun. 13, 2011 and on Oct. 26, 2011, respectively.

부터 설계된 것으로 743 bp 크기의 PCR 산물을 생산한다 (Table 1; Giglio *et al.*, 2008). 이 primer는 geosmin을 생산하는 *Phormidium*, *Anabaena*, *Pseudanabaena*, *Geitlerinema* 속 남세균의 geosmin 생산 유전자를 증폭할 수 있기 때문에, 환경시료 및 분리 남세균에서 geosmin 생산 유전자를 검출하기 위한 목적으로 널리 사용되고 있다 (Giglio *et al.*, 2008; Auffret *et al.*, 2011; Anuar *et al.*, 2017; Davis, 2019; Shardlow, 2021).

국내 대청호와 낙동강에서 분리된 3종의 geosmin 생산 남세균에 대하여 250F/917R을 사용한 PCR을 수행한 결과 PCR 산물이 관찰되지 않았다 (Fig. 2A). 또한 고농도의 geosmin이 측정된 대청호 3개 지점(2011년 6월 13일)과 한강수계의 4개 지점(2011년 7월 1일)에서 채취한 시료를 대상으로 PCR을 수

행한 결과, 7월 1일에 양평에서 채취한 시료와 geosmin이 검출되지 않은 대청호 시료(2010년 9월 17일)에서 약 700 bp 크기의 PCR 산물이 관찰되었으나, 다른 시료에서는 예상되는 크기의 산물이 관찰되지 않았으며, 일부 시료에서는 다수의 band가 관찰되었다 (Fig. 2B). 이와 같이 geosmin이 검출된 시료에서 PCR 증폭이 되지 않은 것은 250F/917R primer가 *Nostoc* 속 남세균으로부터 설계되었으며, *Nostoc* spp.의 geosmin 생합성 유전자의 염기서열이 국내 호소 시료에서 geosmin 발생의 주요 원인 남세균으로 알려진 *Anabaena* 속의 유전자와 상이하기 때문인 것으로 판단된다 (Fig. 1; You *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2020b).

본 연구에서는 국내 호소에서 geosmin 생산에 관여하는 남

세균을 검출하는데 적합한 primer를 설계하였다. 국내 호소에서 *Anabaena* 속 남세균의 우점과 geosmin의 발생의 상관성이 높다는 것을 고려(Lee *et al.*, 2020b)하여, primer 설계 시 *Anabaena* spp.의 geosmin synthase 염기서열을 활용하였다. GenBank에 등록된 3종의 남세균(*Anabaena ucrainica* CHAB 2155, *Anabaena ucrainica* CHAB1432 및 *Nostoc punctiforme* PCC73102)의 geosmin synthase의 유전자 염기서열(HQ404996, HQ404997, FJ010202, FJ010203)을 내려 받아 primer (GA792F/GA1409R)를 설계하였으며, 이의 적합성을 평가하였다(Table 1).

설계된 primer와 국내 호소에서 분리된 3종의 geosmin 생산 남세균과 geosmin이 검출된 대청호 시료(2011년 6월 13일)로부터 추출된 DNA를 사용하여 PCR을 수행한 결과, 예상된 크기의 PCR 산물이 관찰되었다(Fig. 3A). 또한 geosmin이 검출된 팔당호의 3개 시료와 대청호의 2개 시료에서도 PCR 산물이 검출되었다(Fig. 3B). 이에 따라 본 연구에서 개발된 primer가 국내 호소에서 남세균의 geosmin synthase를 검출하기에 적합한 유전자 지표임을 확인하였다.

Geosmin 생산 유전자의 염기서열 다양성

대청호 및 팔당호에서 geosmin이 생산되는 시기에 채취된 시료를 대상으로 geosmin 생산 유전자에 대한 primer를 사용

하여 PCR을 수행한 후, 이들 지점에 서식하는 geosmin 생산 남세균의 geosmin synthase 유전자의 염기서열 다양성을 분석하였다(Supplementary data Figs. S1-S5).

팔당호의 3개 지점에서 채취된 시료에서 분석된 284개의 clone은 모두 *Anabaena* spp.의 *geoA* 유전자와 유사한 염기서열임을 확인하였다(Fig. 4). 이들 시료는 각각 2011년의 겨울과 2012년의 여름에 각각 다른 지점에서 채취된 것으로, 계절적, 지점별 차이가 있음에도 불구하고 geosmin의 주 생산자가 *Anabaena* 속 남세균으로 동일하였다. 선행 연구에 따르면 *Anabaena* 속 남세균은 25°C 이상의 수온에서 최적 성장을 하는 것으로 알려져 있다(Robarts and Zohary, 1987; Lee and Park, 2002). 하지만 영양염류의 농도가 높을 때에는 수온이 낮은 겨울철에도 과다증식이 일어나는 것으로 보고되고 있으며(You *et al.*, 2013), 또한 기후 변화에 따른 수온 상승으로 인해 팔당호에서 클로로필-*a*의 농도가 지속적으로 높아지는 것으로 알려져 있다(Park *et al.*, 2013).

팔당호에서 *geoA* 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 청평(PD-CP)과 화도 취수탑(PD-WD) 지점에서는 동일한 염기서열을 가지는 clone (OR032775와 OR032823)이 해당 지점에서 분석된 clone의 각각 48.9%, 58.3%로 가장 높은 비율을 차지하였다. 양수리(PD-YS) 지점에서는 OR032861이 38.3%

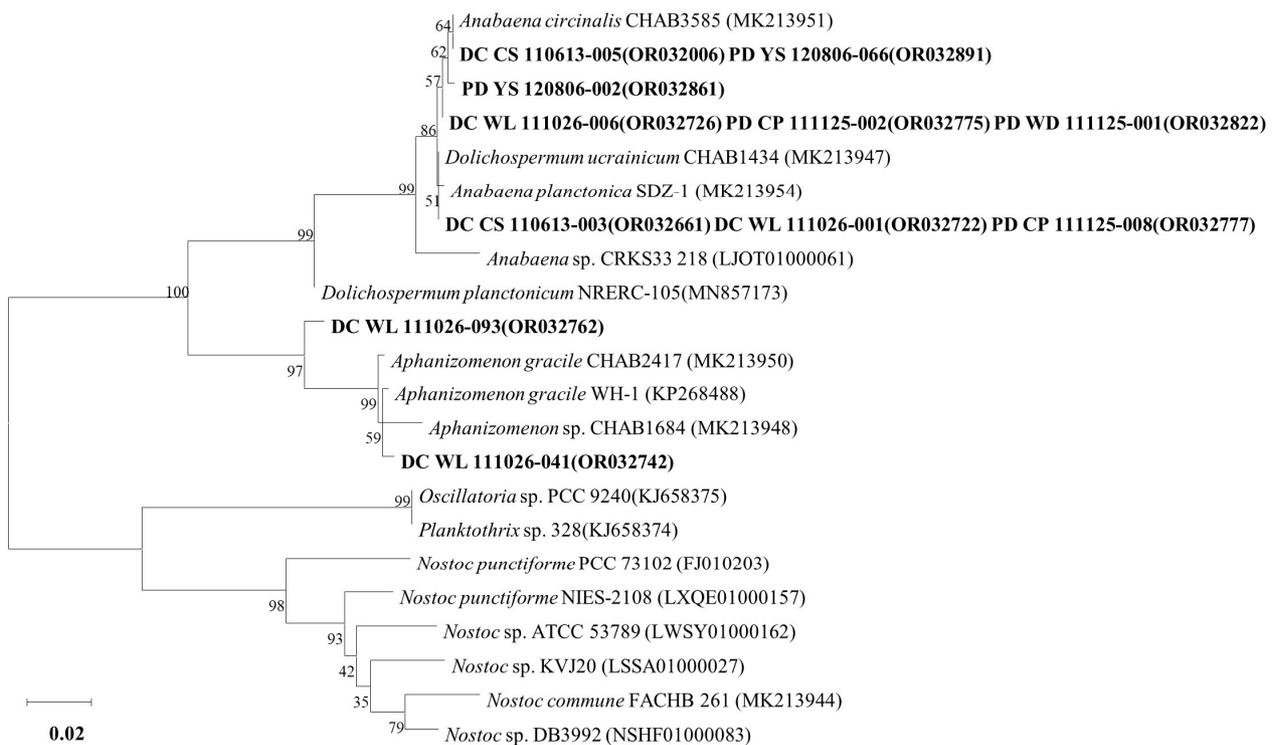


Fig. 4. Phylogenetic tree based on the partial sequences of *geoA* in geosmin synthesis found in Paldang and Daechung Reservoirs. The tree was constructed by using the neighbor-joining method. Local bootstrap probabilities are indicated at nodes.

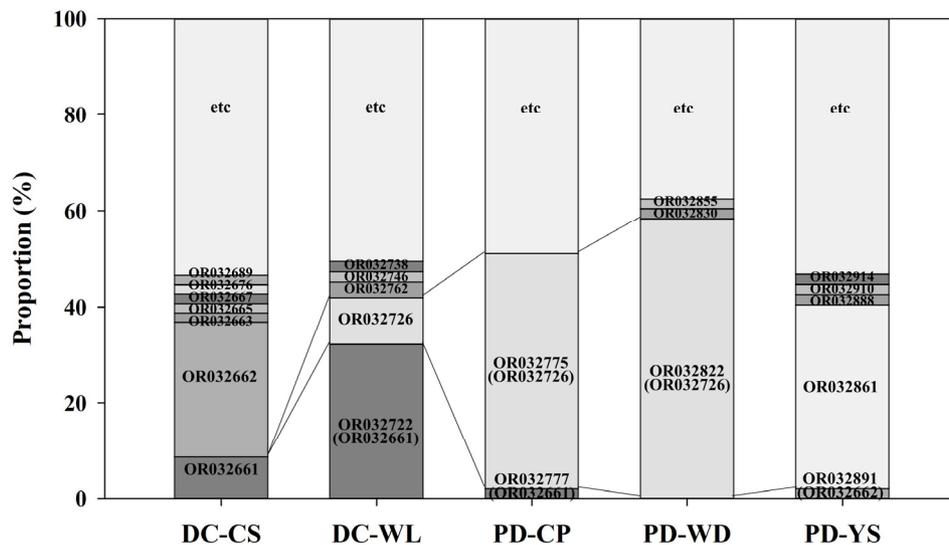


Fig. 5. Distribution dynamics of *geoA* gene in Paldang and Daechung Reservoirs. The name on the bars indicates GenBank accession number of clones. The “etc” indicates the sum of clones showing unique sequences.

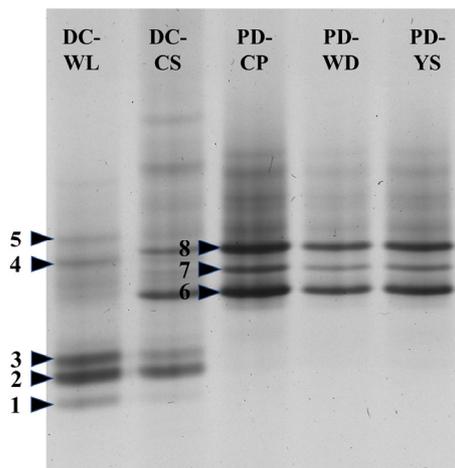


Fig. 6. DGGE pattern of samples taken from Paldang and Daechung Reservoirs. For site description, see ‘Materials and Methods’ section. The DGGE gels had a 30 to 45% denaturant concentration gradient, and only the part of the gel containing bands is shown.

를 차지하였다(Fig. 5). PD-CP와 PD-WD에서 우점한 clone (OR032775와 OR032823)은 PD-YS 지점에서는 나타나지 않았으며, 마찬가지로 PD-YS에서 우점한 clone (OR032861)은 PD-CP와 PD-WD에서 나타나지 않았다. 팔당호의 세 지점 중 PD-CP와 PD-WD는 30 km 이상 이격되어 있으며, PD-WD와 PD-YS는 약 5 km 떨어져 있음에도 PD-CP와 PD-WD에서 동일한 염기서열의 clone이 우점한 반면, PD-YS에는 다른 종류의 clone이 우점하였다. 이러한 결과는 팔당호에서 우점하는 geosmin 생산 남세균의 종류는 지점 보다는 수온에 따라 결정됨을 의미한다. 팔당호는 호소의 체류시간이 평균 5.1일로 짧

Table 3. Identities of bands obtained from DGGE analysis of samples taken from Daechung and Paldang Reservoirs

Band ^a	Cyanobacteria	GenBank Accession No.	Similarity
1	<i>Microcystis viridis</i> CC9	AB035552	1.000
2	<i>Microcystis ichthyoblabe</i> TC24	AB035550	0.993
3	<i>Microcystis viridis</i> CC9	AB035552	0.987
4	Uncultured bacterium NN12	JN869081	1.000
5	<i>Pseudanabaena</i> sp. 0tu30s18	AM259268	0.993
6	<i>Dolichospermum affine</i> 04-44	FN691907	0.987
7	<i>Anabaena lemmermannii</i> 202A2	AJ293104	1.000
8	<i>Anabaena lemmermannii</i> 202A2	AJ293104	0.987

^a For band information, see Fig. 6.

고, 평균 수심이 6.55 m로 성층 발달이 미약한 대표적인 하천형 호소이다(Kim et al., 2002, 2009). 따라서 조류대발생이 일어날 경우 특정 조류가 우점할 가능성이 높으며 이들의 분포와 개체수의 변화는 매우 짧은 기간에 변화할 수 있다(Kim et al., 2009). 따라서 지점이 다르다고 하더라도 같은 시기에 채집된 시료에서 우점하는 종류가 유사하기 때문인 것으로 판단된다.

DGGE법을 사용하여 각 지점에서 우점하는 남세균의 군집 구조를 분석하였다. 팔당호의 세 지점에서 band pattern은 매우 유사하게 나타났으며, 모든 지점에서 *Dolichospermum affine* 04-44 (FN691907)와 *Anabaena lemmermannii* 202A2 (AJ293104)와 염기서열 유사성이 높은 남세균이 우점하는 것으로 나타났다(Fig. 6; Table 3). 대형호와 달리 *Microcystis* 속 남세균은 관찰되지 않았다. 결론적으로 팔당호의 세 지점에서

채취된 시료에서 남세균의 16S rRNA 유전자 특이적인 DGGE primer를 사용한 군집구조 분석 결과, 매우 유사한 군집 구조를 나타내었으며, *Anabaena* 속 남세균이 우점하는 것으로 나타났다. Geosmin 생산 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 모든 clone이 *Anabaena* 속 남세균의 *geoA* 유전자와 상동성이 큰 것으로 나타났으나, 8월에 채집된 PD-YS 시료와 11월에 채집된 PD-CP와 PD-WD 시료에서 우점하는 유전자 종류가 상이하였으며, 이러한 차이는 시료 채취 시기에 따른 것이라는 가능성이 제시되었다.

대청호는 추소리와 서화천 생태습지에서 채취된 시료에서 *geoA* 유전자 염기서열을 각각 94개 분석한 결과, 습지(DC-WL)에서 관찰된 2개의 clone (OR032762, OR032742)를 제외하고 *Anabaena* 속 남세균의 *geoA*와 매우 유사한 것으로 관찰되었다(Fig. 4). OR032762와 OR032742는 *Dolichospermum* 또는 *Aphanizomenon* 속 남세균의 *geoA*와 유사한 염기서열을 나타내었다. OR032762는 *Dolichospermum heterosporum* TAC447 (CP099464) 및 *Aphanizomenon gracile* WH-1 (KP268488)와 각각 97.2% 일치하였으며, OR032742도 이들 군주의 염기서열과 각각 99.6%, 99.5% 일치하는 것으로 나타났다. 따라서 대청호 지점에서는 팔당호와 달리 *Aphanizomenon* 속 남세균에 의한 geosmin 생산 가능성이 있으나, 주로 *Anabaena* 속 남세균에 의해 주로 생산되는 것으로 파악된다.

추소리(DC-CS) 지점에서는 OR032662 (28.2%)와 OR032661 (8.7%)이 우점하였다. OR032661은 습지(DC-WL) 시료에서도 우점(32.3%)하였으며, 팔당호의 청평(PD-CP) 시료(2.1%, 2/94)에서도 관찰되었고, PD-WD와 PD-YS에서도 각각 1개의 clone이 관찰되었다. 따라서 OR032661은 본 연구에서 분석된 5개 지점에서 모두 관찰된 clone이다. OR032662의 경우는 대청호 지점인 DC-WL과 PD-CP, PD-WD에서 나타나지 않았으며, PD-YS에서 2개의 clone (OR032891; 2.1%)이 검출되었다. DC-CS와 PD-YS에서는 하절기인 6월과 8월에 시료가 채취되었으며, 나머지 지점은 가을인 10월과 11월에 채취된 시료이다. 따라서 DC-CS에서 우점한 clone (OR032662)은 주로 상대적으로 수온이 높은 시기에 나타나는 것으로 판단된다.

DGGE를 이용하여 남세균 군집구조를 분석한 결과, 대청호의 두 시료에서는 주로 *Microcystis* 속 남세균이 우점하였으나, 팔당호와 달리 두 지점의 군집구조에 큰 차이가 있었다. 대청호는 길이가 길고 굽어진 지형적인 특성으로 인해 정체수역을 형성하게 되며 시공간에 따라 우점종이 수역별로 다양한 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2011). 추소리 시료에서는 *Microcystis* 속 이외에 팔당호 시료에서 나타났던 *Dolichospermum* (*Anabaena*) 속 남세균도 같이 우점하는 경향을 나타내었다. 습지 시료(DC-

WL)에서는 *Microcystis* 속 이외에 중국 Taihu Lake에서 관찰된 uncultured bacterium clone NN12 (JN869081)와 *Pseudanabaena* 속 남세균(AM259268)과 유사한 종류가 우점하는 것으로 관찰되었다. *Pseudanabaena* 속 남세균은 *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*과 더불어 주요한 geosmin 생산 남세균으로 알려져 있으나(Suurnäkki et al., 2015; Senavirathna and Jayasekara, 2023), *Pseudanabaena* 속 남세균에 대한 geosmin synthase 유전자 염기서열은 아직까지 알려지지 않았기 때문에(Table 2), *Anabaena*의 geosmin synthase와 유사한지는 알 수 없다. 서화천 생태습지 시료에서 분석된 *geoA* 유전자의 염기서열 대부분이 *Anabaena* 속 남세균의 *geoA* 유전자와 매우 유사한 것으로 나왔으며(Supplementary data Fig. S2), DGGE 분석 결과 *Anabaena* 속 남세균 보다는 *Pseudanabaena* 속 남세균의 밀도가 높은 것으로 나타났으므로, 서화천 생태습지 시료에서 분석된 clone이 *Pseudanabaena* 속 남세균의 *geoA* 유전자 염기서열일 가능성이 있을 것으로 판단된다. 이를 확인하기 위하여 환경시료로부터 geosmin 생산 *Pseudanabaena* 속 남세균의 분리 배양을 통해 *geoA* 유전자 염기서열의 분석이 필요할 것으로 보인다.

팔당호 및 대청호에서 냄새물질인 geosmin의 생합성 유전자 염기서열의 다양성을 분석한 결과, 대부분의 clone들이 *Anabaena* 속 남세균과 유사한 염기서열을 나타내어 이들 지역에서 geosmin의 주생산자는 *Anabaena* 속 남세균인 것으로 판단된다. 다만 각 지점에서 우점하는 clone은 호수별로 상이하였으며, 팔당호에서는 시기별로 다른 염기서열을 가진 clone이 우점하였다. 이러한 염기서열의 차이와 geosmin synthase의 geosmin 생산능과의 관련성을 규명하기 위하여, 수시료로부터 geosmin 생산 남세균을 분리 배양하여 확인할 필요가 있다.

본 연구에서 개발된 남세균의 geosmin synthase에 대한 PCR primer는 국내 호소에서 geosmin 생산 남세균을 검출하는데 적합한 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 상수원수에서 냄새물질 발생을 조기 감지할 수 있는 분자생물학적 방법을 통한 모니터링 시스템의 개발에 활용 가능할 것으로 사료된다.

적 요

Geosmin은 먹는물에서 불쾌한 흙냄새를 유발하는 물질로 남세균 과다증식이 일어난 수환경에서 나타나는 대표적인 냄새물질이다. 본 연구에서는 국내 호소에서 남세균의 geosmin 생합성 유전자를 검출할 수 있는 PCR primer를 설계하고 이의

적합성을 평가하였다. *Anabaena*와 *Nostoc* 속 남세균의 *geoA* 유전자 염기서열로부터 설계된 PCR primer를 사용하여, 국내 호소에서 분리된 geosmin 생산 남세균과 geosmin이 검출된 환경시료에 적용한 결과, 설계된 primer가 geosmin synthase의 선택적인 증폭에 적합함을 확인하였다. Geosmin이 고농도로 검출된 팔당호 및 대청호의 5개 지점에서 채취된 시료를 대상으로 *geoA*의 염기서열 다양성을 분석한 결과, 대부분의 clone이 *Anabaena* 속 남세균의 *geoA*와 유사하였으며, 이에 따라 이들 지점에서 *Anabaena* 속 남세균이 geosmin의 주요 생산자인 것으로 판단된다. 우점하는 clone은 호수별로 상이하였으며, 팔당호에서는 시기별로 다른 염기서열을 가진 clone이 우점하였다. 이러한 염기서열의 차이와 geosmin 생산능과의 관련성을 규명하기 위하여, 수시료로부터 geosmin 생산 남세균을 분리 배양하여 확인할 필요가 있을 것으로 판단된다. 본 연구의 결과는 상수원수에서 냄새물질 발생을 조기 감지할 수 있는 분자생물학적 방법을 통한 모니터링 시스템의 개발에 활용 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgments

본 연구는 환경부의 「폐자원에너지재활용 전문인력 양성 사업」의 지원으로 수행되었습니다.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to report.

References

- Agger SA, Lopez-Gallego F, Høye TR, and Schmidt-Dannert C. 2008. Identification of sesquiterpene synthases from *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and *Nostoc* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **190**, 6084–6096.
- Antonopoulou M, Evgenidou E, Lambropoulou D, and Konstantinou I. 2014. A review on advanced oxidation processes for the removal of taste and odor compounds from aqueous media. *Water Res.* **53**, 215–234.
- Anuar NSS, Kassim AA, Utsumi M, Iwamoto K, Goto M, Shimizu K, Othman N, Zakaria Z, Sugiura N, and Hara H. 2017. Characterization of musty odor-producing actinomycetes from tropics and effects of temperature on the production of musty odor compounds. *Microbes Environ.* **32**, 352–357.
- Auffret M, Pilote A, Proulx É, Proulx D, Vandenberg G, and Villemur R. 2011. Establishment of a real-time PCR method for quantification of geosmin-producing *Streptomyces* spp. in recirculating aquaculture systems. *Water Res.* **45**, 6753–6762.
- Callejón RM, Ubeda C, Ríos-Reina R, Morales ML, and Troncoso AM. 2016. Recent developments in the analysis of musty odour compounds in water and wine: a review. *J. Chromatogr. A* **1428**, 72–85.
- Davis SB. 2019. Master thesis. A new qPCR assay to detect geosmin-producing cyanobacteria. Brigham Young University, Provo, Utah, USA.
- Ghimire GP, Oh TJ, Lee HC, Kim BG, and Sohng JK. 2008. Cloning and functional characterization of the germacradienol synthase (*sptrp13*) from *Streptomyces peuceitius* ATCC 27952. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1216–1220.
- Giglio S, Jiang J, Saint CP, Cane DE, and Monis PT. 2008. Isolation and characterization of the gene associated with geosmin production in cyanobacteria. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 8027–8032.
- Giglio S, Saint CP, and Monis PT. 2011. Expression of the geosmin synthase gene in the cyanobacterium *Anabaena circinalis* AWQC318 1. *J. Phycol.* **47**, 1338–1343.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98.
- Han J, Hur J, Kim K, Lee J, Park W, Lee J, and Her N. 2015. A study of efficient removal of 2-methylisoborneol and geosmin by pulsed ultraviolet and ultrasound. *J. Soil Groundw. Environ.* **20**, 1–7.
- Ho L, Sawade E, and Newcombe G. 2012. Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal—a review. *Water Res.* **46**, 1536–1548.
- Ishii K and Fukui M. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3753–3755.
- Kibbe WA. 2007. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**, W43–W46.
- Kim KY, Khan JB, Choi IC, Hong SH, Lee JB, Lee SH, and Lee JJ. 2015. Temporal and spatial distribution of geosmin and 2-MIB in the Daecheong Reservoir. *Korean J. Environ. Agric.* **34**, 14–20.
- Kim J, Lee S, Bang H, and Hwang S. 2009. Characteristics of algae occurrence in Lake Paldang. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* **31**, 325–331.
- Kim K, Lim BJ, You KA, Park MH, Park JH, Kim BH, and Hwang SJ. 2014. Identification and analysis of geosmin production potential of anabaena stain isolated from North Han River using genetic methods. *Korean J. Ecol. Environ.* **47**, 342–349.
- Kim JM, Park JD, Noh HR, and Han MS. 2002. Changes of seasonal and vertical water quality in Soyang and Paldang river-reservoir system, Korea. *Korean J. Ecol. Environ.* **35**, 10–20.
- Kim K, Park C, Yoon Y, and Hwang SJ. 2018. Harmful cyanobacterial material production in the North Han River (South Korea): Genetic potential and temperature-dependent properties. *Int. J.*

- Environ. Res. Public Health* **15**, 444.
- Lee ES, Kim YN, Kim SB, Jung JS, Cha YS, and Kim BS.** 2020a. Distribution and characteristics of geosmin and 2-MIB-producing actinobacteria in the Han River, Korea. *Water Supply* **20**, 1975–1987.
- Lee GC, Kim YS, Kim M, Oh SA, Choi I, Choi J, Park JG, Chong CK, Kim YY, Lee K, et al.** 2011. Presence, molecular characteristics and geosmin producing ability of *Actinomycetes* isolated from South Korean terrestrial and aquatic environments. *Water Sci. Technol.* **63**, 2745–2751.
- Lee I, Lee KL, Lim TH, Park JJ, and Cheon S.** 2013. Determination of geosmin and 2-MIB in Nakdong River using headspace solid phase microextraction and GC-MS. *Anal. Sci. Technol.* **26**, 326–332.
- Lee CS and Park HG.** 2002. A study on odor and taste from Nam River. *J. Environ. Sci. Int.* **11**, 399–403.
- Lee JE, Youn SJ, Byeon M, and Yu SJ.** 2020b. Occurrence of cyanobacteria, actinomycetes, and geosmin in drinking water reservoir in Korea: a case study from an algal bloom in 2012. *Water Supply* **20**, 1862–1870.
- Ludwig F, Medger A, Börnick H, Opitz M, Lang K, Göttfert M, and Röske I.** 2007. Identification and expression analyses of putative sesquiterpene synthase genes in *Phormidium* sp. and prevalence of *geoA*-like genes in a drinking water reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6988–6993.
- Lvova L, Jahatspanian I, Mattoso LH, Correa DS, Oleneva E, Legin A, Di Natale C, and Paolesse R.** 2020. Potentiometric e-tongue system for geosmin/isoborneol presence monitoring in drinkable water. *Sensors* **20**, 821.
- Mochida KYO.** 2009. Evaluation of the cytotoxicity of geosmin and 2-methylisoborneol using cultured human, monkey, and dog cells. *Biocontrol Sci.* **14**, 35–38.
- Mustapha S, Tijani JO, Ndamitso MM, Abdulkareem AS, Shuaib DT, and Mohammed AK.** 2021. A critical review on geosmin and 2-methylisoborneol in water: sources, effects, detection, and removal techniques. *Environ. Monit. Assess* **193**, 204.
- Oh KH.** 2009. Ph.D. thesis. Screening of conserved DNA sequences in microcystin-producing cyanobacteria and application of the sequences to monitor microcystins in water reservoirs. Seoul National University, Seoul, Republic of Korea.
- Oh KH, Beak KM, Shin Y, and Cho YC.** 2022. Assessing the microcystins concentration through optimized protein phosphatase inhibition assay in environmental samples. *J. Microbiol.* **60**, 602–609.
- Oh KH, Jeong DH, Shin SH, and Cho YC.** 2012. Simultaneous quantification of cyanobacteria and *Microcystis* spp. using real-time PCR. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 248–255.
- Park HK, Cho KH, Won DH, Lee J, Kong DS, and Jung DI.** 2013. Ecosystem responses to climate change in a large on-river reservoir, Lake Paldang, Korea. *Clim. Change* **120**, 477–489.
- Park TJ, Yu MN, Kim HS, Cho HS, Hwang MY, Yang HJ, Lee JC, Lee JK, and Kim SJ.** 2016. Characteristics of actinomycetes producing geosmin in Paldang Lake, Korea. *Desalination Water Treat.* **57**, 888–899.
- Rippka R.** 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**, 3–27.
- Robarts RD and Zohary T.** 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* **21**, 391–399.
- Senavirathna MDHJ and Jayasekara MADD.** 2023. Temporal variation of 2-MIB and geosmin production by *Pseudanabaena galeata* and *Phormidium ambiguum* exposed to high-intensity light. *Water Environ. Res.* **95**, e10834.
- Shardlow T.** 2021. Master thesis. Identification and characterization of toxic cyanobacteria in two forested maritime watersheds in North America. University of Waterloo, Ontario, Canada.
- Sinclair JL, Hall S, Berkman JA, Boyer G, Burkholder J, Burns J, Carmichael W, DuFour A, Frazier W, Morton SL, et al.** 2008. Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms workgroup report, pp. 45–103. In Hudnell, HK. (ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 619. Springer, New York, NY, USA.
- Son DM, Son HJ, Lee HJ, and Kang LS.** 2009. Removal of geosmin and 2-MIB using biological activated carbon process. *J. Korean Soc. Water Wastewater* **23**, 189–198.
- Sung YH, Li TY, and Huang SD.** 2005. Analysis of earthy and musty odors in water samples by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Talanta* **65**, 518–524.
- Suurnäkki S, Gomez-Saez GV, Rantala-Ylinen A, Jokela J, Fewer DP, and Sivonen K.** 2015. Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds. *Water Res.* **68**, 56–66.
- Tamura K, Stecher G, and Kumar S.** 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **38**, 3022–3027.
- Tunç Z, Akçalan R, Köker L, and Albay M.** 2021. The first report of geosmin and 2-methylisoborneol producer cyanobacteria from Turkish freshwaters. *Trakya Univ. J. Nat. Sci.* **22**, 163–171.
- Wang Z, Song G, Li Y, Yu G, Hou X, Gan Z, and Li R.** 2019. The diversity, origin, and evolutionary analysis of geosmin synthase gene in cyanobacteria. *Sci. Total Environ.* **689**, 789–796.
- Watson SB, Monis P, Baker P, and Giglio S.** 2016. Biochemistry and genetics of taste-and odor-producing cyanobacteria. *Harmful Algae* **54**, 112–127.
- Whelton AJ and Dietrich AM.** 2004. Relationship between intensity, concentration, and temperature for drinking water odorants. *Water Res.* **38**, 1604–1614.
- You KA, Byeon MS, Youn SJ, Hwang SJ, and Rhew DH.** 2013. Growth characteristics of blue-green algae (*Anabaena spiroides*) causing tastes and odors in the North-Han River, Korea. *Korean J. Ecol. Environ.* **46**, 135–144.