

북한강 수계 방선균 유래 이취미물질(geosmin, 2-MIB)의 분자유전학적 분석

성승혁¹ · 김건희² · 황순진² · 오영택³ · 박석효⁴ · 이수곤⁴ · 정혜인⁴ · 한송이^{1*} 

¹목원대학교 미생물생명공학과, ²건국대학교 휴먼엔에코케어 센터, ³국립낙동강생물자원관 산업화지원센터,
⁴한국수자원공사 한강유역관리처

Molecular genetic analysis of Actinobacterial odorous substances (geosmin, 2-MIB) in North Han River watershed

Seung Hyeok Soung¹, Keonhee Kim², Soon-jin Hwang², Young Taek Oh³, Seokhyo Park⁴, Soogon Lee⁴, Hyein Jeong⁴, and Song-lh Han^{1*} 

¹Department of Microbial Biotechnology, Mokwon University, Daejeon 35349, Republic of Korea

²Department of Environmental Health, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea

³Bio-Resource Industrialization Center, Nakdonggang national Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Republic of Korea

⁴Hangang River Basin Management Department, K-water, Gwacheon 13841, Republic of Korea

(Received November 18, 2022; Revised December 26, 2022; Accepted December 27, 2022)

This study examined the distribution of Actinobacterial odorous substances (geosmin, 2-methylisoborneol), emitting moldy and earthy odors from water and sediment in the North-Han River watershed. The potential and expression levels of the Actinobacterial geosmin and 2-MIB synthase gene were confirmed using an *Actinobacteria*-specific primer. The distribution of the *Actinobacteria* was confirmed to be $1.04\text{--}1.79 \times 10^4$ copies/ml in water and $2.9 \times 10^3\text{--}4 \times 10^{15}$ copies/g in sediment of the North-Han River watershed. The distribution of the odors synthase gene by *Actinobacteria* was confirmed to be $1.05\text{--}3.98 \times 10^{13}$ copies/ml(g), the odors synthase expression level in *Actinobacteria* was confirmed to be $0.21\text{--}2.67 \times 10^8$ copies/ml(g), and the gene expression level was found to vary in proportion to the gene potential. Furthermore, the odors synthase genes in sediment were $10^2\text{--}10^{14}$ times higher than in water.

Keywords: *Actinobacteria*, 2-MIB, geosmin, North Han River, odor

수생태계에서 곰팡이 냄새와 흙냄새를 유발하는 이취미 물질은 수돗물 음용 기피의 주원인으로 국내와 국외에서도 큰

환경 문제로서 주목을 받고 있다. 대표적인 이취미 물질인 geosmin과 2-MIB는 방선균과 남조류 등에서 유래한 이취미 물질로 보고되었다(Gerber and Lechevalier, 1965; Medsker *et al.*, 1969; Bentley and Meganathan, 1981).

방선균에 의한 이취미 물질 생산은 이취미 물질 생합성과 관련된 유전자 존재 여부와 그 종류에 따라서 결정된다. 통상적인 배양법은 방선균을 식별하기까지 5~7일가량의 기간이 소요되고 노동력의 소모가 많으며, 배양되지 않는 균에 대한 평가가 되지 않는 단점이 있다. 이러한 배양법의 단점을 보완할 수 있는 방법으로 qPCR과 NGS 등 다양한 신속 검출 기법의 개발이 지속적으로 이루어지고 있다(Chon *et al.*, 2010).

이취미 물질과 다른 유해물질을 형성하는 생물종의 현장 분포와 거동을 연구하기 위해 metagenomic DNA를 이용하기 시작하였다(Martins and Vasconcelos, 2011). 현재까지 33개 geosmin의 생합성 유전자(*geoA* gene, *gys1* gene)가 알려져 있으며(NCBI Resource Coordinators, 2020; Schoch *et al.*, 2020), geosmin 합성 유전자 검출을 위한 primer들이 개발되어 보고되었고 미국에서도 저수지를 대상으로 geosmin 합성 유전자 모니터링을 수행한 바 있다(Auffret *et al.*, 2011; Tsao *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Lukassen *et al.*, 2017; John *et al.*, 2018). 2-MIB 합성 유전자의 경우, geosmin 합성 유전자 정보

*For correspondence. E-mail: h1882@mokwon.ac.kr;
Tel.: +82-42-829-7554; Fax: +82-42-829-7550

와 마찬가지로 남조류와 방선균의 주요 발생종에 대한 2-MIB 합성 유전자 정보가 보고된 바 있다(NCBI Resource Coordinators, 2020; Schoch *et al.*, 2020). 유전자 기반의 분석을 통해 수층 또는 퇴적층 내 방선균 유래 이취미 물질 생합성 유전자를 신속하게 탐색하여 방선균의 이취미 물질 발생 기여도를 확인할 수 있다.

국내에서는 남조류를 대상으로 2-MIB 합성에 관여하는 *mibC* 유전자의 탐색 및 정량분석을 수행한 바 있으나(Kim, 2018), 방선균의 2-MIB 합성 유전자를 정량 탐색하는 primer에 대한 보고는 전무한 실정이다. 본 연구에서는 북한강 수계 내 metagenomic DNA를 활용하여 방선균 특이적인 이취미 물질 합성 유전자의 정량 PCR primer를 새롭게 제안하고 이를 활용해서 이취미 물질을 합성하는 방선균의 분포를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

시료채취

북한강 수계 내 방선균의 이취미물질 생성 유전자의 분포를 조사하기 위해 2020년 1월부터 2021년 10월까지 매월 의암, 청평, 삼봉 그리고 팔당수역까지 총 12개 본류 지점에서 수층 그리고 퇴적층 시료를 각각 채취하였다(Fig. 1). 수층은 반돈(Van Dorn) 채수기를 이용하였고, 퇴적층은 grab sampler를 이용하여 채취하였다. 채취한 각 시료는 250 ml 멸균 bottle에 담아 실험실로 운반하였다.

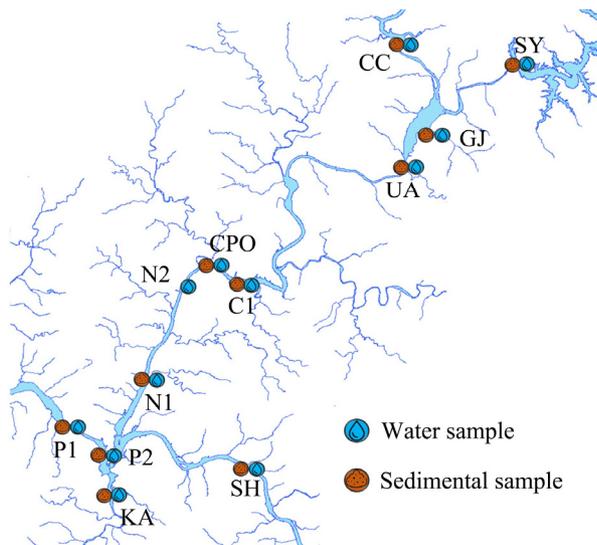


Fig. 1. Map showing sampling sites in the North Han River.

Metagenomic DNA 추출

북한강 수계로부터 DNA 추출을 위한 전처리는 수층시료 50 ml를 0.2 μ m PC membrane (Isopore)을 이용하여 세포를 필터에 농축하였고, 퇴적층 시료는 1 g 정량하였다. 수층과 퇴적층 시료 내 DNA 추출은 DNeasy power soil kit (Qiagen)를 사용하여 추출하였다. 북한강 수계로부터 추출된 DNA는 1.2% agarose (Bioneer), 100V, 25 min 조건으로 전기영동(Mupid-EXu system, TaKaRa)하여 추출 여부를 확인하였다. 추출된 DNA의 농도 측정은 Nano drop colibri spectrophotometer (Titertek-Berthold, wave length:260 nm)를 이용하여 측정하였다.

방선균 군집의 다양성 분석

북한강 수계 이취미 물질 생성 미생물 다양성 확인을 위하여 환경기초조사사업에서 고농도의 이취미물질이 발생한 2019년도 공지천 퇴적층 시료를 선정하였다(K-water, 2019). 퇴적층 시료 1 g을 정량 후 DNA를 추출하여 이를 주형으로 세균의 V1과 V3 hyper variable regions의 16S rRNA 유전자 증폭을 위해 primer 9F (5'-XACGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 541R (5'-XACWTTACCGCGGCTGCTGG-3')을 이용하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel (Bioneer) 전기영동을 통하여 약 500 bp 크기의 밴드를 확인한 후 Qiaquick gel extraction kit (Qiagen)로 정제하였다. 유전자 서열 분석은 CJ Bioscience Inc.에 의뢰하여 GS Junior Sequencing System (Roche)을 사용하여 실시하였다. 해독된 염기서열은 평균 스코어 25 이상, 300 bp 이상인 것만을 대상으로 프라이머 및 바코드 서열을 제거하여 최종 염기서열을 획득하였으며, Chimera 염기서열은 UCHIME (Edgar, 2010)를 사용하여 탐색 후 제거하였다. 분석한 16S rRNA 염기서열의 microbiome taxonomic profiling은 CJ Bioscience Inc.의 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>)를 통해 확인하였다(Yoon *et al.*, 2017). 염기서열의 operational taxonomic units (OTUs)는 CD-HIT (Fu *et al.*, 2012)을 사용하였으며, UCLUST (Edgar *et al.*, 2011)를 사용하여 97% 염기서열 유사도를 기준으로 각 염기서열을 clustering 하였다.

방선균 특이 geosmin과 2-MIB 합성 유전자 primer 제작

이취미 물질(geosmin, 2-MIB)생성 방선균의 탐색을 위하여 방선균 특이 16S rRNA gene primer와 방선균 유래 geosmin과 2-MIB 합성 유전자 primer를 합성하였다. Primer 제작을 위해 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 보고된 16S

Table 1. PCR primers for detection of Actinobacterial 16S rRNA gene and odors (geosmin and 2-MIB) synthesis gene

Gene	Putative function	Primers	Sequences (5'→3')	Reference
16S rRNA		16S- Actino F	TCG GGC AGG CTG TAG CG	This study
		16S- Actino R	GCA GTC TCC TGT GAG T	
geoA	Geosmin synthase	Amgeo F	GAG TAC ATC GAG ATG CGC CGC AA	This study
		Amgeo R	GAG AAG AGG TCG TTG CGC AGG TG	
MIBs	2-MIB synthase	MIB F2	GAC TGC TAC TGC GAG GAC CAC G	This study
		MIB R2	TCG GGC AGG CTG TAG CG	

rRNA 유전자와 geosmin과 2-MIB 합성 유전자의 각 염기서열을 주형으로 Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)를 이용하여 16-23 bp의 primer를 제작하였다(Table 1). 합성된 primer의 적합성평가를 실시하고자 이취미물질을 생성한다고 보고된 방선균 표준균주 *Streptomyces koyangensis* KACC 20561^T, *S. coelicolor* KACC 20100^T, *S. griseus* KACC 20084^T, *Kitasatospora setae* KACC 20032^T, *S. fulvissimus* KACC 14681^T, 북한강 수계에서 분리된 방선균 3균주와 음성대조구로 이취미물질 생산 조류 *Pseudanabaena cinerea*와 *E. coli*를 대상으로 PCR 증폭을 실시하고 본 실험에 사용하였다.

북한강 수계 DNA 내 방선균 정량

북한강 수계로부터 분리된 metagenomic DNA 내 방선균의 정량을 위해 본 연구에서 제작한 16S rRNA primer F/R을 사용하여 방선균의 16S rRNA 유전자를 qPCR 분석하였다(Table 1). 북한강 수계로부터 분리된 metagenomic DNA를 주형으로 DNA 5 µl에 16S-Act forward primer 2 µl, 16S-Act reverse primer 2 µl, 2X GreenStar Master Mix (Bioneer) 10 µl, 제균수 1 µl를 0.2 ml PCR tube에 넣고 혼합하였다. 정량 qPCR 분석은 CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)을 사용하였으며, qPCR 조건은 95°C에서 5분간 반응 후, 95°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 30초간 40회 반복하였으며 annealing 단계에서 형광 값을 측정하였다.

방선균 유래 geosmin과 2-MIB 합성 유전자의 qPCR 분석

방선균 유래 geosmin과 2-MIB 합성 유전자 탐색을 위해 qPCR 분석을 실시하였다. 북한강 수계로부터 추출된 DNA를 주형으로 geosmin 합성 유전자의 탐색을 위해 본 연구에서 제작된 Am geo forward primer와 Am geo reverse primer를 이용하였으며, 2-MIB 합성 유전자 탐색을 위해 mib F2 forward primer와 mib R2 reverse primer를 이용하였다(Table 1). PCR

반응을 위한 조성은 DNA 5 µl에 각 primer 2 µl, 2X GreenStar Master Mix (Bioneer) 10 µl, 제균수 1 µl를 0.2 ml PCR tube에 넣고 혼합하였다. qPCR 조건은 95°C에서 5분간 반응 후, 95°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 30초간 40회 반복하였으며 annealing 단계에서 형광 값을 측정하였다.

Metagenomic RNA 추출

북한강 수계로부터 RNA 추출을 위해 수층시료 50 ml를 0.2 µm PC membrane (Isopore)을 이용하여 여과하고 퇴적층 시료는 1 g 정량 후 HiGene Total RNA Prep kit (Biofact)를 이용하여 추출하였다. 북한강 수계로부터 추출된 RNA의 농도 측정에는 Nano drop colibri spectrophotometer (Titertek-Berthold, wave length: 260 nm)를 이용하여 측정하였다.

방선균 유래 geosmin과 2-MIB 유전자의 발현량 분석

방선균 유래 geosmin과 2-MIB 합성 유전자의 발현량 측정에는 CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)을 사용하여 분석을 실시하였다. 북한강 수계에서 추출된 RNA를 주형으로 geosmin 합성 유전자의 탐색을 위해 Am geo forward primer와 Am geo reverse primer를 이용하였으며, 2-MIB 합성 유전자 탐색을 위해 mib F2 forward primer와 mib R2 reverse primer를 이용하였다(Table 1). 추출된 RNA를 대상으로 발현량 분석을 위해 주형 DNA (Complementary DNA: cDNA) 합성 RT (Reverse Transcription)-PCR은 2X RT Pre-Mix kit (Biofact Co.)를 사용하였으며 2단계로 나누어 수행하였다. RNA template, Oligo-d(T) 20 (50 µM), Random hexamer (50 µM), Sequence-specific primer (15 µM), Nuclease free-water를 혼합하여 상온에서 5분 동안 반응하였다. 이후 50°C에서 30분 동안 반응한 후 95°C에서 5분 동안 열을 가하여 RTase를 비활성하여 주형DNA를 합성하였다. 합성된 주형DNA는 이취미 물질 합성 유전자 탐색과 동일한 primer와 동일한 증폭 조건으로 분석하였다.

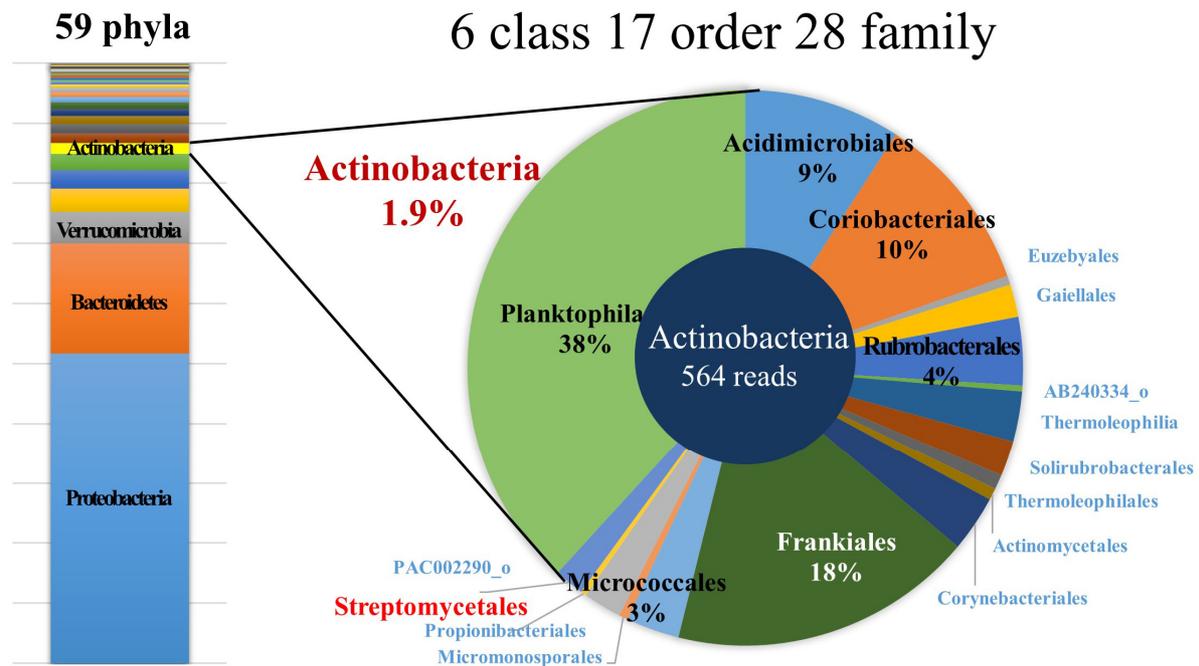


Fig. 2. The taxonomic composition of the bacterial community in Gong-Ji Cheon sediment.

결과 및 고찰

북한강 수계 내 방선균 군집 다양성 확인을 위한 NGS 분석

북한강 수계 공지천 퇴적층 시료의 DNA를 pyrosequencing 분석하여 세균 염기서열을 총 30,350개 얻었으며, 이들 염기서열은 총 3,401 OTUs, 종 풍부도(Chao1 richness)는 3432.24 그리고 다양성 지수(Shannon index)는 7.07로 확인되었다. 세균 염기서열의 계통분석을 실시한 결과, 전체 59개 문(phylum)으로 확인되었으며 *Actinobacteria* 계통군은 전체 세균 군집의 1.86%를 차지하였다. 이들 *Actinobacteria* 계통군 6강 17목 28과로 분류되었으며, *Plantophiles* (38%), *Frankiales* (18%), *Coriobacteriales* (10%) 그리고 *Acidimicrobiales* (9%)가 *Actinobacteria*의 주요 분류군으로 확인되었다(Fig. 2).

공지천 퇴적층 내 전체 방선균의 38%를 차지하는 우점 방선균 계통군인 *Planktophila* 목은 담수 부유성세균(Bacterioplankton)의 우점 분류군 중 하나로 보고된 바 있으나, 현재까지 순수 배양되지 못한 계통군으로 알려져 있다(Jezbera *et al.*, 2009). 반면, 현재 배양되어 LPS (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature)에 보고된 방선균 군집의 21.8%를 차지하는 *Streptomyces* 속은 공지천 퇴적층 내 전체 방선균 군집의 0.002%에 불과한 것으로 확인되었다. Geosmin과 2-MIB를 생성한다고 보고된 대표적인 방선균 *Streptomycetaceae*와 *Micromonosporaceae*의 비율은 전체 방선균의 약 0.005%로

매우 낮은 비율을 나타내었다. 본 연구에서 분석한 공지천 퇴적층 내 방선균 염기서열은 총 564 reads로 방선균 군집에 대한 다양성을 모두 반영하기에는 한계가 있었다. 이취미 물질 생성 방선균 군집의 다양성 및 계통학적 특성을 확인하기 위해서는 배양과 더불어 방선균 특이 primer를 적용하거나 더 많은 OTUs를 분석한 분자유전학적 해석이 필요하다고 판단되었다.

방선균 특이 primer의 적합성 평가

본 연구에서 제작한 방선균 특이 16S rRNA 유전자 primer와 방선균 유래 geosmin과 2-MIB 합성 유전자 primer의 유효성을 확인하기 위하여 방선균 표준균주 *S. koyangensis* KACC 20561^T, *S. coelicolor* KACC 20100^T, *S. griseus* KACC 20084^T, *Kitasatospora setae* KACC 20032^T 그리고 *S. fulvissimus* KACC 146815^T 균주와 북한강 수계에서 분리된 방선균 3균주를 대상으로 PCR 증폭을 실시하였다. 방선균 특이적인 16S rRNA 유전자 증폭을 위한 16S-Actino primer는 약 890 bp의 증폭산물이 확인되었으며, geosmin과 2-MIB 합성 유전자 증폭을 위한 Am geo primer와 MIB F2/R2 primer는 각각 약 167 bp와 980 bp로 8균주 모두에서 성공적으로 PCR 증폭이 되었다(Fig. 3). 반면, 이취미물질 생산 남조류 *Pseudanabaena cinerea*와 *E. coli*는 PCR 증폭되지 않아 제작된 primer는 방선균에 특이적인 것으로 판단되었다.

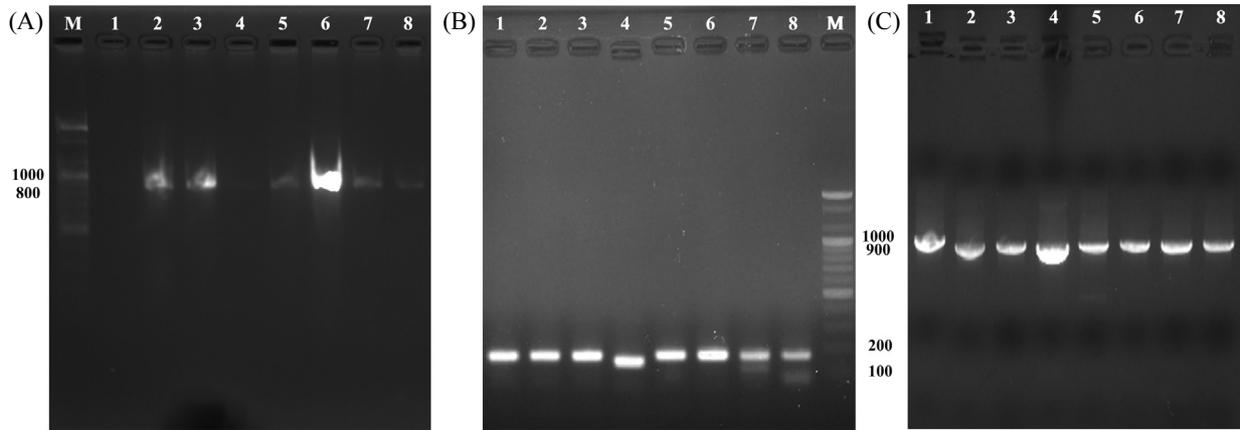


Fig. 3. PCR amplification of gene fragments of 16S rRNA and odors (geosmin, 2-MIB) synthase from *Actinobacteria*. PCR was carried out with primers. (A) 16S rRNA gene, (B) AM geo F/R (geosmin synthase gene), (C) mib F2/R2 (2-MIB synthase gene). Lanes: 1, *S. equi* KACC 20561^T; 2, *S. coelicolor* KACC 20100^T; 3, *S. griseus* KACC 20084^T; 4, *Kitasatospora setae* KACC 20032^T; 5, *S. fulvissimus* KACC 14681^T; 6, *Streptomyces* sp. 008; 7, *Streptomyces* sp. 004; 8, *Streptomyces* sp. 001; M, 100 bp size marker (Bioneer).

북한강 수계 내 방선균 정량

북한강 수계 내 방선균은 수층에서 $1.04\sim 1.79 \times 10^4$ copies/ml의 농도로 나타났으며, 평균 3.23×10^2 copies/ml 농도로 확인되었다. 퇴적층의 경우 $2.9 \times 10^3\sim 4 \times 10^{15}$ copies/g의 농도로 나타났으며, 평균 6.99×10^{13} copies/g의 농도로 확인되었다. 북한강 수계의 방선균 copy 수는 퇴적층이 수층보다 약 $10^2\sim 10^{14}$ 배 더 높은 copy 수를 나타냈다(Fig. 4).

방선균은 수계에 존재하면서 이취미 물질(geosmin, 2-MIB) 생성에 많은 기여를 하고 있다(Denisova *et al.*, 1999). 호주 Queensland 남동부의 강과 저수지에서 *Streptomyces* 속 특이 primer를 사용하여 qPCR 분석 결과, *Streptomyces*는 수심 35~40 m를 제외한 모든 위치에서 검출되었으며, 표층수에서 평균 2.25×10^2 cell/L 그리고 수심 8.5 m 깊이에서 최대 7.75×10^5 cell/L로 검출된 바 있다(Jørgensen *et al.*, 2016). 북한강 수계 수층의 평균 방선균 16S rRNA 유전자 copy 수는 $3.23 \times$

10^5 copies/L로 검출되어 수 환경 내 방선균군집은 수층과 표층 등에 폭넓게 분포하고 있는 것으로 판단되었다.

북한강 수층의 방선균 유래 geosmin과 2-MIB 합성 유전자 분석

본 연구에서 제작한 방선균의 geosmin과 2-MIB 합성 유전자 primer (Table 1)를 이용하여 2020년 1월부터 2021년 10월 까지 북한강 수계 분류 지점의 수층과 퇴적층에서 이취미 물질(geosmin, 2-MIB)을 합성하는 방선균의 분포와 거동을 파악하였다. 북한강 수계 수층에서 방선균 유래 geosmin 합성 유전자(*geoA*)의 분포는 북한강 전체 지점에서 평균 $1.61 \pm 0.34 \times 10$ copies/ml로 나타났다. 의암 지역(SY, CC, GJ, UA)의 geosmin 합성 유전자는 평균 1.53×10 copies/ml, 청평 지역(C1, CPO)의 geosmin 합성 유전자는 평균 1.65×10 copies/ml의 농도로 확인되었으며, 삼봉 지역(N1, N2)의 geosmin 합성 유전자는 평균 1.57×10 copies/ml 그리고, 팔당 지역(P2, P1, SH, KA)의 경우 geosmin 합성 유전자의 농도가 평균 1.69×10 copies/ml로 검출되었다. 계절에 따른 북한강 수층의 방선균 유래 geosmin 합성 유전자는 20년 8월을 기점으로 감소하였으며 21년 4월 청평지역(C1, CPO)을 중심으로 21년 여름(6~8월)과 가을(9~11월) 각각 평균 2.04×10 와 1.1×10 copies/ml의 농도로 증가하였다(Fig. 5A).

북한강 수층의 방선균 유래 2-MIB 합성 유전자(*mibC*)의 분포는 북한강 전체 지점에서 평균 $1.2 \pm 0.24 \times 10$ copies/ml 나타났다. 계절에 따른 북한강 수층의 방선균 유래 2-MIB 합성 유전자의 거동은 20년도와 21년도 겨울철(12~2월) 감소하였으며, 20, 21년도 봄(3~5월)에 증가하는 특징을 나타내었다(Fig. 5B).

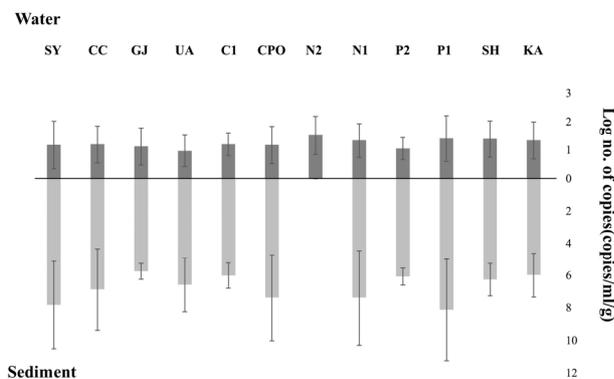


Fig. 4. Actinomycetes density in the North Han River watershed.

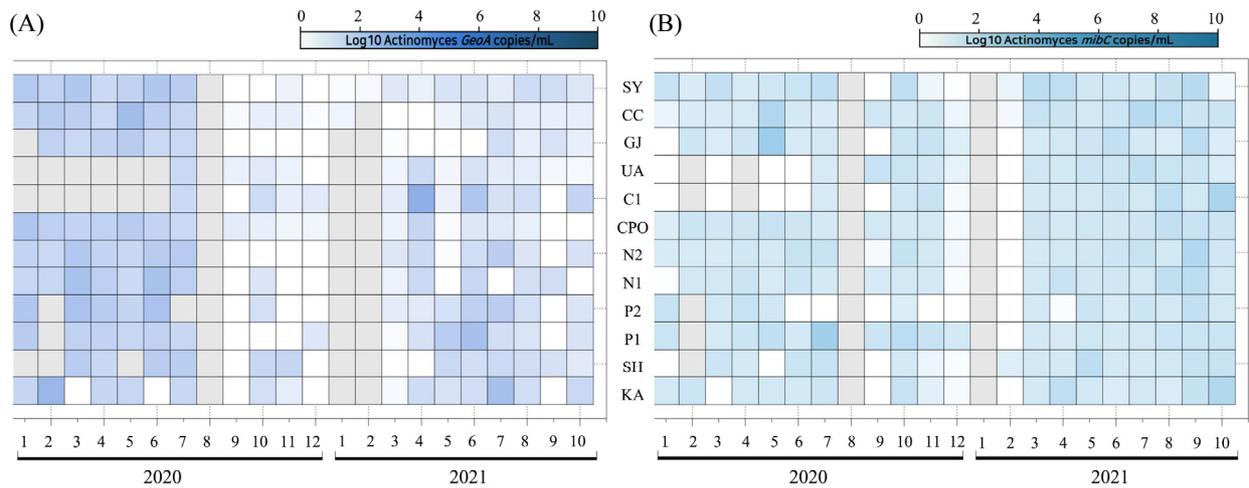


Fig. 5. Spatio-temporal distribution of the geosmin-producing gene (*geoA*) and 2-MIB-producing gene (*mibC*) in the water column of the North-Han River watershed. The heatmap shows the log-transformed copy numbers of the geosmin-producing gene (A) and 2-MIB-producing gene (B).

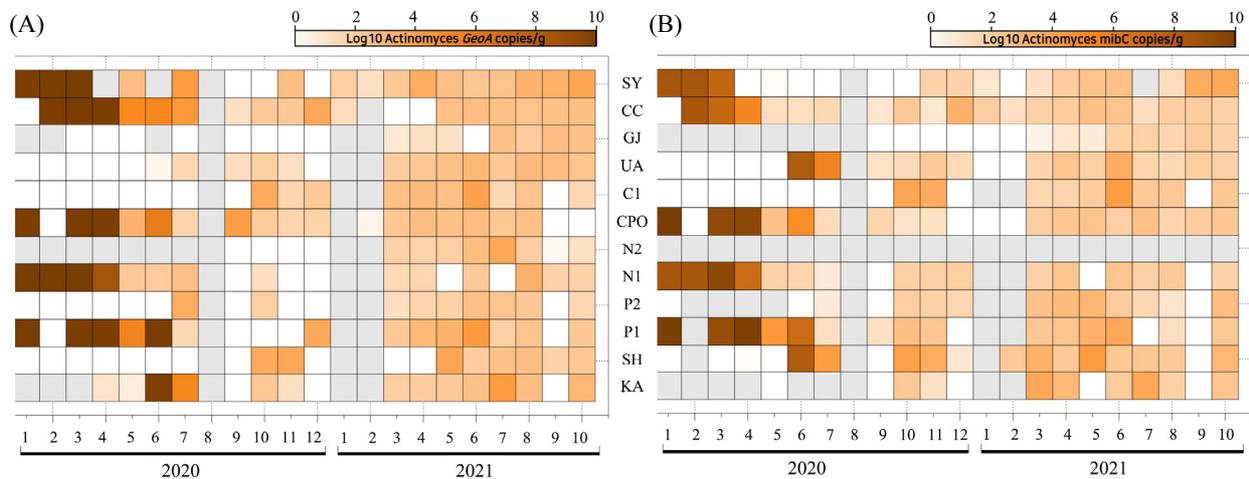


Fig. 6. Spatio-temporal distribution of the geosmin-producing gene (*geoA*) and 2-MIB-producing gene (*mibC*) in the sediment of the North-Han River watershed. The heatmap shows the log-transformed copy numbers of the geosmin-producing gene (A) and 2-MIB-producing gene (B).

북한강 퇴적층의 방선균 유래 geosmin과 2-MIB 합성 유전자 분석

북한강 수계 퇴적층에서 방선균 유래 geosmin 합성 유전자 (*geoA*)의 분포는 북한강 전체 지점에서 평균 $6.15 \pm 1.92 \times 10^3$ copies/g로 나타났다. 의암 지역(SY, CC, GJ, UA)의 geosmin 합성 유전자는 평균 8.88×10^3 copies/g로 나타났으며, 청평 지역(C1, CPO)의 geosmin 합성 유전자는 평균 3.25×10^3 copies/g, 삼봉 지역(N1, N2)의 geosmin 합성 유전자는 평균 6.75×10^3 copies/g 그리고 팔당 지역(P2, P1, SH, KA)은 geosmin 합성 유전자의 농도가 평균 5.64×10^3 copies/g로 나타났다. 계절에 따른 북한강 퇴적층의 방선균 유래 geosmin 합성 유전자는 20년도 겨울(1~2월)에 평균 4.11×10^{10} copies/g

로 조사기간 중 가장 높은 농도로 나타났으며, 20년도 봄과 여름에 각각 평균 9.11×10^7 copies/g과 2.1×10^5 copies/g로 감소하였다. 20년도 8월 홍수 이후 북한강 퇴적층의 geosmin 합성 유전자는 평균 3×10^2 copies/g로 모든 지점에서 $1 \sim 10^3$ 범위의 copy 수를 나타냈다(Fig. 6A).

북한강 퇴적층의 방선균 유래 2-MIB 합성 유전자(*mibC*)의 분포는 북한강 전체 지점에서 평균 $4.15 \pm 2.8 \times 10^2$ copies/g로 나타났다. 의암 지역(SY, CC, GJ, UA)의 2-MIB 합성 유전자는 평균 2.85×10^2 copies/g으로 나타났으며, 청평 지역(C1, CPO)의 2-MIB 합성 유전자는 평균 1.04×10^3 copies/g의 농도로 북한강 평균 2-MIB 합성 유전자 농도보다 약 10배 높은 농도로 검출되었다. 삼봉 지역(N1, N2)의 2-MIB 합성 유전자는 평균 1.35×10^2 copies/g 그리고 팔당 지역(P2, P1, SH, KA)은

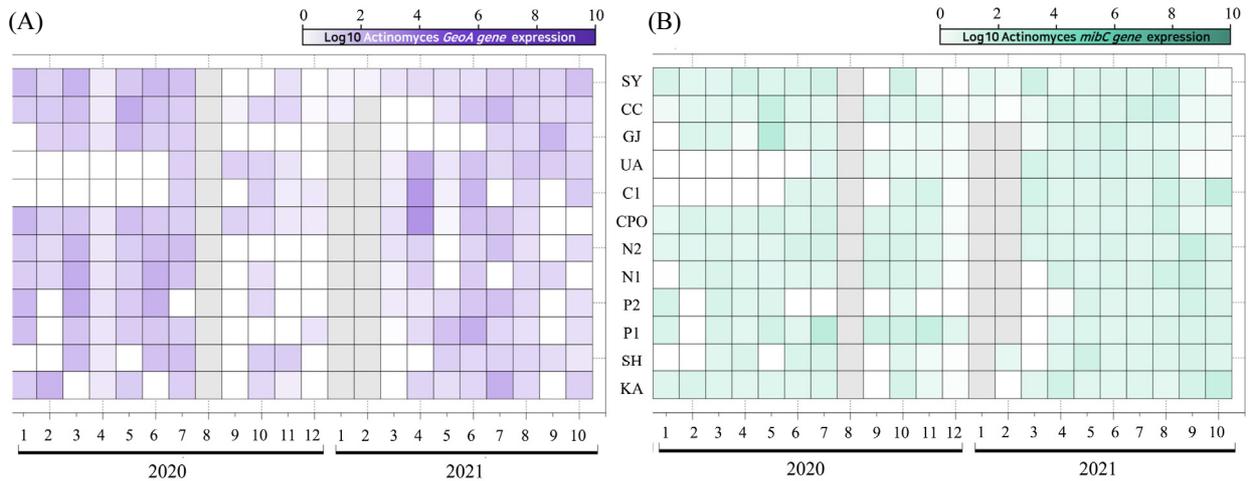


Fig. 7. Spatio-temporal gene expression of the geosmin-producing gene (*geoA*) (A) and 2-MIB-producing gene (*mibC*) (B) in the water column of the North-Han River watershed.

평균 6.85×10^2 copies/g으로 2-MIB 합성 유전자가 검출되었다. 계절에 따른 북한강 수층의 방선균 유래 2-MIB 합성 유전자의 거동은 20년도 겨울(1~2월)에 평균 1.62×10^8 copies/g으로 2-MIB 합성 유전자가 조사 기간 내 가장 높게 검출되었다. 이후 봄과 여름에 각각 1.01×10^5 와 1.53×10^3 copies/g의 농도로 감소하였다. 20년도 8월 홍수 이후 퇴적층의 2-MIB 합성 유전자의 농도는 평균 $8.08 \pm 0.12 \times 10$ copies/g로 급격히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6B).

북한강 수계 퇴적층의 geosmin과 2-MIB 합성 유전자의 분포는 20년도 초 북한강 상류(SY, CC, GJ, UA)에 존재하는 geosmin과 2-MIB 합성 유전자가 20년도 5~6월 하류지점(P2, P1, SH, KA)으로 이동하는 것을 확인하였다. 20년도 8월 홍수 이후의 geosmin과 2-MIB 합성 유전자는 수층과 비교하여 모든 지점에서 분포하는 비슷한 경향을 나타내었다.

북한강 수층의 방선균 유래 geosmin과 2-MIB 합성 유전자 발현량 분석

본 연구에서 제작한 방선균의 geosmin과 2-MIB 합성 유전자 primer (Table 1)를 이용하여 2020년 1월부터 2021년 10월 까지 북한강 수계 본류 지점의 수층과 퇴적층에서 geosmin과 2-MIB 합성 유전자의 발현량을 파악하였다. 북한강 수계 수층에서 방선균 유래 geosmin 합성 유전자(*geoA*)의 발현은 북한강 전체 지점에서 평균 8.88 ± 2.91 copies/ml의 농도로 낮게 존재하고 있었다(Fig. 7A). 2-MIB 합성 유전자(*mibC*)의 발현량도 북한강 전체 지점에서 평균 9.36 ± 2.33 copies/ml의 농도로 geosmin과 유사하게 결과를 보였으며, 발현량은 매우 낮은 검출량이 확인되었다(Fig. 7B). 북한강 수계 수층에서 이취미 물

질 합성하는 유전자의 발현은 거의 나타나지 않거나 발현량이 매우 낮은 것으로 판단된다.

북한강 퇴적층의 방선균 유래 geosmin과 2-MIB 합성 유전자 발현량 분석

북한강 수계 퇴적층에서 방선균 유래 geosmin 합성 유전자(*geoA*)의 분포는 북한강 전체 지점에서 평균 $6.15 \pm 1.92 \times 10^3$ copies/g 나타났다. 의암 지역(SY, CC, GJ, UA)의 geosmin 합성 유전자는 평균 8.88×10^3 copies/g으로 조사 지역 중 가장 높은 농도로 검출되었다. 청평 지역(C1, CPO)의 geosmin 합성 유전자는 평균 3.25×10^3 copies/g의 농도로 나타났으며, 삼봉 지역(N1, N2)의 geosmin 합성 유전자는 평균 6.75×10^3 copies/g, 팔당 지역(P2, P1, SH, KA)은 평균 5.64×10^3 copies/g으로 나타났다. 계절에 따른 북한강 퇴적층의 방선균 유래 geosmin 합성 유전자는 20년도 겨울(1~2월)에 평균 4.11×10^{10} copies/g으로 조사 기간 중 가장 높은 농도로 나타났으며, 20년도 봄과 여름에 각각 평균 9.11×10^7 copies/g과 2.1×10^5 copies/g으로 감소하였다. 20년도 8월 홍수 이후 북한강 퇴적층의 geosmin 합성 유전자는 평균 3×10^2 copies/g으로 모든 지점에서 $1 \sim 10^3$ 범위의 copy 수를 나타냈다(Fig. 8A).

북한강 수계 퇴적층에서 방선균 유래 2-MIB 합성 유전자의 발현은 북한강 전체 지점에서 평균 $2.13 \pm 41.97 \times 10^2$ copies/g의 농도로 나타났다. 의암 지역(SY, CC, GJ, UA)의 2-MIB 합성 유전자 발현은 평균 8.6×10 copies/g, 청평 지역(C1, CPO)의 2-MIB 합성 유전자 발현량은 평균 1.61×10^2 copies/g, 삼봉 지역(N1, N2)의 2-MIB 합성 유전자 발현량은 평균 4.64×10^2 copies/g 그리고, 팔당 지역(P2, P1, SH, KA)은 평균 3.48×10^2

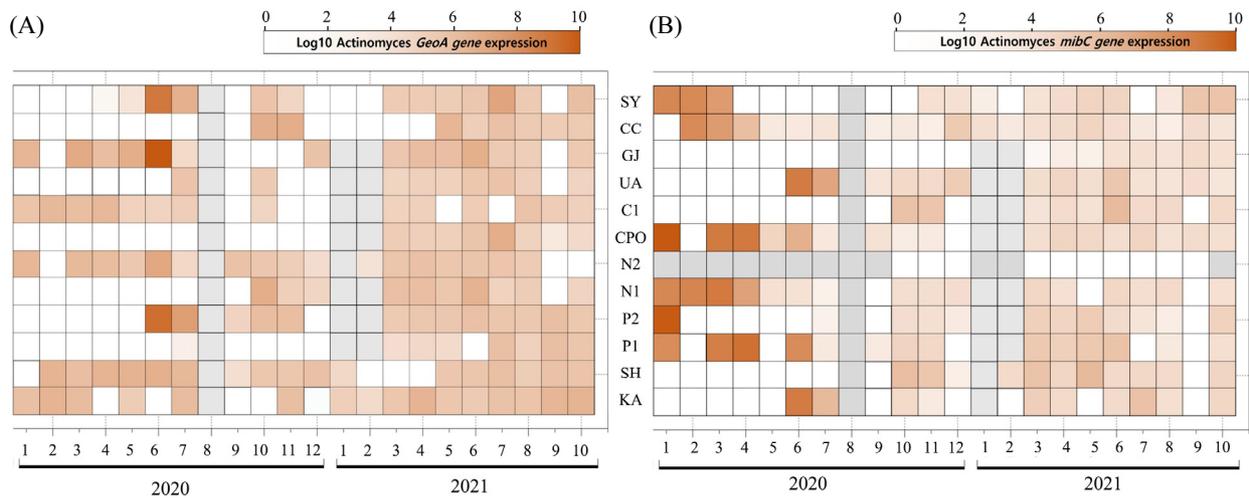


Fig. 8. Spatio-temporal gene expression of the geosmin-producing gene (*geoA*) (A) and 2-MIB-producing gene (*mibC*) (B) in the sediment of the North-Han River watershed.

copies/g을 나타내었다. 계절에 따른 북한강 수층의 방선균 유래 2-MIB 합성 유전자의 발현량은 20년도 겨울철(1~2월) 1.82×10^6 copies/g의 농도에서 봄철(3~5월) 1.58×10^4 copies/g으로 감소하였으며, 20년도 여름과 가을에 각각 평균 7.44×10^2 과 4.81×10 copies/g의 발현량을 유지하였다(Fig. 8B).

북한강 수계 방선균은 퇴적층 전반에 걸쳐 geosmin과 2-MIB 발생 잠재성이 높은 특징을 나타내었으며, 이는 퇴적층 내 방선균의 16S rRNA 유전자량과 비례적인 특징을 나타내었다. 또한, 20년 8월 이후 방선균의 *geoA* 유전자 copy 수는 평균적으로 약 5배 감소한 것으로 확인되어 20년 8월 이후 방선균의 주요 서식지인 퇴적층의 변화가 있었음을 시사하였다. 토양과 퇴적층에서 방선균은 포자를 세균으로부터 보호하기 위한 목적으로 포자 형성 시기에 이취미물질 합성이 증가한다고 보고된 바 있다(Becher et al., 2020). 본 연구에서 퇴적층에서 geosmin 합성 유전자와 2-MIB 합성 유전자가 높게 검출된 것은 방선균이 퇴적층에서 다수 존재하면서 포자 형성과 함께 다량의 이취미 물질을 합성하는 것으로 판단되었다.

분자기법을 이용하여 북한강 수계 본류 지점의 수층과 퇴적층에서 이취미 물질(geosmin, 2-MIB)을 합성하는 방선균의 분포와 거동을 파악한 결과, 유전자를 이용한 geosmin과 2-MIB 생성 방선균의 탐색은 기존의 배양법보다 신속한 분석이 가능하였으며, 낮은 밀도로 배양되지 않는 geosmin과 2-MIB 합성 방선균의 유전자 탐색이 가능하였다. 방선균의 geosmin과 2-MIB 합성 유전자의 분포는 수층보다 퇴적층에 $10^2 \sim 10^3$ 배 이상 높게 존재하는 것으로 확인되어 추후, 퇴적층 내 geosmin과 2-MIB 합성 방선균의 대한 유전자 발현 조건 등을 심층적으로 연구할 필요가 있다고 판단되었다. 북한강 수계 내 방선

균 16S rRNA 유전자량은 이취미물질 합성 유전자의 발현량에 비해 약 $10 \sim 10^4$ 배 낮게 나타내어 이취미물질 합성방선균은 전체 방선균의 5% 미만으로 확인되었다. 이는 북한 강수계에 존재하는 다수의 방선균이 이취미 물질 합성유전자를 가지고 있지 않거나 유전자 발현을 하지 않음을 시사한다. 방선균 중 *S. albidoflavus*, *S. avermitilis*, *S. citreus*, *S. griseus*, *S. griseofuscus*, *S. halstedii*, *S. psammoticus*, *S. tendae*, 그리고 *S. violaceusniger* 등 일부 *Streptomyces* 속과 *Nocardia* 속은 geosmin과 2-MIB의 강력한 생산자로 알려져 있지만 대다수의 많은 *Streptomyces* 속은 geosmin과 2-MIB의 비생산자라고 보고된 바 있다(Zaitlin and Watson, 2006). 또한, 방선균 유래 geosmin과 2-MIB 유전자량과 발현량의 차이를 통해 북한강 수계에는 이취미 물질 합성 유전자는 존재하나 온도, 영양염 등 성장조건 및 환경조건에 따라 발현이 되지 않은 방선균이 다수 존재하고 있다고 판단되었다. 환경 내 이취미 물질 발생 방선균의 비율은 낮지만 이들은 이취미 물질을 다량 생산할 수 있는 잠재성이 있으므로 유전자 분포와 발현을 모니터링해야 하며, 현장에서 이취미 생산 균주의 유전자 분포와 발현에 대한 지속적인 모니터링이 요구된다.

적 요

본 연구에서는 상수원에서 곰팡이와 흙냄새를 유발하는 geosmin과 2-MIB 생성 방선균의 분포를 파악하고자 북한강 수계의 환경유전자를 대상으로 방선균 특이 primer를 사용하여 geosmin과 2-MIB 합성 방선균의 잠재성과 발현량을 확인

하였다. 북한강 수계 내 방선균은 수층에서 $1.04\sim 1.79 \times 10^4$ copies/ml의 농도로 나타났으며, 퇴적층의 경우, $2.9 \times 10^3\sim 4 \times 10^{15}$ copies/g의 농도로 나타났다. 북한강 수계 수층과 퇴적층 내 방선균유래 이취미물질 합성 유전자를 정량한 결과, $1.05\sim 3.98 \times 10^{13}$ copies/ml (g)로 확인되었으며, 이취미 물질 합성 유전자의 발현량은 $0.21\sim 2.67 \times 10^8$ copies/ml (g)으로 확인되었다. 북한강 수계의 방선균 copy 수는 퇴적층이 수층보다 약 $10^2\sim 10^{14}$ 배 더 높게 검출되었다.

감사의 말

본 연구는 2020~2021년 한강수계관리위원회 환경기초조사사업(북한강수계 맛냄새물질 발생원인 조사 및 관리대책 수립)의 지원을 받아 수행되었습니다.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to report.

References

- Auffret M, Pilote A, Proulx E, 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.
- Becher PG, Verschut V, Bibb MJ, Bush MJ, Molnár BP, Barane E, AI-Sassam MM, Chandar G, Song L, Challis GL, et al. 2020. Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract a soil arthropod to *Streptomyces* bacteria promoting spore dispersal. *Nat. Microbiol.* **5**, 821–829.
- Bentley R and Meganathan R. 1981. Geosmin and methylisoborneol biosynthesis in *Streptomyces*. Evidence for an isoprenoid pathway and its absence in non-differentiating isolates. *FEBS Lett.* **125**, 220–222.
- Chon JH, Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Han JA, Chung YH, Song KW, and Seo KH. 2010. Comparison of standard culture method and real-time PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods and vegetables. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**, 355–360.
- Denisova LY, Bel'kova NL, Tulokhonov II, and Zaichikov EF. 1999. Bacterial diversity at various depths in the southern part of lake Baikal as detected by 16S rDNA sequencing. *Mikrobiologiya* **68**, 547–556.
- Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, and Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200.
- Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, and Li W. 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **28**, 3150–3152.
- Gerber NN and Lechevalier HA. 1965. Geosmin an earthy-smelling substance isolated from *Actinomyces*. *Appl. Microbiol.* **13**, 935–938.
- Jezbera J, Sharma AK, Brandt U, Doolittle WF, and Hahn MW. 2009. 'Candidatus Planktophila limnetica', an actinobacterium representing one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2864–2869.
- John N, Koehler AV, Ansell BRE, Baker L, Crosbie ND, and Jex AR. 2018 An improved method for PCR-based detection and routine monitoring of geosmin-producing cyanobacterial blooms. *Water Res.* **136**, 34–40.
- Jørgensen NO, Podduturi R, and Burford MA. 2016. Relations between abundance of potential geosmin-and 2-MIB-producing organisms and concentrations of these compounds in water from three Australian reservoirs. *J. Water Suppl.* **65**, 504–513.
- K-water. 2019. Investigation of the outbreak causes and management measures of the taste and odor compound (2-Methylisoborneol) in the North Han River water system. Hangang Sugye Gwalli Wiwonhoe, Hanam, Republic of Korea.
- Kim KH. 2018. Ph.D thesis. Molecular genetic analysis of cyanobacterial harmful material production potential in the North Han River, Korea. Konkuk University, Seoul, Republic of Korea.
- Lukassen MB, Saunders AM, Sindilariu PD, and Lund NJ. 2017. Quantification of novel geosmin-producing bacteria in aquaculture systems. *Aquaculture* **479**, 304–310.
- Martins A and Vasconcelos V. 2011. Use of qPCR for the study of hepatotoxic cyanobacteria population dynamics. *Arch. Microbiol.* **193**, 615–627.
- Medsker LL, Jenkins D, Thomas JF, and Koch C. 1969. Odorous compounds in natural waters. 2-Exo-hydroxy-2-methylbornane, the major odorous compound produced by several Actinomycetes. *Environ. Sci. Technol.* **3**, 476–477.
- NCBI Resource Coordinators. 2020. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **48**, D7–D19.
- Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hottton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robertse B, et al. 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* **2020**, baaa062.
- Tsao HW, Michinaka A, Yen HK, Giglio S, Hobson P, Monis P, and Lin TF. 2014. Monitoring of geosmin producing *Anabaena circinalis* using quantitative PCR. *Water Res.* **49**, 416–425.
- Wang Z, Shao J, Xu Y, Yan B, and Li R. 2015. Genetic basis for geosmin production by the bloom-forming cyanobacterium, *Anabaena ucrainica*. *Water* **7**, 175–187.

Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, and Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 1613–1617.

Zaitlin B and Watson SB. 2006. Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: myths, tenets and truths. *Water Res.* **40**, 1741–1753.