

Original article

## 북한강 수역에 분포하는 *Pseudanabaena* 균주의 동정 및 2-MIB 생산 잠재성 분석

김건희 · 이세진<sup>1</sup> · 서경화<sup>1</sup> · 황순진\*

건국대학교 상허생명과학대학 환경보건과학과, <sup>1</sup>K-water 한강유역본부 한강물관리처 물환경센터

**Molecular Identification of *Pseudanabaena* Strains and Analysis of 2-MIB Production Potential in the North Han River System.** Keonhee Kim (0000-0002-5725-1447), Sejin Lee<sup>1</sup> (0000-0001-6977-4504), Kyunghwa Seo<sup>1</sup> (0000-0001-6202-3767) and Soon-Jin Hwang\* (0000-0001-7083-5036) (Department of Environment and Health Science, Sanghuh College of Life Sciences, Konkuk University, Seoul, Republic of Korea; <sup>1</sup>Water Quality & Environment Center, Water Resources Management Dept, Hangang River Regional Division, K-water, Gwacheon, Republic of Korea)

**Abstract** Identification of the target species of 2-MIB (2-methylisoborneol) production is crucial in the management of off-flavor problem in the freshwater system. This study was conducted to identify 2-MIB-producing *Pseudanabaena* strains occurring in the North Han River system using molecular genetic method. Eleven phenotypes of *Pseudanabaena* were isolated from several mainstream sites of the North Han River, including Sambong-ri, Joam-myun, and Lake Uiam areas. Despite of morphological similarity of the strains, the phylogenetic analysis using 16S rDNA classified them into different species with low genetic similarity (40~55%). Isolated *Pseudanabaena* strains were converged to four species; *Pseudanabaena cinerea*, *P. yagii*, *P. mucicola*, and *P. redekei*. Among them, the 2-MIB synthesizing gene (*mibC*) was detected in *P. cinerea*, *P. yagii*, and *P. redekei*. However, actual 2-MIB production was detected only in *P. cinerea* and *P. redekei* based on gas chromatography analysis. This study is the first report of the molecular identification of *Pseudanabaena* strains and their 2-MIB production potential in Korea. The results of this study provides an evidence of species diversity of *Pseudanabaena* occurring in the North Han River.

**Key words:** *Pseudanabaena*, species diversity, 16S rDNA, *mibC* gene, 2-MIB, North Han River

### 서 론

남조류에 의해 발생하는 이취미는 세계적으로 물 이용에 상당한 어려움을 유발하고 있다(Whangchai *et al.*, 2017; Churro *et al.*, 2020; Pham *et al.*, 2020). 남조류가 생산하는

Geosmin과 2-MIB는 가장 대표적인 이취미 물질서, 국내에서는 북한강 수계에서 2011년 겨울(11~12월)에 Geosmin이 비정상적으로 높은 농도(1.64 ng L<sup>-1</sup>)를 나타냈으며 이후 2016년까지 지속적으로 북한강 수계의 여러 지점에서 검출되었다(You *et al.*, 2013; HRWEMD, 2016). 2014년 이후로 북한강 수계에서 Geosmin의 발생농도는 점차 감소하였으며 2019년에는 팔당호와 의암호 수역에서만 일시적으로 낮은 농도가 검출되었다(Byun *et al.*, 2015; HRWEMD, 2019). 그러나 2018년 11월에 의암호와 청평댐 하류 지역에서 2-MIB

Manuscript received 12 November 2020, revised 11 December 2020, revision accepted 12 December 2020

\* Corresponding author: Tel: +82-2-450-3748, E-mail: sjhwang@konkuk.ac.kr

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

가 고농도로 발생하였으며 이후 지속적으로 북한강 수계 여러 지역에서 평균 50~100 ng L<sup>-1</sup> 정도로 검출되었다(Byeon *et al.*, 2018).

2011년 북한강 수계에서 발생한 고농도 Geosmin은 *Anabaena*속(屬) 남조류가 원인생물로 알려졌다(Byeon *et al.*, 2013). 특히 *Anabaena crassa*와 *Dolichospermum circinale* (*Anabaena circinalis*)는 Geosmin 발생의 주요 원인종으로 확인되었다(Li *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). 이외에도 *A. spiroides*와 *A. macrospora*의 세포밀도와 Geosmin 농도가 통계적으로 높은 상관성을 나타내어 Geosmin을 생산하는 종으로 추정되었다(Cho *et al.*, 1990; You *et al.*, 2013). 그러나 아직까지도 북한강 수계에서 2-MIB 발생의 원인종에 대해서는 명확한 종 동정이 이루어지지 않았으며 2016년 북한강 수계에서 발견된 *Pseudanabaena limnetica* 세포 밀도와 2-MIB 농도의 통계적 상관분석을 통한 원인종 추정만이 이루어졌다(Byun *et al.*, 2015). 2016년 이후 북한강 수계에서 2-MIB를 생산하는 *Pseudanabaena* strain의 분리 및 동정과 이취미 생산에 대한 연구는 *Pseudanabaena yagii*의 분리 및 genome sequence를 분석한 연구가 유일하다(Jeong *et al.*, 2020).

*Pseudanabaena*속 남조류는 부유성과 부착성(저서성) 생활사를 나타낸다. 일반적인 세포 형태학에 기초할 때(Jeong, 1993; Acinas *et al.*, 2009; Park, 2012b), 세포 외부에 점액질 초(sheath)는 존재하지 않으며 사상체(trichome)가 단독생활을 하거나 매트를 형성하여 성장한다. 종에 따라서 10개 이상의 단일세포가 연결되어 긴 형태이거나 3개~5개 세포가 연결된 짧은 형태를 보이며 단일세포 사이의 격벽이 존재하며 협입되어 있다. 세포는 원통형으로 세포 폭(width)이 길이(length)보다 길며 성장 환경에 따라서 폭과 길이의 비율은 1.5~8.5배이다. 국내에서는 *Pseudanabaena limnetica*, *P. mucicola*, *P. catenata*, *P. minima*, *P. westiana*가 발견되었으며(Park, 2012b), 북한강 수역에서는 *P. limnetica*와 *P. mucicola*가 주로 우점하는 것으로 보고되었다(Byun *et al.*, 2015; HRWEMD, 2016). 하지만 국내에서 발견되는 *Pseudanabaena* 종들 간의 세포 폭과 길이 차이는 0.5 µm~2.0 µm로 매우 작기 때문에 현장에 발생하는 *Pseudanabaena*속의 종들을 광학현미경의 중~고배율(200~400배)에서 명확히 동정하는 것은 매우 어렵다. 또한 다양한 환경조건에서 발생하는 형태적 변이로 인해 현미경 수준에서 정확하게 종을 동정하기는 쉽지 않다(Kim *et al.*, 2014). 뿐만 아니라 이취미 유전자 genotype에 따라서 동일한 종 내에서도 이취미 물질을 생산하는 strain과 생산하지 않는 strain이 모두 존재하기 때문에 정확한 이취미 발생 원인종을 판단하기 위해서는 유전자 수준에서 이취미 물질 합

성에 대한 잠재성을 반드시 확인할 필요가 있다(Moustafa *et al.*, 2009; Boopathi and Ki, 2014).

본 연구에서는 북한강 수계에서 2-MIB가 발생하는 시기 동안 11개의 *Pseudanabaena* strain을 분리 및 배양하여 유전자 수준에서 종 동정 및 2-MIB 발생 잠재성을 분석하였으며 기체 크로마토그래피(GC) 분석을 통해 동정된 종에 의한 실제 2-MIB 물질 생산을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. *Pseudanabaena* strain의 분리·배양 및 형태적 특징 분석

2019년 7월~2020년 7월 사이에 *Pseudanabaena*가 주로 발생하는 의암호 수역(37°52'40.8"N 127°42'18.3"E)과 북한강 수역(37°30'14.4"N 127°17'27.1"E)에서 현장수를 채수하여 저온(4°C) 상태로 실험실로 운반하였다. 실험실에서 Capillary method (Guillard, 1975)를 이용하여 단일세포를 분리하였으며, 분리한 단일세포는 BG-11 배지에서 온도 25°C, 광도 30 µmol<sup>-1</sup> E<sup>-1</sup>cm<sup>2</sup> (L:D=14:10)의 조건에서 1개월 이상 배양하였다. 총 11개 *Pseudanabaena* strain을 분리하였으며 1,000배율 현미경(Axiostar A1, ZEISS, Germany) 하에서 단일세포 및 사상체의 형태적 특징을 관찰하고 사진기(Axiocam 503 color, ZEISS, Germany)로 촬영하였다. 단일세포 및 사상체의 폭과 길이, 사상체의 단일세포 수는 현미경 전용 프로그램(ZEN ver.3.0, ZEISS, Germany)을 이용하여 측정하였다. *Pseudanabaena* strain들의 형태적 특징은 국가생물종목록의 도감(Park, 2012a, 2012b)을 참고하여 속 수준의 세포 크기 범위를 비교하였다.

### 2. *Pseudanabaena* strain의 DNA 추출 및 PCR 증폭

Blood and Tissue DNA extraction Kit (Cat No. 69504, Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 실험실에서 배양된 *Pseudanabaena* 세포의 DNA를 추출하였다(Miya and Sado, 2019). Lysis 용액으로 세포에 존재하는 DNA를 용출시켰으며 용출 혼합액 1,000 µL를 micro column의 resin에 옮겨 담고 원심분리하여 strain의 DNA만 흡착 및 분리하였다. Resin에 흡착된 DNA를 2회 이상 정제하여 DNA의 순도를 높였으며 최종적으로 100 µL Elution buffer를 첨가하여 DNA를 추출하였다. 정확한 종 단위 분석을 위하여 추출된 *Pseudanabaena* strain의 16S rDNA 유전자 구간에서 남조류 특이적인 구간을 증폭하였다. 이를 위해 CYA106F (CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG) primer (Nübel *et al.*, 1997)

와 CYA1280R (GCA ATT ACT AGC GAT TCC TCC) primer (Faldu *et al.*, 2014)를 사용하였으며 TAKARA PCR machine 을 사용하여 95°C에서 5분 동안 가열한 후, 95°C에서 50초, 60°C에서 50초, 72°C에서 60초를 40회 반복한 뒤 72°C에서 5분 동안 가열하여 유전자를 증폭하였다.

또한 *Pseudanabaena* strain의 Geosmin과 2-MIB 합성능 력을 유전자 수준에서 판단하기 위해 남조류의 Geosmin 합 성 유전자 구간(*gysI*)과 2-MIB 합성 유전자 구간(*mibC*)을 PCR 증폭하였다. *gysI* 유전자를 증폭하는 primer는 3139F와 3708R를 사용하였으며(Wang *et al.*, 2015) *mibC* 유전자를 증폭하는 primer는 *mibC300F*과 *mibC300R* primer를 사용 하였다(Kim *et al.*, 2020). 각각의 유전자를 PCR 증폭하기 위 해 TAKARA PCR machine을 사용하여 95°C에서 5분 동안 열처리 후, 95°C에서 50초, Annealing 온도에서 50초, 72°C 에서 1분을 35~40회 반복한 후 72°C에서 5분 동안 열처리 하였다.

PCR 증폭 산물은 E-gel™ Power Sanp Electrophoresis system (ThermoFisher Scientific, USA)을 사용하여 2% agarose gel에서 전기영동하였으며 E-gel™ Power Sanp Camera (ThermoFisher Scientific, USA)로 증폭 산물을 확인하였다.

### 3. Gas chromatography를 이용한 2-MIB 검출

북한강 수계에서 분리한 *Pseudanabaena* strain의 2-MIB (2-methylisoborneol) 물질 합성 검출은 HS-SPME (Head Space-Solid Phase Micro-extraction)법을 적용하였다(Ding *et al.*, 2014). 초음파로 세포가 파쇄된 시료를 직접 Gas chromatography에 주입하여 4분 동안 270°C에서 열 분리시켜 GC/MS (Gas chromatography/Mass spectrophotometer. 450-GC, 320-MS, Bruker)로 분석하였다. Chromatography에서 각 분석 성분의 체류시간(retention time)에 해당하는 위치의 봉우리(peak) 면적을 계산하였다.

### 4. 염기서열 분석 및 BLAST 검색

PCR 증폭 산물의 염기서열 분석은 ABI BigDye® Terminator v3.1 Cycle-Sequencing kit를 이용하였다. PCR 증폭 산물 에 형광물질을 부착하였으며 이를 ABI 373 0XL DNA analyzer (Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 PCR 증폭 산물의 염기 서열을 분석하였다(SolGent, Korea). 유전자 염기서열 분석 을 위해 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분의 온 도 변화를 30회 반복하여 대희 발생하는 형광값을 분석하였 다. 분석을 통해 확인된 PCR 증폭 산물의 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) Genbank database에서 BLAST (Basic Local Alignment Search

Tool)를 이용하여 Genbank database에 존재하는 남조류 16S rDNA 유전자 및 이취미 물질 합성 유전자와 상동성(Homology) 분석을 수행하였다. BLAST 분석에서 hit score와 염기 서열 일치율(Percent of identity)을 모두 고려하였으며 최종 적으로 일치율이 98%를 넘는 종들 중에서 hit score가 가장 높은 종의 유전자로 동정하였다.

### 5. 16S rDNA에 의한 유전자 염기서열 계통분석

북한강 수역에서 분리 및 배양한 *Pseudanabaena* strain 의 유전자 염기서열의 특징을 파악하기 위해 NCBI에서 *Pseudanabaena* strain의 16S rDNA 유전자 염기서열 자료 를 내려받았다. 700 bp~1400 bp 크기의 유전자 정보를 대 상으로 하였으며 정확한 종명이 없고 species(sp.)로 구분된 자 료는 제외하였다. 유전자 염기서열의 계통수를 분석하기 위 해 Clustal W algorithm으로 strain 사이의 염기서열을 정렬 하였으며 Maximum likelihood 방법과 Neighbor-joining 방 법(Saitou and Nei, 1987)을 사용하여 염기서열 사이의 계통 관계를 분석하였다. MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018) (window version 10.1.8)를 이용하여 분석을 수행하였으며 계통수 의 확실성 평가를 위해 bootstrap 방법(1,000회)으로 계통수 를 검증하였다(Felsenstein, 1985). Maximum likelihood와 Neighbor-joining 계통분석에서 염기서열의 치환모델은 각각 Maximum composite likelihood (Felsenstein, 1985) 모델과 Tamura-Nei (Tamura and Nei, 1993) 모델을 사용하였다.

### 6. 염기서열 등록번호(Accession Number)

북한강에서 분리한 *Pseudanabaena*속 4종의 16S rDNA 유 전자 정보를 DDBJ (DNA database Bank of Japan)에 등록하 였으며 Accession 번호 LC582826 (*Pseudanabaena cinerea*), LC582827 (*Pseudanabaena mucicola*), LC582828 (*Pseudanabaena yagii*), LC582829 (*Pseudanabaena redekei*)를 부여 받았다.

## 결과 및 고찰

### 1. 북한강 *Pseudanabaena* strain의 형태적 특징

북한강 수역에서 분리한 11개의 *Pseudanabaena* strain 세 포는 원통형 세포가 일렬로 연결되어 있는 사상성(filament) 형태로 존재하였다. *Pseudanabaena* strain NHUA201911 를 제외하고 모든 세포는 원통형 단일세포 사이가 협입되 었으며 성장단계에 따라서 부유성(Planktonic)과 부착성 (Attached)으로 구분되었다. 배양기간 동안 *Pseudanabaena*

strain의 사상체 확인하였으나 사상체 안에서 휴면포자 (Akinete)와 이형세포(Heterocystis)는 관찰되지 않았다. 사상체는 최소 3개~22개의 단일세포로 구성되었으며 strain 사이에 형태적 특징 및 성장 특성의 차이가 존재하였다(Table 1, Fig. 1).

NHUA201911 strain은 다른 strain과 다르게 세포가 50 μm 이상 길게 신장되었다. 원통형의 단일세포는 평균적으로 너비 2.8 μm ± 0.1 μm, 길이 4.5 μm ± 0.6 μm의 범위로 나타났다. 의암호 수역에서 분리한 NHUA201911 strain은 세포 간의 협입이 관찰되지 않았으며 단일세포가 연결된 사상체의 길이는 최소 54 μm부터 최대 102 μm로 다른 *Pseudanabaena* strain보다 2배 이상 긴 형태로 존재하였다. 또한 NHUA201911는 사상체끼리 뭉쳐서 성장하며 세포 자체가 부유하지 않고 바닥에 침전되어 성장하였다.

NHUA202007-04, NHUA202007-05, NHUA202007-09 strain은 최소 9개~최대 17개의 단일세포가 연결된 사상체 형태를 유지하였으며 기낭을 통한 수직이동은 없었지만 교반기(Shaker)로 플라스크를 교반하였을 때 수층에서 부유하였다. 단일세포의 너비×길이 비율은 NHUA202007-04와 NHUA202007-05 strain이 약 1.6~2.7배, NHUA202007-09 strain은 0.9~1.9배로 strain에 따라서 너비×길이 비율은 최대 3배 차이가 존재하였다.

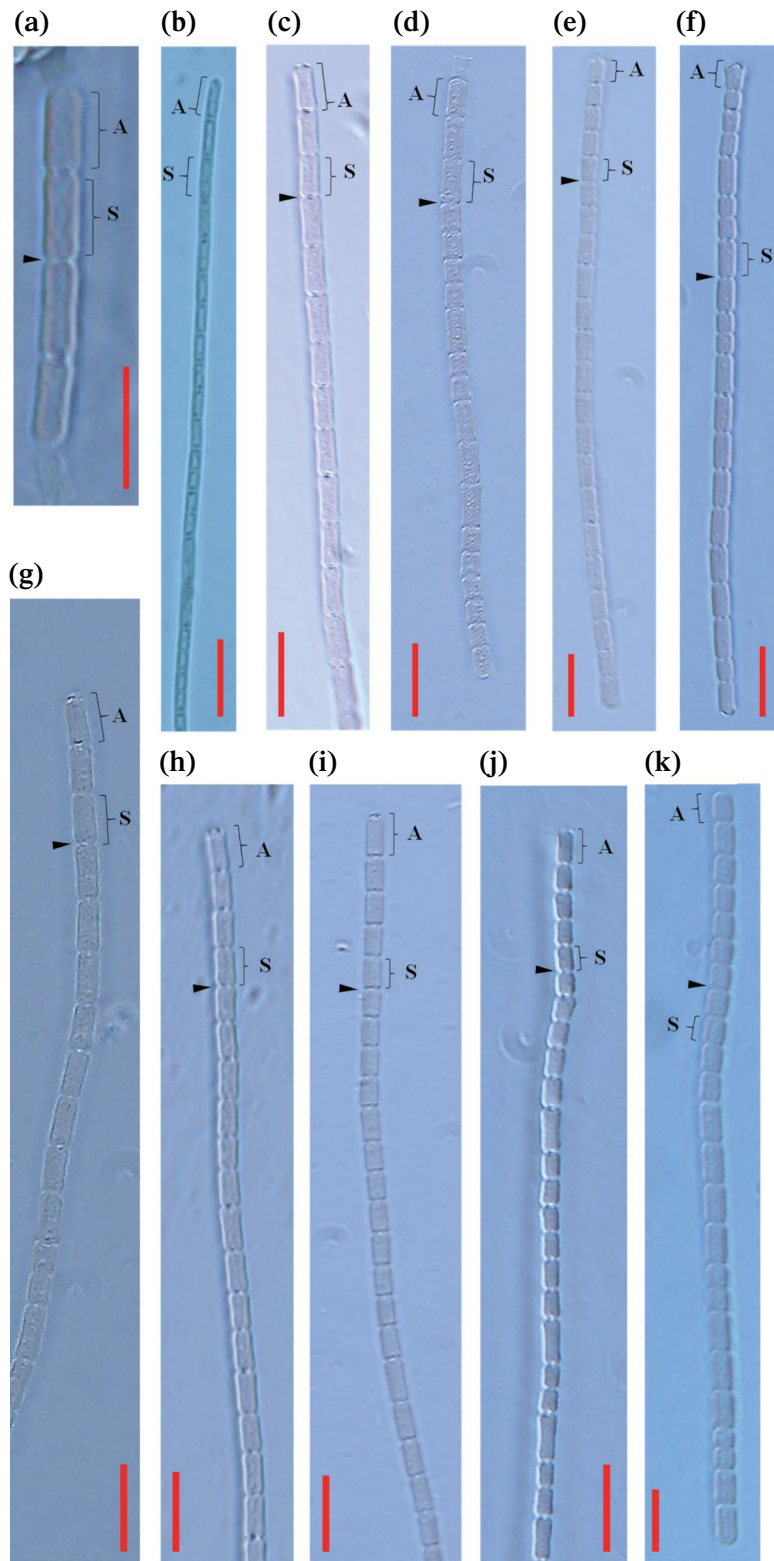
NHUA201909 strain을 포함한 NHUA202007-04, NHUA202007-05, NHUA202007-09 strain은 영양배지에 접종 후 약 1개월 동안 수층에서 부유성으로 성장하였으나 세포성장이 진행됨에 따라서 1개월 이후 부터는 플라스크 바닥에 부착하여 성장하는 세포가 함께 존재하였다. 1개월 이상 배양한 결과 NHPD201909 strain을 비롯한 3개 strain (NHUA202007-04, NHUA202007-05, NHUA202007-09)은 부유성 특성과 부착성 특성이 모두 나타났다. NHPD201909 strain은 NHUA202007-04, NHUA202007-05, NHUA202007-09 strain과 다르게 3개~5개의 세포가 연결되어 있는 짧은 사상체 형태로 존재하였으며 영양염 배지 조건에서 일부 사상체는 5개 이상의 세포가 연결되어 사상체를 형성하였다. 세포크기는 너비 1.4 μm ± 2.4 μm, 길이 2.4 μm ± 0.7 μm로 너비와 길이의 비는 약 1.6~3.0배였다. 양 끝단 세포는 원통형으로 원뿔형에 가까운 등근형이며 일반 영양세포의 길이보다 약 1.2~1.5배 더 길며 강모(setae)와 삭모(calyptra)는 관찰되지 않았다.

NHUA202007-01을 비롯한 NHUA202007-02, NHUA202007-03, NHUA202007-06, NHUA202007-07, NHUA202007-08의 6개 strain은 사상체가 수중에 부유하였으며 일부 사상체들만 바닥에 가라앉은 성장 특성을 나타내었다. 이러한 부유성 strain 안에서 사상체의 형태 및 세포의 크

Table 1. Comparison of morphological characteristics of *Pseudanabaena* strains isolated from the North-Han River system.

Strains characteristics	NHUA202007-01	NHUA202007-02	NHUA202007-03	NHUA202007-04	NHUA202007-05	NHUA202007-06	NHUA202007-07	NHUA202007-08	NHUA202007-09
Cell shape	Cylindrical	Cylindrical, Straight, or slight flexuous	Cylindrical, Straight, or slight flexuous	Cylindrical	Cylindrical	Cylindrical, Straight, or slight flexuous	Cylindrical, Straight, or slight flexuous	Cylindrical	Cylindrical, Straight, or slight flexuous
Ratio of length to width	1.6~3.0	2.0~2.5	1.6~3.5	1.7~2.3	1.6~2.8	1.6~2.7	1.2~2.4	1.4~3.4	0.9~1.9
Cell numbers to compose a trichome (cells)	3~7	12~20	20~22	10~11	10~12	4~10	10~25	10~15	9~17
Single cell size (μm) (width × long)	1.4 (±0.3) × 2.4 (±0.7)	2.8 (±0.1) × 4.5 (±0.6)	2.2 (±0.2) × 4.9 (±0.0)	2.2 (±0.1) × 4.3 (±0.2)	2.1 (±0.1) × 4.6 (±0.3)	2.2 (±0.0) × 4.7 (±0.3)	2.3 (±0.1) × 3.9 (±0.6)	1.5 (±0.1) × 2.7 (±0.8)	2.5 (±0.1) × 3.5 (±0.6)
Apical cell size (μm) (width × long)	1.3 (±0.1) × 4.1 (±1.1)	2.5 (±0.2) × 4.1 (±0.4)	2.0 (±0.4) × 4.3 (±0.6)	1.9 (±0.2) × 3.9 (±0.2)	2.1 (±0.2) × 4.8 (±0.2)	2.0 (±0.1) × 4.3 (±1.4)	2.3 (±0.1) × 4.9 (±1.2)	1.6 (±0.0) × 3.2 (±0.2)	2.5 (±0.2) × 3.6 (±0.8)





**Fig. 1.** Microscopic photos of *Pseudanabaena* strain isolated from North-Han River system ( $\times 1,000$ ). Photos were taken from cultured samples. Scale bar =  $10\ \mu\text{m}$ . 'A' and 'S' means apical cell and single cell, respectively. Black arrow ( $\blacktriangleright$ ) indicated constrictions at cross walls in trichomes. (a): NHPD201908, (b): NHUA201911, (c): NHUA202007-01, (d): NHUA202007-02, (e): NHUA202007-03, (f): NHUA202007-04, (g): NHUA202007-05, (h): NHUA202007-06, (i): NHUA202007-07, (j): NHUA202007-08, (k): NHUA202007-09.

기 차이가 나타났다(Table 1, Fig. 1). NHUA202007-01, NHUA202007-02, NHUA202007-03, NHUA202007-06, NHUA202007-07, NHUA202007-08 strain의 평균 세포크기는 너비  $2.2 \mu\text{m} \pm 0.3 \mu\text{m}$ , 길이  $4.8 \mu\text{m} \pm 0.5 \mu\text{m}$ 로 너비와 길이의 비는 약 1.5~2.3배였으나 NHUA202007-08 strain은 너비  $1.5 \mu\text{m} \pm 0.1 \mu\text{m}$ , 길이  $2.7 \mu\text{m} \pm 0.8 \mu\text{m}$ 로 너비와 길이의 비는 NHUA202007-01, NHUA202007-02, NHUA202007-03, NHUA202007-06, NHUA202007-07 strain과 유사하였으며 세포의 크기는 더 작았다.

북한강에서 분리한 11개 *Pseudanabaena* strain의 세포는 성장 특성에 따라서 부유성과 부착성, 그리고 두 가지를 모두 나타내는 strain으로 구분되었으며 사상체의 길이가 긴 strain과 짧은 strain으로 나뉘었다. 대부분 생물자원관 국가생물종목록 도감(Park, 2012a)과 여러 문헌(Tuji and Niiyama, 2018; Shizuka *et al.*, 2020)에서 설명하는 세포 크기 범위에 포함되거나 유사하였다. 다만 NHUA201911 strain과 NHPD201909 strain을 제외하고 세포 길이의 비율 또는 단일세포의 형태적 특징이 국가생물종목록 도감에서 설명하는 내용과 완벽히 일치하지는 않았다. 이는 남조류 세포가 고농도 영양배지에 노출됨에 따라서 급격히 세포성장이 촉진되었으며 이로 인해 현장수층에서 발생하는 남조류 세포와 크기 차이를 나타낸 것으로 판단된다(Jezberová and Komárková, 2007). 따라서 *Pseudanabaena* strain을 동정함에 있어서 배양을 통한 형태적 특성만으로 종을 구분하는 것은 부정확할 수 있기 때문에 유전자 수준에서의 동정이 요구된다.

## 2. 16S rDNA 염기서열 및 계통학적 특징

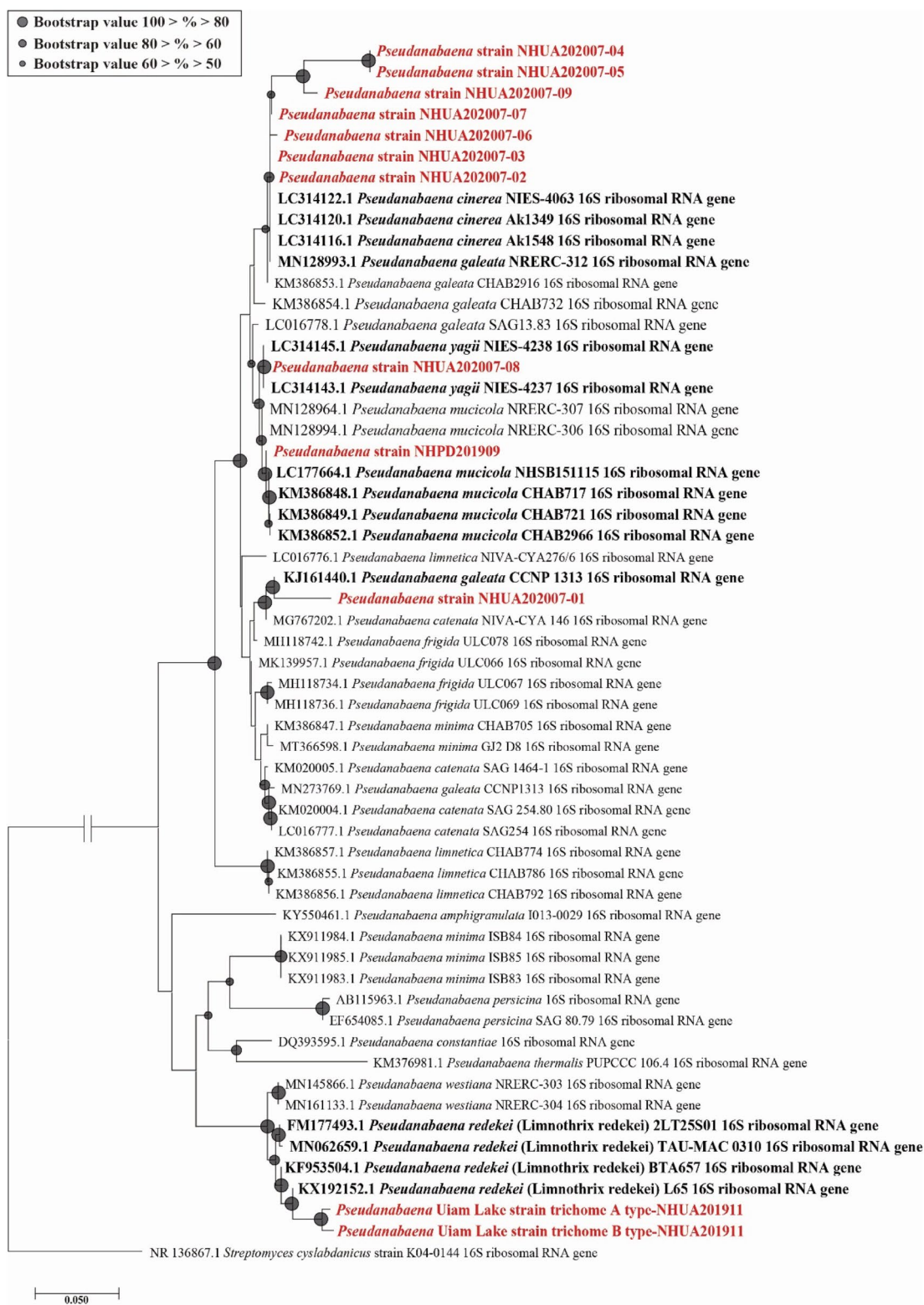
북한강에서 분리한 11개의 *Pseudanabaena* strain의 유전자 염기서열은 Genbank의 *Pseudanabaena*속 남조류 종과 90%~100%로 하나의 계통군을 형성하였다(Fig. 2). NHUA202007-02, NHUA202007-03, NHUA202007-04, NHUA202007-05, NHUA202007-06, NHUA202007-07, NHUA202007-09 strain의 16S rDNA 유전자는 60%의 계통수 하나로 수렴한 반면에, 그외 다른 strain은 서로 다른 계통수로 분리되었다. 하나의 계통수로 수렴된 NHUA202007-02, NHUA202007-03, NHUA202007-04, NHUA202007-05, NHUA202007-06, NHUA202007-07, NHUA202007-09 strain은 *P. cinerea*와 80% 이상의 유전적 유사도를 나타내었다. 특히 *P. cinerea* Ak1349, *P. cinerea* Ak1548, *P. cinerea* NIES-4063 strain과 유전적 유사도가 98% 이상으로 매우 높았다. NHUA202007-04, NHUA202007-05, NHUA202007-09 strain 사이에서 유전적 유사도가 98~100%로 매우 높았

기 때문에 NHUA202007-02, NHUA202007-03, NHUA202007-06, NHUA202007-07 strain과 유전자 염기서열이 서로 다르게 나타난 것으로 판단된다. 또한 NHUA202007-08 strain은 *P. yagii* NIES4238 및 *P. yagii* NIES4237 strain과 90% 이상의 높은 유전적 유사도를 나타내었으며 NHUA201908 strain은 *P. mucicola* 종과 유전적 유사도가 90% 이상으로 높았다. NHUA201911 strain 또한 *P. redekei* strain들과 95% 이상의 매우 높은 유전적 유사도를 나타내었으며 NHUA202007-01 strain은 *P. galeata* CCNP 1313 strain과 97%로 유전적 유사도가 매우 높았다. 하지만 NHUA202007-01 strain과 *P. galeata* CCNP 1313 strain의 계통수 길이는 통계적인 유의성이 낮았다( $P > 0.05$ ). NHUA202007-01 strain을 제외한 나머지 10개 strain은 모두 계통수의 길이는 통계적인 유의성을 보였다( $P > 0.05$ ).

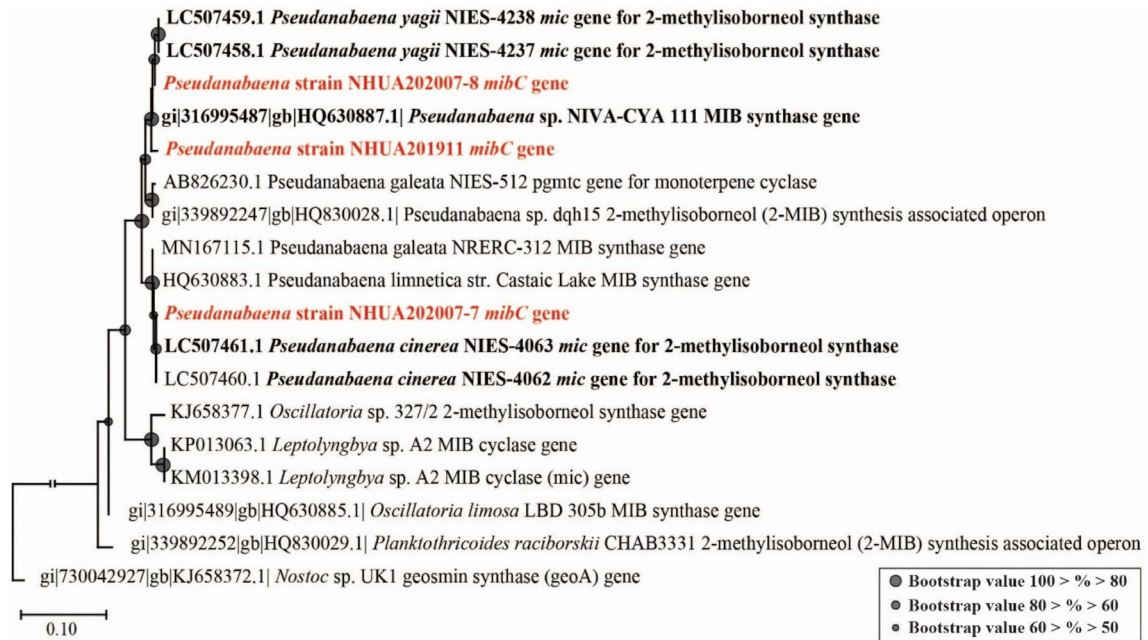
동일한 종으로 구분된 NHUA202007-02, NHUA202007-03, NHUA202007-04, NHUA202007-05, NHUA202007-06, NHUA202007-07, NHUA202007-09 strain은 형태적으로 매우 유사하였으며 배양과정에서 나타나는 특성 또한 서로 유사하였다. 하지만 NHUA202007-04, NHUA202007-05, NHUA202007-09 strain은 유전자 염기서열이 높은 상동성(90%)을 보였으나 계통수 길이에서 NHUA202007-02, NHUA202007-03, NHUA202007-06, NHUA202007-07 strain과 큰 차이를 나타내었다(Fig. 2). 7개의 *P. cinerea* strain 사이에서 유효한 염기서열 916쌍 중 164쌍의 차이(17%)는 *P. cinerea*의 종 내에서 유전적 변이(분화)의 가능성을 나타내고 있으나 이러한 strain 사이의 유전적 차이는 형태적인 특징으로 확인하기 어려웠다. 특히 NHUA202007-07 strain은 NHUA202007-02, NHUA202007-03, NHUA202007-06 strain과 분리된 계통수로 분화되었다. 하지만 이러한 염기서열 및 이차대사산물 형성 차이를 *P. cinerea* 종 사이의 변이로 결론을 내리기에는 보다 직접적인 증거가 요구된다. 따라서 향후 *P. cinerea* strain 사이의 세부적인 염기서열 분석과 생리학적 기능을 비교한다면 *P. cinerea* 종 사이의 변이에 대한 명확한 구분이 가능할 것으로 판단된다.

## 3. 2-MIB 합성 유전자(*mibC*) 유전자 염기서열 특징

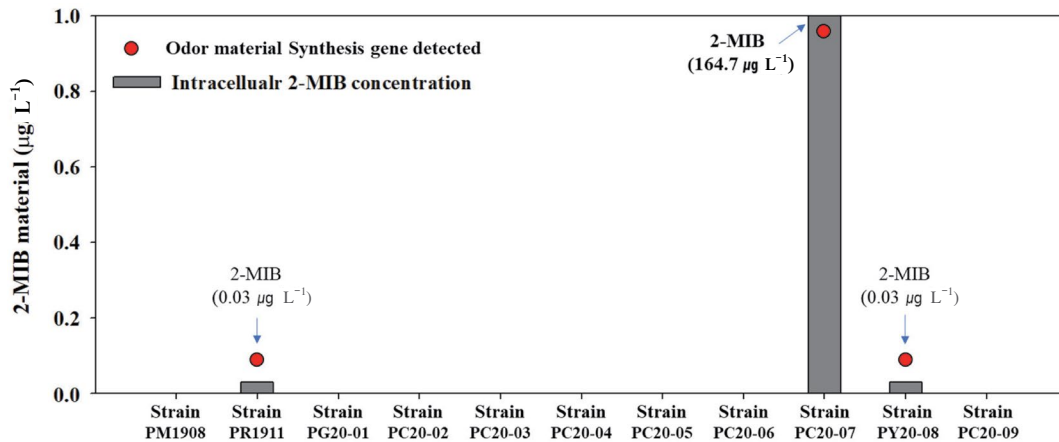
북한강 수역에서 분리 배양한 *Pseudanabaena* strain의 2-MIB 생산 잠재성을 파악하기 위해 각 strain의 DNA에서 2-MIB 합성 유전자(*mibC*)를 PCR 증폭하였다. 총 11개 *Pseudanabaena* strain 중에서 NHUA201911 strain와 NHUA202007-07, NHUA202007-08 strain에서만 300 bp 크기의 유전자 증폭 산물 band가 발견되었으며 3개 strain의 증폭 산물 모두 남조류의 *mibC* 유전자 계통수에 포함되었다(Fig.



**Fig. 2.** Phylogenetic relationships of *Pseudanabaena* taxa inferred using Neighbor-joining and Maximum likelihood analysis. The analyses were based on partial 16S rDNA sequence (1,100 bp). *Streptomyces cylabdanicus* strain K04-0144 was used as outgroup for the analysis. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. Only bootstrap average value of 50% or higher are shown.



**Fig. 3.** Phylogenetic relationship of cyanobacterial *mibC* gene inferred using Neighbor-joining analysis. The analysis was based on partial *mibC* gene sequence (300 bp). Geosmin synthesis gene (*geoA*) of *Nostoc* sp. UK1 strain was used as outgroup for the analysis. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. Only bootstrap average value of 50% or higher are shown.



**Fig. 4.** The 2-MIB concentration of among the isolated strains from North-Han River system. The red dot means the gene detection of odor (2-MIB) material synthesis. And bar graph means intracellular 2-MIB concentration. Each 2-MIB concentration was analyzed by gas chromatography (GC). PM: *Pseudanabaena mucicola*, PR: *P. redekei*, PC: *P. cinerea*, PY: *P. yagii*, PG: *P. galeata*.

3). GC 분석에서도 실제 2-MIB 물질을 생산하는 strain은 NHUA201911 strain과 NHUA202007-07 및 NHUA202007-08 strain으로 확인되었다(Fig. 4). NHUA201911 strain의 *mibC* 유전자는 *Pseudanabaena* sp. NIVA-CYA 111의 *mibC* 유전자와 82%의 상동성을 나타내었으며 NHUA202007-08 strain 및 *P. yagii*의 *mibC* 유전자와도 계통학적으로 매우 유

사하였다. NHUA202007-07 strain은 *P. cinerea*의 *mibC* 유전자와 계통학적으로 매우 밀접하였으며 *P. galeata* 및 *P. limnetica*의 *mibC* 유전자와 95%의 확률로 하나의 계통수를 형성하였다. 따라서 북한강 수역에서 발견되는 *P. limnetica*의 *mibC*와 *P. cinerea*의 *mibC* 유전자는 계통학적으로 정확히 구분하기 어려우며, 수체에서 2-MIB 발생 원인을 명확



히 파악하기 위해서는 *mibC* 유전자뿐만 아니라 16S rDNA와 같은 종 특이적 유전자가 함께 분석되어야 한다. 또한 분리된 *Pseudanabaena* strain의 *mibC* 유전자 분석결과에 기초할 때 북한강 수계에서 발생하는 *P. cinerea*는 2-MIB를 합성하는 strain과 비합성 strain의 두 개 genotype이 존재한다고 판단된다. 이러한 genotype의 차이로 인해 동일한 분류군이 우점하였음에도 불구하고 2-MIB 농도와 상관관계는 다르게 나타날 수 있으며, 실제로 2019년 7월과 9월 사이에 의암호에서 출현한 *Pseudanabaena* strain 세포밀도는 2-MIB 농도와 양의 상관관계를 나타내었으나, 동일한 시기에 팔당호에서 출현한 동일한 *Pseudanabaena* strain의 세포밀도는 2-MIB 농도와 상관관계가 매우 낮았다(HRWEMD, 2019). 이러한 genotype의 차이는 본 연구에서 분리된 *P. yagii*와 *P. redekei* strain에서 모두 발생할 수 있으며, 향후 다양한 genotype의 2-MIB 합성 남조류 균주를 확보한다면 북한강 수역에서 2-MIB 발생 특성을 보다 정확하게 설명할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서 분리한 NHUA202007-07 strain은 200,000 cells mL<sup>-1</sup>당 4,750 ng L<sup>-1</sup> (0.023 pg cell<sup>-1</sup>)의 고농도 2-MIB를 생산하였으며 동일한 분류군의 *Pseudanabaena* sp. FACHB 1277 strain (0.0076 pg cell<sup>-1</sup>)보다 3배 이상 높았다(Zhang *et al.*, 2016). 또한 대표적인 2-MIB 발생 분류군으로 알려진 *Planktothrix* sp. FACHB-1374 strain의 생산량(0.033 pg cell<sup>-1</sup>)과 큰 차이를 나타내지 않았다(Oh *et al.*, 2017). 이렇게 고농도 2-MIB를 생산하는 strain은 일본(Niiyama *et al.*, 2016; Shizuka *et al.*, 2020)과 중국(Zhang *et al.*, 2016; Rong *et al.*, 2018) 등 아시아 지역뿐만 아니라 미국(Izaguirre and Taylor, 1998; Izaguirre and Taylor, 2004)과 유럽(Giglio *et al.*, 2011)에서는 보고된 바 있으나 국내에서는 본 연구의 결과가 최초의 보고이다. 본 연구는 북한강 수계에서 발생하는 2-MIB의 원인종 및 관리방안에 중요한 자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료되며 NHUA202007-07 strain (*P. cinerea*)와 NHUA201911 strain (*P. redekei*)를 활용하여 다양한 환경조건에서 생리·생태적 연구가 진행된다면 북한강 수계에서 *Pseudanabaena*에 의한 2-MIB 발생을 보다 명확하게 이해할 수 있을 것이다.

## 적 요

이취미 물질인 2-MIB를 합성하는 원인종에 대한 정보는 담수생태계에서 이와 관련된 환경 및 경제적 문제를 해결하는 데 필수적이다. 본 연구는 북한강 수계에서 출현하는 *Pseudanabaena* strain을 분리·배양하고, 16S rDNA 염

기서열을 이용하여 종 수준의 동정과 2-MIB 합성 유전자 탐색을 통해 이취미 물질 발생 잠재성을 분석하였다. 북한강 본류 지역(삼봉리, 조암면, 의암호 지역)에서 분리한 *Pseudanabaena* strain은 총 11개로서 NHUA201911과 NHPD201909 strain을 제외하고 단일세포의 크기는 서로 유사하였다. 그러나 16S rDNA 계통분석을 통한 유전자 염기서열의 유연관계를 분석한 결과, 분리된 strain들은 총 5개 종(*P. cinerea*, *P. yagii*, *P. mucicola*, *P. galeata*, *P. redekei*)으로 분류되었다(40~55% 유사도). 2-MIB를 합성하는 *mibC* 유전자는 *P. cinerea* 07 strain (NHUA202007-07)와 *P. yagii* (NHUA202007-08), *P. redekei* (NHUA201911)에서만 발견되었으며, 가스크로마토그래피 분석에 따라 실질적인 2-MIB 합성은 *P. cinerea*와 *P. redekei* 중에서 확인되었다. 본 연구 결과는 분자생물학적 수준에서 북한강 수역에서 발생하는 *Pseudanabaena*속 남조류의 다양도에 대한 증거를 제공하는 연구로서 북한강 수계에서 2-MIB 생산 원인종에 대한 중요한 정보를 제공한다.

**저자정보** 김건희(건국대학교 상허생명과학대학 환경보건과학과 학술연구교수), 이세진(K-water, 한강유역본부 한강물관리처 물환경센터 과장), 서경화(K-water, 한강유역본부 한강물관리처 물환경센터 과장), 황순진(건국대학교 상허생명과학대학 환경보건과학과 교수)

**저자기여도** 개념설정: 김건희, 방법론: 김건희, 황순진, 분석: 김건희, 서경화, 자료제공: 서경화, 이세진, 원고초안작성 및 교정: 김건희, 황순진, 원고검토: 황순진, 과제관리: 김건희, 연구비 수주: 황순진

**이해관계** 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

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

## REFERENCES

- Acinas, S.G., T.H. Haverkamp, J. Huisman and L.J. Stal. 2009. Phenotypic and genetic diversification of *Pseudanabaena* spp. (cyanobacteria). *The ISME Journal* **3**(1): 31-46.
- Boopathi, T. and J.-S. Ki. 2014. Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. *Toxins* **6**(7): 1951-1978.
- Byeon, M.S., J.H. Byun, J.K. Im, Y.H. Jin, H.R. Noh, G.S. Kim, M.N. Yu, J.S. Baek, S.J. Youn, H.N. Kim, Y.B. Shim, S.N. Ham, G.H. Jeon, S.H. Lee, G.H. Kim, H.J. Lee and S.J.

- You. 2018. Molecular Biological Characteristics of Cyanobacteria Originated Off-flavor in Water (I), Han-River Water Environment Research Center National Institute of Environmental Research.
- Byeon, M.S., H.J. Yang, P.G. Kang, K.A. You, Y.H. Jin, T.J. Park, J.S. Moon, S.A. Yoon, J.Y. Park, S.J. Lee, H.S. Kim, S.S. Kim, S.-J. Hwang, B.-H. Kim, M.H. Park, C.H. Park, G.R. Lee, H.J. Park, E.J. Sung and I.H. Jo. 2013. The distribution and eco-physiological characteristics of harmful algae in the Han-river watershed, Ministry of Environment, Han River Watershed and Environment Management District.
- Byun, J.H., S.-J. Hwang, B.-H. Kim, J.-R. Park, J.-K. Lee and B.-J. Lim. 2015. Relationship between a Dense Population of Cyanobacteria and Odorous Compounds in the North Han River System in 2014 and 2015. *Korean Journal of Ecology and Environment* **48**(4): 263-271.
- Cho, K.-S., B.-C. Kim and W.-M. Heo. 1990. The succession of phytoplankton in Lake Soyang. *Physiology and Ecology Japan PEJAE* **6** 27.
- Churro, C., A.P. Semedo-Aguiar, A.D. Silva, J.B. Pereira-Leal and R.B. Leite. 2020. A novel cyanobacterial geosmin producer, revising GeoA distribution and dispersion patterns in Bacteria. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)* **10**(1): 8679.
- Ding, Z., S. Peng, W. Xia, H. Zheng, X. Chen and L. Yin. 2014. Analysis of five earthy-musty odorants in environmental water by HS-SPME/GC-MS. *International Journal of Analytical Chemistry* **2014**: ID 697260.
- Faldu, N., S. Patel, N.P. Vishwakarma, A.K. Singh, K. Patel and N. Pandhi. 2014. Genetic diversity of marine and fresh water cyanobacteria from the Gujarat state of India. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **5**(14): 1061.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**(4): 783-791.
- Giglio, S., W. Chou, H. Ikeda, D. Cane and P. Monis. 2011. Biosynthesis of 2-methylisoborneol in cyanobacteria. *Environmental Science & Technology* **45**(3): 992-998.
- Guillard, R.R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, Springer.
- HRWEMD. 2016. Investigation of causes of off-flavor material production by harmful algae and management strategy. Final Report.
- HRWEMD. 2019. Investigation of the outbreak causes and management measures of the taste and odor compound (2-Methylisoborneol) in the North Han River water system, Han River Watershed and Environment Management District, Han River Watershed and Environment Management District.
- Izaguirre, G. and W. Taylor. 2004. A guide to geosmin- and MIB-producing cyanobacteria in the United States. *Water Science and Technology* **49**(9): 19-24.
- Izaguirre, G. and W.D. Taylor. 1998. A *Pseudanabaena* species from Castaic Lake, California, that produces 2-methylisoborneol. *Water Research* **32**(5): 1673-1677.
- Jeong, J. 1993. Illustration of the freshwater algae of Korea, Academy books.
- Jeong, J.Y., S.H. Lee, M.R. Yun, S.E. Oh, T.H. Kim, M.H. Yoon and H.D. Park. 2020. Draft Genome Sequence of Putative 2-Methylisoborneol-Producing *Pseudanabaena yagii* Strain GIHE-NHR1, Isolated from the North Han River in South Korea. *Microbiology Resource Announcements* **9**(27): e00431-20.
- Ježberová, J. and J. Komárková. 2007. Morphometry and growth of three Synechococcus-like picoplanktic cyanobacteria at different culture conditions. *Hydrobiologia* **578**(1): 17-27.
- Kim, K.H., B.-J. Lim, K.A. You, M.H. Park, J.H. Park, B.-H. Kim and S.-J. Hwang. 2014. Identification and analysis of geosmin production potential of *Anabaena* stain isolated from North Han River using genetic methods. *Korean Journal of Ecology and Environment* **47**(4): 342-349.
- Kim, K.H., Y.D. Yoon, H.J. Cho and S.-J. Hwang. 2020. Molecular Probes to Evaluate the Synthesis and Production Potential of an Odorous Compound (2-methylisoborneol) in Cyanobacteria. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**(6): 1933.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**(6): 1547-1549.
- Li, J., M.-S. Han, S.-O. Hwang, M.-S. Byeun, S.-J. Hwang and B.-H. Kim. 2013. Molecular Identification of the Bloom-forming Cyanobacterium *Anabaena* from North HanRiver System in Summer 2012. *Korean Journal of Ecology and Environment* **46**(2): 301-309.
- Miya, M. and T. Sado. 2019. Environmental DNA sampling and experimental manual version 2.1. Ed. by eDNA Methods Standardization Committee, The eDNA Society.
- Moustafa, A., J.E. Loram, J.D. Hackett, D.M. Anderson, F.G. Plumley and D. Bhattacharya. 2009. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. *PLoS One* **4**(6): e5758.
- Nübel, U., F. Garcia-Pichel and G. Muyzer. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8): 3327-3332.
- Niiyama, Y., A. Tuji, K. Takemoto and S. Ichise. 2016. *Pseudanabaena foetida* sp. nov. and *P. subfoetida* sp. nov. (Cyanophyta/Cyanobacteria) producing 2-methylisoborneol from Japan. *Fottea* **16**(1): 1-11.
- Oh, H.-S., C.S. Lee, A. Srivastava, H.-M. Oh and C.-Y. Ahn. 2017. Effects of environmental factors on cyanobacterial production of odorous compounds: geosmin and 2-methylisoborneol. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**(7): 1316-1323.
- Park, J.-G. 2012a. Algal Flora of Korea-Freshwater cyanobacteria (I), Ministry of Environment, National Institute of Biological Resource.
- Park, J.-G. 2012b. Algal Flora of Korea-Freshwater cyanobacteria

- (II), Ministry of Environment, National Institute of Biological Resource.
- Pham, T.-L., M.H. Bui, M. Driscoll, K. Shimizu and U. Motoo. 2020. First report of geosmin and 2-methylisoborneol (2-MIB) in *Dolichospermum* and *Oscillatoria* from Vietnam. *Limnology* 1-14.
- Rong, C., D. Liu, Y. Li, K. Yang, X. Han, J. Yu, B. Pan, J. Zhang and M. Yang. 2018. Source water odor in one reservoir in hot and humid areas of southern China: occurrence, diagnosis and possible mitigation measures. *Environmental Sciences Europe* 30(1): 45.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4): 406-425.
- Shizuka, K., M. Ikenaga, J. Murase, N. Nakayama, N. Matsuya, W. Kakino, H. Taruya and N. Maie. 2020. Diversity of 2-MIB-Producing cyanobacteria in Lake Ogawara: microscopic and molecular ecological approaches. *Aquaculture Science* 68(1): 9-23.
- Tamura, K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3): 512-526.
- Tuji, A. and Y. Niiyama. 2018. Two new *Pseudanabaena* (Cyanobacteria, Synechococcales) species from Japan, *Pseudanabaena cinerea* and *Pseudanabaena yagii*, which produce 2-methylisoborneol. *Phycological Research* 66(4): 291-299.
- Wang, Z., J. Shao, Y. Xu, B. Yan and R. Li. 2015. Genetic basis for geosmin production by the water bloom-forming cyanobacterium, *Anabaena ucrainica*. *Water* 7(1): 175-187.
- Whangchai, N., T. Pimpimon, U. Sompong, S. Suwanpakdee, R. Gutierrez and T. Itayama. 2017. Study of Geosmin and 2-Methylisoborneol (MIB) Producers in Phayao Lake, Thailand. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* 7(3): 2010-3638.
- You, K.A., M.S. Byeon, S.J. Youn, S.-J. Hwang and D.H. Rhew. 2013. Growth characteristics of blue-green algae (*Anabaena spiroides*) causing tastes and odors in the North-Han River, Korea. *Korean Journal of Ecology and Environment* 46(1): 135-144.
- Zhang, T., L. Zheng, L. Li and L. Song. 2016. 2-Methylisoborneol production characteristics of *Pseudanabaena* sp. FACHB 1277 isolated from Xionghe Reservoir, China. *Journal of Applied Phycology* 28(6): 3353-3362.