

Original article

## 담수환경에서 eDNA와 eRNA를 이용한 Microcystin 합성 남조류 탐색 및 세포 내 Microcystin 생합성 활성 변화

김건희 · 박채홍 · 조현진<sup>1</sup> · 권대률<sup>2</sup> · 황순진<sup>3,\*</sup>

건국대학교 상허생명과학대학 휴먼엔에코케어센터, <sup>1</sup>전남대학교 생물학과,  
<sup>2</sup>국립낙동강생물자원관 미생물연구실 원생생물연구팀, <sup>3</sup>건국대학교 환경보건과학과

**Detection of Microcystin Synthetic Cyanobacteria and Variation of Intracellular Microcystin Synthesis Using by eDNA and eRNA in Freshwater Ecosystem.** Keonhee Kim (0000-0002-5725-1447), Chaehong Park (0000-0003-1080-0733), Hyeonjin Cho<sup>1</sup> (0000-0003-0591-519X), Daeryul Kwon<sup>2</sup> (0000-0001-5237-5275) and Soon-Jin Hwang<sup>3,\*</sup> (0000-0001-7083-5036) (Human and Eco Care Center, College of Sang-huh Life Science, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea; <sup>1</sup>Department of Biology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea; <sup>2</sup>Protist Research Team, Microbial Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Republic of Korea; <sup>3</sup>Department of Environmental Health Science, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea)

**Abstract** Targeting Microcystin (MC), which is most abundantly detected in the North-Han River water area, we analyzed the relationship between the MC biosynthesis gene (*mcyA* gene), cyanobacteria cell density, and MC concentration, derived an RNA-MC conversion formula, and derived the cyanobacteria. The concentration of MC present in cells was predicted. In the North-Han River waters, the *mcyA* gene was found mainly at downstream sites of the North-Han River after Muk-Hyeon Stream junction, and higher copy numbers were found on average than other sites. In the Uiam Lake waters upstream of the North-Han River, the *mcyA* gene copy number increased at the Kong-Ji Stream point, and after September, the *mcyA* gene copy number decreased throughout the North-Han River waters. The expression of the *mcyA* gene was concentrated in the short period of summer due to the spatio-temporal difference between upstream and downstream water bodies. The *mcyA* gene expression level was not only highly correlated with MC concentration, but also correlated with the cell density of *Microcystis aeruginosa* and *Dolichospermum circinale*, which are known to biosynthesize MC. Six conversion formulas derived based on the RNA-MC relationship showed statistical significance ( $p < 0.05$ ) and exhibited high correlation coefficients ( $r$ ) of 0.9 or higher. The expression level of MC biosynthesis gene present in eRNA determines the synthesis of cyanotoxin substances in water, quickly quantifies gene activity, and can be fully utilized for early warning of MC development.

**Key words:** cyanobacteria, microcystin, *mcyA*, environmental DNA, environmental RNA

## 서 론

Manuscript received 24 February 2023, revised 15 March 2023,  
revision accepted 16 March 2023  
\* Corresponding author: Tel: +82-2-450-3748,  
E-mail: sjhwang@konkuk.ac.kr

담수생태계의 부영양화로 인한 유해 남조류 대발생은  
전 세계적으로 빈번하게 발생하고 있으며 40종 이상의 남

© 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.

조류가 생산하는 다양한 남조독소(Cyanotoxin)는 수생태계 건강성을 악화시키고 수자원 이용에 경제적 피해를 줄 수 있다(Christoffersen and Kaas, 2000; Olsen *et al.*, 2016). Microcystin을 비롯한 다양한 남조독소는 세포 성장 기간 동안 세포 내부에서 합성 및 축적되며 세포가 사멸할 때 수중으로 용출된 남조독소를 물리적으로 제어하는 것은 매우 어렵다(Zamyadi *et al.*, 2012; Sklenar *et al.*, 2016; Waters and Dugan, 2016). 따라서 수중의 남조독소를 효율적으로 제어하기 위해 세포 내부에 존재하는 남조독소의 생합성을 신속히 파악하는 것은 상수원 관리 측면에 있어서 매우 중요하다.

많은 연구에서 남조류의 남조독소 생합성을 신속히 파악하기 위해 남조독소 농도를 측정하였으며 대표적으로 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 분석법과 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 분석법이 사용되었다(Chorus and Bartram, 1999; Mathys and Surholt, 2004; Qu *et al.*, 2013; Shamsollahi *et al.*, 2015). 하지만 ELISA 분석법은 신속하게 남조독소를 분석할 수 있으나 남조독소의 존재상태(입자성, 용존성)를 구분하지 않고 측정하기 때문에 유해 남조류의 남조독소 합성상태를 정확히 파악하기 어렵다(Crush *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2017). HPLC 분석법은 현재 남조독소 분석 방법 중에서 가장 정확한 분석이 가능하지만 전처리와 분석을 위해 많은 시간이 소요되며(McElhiney and Lawton, 2005; Shabnam, 2013), 초음파 파쇄 과정에서 고온으로 인한 남조독소 물질의 손실이 발생할 수 있다(MOE, 2016). 뿐만 아니라 ELISA 분석법과 HPLC 분석법 모두 생합성이 완료된 단백질을 분석하며, 독소 단백질은 세포 내부에서 분해되지 않고 10일 이상 장기간 존재하기 때문에 특정 시기의 정확한 남조독소의 농도를 측정하기는 어렵다(Chen *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2016). 또한 남조독소 합성은 독소 형성 유전자의 genotype과 같이 유전적 요인이 독소합성의 첫 번째 요인으로 작용하기 때문에 유전자 발현 이후 단백질 수준에서만 남조독소 농도를 모니터링하는 것은 남조독소의 합성활성에 대한 불확실성을 가지고 있다(Vezie *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000; Vaitomaa *et al.*, 2003; Boopathi and Ki, 2014).

이러한 물질수준의 남조독소 모니터링 한계점을 개선하고자 최근 분자유전학적 방법으로써 환경에 존재하는 생물체의 유전물질을 탐색하는 방법이 거론되었다. 특히 eDNA (environmental DNA) 기반의 유전자 탐색법은 수체의 eDNA에서 남조독소 형성 유전자를 탐색하고 이를 기반으로 유해 남조류의 분포를 파악함과 동시에 남조류가 대발생하기 이전에 유해물질 발생 가능성을 판단할 수 있고 유전자 primer에 따라서 종 수준의 특이성을 확인할 수 있다(Tamura and Nei, 1993; Ueno *et al.*, 1996; Vaitomaa *et al.*,

2003; Tsao *et al.*, 2014; Savela *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2018b). 뿐만 아니라 eRNA (environmental RNA) 발현 분석을 통해 남조류의 남조독소 합성시기를 판단할 수 있으며 이를 통해 대발생하는 남조류의 독소물질 생합성 활성 여부를 판단할 수 있다(Stelzer *et al.*, 2013). 따라서 환경 유전자를 이용한 유해 남조류 탐색법은 HPLC와 ELISA 분석법보다 다양한 생태적 정보를 제공할 수 있으며 이는 상수원에서 대발생하는 유해 남조류의 특성을 빠르게 파악하고 이들의 분포를 파악하는 데 매우 유용하다(Kim *et al.*, 2018b; Chun *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020).

본 연구는 담수환경의 eDNA와 eRNA에 존재하는 남조독소 형성 유전자 중 Microcystin 생합성 유전자(*mcyA*)를 분석하여 잠재적인 Microcystin 생합성 남조류의 분포 및 Microcystin 생합성 활성 변화를 파악하였으며 이를 통해 수 환경에 분포하는 유전물질과 유해남조류 및 남조독소 사이의 관계를 파악하였다.

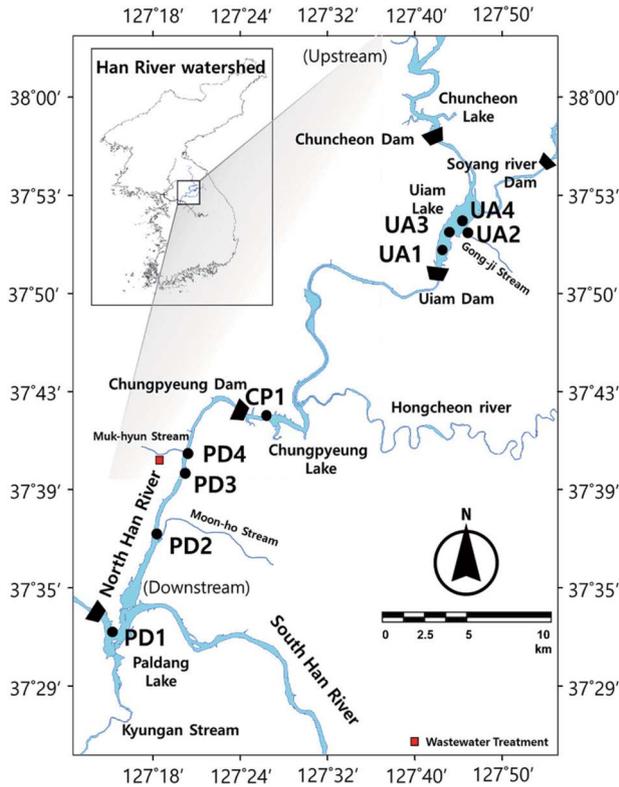
## 재료 및 방법

### 1. 조사지점 및 시료채집

북한강 수역의 9개 지점에서 2015년 1월~2016년 3월까지 매월 1회(n=14) 조사하였다(Fig. 1). 모든 지점에서 Vandorn water sampler (Geo Scientific Ltd, Vancouver, Canada)를 사용하여 표층 30 cm 내외의 현장수를 채집하였고 2 L 채수병과 250 mL PET 병에 각각 옮겨 담았다. 현장에서 채수한 시료는 냉암소 조건에서 24시간 안에 실험실로 운반하였다. 2 L 채수병의 현장수에서 1.5 L는 microcystin 형성 유전자(*mcyA*) 분석에 사용하였고, 500 mL는 수중의 microcystin 농도를 분석하는 데 사용하였다. 250 mL PET 병의 현장수는 Lugol 용액으로 고정된 후 실험실에서 남조류 세포를 계수하였다.

### 2. eDNA와 eRNA 추출

실험실로 운반한 현장수는 GF/F glass fiber filter (pore size: 0.7  $\mu$ m, diameter: 45 mm, Whatman Co., UK)와 polycarbonate membrane filter (pore size: 1.0  $\mu$ m, diameter: 45 mm, Whatman Co., UK)로 여과하여 남조류 세포를 농축하였으며 *mcyA* 유전자의 시·공간적 분포와 유전자 발현량을 파악하기 위해 eDNA와 eRNA를 추출하였다. 각 시료의 여과량은 여과지의 폐쇄현상이 발생하기 직전까지 여과하였으며, 매번 여과량을 기록하였다. eDNA를 추출하기 위해 Freezing thaw 방법과 Bead beating 방법으로 GF/F



**Fig. 1.** Map of North-Han River watershed and sampling sites. PD, CP and UA indicate Paldang, Chungpyeung and Uiam, respectively.

glass fiber filter로 여과된 남조류 세포를 물리적으로 파쇄하였으며 kit (Nucleospin soil kit, Macherey-nagel, Düren, Germany)의 protocol에 따라서 eDNA를 추출하였다(Lazarovic *et al.*, 2013).

eRNA를 추출하기 위해 Trizol 성분의 Riboex 용액을 사용하였으며 polycarbonate membrane filter에 존재하는 남조류 세포의 RNA를 용출하였다. 용출된 RNA는 RNA purification kit (Hybrid-R™, Geneall, Korea)를 사용하여 정제하였다. eDNA와 eRNA 추출을 확인하기 위해 E-gel™ Power Snap Electrophoresis system (ThermoFisher Scientific, USA)의 2% agarose gel에서 전기영동을 수행하였고 E-gel™ Power Snap Camera (ThermoFisher Scientific, USA)로 증폭산물을 확인하였다. 전기영동에서 유전자 band가 확인된 시료는 Nanodrop (One, Thermo Scientific Co., Waltham, USA)으로 농도를 측정하였다.

### 3. eDNA와 eRNA의 정량분석(Quantitative analysis)

수층에서 *mcyA* 유전자를 탐색하고 DNA copy number와 유전자 발현량을 분석하기 위해 quantitative PCR 분석을 수

행하였다. *mcyA* gene primer는 문헌에서 보고된 *mcyA*-Cd 1F (5'-AAA AGT GTT TTA TTA GCG GCT CAT-3')와 *mcyA*-Cd 1R (5'-AAA ATT AAA GCC GTA TCA AA-3')를 사용하였다(Hisbergues *et al.*, 2003). *mcyA* 유전자 발현(RNA gene expression)은 RNA 염기서열의 상보적인 DNA (complementary DNA: cDNA)를 사용하여 quantitative PCR 분석하였다. cDNA를 합성하기 위해 Easy cDNA synthesis Kit (EcDNA100, Nanohelix Co., Daejeon, Korea)를 사용하였으며 kit의 protocol에 따라 2 step으로 나누어 수행하였다. 합성된 cDNA는 quantitative PCR 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다.

DNA와 RNA의 copy number를 분석하기 위해 polymerase와 mixture를 혼합한 후 quantitative PCR machine (Rotorgene, TAKARA, Japan)으로 분석하였다. Polymerase는 intercalate type의 2× Real-Time PCR Master Mix: including SFCgreen® I in mixture (DQ362-40h, Biofact Co., Korea)를 사용하였으며 정량분석을 위해 PCR Master Mix 10 μL, forward primer (10 pmole μL<sup>-1</sup>) 1 μL, reverse primer (10 pmole μL<sup>-1</sup>) 1 μL, template DNA 3 μL, nuclease free water 5 μL를 모두 혼합하였다. 분석 조건은 95°C에서 15 min 동안 반응한 후 95°C에서 5 sec, 62°C에서 10 sec, 72°C에서 15 sec 과정을 35회 반복하였으며 72°C 단계에서 형광값을 측정하였다. Quantitative PCR 분석에서 각 유전자 Ct 값 계산과 copy number ( $N_{CN}$ )는 표준곡선 식(Equation 1)을 이용하여 산출하였다(Oh, 2009).

$$N_{cn} = \frac{C_T \times A_N}{S_A \times MW_{bp} \times 10^6} \quad (1)$$

$A_N$ 는 아보가드로의 수,  $MW_{bp}$ 는 염기쌍의 평균 분자 무게,  $S_A$ 는 *Microcystis*의 genome 크기,  $C_T$ 는 외부 표준곡선을 통해 계산된 DNA 시료의 대상유전자 copy number를 의미한다. 표준곡선을 산출하기 위해 표준 남조류 strain으로 *Microcystis aeruginosa* UTEX 2385를 사용하였으며 cloning method를 사용하여 표준곡선의 copy number를 계산하였다(Oh, 2009).

### 4. 남조류 세포밀도 및 Microcystin (MC) 분석

Lugol 용액으로 고정한 시료는 72 hr 이상 자연침강으로 농축하였다. 농축한 시료는 균일하게 혼합한 후 1 mL를 Sedgwick-Rafter counting chamber에 옮겨 담고 10 min 이상 침전시켜 광학현미경으로 관찰하였다. 출현종의 동정을 위한 형태적 특징은 광학현미경에 부착된 카메라로 단일세포의 형태를 촬영하였으며 세포 길이(μm), 폭(μm), 형태 등

을 문헌 및 도감(Jung, 1993; Park, 2012a, b)과 비교하였다.

Microcystin (MC) 분석은 먹는 물 감시 공정시험법에 따라서 수행하였다(MOE, 2016). MC는 4가지 형태를 모두 측정하였으며 전체를 합산한 농도를 총 MC 농도로 판단하였다. 현장수 10 mL를 초음파 파쇄기를 이용하여 30 min 동안 세포를 파쇄한 후, 현미경으로 세포 파쇄를 확인하였으며 파쇄가 90% 이상 발생하지 않았을 경우에는 동일한 과정을 반복하였다. 세포 파쇄 이후 주사기필터(syringe filter, pore size: 0.25  $\mu\text{m}$ , Whatman, UK)를 사용하여 세포 잔여물(cell debris)을 여과하였다. 여과한 시료를 고상 카트리지에 통과시켜 MC를 추출하였으며 추출된 MC 시료를 liquid chromatography/mass spectrophotometer (Agilent, USA)의 ODS  $\text{C}^{18}$  컬럼을 사용하여 분석하였다. MC 농도는 대상 체류시간에 발생한 chromatogram peak 면적을 통해 계산하였다.

## 5. 통계분석

수층에서 *mcyA* DNA copy number와 *mcyA* RNA copy number를 heatmap으로 분석하였다. DNA와 RNA 모두 copy number  $\text{mL}^{-1}$  단위로 계산된 자료를 사용하였으며, R window (version 3.6.0, Boston, USA)와 R studio (version 1.1.463, Boston, USA)를 사용하여 자료를 분석하였고 ggplot2 package (version 3.1.1)의 2d heatmap package를 사용하여 분석 결과를 확인하였다(Wickham, 2016). R에서 분석한 heatmap 결과는 Datagraph 프로그램(version 4.4, Visual Data Tools Inc., Chapel Hill, North Carolina, USA)에 입력하여 시각화하였다.

수층의 MC 농도와 *mcyA* RNA expression 사이의 회귀 방정식을 도출하기 위해 각각 8개 data를 excel sheet에서 indirect 함수와 rand 함수를 사용하여 gene expression 값을 무작위 추출(Random sampling)하였다. 추출된 RNA 발현 값과 동일한 시기의 MC 농도값을 이용하여 무작위 표본 회귀공식을 산출하였다. 50회 이상 무작위 추출하였고 MC 농도와 *mcyA* RNA expression 사이의 상관관계수( $r$ )가 0.9 이상인 표본 회귀공식을 선별하였다. 또한 남조류 세포밀도, MC 농도, *mcyA* DNA copy number, *mcyA* RNA expression 양 사이의 상관관계를 분석하기 위해 R window와 R studio의 performance analytics package (version 3.6.3)의 Chart Correlation tool 분석을 사용하였다(Peterson *et al.*, 2018).

## 결 과

### 1. 수층에서 *mcyA* DNA copy number의 시·공간적 변이

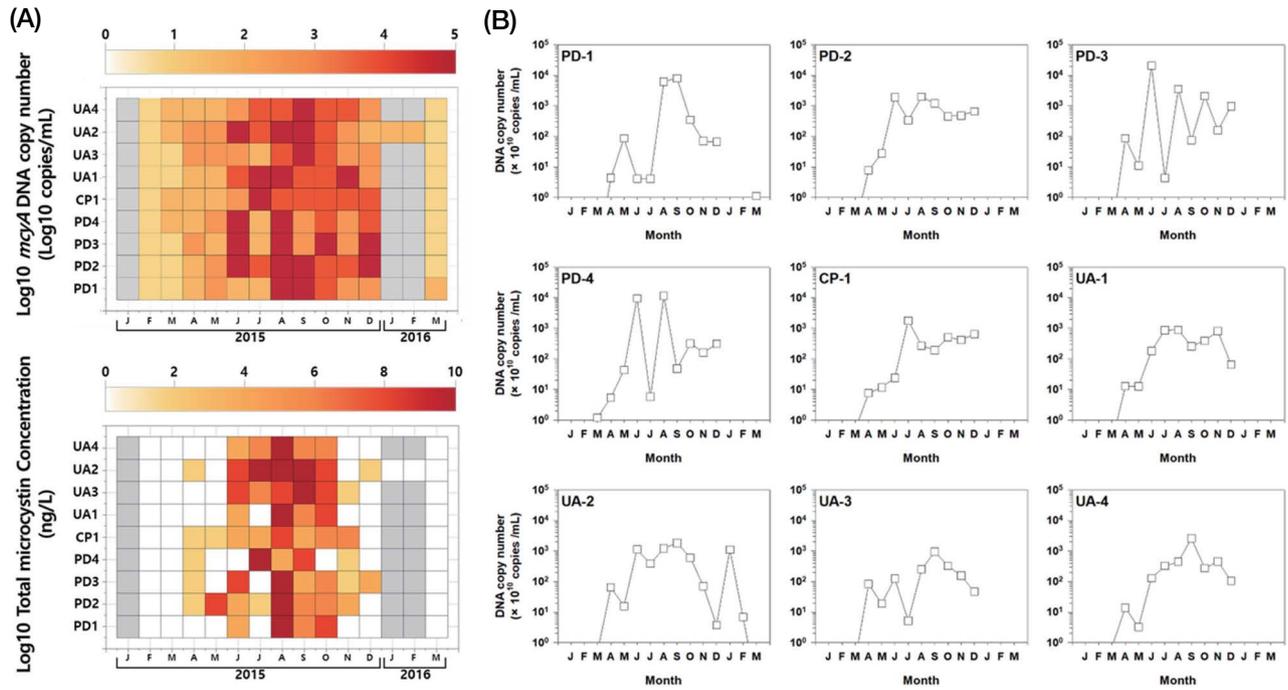
모든 지점에서 *mcyA* DNA는 6월에서 12월 사이에 주로

발생하였으며, 또한 상류수역과 하류수역의 *mcyA* DNA 발생은 시간적 차이가 존재하였다(Fig. 2A). 8~9월 사이에 copy number가 매우 높았으며 주로 하류수역(PD1~PD4)에서 높은 copy number가 발견되었다. *mcyA* DNA는 6월에 급증하였으며 하류수역(PD2~PD4)에서 평균  $5.8 \times 10^{14}$  copies  $\text{mL}^{-1}$ 으로 상류수역(CP1~UA4)보다 9배 높았다. 특히 묵현천이 유입되는 PD3와 PD4 지점이  $7.5 \times 10^{14}$  copies  $\text{mL}^{-1}$ 으로 가장 높았다(Fig. 2B). 8월에는 팔당댐을 포함하는 하류수역 모든 지점에서 *mcyA* DNA copy number가 평균  $1.0 \times 10^{14}$  copies  $\text{mL}^{-1}$  이상 급격히 증가하였으며 상류는 의암댐(UA1) 지점과 공지천(UA2)에서도  $8.6 \times 10^{12} \sim 1.2 \times 10^{13}$  copies  $\text{mL}^{-1}$ 으로 copy number가 높았다. *mcyA* DNA copy number가 급격히 증가한 8월에는 수층의 남조류 밀도 역시 급격히 증가하였다. 하류수역은 9월에 copy number가 감소하였으나 상류수역은 8월보다 5배 이상 증가하였다(Fig. 2B). 의암댐을 비롯하여 의암호 내 지점 전체에서  $8.5 \times 10^{12} \sim 2.6 \times 10^{13}$  copies  $\text{mL}^{-1}$ 의 높은 copy number가 분포하였다. 9월 이후 대부분 지점에서 *mcyA* DNA는 11월까지 감소하였으며 특히 UA2 지점은 11월에  $3.7 \times 10^{10}$  copies  $\text{mL}^{-1}$ 으로 가장 낮았다. 하지만 묵현천이 합류하는 지점(PD3)은 *mcyA* DNA copy number가 10월과 12월에 일시적으로  $2.1 \times 10^{13}$  copies  $\text{mL}^{-1}$ 까지 급증하였으며 12월에는 PD3 지점뿐만 아니라 PD2 지점까지 copy number가 일시적으로  $8.2 \times 10^{12}$  copies  $\text{mL}^{-1}$  이상 급격히 증가하였다(Fig. 2B). CP1과 PD4 지점에서도 10월과 12월에 *mcyA* DNA copy number가 증가하였으나  $3.1 \times 10^{12} \sim 5.1 \times 10^{12}$  copies  $\text{mL}^{-1}$ 으로 PD3와 PD2보다 낮았다(Fig. 2).

북한강 수역에서 *mcyA* DNA는 주로 묵현천 합류 이후 하류에서 관찰되었으며 다른 지점보다 평균적으로 높은 copy number가 검출되었다. 상류의 의암호 수역은 공지천에서 가장 먼저 *mcyA* DNA copy number가 증가하였으며 이후 9월에는 의암호 수역 전체에서 copy number가 증가하였다. 9월 이후 대부분의 지점에서 *mcyA* DNA copy number는 점차 감소하였으나 묵현천의 영향을 받는 PD2 지점과 PD3 지점은 12월까지 *mcyA* DNA copy number의 일시적인 증가를 확인하였다.

### 2. 수층에서 *mcyA* 유전자 발현(RNA gene expression)의 시·공간적 변이

북한강 수역에서 *mcyA* 유전자 발현(RNA gene expression)은 6~9월 사이에 매우 짧은 시간 동안 관찰되었으며 발현량 증가는 청평댐을 기준으로 상류와 하류수역에서 시간적 차이가 존재하였다(Fig. 3A). 6월에 *mcyA* 유전자의 발현



**Fig. 2.** Spatio-temporal distribution of microcystin producgin gene (*mcyA*) and microcystin concentration in the surface water of the North-Han River during January 2015~March 2016. (A) The heatmap shows log transformed copy numbers of *mcyA* DNA potential and Microcystin concentration. Grey color squares indicate sites that were not sampled because of ice cover. (B) Line graph shows log transformed copy number of *mcyA* DNA.

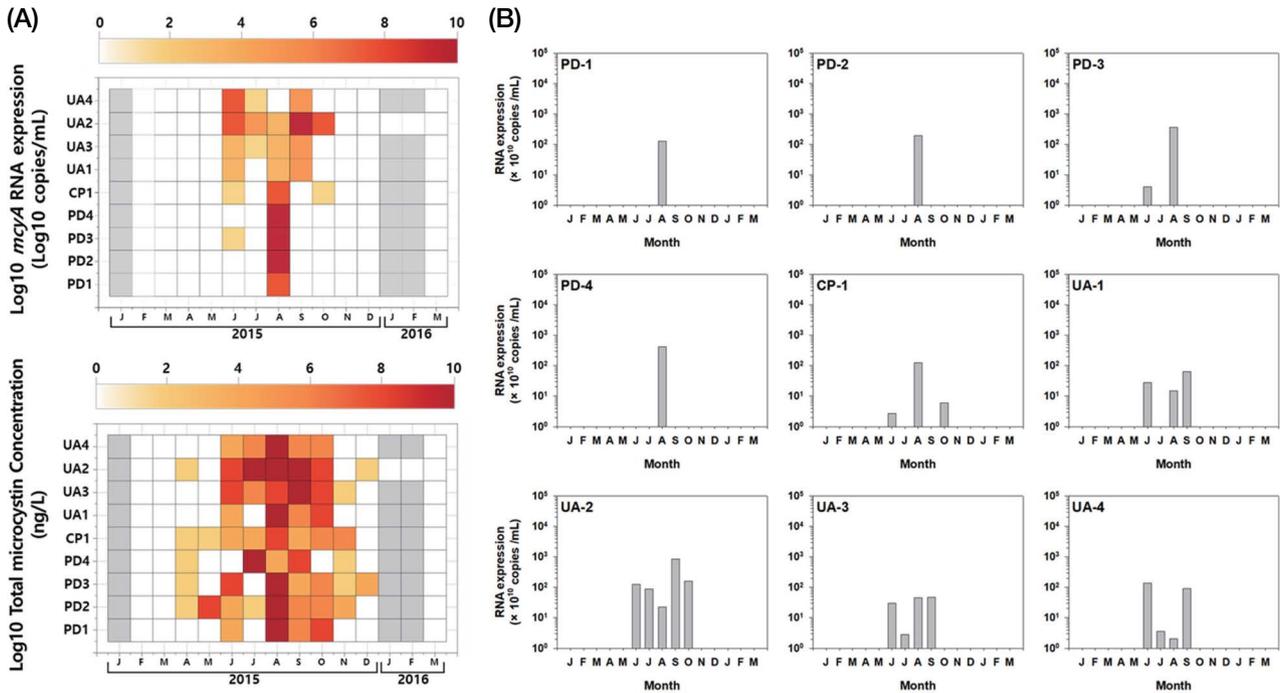
이 관찰되기 시작하였으며 공지천(UA2)과 인근지점(UA3, UA4)에서  $1.0 \times 10^{13}$  copies  $\text{mL}^{-1}$  이상으로 다른 지점의 발현량보다 3배 이상 높았다. 공지천 지점(UA2)과 의암호 내 지점(UA3)은 6월부터 9월까지 지속적으로 *mcyA* gene expression이 관찰되었으며 UA2 지점은 9월에 발현량이  $8.5 \times 10^{13}$  copies  $\text{mL}^{-1}$  이상 급증하여 북한강 수역 전체에서 발현량이 가장 높았다(Fig. 3B). UA2 지점은 10월에  $1.0 \times 10^{13}$  copies  $\text{mL}^{-1}$ 이 발현하였으며 가장 늦은 시기까지 *mcyA* gene expression이 관찰되었다. 이와 반대로 청평댐 하류수역에서 *mcyA* gene expression은 6월에 청평댐과 목현천 합류 지점에서만 관찰되었으나 8월에 청평댐 하류수역 모든 지점에서 *mcyA* gene expression이 급격히 증가하였다(Fig. 3A). 8월에 청평댐 하류수역의 *mcyA* gene expression은 평균  $4.3 \times 10^{13}$  copies  $\text{mL}^{-1}$ 으로 청평댐 상류수역보다 10배 이상 높았으며 특히 PD2 지점에서  $7.6 \times 10^{13}$  copies  $\text{mL}^{-1}$ 으로 북한강 수역 전체에서 발현량이 가장 높았다(Fig. 3B). 8월 이후 청평댐 하류수역에서 *mcyA* gene expression은 급격히 감소하였으며 9월부터 수중에서 *mcyA* gene expression은 발견되지 않았다(Fig. 3A).

북한강 수역에서 MC 합성에 관여하는 *mcyA* gene expression은 시·공간적인 차이가 존재하였으며 오랜 시간에 걸

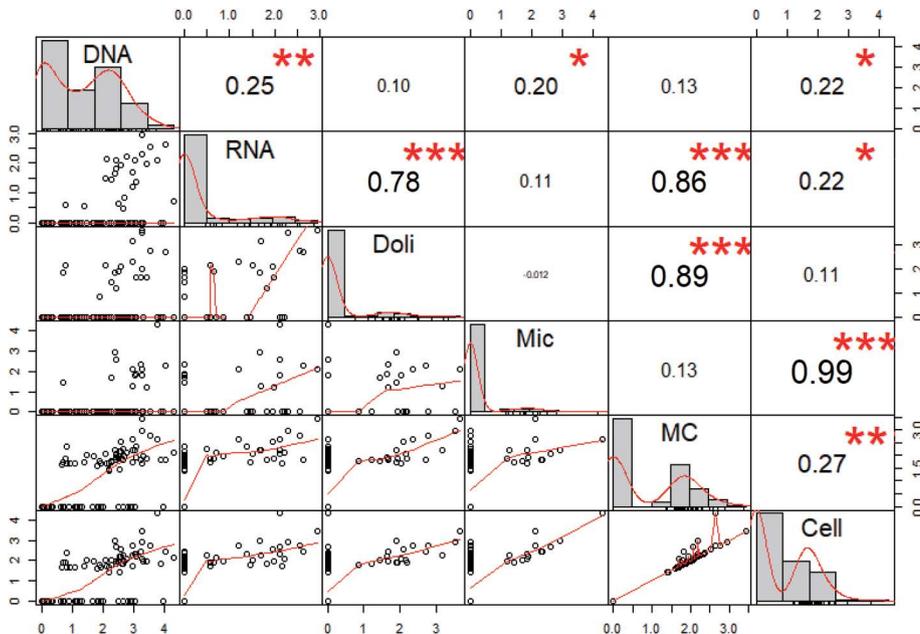
쳐서 지속적으로 발현하기보다는 여름철 짧은 시기에 집중적으로 발현하였다. 수체에서 *mcyA* gene expression의 시·공간적 변화는 MC 농도 변화와 유사한 발생 특성을 나타내었을 뿐만 아니라 수중의 *Dolichospermum circinale*와 *Microcystis aeruginosa*의 세포밀도 변화와 유사하였다(Fig. 3, Supplementary data 1).

### 3. eRNA발현과 Microcystin (MC) 농도 사이의 관계

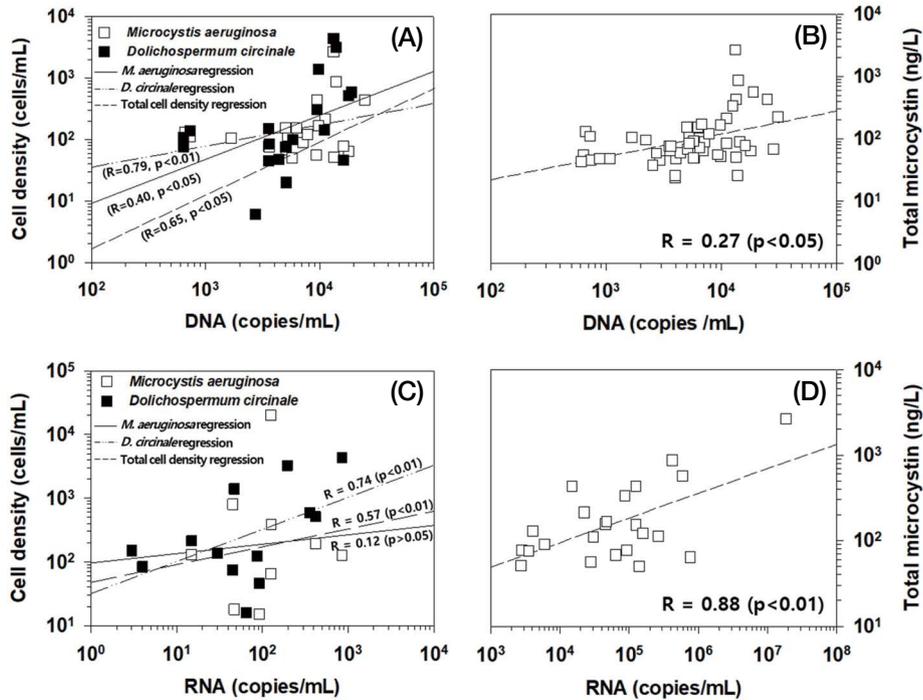
북한강 수역에서 분석된 *mcyA* 유전자 DNA copy number와 RNA expression은 남조류 세포밀도 및 MC 농도와 양의 선형적 관계가 존재하였다(Fig. 4) (Supplementary data 1). *mcyA* DNA는 남조류 세포밀도와 비교하였을 때 통계적으로 유의하였으나( $r=0.22$ ,  $p<0.05$ ) 이러한 선형적 관계는 *D. circinale*와 *M. aeruginosa*에서 서로 다르게 나타났다. *mcyA* DNA copy number는 *M. aeruginosa* 세포밀도와 상관계수는 낮지만( $r=0.20$ )  $p<0.05$  수준에서 통계적으로 유의하였고 *D. circinale*의 세포밀도와는 유의한 상관성을 나타내지 않았다. 수중의 MC 농도는 *mcyA* DNA copy number와 상관도가 낮고 통계적인 유의성이 존재하지 않았다(Fig. 4). *mcyA* DNA copy number와 세포밀도 사이의 관계를 보다 정확하게 파악하기 위해 *M. aeruginosa*와 *D. circinale*의



**Fig. 3.** Spatio-temporal distribution of *mcyA* gene expression and microcystin concentration in the surface water of the North-Han River during January 2015~March 2016. (A) The heatmap shows log transformed gene expression of *mcyA* and microcystin concentration. Grey color squares indicate sites that were not sampled because of ice cover. (B) Bar graph shows log transformed gene expression of *mcyA*.



**Fig. 4.** Chart correlation of *mcyA* gene copies ( $\text{copies mL}^{-1}$ ), *mcyA* gene expression, cyanobacterial cell density, and microcystin concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in lake water samples. Spearman correlation coefficients ( $\rho$ ) between two variables are shown in the boxes on the top right, bivariate scatter plots on the bottom left, histogram of each variable on the diagonal, and significance levels are shown as stars ( $p < 0.001$ \*\*\*;  $p < 0.01$ \*\*;  $p < 0.05$ \*). Doli means *Dolichospermum circinale*, Mic means *Microcystis aeruginosa*, MC means Microcystin and Cell means Total cell density.



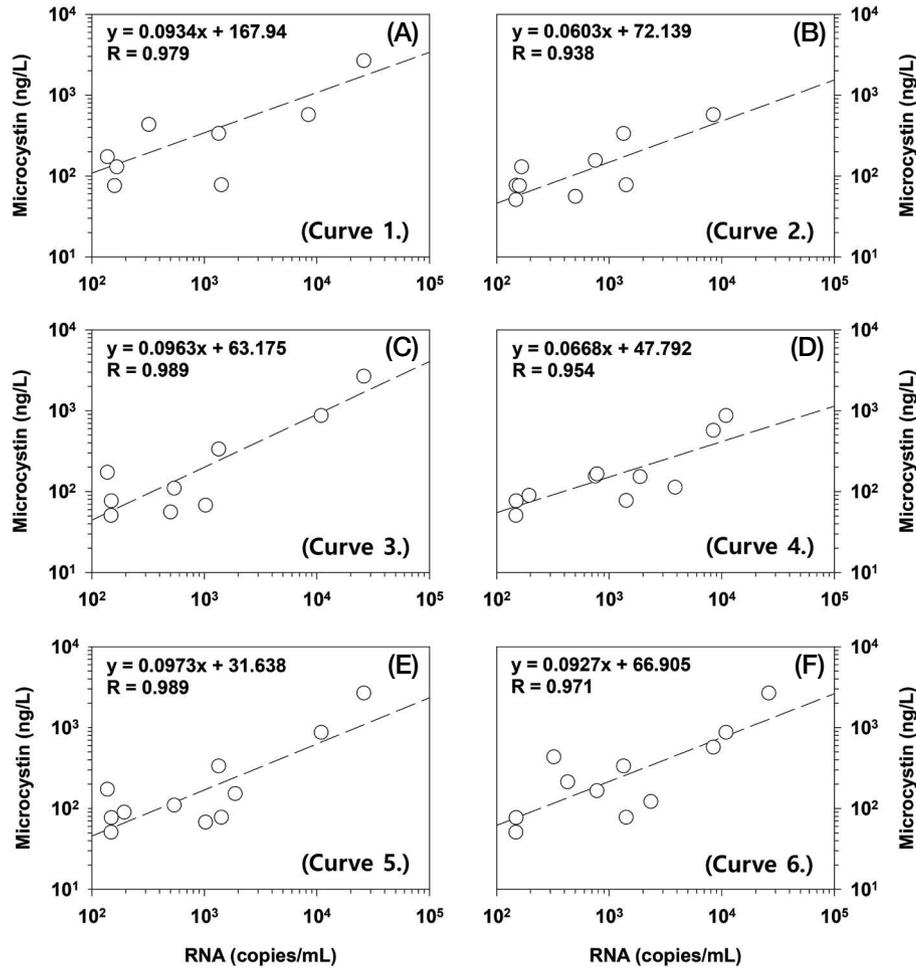
**Fig. 5.** Relation among microcystin producing gene (*mcyA*), cyanobacterial cell density, and concentration of harmful materials detected in the water column of study sites of the North Han River from January 2015 to March 2016. Cyanobacterial cell density combine *M. aeruginosa* and *D. circinale* was known that producing microcystin in study site.

세포밀도와 *mcyA* DNA 또는 *mcyA* RNA가 모두 발견된 자료를 추출하였다(Fig. 5). Chart correlation 분석과 다르게 *M. aeruginosa*와 *D. circinale* 세포밀도 합은  $p < 0.05$  수준에서 *mcyA* DNA copy number와 상관성이 존재하였으며 각각의 분류군에서도 *mcyA* DNA copy number와  $p < 0.01$  및  $p < 0.05$  수준에서 상관관계가 존재하였다(Fig. 5). MC 농도는 *mcyA* DNA copy number와  $p < 0.05$  수준에서 상관관계가 존재하였으나 상관계수가 0.27로 매우 낮았다.

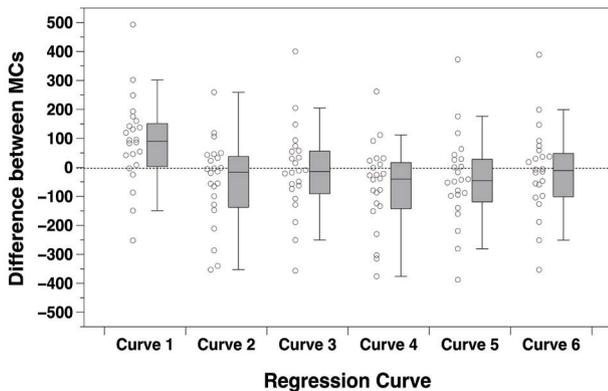
*mcyA* RNA expression과 *M. aeruginosa*와 *D. circinale* 세포밀도 총합 사이에는 상관계수가 높지 않았으나( $r = 0.57$ )  $p < 0.01$  수준의 통계적 유의성이 존재하였다(Fig. 4). 두 남조류 분류군을 각각 나누어 비교하였을 때 분류군에 따라서 *mcyA* RNA expression과 상관관계는 서로 다르게 나타났으며 *D. circinale* 세포밀도와는  $p < 0.01$  수준의 상관관계가 존재하였으나( $r = 0.74$ ) *M. aeruginosa* 세포밀도와는 *mcyA* RNA expression에 대하여 상관계수가 0.12로 매우 낮을 뿐만 아니라 통계적 유의성이 존재하지 않았다(Fig. 5A, C). *mcyA* RNA expression과 MC가 모두 검출된 시료는 총 24개로써 MC 농도는  $50 \sim 2,671 \text{ ng L}^{-1}$ 의 범위를 나타냈다(Supplementary data 1). 24개 시료의 *mcyA* RNA expression과 MC 농도 사이의 상관관계는 chart correlation 분석의 상

관계수보다 조금 높았으며( $r = 0.88$ )  $p < 0.01$ 로 통계적으로 매우 유의하였다(Fig. 5B, D).

*mcyA* gene expression과 MC 농도 사이의 관계를 보다 명확하게 분석하기 위해 *mcyA* gene expression과 MC 농도가 모두 검출된 24개의 시료 중에서 8개의 시료를 무작위 추출(Random sampling)한 결과 6개의 무작위 표본을 선정하였고 이들의 회귀방정식을 산출하였다(Fig. 6). 6개 무작위 표본의 상관계수는 0.938~0.989로 매우 높았으며 모두 양(positive)의 선형상관관계를 나타내었다. 6개의 회귀방정식을 사용하여 수중의 *mcyA* gene expression을 기반으로 예측된 MC (cMC: calculated MC)의 농도는 실제 측정된 MC (aMC: analyzed MC)의 농도보다 높게 계산되었다(Fig. 7). 6개의 회귀방정식을 이용하여 계산된 cMC의 평균 농도는  $185 \sim 359 \text{ ng L}^{-1}$  범위로 cMC의 농도와 aMC 농도 차이는  $-119 \sim 55 \text{ ng L}^{-1}$  범위로서 2배 이상의 큰 차이가 존재하였다(Fig. 7). 1번 회귀식을 제외하고 2번~6번 회귀식의 cMC 농도는 aMC보다 낮았으며 1번 회귀식의 cMC는 대부분 aMC보다 최소 1.5배 이상 높았다. 전체 회귀식 중에서 6번 회귀식의 cMC가 aMC와 가장 유사하였으나 대부분 계산된 결과는 실측 농도보다 낮게 계산되었다(Fig. 7).



**Fig. 6.** Relationship between RNA gene expression and microcystin concentration. All plot that composed each regression curve has random sampling from analyzed data in surface water.



**Fig. 7.** Range of differences for calculated microcystin using regression curve and analyzed microcystin analyzed using HPLC. All samples collected in the surface water. Each circle plot beside the box plot means raw value of difference between analyzed and calculated.

## 고 찰

많은 연구에서 유해물질을 생성하는 세포의 밀도와 유해물질의 농도 사이에는 항상 양의 상관관계가 존재하지 않았으며 유해물질의 종류 또는 남조류 분류군에 따라서 통계적인 유의성이 서로 다르게 나타났다(Trapp and Croteau, 2001; Smith *et al.*, 2008; Westrick *et al.*, 2010; Srinivasan and Sorial, 2011). 본 연구에서도 *D. circinale*와 *M. aeruginosa* 각각의 세포밀도는 세포밀도 총 합보다 상관계수가 낮은 것으로 확인되었는데, 이는 북한강 수계에 존재하는 *D. circinale*와 *M. aeruginosa* 분류군 사이에 독성과 비독성 균주(strain)가 혼합되어 분포하는 영향인 것으로 판단된다. MC를 합성하는 남조류는 *mcyA* 유전자 오페론(operon)의 돌연변이가 발생에 따라서 독성 strain과 비독성 strain으로 구분할 수 있으며, 독성 strain 내에는 MC 생산력의 차이가 나

타난다(Neilan *et al.*, 1997; Kaebernick *et al.*, 2001; Tillett *et al.*, 2001). 선행 연구를 통해 북한강 수역에서 비슷한 시기에 분리된 *M. aeruginosa* 세포는 각각 독성과 비독성 strain으로 구분되었으며 북한강 수역에서 분리한 *D. circinale*에서 *mcyA* 유전자가 존재한 것으로 확인되었다(NIER, 2014; Kim *et al.*, 2018a). 본 연구에서도 공지천 수역(UA2)과 북한강 하류(PD3) 지점에서 *D. circinale*의 세포밀도가 급증하였을 때 MC 농도는  $800\sim 2,000\text{ ng L}^{-1}$  이상으로 매우 높았지만, 의암호 내 UA3 지점은 *D. circinale* 세포밀도가  $5,000\text{ cells mL}^{-1}$  이상 급증하였음에도 불구하고 MC 농도는  $200\text{ ng L}^{-1}$  이하로 매우 낮았다. 또한 팔당댐 앞(PD1) 지점에서는 *M. aeruginosa* 세포밀도가  $20,000\text{ cells mL}^{-1}$  이상으로 급증하였지만 MC 농도는  $400\text{ ng L}^{-1}$ 이 검출되었다. 따라서 북한강 수계에 존재하는 *M. aeruginosa*와 *D. circinale*는 독성과 비독성 strain이 존재하며 독성 *D. circinale* strain 안에서 MC 생산력이 서로 다른 두 개의 strain이 존재한다고 판단된다.

회귀분석을 통해 도출된 6개의 회귀직선식 중에서 3번과 6번 회귀식은 RNA 발현량과 MC 농도 사이에 표준편차가 낮고 두 요인 사이의 상관계수가 0.97 이상으로 매우 높았다. 하지만 이러한 회귀식을 이용하여 *mcyA* gene expression량을 MC 농도로 환산하였을 때 MC 농도 예측값은 실제 검출된 농도보다 최소 2배~최대 100배 이상 높게 나타났다. 일반적으로 RNA 발현은 단백질 합성으로 직접적으로 이어지므로 RNA 발현과 단백질 농도 사이에는 선형관계를 형성한다(Ngwa *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2016). 본 연구에서 *mcyA* RNA 발현량을 기반으로 계산된 cMC와 aMC 농도의 편차는  $100\text{ ng L}^{-1}$  이상 존재하였다. 이러한 편차가 발생하는 몇 가지 원인 중 주요한 원인은 다음과 같다. 첫 번째, *mcyA* RNA 발현량을 분석하기 위한 역전사(Reverse transcript) 과정이 원인으로 판단된다(Pacheco *et al.*, 2016). 역전사 과정에서 cDNA는 RNA를 주형(template)으로 합성되는 DNA 가닥을 의미하며 단백질 발현 정도를 분석할 때 주로 합성한다(Meis and Khanna, 2009). 하지만 단일가닥 RNA에서 이중가닥 DNA로 합성되는 과정에서 분류군 사이에 존재하는 작은 copy number의 차이가 PCR 증폭 과정에서 더욱 증가할 수 있으며 이로 인해 단백질 농도와 RNA 발현량을 통한 예측값이 과대산출될 가능성이 매우 큰 것으로 판단된다(Kim *et al.*, 2013). 두 번째, 수중의 질소농도에 따라서 세포 내부에서 합성된 MC는 세포 내부에 축적되지 않고, 대부분 세포 밖으로 용출되어 수중의 MC 농도를 증가시킨다(Kuzuyama, 2002; Seravalli *et al.*, 2003; Monchamp *et al.*, 2014; Pimentel and Giani, 2014). 이로 인해 세포 내부에 축적되어 있는 MC의 농도와 수중에 용존되어 있는 MC의 농

도 사이에 큰 차이가 발생할 수 있으며 세포 내부의 입자성 MC 농도가 매우 낮게 유지될 수 있다. 이는 *mcyA* RNA 발현을 기반으로 계산된 cMC 농도와 수중에 존재하는 aMC 농도 차이로 이어질 수 있다.

eRNA 기반의 남조독소 유전자 탐색법은 세포 내부에 존재하는 MC 합성 유전자의 활성을 정량적으로 분석하여 세포 내부에서 합성되는 MC의 농도 변화를 파악할 수 있으며 이를 통해 수중에서 MC의 농도가 급증하기 전에 MC 농도 증가를 예측할 수 있다. 특히 단백질 구조의 남조독소(cyanotoxin)가 생성되기 위해서는 세포의 central dogma 과정으로 DNA에서 RNA로의 전사(Transcription)가 반드시 발생하게 된다. 따라서 수중의 MC 농도가 증가하기 이전에 반드시 RNA가 증가하게 되며, 이를 이용한다면 수중의 MC가 발생하기 전, 또는 발생 초기에 이를 탐색할 수 있다. 이는 유해남조류의 사전경보(early warning) 지표로서 충분한 가치가 있으며 Microcystin의 농도와 함께 조류경보제의 주요한 항목이 될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 RNA는 활성을 가지는 세포에서 주로 생성되며, 특히 세포분열과정에서 16S rRNA (16S ribosomal RNA) 및 *rbcL* (Ribulose biphosphate carboxylase large chain)과 같은 하우스키핑 유전자(Housekeeping gene)가 발생한다. 이러한 16S rRNA를 탐색하는 것은 수중에 존재하며 활발하게 세포분열하는 남조류 세포를 탐색하는 것으로써 보다 정확한 유해남조류 발생 모니터링 정보를 제공할 수 있다. 이러한 eDNA와 eRNA 기반의 탐색법은 유전자 primer의 설계에 따라서 매우 다양한 2차 대사산물과 유해남조류의 발생을 선택적(Specific)이고 통합적(Universal)으로 탐색할 수 있으며 상수원 관리 측면에서 매우 중요한 정보를 제공하는 지표로서 충분히 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

## 적 요

북한강 수역에서 가장 많이 검출되는 Microcystin (MC)을 대상으로 하여 MC 생합성 유전자(*mcyA* gene), 남조류 세포밀도, MC 농도 사이의 관계를 분석하여 RNA-MC 환산식을 도출하고 남조류 세포 내 존재하는 MC 농도를 예측하였다. 북한강 수역에서 *mcyA* 유전자는 묵현천 합류 이후 북한강 하류 지점에서 주로 발견되었으며 평균적으로 다른 지점보다 높은 copy number가 발견되었다. 북한강 상류 의암호 수역의 경우, 공지천 지점에서 *mcyA* 유전자 copy number가 증가하였으며 9월 이후 북한강 수역 전체에서 *mcyA* 유전자 copy number는 감소하였다. *mcyA* gene expression은 상류와 하류 수역의 시·공간적 차이가 존재하였으며 여름철

짧은 시기에 집중적으로 발현하였다. *mcyA* gene expression 양은 MC 농도와 상관성이 매우 높을 뿐만 아니라 MC 을 생합성하는 것으로 알려진 *Microcystis aeruginosa*와 *Dolichospermum circinale*의 세포밀도와도 통계적으로 유의한 상관성이 존재하였다. RNA-MC 관계를 기반으로 도출된 6개의 환산식은 통계적 유의성을 보이며 ( $p < 0.05$ ) 0.9 이상의 높은 상관계수( $r$ )를 나타냈다. eRNA에 존재하는 MC 생합성 유전자 발현량은 수중의 남조독소 물질 합성을 판단하고 유전자의 활성 정도를 빠르게 정량하여 MC 발생 조기경보에 충분히 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

**저자정보** 김건희 (건국대학교 상허생명과학대학 휴먼앤에코케어센터 학술연구교수), 박채홍 (건국대학교 상허생명과학대학 휴먼앤에코케어센터 학술연구교수), 조현진 (전남대학교 생물학과 연구원), 권대률 (국립낙동강생물자원관 미생물연구실 원생생물연구팀 연구원), 황순진 (건국대학교 환경보건과학과 교수)

**저자기여도** 개념설정: 김건희, 황순진, 방법론: 김건희, 자료 제공: 박채홍, 조현진, 권대률, 원고초안작성: 김건희, 원고검토: 박채홍, 조현진, 황순진, 과제관리: 황순진, 연구비 수주: 황순진

**이해관계** 본 연구는 이해관계의 충돌 여지가 없습니다.

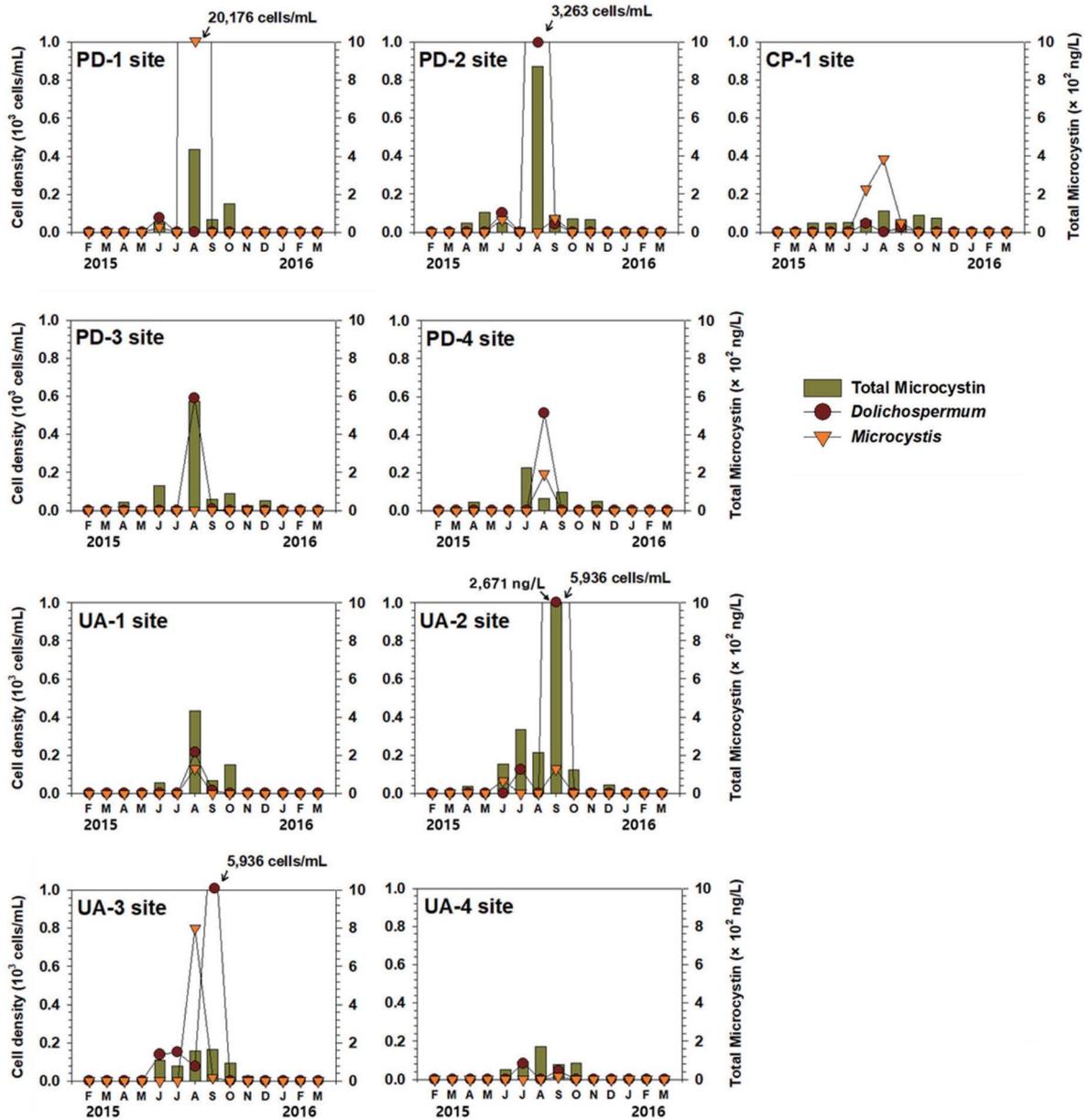
**연구비** 이 논문은 2021학년도 건국대학교의 연구년교원 지원에 의하여 연구되었음.

## REFERENCES

- Boopathi, T. and J.-S. Ki. 2014. Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. *Toxins* **6**(7): 1951-1978.
- Chen, X., H. Xiang, Y. Hu, Y. Zhang, L. Ouyang and M. Gao. 2014. Fates of *Microcystis aeruginosa* cells and associated microcystins in sediment and the effect of coagulation process on them. *Toxins* **6**(1): 152-167.
- Chorus, I. and J. Bartram. 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. CRC Press.
- Christoffersen, K. and H. Kaas. 2000. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring, and management. *Limnology and Oceanography* **45**(5): 1212-1212.
- Chun, S.-J., Y. Cui, C.S. Lee, A.R. Cho, K. Baek, A. Choi, S.-R. Ko, H.-G. Lee, S. Hwang and H.-M. Oh. 2019. Characterization of distinct cyanoHABs-related modules in microbial recurrent association network. *Frontiers in Microbiology* **10**: 1637.
- Crush, J., L. Briggs, J. Sprosen and S. Nichols. 2008. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environmental Toxicology: An International Journal* **23**(2): 246-252.
- Dong, X., S. Zeng, F. Bai, D. Li and M. He. 2016. Extracellular microcystin prediction based on toxigenic *Microcystis* detection in a eutrophic lake. *Scientific Reports* **6**: 20886.
- Hisbergues, M., G. Christiansen, L. Rouhiainen, K. Sivonen and T. Börner. 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology* **180**(6): 402-410.
- Jeon, J.H., G.-e. Rhie and J.H. Kim. 2017. Recent advancements in diagnostic ELISA kits and immunosensors. Korea Center for Disease Control.
- Jung, J. 1993. Illustration of Korea freshwater phytoplankton. Academy.
- Kaebnick, M., T. Rohrlack, K. Christoffersen and B.A. Neilan. 2001. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. *Environmental Microbiology* **3**(11): 669-679.
- Kim, J., J. Lim and C. Lee. 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnology Advances* **31**(8): 1358-1373.
- Kim, K., C. Park, Y. Yoon and S.-J. Hwang. 2018a. Harmful Cyanobacterial Material Production in the North Han River (South Korea): Genetic Potential and Temperature-Dependent Properties. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **15**(3): 444.
- Kim, K., Y. Yoon, W.-Y. Hong, J. Kim, Y.-C. Cho and S.-J. Hwang. 2018b. Application of metagenome analysis to characterize the molecular diversity and saxitoxin-producing potentials of a cyanobacterial community: a case study in the North Han River, Korea. *Applied Biological Chemistry* **61**(2): 153-161.
- Kuzuyama, T. 2002. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**(8): 1619-1627.
- Lazarevic, V., N. Gaïa, M. Girard, P. Francois and J. Schrenzel. 2013. Comparison of DNA extraction methods in analysis of salivary bacterial communities. *PLoS One* **8**(7): e67699.
- Lee, J., J. Choi, M. Fatka, E. Swanner, K. Ikuma, X. Liang, T. Leung and A. Howe. 2020. Improved detection of *mcyA* genes and their phylogenetic origins in harmful algal blooms. *Water Research* **176**: 115730.
- Mathys, W. and B. Surholt. 2004. Analysis of microcystins in freshwater samples using high performance liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **207**(6): 601-605.
- McElhiney, J. and L.A. Lawton. 2005. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied*

- Pharmacology* **203**(3): 219-230.
- Meis, J.E. and A. Khanna. 2009. RNA amplification and cDNA synthesis for qRT-PCR directly from a single cell. *Nature Methods* **6**(8): 622.
- MOE. 2016. Standard Methods for the Examination of drinking water surveillance.
- Monchamp, M.-E., F.R. Pick, B.E. Beisner and R. Maranger. 2014. Nitrogen forms influence microcystin concentration and composition via changes in cyanobacterial community structure. *PloS One* **9**(1): e85573.
- Neilan, B.A., D. Jacobs, L.L. Blackall, P.R. Hawkins, P.T. Cox and A.E. Goodman. 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **47**(3): 693-697.
- Ngwa, F.F., C.A. Madramootoo and S. Jabaji. 2014. Comparison of cyanobacterial microcystin synthetase (*mcy*) E gene transcript levels, *mcy* E gene copies, and biomass as indicators of microcystin risk under laboratory and field conditions. *MicrobiologyOpen* **3**(4): 411-425.
- NIER. 2014. Characteristics of Cyanobacterial Toxin Production and Management Strategies of These Toxins. National Institute of Environmental Research.
- Oh, K.H. 2009. Screening of conserved DNA sequences in microcystin-producing cyanobacteria and application of the sequences to monitor microcystins in water reservoirs. Seoul National University of Graduate School.
- Olsen, B.K., M.F. Chislock and A.E. Wilson. 2016. Eutrophication mediates a common off-flavor compound, 2-methylisoborneol, in a drinking water reservoir. *Water Research* **92**: 228-234.
- Pacheco, A.B.F., I.A. Guedes and S.M. Azevedo. 2016. Is qPCR a reliable indicator of cyanotoxin risk in freshwater?. *Toxins* **8**(6): 172.
- Park, H.-D., J. Han and B.-s. Jeon. 2016. Dynamics and control methods of cyanotoxins in aquatic ecosystem. *Korean Journal of Ecology and Environment* **49**(2): 67-79.
- Park, H.-K., W.-H. Jheong, O.-S. Kwon and J.-K. Ryu. 2000. Seasonal succession of toxic cyanobacteria and microcystins concentration in Paldang reservoir. *Algae* **15**(1): 29-35.
- 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.
- Peterson, B.G., P. Carl, K. Boudt, R. Bennett, J. Ulrich, E. Zivot, D. Cornilly, E. Hung, M. Lestel and K. Balkissoon. 2018. Package 'PerformanceAnalytics'. R Team Cooperation.
- Pimentel, J.S. and A. Giani. 2014. Microcystin production and regulation under nutrient stress conditions in toxic *Microcystis* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(18): 5836-5843.
- Qu, J.-Q., Q.-J. Zhang, C.-X. Jia, L. Pan and Y. Mu. 2013. Optimization of microcystin extraction for their subsequent analysis by HPLC-MS/MS method in urban lake water. *International Journal of Environmental Science and Development* **4**(5): 600.
- Savela, H., L. Spooft, N. Perälä, M. Preede, U. Lamminmäki, S. Nybom, K. Häggqvist, J. Meriluoto and M. Vehniäinen. 2015. Detection of cyanobacterial *sxt* genes and paralytic shellfish toxins in freshwater lakes and brackish waters on Åland Islands, Finland. *Harmful Algae* **46**: 1-10.
- Seravalli, J., W. Gu, A. Tam, E. Strauss, T.P. Begley, S.P. Cramer and S.W. Ragsdale. 2003. Functional copper at the acetyl-CoA synthase active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(7): 3689-3694.
- Shabnam, R. 2013. Evaluation of laboratory methods for the analysis of microcystins. Ryerson University.
- Shamsollahi, H.R., M. Alimohammadi, R. Nabizadeh, S. Nazmara and A.H. Mahvi. 2015. Measurement of microcystin-LR in water samples using improved HPLC method. *Global Journal of Health Science* **7**(2): 66.
- Sklenar, K., J. Westrick and D. Szlag. 2016. Managing Cyanotoxins in Drinking Water: A Technical Guidance Manual for Drinking Water Professionals. American Water Works Association and Water Research Foundation, Denver, CO, USA.
- Smith, J.L., G.L. Boyer and P.V. Zimba. 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture* **280**(1-4): 5-20.
- Srinivasan, R. and G.A. Sorial. 2011. Treatment of taste and odor causing compounds 2-methyl isoborneol and geosmin in drinking water: a critical review. *Journal of Environmental Sciences* **23**(1): 1-13.
- Stelzer, E.A., K.A. Loftin and P. Struffolino. 2013. Relations between DNA- and RNA-based molecular methods for cyanobacteria and Microcystin concentration at Maumee Bay State Park Lakeside Beach, Oregon, Ohio, 2012. US Department of the Interior, US Geological Survey.
- 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.
- Tillett, D., D.L. Parker and B.A. Neilan. 2001. Detection of toxicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(6): 2810-2818.
- Trapp, S.C. and R.B. Croteau. 2001. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* **158**(2): 811-832.
- Tsao, H.-W., A. Michinaka, H.-K. Yen, S. Giglio, P. Hobson, P. Monis and T.-F. Lin. 2014. Monitoring of geosmin pro-

- ducing *Anabaena circinalis* using quantitative PCR. *Water Research* **49**: 416-425.
- Ueno, Y., S. Nagata, T. Tsutsumi, A. Hasegawa, M.F. Watanabe, H.-D. Park, G.-C. Chen, G. Chen and S.-Z. Yu. 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* **17**(6): 1317-1321.
- Vaitomaa, J., A. Rantala, K. Halinen, L. Rouhiainen, P. Tallberg, L. Mokelke and K. Sivonen. 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(12): 7289-7297.
- Vezie, C., L. Briant, K. Sivonen, G. Bertru, J.-C. Lefevre and M. Salkinoja-Salonen. 1998. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Lake Grand-Lieu (France). *Microbial Ecology* **35**(2): 126-135.
- Waters, T. and A. Dugan. 2016. Water Treatment Optimization for Cyanotoxins, EPA.
- Westrick, J.A., D.C. Szlag, B.J. Southwell and J. Sinclair. 2010. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**(5): 1705-1714.
- Wickham, H. 2016. ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer.
- Zamyadi, A., S.L. MacLeod, Y. Fan, N. McQuaid, S. Dorner, S. Sauvé and M. Prévost. 2012. Toxic cyanobacterial breakthrough and accumulation in a drinking water plant: a monitoring and treatment challenge. *Water Research* **46**(5): 1511-1523.



**Supplementary data 1.** Spatio-temporal fluctuation of major cyanobacteria (*M. aeruginosa* and *D. circinale*) that known to microcystin producer and concentration of microcystin at the study sites of the North Han River between February 2015 and March 20.