

## Comparative Analysis of Microcystin during Water Treatment Process between Real-Time PCR and LC/MS

Hong-Gi Park\*, Mi-Eun Jung, Dong-Jin Cha, Eun-Young Jung and Jae-Hoon Bean

Water Quality Institute, Water Works HQ of Busan Metropolitan City, Kyoungnam, 621-813, Korea

Received April 5, 2010 / Accepted April May 11, 2010

We performed a comparative analysis using a Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) and LC/MS (Liquid-Chromatograph/Mass Spectrometer) method in order to detect microcystin in environmental sources. Among the three different primer sets tested for microcystin using three positive strains of *Microcystis aeruginosa* by Real-time PCR assay, only TOX2P/TOX2M primer pairs were able to detect *Microcystis aeruginosa*. According to the results of a survey carried out from June 2009 to September 2009, 11 out of 11 (100%) raw water samples were found to have microcystin when the Real-Time PCR and LC/MS method was used, with total microcystin concentration ranging from 5.98~219.0 µg/l. A microcystin removal treatment process was used to ensure entire removal, by passing it through a BAC filtration step. It was concluded that real-time PCR assay can be used to estimate microcystin detection more rapidly and easily than the LC/MS method.

**Key words** : Microcystin, Real-Time PCR, LC/MS, TOX2P/TOX2M primer

### 서 론

호소에서의 부영양화가 진행됨에 따라 호소내 식물플랑크톤의 대량증식이 빈번히 일어나며 특히 수온이 높은 시기에는 남조류가 대량 증식하여 수표면에 물꽃을 형성하여 수체내 pH 상승, 어류의 폐사, 이·취미 발생 및 정수처리 과정의 여과 폐쇄 등 수 이용상에 많은 문제를 일으킨다[8]. 이런 남조류 중에서도 대표적인 종인 *Microcystis spp.*는 전 세계적으로 넓게 발생하고 있는 대표적인 독조현상 원인 속(genus)으로, 우리나라에도 낙동강, 대청호, 팔당호 등에서 발생이 보고되고 있다[9]. 남조류가 생산하는 독소 중에서 가장 널리 알려진 것은 간독성을 가진 마이크로시스틴으로, 주요 원인종은 *Microcystis spp.*, *Oscillatoria spp.*, *Nostoc spp.* 등이 알려져 있다[3]. 마이크로시스틴은 총 7개의 아미노산으로 이루어진 분자량 1,000 정도의 환상 펩타이드이며, 이를 구성하는 아미노산의 종류에 따라 LR, LA, YR, RR 등을 포함하여 약 70여 종의 다양한 종류가 있는 것으로 알려져 있다[12].

마이크로시스틴에 의한 사람의 피해사례 중 가장 대표적인 것은 1996년 브라질의 Caruaru 지방에서 일어난 것으로, 신장 투석환자 55명이 마이크로시스틴에 의해 오염된 물을 인해 사망하였다. 이 사건을 계기로 세계보건기구(WHO)에서는 남조류가 생산하는 독소 중에서 유일하게 마이크로시스틴에 대해 1.0 µg 마이크로시스틴-LR/L의 먹는 물 가이드라인을 제정하였다[13].

마이크로시스틴을 생성하는 주된 남조류인 *Microcystis spp.*는 형태적으로 동일하더라도 마이크로시스틴 합성과 관련된 유전자의 존재유무에 따라 독성 및 비독성 종으로 구분될 수 있다[4]. 따라서 형태학적 특성에 근거한 현미경적 방법(Microscopic method)은 독성 종의 확인이 불가능하다. 또한 PC-IGS, 16S rRNA 등과 같은 분자생물학적 방법들은 종 동정의 정확성은 향상시켰으나, 독성 종과 비독성 종의 명확한 구분은 불가능하였다. 하지만 마이크로시스틴 합성에 관여하는 microcystin biosynthetase (*mcy*) gene에 대한 분자생물학적 연구들은 독성 및 비독성 남조류를 구분할 수 있는 PCR 기법의 발달을 가져왔다[1,4]. Tillett 등[11]에 따르면, 독소를 생성하는 *Microcystis spp.*에 존재하는 *mcy* gene cluster는 chromosome 상에서 두 개의 operon (*mcyA-C* 및 *mcyD-J*) 구조로 배열된 10개의 open reading frame (ORFs)을 암호화하는 55 kb의 DNA를 포함한다. 두 개의 operon 중 *mcyA-C*는 nonribosomal peptide synthetase (NRPS) modules을 암호화하며, *mcyD-J*는 polyketide synthase (PKS) 및 NRPS modules을 암호화한다. 따라서, *mcy* 유전자를 선택적으로 증폭시킴으로써 마이크로시스틴 생성의 가능성을 확인할 수 있다.

국내에서도 상수원수를 중심으로 주로 *Microcystis spp.*에 의한 수확이 빈번하게 발생하고 있으며, 이들에 의해 생성된 마이크로시스틴의 농도가 구체적으로 보고된 바 있다[7]. 현재 마이크로시스틴 농도는 남조류 독소분석 지침에 의해 LC/MS (Liquid-Chromatograph/Mass Spectrometer)법 분석하고 있으나 복잡하고 많은 시간이 소요되어 검출 시 신속하게 대처하는데 어려움이 있다[5]. 하지만, 대부분의 식수를 낙동강 상수원수로부터 공급받는 우리의 여건을 고려할 때, 독성 남조류의 대발생을 조기에 예측할 수 있는 검출방법의 도입은 적

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-669-4644, Fax : +82-51-669-4609

E-mail : phk111@korea.kr

절하고 신속한 대응을 위해서도 반드시 필요하다.

본 연구는 *mcy* gene을 target으로 하는 primer를 대상으로 현재 가장 많이 사용되고 있는 PCR법 보다 진보된 방법이며 국내에서는 아직 적용사례가 없는 Real-Time PCR법을 이용하여 먼저 마이크로시스틴 시험방법을 정립하고 아울러 마이크로시스틴 표준시험방법인 LC/MS법과 동시에 상수원수(표층수)와 정수처리 공정별 시료를 대상으로 마이크로시스틴 분석을 실시하고 그 검출방법을 비교 평가하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 표준균주 및 배양

실험에 사용된 남조류는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받은 3개의 *Microcystis aeruginosa* (AG30001, AG30082, AG30083) 균주들을 이용하였다. 실험을 위해 균주

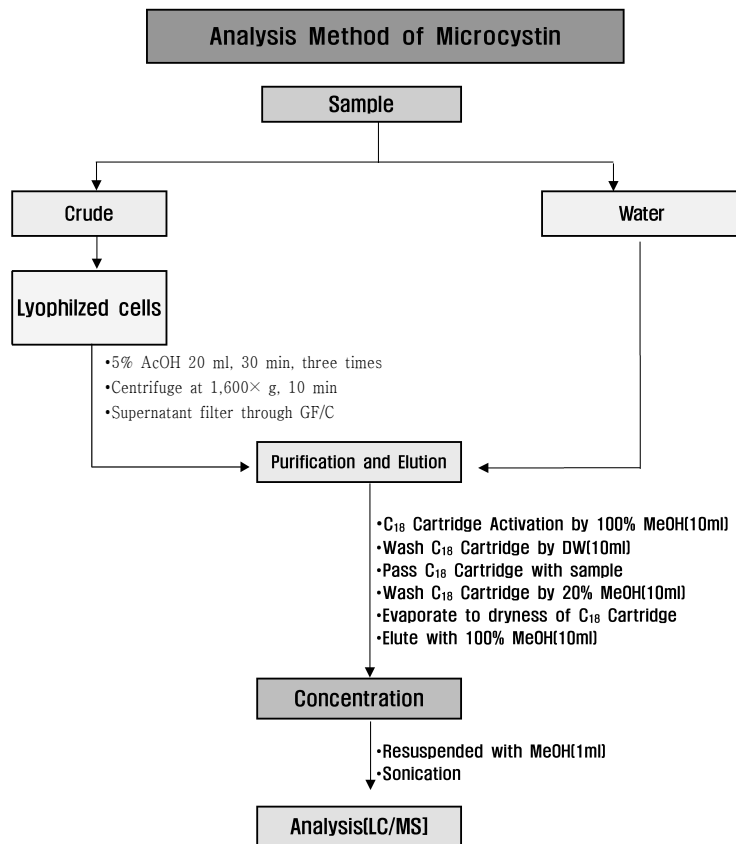
들은 약 30  $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 조도와 25 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 CB 배지를 사용하여 배양시켰다.

#### 현장시료 및 정수공정별 시료

현장시료인 표층수는 남조류 수화현상이 발생한 2009년 6월에서 9월 사이에 부산시 상수원수인 물금·매리 지점에서 채취한 시료(10 l)를, 정수처리 공정별 시료(4 l)는 화명·덕산 정수장을 대상으로 3회 분석하였다. 출현한 남조류 중 동정은 도립 현미경(Zeiss Axiovert 135M, Germany) 400~1,000배에서 실시하여 확인하였고 남조류 균체는 증류수로 씻어낸 후 시료를 Falcon tube (USA)에 넣어 분석 때까지 4 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

#### LC/MS법

마이크로시스틴 분석을 위한 LC/MS법은 환경부에서 규정한 지침을 근거로(Fig. 1) 정제, 용출 그리고 농축과 같은 전처



LC/MS analysis condition	
Column	XTerra C18, 3.5 $\mu\text{m}$ , 2.1 $\times$ 150 mm
Mobile phase	A line : 0.1% FA in Water, B line : 0.1% FA in MeOH
Flow rate	0.2 ml/min
Detector	MS detector

Fig. 1. Detection procedure of microcystin in environmental water samples by LC/MS assay.

리를 한 후 분석을 실시하였다[5].

#### DNA 추출 및 정제

배양 및 현장에서 채취한 남조류 시료의 DNA는 Quigen kit (QIAamp DNA mini kit)를 이용하여 추출하였다. 먼저 배양액 시료 1 ml를 ATL Buffer 180  $\mu$ l와 Proteinase K (20 mg/ml) 20  $\mu$ l를 넣고 잘 섞은 후 56°C에서 1시간 이상 반응시켰다. 반응 후 각 tube에 200  $\mu$ l AL buffer를 첨가하여 15초간 조심스럽게 혼합(vortexing)하고 70°C, 10분간 반응시켰다. 반응 후 200  $\mu$ l ethanol (100%)를 넣고 15초 정도 inverting하여 QIAamp spin column에 넣어 8,000 rpm, 5분간 원심 분리하였다. 여기에 500  $\mu$ l AW 1를 넣고 같은 조건으로 원심분리 한 후 다시 500  $\mu$ l AW 2를 첨가하여 14,000 rpm, 3분간 원심분리하여 세척하였다. 여기에 AE buffer 200  $\mu$ l를 넣어 5분간 반응시킨 후 8,000 rpm, 1분간 원심분리한 후 이를 PCR의 주형으로 사용하였다.

#### 중합효소연쇄반응(PCR)

남조류 독성 마이크로시스틴 검출을 위한 3종류의 primer는 microcystin genome을 특이적으로 검출할 수 있는 염기서열로 제작하였다(Table 1). PCR 반응액은 총 100  $\mu$ l [DNA template, 10 $\times$  PCR buffer, 각각의 -F, -R primer (50 pmol/ $\mu$ l), 5U/ $\mu$ l Taq polymerase (Takara사), H<sub>2</sub>O]이 되도록 하여 PCR 반응을 수행하였다.

PCR은 95°C에서 3분 동안 predenaturation을 실시한 후, 95°C에서 30초, 66°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초씩 30 cycles을 반복하고, 72°C에서 10분 동안 final extension을 실시하여 PCR 산물을 얻었다. PCR 반응 결과 생겨난 산물을 1.5% agarose gel에 전기영동 하여 각각의 PCR 산물의 형성 유무를 확인하였다.

#### Real-Time PCR

기존의 PCR 방법은 증폭 후 전기영동을 실시하여 PCR 산물 생성 여부로 다시 확인하는 등 다소 번거롭고 시간이 소요되는 단점이 있다. 이러한 단점이 보완된 즉 증폭과 동시에 그래프로 마이크로시스틴 검출이 확인 가능하여 시간이 많이 단축되는 Real-Time PCR법을 본 실험에 적용하고자 하였다.

Real-Time PCR 반응액은 총 20  $\mu$ l [DNA template, probe master, 각각의 -F, -R primer (10 nmol/ $\mu$ l), H<sub>2</sub>O]이 되도록 하여 반응을 수행하였다. Real-Time PCR은 Roche사의 Light Cycler 480 Real-Time PCR 기기를 사용하였으며 반응조건은 PCR과 동일하게 수행하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 표준균주에 의한 Real-Time PCR 시험방법 정립

3종류의 primer쌍을 이용하여 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받은 3종의 *Microcystis aeruginosa* 균주를 대상으로 Real-Time PCR 증폭을 실시하였다. 3회 분석한 결과 TOX2P/TOX2M primer를 이용한 3개의 균주에서만 그래프와 350 bp의 PCR 산물이 확인되었으나, 나머지 2개의 primer에서는 검출되지 않았다.

마이크로시스틴의 합성에 관여하는 유전자 중에서 *myB* 유전자는 adenylation, thiolation 및 condensation domain을 각각 1개씩 포함하는 2개의 module로 구성되어 있다[11]. 이번 연구에 사용된 TOX2P/TOX2M primer쌍은 *myB* 유전자의 adenylation domain을 특이적으로 증폭시키기 위해 개발되었으며[1], Pan 등은 TOX2P/TOX2M에 의한 PCR법은 마이크로시스틴 생성 균주를 매우 신속하고 효과적으로 검출할 수 있는 유용한 방법임을 이미 증명한 바 있다[6]. 따라서 TOX2P/TOX2M primer는 이번 연구에 검출하고자 하는 남조류 독성 마이크로시스틴에 대한 감도가 뛰어난 것으로 조사되었기에 농축시킨 상수원수(표충수)시료와 정수처리 공정별 시료도 같은 방법으로 Real-Time PCR법을 실시하여 검출여부를 확인하였다.

##### 상수원수(표충수) 마이크로시스틴 시험

2009년 6~9월 사이에 남조류 수화현상이 발생한 물금, 매리 지점 표충수를 대상으로 Real-Time PCR법과 LC/MS법을 이용하여 독성 시험을 실시하였다. 먼저 채수한 시료들을 농축하여 도립현미경에서 동정한 결과 발생한 남조류는 모두 *Microcystis spp.* 속으로 확인되었다. 시료를 전처리 한 후 먼저 TOX2P/TOX2M primer쌍을 이용한 Real-Time PCR법을 실시하였는데 그 결과 총 7회 11개 시료 모두에서 독성이 검출되

Table 1. The PCR Primer sequences for detection of cyanobacterial microcystin

Primer	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Tm	Amplification region (bp)
16SCF	GGCAGCAGTGGGGAATTTTC	58	433
Cya-R783	GACTACGGGGTATCTAATCCCCG		
<i>myA</i> -Cd 1F	AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT	54	297
<i>myA</i> -Cd 1R	AAAATTTAAAGCCGTATCAAA		
TOX2P	GGAACAAGTTGCACAGAATCCGC	63	350
TOX2M	CCAATCCCTATCTAAACACAGTAACTCGG		

어 낙동강에서 발생한 남조류 시료들은 마이크로시스틴 독성을 함유하는 것으로 나타났다(Table 2). 따라서 이번 연구에서 조사된 표준균주 및 현장시료들은 *mcy* 유전자를 지닌 *Microcystis spp.* 개체들은 거의 예외 없이 마이크로시스틴을 실제로 생성한다고 보고한 선행 연구결과들과 일치하는 것으로 나타났다[2]. LC/MS법에 의한 실험결과도 Real-Time PCR 법과 마찬가지로 모든 시료에서 독성이 검출되었는데(Table 3) 농도는 5.98~219.0 µg/l 범위로 조사되었다. 지점별로는 물금 지점이 매리 지점보다, 시기별로는 9월이 6월보다 농도가 높게 검출되었다.

정수처리 공정별 마이크로시스틴 시험

정수처리 공정별 시험은 2009년 6월17일에서 6월19일까지 3회 실시하였다. 먼저 LC/MC법에 의한 시험결과는 Fig. 2와

같다. 화명정수장의 경우 표층수에서 5.98~219.0 µg/l 농도를 보인 마이크로시스틴은 정수장에 유입되면 전염소에서 평균 0.45 µg/l, 전오존에서 평균 0.35 µg/l, 사여과에서 평균 0.30 µg/l 농도로 검출되었으며 BAC 여과 이후부터는 검출되지 않았다. 그러나 6월 19일 채수한 시료에서는 사여과 부터 마이크로시스틴이 검출되지 않은 것으로 조사되었다. 표층수의 농도가 6.19~12.40 µg/l 분포를 보인 덕산 정수장의 경우 화명 정수장과 거의 비슷한 경향을 보여 BAC 여과 이후부터 마이크로시스틴은 검출되지 않은 것으로 나타났다. 3회 실험한 결과 정수장에 유입된 마이크로시스틴은 전염소와 전오존 단계에서 평균 96% 그리고 후오존 처리를 거친 BAC 여과 이후부터는 완전히 제거되는 것으로 나타나 부산시 수돗물의 안전성을 확인할 수 있었다.

Real-Time PCR법 시험결과도 LC/MS법 결과와 마찬가지로

Table 2. Comparison of microcystin results by Real-Time PCR and LC/MS method

Sampling time (day/month/year)	Sampling sites	Real-Time PCR (Detection time: 1~2day)	LC/MS (Detection time: 7~10day)
12/06/2009	Mulgum	+	9.62 µg/l
14/06/2009	Mulgum	+	8.40 µg/l
17/06/2009	Mulgum	+	8.11 µg/l
	Maeri	+	12.40 µg/l
18/06/2009	Mulgum	+	15.67 µg/l
	Maeri	+	10.52 µg/l
19/06/2009	Mulgum	+	5.98 µg/l
	Maeri	+	6.19 µg/l
07/09/2009	Mulgum	+	32.4 µg/l
11/09/2009	Mulgum	+	219.0 µg/l
	Maeri	+	83.8 µg/l

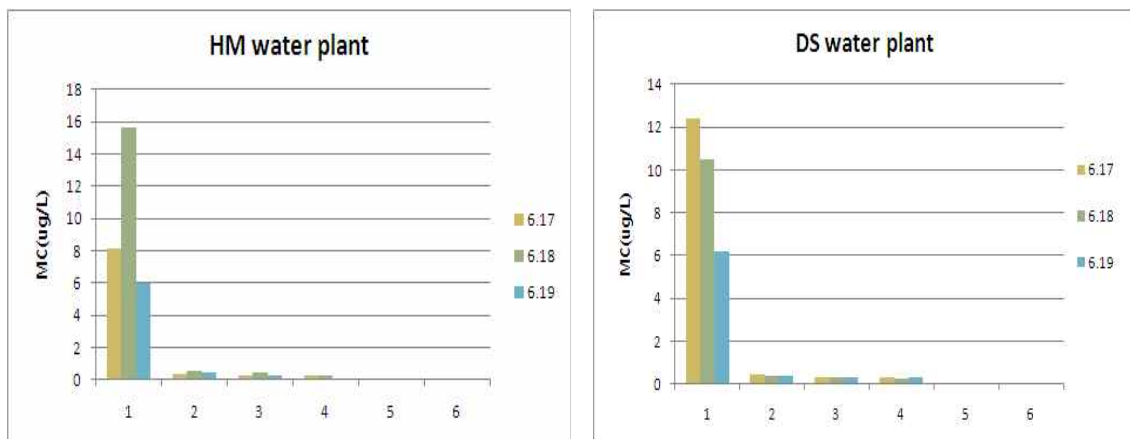


Fig. 2. Detection of microcystin from each step of water treatment process using biological activated carbons by LC/MS based method (Step 1 is a water sample from raw water tank. Step 2 from pre-Cl<sub>2</sub> contactor. Step 3 from pre-O<sub>3</sub> contactor. Step 4 from filtered water tank. Step 5 BAC effluent. Step 6 from Treated water). HM: Hoamyung, DS: Duksan

Table 3. Detection of microcystin from each step of water treatment process using biological activated carbons by Real-Time PCR method

Sampling time (day/month/year)	Pre Cl <sub>2</sub>		Pre O <sub>3</sub>		Sedimentation basin		BAC effluent		Treated water	
	HM	DS	HM	DS	HM	DS	HM	DS	HM	DS
17/06/2009	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
18/06/2009	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
19/06/2009	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

+: Detected, -: Not Detected, HM: Hoamyung, DS: Duksan

로 BAC 여과 이후부터 독성이 검출되지 않았다(Table 3). 그러나 6월 19일 LC/MS법에서는 검출되지 않았던 사여과 시료가 Real-Time PCR법에서는 검출되었는데 이는 LC/MS법의 경우 마이크로시스틴이 저농도로 존재하는 경우 다른 용존 유기물의 방해로 인해 감도가 떨어졌기 때문인 것으로 판단된다.

우리나라는 1998년부터 상수원수를 중심으로 조류 예보제를 실시하고 있으며, 2009년 조류 예보제 시행계획에 따르면 남조류 세포수가 5,000 cells/ml 이상일 때 조류경보를 발령함과 동시에 LC/MS에 의한 마이크로시스틴 정량분석을 권장하고 있다[5,10]. 하지만, LC/MS에 의한 분석방법은 마이크로시스틴의 직접적인 분석이 가능하다는 장점은 있으나, 전처리에 있어서 많은 시간이 소요되며 다량의 시료를 필요로 한다(Fig. 1). 따라서, 조류 경보가 발생되기 전의 상대적으로 낮은 남조류 밀도 수준에서는 LC/MS 분석법을 적용하기 어렵다. 반면에 물금, 매리 상수원수(표충수) 시료를 대상으로 실시한 TOX2P/TOX2M primer쌍에 의한 Real-Time PCR법은 조류 경보 발령단계 이전의 밀도 수준에서도 매우 효과적이고 신속하게 검출하였는데 이는 기존의 시험방법인 LC/MS 분석법보다 최대 8일 정도 분석시간을 단축시키는 것으로 확인되었다(Table 2). 물론 TOX2P/TOX2M primer 이외의 다른 primer에서도 마이크로시스틴 독성이 검출되었다는 보고가 있으나[11, 12] 본 실험에서는 검출되지 않았는데 이는 *Microcystis spp.* 속의 환경적인 생장조건 및 생태학적 인자 등이 차이로 인해 기인된 것으로 판단된다.

결과적으로 TOX2P/TOX2M primer쌍에 기초한 Real-Time PCR법은 LC/MS법 그리고 남조류 세포수와 농도정량에 대한 적절한 호환이 이루어진다면 우리시 상수원수의 마이크로시스틴에 대한 효율적인 검출방법으로 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

## References

- Dittmann, E., B. A. Neilan, and T. Borner. 1999. Peptide synthetase genes occur in various species of cyanobacteria., pp. 615-621. The phototropic prokaryotes. In Perschek, G. A., W. Loeffelhardt, and G. Schmetterer (eds.), Kluwer Academic/Plenum Press, New York.
- Dittmann, E. and B. A. Borner. 2005. Genetic contribution to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **203**, 192-200.
- Hisbergues, M., G. Christiansen, L. Rouhiainen, K. Sivonen, and T. Borner. 1998. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch. Microbiol.* **180**, 402-410.
- Meissner, K., E. Dittmann, and T. Borner. 1996. Toxic and non-toxic strains of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**, 295-303.
- National Institute of Environmental Research. 2009. Monitoring of Algae. Seoul.
- Pam, H., L. Song, Y. Liu, and T. Borner. 1999. Detection of hepatotoxic microcystin strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. *Arch. Microbiol.* **178**, 421-427.
- Park, H. D., B. C. Kim, E. K. Kim, and T. Okino. 1998. Hepatotoxic microcystins and neurotoxic anatoxin-a in cyanobacterial blooms from Korean lakes. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **13**, 225-234.
- Park, H. K., S. I. Cheon, S. I. Park, M. H. Lee, and J. K. Ryu. 1992. Seasonal succession of phytoplankton in some artificial lakes of Korea. *J. KSWQ.* **8**, 150-158.
- Park, H. K. 1998. Physio-ecological study on Korean freshwater cyanobacteria, *Microcystis spp.* 19. pp. 1-10, Thesis for the Degree of Doctor, Department of Microbiology Graduate School, Kyungpook National University.
- Poon, K. F., M. H. Lam, P. K. Lam, and B. S. Wong. 2001. Determination of microcystins in cyanobacterial blooms by solid-phase microextraction-high-performance-liquid-chromatography. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 1648-1655.
- Tillett, D., E. Dittmann, M. Erhard, H. von Dohren, T. Borner, and B. A. Neilan. 2000. Structural organization of Microcystin biosynthesis *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* **7**, 753-764.
- Welker, M. and H. Von Dohren. 2006. Cyanobacterial peptides-nature's own combination biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 530-563.
- WHO. 1998. Guidelines for drinking-water quality. 2nd., Addendum to volume 1. Recommendations, pp. 13-14, World Health Organization, Geneva.

초록 : Real-Time PCR법과 LC/MS법을 이용한 수계중의 마이크로시스틴 검출방법 비교연구

박홍기\* · 정미은 · 차동진 · 정은영 · 빈재훈  
(부산광역시 상수도사업본부 수질연구소)

현장의 환경 시료를 대상으로 Real-Time PCR법과 LC/MS법을 이용하여 마이크로시스틴 검출방법을 비교 연구하였다. 3종류의 primer쌍을 이용하여 3종의 *Microcystis aeruginosa* 표준균주를 대상으로 Real-Time PCR법을 실시한 결과 TOX2P/TOX2M primer를 이용한 균주에서만 마이크로시스틴이 검출되었다. 2009년 6~9월 사이에 남조류가 발생한 상수원수 시료를 정립된 Real-Time PCR법과 기존의 LC/MS법으로 실험한 결과 11개 시료 모두에서 마이크로시스틴이 검출되었고, 농도는 5.98~219.0 µg/l 범위로 조사되었다. 정수처리 공정별 실험에서는 BAC 여과 단계에서 마이크로시스틴이 완전히 제거되는 것으로 나타났다. 실험결과 Real-Time PCR법은 기존의 표준시험방법인 LC/MS법 보다 분석시간을 많이 단축시키는 것으로 나타나 효과적인 마이크로시스틴 검출방법임을 알 수 있었다.