

## 분자생물학적 방법에 의한 남조류의 독성 생성능의 확인

이경락 · 정원화 · 김종민 · 김한순<sup>1,\*</sup>

(국립환경과학원, <sup>1</sup>경북대학교 자연과학대학 생물학과)

**Detection of Toxicogenicity of Cyanobacteria by Molecular Method. Lee, Kyung-lak, Weon-hwa Jheong, Jong-min Kim and Han-soon Kim<sup>1,\*</sup> (National Institute of Environmental Research, Kyeongseo-dong, Seo-gu, Incheon 404-170, Korea; <sup>1</sup>Department of Biology, Kyungpook University, Daegu 702-701, Korea)**

In the present study, we performed the PCR assay using TOX2P/TOX2M primer targeting a specific region within *mcyB* gene to identify potential microcystin-producing cyanobacteria. TOX2P/TOX2M primer set was effective in amplifying *mcy* gene in the field samples containing *Microcystis* spp. of 1,000 cells per mL. Moreover, the results from the PCR assay agreed with those of the ELISA analysis. Consequently, this study demonstrated that TOX2P/TOX2M primer set can be used as a genetic probe for the early detection of cyanobacterial toxicogenicity in Korean water bodies.

**Key words : cyanobacteria, microcystin biosynthetase gene, toxicogenicity, TOX2P/TOX2M primer, ELISA**

### 서 론

담수의 지속적인 부영양화에 따른 남조류의 수화현상은 전 세계적으로 널리 발생되며(김과 문, 2000; Sabour *et al.*, 2002; Kemp and John, 2006), 남조류에 의해 생성되는 독성물질은 인간에게 심각한 위협이 될 수 있다(Falconer *et al.*, 1983; Falconer and Humpage, 1996). 남조류는 신경독소 및 간장독소 등을 포함한 독성 화합물을 광범위하게 생성한다(Sivonen, 1996; Codd *et al.*, 1999; Kaebnick and Neilan, 2001). 특히, 간장독소인 hepatotoxin은 간세포에 특이적으로 결합함으로써 인간의 간손상을 유발한다(Carmichael, 1992). 가장 대표적인 간장독소는 microcystins로 알려져 있으며, 이들 독소는 900~1,100 Dalton의 분자량을 지닌 환상구조(-D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-)로서 남조류 독소들 중에서 가장 널리 분포하는 독소이다(Sivonen and Jones,

1999).

Microcystins를 생성하는 주된 남조류인 *Microcystis* (Carmichael, 1988; Carmichael, 1996)는 형태적으로 동일하더라도 microcystins 합성과 관련된 유전자의 존재유무에 따라 독성 및 비독성 종으로 구분될 수 있다(Meissner *et al.*, 1996). 따라서, 형태학적 특성에 근거한 현미경적 방법(microscopic method)은 독성 종의 확인이 불가능하다. 또한, PC-IGS (Neilan *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 2001), 16S rRNA (Otsuka *et al.*, 1998) 및 16S~23S rRNA internal transcribed spacer region (Neilan *et al.*, 1997; Otsuka *et al.*, 1999)과 같은 분자생물학적 방법들은 종 동정의 정확성은 향상시켰으나, 독성 종과 비독성 종의 명확한 구분은 불가능하였다. 하지만, microcystins 합성에 관여하는 microcystin biosynthetase (*mcy*) gene에 대한 분자생물학적 연구들은 독성 및 비독성 남조류를 구분할 수 있는 PCR 기법의 발달을 가져왔다(Dittmann *et al.*, 1999; Nishizhawa *et al.*, 1999; Baker *et al.*,

\* Corresponding author: Tel: 053) 950-5344, Fax: 053) 953-3066, E-mail: kimhsu@knu.ac.kr

**Table 1.** Comparison of PCR and ELISA results among cyanobacterial strains.

Strain	Species	Origin	PCR	MCs
			TOX2P/TOX2M	
NIER-10001	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Daechung Dam	n.d.	n.d.
NIER-10004	<i>Microcystis</i> sp.	Soyang Dam	+	+
NIER-10010	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Sapkyo Stream	+	+
NIER-10012	<i>Microcystis</i> sp.	Sapkyo Stream	+	+
NIER-10020	<i>Microcystis viridis</i>	Nakdong River	+	+
NIER-10022	<i>Microcystis novacekii</i>	Nakdong River	n.d.	n.d.
NIER-10038	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Paldang Dam	+	+
NIER-10051	<i>Microcystis</i> sp.	Daechung Dam	n.d.	n.d.
NIER-10073	<i>Microcystis wesenbergii</i>	Daechung Dam	n.d.	n.d.
NIER-10055	<i>Microcystis</i> sp.	Daechung Dam	n.d.	n.d.
NIER-10056	<i>Microcystis</i> sp.	Daechung Dam	n.d.	n.d.
NIER-10058	<i>Microcystis</i> sp.	Juam Dam	n.d.	n.d.
NIER-10083	<i>Phormidium musicola</i>	Daechung Dam	n.d.	n.d.
NIER-10111	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Yeongchun Dam	+	+
NIER-10112	<i>Microcystis ichthyoblabe</i>	Ankei Dam	+	+
NIER-10113	<i>Microcystis viridis</i>	Ankei Dam	+	+

MCs: microcystins detected by ELISA analysis, +: detected, n.d.: not detected.

2002). Tillett 등(2000)에 따르면, 독소를 생성하는 *Microcystis*에 존재하는 *mcy* gene cluster는 chromosome상에서 두 개의 operon (*mcyA-C* 및 *mcyD-J*) 구조로 배열된 10개의 open reading frames (ORFs)을 암호화하는 55 kb의 DNA를 포함한다. 두 개의 operon중 *mcyA-C*는 nonribosomal peptide synthetase (NRPS) modules을 암호화하며, *mcyD-J*는 polyketide synthase (PKS) 및 NRPS modules을 암호화한다. 따라서, *mcy* 유전자를 선택적으로 증폭시킴으로써 microcystins 생성의 가능성을 확인할 수 있다.

국내에서도 상수원지를 중심으로 주로 *Microcystis*에 의한 수화가 빈번하게 발생하고 있으며(김과 문, 2000; 김 등, 2005; 박, 2005), 이들에 의해 생성된 microcystins의 농도가 구체적으로 보고된 바 있다(Park *et al.*, 1998). 하지만, microcystins의 검출을 위한 PCR법에 관한 연구는 거의 수행된 바 없다. 특히, 대부분의 식수를 상수원지로부터 공급받는 우리의 여건을 고려할 때, 독성 남조류의 대발생을 조기에 예측할 수 있는 PCR법의 도입은 정수장의 적절하고 신속한 대응을 위해서도 반드시 필요하다(Baker *et al.*, 2001).

이번 연구에서 저자들은 *mcyB* 유전자를 target으로 하는 TOX2P/TOX2M primer쌍에 의한 PCR 실험을 통해 국내의 수체에서 남조류 독성 검출의 가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Cyanobacterial strain and growth condition

실험에 사용된 남조류 균주(strain)들은 국립환경과학원(NIER, National Institute of Environmental Research)의 배양 균주들을 이용하였으며, 이들 균주들은 15개의 *Microcystis* 속과 1개의 *Phormidium musicola*로 구성되었다(Table 1). 실험을 위해 균주들은 약 30  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 의 조도와 25  $\pm$  1°C의 온도에서 CB medium(Watanabe, 1996)을 사용하여 성장시켰다.

### 2. Field sample

현장 시료들은 남조류가 출현한 2006년 6월과 9월 사이에 굴포천(1개 지점), 영천댐(1개 지점) 및 안계댐(2개 지점)으로 부터 각각 채집하였다. 출현종의 동정은 광학현미경(Zeiss Axioskop2, German) 400~1,000배에서 실시하였다. PCR 실험을 위해 현장시료들에 포함된 군체 혹은 사상체를 이루는 남조류들은 초음파 분쇄(Sonic Dismembrator 550, USA)를 통해 단일세포로 각각 분리하였으며, serial dilution 과정을 거친 후, mL당 약 1,000 cells을 함유한 50 mL의 시료를 Falcon tube(USA)에 넣어 분석 때까지 -20°C에서 보관하였다.

**3. PCR template**

Whole-cell PCR에 사용될 template의 준비를 위해 50 mL의 각 시료들(배양 균주 및 환경시료)을 30분 동안 4,000 g에서 원심분리 하여 1 mL로 농축시켰다. 농축된 각 시료는 15분 동안 10,000 g에서 원심분리 시켜 상등액 (supernatant)을 제거한 후 Mili-Q water (Millipore Coporation, USA)에 의해 mixing과 washing 과정을 3회 반복하였으며, 최종 100 µL (약 50,000 cells)로 농축시켰다.

**4. PCR amplification**

PCR 증폭을 위해 사용된 TOX2P/TOX2M primer쌍은 다음과 같다(Dittmann *et al.*, 1999).

TOX2P (forward primer):

5'-GGAACAAGTTGCACAGAATCCGC-3'

TOX2M (reverse primer):

5'-CCAATCCCTATCTAAACACAGTAACTCGG-3'

PCR 증폭은 GeneAmp2400 thermocycler (Perkin-Elmer Cetus, USA)을 이용하여 실시하였다. PCR mixture에는 10 × PCR buffer (Promega, USA) 2.5 µL, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 1.5 µL, dNTP (2.5 mM) 0.5 µL, bovine serum albumin (BSA, 12.5 mg · mL<sup>-1</sup>) 0.2 µL, Taq DNA polymerase (Promega, USA) 1U, template 2 µL 및 최종 25 µL의 volume으로 맞추기 위해 첨가된 증류수가 포함되었다. PCR은 95°C에서 3분 동안 predenaturation을 실시한 후, 95°C에서 30초, 66°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초씩 30 cycle을 반복하고, 72°C에서 10분 동안 final extension을 실시하였다.

**5. DNA sequencing**

PCR 생성물은 PCR Purification kit (Bio Basics, Canada)를 사용하여 정제 (purification) 하였으며, ABI Prism BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA)와 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 sequencing 하였다. 모든 염기서열은 BLAST 2.1을 사용하여 GenBank에 등록된 *mcyB*의 서열과 비교하였다.

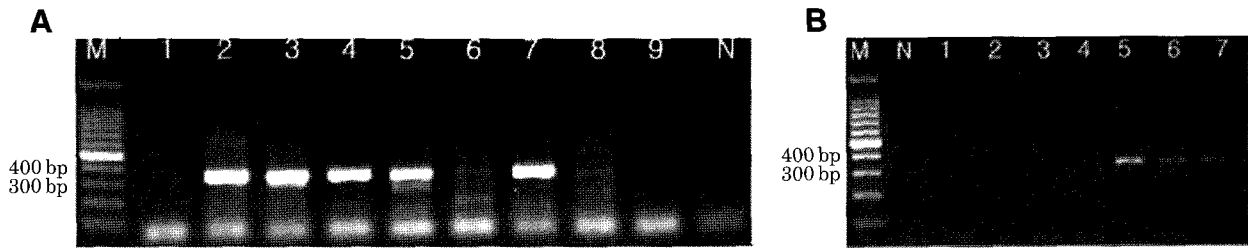
**6. ELISA analysis**

Microcystins의 정량 분석을 위해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 사용하였다. ELISA를 이용한 microcystins 분석은 0.16~2.5 ppb 범위에서 제작

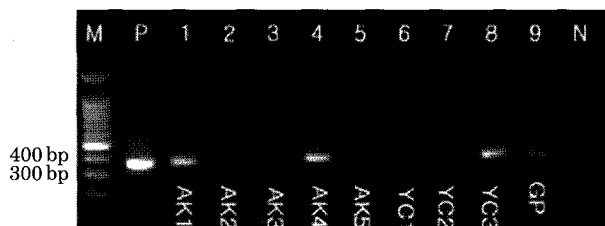
사의 protocol에 따라 Microcystin ELISA Plate Kit (EnviroLogix Inc., Portland, USA)를 사용하여 실시하였다. 분석에 앞서 100 mL의 sample은 진공농축기 (Labconco, USA)에서 동결건조 시켰으며, 건조된 시료들은 sonication (Sonic Dismembrator 550, USA)과 더불어 20 mL의 Milli-Q water (Millipore Coporation, USA)로 3회에 걸쳐 추출하였다. 추출물은 15분 동안 4,000 g에서 원심분리 하였으며, 상등액은 microcystins 분석을 위해 assay kit에 반응시켰다.

**결과 및 고찰**

TOX2P/TOX2M primer쌍을 이용하여 국내 8개 수체에서 분리한 국립환경과학원의 남조류 균주들을 대상으로 *mcyB* 유전자의 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 분석에서 16개의 균주들 중 8개의 균주들, *Microcystis* sp. NIER-10004, *Microcystis aeruginosa* NIER-10010, *Microcystis* sp. NIER-10012, *Microcystis viridis* NIER-10020, *Microcystis aeruginosa* NIER-10038, *Microcystis aeruginosa* NIER-10111, *Microcystis ichthyoblabe* NIER-10112, *Microcystis viridis* NIER-10113으로부터 350 bp의 PCR 산물이 형성되었다 (Fig. 1). 모든 PCR 결과들은 ELISA에 의한 microcystins의 정량분석 결과들과 일치하였다 (Table 1). *mcyB* 유전자 부위의 정확한 확인을 위해 band가 확인된 8개의 PCR 산물들을 대상으로 *mcyB* 유전자 서열분석을 실시한 후, 분석된 염기서열들을 GenBank에 등록된 균주들의 *mcyB* 서열들과 비교하였다. 그 결과, *mcyB* 유전자의 각 염기서열은 공통으로 *M. aeruginosa* (GenBank accession no. AB019578), *M. aeruginosa* (AB092806), *M. viridis* (AB092807) 및 *M. aeruginosa* PCC7813 (AY034601)의 *mcyB* 유전자의 부위와 98~100%의 identity를 나타내었다. 특히, *M. viridis* NIER-10020의 *mcyB* 염기서열은 *M. viridis* (AB092807)와 100%의 identity를 보였다. 따라서, 8개의 모든 PCR 산물들은 *mcyB* 유전자에 해당하는 부분임을 확신할 수 있었다. TOX2P/TOX2M primer쌍의 현장 적용성을 알아보기 위해 현장 (굴포천, 영천댐 및 안계댐)에서 채집한 9개의 시료들에 대해 DNA 추출과정을 생략한 whole-cell PCR을 실시한 결과, ELISA에 의해 microcystins 생성이 확인된 4개의 현장시료들에서만 양성 대조군 (*M. aeruginosa* NIER-10010)과 동일한 크기 (350 bp)의 PCR 산물이 확인되었다 (Fig. 2). 현장시료들에 대한 whole-PCR과 ELISA 분석결과들의 일치는 TOX2P/TOX2M primer쌍이 현장



**Fig. 1.** PCR amplification of *mcyB* gene by the oligonucleotide primers TOX2P/TOX2M from cyanobacterial strains. A. M: DNA marker, 1: *Microcystis aeruginosa* NIER-10001, 2: *Microcystis* sp. NIER-10004, 3: *Microcystis aeruginosa* NIER-10010, 4: *Microcystis* sp. NIER-10012, 5: *Microcystis viridis* NIER-10020, 6: *Microcystis novacekii* NIER-10022, 7: *Microcystis aeruginosa* NIER-10038, 8: *Microcystis* sp. NIER-10051, 9: *Microcystis wesenbergii* NIER-10073, N: negative control (dH<sub>2</sub>O); B. M: DNA marker, N: negative control (dH<sub>2</sub>O), 1: *Microcystis* sp. NIER-10055, 2: *Microcystis* sp. NIER-10056, 3: *Microcystis* sp. NIER-10058, 4: *Phormidium musicola* NIER-10083, 5: *Microcystis aeruginosa* NIER-10111, 6: *Microcystis ichthyoblabe* NIER-10112, 7: *Microcystis viridis* NIER-10113.



**Fig. 2.** PCR amplification of *mcyB* gene by the oligonucleotide primers TOX2P/TOX2M from water samples of Ankei Dam (AK), Yeongchun Dam (YC), and Goolpo Stream (GP). M: DNA marker, P: positive control (*M. aeruginosa* NIER-10010), N: negative control (dH<sub>2</sub>O).

에서 잠재적 microcystins 생성종의 확인을 위한 효과적인 probe임을 보여 주었다.

Microcystins의 합성에 관여하는 유전자 중에서 *mcyB* 유전자는 adenylation, thiolation 및 condensation domain을 각각 1개씩 포함하는 2개의 module로 구성되어 있다 (Tillett *et al.*, 2000). 이번 연구에 사용된 TOX2P/TOX2M primer쌍은 *mcyB* 유전자의 adenylation domain을 특이적으로 증폭시키기 위해 개발되었으며 (Dittmann *et al.*, 1999), Pan 등 (2002)은 TOX2P/TOX2M에 의한 PCR법은 microcystins 생성 균주를 매우 신속하고 효과적으로 검출할 수 있는 유용한 방법임을 이미 증명한 바 있다. 특히, 이번 연구를 통해 형태적으로 동일한 개체들 사이에서 독성 균주와 비독성 균주가 모두 확인되었다는 점은 주목할 만하다 (Table 1). 이는 선행연구들 (Neilan *et al.*, 1999; Ostuka *et al.*, 1999; Tillett *et al.*, 2001)에서 이미 증명된 바와 같이 *mcy* 유전자의 존재가 종의 형태적 특성과 무관하다는 사실을 잘 보여준다. 더욱이, 현장

(field)에서 형태적으로 동일하더라도 독성 및 비독성 균주는 환경요인들에 대한 적응성의 차이에 따라 출현 양상이 달라질 수 있다 (Bittencourt-Oliveira, 2003). 따라서, 국내에서 남조류의 모니터링 (monitoring)을 위해 많이 사용되고 있는 종의 형태학적 특성에 기초한 광학현미경 관찰법 (microscopic method)은 microcystins 생성 균주의 확인에는 부적절한 방법이다 (Dittmann and Wiegand, 2006).

이번 연구에서 *mcy* 유전자가 확인된 균주 및 현장시료들은 모두 ELISA에 의해 microcystins의 생성이 확인되었다 (Table 1). 이는 *mcy* 유전자를 지닌 *Microcystis* 개체들은 거의 예외 없이 microcystins를 실제로 생성한다고 보고한 선행 연구 결과들과 일치한다 (Via-Ordorika *et al.*, 2004; Dittmann and Börner, 2005). 우리나라는 1998년부터 상수원지를 중심으로 조류 예보제를 실시하고 있으며, 2006년 조류 예보제 시행계획 (환경부)에 따르면 남조류 세포수가 5,000 cells · mL<sup>-1</sup> 이상일 때 조류경보를 발령함과 동시에 HPLC에 의한 microcystins의 정량 분석을 권장하고 있다 (환경부, 2006). 하지만, HPLC에 의한 분석 방법은 microcystins의 직접적인 분석이 가능하다는 장점은 있으나, 전처리에 있어서 시간이 많이 소요되며, 다량의 시료를 필요로 한다 (Poon *et al.*, 2001). 따라서, 조류 경보가 발생되기 전의 상대적으로 낮은 남조류 밀도 수준에서는 HPLC 분석법을 적용하기 어렵다. 반면에, 조류예보제 대상호소들 (영천댐 및 안계댐)의 현장시료들을 중심으로 실시된 TOX2P/TOX2M primer쌍에 의한 whole cell PCR법은 조류경보 발령단계 이전의 밀도 수준 (약 1,000 cells · mL<sup>-1</sup>)에서도 매우 효과적이고 신속하게 *mcy* 유전자의 증폭에 성공하였다. 또한, whole-cell PCR법은 PCR과정에서 고가의 제품 (kit)을 사용하는

DNA 추출과정을 생략함으로써 비용의 절감뿐만 아니라 현장 적용에 있어 효율성을 높이는 측면에서 장점을 지닌다(Baker *et al.*, 2001). 결과적으로, TOX2P/TOX2M primer쌍에 기초한 PCR법과 HPLC법 사이의 적절한 호환이 이루어진다면 국내 수계의 microcystins에 대한 더 효율적인 모니터링이 가능할 것으로 판단된다.

적 요

남조류의 독성 잠재력을 확인하기 위해 microcystins 합성 유전자인 *mcyB*에 특이적으로 작용하는 TOX2P/TOX2M primer쌍을 이용한 whole-cell PCR을 실시하였다. 환경시료를 대상으로 한 실험 결과에서 TOX2P/TOX2M primer쌍은 약 1,000 cells · mL<sup>-1</sup>의 낮은 밀도에서 효과적으로 *mcyB* 유전자의 증폭에 성공하였으며, *mcyB* 유전자를 지닌 종들은 모두 ELISA 분석에 의해 microcystins의 생성이 확인되었다. 따라서, TOX2P/TOX2M primer쌍은 국내의 수체에서 독성 남조류의 신속하고 효과적인 검출을 위한 유용한 probe로 판단되었다.

인 용 문 헌

김한순, 문주환. 2000. 공산호에서 수화발생동안 *Microcystis aeruginosa* 수직분포의 변동, *육수지* **33**: 119-127.  
 김종민, 한명수, 정원화, 박준대. 2005. 팔당호에서 식물플랑크톤 군집 동태와 수질과의 상관성, *육수지* **38**: 217-224.  
 박종근. 2005. 대청호의 남조세균 수화 발달 특성, *환경생물* **23**: 304-314.  
 환경부. 2006. 조류예보제 시행계획. 환경부 수질보전국, 서울.  
 Baker, J.A., B.A. Neilan, B. Entsch and D.B. McKay. 2001. Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis. *Environ. Toxicol.* **16**: 472-482.  
 Baker, J.A., B. Entsch, B.A. Neilan and D.B. McKay. 2002. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 6070-6076.  
 Bittencourt-Oliveira, M.C. 2003. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. *Harmful Algae* **2**: 51-60.  
 Carmichael, W.W. 1988. Toxins of freshwater algae. p. 121-147. *In: Marine Toxins and Venoms, Handbook of Natural Toxins* (Tu, A.T., ed.). Marcel Dekker Press, New

York.  
 Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacterial secondary metabolites-the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 445-459.  
 Carmichael, W.W. 1996. Cyanobacterial toxins. *IOC Manuals and Guides* **33**: 163-175.  
 Codd, G.A., C.J. Ward, K.A. Beattie and S.G. Bell. 1999. Widening perceptions of the occurrence and significance of cyanobacterial toxins. p. 623-632. *In: The phototrophic prokaryotes* (Peschek, G.A., W. Loeffelhardt and G. Schmetterer, eds.). Kluwer Academic Press, New York.  
 Dittmann, E., B.A. Neilan and T. Börner. 1999. Peptide synthetase genes occur in various species of cyanobacteria. p. 615-621. *In: The phototrophic prokaryotes* (Peschek, G.A., W. Loeffelhardt and G. Schmetterer, eds.). Kluwer Academic/Plenum Press, New York.  
 Dittmann, E. and B.A. Börner. 2005. Genetic contribution to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **203**: 192-200.  
 Dittmann, E. and C. Wiegand. 2006. Cyanobacterial toxins -occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**: 7-17.  
 Falconer, I.R., A.M. Beresford and M.T.C. Runnegar. 1983. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Med. J. Aust.* **1**: 511-514.  
 Falconer, I.R. and A.R. Humpage. 1996. Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia* **35**: 74-79.  
 Kaebernick, M. and B.A. Neilan. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 1-9.  
 Kemp, A. and J. John. 2006. Microcystins associated with *Microcystis* dominated blooms in the Southwest wetlands, Western Australia. *Environ. Toxicol.* **21**: 125-130.  
 Meissner, K., E. Dittmann and T. Börner. 1996. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**: 295-303.  
 Neilan, B.A., D. Jacobs and A.E. Goodman. 1995. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3875-3883.  
 Neilan, B.A., D. Jacobs, T.D. Dot, 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*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 693-697.  
 Neilan, B.A., E. Dittmann, L. Rouhiainen, R.A. Bass, V. Schaub, K. Sivonen and T. Börner. 1999. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J.*

- Bacteriol.* **181**: 4089-4097.
- Nishizawa, T., M. Asayama, K. Fujii, K. Harada and M. Shirai. 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem.* **126**: 520-529.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto and M.M. Watanabe. 1998. 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 119-124.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto and M.M. Watanabe. 1999. Phylogenetic relationship between toxic and nontoxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**: 15-21.
- Pan, H., L. Song, Y. Liu and T. Börner. 2002. Detection of hepatotoxic *Microcystis* 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.
- 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.
- Sabour, B., M. Loudiki, B. Oudra, V. Vasconcelos, R. Martins, S. Oubraim and B. Fawzi. 2002. Toxicology of a *Microcystis ichthyoblabe* Waterbloom from Lake Oued Mellah (Morocco). *Environ. Toxicol.* **17**: 24-31.
- Sivonen, K. 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* **35**: 12-24.
- Sivonen, K. and G. Jones. 1999. Cyanobacterial toxins. p. 41-111. In: Toxic cyanobacteria in water (Chorus, I. and J. Bartram, eds.). A guide to their public health consequences, monitoring and management. E and FN Spon Press, London.
- Tillett, D., E. Dittmann, M. Erhard, H. von Dohren, T. Börner and B.A. Neilan. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* **7**: 753-764.
- Tillett, D., D.L. Parker and B.A. Neilan. 2001. Detection of toxigenicity 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2810-2818.
- Via-Ordorika, L., J. Fastner, R. Kurmayer, M. Hisbergues, E. Dittmann, J. Komarek, M. Erhard and I. Chorus. 2004. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *System. Appl. Microbiol.* **27**: 592-602.
- Watanabe, M.F. 1996. Toxic *Microcystis*. p. 35-56. In: Production of microcystin (Watanabe, M.F., K. Harada, W.W. Carmichael and H. Fujiki, eds.). CRC Press, Tokyo.

(Manuscript received 12 February 2007,  
Revision accepted 9 March 2007)