

담수 생태계에서 Microcystin을 생산하는 남조세균의 분리

이희선¹ · 오경희^{2,3} · 조영철^{1*}

¹충북대학교 환경공학과, ²충북대학교 바이오연구소, ³서울대학교 생명과학부

대청호와 용담호로부터 조류 독소인 microcystin을 생산하는 남조세균을 분리하고, 이의 16S rRNA와 microcystin 생합성 유전자(*mcyA*)를 분석하였다. 분리된 조류 중 대청호에서 분리된 DC-2와 용담호에서 분리된 YD-1, YD-6은 16S rRNA와 *mcyA* 유전자 염기서열을 분석한 결과 *Microcystis aeruginosa*에 속하는 것으로 판단되었다. 용담호에서 분리된 YDS2-3의 경우, *mcyA* 유전자는 *M. aeruginosa*와 매우 유사하나 16S rRNA 유전자는 매우 상이한 것으로 나타나 *Microcystis* 속에 속하는 새로운 종일 가능성이 있는 것으로 판단되었다. 대청호와 용담호 시료로부터 *mcyA* 유전자 library를 구축하여 분리된 조류의 유전자와 비교한 결과, DC-2의 *mcyA* 유전자가 두 호수에서 가장 우점하는 것과 일치하였다. 본 연구에서 분리된 조류는 독성 조류의 모니터링 및 제어에 관한 연구에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Key words □ Daechung Reservoir, *mcyA*, microcystin, *Microcystis*, Yongdam Reservoir

우리나라는 낮은 수자원 보유율을 높이기 위해 많은 수의 대형 댐을 건설하여 많은 양의 물을 체류시키고 있다. 댐의 건설로 인해 호소 내의 수리학적 체류시간이 길어졌으며, 만입부 등의 정체수역이 형성되어 호소 내부 및 외부로부터의 오염물질 유입에 의한 부영양화 가능성이 매우 높아졌다(2). 호소의 부영양화는 수자원 이용에 어려움을 일으키기도 하며, 식물플랑크톤의 과다 증식과 같은 조류 대발생(algal blooming)을 유발하기도 한다(2~4). 조류 대발생은 수체의 착색 뿐만 아니라 이취미를 발생시켜 음용수의 가치를 떨어뜨리기도 하며, 독소를 생산하는 조류가 대량 증식하는 경우 인간이나 가축에 해를 끼치기도 한다(2, 3)

일반적으로 빈영양 상태의 호소에서는 녹조류와 편모류가 우점하며, 부영양화된 호수에서는 남조류와 규조류가 우점하는 것으로 알려져 있다(4, 12). 호소에서 녹조가 일어날 때 주로 *Microcystis*와 *Anabaena*가 출현하며, 국내 대부분의 호소에서는 *Microcystis*가 우점하는 것으로 알려져 있다(2, 3).

조류가 생산하는 독소 중에서 가장 널리 알려진 것은 간독성을 가진 microcystin으로, 주요 원인 종은 *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc* spp. 등이 알려져 있다(8, 22). Microcystin은 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(20).

Microcystin을 합성하는데 관여하는 *mcy* gene cluster는 두 개의 operon (*mcyABC*와 *mcyDEFGHIJ*)에 10개의 open reading frame을 암호화하는 55 kb의 유전자로 구성되어 있다(7). 이들

중 *mcyA*에 대한 연구가 가장 활발히 진행되고 있는데, *mcyA*는 *N*-methyltransferase, adenylation, thiolation, epimerisation, condensation domain으로 구성되어 있다(8, 19). 최근에 *mcyA*의 condensation domain을 대상으로 조류의 microcystin 생성 여부 및 속(genus)을 구분할 수 있는 primer (*mcyA*-Cd 1F/*mcyA*-Cd 1R)가 개발되어 널리 사용되고 있다(8, 15).

Microcystin에 의한 사람의 피해 사례 중 가장 대표적인 것은 1996년 브라질의 Caruaru 지방에서 일어난 것으로, 신장투석환자 55명이 microcystin에 의해 오염된 물로 인해 사망하였다(13). 이 사건을 계기로 세계보건기구(WHO)에서는 남조세균이 생산하는 독소 중에서 유일하게 microcystin에 대해 1.0 µg microcystin-LR/L의 먹는 물 가이드라인을 제정하였다(21). 국내 주요 호수에서 microcystin의 함량을 조사한 결과, microcystin-RR, YR, LR이 각각 0.3~13.3 µg/L, 0.03~1.3 µg/L, 0.1~11.9 µg/L의 범위로 나타났다(1). 아직까지 국내에서는 조류가 생산하는 독소에 의해 심각한 피해가 보고된 적은 없으나, 주로 식수원으로 사용되는 호소에서 독소를 생산하는 조류가 대량 발생한다는 것을 고려할 때 독성 조류에 대한 연구가 지속적으로 이루어질 필요가 있다고 판단된다. 이를 위하여 국내 호소에 서식하는 독성 조류의 확보가 선행되어야 하나, 분리된 조류의 수가 아직까지 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 매년 녹조가 반복적으로 발생하는 대청호 및 용담호로부터 microcystin을 생산하는 남조세균을 분리하였으며, 이의 16S rRNA 및 *mcyA* 유전자를 분석하였다. 또한 대청호와 용담호에서 발견되는 *mcyA* 유전자의 특성을 분석하여, 분리된 남조세균에서 얻은 결과와 비교 분석하였다.

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-43-261-3577, Fax: 82-43-261-2465

E-mail: choy@chungbuk.ac.kr

재료 및 방법

시료의 채취

남조세균의 분리 및 독소 유전자의 분석에 사용된 시료는 대청호와 용담호에서 채수되었다. 대청호 시료는 소옥천 유역에 속한 추소리에서 채수되었으며, 용담호 시료는 용평대교 부근에서 채수되었다. 채취된 시료에서 엽록소 a를 분석한 결과 대청호와 용담호에서 각각 97.0 µg/L와 40.1 µg/L로 매우 높았다. 채취된 시료는 냉장 상태로 실험실로 옮겨 후속 실험을 수행하였다.

남조세균의 분리 및 배양

시료를 액체 CB 배지(2, 17)로 적당히 희석한 후, CB 평판배지 위에 도말하였다. CB 평판 배지는 액체 배지에 agarose LE (Promega, Madison, USA)를 첨가(0.4%, w/v)하여 만들었다(17). 평판배지는 parafilm으로 씌운 후, 25°C에서 light/dark (14시간/10시간)를 반복하면서 2주 동안 배양하였다. 자란 colony를 따서 다시 평판배지에 도말한 후 형성된 colony를 CB 액체 배지로 옮겨 배양하였다. 배양 후 배양액을 광학현미경 및 형광현미경으로 검정하여 순수 배양 여부를 확인하였다.

남조세균의 유전자 분석

분리된 남조세균의 배양액을 GF/C 여과지로 여과한 후, 급속 해냉동법을 사용하여 chromosomal DNA를 추출하고 phenol-chloroform법으로 정제하였다(10). 분리된 남조세균의 16S rRNA 유전자 단편을 분석하기 위하여 남조세균의 16S rRNA 유전자에 특이성을 가지는 primer (16SCF/Cya-R783)를 사용하여 PCR로 증폭하였다. Microcystin 합성 유전자의 분석은 mcyA-Cd 1F/mcyA-Cd 1R을 primer로 사용하였다(Table 1). 16SCF/Cya-R783을 이용한 PCR 조건은 94°C에서 3분간 반응시키고, 94°C, 58°C, 72°C에서 각각 30초 동안 반응시키는 주기를 30회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 10분간 반응을 시켰다. mcyA-Cd 1F/mcyA-Cd 1R의 경우는 결합온도를 54°C로 사용하였으며, 다

른 조건은 16SCF/Cya-R783와 동일하였다. 호소 시료의 경우 위에서 제시한 방법과 같이, GF/C로 여과한 후 급속 해냉동법으로 DNA를 추출한 후, mcyA-Cd 1F/mcyA-Cd 1R을 사용하여 PCR을 수행하였다.

PCR 산물은 PCR Purification Kit (TaKaRa, Japan)로 정제한 후, pGEM-T easy vector (Promega)를 사용하여 cloning을 하였다. 분리된 남조세균의 경우 증폭 유전자에 따라 각각 5개 정도의 colony를 선택하였으며, 호소 시료의 경우에는 각각 65개의 colony를 선택하였다. 16S rRNA 또는 mcyA 유전자의 PCR 산물의 크기가 각각 433, 297 bp로 작기 때문에 white/blue selection을 수행하지 않고, LA (+ampicillin) 배지에서 자란 colony를 무작위로 선택하였다. 선택된 colony는 24시간 배양 후, 16SCF/Cya-R783 또는 mcyA-Cd 1F/mcyA-Cd 1R로 PCR을 수행하여 16S rRNA 또는 mcyA 유전자가 삽입된 것을 확인하였다.

확인된 plasmid를 Miniprep Kit (Solgent, Korea)로 정제하였으며, M13F primer를 사용하여 DNA 염기서열분석기(Megabase 1000, GE Healthcare, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 16S rRNA의 염기서열을 RDP II에 입력하여 기존에 알려진 남조세균의 염기서열과 비교 분석하였다(6). mcyA 유전자의 경우 GenBank에서 내려 받은 유전자의 염기서열과 비교 분석하였다. 계통수는 MEGA 4.0을 사용하여 Neighbor-Joining method로 작성하였다(18).

결과 및 고찰

분리된 남조세균의 16S rRNA 유전자 분석

대청호와 용담호에서 조류대발생이 일어난 시기에 채취한 시료에서 독소를 생성하는 남조세균을 분리한 결과, 대청호에서는 DC-2, 용담호에서는 YD-1, YD-6, YDS2-3을 단일 조류로 분리하였다. 16S rRNA 유전자 분석 결과 DC-2, YD-1, YD-6은 *Microcystis aeruginosa*와 염기서열이 일치하는 것으로 나타났다(Table 2 and Fig. 1). DC-2와 YD-1은 염기서열이 일치하였으나,

Table 1. Primers used in this study

| Name | Sequence | Target gene | Size of amplicon (bp) | Reference |
|------------|--------------------------|-------------|-----------------------|------------|
| 16SCF | GGCAGCAGTGGGAATTTTC | 16S rRNA | 433 | This study |
| Cya-R783 | GACTACWGGGGTATCTAATCCCW | | | 23 |
| mcya-Cd 1F | AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT | mcya | 291~297 | 8 |
| mcya-Cd 1R | AAAATTAAAAGCCGTATCAAA | | | |

Table 2. Phylogenetic relationship of cyanobacteria isolated from lakes based on 16S rRNA gene sequences (GenBank accession no. for the closest relatives are given in parentheses)

| Strains | Nearest phylogenetic relative | Similarity |
|---------|---|------------|
| DC-2 | <i>Microcystis aeruginosa</i> NC7 (AB035549) | 1.000 |
| YD-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> NC7 (AB035549) | 1.000 |
| YD-6 | <i>Microcystis aeruginosa</i> LMECYA 7 (EU078485) | 1.000 |
| YDS2-3 | <i>Synechococcus</i> sp. PS721 (AF216954) | 0.986 |

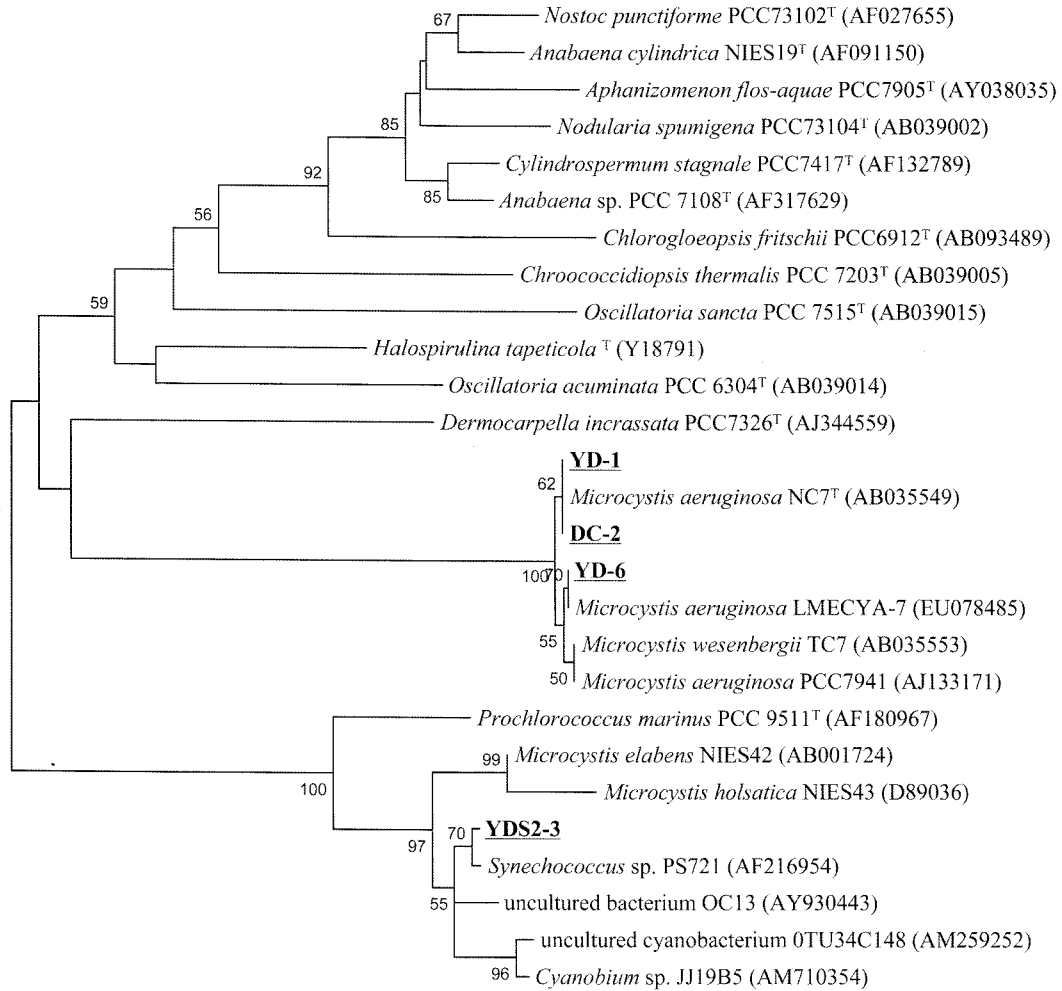


Fig. 1. Phylogenetic position of the isolated cyanobacteria based on 16S rRNA gene sequences, which were constructed in MEGA4. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method.

배양액에서의 성장 양상 및 현미경 관찰 결과와 *mcyA* 유전자 염기서열(Fig. 2)로 볼 때 두 남조세균은 동일한 strain이 아닌 것으로 판단되었다. 두 남조세균의 16S rRNA 유전자의 염기서열이 동일하게 나온 것은 본 연구에서 분석한 16S rRNA 유전자의 길이가 약 433 bp (Table 1)로 16S rRNA 유전자 전체를 분석하지 않았기 때문인 것으로 판단되며, 16S rRNA 유전자 전체를 분석한다면 보다 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이다.

YDS2-3의 경우 16S rRNA 유전자의 염기서열은 *Synechococcus* sp.와 유사성이 매우 높은 것으로 나타났다(Table 2). 하지만 microcystin을 생산하는 남조세균은 대부분 genus *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Planktothrix*에 속하는 것으로 알려져 있으며, 아직까지 *Synechococcus* 중에서 microcystin을 생산하는 것은 알려진 바가 없다(8, 22). 16S rRNA 유전자의 염기서열을 기초로 세균을 분류한 결과에 따르면, 대부분의 *Synechococcus*는 Group IIa와 Group X에 속하며, *Microcystis*의 대부분은 Group XI에 속한다(<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). 하지만, *Microcystis elabens* NIES42 (AB001724)

와 *Microcystis holsatica* NIES43 (D89036)은 Group IIa에 속한다(11). YDS2-3의 16S rRNA 유전자 염기서열은 Group IIa에 속하는 *Synechococcus* sp., *M. elabens*, *M. holsatica*와 유사하다(Fig. 2). 따라서 용담호에서 분리한 YDS2-3은 Group IIa에 속한 새로운 종류의 *Microcystis* sp.일 가능성이 큰 것으로 판단되며, 보다 심도있는 연구가 필요한 것으로 사료된다.

분리된 남조세균의 *mcyA* 유전자 염기서열 분석

대청호 및 용담호에서 분리된 4종류의 남조세균에서 microcystin의 생성에 관여하는 유전자인 *mcyA* 중 condensation domain의 일부 염기서열을 분석하였다. 분석 결과 4종류 모두 *Microcystis aeruginosa*의 *mcyA* 유전자와 유사한 것으로 나타났다(Table 3 and Fig. 2). *mcyA*-Cd 1F/*mcyA*-Cd 1R로 *mcyA* gene을 증폭하였을 때 291 bp 또는 297 bp의 amplicon이 만들어진다(8, 9). 본 연구에서 분리된 4종류의 남조세균은 모두 291 bp의 amplicon을 만들었다.

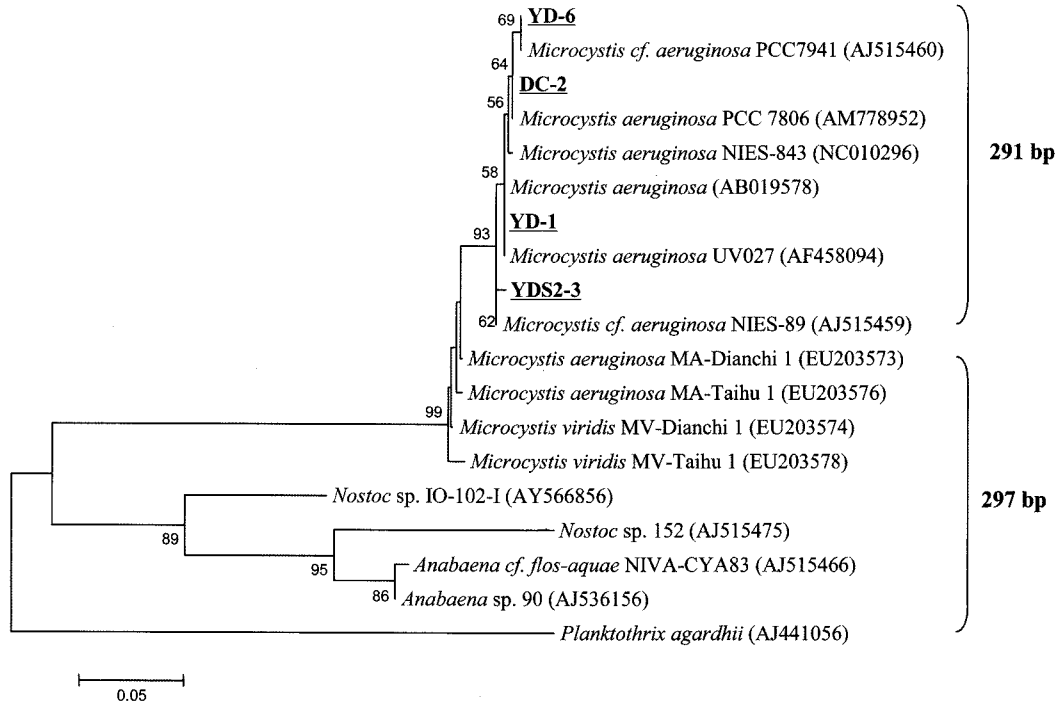


Fig. 2. Neighbor-joining tree displaying the relationship of partial *mcxA* sequences of known and isolated cyanobacteria, which were constructed in MEGA4.

현장 시료에서 *mcxA* 유전자 분석

독성 남조세균을 분리하기 위해 채취된 호소 시료에서 추출한 DNA로부터 *mcxA*-Cd 1F/*mcxA*-Cd 1R을 primer로 사용하여 *mcxA* 유전자를 PCR로 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. 각 시료 당 약 65개의 clone을 분석한 결과 대청호의 경우 각기 다른 염기서열을 가진 18개의 group으로 분류되었으며, 용담호 시료의 경우에는 9종류인 것으로 나타났다(Fig. 3). 대청호 시료에서 관찰된 amplicon의 크기는 모두 291 bp이었으며, 이 중 269 bp가 모든 group에서 일치하였고 22 bp에서 변이가 나타나, 각 group 별 DNA 유사도는 0.963~0.995이었다. 용담호 시료에서 관찰된 PCR product도 291 bp 길이며, 282 bp가 일치하였고 9 bp에서 변이가 나타났으며 유사도는 0.987~0.995이었다. 모든 clone의 염기서열이 *Microcystis aeruginosa*에서 발견되는 *mcxA*와 매우 근접한 것으로 나타났다(Fig. 4).

대청호 시료에서 관찰된 clone은 65개 중 DCCS08-1와 염기서열과 일치하는 것이 20개(30.8%)이고 DCCS08-2와 일치하는 것

은 29개(44.6%)이었으며, 나머지 16개는 각각 다른 염기서열을 나타내었다. 용담호 시료의 경우에는 YDYP08-1와 염기서열이 같은 것이 전체의 79.7%(51개/64개)를 차지하였으며, YDYP08-6는 전체의 7.8%(5개/64개)이었고, 나머지는 각각 다른 염기서열을 나타내었다. 대청호와 용담호에서 대부분을 차지하는 DCCS08-1과 DCCS08-2가 각각 YDYP08-1, YDYP08-6과 서로 염기서열이 일치하였다. 대청호와 용담호가 지리적으로 떨어져 있음에도 우점하는 *mcxA* 유전자가 같은 것은 두 호수가 같은 금강수계에 속하기 때문인 것으로 판단된다.

현장시료와 분리된 남조세균의 *mcxA* 유전자 염기서열을 비교한 결과 DS-2의 경우 DCCS08-1/YDYP08-1과 일치하였으며, YD-6의 경우 DCCS08-32와 일치하였다. YD-1과 YDS2-3의 경우 현장시료에서 분석된 *mcxA* 유전자와 일치하는 것이 없었다. 이는 YD-1과 YDS2-3의 *mcxA* 유전자가 대청호와 용담호에 적은 수로 존재하여, 제한된 수의 유전자를 분석한 본 연구에서 검출이 되지 않은 것으로 판단된다. 하지만 YD-1과 YDS2-3의

Table 3. The nearest relatives of *mcxA* gene sequences of isolated cyanobacteria (GenBank accession no. for the closest relatives are given in parentheses)

| Strains | Nearest relative | Similarity |
|---------|--|------------|
| DC-2 | <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 (AM778952) | 0.995 |
| YD-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> UV027 (AF458094) | 0.987 |
| YD-6 | <i>Microcystis cf. aeruginosa</i> PCC7941 (AJ515460) | 0.991 |
| YDS2-3 | <i>Microcystis cf. aeruginosa</i> NIES-89 (AJ515459) | 0.995 |

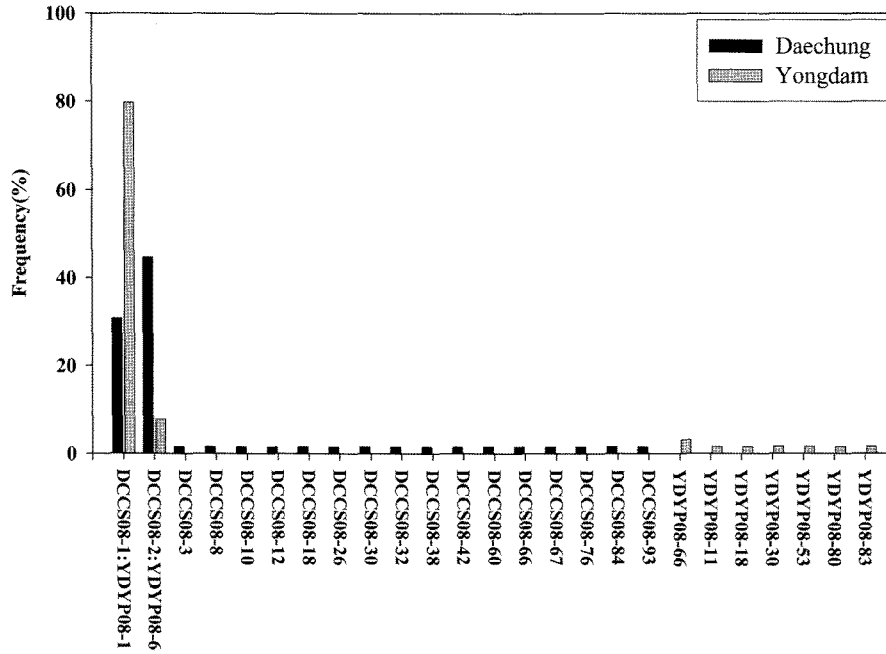


Fig. 3. Distribution and frequency of groups from partial *mcyA* gene clone libraries from Daechung and Yongdam Reservoirs.

mcyA 유전자가 검출되지 않은 것이 두 균주가 대칭호 및 용담호의 남조세균 군집에서 적은 부분을 차지하는 것을 의미하지는 않는다고 여겨진다. 왜냐하면 *mcyA* 유전자의 변이 때문에 *mcyA* 유전자의 유사도가 16S rRNA의 유사도를 반영하는 것은 아니라고 알려져 있기 때문이다(14). 본 연구에서도, 유전자의 일부분만을 분석한 한계는 있으나, DC-2와 YD-1의 경우 16S rRNA 유전자의 염기서열은 같지만, *mcyA* 유전자의 염기서열은 서로 다른 것으로 나타났다.

mcyA-Cd 1F/*mcyA*-Cd 1R은 microcystin을 생산하는 *Microcystis*, *Anabaena* 및 *Planktothrix*의 *mcyA* 중 condensation domain을 대상으로 설계한 primer로 여러 연구자들에 의해 널리 사용되고 있다(15, 16). *Microcystis*를 *mcyA*-Cd 1F/*mcyA*-Cd 1R로 증폭하였을 때 만들어지는 산물은 291 또는 297 bp이며, 297 bp의 경우 6 bp (TTTGCG, 2 amino acids)가 삽입된 것이다(Fig. 2 and 8). 현재까지 알려진 염기서열에 따르면 *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*은 모두 297 bp의 산물을 만든다(5, 8). 본 연구에 사용된

Table 4. Comparison of the sequences of *mcyA*-Cd 1F/*mcyA*-Cd 1R primers and known *mcyA* sequences of cyanobacteria

| Strains (GenBank Accession No.) | <i>mcyA</i> -Cd 1F | <i>mcyA</i> -Cd 1R |
|--|--------------------------|------------------------|
| <i>mcyA</i> -Cd 1F/ <i>mcyA</i> -Cd 1R | AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT | TTTGATACGGCTTTTAAATTTT |
| <i>Microcystis cf. aeruginosa</i> NIES-89 (AJ515459) | -----T-----A-G----- | ----T-G-T----T--- |
| <i>Microcystis cf. aeruginosa</i> PCC7941 (AJ515460) | -----T-----A-G----- | ----T-G-T----T--- |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843 (NC010296) | -----T-----G-G----- | ----T-G-T----T--- |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> UV027 (AF458094) | -----T-----G-G----- | ----T-G-T----T--- |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 (AF183408) | -----T-----G-G----- | ----T-G-T----T--- |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> (AB019578) | -----T-----G-C----- | ----T-G-T----T--- |
| <i>Anabaena cf. flos-aquae</i> NIVA-CYA83 (AJ515466) | -----T-----A-G----- | ----T-G-T----T--- |
| <i>Anabaena</i> sp. 90 (AJ536156) | -----T-----A-G----- | ----G-T-G----C--- |
| <i>Anabaena</i> sp. 66A (AJ515462) | -----G-----A-G----- | ----T-G-T----T--- |
| <i>Anabaena</i> sp. 66B (AJ515463) | -----G-----A-G----- | ----T-G-T----T--- |
| <i>Planktothrix agardhii</i> (AJ441056) | -----T-----A-G----- | ----T-G-T----T--- |
| <i>Planktothrix</i> sp. PCC7821 (AJ515473) | -----T-----A-G----- | ----T-G-T----T--- |
| <i>Nostoc</i> sp. 152 (AJ515475) | -----T-----A-G----- | ----T-G-T----T--- |

현장시료를 현미경으로 관찰한 결과 대청호 시료의 경우에는 대부분이 *Microcystis*였으나, 용담호 시료의 경우 *Microcystis*가 50% 정도를 차지하며 나머지는 *Anabaena*와 같은 heterocyst를 만드는 종류이었다. 용담호 시료에서 *mcyA* 유전자를 증폭하여 분석한 결과, 모두 *Microcystis*가 가지는 *mcyA*인 것으로 나타났으며 *Anabaena*가 가지는 *mcyA* 유전자는 나타나지 않았다. 이는 용담호에 있는 *Anabaena*류 남조세균은 microcystin 생산 유전자

를 가지지 않는 것으로 판단될 수 있다. 하지만, 현재까지 알려진 *mcyA* 유전자의 염기서열을 GenBank에서 내려 받아, *mcyA*-Cd 1F/*mcyA*-Cd 1R primer의 일치도를 조사한 결과, 다른 primer로 *mcyA*를 증폭하여 얻은 염기서열에서 *mcyA*-Cd 1F 및 *mcyA*-Cd 1R과 각각 3개, 4개의 염기서열에 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 4). 이러한 차이는 일부 *Microcystis*에서도 나타났으며, 특히 *Anabaena*의 경우에는 큰 차이가 있는 것으로 나타났다. Microcystin의 합성에 관여하는 gene cluster의 전체 염기서열이 밝혀진 *Anabaena* sp. 90 (*Anabaena circinalis* 90; AJ536156)의 경우에는 *mcyA*-Cd 1R 중 4개의 염기가 일치하지 않았다. 이러한 결과로 볼 때, 용담호에서 *Anabaena*의 *mcyA* 유전자가 증폭되지 않은 것은, *mcyA*-Cd 1F/*mcyA*-Cd 1R primer set가 용담호에 있는 *Anabaena*의 *mcyA*를 증폭하는데 적합하지 않을 가능성도 있다. 따라서 두 primer에 *Anabaena*의 *mcyA*를 증폭하는데 적합한 degenerate base로 바꾸거나, 다른 *mcy* 유전자를 대상으로 실험을 수행하여, 용담호에 있는 *Anabaena*의 microcystin 생성 여부를 확인해야 할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 남조세균에 의한 blooming이 매년 반복되는 대청호와 용담호로부터 4종류의 *Microcystis* 속에 속하는 남조세균을 분리하였으며, 이들의 독소 생산 유전자를 분석하였다. 특히, 분리된 남조세균 중 대청호에서 분리된 DC-2의 경우 대청호 및 용담호에서 우점하는 *mcyA* 유전자를 가지고 있는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 분리된 남조세균은 microcystin의 생성과 관련된 유전자의 monitoring 및 독소의 생산에 영향을 미치는 요인 분석을 위한 실험실 실험에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 말

이 논문은 2007년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김법철, 김호섭, 박호동, 최광순, 박종근. 1999. 국내 호수에서 발생한 남조류의 microcystin 함량과 독성평가. 한국육수학회지 32, 288-294.
2. 박혜경. 2007. 수자원 관리를 위한 조류 분석법. 대한환경공학회지 29, 593-609.
3. 이현경, 김준호, 유순애, 안태석, 김치경, 이동훈. 2003. 독소 생성 *Microcystis* 검출을 위한 PCR primer의 평가. 한국미생물학회지 39, 166-174.
4. 정승현, 안치용, 최애란, 장감용, 오희목. 2005. 대청호에서 강우와 식물플랑크톤 군집의 관계. 한국환경생물학회지 23, 57-63.
5. Christiansen, G., J. Fastner, M. Erhard, T. Borner, and E. Dittmann. 2003. Microcystin biosynthesis in planktothrix: genes, evolution, and manipulation. *J. Bacteriol.* 185, 564-572.
6. Cole, J.R., B. Chai, R.J. Farris, Q. Wang, A.S. Kulam-Syed-Mohideen, D.M. McGarrell, A.M. Bandela, E. Cardenas, G.M. Garrity, and J.M. Tiedje. 2007. The ribosomal database project

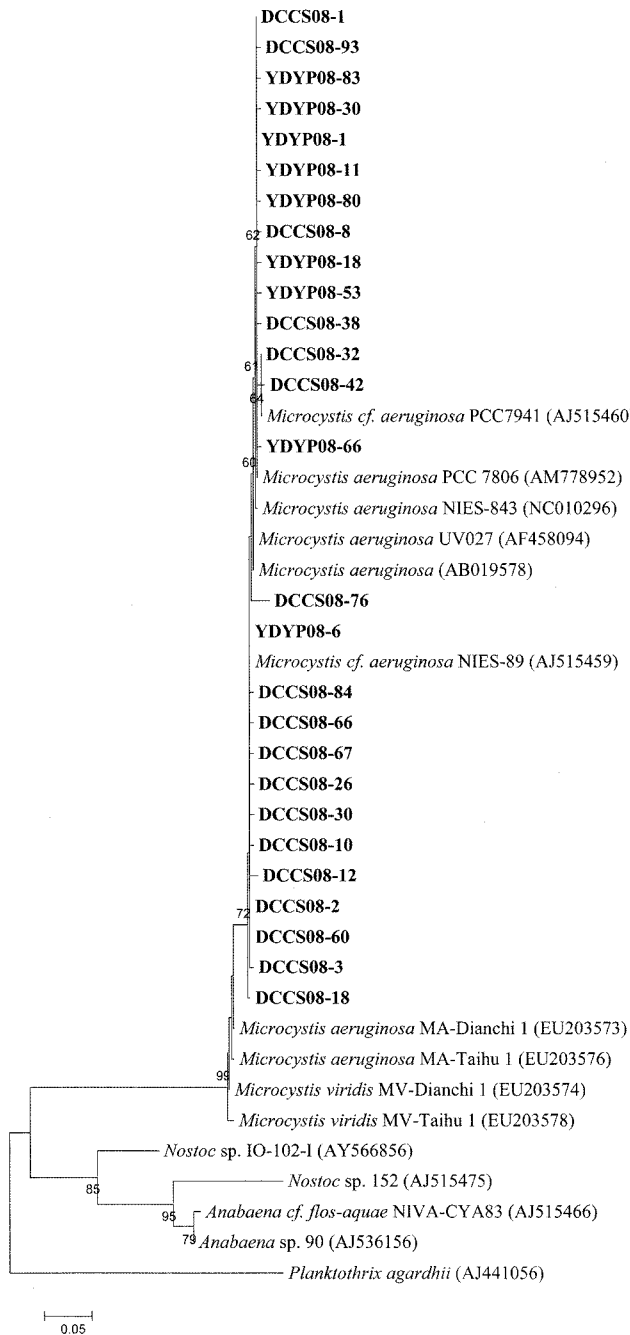


Fig. 4. Neighbor-joining tree displaying the relationship of partial *mcyA* sequences from two reservoirs, which were constructed in MEGA4.

- (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* 35, D169-D172.
7. Dittmann, E. and T. Börner. 2005. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol. Appl. Pharm.* 203, 192-200.
 8. Hisbergues, M., G. Christiansen, L. Rouhiainen, K. Sivonen, and T. Börner. 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch. Microbiol.* 180, 402-410.
 9. Hotto, A.M., M.F. Satchwell, and G.L. Boyer. 2007. Molecular characterization of potential microcystin-producing cyanobacteria in Lake Ontario embayments and nearshore waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4570-4578.
 10. Kim, J.B., M.S. Moon, D.H. Lee, S.T. Lee, M. Bazzicalupo, and C.K. Kim. 2004. Comparative analysis of cyanobacterial communities from polluted reservoirs in Korea. *J. Microbiol.* 42, 181-187.
 11. Kondo, R., M. Komura, S. Hiroishi, and Y. Hata. 1998. Detection and 16S rDNA sequence analysis of a bloom-forming cyanobacterial genus *Microcystis*. *Fish. Sci.* 64, 840-841.
 12. Negro, A.I., C.D. Hoyos, and J.C. Vega. 2000. Phytoplankton structure and dynamics in Lake Sanabria and Valparaiso reservoir (NW Spain). *Hydrobiologia* 424, 25-37.
 13. Pouria, S., A. Deandrade, J. Barbosa, R.L. Carvalcanti, V.T.S. Barreto, C.J. Ward, W. Preiser, G.K. Poon, G.H. Neild, and G.A. Codd. 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352, 21-26.
 14. Rantala, A., D.P. Fewer, M. Hisbergues, L. Rouhiainen, J. Vaitomaa, T. Börner, and K. Sivonen. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101, 568-573.
 15. Rinta-Kanto, J.M. and S.W. Wilhelm. 2006. Diversity of microcystin-producing cyanobacteria in spatially isolated regions of Lake Erie. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5083-5085.
 16. Saker, M.L., M. Vale, D. Kramer, and V.M. Vasconcelos. 2007. Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 441-449.
 17. Shirai, M., K. Matumaru, A. Ohtake, Y. Takamura, T. Aida, and M. Nakano. 1989. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2569-2571.
 18. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
 19. Tanabe, Y., K. Kaya, and M.M. Watanabe. 2004. Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp.. *J. Mol. Evol.* 58, 633-641.
 20. Welker, M. and H. Von Dhrén. 2006. Cyanobacterial peptides-nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 530-563.
 21. WHO. 1998. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed., Addendum to Volume 1. Recommendations, p. 13-14. World Health Organization, Geneva.
 22. Zurawell, R.W., H. Chen, J.M. Burke, and E.E. Prepas. 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in fresh water environments. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 8, 1-37.
 23. Zwart, G., M.P. Kamst-van Agterveld, I. Van Der Werff-Staverman, F. Hagen, H.L. Hoogveld, and H.J. Gons. 2005. Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. *Environ. Microbiol.* 7, 365-377.

(Received September 3, 2008/Accepted September 23, 2008)

ABSTRACT: Isolation of Cyanobacteria Producing Microcystin from Lakes

Hee Seon Lee¹, Kyoung-Hee Oh^{2,3}, and Young-Cheol Cho^{1*} (¹Department of Environmental Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea, ²Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea, ³School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-749, Republic of Korea)

Four potential microcystin-producing cyanobacteria were isolated from large reservoirs which act as sources of drinking water supply in Korea. Strain DC-2, YD-1, and YD-6 were closely related to *Microcystis aeruginosa* based on the analysis of 16S rRNA gene and *mcyA* gene sequences. *mcyA* gene sequence of YDS2-3, isolated from Yongdam Reservoir, was closed to that of *M. aeruginosa*, whereas 16S rRNA gene sequence was not related to the known sequences of microcystin-producing cyanobacteria indicating this strain can be a novel cyanobacterium belonging to the genus *Microcystis*. When *mcyA* gene sequences of isolated cyanobacteria were compared with the *mcyA* gene sequence library of two reservoirs, the sequence of DC-2 matched with the dominant ones.