

Microcystin을 분해하는 신균주 *Microbacterium* sp. MA21

고소라 · 이영기 · 오희목 · 안치용*

한국생명공학연구원 환경바이오연구센터

A Novel Microcystin-degrading Bacterium, *Microbacterium* sp. MA21

So-Ra Ko, Young-Ki Lee, Hee-Mock Oh and Chi-Yong Ahn*

Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

Abstract - A microcystin-degrading bacterium was isolated from Daechung reservoir, Korea. The isolated bacterium was identified as *Microbacterium* sp. by 16S rRNA gene sequence analysis, and designated as *Microbacterium* sp. MA21. This strain degraded cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR, over 80% when incubated at 30°C for 12 hr in R2A medium. Two unknown metabolites of microcystin were also identified during the degradation process. Although only *Sphingomonas* and *Actinobacteria* have been known to degrade microcystin previously, this is the first report that *Microbacterium* sp. MA21 could degrade microcystin.

Key words : degrading bacteria, HPLC, microcystin-LR, *Microbacterium* sp.

서 론

국내 하천이나 호소수에서 부영양화 발생시에 빈번하게 출현하는 남조류는 *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*) 등이 대표적으로 알려져 있으며, *Microcystis* 속의 종들이 가장 빈번히 우점하고 있다(Kim *et al.* 1999; Lee *et al.* 2003). 특히, 여름철마다 남조류의 대량증식에 의한 수화현상(algal bloom)은 악취는 물론 일부 종들에 의해 생산되는 독소로 인해 심각한 수질 문제를 야기시킨다. 남조류가 생산하는 독소 중에서 간독소인 microcystin(MC)이 가장 대표적인 독소로 알려져 있다. Microcystin은 총 7개의 아미노산으로 구성된 환상 펩타이드

구조를 지니고 있으며, 열에 대해 높은 안정성을 갖고, 극성이 낮은 물질로서 두 개의 치환 아미노산에 따라 LR, LA, YR, RR 등을 포함하여 80종 이상의 다양한 종류가 있다. 이 중 가장 독성이 높은 물질은 microcystin-LR로 알려져 있다(Sivonen and Jones 1999). 음용수의 안전성을 확보하기 위하여 WHO(1998)는 대표적인 microcystin-LR의 최대 허용농도를 $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 지정하였지만, 우리나라는 아직 남조류 독소에 대한 공식적인 먹는 물 가이드라인이 없는 상황이다. 그렇지만 남조류 독소에 의한 먹는 물 위해성 방지를 위해 상수원수를 대상으로 실시되고 있는 조류경보제에서 microcystin-LR $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 에 해당하는 유해 남조류 세포수 약 $5,000 \text{ cells mL}^{-1}$ 를 조류경보의 기준으로 하고 있다(NIER 2008).

*Microbacterium*은 토양과 폐수, 병원의 공기나 가습기 등 환경에 널리 분포하며, 사람에게서는 드물게 질병과 관련된 것으로 알려진 그람 양성균으로서 호기성이며,

* Corresponding author: Chi-Yong Ahn, Tel. 042-860-4329,
Fax. 042-879-8103, E-mail. cyahn@kribb.re.kr

노란색 색소를 생성하는 coryneform 세균이다. 지금까지 60여 종 이상이 알려져 있으며, 최근에도 지속적으로 새로운 종이 보고되고 있다 또한 *Microbacterium*속의 미생물로 xylan 분해균, chitosanase 생산균, α -glucosidase 생산균, cellulase 생산균, mannan 분해균 등이 분리된 바 있다 (Yoon 2011). 그러나 이들 박테리아에 의한 microcystin 분해에 대한 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 *Microcystis*가 우점하는 국내 호소에서 microcystin를 분해하는 *Microbacterium* 1종을 분리하여 이들의 microcystin 분해능을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균주 분리 및 배양

부영양화 시기 (2010년 8월)에 대청호에서 채취한 시료를 단계별로 희석한 후 *Microcystis*와 공존하는 다양한 박테리아를 분리하였다. 미생물 분리, 배양에 사용한 배지는 R2A 영양배지를 사용하였고, 배양조건은 30°C에서 18시간 동안 진탕 호기 배양하였다. Microcystin 분해능을 나타내는 균주를 분리하기 위해 R2A 배지에 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ microcystin-LR을 첨가하여 동일 조건으로 배양한 후, protein phosphatase inhibition assay (PPIA)를 통해 분해능을 나타내는 균주를 선별하였다. 최종 선별된 균주의 microcystin 분해 실험은 R2A 배지에 18시간 전배양한 배양액을 새로운 R2A 배지에 optical density (OD_{600nm})가 0.3이 되도록 분주한 후, microcystin-LR을 최종 농도 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ 가 되도록 첨가하여 분해실험을 수행하였다.

2. Microcystin 추출 및 정량분석

1) HPLC

Microcystin-LR의 표준시료 (Alexis, Switzerland)를 100% 메탄올 1 mL에 녹인 후 농도별로 희석하여 사용하였다. Microcystin 분석법은 크게 HPLC/UV법, LC/MS법, GC/MS법 등을 이용한 기기분석법과 ELISA를 이용한 분자생물학적 방법 그리고 효소를 이용한 PPIA법이 있다. 효소를 이용한 PPIA법과 ELISA는 감도가 매우 뛰어나지만 microcystin의 변종에 대한 개별 분석이 어렵다는 단점이 있고, HPLC법은 분석 값의 오차와 검출한계를 낮추는 데 한계가 있으므로 (Kim *et al.* 2009), 두 가지 방법을 병행하여 단점을 보완하고자 하였다.

배양액에 포함된 microcystin의 농도를 측정하기 위해

시, 시료 1 mL을 동결 건조한 후, 동량의 50% 메탄올을 첨가하여 강한 vortexing과 sonication을 통해 microcystin를 추출하였다 (Manage *et al.* 2009). 추출액은 10분 동안 4,000 rpm으로 원심 분리하였다. 분리된 상등액을 0.45 μm Nylon syringe filter로 여과하여 최종 50 μL 로 용출한 것을 HPLC (CLASS-LC10, Shimadzu) 기기를 이용하여 분석하였다. Column은 역상의 Nucleosil C18 (5 μm , 150-by 4.6 mm inside diameter)을 사용하였고, injection volume은 20 μL 로 정하였다. 이동상은 methanol과 0.05% TFA (trifluoroacetic acid)가 포함된 water를 52 : 48 (v/v)로 혼합하여 사용하였다. Flow rate는 1 mL min⁻¹으로 하여 238 nm에서 peak를 측정하였다. 순수한 microcystin-LR을 외부표준물질로 사용하여, microcystin의 peak를 판별하고 정량하였다 (Oh *et al.* 2001). 검출한계는 0.1 mg L⁻¹이었다 (Zhou *et al.* 2010).

2) PPIA (Protein Phosphatase Inhibition Assay)

효소용액인 protein phosphatase 1 (Sigma Co., USA)을 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM Na₂EDTA, 2 mM MnCl₂, 0.1% β -mercaptoethanol (v/v), 0.5 mg L⁻¹ BSA를 함유하고 있는 protein phosphatase 희석 buffer에 녹여 준비하였다. 기질용액은 *para*-nitrophenyl phosphate (Sigma Co., USA)를 50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 0.2 mM MnCl₂, 20 mM MgCl₂를 함유하는 buffer에 녹여 준비하였다. 효소용액 10 μL 를 tube에 넣고, 표준 용액 및 시료 25 μL 를 넣고 37°C에서 1분간 전 배양하여 효소와 독소가 반응하도록 하였다. 그 용액에 기질용액 100 μL 를 넣고 37°C에서 22분간 반응시킨다. 반응 후, 흡광도 405 nm에서 시료 값을 측정하였다 (An and Carmichael 1994).

3. PCR 증폭 및 염기서열 분석

배양된 시료를 원심분리 (6,300 \times g, 10 min)를 이용하여 농축하였고, 회수한 세포로부터 DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR 반응에 사용된 primer는 universal primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였다 (Lane 1991). PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 초기 열처리를 한 후, 94°C에서 1분간 변성시키고, 결합 온도는 56°C에서 30 cycle을 수행하여 1분간 반응시키고 신장을 위하여 72°C에서 1분간 반응시킨 후 최종적으로 72°C에서 10분간 처리하고 반응을 중단시켰다. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

PCR로 증폭된 DNA는 Gel extraction kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 automatic DNA sequencer (model 377, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 GenBank DB를 이용하여 BLAST search program을 통해 분석하였다.

분리한 박테리아의 계통분류학적 분석을 위해 Clustal-X 프로그램과 MEGA version 3.1의 neighbor-joining method를 이용하여 phylogenetic tree를 완성하였다. Kim *et al.* (2006)의 방법에 따라, bootstrap 분석은 1,000회의 resampling을 통하여 조사하였고, 염기서열 간 distances 계산은 Kimura's two parameter model을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 분리 균주의 Microcystin 분해

Microcystin-LR 분해능을 나타내는 분리 균주를 이용하여 배양 시간에 따른 세포 성장과 microcystin-LR 분해를 조사하였다. $50 \mu\text{g L}^{-1}$ microcystin을 처리하여 배양한 결과, 9시간 후 분리균주는 0.8로 최고 OD를 나타냈고, 이는 초기 접종량 (OD 0.3)에 비해 2.6배 증가된 수치였다 (Fig. 1). 배양 시간에 따른 microcystin 분해율은 PPIA를 통해 확인하였다. 대조구의 독소 농도는 거의 변화가 없는 반면, 분리균주 *Microbacterium sp.* MA21을 접종한 처리구의 경우 배양 3시간 후부터 지속적으로

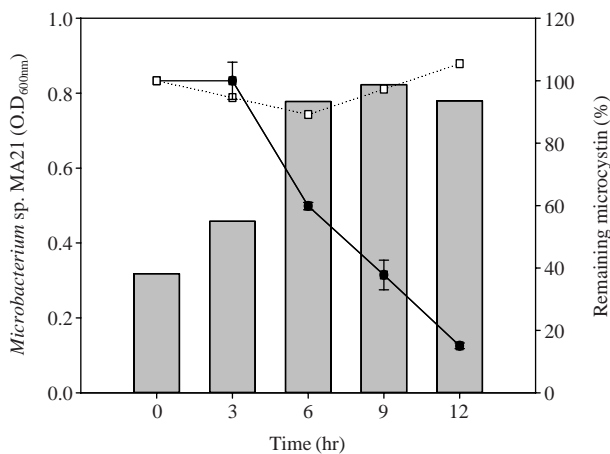


Fig. 1. Microcystin-LR degradation during the growth of *Microbacterium sp.* MA21 in R2A medium containing microcystin-LR (final concentration $50 \mu\text{g L}^{-1}$). Remaining microcystin (%) without *Microbacterium sp.* MA21 (□), with *Microbacterium sp.* MA21 (■), and OD_{600nm} of the culture (gray bar).

microcystin-LR의 농도가 감소하였다. 또한 12시간 배양 후, 초기 접종 농도와 비교하여 microcystin-LR이 80% 이상 분해되는 것을 확인하였다 (Fig. 1). Microcystin-LR이 가장 많이 분해된 12시간 배양액을 대상으로 HPLC를 이용하여 microcystin 분해율을 재확인하였다. 그 결과, microcystin-LR을 나타내는 peak (retention time 31분)의 area 값이 18% 감소하였고, microcystin의 분해산물로 추정되는 peak A와 B가 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 그러나 HPLC를 이용한 microcystin 정량분석은 HPLC의 검출한계로 인하여 정확한 microcystin의 분해율을 검증하는 데에는 한계가 있다 (Hummert *et al.* 2001). 본 연구에서는 낮은 농도 ($50 \mu\text{g L}^{-1}$)의 microcystin을 대상으로 분해실험을 수행하였고, PPIA와 비교하여 HPLC의 경우 분해율이 상대적으로 낮은 비율로 감소된 것으로 조사되었다.

최근 들어 microcystin 분해 미생물의 분리 및 동정에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 특히, *Sphingomonas sp.*의 경우 microcystin-LR 또는 RR을 분해하는 균주로 알려져 있고 이미 다양한 종이 분리, 연구되고 있다 (Bourne *et al.* 1996; Okano *et al.* 2009; Wang *et al.* 2010). Microcystin 분해과정에서 microcystin 분해 유전자라고 추정되는 유전자들 또한 *Sphingomonas sp.*에서 동정되었다. Bourne *et al.* (2001)의 경우, microcystin 분해 균주로 *Sphingomonas sp.* strain MJ-PV를 분리하였고, 이들의 gene library screening을 통해 microcystin 분해에 관련된 유전자 *mlrA*, *mlrB*, *mlrC*, *mlrD*를 분리, 확인하였다. 또한 microcystin-RR을 분해한다고 알려진 USB-05균주의 경우 16S rRNA 염기서열 분석결과 *Sphingomonas sp.*로 동정되었으며 microcystin-RR 분해에 최소 3개 이상의 유전자가 관여한다는 연구가 보고된 바 있다 (Wang *et al.* 2010).

Bourne *et al.* (1996)에 의하면 microcystin-LR의 경우, 첫 번째 분해 단계로 microcystinase에 의해 환상형에서 직선형태의 구조로 선형화된 후, 다른 효소에 의해 짧은 형태의 peptide로 분해된다고 보고된 바 있다. 또한 Microcystinase에 의한 첫 번째 분해 과정을 HPLC와 LC/MS로 분석한 결과, 두 개의 산물이 관찰되었다. 분해 산물 중 하나는 선형의 microcystin-LR ($\text{NH}_2\text{-Adda-Glu(iso)-methyldehydroalanine-Ala-Leu-}\beta\text{-methylaspartate-Arg-OH}$)로 m/z 1,013.5의 분자량을 가지며, 또 다른 산물은 tetrapeptide인 $\text{NH}_2\text{-Adda-Glu(iso)-methyldehydroalanine-Ala-OH}$ 로 m/z 615의 분자량을 갖는 것으로 확인하였다. 본 연구에서도 분리 균주인 *Microbacterium sp.*에 의해 microcystin-LR이 분해되어 HPLC 상 두 개의 산물이 새로이 관찰되었다.

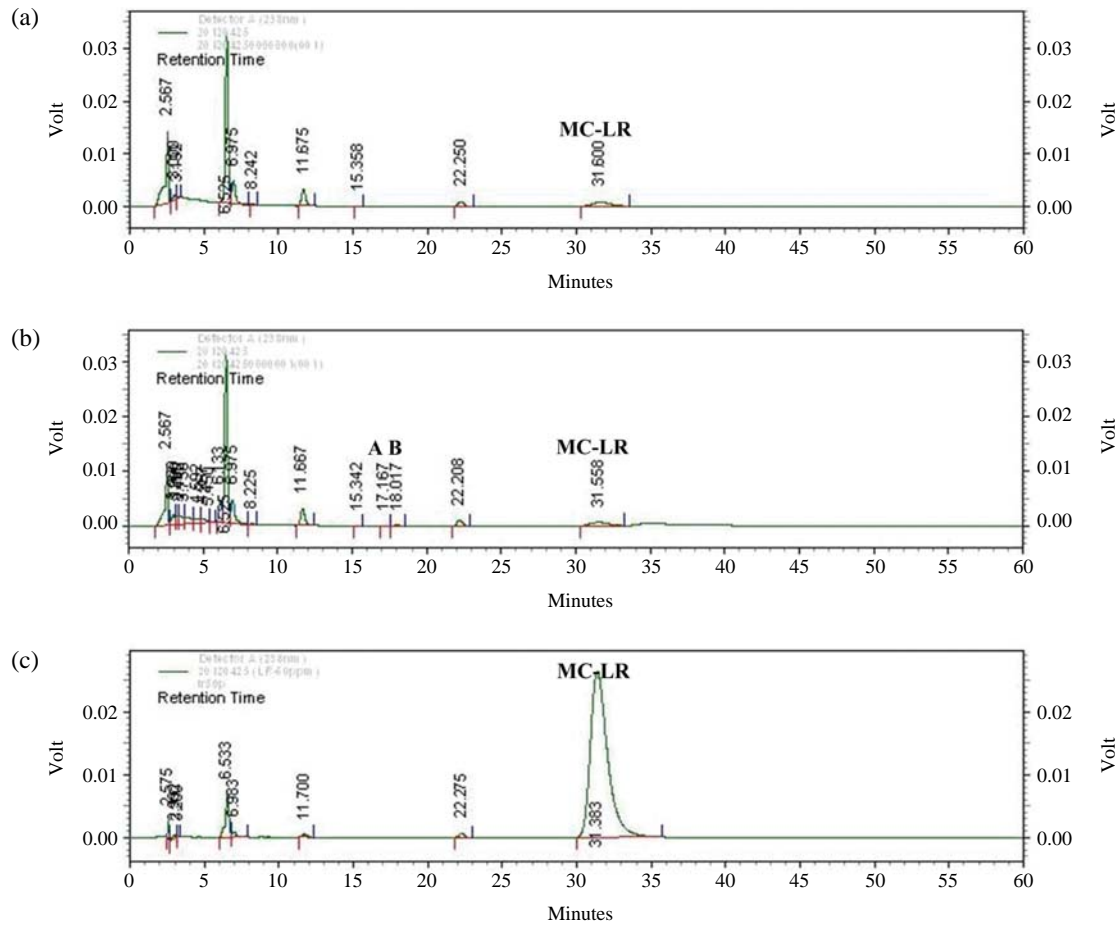


Fig. 2. HPLC profiles of the biodegradation of microcystin-LR by *Microbacterium* sp. MA21 at time zero (a), 12 h (b) and standard microcystin-LR(c). Peaks A and B indicate biodegradation products of microcystin-LR.

2. 분리 균주 동정 및 계통 분류

본 연구에서 분리한 균주를 16S rDNA 염기서열로 동정한 결과 *Microbacterium* sp.로 동정되었고(GenBank accession number AM403159, 98.7% similarity), 이 균주를 *Microbacterium* sp. MA21이라 명명하였다.

이전에 보고된 microcystin 분해 미생물은 대부분이 *Sphingomonas* sp.에 해당하는 균주로, 최초 보고된 균주는 호주에서 분리된 *Sphingomonas* sp. ACM-3962로 microcystin-LR과 RR을 분해한다(Jones and Orr 1994; Bourne *et al.* 1996, 2001). 또한 Suwa호에서 분리한 *Sphingomonas* sp. Y2 (Park *et al.* 2001; Maruyama *et al.* 2003), *Sphingomonas* sp. 7CY (Ishii *et al.* 2004)는 microcystin-LR을 비롯하여 RR, YR까지도 분해한다고 보고되었다. 특히적으로, microcystin-RR만을 분해하는 *Sphingomonas* sp. CBA4 (Valeria *et al.* 2006)와 *Sphingopyxis* sp. (Wang

et al. 2010)도 보고된 바 있다. 그러나 대부분 microcystin을 분해한다고 보고된 균주들은 *Sphingomonas* sp.로 alphaproteobacteria 강에 속하는 균주들이었다. Manage *et al.* (2009)에 의해 *Sphingomonas* 속에 속하지 않는 microcystin 분해 균주가 보고되었다. 이 균주들은 모두 환경에서 분리된 균으로 배양 3일 후 microcystin-LR을 96% 이상 분해 효율을 보였고, 16S rRNA 염기서열을 이용한 계통분류 분석 결과, Actinobacteria에 속하는 *Arthrobacter* sp. *Brevibacterium* sp. 그리고 *Rhodococcus* sp.로 확인되었다. 이외에도 microcystin을 분해하는 균주로 *Ralstonia solanacearum* (Yan *et al.* 2004), *Paucibacter toxinivorans* (Rapala *et al.* 2005), *Burkholderia* sp. (Lemes *et al.* 2008), *Methylobacillus* sp. (Hu *et al.* 2009)가 보고된 바 있다.

Microbacterium sp. MA21로 명명된 분리균주를 이용하여 계통분류 분석한 결과 microcystin 분해 균주로 알려진 기존의 균주들과 다른 새로운 종으로 확인되었다

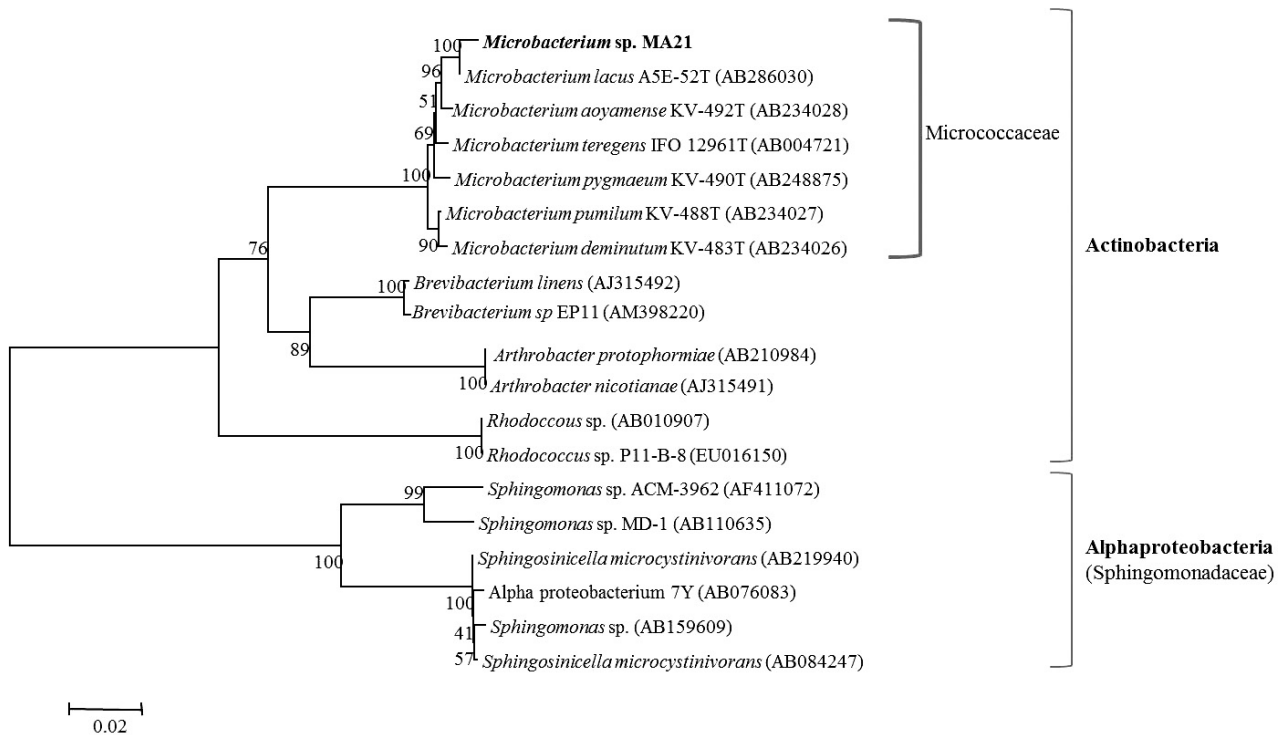


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic position of isolated bacteria to other members of the *Actinobacteria* group and to microcystin-degrading *Alphaproteobacteria*. Bootstrap analysis was based on 1,000 replicates. Scale indicates 2% sequence divergence.

(Fig. 3). 기존에 알려진 microcystin 분해 유전자들 (*mlrA*, *B*, *C*, *D*)은 소수의 *Sphingomonas* sp.에 국한되었다 (Bourne *et al.* 2001). 또한 이를 제외한 몇몇의 다른 그람 음성균에서도 microcystin 분해 유전자 유전자가 검출되었다는 보고는 있으나, 그람 양성균에서는 분해 유전자에 관한 결과는 보고된 적이 없었다 (Shimizu *et al.* 2011). 그러나 이번 연구에서 분리한 균주인 *Microbacterium* sp. MA21의 경우, 그람 양성균임에도 *Sphingomonas* 유래 *mlr* 유전자를 증폭할 수 있는 degenerated PCR primer (Ho *et al.* 2007)를 사용하여 PCR 수행 결과, 59%로 유사도는 낮지만 *mlrA* 유전자로 추정되는 증폭산물이 확인되었다 (data not shown).

본 연구에서는 환경에서 microcystin-LR 분해능을 나타내는 균주를 분리, 동정하였다. 분리한 균주를 최종농도 $50 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 microcystin-LR을 포함한 R2A 배지에서 30°C 에서 12시간 동안 배양하여 80% 이상의 분해효율을 나타내는 것을 PPIA를 통하여 확인하였다. 또한, HPLC를 통하여 12시간이 지난 후 microcystin-LR의 peak가 감소하며, 분해 산물로 추정되는 두 개의 peak를 확인하였다. 16S rRNA 염기서열 분석 결과 *Microbacterium*에 속하는 종으로 동정되었고, 계통분류분석 결과 기존에

알려진 microcystin 분해 균주와 다른 속으로 확인되었다. 분리 균주 *Microbacterium* sp. MA21의 microcystin 분해 특성을 보다 정확히 이해하기 위해서는 microcystin 분해 관련 유전자 동정은 물론 분해 기작에 관한 연구가 추가되어야 할 것이다.

적 요

환경시료에서 마이크로시스틴 분해능을 나타낸 균주 1종을 분리하였고 16S rRNA gene sequence 분석 결과, *Microbacterium* sp.로 동정되어 *Microbacterium* sp. MA21로 명명하였다. R2A배지를 기본 배지로 하여 $50 \mu\text{g L}^{-1}$ microcystin-LR을 첨가하여 30°C , 12시간 동안 배양한 후 PPIA를 통해 microcystin이 80% 이상 분해되는 것을 확인하였다. Microcystin-LR의 분해를 HPLC 분석을 통해 재확인하였고, microcystin 분해산물로 추정되는 두 개의 peak를 확인하였다. 16S rRNA 염기서열을 이용한 계통분류 분석 결과, 본 연구에서 분리한 *Microbacterium* sp. MA21은 *Alphaproteobacteria*의 *Sphingomonas* 속에 속하지 않는 것은 물론 *Actinobacteria*에는 속하지만 기

존에 보고되지 않은, 새로운 genus로 확인되었다.

사 사

본 연구는 환경부 Eco-STAR project(수생태복원사업단)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- An J and WW Carmichael. 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon*. 32:1495-1507.
- Bourne DG, GJ Jones, L Blakeley, A Jones, AP Negri and P Riddles. 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4086-4096.
- Bourne DG, P Riddles, GJ Jones, W Smith and RL Blakeley. 2001. Characterization of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environ. Toxicol.* 16:523-534.
- Ho L, D Hoefel, CP Saint and G Newcombe. 2007. Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter. *Water Res.* 41:4685-4695.
- Hu LB, JD Yang, W Zhou, YF Yin, J Chen and ZQ Shi. 2009. Isolation of a *Methylobacillus* sp. that degrades microcystin toxins associated with cyanobacteria. *New Biotechnol.* 26: 205-211.
- Hummert C, J Dahlmann, M Reichelt and B Luckas. 2001. Analytical techniques for monitoring harmful cyanobacteria in lakes. *Lakes Reserv.: Res. Manage.* 44:159-168.
- Ishii H, M Nishijima and T Abe. 2004. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. *Water Res.* 38:2667-2676.
- Jones GJ and PT Orr. 1994. Release and degradation of microcystins following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.* 28: 871-876.
- Kim DJ, SH Hong and TS Ahn. 1999. Seasonal and vertical change of bacterial communities in Lake Soyang. *Kor. J. Microbiol.* 35:242-247.
- Kim HB, HK Park and JS Moon. 2009. Evaluation of pre-treatment stages for microcystins analysis using LC/MS/MS. *J. Kor. Soc. Water Qual.* 25:720-726.
- Kim SG, SK Rhee, CY Ahn, SR Ko, GG Choi, JW Bae, YH Park and HM Oh. 2006. Determination of cyanobacterial diversity during algal blooms in Daechung Reservoir, Korea, on the basis of cpcBA intergenic spacer region analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3252-3258.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. pp.115-175. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Stackebrandt E and M Goodfellow eds.). Wiley. New York.
- Lee HK, JH Kim, SA Yoo, TS Ahn, CK Kim and DH Lee. 2003. Primer evaluation for the detection of toxigenic *Microcystis* by PCR. *Kor. J. Microbiol.* 39:166-174.
- Lemes GAF, R Kersanach, LS Pinto, OA Dellagostin, JS Yunes and A Matthiensen. 2008. Biodegradation of microcystins by aquatic *Burkholderia* sp. from a South Brazilian coastal lagoon. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69:358-365.
- Manage PM, C Edwards, BK Singh and LA Lawton. 2009. Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6924-6928.
- Maruyama T, K Kato, A Yokoyama. 2003. Dynamics of microcystin-degrading bacteria in mucilage of *Microcystis*. *Microb. Ecol.* 46:279-288.
- National Institute of Environmental Research. 2008. Study on the alert criteria of harmful algal bloom alert system (I). NIER No. 2008-49-999.
- Oh HM, SJ Lee, JH Kim, HS Kim and BD Yoon. 2001. Seasonal variation and indirect monitoring of microcystin concentration in Daechung Reservoir, Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1484-1489.
- Okano K, K Shimizu, Y Kawauchi, H Maseda, M Utsumi, Z Zhang, BA Neilen and N Sugiura. 2009. Characteristics of a microcystin-degrading bacterium under alkaline environmental conditions. *J. Toxicol.* 2009:954291.
- Park HD, Y Sasski, T Maruyama, E Yanagisawa, A Hiraishi and K Kato. 2001. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environ. Toxicol.* 16:337-343.
- Rapala J, KA Berg, C Lyra, RM Niemi, W Manz, S Suomalainen, L Paulin and K Lahti. 2005. *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1563-1568.
- Shimizu K, H Maseda, K Okano, T Itayama, Y Kawauchi, R Chen, M Utsumi, Z Zhang and N Sugiura. 2011. How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity. *Lakes Reserv.: Res. Manage.* 16:169-178.
- Sivonen K and G Jones. 1999. Cyanobacterial toxins. pp.41-111. In *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management* (Chorus I and J Bartram eds.). E&FN Spon. London.

- Valeria AM, EJ Ricardo and WD Alberto. 2006. Degradation of microcystin-RR by a new isolated *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Córdoba-Argentina). *Biodegradation* 17:447-455.
- Wang JF, PF Wu, J Chen and H Yan. 2010. Biodegradation of microcystin-RR by a new isolated *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *Chin. J. Chem. Eng.* 18:108-112.
- WHO. 1998. Guidelines for drinking-water quality. pp.95-110. In *Health Criteria and Other Supporting Information*, second ed. World Health Organization, Geneva.
- Yan H, G Pan, H Zou, XL Li and H Chen. 2004. Effective removal of microcystins using carbon nanotubes embedded with bacteria. *Chin. Sci. Bull.* 49:1694-1698.
- Yoon KH. 2011. Production and properties of hemicelluloses by an isolate of *Microbacterium* sp. *Kor. J. Microbiol.* 47: 225-230.
- Zhou L, L Hou, Y Hu, J Song and W Chen. 2010. Effects of wattle extract in *Microcystis aeruginosa* growth and the simulated mini fresh water ecosystem. *J. Environ. Biol.* 31:1023-1030.

Received: 27 September 2012

Revised: 2 June 2013

Revision accepted: 3 June 2013