

A study on the massive cultivation of cyanobacteria and strip analysis of cyanobacterial toxin

Dongjin Pyo[★], Miyeon Yim and Eujin Kim

Department of Chemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received November 7, 2012; Revised November 20, 2012; Accepted November 25, 2012)

남조류의 대량배양 및 남조류 독소의 스트립분석법 연구

표동진[★] · 임미연 · 김어진

강원대학교 자연과학대학 화학과

(2012. 11. 7. 접수, 2012. 11. 20. 수정, 2012. 11. 25. 승인)

Abstract: Cyanobacterial toxins, microcystins which exist in Korean lakes show strong toxicity to fish, cattles and human. In this study, we tried to analyze cyanobacterial toxin, microcystin in the *Microcystis* cultivation solution using test strip, although the most common analytical methods for the detection of microcystin are HPLC and ELISA. This new analytical method used the advantages of high specificity and rapidness of test strip, high sensitivity of fluorescence reader. Therefore, we could analyze the trace amount of microcystin existed in various water samples without using the microcystin standards.

요약: 남조류 독소인 마이크로시스틴은 여름철 우리나라 여러 호수들에 존재하여 물고기와 가축 그리고 인간에게 강한 독성을 나타내는 독소이다. 지금까지는 남조류독소인 마이크로시스틴을 분석하기 위하여 HPLC를 사용하거나 ELISA 분석법을 이용하였으나 본 연구에서는 대량배양을 통해서 얻어진 남조류들 속에 미량존재하는 마이크로시스틴을 분석하기 위해 스트립을 이용하는 새로운 분석방법을 시도하였다. 이 분석법은 항원-항체기술을 이용하여 높은 특이도(specificity)와 테스트 스트립(test strip)의 신속성, 그리고, 형광리더(reader)의 고감도(sensitivity) 분석능력 등의 장점을 이용하였다. 따라서 새로 개발된 분석법을 이용하면 다양한 물시료속에 존재하는 마이크로시스틴을 독소 표준품 없이 단시간에 고감도로 분석할 수 있다.

Key words: cyanobacterial toxin, microcystin, strip analysis, cultivation

1. 서론

우리나라 여름철 호수나 강에서 남조류의 이상번식 현상이 곳곳에서 발생하고 있다. 올해 2012년 여름에

도 우리나라 주요 상수원에서 남조류의 이상번식현상이 일어나 크게 사회문제가 되었다. 여름철에 이러한 남조류 이상번식은 음용수에서 불쾌한 맛과 냄새를 유발시키며 더욱 심각한 것은 물고기와 가축 그리고

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)33-250-8491 Fax : +82-(0)33-253-7582

E-mail : pyod@kangwon.ac.kr

인간에게 강한 독성을 나타내는 독특한 독성물질을 발생시킨다는 사실이다.

유독한 남조류의 출현은 1870 년대에 오스트레일리아에서 일어났던 *Nodularia*에 의한 동물의 죽음에서 최초로 보고되었고¹ 이 후 미국, 캐나다, 영국 등 많은 나라에서도 동물에 대한 피해가 보고된 바 있다.²

담수 남조류가 내는 독성물질은 크게 두 가지로 즉, 신경독성물질(neurotoxin)과 간장독성물질(hepatotoxin)로 분류되어진다. 독성물질을 발생시키는 남조류중 세계적으로 가장 먼저 알려진 종은 *Microcystis aeruginosa* 이었다. 이 종에 의한 동물의 피해는 이미 1940 년대에 나타났고, 피해가 일어난 지역도 미국, 영국, 오스트레일리아 등 넓은 지역에 분포한다. 또 피해 동물도 소, 말, 코뿔소 등 대형동물부터 소형동물에 이르기까지 다양하다.³ 미국에서 일어났던 최근의 예에서 20 두(頭)의 소(울스타인 종)가 식욕부진, 탈수, 횡와(橫臥) 등의 증상을 나타냈고, 9 두가 죽었다는 보고도 있다.⁴ 이것은 발생시키는 독성물질은 microcystin이라고 불리우는 고리 형태의 펩타이드 구조^{5,6}를 가진 간장독성물질임이 밝혀졌다. 이러한 microcystin은 *Microcystis aeruginosa* 이외에도 *Microcystis viridis*,⁷ *Anabeana flos-aquae*,⁸ *Oscillatoria agardhii*,⁹ 그리고 *Nostoc* sp.¹⁰ 등에서도 발견되었다. *Anabeana*속 중에는 *Anabeana flos-aquae*에 의한 피해가 많고, 소, 돼지 등의 가축 외에 집오리나 거위, 꿩 등의 조류에 피해가 있는 것이 특징이다.

지금까지 알려진 80여 가지의 microcystin은 모두 공통된 구조적인 특징을 가지고 있다. 이러한 특징들로는 모두가 7 개의 펩타이드(peptide)가 고리를 이루 형태를 취하고 있으며 그 기본적인 구조는 γ -linked *D*-glutamic acid (Glu), *N*-methylde-hydroalanine (Mdha), 하나의 β -amino acid, 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,3,8-trimethyldeca-4,6-dienoic acid (Adda) 그리고 두 개의 L-amino acid로 구성되어 있다. Nodularin은 microcystin과 구조가 비슷하나 5 개의 펩타이드가 고리를 이루고 있는 점이 다르다고 할 수 있다. Fig. 1은 대표적인 남조류 독성물질인 Mirocystin LR의 화학적 구조를 보여준다.

남조류에서 발생되는 신경독성물질로는 현재까지 세 개의 독성물질들이 보고되었다. 첫째는 *Aphanizomenon flos-aquae*로부터 발생되는 aphantoxins (saxitoxins)¹¹과 *Anabeana flos-aquae*로부터 나오는 anatoxina와 anatoxin-a(s)가 있다. Anatoxin-a는 alkaloid 같은 화학적 구조를 가지는 것으로 밝혀졌고¹² anatoxin-a(s)

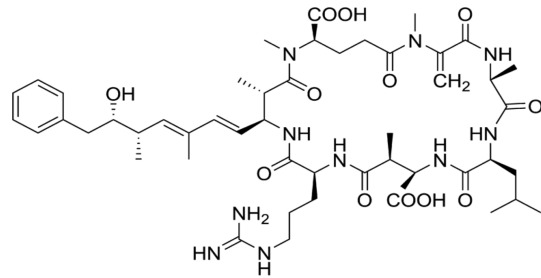


Fig. 1. Chemical structure of microcystin LR.

는 cyclic N-hydroxyguanidine의 phosphate ester 구조를 가짐이 알려지고 있으며,¹³ anticholinesterase¹⁴로 작용함이 알려졌다.

이러한 남조류의 독성물질들이 외국의 선진국에서는 많은 연구와 함께 화학적 구조까지 속속 밝혀지고 있지만 국내에서는 이에 대한 연구가 거의 전무한 상태이다. 우리나라의 대부분의 호수들도 부영양화가 되면서 유기물 함량이 증가하고 수중 산소고갈과 조류 현존량의 증가 및 식물플랑크톤의 종조성 변화를 초래하며 남조류가 늦여름에 심한 번성을 형성하고 있다. 중영양호 수준이던 소양호에서도 1986년 남조류가 처음 출현한 이후 매년 증가추세에 있다.¹⁵ 이러한 호수들은 우리나라의 경우 국민의 상수원으로 사용되는 경우가 많기 때문에 위에서 언급한 많은 독성물질에 대한 연구가 시급히 이루어져야 하는 실정이다.

이러한 수중 남조류 독소, 마이크로시스틴을 정량 분석하기 위해서 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)¹⁶⁻¹⁸ 분석법과 면역화학(ELISA)¹⁹⁻²¹ 분석법이 현재 세계적으로 가장 많이 사용되는 분석법이다. 하지만 HPLC 측정법은 수중 마이크로시스틴의 농도를 ppm 단위로만 측정 가능하고, ELISA 측정법은 측정방법이 복잡하고, 독소 표준품이 필요하는 등 일반인이 사용하기에는 많은 어려움이 뒤따른다. 이러한 배경하에서 본 연구에서는 항원-항체 면역크로마토그래피 방식을 사용함으로 수중 마이크로시스틴을 간편하고 빠르게 미량 측정할 수 있는 스트립분석법을 개발하였다. 이 분석법은 항원-항체 기술을 이용하여 높은 특이도(specificity)와 스트립분석의 간편성, 그리고, 형광리더(reader)의 고감도(sensitivity) 분석능력 등의 장점을 이용하였다. 따라서 새로 개발된 스트립분석법은 현재까지의 분석법들에 비해, 다양한 환경시료를 독소 표준물 없이 간편하게 고감도로 분석할 수 있다.

2. 실험

2.1. 남조류의 대량 배양

국립환경과학원으로부터 남조류 균주(NIER 10024)를 분양 받아 실험실에서 배양하였다. 배양은 먼저분양 받은 남조류 균주를 한 달 가량 배양기(shaker) 안에서 키워 녹색을 띠 때까지 키운다. 녹색을 띠게 되면 배양액을 갈아준다. 갈아주는 배양액(MA 배지²²⁾은 증류수 980 mL에 8 종류의 시약을 넣어주어 만든다. 시약으로는 0.46 M $C_3H_7Na_2O_6P \cdot 5H_2O$, 1 M KNO_3 , 0.2 M $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0.25 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.28 M Na_2SO_4 , 0.6 M $NaNO_3$ 등 7 종류의 혼합시약에다 Bicine 이 첨가된다. Bicine을 제외한 나머지 7 가지 시약은 각각 1 mL씩 넣어주고 Bicine은 0.5 g 넣어준다. 그런 뒤 NaOH로 pH를 8.6으로 맞추어준다. 배양액이 다 만들어지면 멸균시킨다. 멸균시킨 배양액은 clean bench에서 배양액 500 mL에 원액 100 mL로 갈아주고 배양기(SK-71, JEIO TECH)안에서 약 7일 가량 키운다. 일주일 정도 되면 배양액의 색이 짙은 녹색이 된다. 처음에는 1 L 삼각플라스크에서 배양한 후 Fig. 2와 같은 부피 30 L의 둥근바닥형태의 유리 플라스크로 옮겨 대량배양에 들어간다. 대량배양은 온



Fig. 2. Real image of massive cultivation equipment of cyanobacteria.

도 25 °C로 유지하고, 형광등 아래에서 24 시간 빛을 쬐어 약 10 일간 배양한다.

2.2. 남조류 독소의 분석

스트립분석법을 이용하여 남조류독소를 정량하기 위해서는 남조류독소인 마이크로시스틴의 항체가 필요한데 이러한 항체개발은 마이크로시스틴-BSA 결합체를 실험용 쥐에 주사시켜 생체내에서 항체가 생성 되도록 하는 방법을 통하여 이루어졌다. 태어난지 6-8 주 되는 쥐에게 3-4 주 간격으로 4-5 차례 마이크로시스틴-BSA 결합체를 주입시키 후 쥐의 혈액으로부터 마이크로시스틴 항체를 분리해내었다.

스트립분석법에서 사용한 스트립은 샘플 패드, NC(nitrocellulose) 멤브레인, 흡수패드 세 부분으로 나누어져 구성되어 있는데 샘플패드는 유리 섬유로 되어있어 투입구로 들어온 샘플이 NC 멤브레인까지 도달할 수 있게 한다. NC 멤브레인에는 Control line과 Test Line이 그어져있는데 Control line에는 스트렙타비딘(streptavidin)이 고정되어있고 Test line에는 마이크로시스틴-BSA 결합체가 고정되어 있다. 물시료에다 형광으로 표지된 마이크로시스틴 항체를 섞어주고 크로마토그래피 매질을 통해 이동시키면 물시료에 함유된 마이크로시스틴과 니트로셀룰로스 전개막상에 고정된 마이크로시스틴-BSA 결합체와 경쟁 반응을 한다. 만약 시료에 마이크로시스틴의 양이 많으면 고정된 Test line에 포획되는 형광의 양이 적어지고 반대로 시료내에 마이크로시스틴의 양이 적으면 포획되는 형광 표지자의 양은 증가한다. 이러한 이유는 샘플에 마이크로시스틴의 농도가 높을수록 detection solution 속에 있는 마이크로시스틴 항체와 많이 결합하여 테스트라인의 마이크로시스틴-BSA와 결합할 확률이 줄어든다. 이렇게 주입된 물시료는 멤브레인을 따라 전개되어 흡수패드까지 이르게 된다. 흡수패드는 샘플패드로부터 멤브레인을 지나는 시간동안 지속적인 유속을 유지시켜 주게 된다. 시료가 주입된 스트립은 형광리더기(Boditech Med., Chunchon, Korea)에 의해 형광값이 측정된다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 남조류의 대량 배양

남조류의 대량배양을 위해서는 우선 배양하려는 남조류의 생육에 적합한 배지(medium)를 선택하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 남조류 *Microcystis aeruginosa* 종이 가장 잘 번성하는 배지를 알아보기 위해 3 가지

Table 1. Cyanobacteria cultivation results using various cultivation mediums

Culture medium	Number of Cyanobacterial Cells for 1 mL of Culture Medium (after 10 days)
MA medium	1.8×10^6
CB medium	1.4×10^5
BG-11 medium	1.2×10^5

Table 2. Cyanobacteria cultivation results using various cultivation temperatures

Temperature	Number of Cyanobacterial Cells for 1 mL of Culture Medium (after 10 days)
15	1.7×10^4
20	2.8×10^5
25	1.8×10^6
30	8.9×10^5

서로 다른 배지 즉 MA 배지,²² CB 배지²³ 그리고 BG-11 배지²⁴에서 남조류를 배양하였다 그 결과 MA 배지가 남조류 대량배양에 가장 적합한 배지임을 보여주었다(Table 1). MA 배지로 남조류를 배양했을 때 배양시작에서 10 일후 배양액 1 mL당 1.8×10^6 개의 남조류 세포수를 얻을 수 있었다. 이 결과는 CB 배지에서 키운 남조류 세포수에 비해 약 13배, BG-11 배지에서 키운 남조류 세포수에 비해서는 약 15 배 높은 수치이다(Table 1).

남조류를 대량배양할 때 중요한 변수 가운데 하나가 배양온도이다. 자연상태에서도 남조류는 주로 여름철에만 번성하기에 배양온도는 남조류의 생육과 직접 연관되어 있다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 배양온도가 남조류의 생육에 미치는 영향을 살펴보기 위해 서로 다른 4 가지 배양온도 즉, 15, 20, 25, 30 °C에서 남조류를 배양하여 남조류의 세포수를 관찰하였다(Table 2). 그 결과 25 °C에서 가장 많은 남조류 세포수를 보여주었다. Table 2의 실험결과를 보면 배양온도 15 °C와 20 °C는 남조류가 생육하기에 너무 낮은 온도라고 생각되고 25 °C가 가장 적합한 온도이며 이를 넘어선 30 °C에서는 약간 남조류 세포수가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 또한 본 연구에서는 가장 좋은 남조류 배양기간을 찾기위해 배양일별로 남조류의 세포수를 측정하였다(Table 3). Table 3으로부터 배양 시작한 후 10 일 까지는 남조류의 세포수가 꾸준히 증가하다가 10 일을 정점으로 다소 감소하는 것을 볼 수 있다. 따라서 남조류를 대량배양할 때 가장 좋은

Table 3. Cyanobacteria cultivation results with various cultivation periods

Culture period (day)	Number of cyanobacterial cells
2	1.2×10^3
4	2.3×10^4
6	4.7×10^5
8	1.1×10^6
10	1.8×10^6
12	1.6×10^6
14	1.1×10^6
16	8.2×10^5

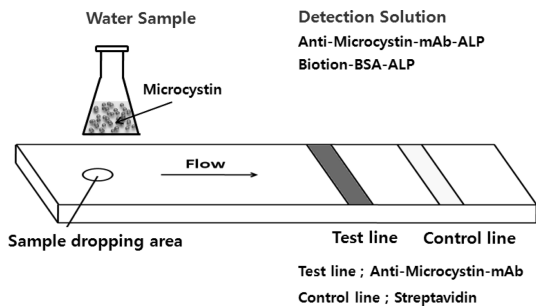


Fig. 3. Schematic diagram of the strip analysis for the detection of microcystin.

배양기간은 약 10 일임을 알 수 있었다.

3.2. 스트립분석법을 이용한 남조류 독소의 분석

본연구에서는 남조류독소 마이크로시스틴을 분석하기 위해 스트립을 이용한 새로운 분석법을 시도하였다. 스트립에는 Fig. 3와 같이 Test line과 Control line 두선이 그려져 있으며 스트립 입구에 시료가 적하되는 장소가 있다. Test line에는 마이크로시스틴-BSA 결합체가 분주되어 있고, Control line에는 Streptoavidin이 분주되어 있다. 마이크로시스틴을 함유한 물시료에 Detection solution (마이크로시스틴 항체-형광물질 결합체 와 Biotin-BSA-형광물질 결합체가 들어있음)을 가하여 스트립에 적하시키면 물시료는 크로마토그래피 작용으로 Test line과 Control line을 통과하게 되며 물시료에 포함된 마이크로시스틴의 농도에 따라 Test line에서 얻어지는 형광값이 달라진다. 본 연구에서는 스트립의 Test line과 Control line에서 얻어지는 형광값 면적을 비교함으로써 시료에 포함된 마이크로시스틴을 정량분석할 수 있었다. 높은 농도의 마이크로시스틴을 함유한 시료의 경우 Detection solution속의 마이크로시스틴 항체와 높은 비율로 결합하기에 실제 스

Table 4. Determination of the concentration of microcystin in various standard solutions [unit : ng/mL]

Standard solution	5.0	2.5	1.0	0.50	0.25	0.10
Five measurements	5.15	2.16	1.03	0.52	0.29	0.12
	5.02	2.76	0.98	0.54	0.25	0.23
	5.03	2.54	1.20	0.54	0.32	0.24
	4.97	2.42	1.05	0.56	0.28	0.04
	4.90	2.43	1.16	0.55	0.29	0.25
Mean	5.01	2.46	1.07	0.53	0.27	0.16
Standard deviation	0.08	0.19	0.08	0.01	0.02	0.08
Relative standard deviation (%)	1.60	7.72	7.48	1.89	7.41	50.0



Fig. 4. Real images of fluorescence reader and test strip.

트립의 Test line에 있는 마이크로시스틴-BSA 결합체가 마이크로시스틴 항체와 결합하는 비율이 낮아진다. 낮은 농도의 마이크로시스틴을 함유한 시료의 경우는 반대로 Test line의 면적이 커지게 된다. 실제로, 5.0 ng/mL 농도의 마이크로시스틴 함유 물시료의 경우 A_T/A_C 가 1.39이었으며 0.1 ng/mL 농도의 마이크로시스틴 함유 물시료의 경우는 A_T/A_C 가 7.02이었다. 여기서 A_T 는 Test line의 면적, A_C 는 Control line의 면적을 가르킨다.

스트립 분석법의 마이크로시스틴 정량범위와 정량치의 정확도를 측정하기 위하여 6가지 서로다른 마이크로시스틴 농도(5.0 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 5.0 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL)의 표준용액들을 가지고 정량분석을 시도하였다. 개별시료당 5번 측정하여 평균값과 표준편차, 상대표준편차를 계산하였다

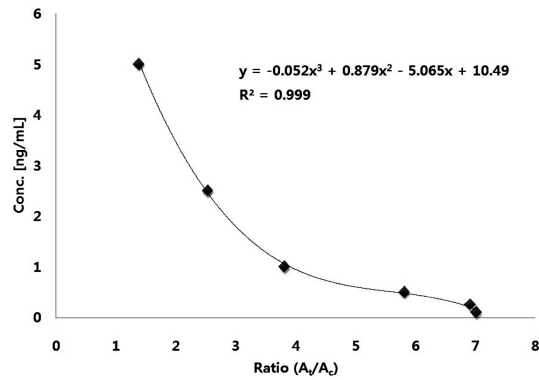


Fig. 5. Calibration curve for microcystin standard solutions.

(Table 4). Fig. 5는 6가지 표준용액들의 형광값을 A_T/A_C 로 측정된 결과를 그래프로 나타내었다. Table 4와 Fig. 5로부터 본 연구에서 사용된 스트립 분석법의 정량범위는 5.0-0.2 ng/mL임을 알 수 있었다. 0.2 ng/mL 보다 낮은 0.1 ng/mL에서도 측정치를 얻었지만 상대표준편차가 50%로 매우 높게 측정되어 정량범위에서 제외시키고, 0.2 ng/mL을 최저측정한계로 결정하였다. WHO에서는 마이크로시스틴의 농도가 1.0 ng/mL 이상 일 때 취수금지령을 발하도록 권고하고 있기에 본 연구에서 개발된 스트립 분석법은 물시료

Table 5. Determination of the concentration of microcystin in water sample using various methods for the destruction of cyanobacterial cells [unit : ng/mL]

Sample	Acid pretreatment+sonication			Sonication	Freeze	Toxin in water
	5%acetic acid (1.25 mL)+5 min sonication	10%acetic acid (1.25 mL)+5 min sonication	100% acetic acid (2.50 mL)+5 min sonication			
Three measurements	1.19	2.03	2.31	1.26	1.06	0.85
	1.79	2.12	2.12	1.34	1.14	0.87
	1.81	1.97	2.06	1.39	1.17	0.79
Mean	1.84	2.04	2.16	1.33	1.12	0.84

에서 마이크로시스틴을 미량분석할 때 매우 이상적인 정량범위를 갖고 있다고 할 수 있다. 또한 드문 경우지만, 5.0 ng/mL 보다 높은 농도의 마이크로시스틴을 함유한 물시료의 경우는 시료를 10-100 배 희석하여 측정하면 되기 때문에 스트립분석법을 사용하는데 큰 어려움은 없을 것으로 예상된다. Table 4의 실험결과를 보면 본 연구에서 사용된 스트립 분석법의 측정 표준편차는 0.01-0.19, 상대표준편차는 1.6-7.7%로 매우 낮은 값을 보여주었다.

마지막으로 스트립분석법으로 실제 남조류 cell이 포함된 배양시료를 가지고 cell 안의 독소와 cell 밖의 독소를 한꺼번에 측정하는 실험을 진행하였다. 보통 마이크로시스틴은 남조류 cell 안에 고농도로 존재하고 cell 밖에는 저농도로 존재하게 된다. 따라서 남조류 cell 안의 독소와 cell 밖의 독소를 합친 독소 총농도를 측정하기 위해서는 남조류 cell을 완전하게 파쇄하는 방법을 개발하여야 한다. 이를 위하여 본 연구에서는 세 가지 다른 파쇄방법들을 시도하였다. 첫번째는 물과 셀의 혼합된 시료를 0 이하로 얼렸다가 녹이는 과정을 2 회 반복하여 남조류 cell을 파쇄하는 방법이고 두번째는 초음파(sonication)를 이용한 남조류 셀의 파쇄이고 세 번째는 초산을 시료에 가하고 sonication 시키는 화학적 파쇄 방법이다. 실험결과(Table 5) 세번째 방법이 가장 효과적인 방법임이 입증되었다. 세 번째 방법중에서도 100% 초산을 사용하였을 때 남조류 cell을 완전하게 파쇄시킬 수 있었다. Table 5로부터 100% 초산을 사용하고 5 분간 sonication 시키는 방법으로 남조류 cell을 완전히 파쇄한 후 cell 안과 밖의 마이크로시스틴 총농도를 측정하였을 때 2.16 ng/mL로 측정되었다. 남조류 cell을 전혀 파쇄하지 않고 측정 한 남조류 cell 밖의 독소의 농도는 0.84 ng/mL이었다. 초음파만을 이용하여 남조류 cell을 파쇄한 후 cell 안과 밖의 마이크로시스틴 농도를 측정하였을 때 1.33 ng/mL, 시료를 얼렸다 녹이는 과정을 2 회 반복하는 방법을 이용하여 남조류 cell을 파쇄한 후 cell 안과 밖의 마이크로시스틴 농도를 측정하였을 때는 1.12 ng/mL의 측정치를 얻었다. 이는 남조류 cell을 파쇄하는 방법중 첫 번째와 두 번째 방법은 cell을 완전히 파쇄하지 못한다는 것을 보여주는 실험결과이다.

4. 결 론

남조류 독소인 마이크로시스틴은 여름철 우리나라 여러 호수들에 존재하여 물고기와 가축 그리고 인간

에게 강한 독성을 나타내는 독소이다. 지금까지는 남조류독소인 마이크로시스틴을 분석하기 위하여 HPLC를 사용하거나 ELISA 분석법을 이용하였으나 본 연구에서는 대량배양을 통해서 얻어진 남조류들 속에 미량존재하는 마이크로시스틴을 분석하기 위해 스트립을 이용하는 새로운 분석방법을 시도하였다. 이 스트립 분석법은 정량범위가 5.0-0.2 ng/mL이며 5번의 개별측정결과 측정표준편차가 0.01-0.19, 상대표준편차는 1.6-7.7%로 매우 낮은 값을 보여주었다. 또한 이 스트립 분석법은 실제 배양시료에 적용하여 남조류 cell을 파쇄한 후 남조류 cell 안과 밖의 마이크로시스틴 총농도를 측정하는 데 성공적으로 적용되었다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단 기초연구사업의 지원(No. 2010-0009186)과 환경부 에코스타사업의 지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

1. G. Francis, *Nature(London)*, **18**, 11 (1878).
2. M. Schwimmer and D. Schwimmer, In 'Medical Aspects of Phycology', p279, 358, D. F. Jackson, Ed., Syracuse Univ, 1968.
3. W. W. Chrmichael and R. S. Saffermann, A Status Report on Planktonic Cyanobacteria (Blue-Green Algae) and Their Toxins, EPA/600/R 92/079 (1992).
4. F. D. Galey, V. R. Beasley, W. W. Carmichael, G. Kleppe, S. B. Hooser and W. M. Haschek, *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 1415 (1987).
5. D. P. Botes, C. C. Viljoen, M. Kruger, P. L. Wessels and D. H. Williams, *Toxicon.*, **20**, 1037 (1982).
6. D. P. Botes, A. A. Tainman, P. L. Wessels, C. C. Viljoen, M. Kruger, D. H. Williams, S. Santikam, R. J. Smith and S. J. Hammond, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 2311 (1984).
7. T. Kusumi, T. Ooi, M. M. Watanabe, H. Takahashi and H. Kakisawa, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 4695 (1987).
8. T. Krishnamurthy, W. W. Carmichael and E. W. sarver, *Toxicon*, **24**, 865 (1986).
9. J. A. O. Meriluoto, A. Sandstrm, J. E. Eriksson, G. Remand, A. Grey Craog and J. Chattopadhyaya, *Toxicon*, **27**,

- 1021 (1989).
10. K. Sivonen, W. W. Carmichael, M. Namikoshi, M. L. Rinehart, A. M. Dahlem and S. I. Niemela, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2650 (1990).
 11. J. J. Jr. Sansner, M. Ikawa and T. L. Foxall, In 'Studies on Aphanizomenon and Microcystic Toxins, Seafood Toxins', pp. 391-406, E. P. Ragelis, Ed., American Chemical Society Symposium Series 262, Washington, DC., 1984.
 12. J. P. Devlin, O. E. Edwards, P. R. Gorham, N. R. Hunter, P. K. Pike and B. Stavric, *Can. J. Chem.*, **55**, 1367 (1977).
 13. S. Matsunaga, R. E. Moore, W. P. Niemozura and W. W. Carmichael, *J. Am. Soc.*, **111**, 8021 (1989).
 14. N. A. Mahmood and W. W. Carmichael, *Toxicon*, **25**, 1221 (1986).
 15. K. S. Cho, B. C. Kim, W. M. Heo and S. J. Cho, *Korean J. Limnology*, **22**(3), 179 (1989).
 16. R. Ruangyuttikarn, M. Ivan, P. Jeeraporn, P. Yuwadee and D. Zdenek, *J. Chromatogr. B*, **800**, 315-319 (2004).
 17. L. Spoof, P. Vesterkvist, T. Lindholm and J. Meriluoto, *J. Chromatogr. A*, **1020**(1), 101-115 (2003).
 18. K. I. Harada, N. Tomoyo, F. Kiyonaga and S. Makoto, *J. Chromatogr.*, **1033**, 107-113 (2004).
 19. H. Mhadhbi, S. Ben-Rejeb, C. Cl eroux, A. Martel and P. Delahaut, *Talanta*, **70**, 225-235 (2006).
 20. J. W. Shenga, M. He and H. C. Shia, *Analytica Chimica Acta*, **603**(1), 111-118 (2007).
 21. L. A. Lawton, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **203**(3), 219-230 (2005).
 22. R. Y. Stainier, R. Kunisawa, M. Mandel and G Cohen-Bazire *Bacteriol. Rev.*, **35**, 171-205 (1971).
 23. M. Shirai, K. Matumaru, A. Ohotake, Y. Takamura, T. Aida and M. Nakano, *APP. Environmental Microbiology*, **55**, 2569-2571 (1989).
 24. M. F. Watnabe and S. Oishi, *APP. Enviyon. Microbiol*, **49**, 1342-1344 (1985).