

북한강 수계 조류대발생 원인종 남조 *Anabaena*의 분자계통학적 검토

이 준 · 한명수 · 황수옥¹ · 변명섭² · 황순진³ · 김백호*

(한양대학교 생명과학과, ¹한국수자원공사, ²한강물환경연구소, ³건국대학교 환경과학과)

Molecular Identification of the Bloom-forming Cyanobacterium *Anabaena* from North Han River System in Summer 2012. Li, Zhun, Myung-Soo Han, Su-Ok Hwang¹, Myeong-Seop Byeon², Soon-Jin Hwang³ and Baik-Ho Kim* (Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea; ¹K-waters, Korea Water Resources Corporation, Gwacheon, Gyeonggi 427-100, Korea; ²Han River Environment Research Center, National Institute of Environmental Research, Gyeonggi 427-100, Korea; ³Department of Environmental Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea)

Between May and August 2012, a massive cyanobacterial bloom with *Anabaena* has been occurred throughout the North Han River. Sampling was conducted at one station on each lake, L. Uham, L. Cheongpyung, and L. Paldang, where occurred a dense bloom, in 13 July. According to the microscopic examination, the blooms was dominated by one specific filamentous cyanobacterium *Anabaena* and other phytoplankton. Morphologically, previous literature proven that this *Anabaena* species is *A. crassa* (Lemmermann) Komark.-Legn. & Cronberg. However, identification of species in a mixed population is complicated due to limited morphological differences. Therefore, with live sample including trichome, akinete and heterocyst, the sequences of 16S rRNA gene of *Anabaena* isolates were cloned and analyzed, and three 16S rRNA gene sequences of 1188~1520 bp in length were obtained. It was shown from the homologous analysis results that the obtained 16S rRNA sequences were highly homologous to the relevant sequences of *A. crassa* in GenBank. The 16S rRNA sequences of 63 species were retrieved from GenBank, and the phylogenetic tree was constructed by using these sequences.

Key words : Cyanobacterium, *Anabaena crassa*, Han River, Harmful Algal Bloom, 16S rRNA

서 론

일반적으로 자연수에서 흙이나 곰팡이 냄새를 일으키

는 화학물질 (2-MIB과 Geosmin)은 주로 방선균, 조류, 이들 상호작용을 거쳐 발생하며 이들의 농도 또한 특정 조류종이나 밀도, 그리고 박테리아와 상호관계에 따라 차이를 보이기 때문에 냄새유발 조류에 대한 관심이 증가하

* Corresponding author: Tel: +82-2-2220-0960, Fax: +82-2-2220-0960, E-mail: tigerk@hanyang.ac.kr

고 있다(Lim *et al.*, 2006). 특히 남조류 대발생을 일으키는 대표적인 속의 하나인 *Anabaena*의 geosmin생성에 대한 연구는 활발하게 진행되어 왔다(Izaguirre *et al.*, 1982; Hayes and Burch, 1989; Saadoun *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005).

우리나라는 총 인구의 약 40%가 서울-경기 수도권에 집중되어 있으며, 이들의 음용수 공급은 주로 한강수계(북한강, 남한강, 경안천)에 절대적으로 의존하고 있다. 한강수계는 지난 2012년 여름철 동안 하천과 호수에 상관없이 *Anabaena*가 대발생하였고 동반된 맛과 냄새발생으로 인하여 음용수 공급과 관련된 민원이 급증하였다(<http://www.hani.co.kr/arti/society/environment/545937.html>).

한강수계에서 *Anabaena* 대발생은 매우 이례적으로 지금까지 보고된 사례는 전무하다(Jung *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2006; Lee and Choi, 2012; You *et al.*, 2013). 다만 소양호에서 *Anabaena macrospora* (Cho *et al.*, 1989), *Anabaena* spp. (Lee *et al.*, 1998) 대발생, 북한강 수계에서 냄새발생을 일으키는 *Anabaena spiroides*의 성장특성 연구(Lee *et al.*, 2013), 한강에서 냄새발생 식물플랑크톤 연구(Lee and Choi, 2012) 등이 보고된 바 있으나 이들의 분류학적 연구는 진행되지 않았다.

국외에서는 브라질의 몇몇 저수지에서 *Anabaena* 대발생을 보였으며 맛이나 냄새보다 독소 Anatoxin-a량도 급증하여 음용수 공급에 문제를 일으켰다(Frizzo *et al.*, 2004; Yunes *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2008). 한편, *Anabaena flos-aquae* (Mahmood *et al.*, 1988; Cook *et al.*, 1989), *Anabaena lemmermannii* (Henriksen *et al.*, 1997) 등도 대발생을 일으켰으며 Rio Grande do Sul (Monserrat *et al.*, 2001; Yunes *et al.*, 2003)과 Pernambuco (Molica *et al.*, 2005)에서는 *Anabaena crassa*와 *A. spiroides*가 동시에 대발생하였고, Zapomělová *et al.* (2008)에서는 *Anabaena crassa*와 *A. circinalis*가 혼재하였다. 일반적으로 남조류 *Anabaena*의 동정은 영양세포의 형태적 특성만으로는 정확한 동정이 어렵기 때문에 16S rRNA 염기분석법을 이용하며(Lee *et al.*, 1996) 이들의 생리, 생태학적 특성을 이해하는데도 유용하다. Nübel *et al.* (1997)은 남조류 16S rRNA에서 세균(eubacteria)에서는 존재하지 않는 독특한 유전자 부위를 보고하고 무균배양이나 cloning없이 남조류 영양세포로부터 직접 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 종 동정을 시도하였다.

결국 *Anabaena* 대발생을 일으킨 현장에서는 형태적으로 유사한 종들이 혼재(co-existence)하는 경우가 많아 반드시 형태 및 분자생물학적 분석이 동시에 이루어져야

한다(Werner and Laughinghouse, 2009; Becker *et al.*, 2010; Zapomělová *et al.*, 2008). 본 연구는 2012년 여름철 북한강수계에서 대발생을 일으킨 남조류 *Anabaena*의 분류학적 특성을 파악하기 위하여 3개 호소(의암호, 청평호, 팔당호)에서 직접 분리한 *Anabaena* 영양세포(이형세포 및 휴면포자)의 형태 및 분자계통학적 분석을 시도하고 16S rRNA 염기서열을 근거로 분리주(isolate)들간의 유연관계를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료채집 및 분석

시료채집은 남조류 *Anabaena* 대발생 기간중 가장 높은 밀도를 보였던 2012년 7월 13일에 북한강 수계 3개 호수-의암호(H2), 청평호(H3), 팔당호(H7)에서 시료채집이 용이한 정점을 1개씩을 선정하여 실시하였다(Fig. 1).

생시료의 세포관찰을 위하여 각 정점의 표층수를 채수하여 250 mL 폴리에틸렌 병에 넣어 실험실로 운반하였다. 한편 세포밀도를 파악하기 위하여 채수된 시료를 Lugol's solution으로 고정하여(최종농도 0.5%) 균일하게 섞은 다음 실험실로 운반하였다. 세포관찰 및 계수는 광학현미경(Zeiss axioplan, ×1,000)하에서 실시하였으며, 고정시료 1 mL를 Sedgwick-Rafter counting chamber에 장착하여 시료당 최소 300세포 이상 계수하여 산정하였다. 조류동정은 선행연구문헌을 참고하였다(Willame *et al.*, 2006; Komárek and Zapomělová, 2007; Werner and Laughinghouse, 2009; Tuji and Niiyama, 2010; Zapomělová *et al.*, 2012).

남조류 *Anabaena*의 분자생물학적 분석을 위하여 각 정점의 표층수를 Van-Dorn 채수기로 채수한 다음 2L 플라스크통에 넣고 암상태를 유지하여 실험실로 운반한 다음 곧바로 genomic DNA 추출 및 PCR을 실시하였다.

2. Genomic DNA 추출

남조류 *Anabaena*의 genomic DNA는 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였고, 방법은 다음과 같다. 세포 조체에 Buffer AP1 (lysis buffer) 400 μ L와 RNase A (100 mg mL⁻¹) 4 μ L를 첨가한 후 65°C에서 10분간 배양하였다. 그 후 Buffer AP2 (precipitation buffer) 130 μ L를 첨가한 후 얼음에서 10분간 다시 배양하였다. 침전물을 제거하기 위해 QIAshredder spin column에 lysate를 넣고 5분 후에 14,000 rpm에서 2분간 원

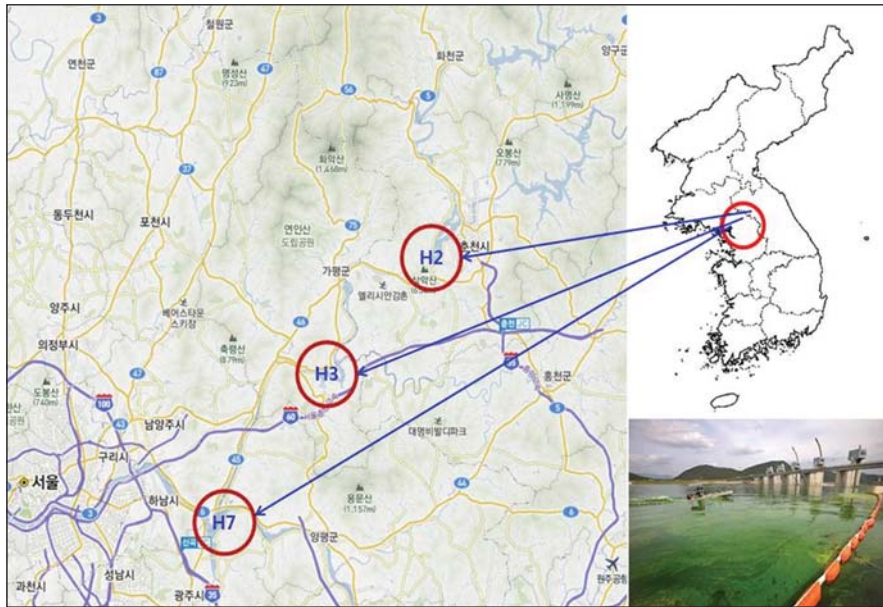


Fig. 1. A map showing the sample collection site. Lake Uam (H2), Lake Cheongpyung (H3) and Lake Paldang (H7). A photo in right-bottom is the scene of *Anabaena* bloom in Han River System between May and August 2012.

심분리하였다. Column을 통과한 여과액을 세포 잔해들을 취하지 않도록 하여 새로운 1.5 mL tube로 옮기고, 1.5 배 부피의 Buffer AP3/E (binding buffer)를 첨가한 후 조심스럽게 pipette을 이용하여 혼합하였다. 혼합물 중 650 μ L를 취하여 DNeasy mini spin column에 넣고 막에 잘 흡수되도록 5분간 상온에 방치한 다음 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 column 막에 DNA가 부착되도록 하였다. 이어 여과액을 제거한 후 남아 있는 혼합물을 취하여 동일한 방법으로 다시 원심분리 하였다. 새로운 collection tube에 DNeasy column을 놓고 Buffer AW (wash buffer) 500 μ L를 첨가한 후 막의 흡수를 위해 2분간 상온에서 방치한 후, 12,000 rpm에서 원심분리하고 여과액을 제거하였다. Buffer AW 500 μ L를 다시 column에 첨가하여 동일한 방법으로 세척하였는데, 이때에는 막이 완전히 마를 수 있도록 14,000 rpm에서 2분간 원심분리 하였다. DNeasy column을 새로운 1.5 mL tube에 옮긴 후, 예열 (65°C)되어 있던 Buffer AE (elution buffer) 100 μ L를 취하여 막의 중앙부위에 천천히 떨어뜨렸다. 용액이 막에 잘 스며들 수 있도록 약 5분간 방치한 다음 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 최종 DNA를 얻었다.

3. PCR 반응

PCR reaction은 50 μ L를 최종 부피로 하여 수행하였다. Genomic DNA 2 μ L, 100 pmol CYAN108F (ACGGGTGA

GTAACRCGTRA) (Urbach *et al.*, 1992) 3 μ L, 100 pmol 16SCYR (CTTCAYGYAGGCGAGTTGCAGC) (Urbach *et al.*, 1992) 3 μ L, 10 mM dNTP mix 4 μ L, dH₂O 13 μ L)과 master mix 2 (Pwo DNA polymerase (5 U μ L⁻¹) 0.5 μ L, 10 \times PCR buffer with 20 mM MgSO₄ 5 μ L, dH₂O 19.5 μ L)를 각각 제조하여 reaction 이전에 가볍게 섞어주고 다음 조건에서 수행하였다: DNA template의 초기 denaturation은 94°C에서 4분간 일어나고, 그 후 denaturation 과정은 94°C에서 15초, annealing 과정은 55°C에서 30초, elongation 과정은 72°C에서 45초 동안 반복된 조건에서 PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., USA)를 사용하여 40회 증폭하였는데, 마지막으로 72°C에서 7분 동안 extension reaction을 수행하였다. PCR 산물들은 Trisacetate-EDTA buffer (pH=8.3 \pm 0.1, FisherBiotech, USA)를 사용한 1.0% agarose gel (BMA, USA)에서 전기영동하여 (100 V, 20분), 각 PCR 산물의 크기와 성공도를 확인하였다 (Mupid 21, Cosma Bio Co., Japan).

4. DNA sequencing

정제된 PCR product clone들의 DNA sequencing은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 AutoDNA sequencer에 의해 수행되었다 (Bionex, Korea).

Table 1. Strain number, isolation locality and GenBank number for species used in the molecular phylogenetic analysis.

Species	Strain number	Isolation locality	GenBank number
<i>Anabaena affinis</i>	TAC439	Japan	AB551445
<i>Anabaena affinis</i>	TAC454	Japan	AB551451
<i>Anabaena akankoensis</i>	TAC505	Japan	AB551466
<i>Anabaena aphanizomenoides</i>	TAC456	Japan	AB551453
<i>Anabaena circinalis</i>	TAC496	Japan	AB551463
<i>Anabaena circinalis</i>	TAC500	Japan	AB551464
<i>Anabaena circinalis</i>	TAC503	Japan	AB551465
<i>Anabaena circinalis</i>	TAC507	Japan	AB551467
<i>Anabaena circinalis</i>	TAC553	Japan	AB551477
<i>Anabaena circinalis</i>	TAC585	Japan	AB551483
<i>Anabaena</i> (H2)	–	Korea	KF175509
<i>Anabaena</i> (H3)	–	Korea	KF175510
<i>Anabaena</i> (H7)	–	Korea	KF175511
<i>Anabaena crassa</i>	TAC525	Japan	AB551472
<i>Anabaena crassa</i>	TAC529	Japan	AB551473
<i>Anabaena crassa</i>	TAC111	Japan	AB551439
<i>Anabaena crassa</i>	TAC436	Japan	AB551442
<i>Anabaena crassa</i>	TAC443	Japan	AB551446
<i>Anabaena crassa</i>	TAC474	Japan	AB551456
<i>Anabaena crassa</i>	TAC485	Japan	AB551461
<i>Anabaena crassa</i>	TAC494	Japan	AB551462
<i>Anabaena crassa</i>	TAC514	Japan	AB551469
<i>Anabaena crassa</i>	TAC515	Japan	AB551470
<i>Anabaena crassa</i>	TAC520	Japan	AB551471
<i>Anabaena crassa</i>	CENA199	Brazil	FJ830574.1
<i>Anabaena crassa</i>	CENA205	Brazil	FJ830576.1
<i>Anabaena crassa</i>	CENA206	Brazil	FJ830577.1
<i>Anabaena crassa</i>	CENA207	Brazil	FJ830578
<i>Anabaena elliptica</i>	TAC453	Japan	AB551450
<i>Anabaena flos-aquae</i>	TAC446	Japan	AB551447
<i>Anabaena flos-aquae</i>	TAC475	Japan	AB551457
<i>Anabaena flos-aquae</i>	TAC99	Japan	AB551438
<i>Anabaena kisseleviana</i>	TAC34	Japan	AB551437
<i>Anabaena lemmermannii</i>	TAC437	Japan	AB551443
<i>Anabaena lemmermannii</i>	TAC438	Japan	AB551444
<i>Anabaena mendotae</i>	TAC583	Japan	AB551481
<i>Anabaena mendotae</i>	TAC584	Japan	AB551482
<i>Anabaena minispora</i>	TAC554	Japan	AB551478
<i>Anabaena mucosa</i>	TAC425	Japan	AB551440
<i>Anabaena oumiana</i>	TAC464	Japan	AB551454
<i>Anabaena oumiana</i>	TAC568	Japan	AB551480
<i>Anabaena oumiana</i>	TAC509	Japan	AB551468
<i>Anabaena planctonica</i>	TAC472	Japan	AB551455
<i>Anabaena planctonica</i>	TAC561	Japan	AB551479
<i>Anabaena pseudocompacta</i>	TAC538	Japan	AB551474
<i>Anabaena reniformis</i>	TAC478	Japan	AB551458
<i>Anabaena reniformis</i>	TAC481	Japan	AB551459
<i>Anabaena reniformis</i>	TAC484	Japan	AB551460
<i>Anabaena reniformis</i>	TAC543	Japan	AB551475
<i>Anabaena smithii</i>	TAC431	Japan	AB551441
<i>Anabaena smithii</i>	TAC450	Japan	AB551449
<i>Anabaena spiroides</i>	TAC551	Japan	AB551476
<i>Anabaena spiroides</i>	PMC9403	France	AJ293116

Table 1. Continued.

Species	Strain number	Isolation locality	GenBank number
<i>Anabaena spiroides</i>	PMC9702	France	AJ293118
<i>Anabaena spiroides</i>	RPAN20	India	GQ466494
<i>Anabaena spiroides</i>	RPAN58	India	GQ466495
<i>Anabaena spiroides</i>	NIES76	Japan	AB047104
<i>Anabaena spiroides</i>	NIES77	Japan	AY701563
<i>Anabaena spiroides</i>	NIES78	Japan	AF317627
<i>Anabaena spiroides</i>	NIES79	Japan	AY701564
<i>Anabaena ucraïnica</i>	TAC449	Japan	AB551448
<i>Anabaena ucraïnica</i>	TAC455	Japan	AB551452
<i>Dolichospermum heterosporum</i>	TAC447	Japan	AB558957
<i>Dolichospermum spiroides</i>	CHAB503	China	GU197606
<i>Dolichospermum spiroides</i>	CHAB506	China	GU197611
<i>Dolichospermum spiroides</i>	CHAB507	China	GU197610

5. 남조 *Anabaena*속의 분자계통학적 분석

상기 실험에서 얻은 *Anabaena*의 염기서열을 이용하여 본 연구에서는 이 종의 계통학적 위치를 확인하였다. 염기서열 비교를 위해서 계통수에 사용된 염기서열은 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 획득하여 이용하였다 (Table 1). 외군 (out-group)으로는 균체형 남조 (*Synechococcus* sp. PCC 7117, *S. elongates* 6301)를 이용하였다. 염기서열의 편집은 BioEdit 프로그램 (v. 7.1.3; Hall, 1999)을 이용하였으며, 정렬은 CLUSTAL W for Mac (Thomson *et al.*, 1994)을 이용하였다. 염기서열 자료를 통한 계통학적 유연관계 분석에서 근린결합분석 (Neighbor-joining analysis)은 PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, ver. 4.0; Swofford, 2002)를 사용하였으며, 최대유사분석 (Maximum-likelihood analysis)은 PhyML (Guindon and Gascuel, 2003)을 각각 이용하였다. 최대유사분석에서 계통수의 각 branch의 신뢰도는 1000회의 bootstrap을 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 남조 *Anabaena*의 형태

영양세포는 구형이거나 반달형이며, 세포직경은 10~13 μm , heterocyst는 투명하고 구형이며 12 μm , akinete는 계란형으로 15 \times 25 μm 이다. 나선형 필라멘트 (trichome)는 1 cycle의 폭은 30~75 μm 이며, 길이는 30~65 μm 로 가로와 세로가 비슷하다. 조류대발생 기간 동안 필라멘트는 규칙적으로 회전하며, 종종 느슨하게 신장되어 부드러운 직선형도 동시에 관찰된다 (Fig. 2). 형태적으로 유사한

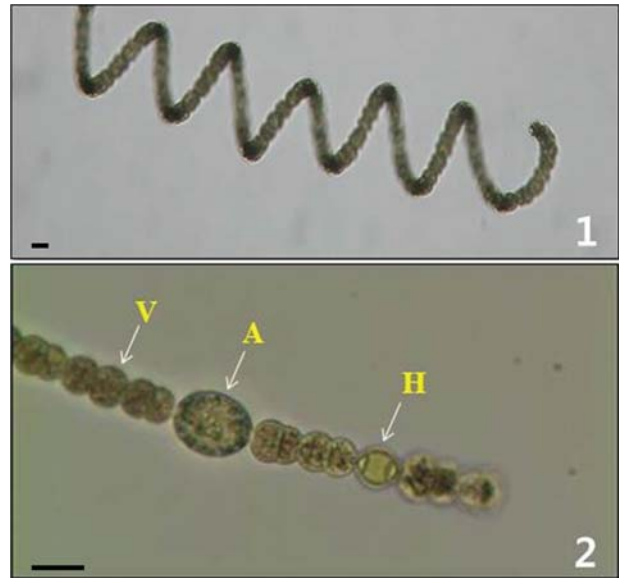


Fig. 2. Photos of toxic cyanobacterium *Anabaena crassa* (Lemmermann) Komark.-Legn. & Cronberg in Han River System (sites H2, H3, and H7) between May and August, 2012. 1. Coiled trichome of *A. crassa* collected during the bloom period, Han River System 2012 ($\times 100$). 2. Straight-type trichome of *A. crassa* ($\times 400$). V; vegetative cells, A; akinete, H; heterocyst.

종들의 형태적 특성을 비교하였다 (Table 2). Komárek and Zapomělová (2007)는 형태적으로 차이를 보인 coiled *Anabaena* 종들의 16S rRNA 염기서열만으로 비교하기 어렵고, 그 중 *A. spiroides*와 *A. flos-aquae*는 특히 형태적으로도 구분하기 어렵다고 보고하였다. 한편 *Anabaena*속은 영양세포가 직선형 (straight)과 코일형 (coiled)이 섞

Table 2. Morphological comparisons among *Anabaena* (A) with similar phenotypes (Komárek and Zapomělová, 2007).

	<i>A. crassa</i>	<i>A. circinalis</i>	<i>A. spiroides</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>A. mucosa</i>
VC-Shape	Spherical to barrel-shaped	Spherical	Spherical	Spherical	Spherical
Tr-Width (μm)	10~15	8~11	6~9	4~7	7~10
Ak-Shape	Oval, rarely slightly kidney-shaped	Oval	Oval, rarely slightly kidney-shaped	Slightly kidney-shaped to cylindrical	Spherical to wide oval
Ak-Size (μm)	15~42×13~25	20~28×15~21	15~20.8×9~14	15~24×7~13	18~25
Ak-position	Solitary or in pairs, distant from Hc	Solitary, rarely two together, distant from Hc	Solitary, distant from Hc	Solitary, rarely in pairs, distant from Hc	Distant from Hc

*VC; vegetative cells, Tr; tichome, Ak; akinetes, Hc; heterocytes

인 종들은 크기가 비교적 큰 것으로 *A. planctonica*, *A. crassa*, *A. circinalis*, *A. mucosa* 등이 있으며, 작은 종으로는 *A. flos-aquae*, *A. lemmermannii* 등이 있으며, strain 인 *A. sigmoidea* 항상 이질적(두 가지 타입이 동시에 존재하기 때문에)이므로 *Anabaena* 종 동정은 결국 wild type과 strain type에 대한 형태 및 분자적 연구가 동시에 이루어져야 한다고 주장하였다. 이번 조사에서 출현한 *Anabaena*의 형태학적 특성은 선행문헌에 따르면 *Anabaena crassa* (Lemmermann) Komark.-Legn. & Cronberg와 가장 높은 유사성을 나타냈다(Komárek and Zapomělová, 2007; Zapomělová et al. 2008). 다만 분자생물학적 분석 결과 또 다른 종인 *A. circinalis*와는 사실상 형태적으로 구분하기 어려웠으며 이는 Zapomělová et al. (2008, 2012)의 견해와 일치하였다. 따라서 한강수계의 다양한 분리주의 형태적 특성 및 분자생물학적 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다.

2. 남조 *Anabaena*의 염기서열

남조 *Anabaena*의 분자생물학적 특성을 조사하기 위하여 현장에서 분리한 *Anabaena*로부터 16S rRNA를 직접 추출하는 방법을 이용하여 염기서열을 비교 분석하였다.

본 조사에서 확인된 남조 *Anabaena*의 의 16S rRNA 유전자부위 염기서열을 분석한 결과, 사용된 *Anabaena* 속에 대한 16S rRNA 염기의 길이가 가장 긴 종은 *Anabaena spiroides* NIES-77 2478 bp의 염기를 가지고 있었고, 가장 짧은 종은 *Anabaena spiroides* NIES-76으로 646 bp의 염기를 가지고 있었다. 두 *Anabaena* (H-7)과 *Anabaena* (H-2)의 염기서열은 서로 100% 유사도를 나타내 동일종으로 판단하였고 이들은 모두 *Anabaena crassa* TAC strains에 대하여 99~100% 유사도를 보여 북한강 수계

의 시료를 *Anabaena crassa* 종으로 처리하였다(Fig. 3). 한편 *Anabaena* (H-3)의 경우는 열기서열은 *Anabaena circinalis* TAC strains에 높은 유사도(100%)를 보여 *Anabaena circinalis*로 나타났다. Zapomělová et al. (2008, 2012)는 *A. crassa*와 *A. circinalis*는 유전적으로는 구분이 거의 되지 않으며 strain과 환경조건에 따라 영양세포, 이형세포, 휴면포자 등의 형태적 차이를 보인다고 하였다. 본 연구에서 H3는 H2와 H7 사이에 위치하며 거리상 10 km 이내로 매우 가깝기 때문에 현 시점에서 북한강 수계에서 대발생을 일으킨 남조 *Anabaena*는 *A. crassa*로 처리하여도 크게 문제되지 않을 것으로 판단되었다.

3. 유연관계

근린결합분석(Neighbor-joining analysis) 결과는 최대 유사분석(Maximum-likelihood analysis) 결과와 동일하게 나타났다. 최대절약분석결과, 66개 분류군에서 얻어진 16S rRNA 염기서열에서 계통수의 길이는 909였으며, 최대절약계통수는 1개로 나타났다. 분석결과 *Anabaena* (H-7) 및 *Anabaena* (H-2) 명확하게 주로 *Anabaena crassa* 포함된 *Anabaena crassa* Group에 속하였다. 한편 *Anabaena* (H-3)는 주로 *Anabaena circinalis* 포함된 Group에 속한 반면, 기존에 한강수계에 분포한다고 알려진 *Anabaena spiroides*는 다양하게 분산되어 정확한 Grouping이 되지 않았다(Fig. 3).

결과를 종합하면 한강수계에서 조류대발생을 일으킨 남조 *Anabaena*는 의암호(H2), 청평호(H3), 팔당호(H7) 모두 동일종 *Anabaena crassa* (Lemmermann) Komark.-Legn. & Cronberg일 가능성이 높으며, 이 종과 형태 및 분자계통학적으로 거의 일치한 *A. circinalis*는 환경요인에 따라 형태변이가 쉽게 일어나는 그룹으로 밝혀졌다.

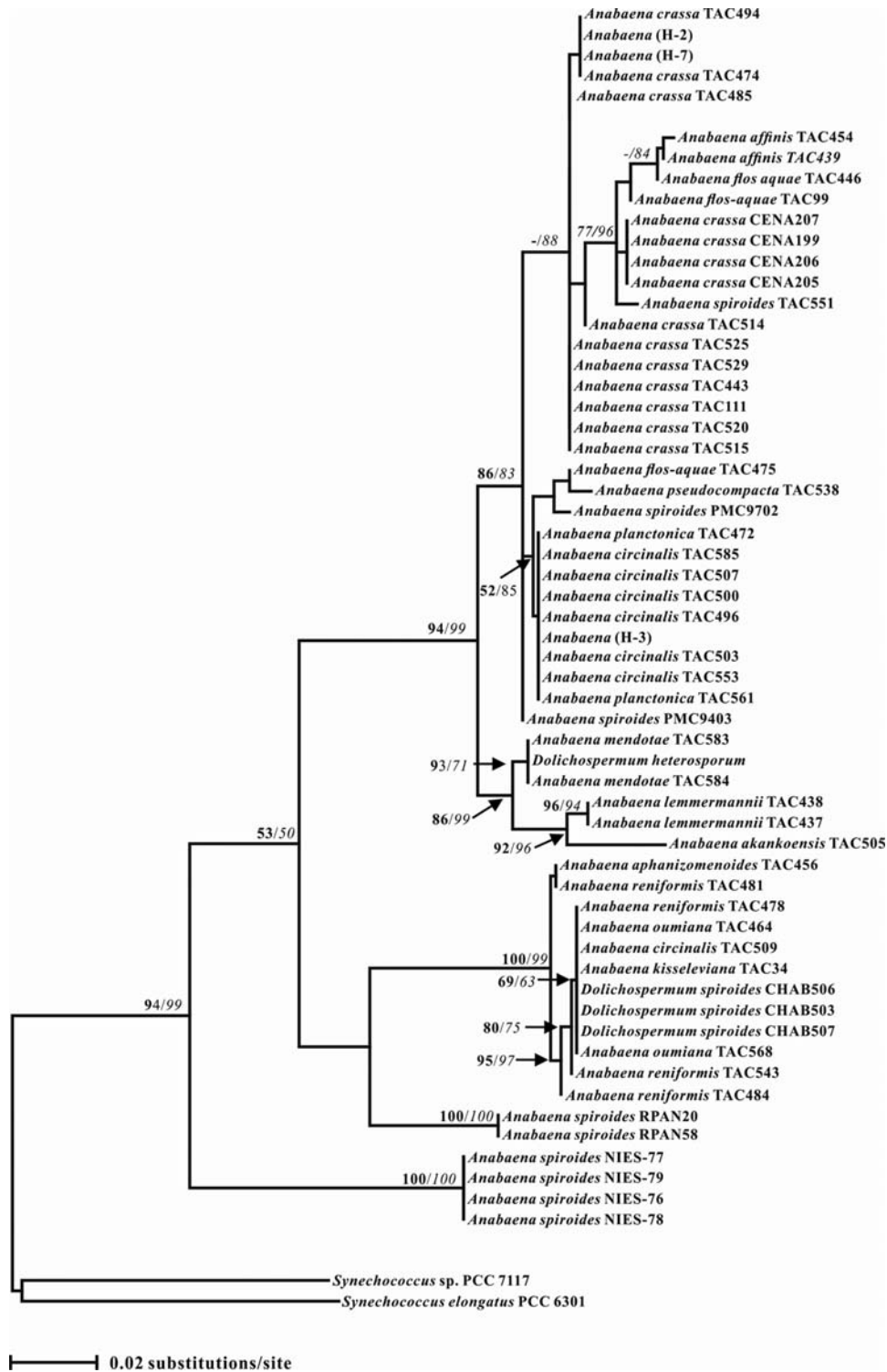


Fig. 3. Phylogenetic relationships of *Anabaena* taxa inferred by maximum likelihood analyses settings obtained using Modeltest (Posada & Crandall 1998). The analysis was based on partial 16S rRNA sequences (908 bp). Two *Synechococcus* species were used as an outgroup for the purpose of rooting the analyses. In maximum likelihood analyses the best -ln likelihood score was 3233.5317 using the TrN+I+G model (Tamura and Nei, 1993). Only bootstrap values of 50% or higher are shown to the left of internal nodes. The first numbers are from maximum likelihood analyses (100 replications) and the second numbers are from neighbor-joining analyses (1000 replications).

적 요

2012년 북한강수계 전역에 걸쳐 대발생을 일으킨 남조 *Anabaena*의 분자생물학적 특성을 검토하였다. 시료는 2012년 7월 13일에 남조 *Anabaena* 밀도가 높았던 3개 호소-의암호, 청평호, 팔당호에서 각각 채집하였다. 분석은 선행연구 문헌을 근거로 하는 형태학적 분석, 16S rRNA 염기서열 분석을 통한 분자계통학적 분석을 동시에 실시하였다. 결과를 종합하면 북한강수계 3개 호소에서 조류 대발생을 일으킨 남조 *Anabaena*는 모두 동일종 *Anabaena crassa* (Lemmermann) Komark.-Legn. & Cronberg이며, 동시에 출현하고 본 종과 형태 및 분자생물학적으로 매우 유사한 *A. circinalis*는 환경요인에 따라 형태변이가 쉽게 일으키는 동일종으로 밝혀졌다.

사 사

본 연구는 2012년도 한강수계 환경기초조사사업의 일환으로 수행되었으며 시료채집에 도움을 주신 박명환, 조인환, 김하경, 변정환 군에게 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Becker, V., P. Ihara, J.S. Yunes and V.L.M. Huszar. 2010. Occurrence of anatoxin-a(s) during a bloom of *Anabaena crassa* in a water-supply reservoir in southern Brazil. *Journal of Applied Phycology* **22**: 235-241.
- Cho, K.S., B.C. Kim, W.M. Heo and S.J. Cho. 1989. The succession of phytoplankton in Lake Soyang. *Korean Journal of Limnological Society* **10**: 73-82.
- Cook, W.O., V.R. Beasley, R.A. Lovell, A.M. Dahlem, S.B. Hooser, N.A. Mahmood and W.W. Carmichael. 1989. Consistent inhibition of peripheral cholinesterases by neurotoxins from the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*: studies of ducks, swine, mice and a steer. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**: 915-922.
- Frizzo, E.E., V. Becker, F.B. Spiandorello, R. Girardi and J.S. Yunes. 2004. Implantação do monitoramento fitoplanctônico, com ênfase em cianobactérias e cianotoxinas, nos mananciais de abastecimento do município de Caxias do Sul, RS. In Anais VIII Exposição de experiências municipais em saneamento/34ª Assembléia Nacio-
- nal da ASSEMAE. ASSEMAE, Caxias do Sul, 421-424.
- Guindon, S. and O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696-704.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hayes, K.P. and M.D. Burch. 1989. Odorous compounds associated with algal blooms in South Australian waters. *Water Research* **23**: 115-121.
- Henriksen, P., W.W. Carmichael, J. An and Ø. Mostrup. 1997. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* **35**: 901-913.
- Izaguirre, G., C.J. Hwang, S.W. Krasner and M.J. McGuire. 1982. Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems. *Applied and Environmental Microbiology* **43**: 708-714.
- Jung, S.W., J.H. Lee and H.K. Heo. 2004. Environmental studies in the lower part of the Han River VI. The statistical analysis of eutrophication factor. *Korean Journal of Limnological Society* **37**: 78-86.
- Kim, B.H., J.Y. Choi, M.S. Han and S.J. Hwang. 2004. Influences of nutrient deficiency on the phytoplankton in Paltang reservoir, Korea. *Korean Journal of Limnological Society* **37**: 47-56.
- Komárek, J. and E. Zapomělová. 2007. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena*=subg. *Dolichospermum* - 1. part: coiled types. *Fottea* **7**: 1-31.
- Kwon, O.Y., S.W. Chung and J.W. Lee. 2006. Environmental studies in the lower part of the Han River VIII. Physicochemical factors contributing to variation of phytoplankton communities. *Korean Journal of Limnological Society* **39**: 340-351.
- Lee, D.S., S.Q. Suh, S.K. Hwang, T.K. Kwon, T.H. Kim, W.C. Shin and S.D. Hong. 1996. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from *Streptomyces melanosporofaciens* 7489. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **6**: 364-365.
- Lee, E.J. and I.H. Choi. 2012. Variation of the phytoplankton community and analysis of odor compounds in Han River. *Co-conferences of Korean Society of water Environment and Korean Society of Drinking Water*. March 21-22. KINTEX.
- Lee, E.J., B.C. Kim and K.S. Cho. 1998. Patterns of phytoplankton community structure at inlet site (Sanggul-Ri) in Lake Soyang from 1984 to 1997. *Korean Journal of Limnological Society* **31**: 119-128.
- Lim, J.R., S.S. Kim, K.H. Lee, S.Y. Lee, H.J. Cheon and S.Y.

- Chung. 2006. The relation of occurrence of algae and taste and odor in water treatment plant around the Han River water supply system. *Conferences of Korean Society of Water Environment Engineering*. April 27-29. pp. 248-251. KINTEX.
- Mahmood, N.A., W.W. Carmichael and D. Pfahler. 1988. Anticholinesterase poisonings in dogs from a cyanobacterial (blue-green algae) bloom dominated by *Anabaena flos-aquae*. *American Journal of Veterinary Research* **49**: 500-503.
- Molica, R.J.R., E.J.A. Oliveira, P.V.V.C. Carvalho, A.N.S.F. Costa, M.C.C. Cunha and G.L. Melo. 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* **4**: 743-753.
- Monserrat, J.M., J.S. Yunes and A. Bianchini. 2001. Effects of *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria) aqueous extracts on the Aceltycholinesterase activity of aquatic species. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 1228-1235.
- Nübel, U., F. Garcia-Pichel and G. Muyzer. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3327-3332.
- Saadoun, I., K.K. Schrader and W.T. Blevins. 2001. Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Anabaena* sp. *Journal of Basic Microbiology* **41**: 51-55.
- Seo, M.Y., B.H. Kim and K.S. Bae. 2007. Fluctuation of environmental factors and dynamics of phytoplankton communities in lower part of the Han River. *Korean Journal of Limnological Society* **40**: 395-402.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) and other Methods, ver. 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Symposium Series* **22**: 4673-4680.
- Tuji, A. and Y. Niiyama. 2010. Phylogenetic study by the morphological and molecular analyses of Japanese planktonic *Anabaena* Species. *Bulletin of the National Science Museum Series B* **36**: 71-80.
- Urbach, E., D. Robertsin and S. Chisholm. 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* **355**: 267-270.
- Wang, S.H., A.R. Dzialowski, J.O. Meyer, F. de Noyelles, N.C. Lim, W.W. Spotts and D.G. Huggins. 2005. Relationships between cyanobacterial production and the physical and chemical properties of a Midwestern Reservoir, USA. *Hydrobiologia* **541**: 29-43.
- Werner, V.R. and H.D. Laughinghouse. 2009. Bloom-forming and other planktonic *Anabaena* (Cyanobacteria) morphospecies with twisted trichomes from Rio Grande do Sul State, Brazil. *Nova Hdwigia* **89**: 17-47.
- Willame, R., C. Boutte, S. Grubisic, A. Wilmotte, J. Komarek and L. Hoffmann. 2006. Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *Journal of Phycology* **42**: 1312-1332.
- You, K.A., M.S. Byeon, S.J. Youn, S.J. Hwang and D.H. Rhew. 2013. Growth Characteristics of Blue-green Algae (*Anabaena spiroides*) Causing Tastes and Odors in the North-Han River, Korea. *Korean Journal of Ecology and Environment* **46**: 135-144.
- Yunes, J.S., N.T. Cunha, L.A.O. Proença, L.P. Barros and J.M. Monserrat. 2003. Cyanobacterial neurotoxins from Southern Brazilian freshwaters. *Comments on Toxicology* **9**: 103-115.
- Yunes, J.S., A. Matthiensen, C. Carneiro, F. Oroski, V. Becker and M.C. Carvalho. 2005. Florações de Cianobactérias Tóxicas: Mãos à obra ao problema. In: Marinho M, Roland F, Cesar D (eds) Lições de Limnologia. RiMa, São Carlos, 299-323.
- Zapomělová, E., D. Hisem, K. Řeháková, P. Hrouzek, J. Jezberová, J. Komárková, J. Korelusová and P. Znachor. 2008. Experimental comparison of phenotypical plasticity and growth demands of two strains from the *Anabaena circinalis/A. crassa* complex (cyanobacteria). *Journal of Plankton Research* **30**: 1257-1269.
- Zapomělová, E., E. Zapomělová, O. Skácelová, P. Pummann, R. Kopp and E. Janeček. 2012. Biogeographically interesting planktonic Nostocales (Cyanobacteria) in the Czech Republic and their polyphasic evaluation resulting in taxonomic revisions of *Anabaena bergii* Ostenfeld 1908 (*Chrysoosporum* gen. nov.) and *A. tenericaulis* Nygaard 1949 (*Dolichospermum tenericaule* comb. nova). *Hydrobiologia* **698**: 353-365.

(Manuscript received 1 April 2013,
Revised 14 May 2013
Revision accepted 19 June 2013)