

# 유전자 기법을 이용한 북한강 수역 *Anabaena* strain의 동정 및 Geosmin 생산 잠재성 분석

김건희 · 임병진<sup>1</sup> · 유경아<sup>1</sup> · 박명환 · 박정환 · 김백호<sup>2</sup> · 황순진\*

건국대학교 환경과학과, <sup>1</sup>국립환경과학원 한강물환경연구소, <sup>2</sup>한양대학교 생명과학과

**Identification and Analysis of Geosmin Production Potential of *Anabaena* stain Isolated from North Han River using Genetic Methods. Kim, Keon hee, Byung-Jin Lim<sup>1</sup>, Kyoung-A You<sup>1</sup>, Myung-Hwan Park, Jung Hwan Park, Baik-Ho Kim<sup>2</sup> and Soon-Jin Hwang\* (Department of Environmental Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea, <sup>1</sup>Han River Environment Research Center, National Institute of Environmental Research Yangpyung, Gyeonggi 476-823, Korea, <sup>2</sup>Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)**

**Abstract** This study was conducted to identify the bloom-forming *Anabaena* strains with two phenotypes (straight-type and coil-type) isolated from North Han River (Sambong-ri Joam-myun) using 16S rDNA sequence. The odor material producing potential was also examined using the geosmin-synthesizing gene cluster. Despite of striking morphological difference of the two stains, resembling *A. circinalis* and *A. crassa* species, the phylogenetic analysis using 16S rDNA identified the both strains as a single species of *A. circinalis* with high genetic similarity (98% ~ 100%). Also, two *Anabaena* strains showed to possess the geosmin-synthesizing gene cluster, indicating that they are capable of producing the odor substance. This study is the first report that provides the direct evidence of geosmin production in the gene level by *A. circinalis* in Korea, and provides important basic information to identify the source alga of geosmin increase and its management in North Han River.

**Key words:** *Anabaena circinalis*, phenotypes, 16S rDNA, geosmin production potential, North Han River

## 서 론

담수생태계에서 남조류에 의한 이취미 물질의 발생은 세계 여러 나라에서 보고되었으며 음용수 공급 등 물이용에 상당한 문제를 일으키고 있다(Saadoun *et al.*, 2001; Tsujimura and Okubo, 2003; Wang *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2007). 이취미의 원인물질은 geosmin과 2-MIB 이

며, 국내에서는 2011년 11월 북한강 수계에서 고농도의 geosmin 발생이 관찰되었다(HRWEMD, 2012; You *et al.*, 2013). 당시 염주말목에 속하는 *Anabaena*가 대발생하여 geosmin 증가의 원인종으로 지목된 바 있다(HRWEMD, 2012). 북한강 수계에서 *Anabaena*의 대발생은 과거 소양호에서 *Anabaena macrospora* (Cho *et al.*, 1989)의 발생이 보고된 이후 25년 만에 처음으로 관찰되었다(Jung *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2006). 그러나 최근 2~3년 동안 북한강 수계에서 *Anabaena* 대발생이 빈번하게 나타나(Li *et al.*, 2013; You *et al.*, 2013) 상수원 관리에 주요한 현안 문제로 부각되

Manuscript received 20 November 2014, revised 19 December 2014, revision accepted 22 December 2014  
\* Corresponding author: Tel: +82-2-450-3748, Fax: +82-2-456-5062, E-mail: sjhwang@konkuk.ac.kr

고 있다.

이취미 물질과 같은 대사부산물질을 생산하는 남조류에 대하여 균체 형태, 세포 외부의 점액질 초(sheath), 세포 형태·분화·배열, 세포 직경, 세포 분지 형태 등의 형태학적 특징에 근거한 종 분류가 수행되었다. 하지만 다양한 환경조건에서 발견되는 형태적 변이종(morpho-type)들을 현미경 관찰을 통해 정확하게 동정하기는 쉽지 않다. 한편으로, 현장의 남조류 밀도와 이취미 물질 농도의 상관성 분석을 통해 남조류에 의한 이취미 물질 발생 기여도를 유추할 수는 있으나 이취미 물질을 생산하는 정확한 원인종을 확인할 수 없다. 종 수준에서 다양한 염기서열을 나타내며 보존성이 높은 16S rDNA (ribosomal DNA) 유전자는(Lyra *et al.*, 2001) 형태학적인 분류가 어려운 박테리아 등과 같은 미생물의 동정에 널리 사용된다. 또한, 환경변화에 따른 형태적 변이에 비해 유전자 수준의 변형은 상대적으로 오랜 시간에 걸쳐 발생하므로 특정 남조류의 16S rRNA 염기서열을 밝혀낸다면 다른 남조류의 염기서열과 계통학적인 유연관계를 분석하여 형태학적 변이에 영향을 받지 않고 종을 동정하는 것이 가능하다. 또한, 이미 밝혀진 남조류의 특정 대사부산물질 생산능력에 관여하는 유전자 구간을 이용한 탐침은 관심 있는 해당 종의 대사부산물질 생산능력의 유무를 파악할 수 있게 한다.

본 연구에서는 북한강 수역에서 geosmin 농도가 급증한 시기 동안에 우점하였던 *Anabaena* strains의 분자적 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열을 이용한 계통수 및 유연관계 분석을 수행하였으며, geosmin 생산 잠재성을 유전자 수준에서 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. *Anabaena* strain 분리, 배양 및 형태적 특징 분석

*Anabaena*가 대발생한 2012년 8월에 북한강 수역의 조안면 삼봉리 지역(37° 34'59.6"N, 127° 20'12.2"E)에서 현장수를 채수하여 실험실로 저온 운반하였으며, Capillary method (Guillard, 1973)를 이용하여 단일 세포를 분리하였다. 분리된 세포는 BG-11배지의 25°C 온도 및 30  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ 의 빛 조건(L:D=14:10)에 1개월 이상 배양하였다. 최종적으로 현장에서 가장 많이 관찰된 직선형(straight-type)과 나선형(coil-type) 두 가지 형태의 *Anabaena* strain을 분리하였다. 현미경(ZEISS, axiovert, Germany)을 통해 세포의 형태적인 특징을 사진기(Ca-

non 650D, Japan)로 촬영한 후 INNERVIEW v2.0 program (ZOOTOS, Korea)을 이용하여 세포의 크기 및 길이를 측정하였다.

### 2. *Anabaena* strain의 DNA 추출 및 PCR 증폭

Genomic DNA extraction kit (Macherey-Nagal, USA)를 사용하여 배양된 세포의 DNA를 추출하였으며, 각각의 시료는 lysis 용액 및 silica bead와 함께 vortexing하여 세포를 파괴하였다. 용출된 세포혼합액 700  $\mu\text{L}$ 를 micro column의 resin에 옮겨 담고 원심분리하여 DNA만 흡착·분리하였다. 분리된 *Anabaena*의 정확한 종 단위 검증을 위하여 16S rRNA 유전자를 PCR 증폭하였다. 이를 위해 CYA106F(GGG GAA TTT TCC GCA ATG GG)(Nübel *et al.*, 1997)와 1492R(ACC TTG TTA CGA CTT)(Lane *et al.*, 1985) primer를 사용하였으며, 95°C에서 2분 동안 처리한 후 95°C 1분, 58°C 1분, 72°C 90초의 순으로 35회 반복한 뒤, 72°C에서 5분 동안 처리하여 유전자를 증폭하였다.

### 3. 유전자 염기서열 분석 (Sequencing)

유전자 증폭은 ABI BigDye® Terminator v3.1 Cycle-Sequencing kit를 이용하여 형광물질을 산물에 부착하여, 다시 증폭과정을 수행하였다. 증폭된 유전자는 ABI 3730XL DNA analyzer(Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 유전자 염기서열을 분석하였다(SolGent, Korea). 유전자 염기서열 분석을 위해 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분의 온도 변화를 30회 반복하여 매회 발생하는 형광값을 분석하였다. 분석을 통해 확인된 염기서열은 NCBI(National Center for Biotechnology Information, USA) Genbank database의 BLAST program을 이용하여 상동성(Homology) 분석을 수행하였다. 각 균주의 염기서열은 Clustal W algorithm을 이용하여 병렬로 정렬하였으며, BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 비교 분석결과에서 hit score가 가장 높은 종으로 동정하였다.

### 4. 16S rRNA에 의한 계통수 분석

북한강에서 분리한 *Anabaena*의 유전자 염기서열의 특징을 조사하기 위해 추출된 DNA를 이용하여 16S rRNA를 PCR 증폭하였다. 유전자 비교를 위해 NCBI에서 *Anabaena* strain의 16S rRNA 유전자 염기서열 자료를 내려 받았으며, 1000 bp~1400 bp의 크기의 유전자 자료만을 선별하여 64개의 *Anabaena* strain의 16S rRNA 유

전자 자료를 선택하였다. 염기서열의 계통수 분석을 위해 유전자는 Clustal W algorithm을 통해 정렬하였으며 Maximum parsimony (MP) 방법, Maximum likelihood (ML) 방법, Neighbor-joining (NJ) 방법을 이용하여 수행하였다. MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013)을 이용하여 분석을 수행하였으며, 계통수의 확실성 평가를 위한 bootstrap (BS)은 모든 방법에서 1000회 반복하였다. Maximum likelihood 방법과 Neighbor-joining 방법에서 염기서열의 치환모델은 각각 Tamura-Nei (Tamura and Nei, 1993)와 Maximum composite Likelihood (Felsenstein, 1985) 모델을 사용하였으며, Maximum parsimony 방법은 MrModeltest v2.3 (Nylander, 2004)에 따라 GTR+I+G 모델을 사용하였다.

### 5. Geosmin 생산 유전자의 PCR 증폭

북한강에서 분리된 *Anabaena*의 DNA를 이용하여 geosmin 생산능력을 유전자 수준에서 판단하였다. 실험에 사용된 primer는 3139F (CTAGACCMATGCGGGTTT TA)와 3708R (CCATTC-TTTRGAATGMTT)이었으며, 이는 *Phormidium* sp. P2r sesquiterpene synthase (geoA2)와 *Anabaena ucrainica* CHAB2155 putative geosmin synthase (gys1) 유전자 정보를 이용하여 제작하였다 (Ludwig *et al.*, 2007; Tsao *et al.*, 2014). PCR 증폭을 위해 95°C에서 2분간 처리 후, 95°C 30초, 53°C 30초, 72°C 1분을 30회 반복한 뒤, 72°C 10분 처리하였다. 증폭된 PCR 산물은 Ethidium bromide와 TAE buffer를 혼합한 1% agarose gel에서 전기영동하여 크기를 측정하였으며, NCBI에서 BLAST를 통해 Genbank database의 유전자와 비교하여 geosmin 생산 유전자를 확인하였다.

### 6. 염기서열 등록번호 (Accession number)

북한강에서 분리한 직선형과 나선형 *Anabaena*의 16S rDNA 유전자 정보를 DDBJ (DNA Database Bank of Japan)에 등록하였으며, Accession 번호 LC006113, LC006112를 각각 부여받았다.

## 결과 및 고찰

### 1. 형태적 특징 및 동정

북한강 수역에서 분리한 *Anabaena*의 영양세포 (Vegetative cell)는 염주형태로 연결된 사상성이며 직선 (strai-

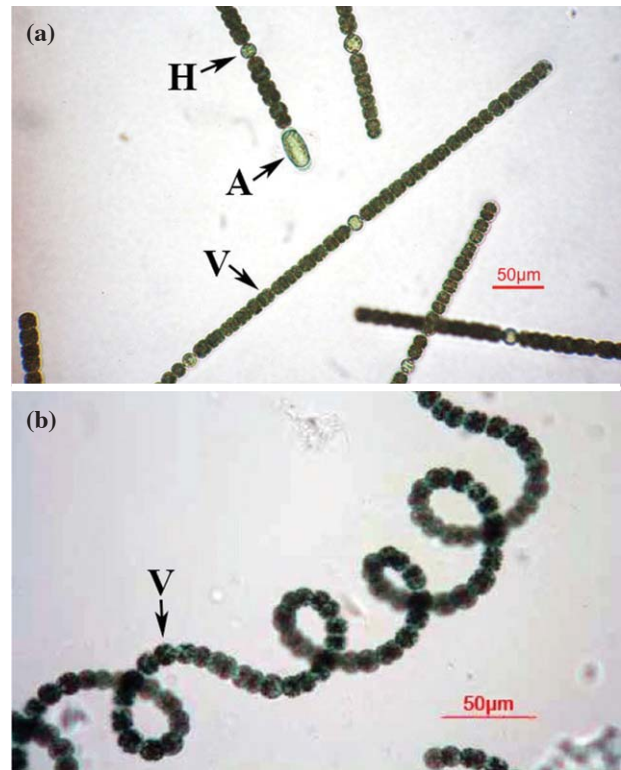


Fig. 1. Photo of *Anabaena circinalis* found in North Han River. (a): Straight-type ( $\times 100$ ). A; Akinete, H; Heterocyst, V; Vegetative cells. (b): Coil-type ( $\times 200$ ). V; Vegetative cells.

ght-type) (Fig. 1a) 또는 나선 (coil-type) (Fig. 1b) 형태로 존재하였다. 직선형 사상체의 최장길이는 최소 124  $\mu\text{m}$ 에서부터 최대 563  $\mu\text{m}$ 까지 다양하게 관찰되었으며, 단일세포는 원형에 가까운 타원 형태로 평균적으로  $10.6 \pm 1.9 \mu\text{m} \times 11.2 \pm 2.9 \mu\text{m}$  (폭  $\times$  길이)의 크기를 보였다. 이형세포 (Heterocyst)와 휴면포자 (Akinete)는 각각 원형에 가까운 형태 ( $18.5 \pm 2.2 \mu\text{m} \times 17.6 \pm 5.1 \mu\text{m}$ ) 그리고 원통형 ( $20.5 \pm 1.1 \mu\text{m} \times 47.6 \pm 4.3 \mu\text{m}$ )의 형태로 관찰되었다 (Fig. 1a). 나선형 *Anabaena*의 영양세포는 직선형과 마찬가지로 구형에 가까운 형태이며 (Fig. 1b) 세포 크기는 직선형보다 약간 작았다 ( $10.1 \pm 3.9 \mu\text{m} \times 9.3 \pm 3.2 \mu\text{m}$ ). 나선형 사상체의 평균길이는  $568.5 \pm 15.9 \mu\text{m}$ 로 평균적으로 나선 1 cycle의 간격은  $75.5 \pm 6.0 \mu\text{m}$ 였다. 이형세포와 휴면포자는 직선형 사상체와 동일한 형태 및 크기를 보였다.

북한강에서 분리한 *Anabaena*는 세포 크기, 사상체 형태, 이형세포와 휴면포자 크기 및 형태 등을 이용하여 선행연구와 비교한 결과 (Choi *et al.*, 2002; Komárek and Zapomêlová, 2007), *Anabaena circinalis* 및 *A. crassa* 중

**Table 1.** Morphological comparison among *Anabaena* species with similar phenotypes (Choi *et al.*, 2002; Komárek and Zapomêlová 2007).

	<i>A. circinalis</i>	<i>A. spiroides</i>	<i>A. crassa</i>	<i>A. planktonica</i>	<i>A. solitaria</i>	<i>A. mucosa</i>	<i>A. ucranica</i>
Cell shape	Spherical	Spherical	Spherical or barrel shaped	Shortly barrel-shaped	Spherical to oval elongated (citriform)	Spherical	Spherical or barrel shaped
Trichome width (µm)	8~11	6~9	10~15	(7.7)8~15	6.5~10 (12)	7~10	6~10
Heterocyst shape	Spherical	Spherical	Spherical	Rounded, nearly spherical	Spherical	Spherical	Spherical
Akinete shape	Oval	Oval, rarely slightly kindey-shape	Oval, rarely slightly kindey-shape	Oval to almost wide cylindrical with rounded ends	Long cylindrical	Spherical to wide oval	Spherical or elliptical
Akinete size (µm)	20~28 × 15~21	15~20.8 × 9~14	15~42 × 13~25	15~37 × 9~21	20~45 × 10~16	16~19 × 16~20	15~20 × 16~21
Diameter of coil (µm)	Coils 68~120 wide	Coiling with slight irregularities	Coils 40~70 wide	Straight type	Straight type	Irregular coils, 60~200 wide	50~85

과 형태적으로 가장 유사하였다 (Table 1). 그러나 형태적 특징만으로 두 strain을 명확하게 구분하기 어려웠다.

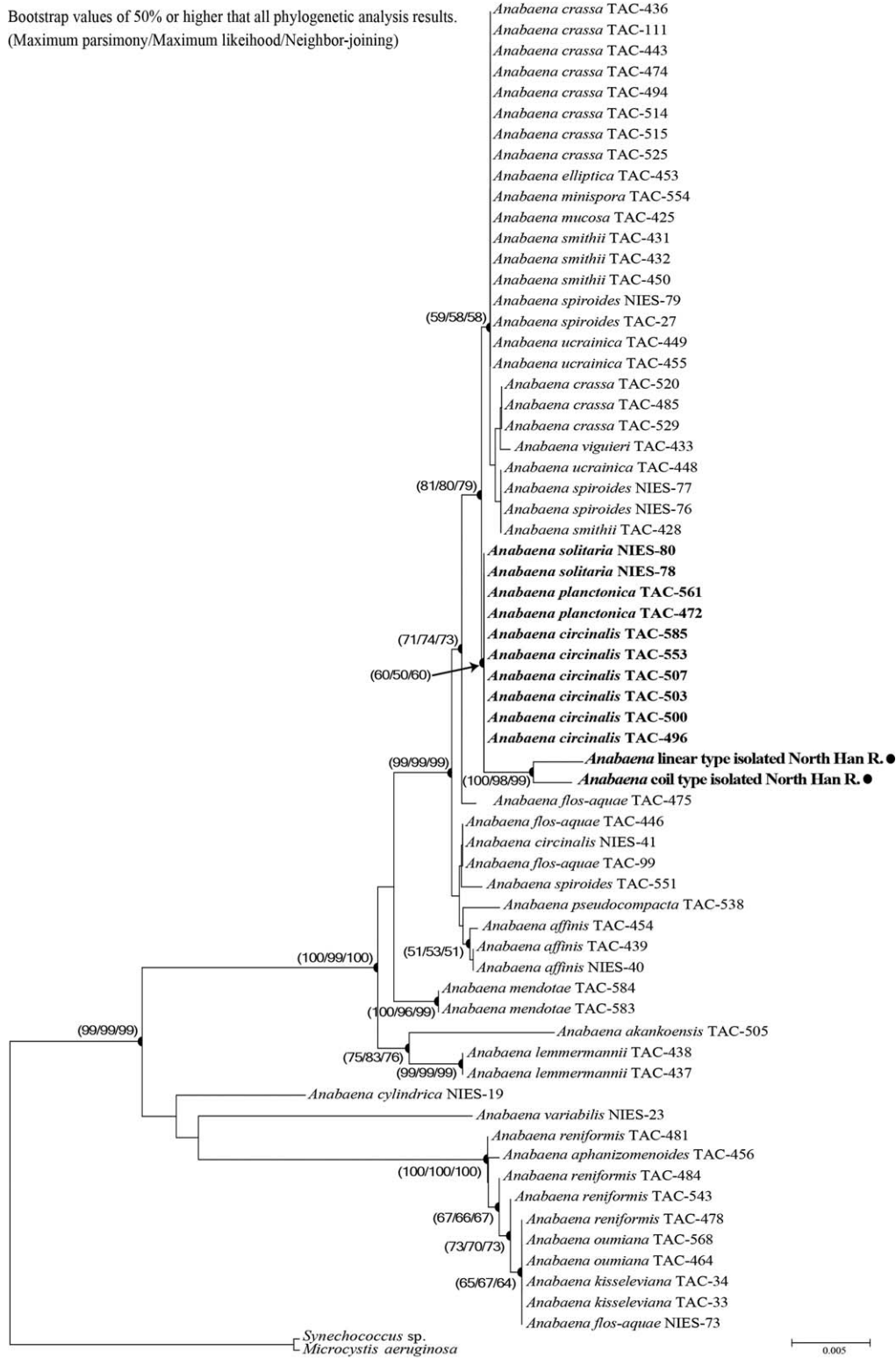
## 2. 염기서열 및 계통학적 특징

북한강에서 분리한 직선형 그리고 나선형 *Anabaena* 사상체는 단일 계통으로 98%~100% 유전적 유사도를 보였다 (Fig. 2). NCBI의 유전자 은행으로부터 선별한 1000 bp에서 1400 bp 길이의 *Anabaena* strain과의 BLAST 분석 결과에서도 두 strain 모두 일본에서 분리된 *Anabaena circinalis* TAC strain과 98%의 유전적 유사도를 나타내었다. 이와 같은 결과는 북한강에서 발생한 두 가지 형태의 *Anabaena* strain이 종 수준에서 동일함을 보여준다. 선행 연구들의 유전적 유사도 분석을 통한 종판별의 결과와 비교할 때, 본 연구에서 대상으로 하고 있는 두 strain 간의 98%의 유전적 유사도는 같은 종으로 판단하는 데 문제가 없다고 사료된다. Jagadeesan *et al.* (2009)와 Kim *et al.* (2014)는 해양성 남조류와 일부 박테리아 종에 대한 16S rDNA와 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 95%~96%의 유전적 상동성을 동일종으로 보고하였다.

종 수준의 형태학적 분류의 모호함은 남조류의 *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia* 그리고 *Cylindrospermopsis* 속에서 빈번하게 발생하고 있으며 (Choi *et al.*, 2012; Thomazeau *et al.*, 2010), 유전적 분류를 통해 이를 명확하게 하고자 하는 노력이 진행되어 왔다 (Wilmontte and Golubic, 1991; Neilan *et al.*, 1995). 형태학적 모호함은 상이한 형태를 보이거나 동일한 종인 경우와 형태학적으

로 매우 유사하나 서로 다른 종인 두 가지의 경우를 가진다. 예를 들어 *Anabaena planktonica*와 *Anabaena solitaria*의 경우 세포의 크기, 휴면포자 형태의 차이 등으로 인해 현미경 동정 시 서로 다른 종으로 분류되나, 명확한 형태학적인 차이점에도 불구하고 유전자를 통한 분류에서 두 종은 동일 종으로 판명되었다 (Wacklin *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2012). 이러한 모호함은 본 연구에서 형태적인 차이를 보임에도 불구하고 유전자 계통학적으로는 단일종으로 나타난 *A. circinalis*와 *A. planktonica*, *A. solitaria*의 경우에도 나타났다 (Fig. 2). 북한강에서 분리한 직선형과 나선형 *Anabaena* strain의 경우에도 현미경 관찰 시 형태학적으로 구분이 어려운 *A. crassa*와 *A. circinalis*의 특징을 보였으나 계통도를 통한 유전적 분류에서는 *A. circinalis* 단일 종으로 수렴되었다 (Fig. 2). 이와 같이 유전자를 이용한 분류방법은 환경변화에서 기인하는 형태적 변이가 현미경 동정 시 발생할 수 있는 오류를 최소화하는 한편, 육안으로 구분하기 어려운 두 종을 명확하게 구별할 수 있다는 장점을 지닌다.

북한강 수역에서 발생하는 두 종류의 *A. circinalis* strain들이 유전적으로 98%의 유사도를 보여 동일종으로 판정되었다 할지라도, 염기서열 1309쌍 중 28쌍의 차이 (2%)는 *Anabaena circinalis* 종 내에서 직선형 사상체와 나선형 사상체 간에 유전적 분화(변이)의 진행 가능성을 시사한다. 특히, 두 strain 간 사상체의 직선형과 coil형이라는 형태적으로 명확한 차이와 함께 세포 크기의 차이는 현미경 관찰로도 어렵지 않게 구분되는 특징이다. 이러한 특징들이 유전적인 차이로 반영된 것이라는



**Fig. 2.** Phylogenetic relationships of *Anabaena* taxa inferred using Maximum parsimony, Maximum likelihood and Neighbor-joining analyses. The analysis was based on partial 16S rRNA sequences (1078 bp). *Synechococcus* sp. and *Microcystis aeruginosa* were used as outgroup for the purpose of rooting the analyses. Only bootstrap values of 50% or higher are shown to the left of internal nodes. The first numbers are from maximum parsimony analyses, second numbers are from Maximum likelihood analyses and third numbers are from neighbor-joining analyses. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.

**Table 2.** DNA nucleotide sequence of geosmin synthesizing gene of *Anabaena circinalis* isolated from North Han River. Both phenotypes were completely same sequence. Sequence direction is 5' to 3'.

1	AAAATGGCTGATGGTGAATCTCCGCAATGATCTATTCTCCTACCAAAGA	50
51	GAGGTGGAAGAGGAAGGTGAAAATTCTAACTGTGTGCTTGTAGTTGAGCG	100
101	TTTCTTGAATGTGAGTACCCAAGAGGCCGTAACCTCACTAACGAACTAC	150
151	TCAACTCCCGTTTATACCAATTTGACAACACTGCTGTCACTGAATTACCC	200
201	TCTCTTTTTGAGGAGTACGGAGTAGATCCAGTAGAGCGTGTGAATGTTCT	250
251	CCTTTACATTAAAGGACTTCAAGATTGGCAATCTGGTGGTCACGAGTGGC	300
301	ACATGAGGTCAAGCCGCTATATGAACAAGCAAGAGCCGGATAATTCAGGT	350
351	ACATCTGTGACTTTGGGTGGGCCTACTGGGCTAGGAACATCGGCCGCGCG	400
401	GCTAGAATCCTTATCCACTACTTTGGGTTTGAGAAGGTTTTAAAAGTTTTA	450
451	CTCATGTTTCCTTATCAAACCTGTAGGACCAGTAAAACCTGCCTAAGTTTTAT	500
501	ATGCCCTTCTCTACCACCTTAAATCCTAATTTGGATGCCGCACGGAATCA	550
551	TTCCAAAAGAATGGA	565

결론을 내리기에는 현실적으로 증거가 부족하다. 다만 유전적 차이에 앞서 명확한 형태적 차이로 인해 이 두 strain을 *Anabaena circinalis*의 형태적 변이종(morpho-type)으로 취급하는 것이 바람직하다고 사료된다.

**3. Geosmin 생산 유전자의 PCR 증폭**

두 가지 strain의 *A. circinalis*의 geosmin 생산 잠재성을 유전자 수준에서 판단하기 위해 세포의 DNA에서 geosmin 형성 유전자 증폭을 수행하였다. 증폭된 산물을 전기영동으로 분석한 결과, 두 가지 형태 모두에서 565 bp 크기의 유전자 염기서열이 100% 일치하는 band가 나타났다(Table 2). 해당 염기서열을 NCBI의 유전자 은행 database에서 BLAST 검색 한 결과, *Anabaena ucrainica* CHAB strain과 *Oscillatoria* sp.의 geosmin 형성 유전자와 각각 99%, 81%의 상동성을 보였다. 이 결과는 북한강 수계에 존재하는 *Anabaena circinalis*는 종의 형태적 변이에 관계없이 geosmin을 생성할 수 있음을 보여준다. 실제로 본 연구의 선행연구에서 *Anabaena circinalis* 영양세포가 geosmin을 생산함을 확인하였다(HRWEMD, 2012). Geosmin을 생산하는 *A. circinalis*는 대만(Tsao et al., 2014)과 중국(Su et al., 2013) 등 아시아 지역에서 보고된 바 있으나 국내에서는 본 연구의 결과가 최초의 보고로서 북한강 수계에서 geosmin 증가의 원인종 확인 및 관리에 중요한 자료를 제공한다고 사료된다. 그러나 현장에서 *Anabaena circinalis*에 의한 geosmin 발생과 변화를 보다 명확하게 이해하기 위해서는 다양한 환경조건에의 생리·생태적 연구가 필요하다.

**적 요**

본 연구는 최근 북한강 수계에서 번성하고 있는

*Anabaena* strain의 16S rDNA 염기서열을 이용한 종 수준의 동정과 geosmin 합성 유전자의 탐침을 통해 이취미 물질의 잠재 생산능력을 분석하였다. 현장(경기도 양평군 조암면 삼봉리 수역)에서 분리 배양한 *Anabaena*는 직선형과 나선형 두 가지의 형태적 변이를 보였다. 이들은 세포의 크기와 사상체에서 형태적 차이를 나타냈으며, *A. circinalis* 및 *A. crassa*와 유사한 형태적 특징들을 보여주었다. 그러나 16S rDNA 계통수 및 유연관계를 분석한 결과, 직선형과 나선형 모두 동일한 *A. circinalis* 종으로 확인되었다(98%~100%의 유전적 유사도). 또한 직선형과 나선형 strain 모두에서 geosmin을 합성하는 유전자 구간이 발견되어, 북한강 수계에 존재하는 *Anabaena circinalis*는 종의 형태적 변이에 관계없이 geosmin을 생산할 수 있음을 보여주었다. 본 연구의 결과는 유전자 수준에서 *A. circinalis*의 geosmin 생산에 대한 직접적인 증거를 제공하는 국내 최초의 보고로서 북한강 수계에서 geosmin 증가의 원인종 확인 및 관리에 중요한 자료를 제공한다.

**사 사**

본 연구는 2014년도 한강수계 환경기초조사사업(연구과제명: 유해조류에 의한 이취미물질 발생원인 조사 및 관리방안 연구) 지원에 의해 수행되었음.

**REFERENCES**

Bruchet, A. 1999. Solved and unsolved cases of taste and odor episodes in the files of Inspector Cluzeau. *Water Science Technology* 40:15-21.  
 Cho, K.S., B.C. Kim, W.M. Heo and S.J. Cho. 1989. The suc-

- cession of phytoplankton in Lake Soyang. *Korean Journal of Limnology* **10**: 73-82.
- Choi, A.R., J.H. Park and J.A. Lee. 2002. Population dynamics and the toxin *Anabaena* in the lower Nakdong River. *Algae* **17**(2): 95-104.
- Choi, G.G., C.Y. Ahn and H.M. Oh. 2012. Phylogenetic relationships of *Arthrospira* strains inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA*-IGS sequences. *Algae* **27**(2): 75-82.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Guillard, R.R.L. 1973. Methods for micro flagellates and nanoplankton. p. 69-85. In: Handbook of phylogical Methods, culture Method and Growth measurement (Stein, J.R., ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Han River Watershed and Environment Management District (HRWEMD). 2012. Distribution and eco-physiological characteristics of harmful algae in North Han River. Final Report.
- Jagadeesan, P., B. Priya, D. Prabaharan and L. Uma. 2009. Genetic heterogeneity of the marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* (Pseudanabaenaceae) evidenced by RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. *Journal of Plankton Research* **31**(10): 1141-1150.
- 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 Limnology* **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 Pal-tang reservoir, Korea. *Korean Journal of Limnology* **37**: 47-56.
- Kim, M., H.-S. Oh, S.-C. Park and J.S. Chun. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**: 346-351.
- Kwon, O.Y., S.W. Chung and J.W. Lee. 2006. Environmental studies in the lower part of the Han River VIII. Physico-chemical factors contributing to variation of phytoplankton communities. *Korean Journal of Limnology* **39**: 340-351.
- Komárek, J. and E. Zapomêlová. 2007. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena*=subg. *Dolichospermum* - 1. part: coiled types. *Fottea* **7**: 1-31.
- Komárek, J. and E. Zapomêlová. 2008. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena*=subg. *Dolichospermum* - 2. part: straight types. *Fottea* **8**: 1-14.
- Lane, D., B. Pace, G.J. Olsen, D.A. Stahl, M.L. Sogin and N.R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **82**: 6955-6959.
- Li, Z., M.S. Han, S.O. Hwang, M.S. Byeon, S.J. Hwang and B.H. Kim. 2013. Molecular Identification of the Bloom-forming Cyanobacterium *Anabaena* from North Han River System in summer 2012. *Korean Journal of Ecology and Environment* **46**(2): 301-309.
- Lyra, C., S. Suomalainen, M. Gugger, C. Vezie, P. Sundman, L. Paulin and K. Sivonen. 2001. Molecular characterization of planktonic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 513-526.
- Ludwig, F., A. Medger, H. Börnick, M. Opitz, K. Lang, M. Göttfert and I. Röske. 2007. Identification and expression analyses of putative sesquiterpene synthase genes in *Phormidium* sp. and prevalence of *geoA*-like genes in a drinking water reservoir. *Applied Environmental Microbiology* **73**: 6988-6993.
- 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. *Applied Environmental Microbiology* **61**: 3875-3883.
- Nübel, U., F. Garcia-Pichel and G. Muzer. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology* **63**(8): 3327-3332.
- Nylander, J.A.A. 2004. Bayesian phylogenetics and the evolution of gall wasps. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, ISSN 1104-232X; 937
- 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.
- Su, M., V. Gaget, M. Burch, W. An and M. Yang. 2013. Establishment of quantitative PCR methods for the quantification of geosmin producing potential and *Anabaena* sp. in freshwater systems. *Water Research* **47**(10): 3444-3454.
- Tamura, K., G. Stecher, Peterson, A. Filipiski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.
- Tamura, K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**: 512-526.
- Thomazeau, S., A. Houdan-Fourmont, A. Couté, C. Duval, A. Couloux, F. Rousseau and C. Bernard. 2010. The contribution of sub-Saharan African strains to the phylogeny of cyanobacteria: focusing on the Nostacaceae (Nostocales, Cyanobacteria). *Journal of Phycology* **46**(3): 564-579.
- Tsao, H.W., A. Michinaka, H.-K. Yen, G. Steven, H. Peter, M. Paul and T.-F. Lin. 2014. Monitoring of Geosmin producing *Anabaena circinalis* using quantitative PCR. *Water Research* **49**: 416-425.
- Tsujimura, S. and T. Okubo. 2003. Development of *Anabaena* blooms in a small reservoir with dense sediment akinete

- population, with special reference to temperature and irradiance. *Journal of Plankton Research* **25**: 1059-1067.
- Wacklin, P., L. Hoffmann and J. Komárek. 2009. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea* **9**(1): 59-64.
- 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.
- Watson, S.B., M. Charlton, Y.R. Rao, T. Howell, J. Ridal, B. Brownlee, C. Marvin and S. Millard. 2007. Off flavours in large waterbodies: physics, chemistry and biology in synchrony. *Water Science and Technology* **55**: 1-8.
- Wilmotte, A. and S. Golubic. 1991. Morphological and genetic criteria in the taxonomy of cyanophyta/cyanobacteria. *Algological Studies* **64**: 1-24.
- 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.