

낙동강에서 분리된 *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanophyceae) 균주의 목표 유전자를 이용한 잠재적 독소 생성능 및 계통학적 분석

류희성 · 안성민¹ · 임창건² · 신라영 · 박종근³ · 이정호*

대구대학교 생물교육전공, ¹한국해양과학기술원, ²대구대학교 생명과학과, ³대구대학교 지구과학교육전공

Analysis of Potential Toxicogenicity and Phylogeny using Target Genes in *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanophyceae) Strains Isolated from the Nakdong River. Ryu, Hui-Seong (0000-0002-8850-3838), Sung-Min An¹ (0000-0002-9180-309X), Chang-Kun Lim² (0000-0002-1799-7818), Ra-Young Shin (0000-0001-8248-0463), Jong-Guen Park³ (0000-0003-2843-054X) and Jung-Ho Lee* (0000-0002-1426-4555) (Department of Biology Education, Daegu University; ¹Korean Institute of Ocean Science & Technology; ²Department of Biological Science, Daegu University; ³Department of Earth Science Education, Daegu University)

Abstract The identity of toxin producers remains only hypothesis unless there were identified by strain isolation and analytical confirmation of both the cyanotoxin production and the genetic identity of the monoculture. The purposes of this study were to identify a morphologic and phylogenetic classification in *Aphanizomenon flos-aquae* strains isolated from the Nakdong River and to investigate the potential ability of the strains to produce toxins such as saxitoxin and cylindrospermopsin using target genes. The 16S rRNA and *sxtA*, *sxtI*, *cyrA*, *cyrJ* genes were analyzed on two strains (DGUC001, DGUC003) isolated from the Nakdong River. Morphological features of the strains were observed a shape of aggregated trichomes in parallel fascicles which can reach up to macroscopic size and a hyaline terminal cell without aerotop. In addition, the 16S rRNA phylogenetic analyses showed that the strains were identified as the same species with high genetic similarity of 98.4% and grouped within a monospecific and supported cluster I of *Aphanizomenon flos-aquae* selected from GenBank of the NCBI. The *cyrA* and *cyrJ* genes encoding for the cylindrospermopsin-biosynthesis were not detected in the present study. The *sxtA* gene was in detected both the two strains, whereas the *sxtI* gene which had been suggested as a suitable molecular marker to detect saxitoxin-producing cyanobacteria was not found both the strains. Thus, the two strains isolated from Nakdong River were identified as the same species of *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet et Flahault 1888, the two strains were confirmed as potential non-producing strains of the saxitoxin and cylindrospermopsin.

Key words: cyanobacteria, cylindrospermopsin, saxitoxin, 16S rRNA, nostocales

서 론

Manuscript received 15 February 2017, revised 27 March 2017,
revision accepted 27 March 2017

* Corresponding author: Tel: +82-53-850-6994, Fax: +82-53-850-6979,
E-mail: jungho@daegu.ac.kr

*Aphanizomenon*속은 전 세계적으로 담수생태계에서 널리 분포하며, 과다 증식하여 유해한 수화현상 (Harmful

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

cyanobacterial bloom)을 빈번하게 발생시킨다(McDonald and Lehman, 2013). *Aphanizomenon*속의 의한 수화현상은 간독소(hepatotoxin)와 신경독소(anatoxin, aphantoxin, saxitoxin), 세포독소(cylindrospermopsin)와 같은 2차 대사 산물을 유발하여 인간과 동물에게 심각한 질환을 일으키고, 일부 경우에는 사망에 이르게 할 수 있다(KokoCiński, 2013; Zhang *et al.*, 2015). 세계적으로 많은 국가에서 *Aphanizomenon*속의 속하는 대부분의 분류군은 잠재적 독소 생성 분류군으로 간주되고 있으며(Brient *et al.*, 2009; Ballot *et al.*, 2010a; Casero *et al.*, 2014), 국내의 경우 아직까지 *Aphanizomenon*속의 독소에 의한 직접적인 피해사례는 없었으나, 모든 분류군을 유해남조류로 분류하고 있다(Park *et al.*, 2015).

*Aphanizomenon*속에서 생성되는 saxitoxin (STX)은 총 26개의 유전자로 암호화된 다효소 복합체에 의해 생합성되는 것으로 추정되며, cluster의 크기는 약 27.5 kb이다(Mihali *et al.*, 2009). 이 중 *sxtA* 유전자는 saxitoxin 생합성의 첫 번째 단계를 개시하는 폴리케티드(polyketide) 생합성을 암호화하며, 독소 생성 균주뿐만 아니라 모든 독소 비생성 균주에서도 발견된다(Ballot *et al.*, 2010b; Cirés *et al.*, 2014). 반면, *sxtI* 유전자는 saxitoxin 생합성 유전자 cluster 중 유일하게 STX 독소 생성능이 있는 균주에서만 발견되는 유전자이며, STX 독소 생성 가능성을 의미하는 특이적인 지표로 고려되어진다(Casero *et al.*, 2014). 세포독인 cylindrospermopsin (CYN)을 암호화하는 *cyr* cluster는 11개의 유전자로 구성되며, 약 39.7 kb가 포함되어 있다(Stüken and Jakobsen, 2010). 이 중 *cyrJ*와 *cyrA* 유전자는 CYN의 생성능을 식별하는 유전자로 사용되어 왔으며, 특히 황산기전달효소(sultotransferase)를 암호화하는 *cyrJ* 유전자가 독소 생성능이 있는 균주를 발견하는 가장 적합한 지표로서, 최근 연구까지 CYN 독소 생성능이 있는 균주에서만 발견되어왔다(Mihali *et al.*, 2008; Mazmouz *et al.*, 2010).

세계적으로 *Aphanizomenon*의 속에는 18개 이상의 분류군이 기재되어 있으며, 최근 형태학뿐만 아니라, 생태학, 계통분류학 등의 다양한 접근법을 이용한 연구에 의해 유전적 다양성과 생리생태학적 특징이 종 수준에서 다양하게 밝혀지고 있다(Rajaniemi *et al.*, 2005a, b; Ballot *et al.*, 2010b; Komárek, 2013; Zhang *et al.*, 2015). 대표적으로, *Aphanizomenon*속의 기준종(type species)인 *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet et Flahault 1888은 19세기 말 이후 남세균 독소(Cyanobacterial toxins)의 잠재적인 생산자로 빈번하게 보고되어왔다(Gentile and Maloney, 1969; Alam *et al.*, 1978; Mahmood

and Carmichael, 1986). 그러나 기존 연구에 사용된 균주들이 실제로는 형태적으로 유사한 *Aphanizomenon gracile* Lemmermann 1907 혹은 *Cuspidothrix issatschenkoii* (Usachev) Rajaniemi *et al.* 2005로 밝혀졌다(Li *et al.*, 2000, 2003; Preßel *et al.*, 2009; Cirés *et al.*, 2014). 이로 인해, Cirés and Ballot (2016)는 분리된 균주를 형태 및 계통학적으로 동정하고, 단일 배양을 통하여 독소의 생성여부와 그에 따른 유전학적 분석 과정이 검증되어야만 독소 생성 분류군으로 정의될 수 있다는 의견을 제시하였다. 이러한 과정을 통해 *Aphanizomenon*속의 분류군 중 *Aphanizomenon gracile*와 *Chrysochlorum ovalisporum* (Forti) E.Zapomelová, O.Skáclová, P.Pumann, R.Kopp & E.Janecek 2012, *C. issatschenkoii*가 독소 생성 분류군으로 확인되었으며(Ballot *et al.*, 2010a, b; Campo *et al.*, 2013), 그 밖의 분류군은 독소 생성 분류군으로 확정 이전의 추정상태로서 추가적인 연구가 진행되고 있다.

수자원 관리 측면에서 *Aphanizomenon*속의 속하는 분류군의 정확한 동정과 독소 생성능을 파악하는 것은 향후 이 분류군에 의한 수화현상 및 출현빈도의 증가 가능성을 고려할 때 필수적이라 할 수 있다(Yamamoto and Nakahara, 2009). 따라서 본 연구의 목적은 낙동강의 보구간을 중심으로 그 출현빈도와 횡수가 급증하고 있는 *Aphanizomenon flos-aquae*를 대상으로(Yu *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2015; Ryu *et al.*, 2016), 16S rRNA 염기서열을 이용하여 계통학적 위치를 확인하고, 남세균 독소인 saxitoxin (STX)과 cylindrospermopsin (CYN)의 잠재적 생성능력을 유전자 수준에서 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 채수 및 균주 분리

현장시료는 *Aphanizomenon*속이 우점하여 출현한 2016년 8월 낙동강 중하류 수역의 적포교 지점(N 35°31'40.88", E 128°21'36.16")과 2016년 10월 삼랑진교 지점(N 35°22'55.61", E 128°49'7.79")에서 표층수를 채수하여 이용하였으며, 채수된 시료는 균주의 분리를 위하여 실험실로 운반되었다. 현장시료 이외에 국립낙동강생물자원관 생물자원은행에서 보관 중인 *Aphanizomenon flos-aquae* 2개 균주(FBCC010006, FBCC010007)를 제공받았다.

현장시료로부터 *Aphanizomenon* 균주를 분리하기 위해, 도립 현미경(Leica DMi1, ×400) 하에서 파스퇴르 피펫을 사용하여 멸균된 CB 배지(Shirai *et al.*, 1989)가 담긴 well cell culture plate로 옮겨졌으며, 이 과정은 *Aphanizomenon*

Table 1. List of primers to amplify partial *sxt* and *cyr* genes, 16S.

Gene	Putative function	Primer	Sequence (5'-3')	Fragment length (bp)
16S rRNA		PA B23S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT	1393
<i>sxtA</i>	Polyketide Synthase	sxtAf sxtAr	GCGTACATCCAAGCTGGACTCG GTAGTCCAGCTAAGGCACTTGC	555
<i>sxtI</i>	Carbamoylation	sxtIf sxtIr	AGCGCTGCCGCTATGGTTGTCCG ACGCAATTGAGGGCGACACCAC	910
<i>cyrA</i>	Amidinotransferase	cylatF cylatR	ATTGTAAATAGCTGGAATGAGTGG TTAGGGAAGTAATCTTCACAG	1105
<i>cyrJ</i>	Sulfotransferase	cynsulF cynamR	ACTTCTCTCCTTCCCTATC GAGTGA AAAATGCGTAGA ACTTG	578

의 single trichome이 분리될 때까지 반복하여 수행하였다. 분리된 균주는 150 mL 배지가 담긴 250 mL Erlenmeyer flask에 담아 진탕배양기(Hanbaek, HB-201SLI)에서 다음 조건으로 배양되었다; 21°C의 온도, 80 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-1}$ 의 백열등 광조건(L : D = 12 h : 12 h). 배양된 균주는 광학현미경(Nikon ECLIPSE 80i)을 이용하여 정확한 동정을 실시하고 사진촬영 하였으며, 촬영된 사진은 이미지 분석 프로그램(NIS-Elements F 3.0 software)을 통해 세포의 길이와 크기를 분석하였다. 종의 형태적 분류는 Komárek and Komárková(2006)와 Komárek(2013)을 참고하였다.

2. DNA 추출 및 PCR 증폭

배양된 균주는 대수증식기(exponential growth phase)까지 유지되었으며, 원심분리하여 배양액과 균주를 분리하여 실험에 사용하였다(14,000 $\times g$, 1 min). DNA는 LaboPass™ Tissue Mini (Cosmogenetech, Korea)를 사용하여 추출하였다.

PCR 반응 용액의 조성은 1.0 μL 의 DNA template, 3 μL 의 10X TaKaRa Ex Taq buffer, 2.4 μL 의 dNTP(10 mM), 0.5 μL 의 primer(10 pmol), 0.2 μL 의 TaKaRa Ex Taq polymerase(5 Unit μL^{-1} , TaKaRa, Ohtsu, Japan)로 구성하였으며, 전체 용량이 30 μL 가 되도록 하였다. 16S rRNA는 primer PA(Edwards *et al.*, 1989)와 B23S(Lepère *et al.*, 2000)을 이용하여 증폭하였으며(Table 1), PCR 조건은 초기 변성단계인 94°C에서 5분간 1회 처리한 후 DNA 변성단계인 94°C에서 30초, primer 풀림단계인 50°C에서 30초, strand 신장 단계인 70°C에서 1분간 진행하여 총 30회 반복하였으며, 최종 신장 단계는 72°C에서 3분간 처리하였다.

3. 16S rRNA의 염기서열 분석

증폭된 16S rRNA의 PCR 산물은 Qiaquick PCR purification kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정

제된 PCR product는 PA, CYA359F(Nubel *et al.*, 1997), pFr(Edwards *et al.*, 1989), 16S1494R(Wilmotte *et al.*, 2002)의 primer를 이용하여 sequencing reaction을 수행하였으며, 염기서열 결정을 위해서 Macrogen(Seoul, Korea)에 분석을 의뢰하였다.

4. 16S rRNA의 계통학적 분석

계통학적 분석을 위하여 forward와 reverse 방향의 각 염기서열들은 Vector NTI Advance 11(Invitrogen Corp., USA)로 조합하였다. 분류학적 위치를 확인하기 위하여, 유전자은행 NCBI(National Center for Biotechnology Information, USA)의 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)를 이용하여 1,000 bp 이상의 염기서열이 등록된 분류군을 선별하였다. 정렬된 염기서열은 MEGA 5.2(Tamura *et al.*, 2011)를 이용하여 Maximum likelihood(ML)와 Maximum parsimony(MP), Neighbor-joining(NJ) 방법으로 계통수를 작성하였고, 염기치환 모델은 Tamura-Nei와 Subtree-pruning-regrafting(SPR) algorithm, Maximum composite Likelihood이 각각 사용되었다. 각 분계도의 지지 정도를 알아보기 위해 1,000회 반복하여 bootstrap을 산출하였다. Outgroup로는 Chroococcales에 속하는 *Microcystis aeruginosa*(Accession no.: AB035549)가 사용되었다.

5. 목표유전자(target gene)를 이용한 독소 생성능(toxigenicity) 분석

Saxitoxin 독소의 생합성을 암호화하는 *sxt* 유전자 cluster는 최근 *Aphanizomenon gracile* strain NH5 뿐만 아니라, *Dolichospermum circinale*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Raphidiopsis brookii*, *Lyngbya wollei*의 균주에서도 확인된다(Kellmann *et al.*, 2008; Mihali *et al.*, 2009, 2011; Stucken *et al.*, 2010). *Aph. gracile* strain NH-5에서 saxi-

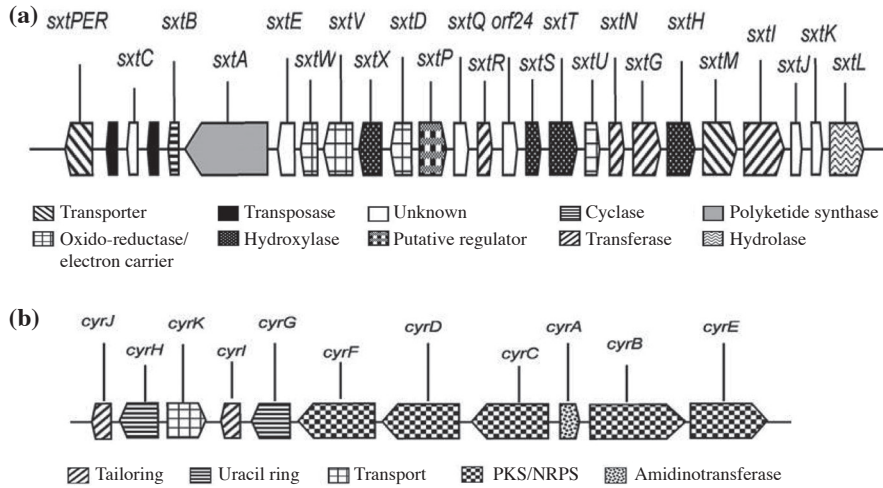


Fig. 1. (a) Saxitoxin biosynthesis (*sxt* gene) cluster of *Aphanizomenon* sp. strain NH-5 (after Mihali *et al.*, 2009). (b) cylindrospermopsin biosynthesis (*cyr* gene) cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6 (after Stüken and Jakobsen, 2010). Putative enzyme functions are included.

toxin 암호화 유전자 cluster의 크기는 약 27.5 kb로 구성되어 있으며, 유전자 cluster는 26개 유전자로 구성되어 있다 (Fig. 1a). Cylindrospermopsin 암호화 *cyr* 유전자 cluster는 *Aphanizomenon* sp. 균주 10E6에서 분석되었으며, 총 11개의 *cyr* 유전자의 약 39.7 kb로 구성되어 있다. *cyr* 유전자 cluster는 3구역에 배치되어 있는데, 첫 번째 구역은 amidinotransferase, nonribosomal peptide/polyketide synthase, polyketide synthase를 각각 암호화하는 *cyrA*, *cyrB*, *cyrE*를 포함하며, 정방향으로 전사된다. 두 번째 구역은 *cyrC*를 포함하며, 역방향으로 전사되고, 세 번째 구역은 *cyrD-cyrK*를 포함한다 (Stuken and Jakobsen, 2010) (Fig. 1b).

목표유전자 하나를 이용한 분석보다 두 가지 이상의 목표유전자를 사용하는 방법은 완전한 유전자 cluster를 파악하고, 균주가 가지고 있는 독소 생성능 유전자형 (toxigenic genotype)을 검증하는 데 보다 신뢰할 수 있는 결과를 도출할 수 있다 (Kokociński *et al.*, 2013). 본 연구에서는 독소 생성능을 파악할 수 있는 목표유전자를 *sxtA*, *sxtI*, *cyrA*, *cyrJ* 등 총 4개를 선별하였으며, 목표유전자 증폭을 위한 primer의 경우 *sxtA* 유전자는 Ballot *et al.* (2010b)을, *sxtI* 유전자는 Casero *et al.* (2014), *cyrA* 유전자는 Stüken & Jakobsen (2010), *cyrJ* 유전자는 Mihali *et al.* (2008)을 각각 참고하여 설계하였다 (Table 1). PCR 증폭 조건은 *sxtA*가 94°C에서 4분간 처리한 후, 94°C 10초, 55°C 20초, 72°C 1분을 30회 반복한 뒤, 72°C에서 1분간 처리하였고, *sxtI*가 94°C에서 4분간 처리한 후, 94°C 10초, 55°C 20초, 72°C 1분을 30회 반복한 뒤, 72°C에서 3분간 처리하였으며, *cyrA*

는 95°C에서 5분간 처리한 후, 95°C 30초, 62°C 1분, 72°C 1분을 40회 반복한 뒤, 72°C에서 7분간 처리하였다. *cyrJ* 유전자의 증폭조건은 94°C에서 3분간 처리한 후, 94°C 10초, 57°C 20초, 72°C 1분을 30회 반복한 뒤, 72°C에서 7분간 처리하였다.

결과 및 고찰

1. 형태적 특징

현장시료에서 분리된 균주의 자원 번호 (strain number)는 DGUC001과 DGUC003으로, 국립낙동강생물자원관 생물자원은행에서 제공한 균주의 자원 번호는 FBCC010006과 FBCC010007로 각각 구분되었다 (Table 2).

DGUC001과 DGUC003는 육안으로 관찰 가능한 크기의 다발 (fascicles)을 형성하였으며, 세포사 (trichome)가 병렬 형태로 나열되어 최대 길이가 1.5 cm까지 관찰되었다 (Fig. 2a). 단일 세포사 (trichome)는 직선이거나 약간 휘어진 형태이며, 비대칭 (subsymmetric) 구조를 가지고 있었다. 영양 세포 (vegetative cell)는 원통형으로 4~12.1×3.6~5.6 μm이며, 세포사의 양쪽 끝에 위치한 말단 세포 (terminal cell)는 최대 18.3 μm로 관찰되었으며, 거의 투명하거나 긴 끈 형태의 세포질이 존재하였다. 이형세포 (heterocyte)는 단독으로 관찰되었으며, 원통형으로 6.6~7.8×4.2~5.1 μm의 크기로 관찰되었다. 아키네트 (akinet)는 영양 세포 사이에 위치하고 있고, 긴 원통형

Table 2. Diacritical morphological characteristics of four strains isolated in Nakdong River or offered from Nakdonggang National Institute of Biological Resources.

Strain no.	Species name	Morphological characteristics				
		Fascicles trichomes	Terminal cells	Vegetative cells	Heterocytes	Akinetes
DGUC001, DGUC003	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Band-like, up to 2 cm long, straight or bent, often grouped in fascicles	Elongated cylindrical, not narrowed, without aerotopes, almost hyaline	Cylindrical to slightly barrel-shaped, 4.0~12.1 × 3.6~5.6 μm	Intercalary, solitary, cylindrical 6.6~8.5 × 3.3~3.9 μm	Intercalary, long cylindrical, distant from heterocytes, 30~62 × 5.2~7.5 μm
FBCC010006	<i>Cylindrospermum</i> sp.	Mat macroscopic, flexuous, constricted cross-walls	-	Cylindrical to slightly barrel-shaped, isodiametric, 3.8~4.2 × 4.0~4.4 μm	Elongated, oval or ovoid (conical), 6.2~7.9 × 4.1~5.0 μm	-
FBCC010007	<i>Geitlerinema amphibium</i>	Large and thin mat, bright to deep blue-green, straight and slightly flexuous, uncontracted cross-walls, motile	Not attenuated at the ends, apical cell rounded	Cell contents pale blue-green with granules on either or both side of cross-walls. 2.3~9.8 × 1.0~2.9 μm	-	-

으로 30~62 × 5.2~7.5 μm이며, 컵 모양의 초(cup-shaped sheath)를 형성하지 않았다(Fig. 2b). 현장시료에서 분리한 DGUC001과 DGUC003은 다발의 형태, 말단 세포의 구조 등을 통하여 형태적으로 *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet et Flahault 1888로 동정되었다(Komárek and Komáková, 2006; Komárek, 2013; Ryu *et al.*, 2017).

FBCC010006은 갈색을 띠고 있었으며, 육안으로 관찰 가능한 매트(mat)를 형성하였다. 세포사(trichome)는 탄력성 있게 휘어지는 형태로 나타났으며, 세포 격벽(cross wall) 부분이 잘록하게 구분되었다. 술통 혹은 원통형의 세포(cell)로 3.8~4.2 × 4.0~4.4 μm의 크기의 등직경이었다. 이형세포(heterocyte)는 오직 세포사(trichome)의 양 쪽 말단의 위치하여 대칭(symmetric) 구조를 이루며, 끝이 둥근 원통형 또는 원뿔형 세포로 나타났다. 크기는 6.2~7.9 × 4.1~5.0 μm에 해당하였다. 국립낙동강생물자원관 생물자원은행에서 분양받은 *Aphanizomenon flos-aquae* (FBCC010006)는 이형세포의 위치와 세포사의 구조에 따른 형태적 분석결과, *Cylindrospermum* sp.로 동정되었지만, 배양균주의 특성상 아키네트(akinete)를 형성하지 않아 정확한 종 수준의 동정은 불가하였다(Komárek, 2013). FBCC010007은 청록색을 띠고 있으며, 넓고 얇은 매트(mat)를 형성하였다. 세포사(trichome)가 일직선 혹은 약간 구부러진 형태로 정단부분(ends)에 가늘어짐이 없었고, 격벽(cross-wall)의 잘록함도 없었다. 또한, 운동성이 있어 현미경 관찰 중에 움직임이 보였다. 세포는 2.3~9.8 × 1.0~2.9 μm의 크기로 매우 가늘고 길며, 세포 격벽 부근에 과립(granule)을 가지고 있었다(Fig. 2c). 정단세포(apical cell)는 둥글고, 때로 미세하게 구부러졌다. 국립낙동강생물자원관 생물자원은행에서 분양받은 *Aphanizomenon flos-aquae* (FBCC010007)는 세포사의 형태, 과립(granule)의 형성, 아키네트(akinete) 및 이형세포의 미발달 등에 따른 형태적 분석결과, *Geitlerinema amphibium* (C. Agardh ex Gomont) Anagnostidis 1989로 동정되었다(Komárek, 2013).

2. 염기서열 및 계통학적 특징

낙동강 현장시료에서 분리된 균주의 16S rRNA를 정렬하여 분석한 결과, 전체 구간의 길이는 DGUC001과 DGUC003이 각각 1,569와 1,541 bp로 획득되었으며, 획득된 염기서열은 최종 1,303 bp로 정렬되었다. 염기 조성의 평균은 A가 26.2%, T가 18.5%, G가 30.9%, C가 22.5%였으며, DNA의 구조 및 물리적 특성을 결정하는 G+C의 함량은 전체적으로 약 53.4%로 산출되었다. Kimura's

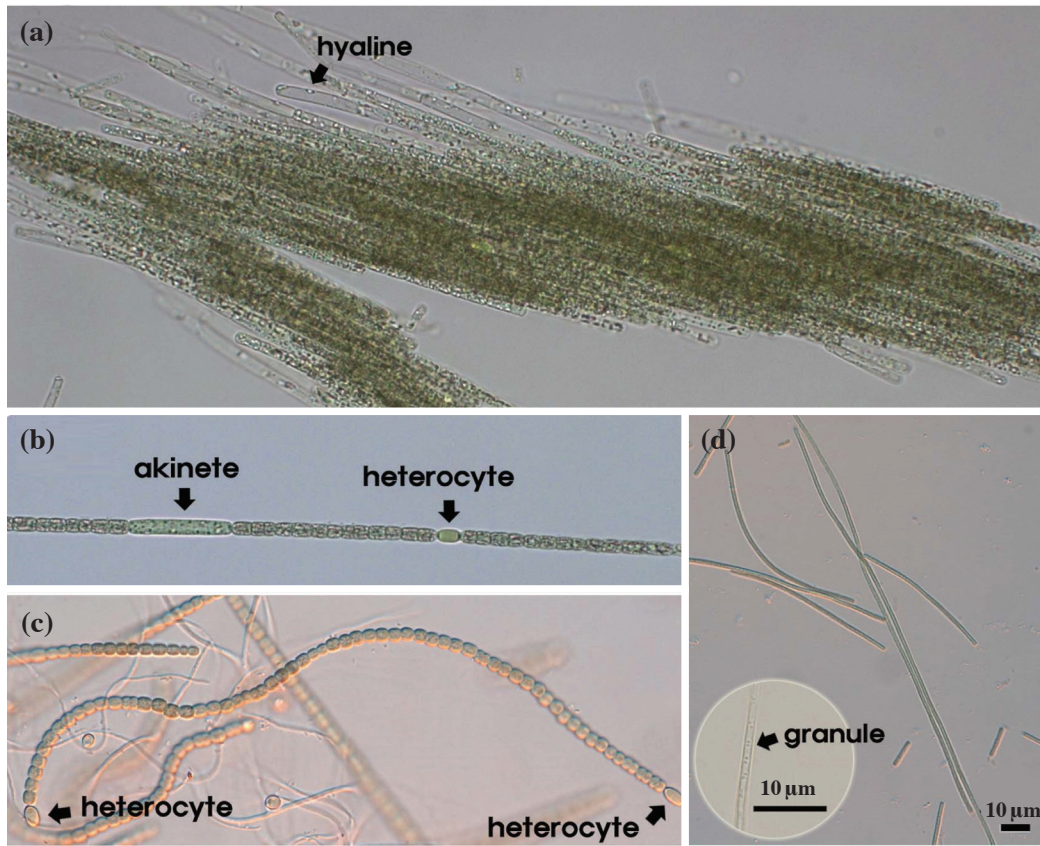


Fig. 2. Photographs of strains isolated in Nakdong River (a, b) and offered from Nakdonggang National Institute of Biological Resources (c, d); (a) fascicles of *Aphanizomenon flos-aquae*, (b) trichome of *Aphanizomenon flos-aquae*, (c) trichome of *Cylandrospermum* sp. (d) filaments of *Geitlerinema amphibium*.

two parameter model을 이용한 각 분류군 간 유전적 거리 (Pairwise distance)는 Cluster I의 15개체 염기변이가 외군을 포함하여 0~0.196으로 나타났고, 외군을 제외한 15개체의 염기변이는 0~0.012로 낮게 나타났다.

낙동강 현장시료에서 분리된 두 개의 균주는 98.4%의 유전적 유사도를 나타내어 계통분류학적으로 동일종으로 판단하였고, 유전자은행에서 선별한 Cluster I의 *Aphanizomenon flos-aquae*에 대하여 98~99%의 유전적 유사도를 나타내었다. 16S rRNA를 이용한 종 분리의 유전적 유사도 임계값에 대한 최근 연구들에 따르면, 98% 수준을 기준으로 제시하고 있다(Kim *et al.*, 2014). 따라서 낙동강 현장시료에서 분리된 두 개의 균주는 계통분류학적으로 동일종인 *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet et Flahault 1888로 동정되었다. 동정된 두 개 균주의 유전자 정보는 유전자은행 NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)에 등록되었으며, KY327795, KY327796의 Accession no.를 각각 부여받았다.

16S rRNA를 이용한 유전자계통분석을 통해 *Aphanizo-*

*menon*속의 분류군은 크게 5개의 cluster로 구분되었으며, 이 중 cluster 1~3의 구분은 비교적 낮은 bootstrap value에 의해 지지되었다. cluster I과 III에는 형태학 및 계통학적으로 검증된 *Aphanizomenon flos-aquae*와 *Aphanizomenon gracile*이 해당되었으나 (Cirés *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015), Cluster II는 분류가 불분명한 *Aphanizomenon flos-aquae*/*gracile* 혹은 *Aphanizomenon* sp.의 균주들이 주로 포함되었다 (Cirés and Ballot, 2016). 전통적으로 두 종의 형태적 분류는 다발 (fascicle)의 형성과 아키네트 (akinetes)의 부착지 (appendice) 존재가 중요한 분류형질이 되지만 (Komárek, 2013), 물리적 교란에 의해 쉽게 분리되는 다발 (fascicle)의 특성과 아키네트 (akinetes)의 낮은 형성율로 인해 분류가 쉽지 않은 것으로 알려져 있다 (Cirés and Ballot, 2016; Ryu *et al.*, 2017). 이로 인하여 기존에 *Aphanizomenon flos-aquae*로 보고된 일부 균주들은 *Aphanizomenon gracile*로 재분류되었거나 (Accession no.: AY196086) (Li *et al.*, 2000, 2003), 재분류가 검토되고 있다 (Accession no.: AF317632, HE975010, AJ293131) (Cirés

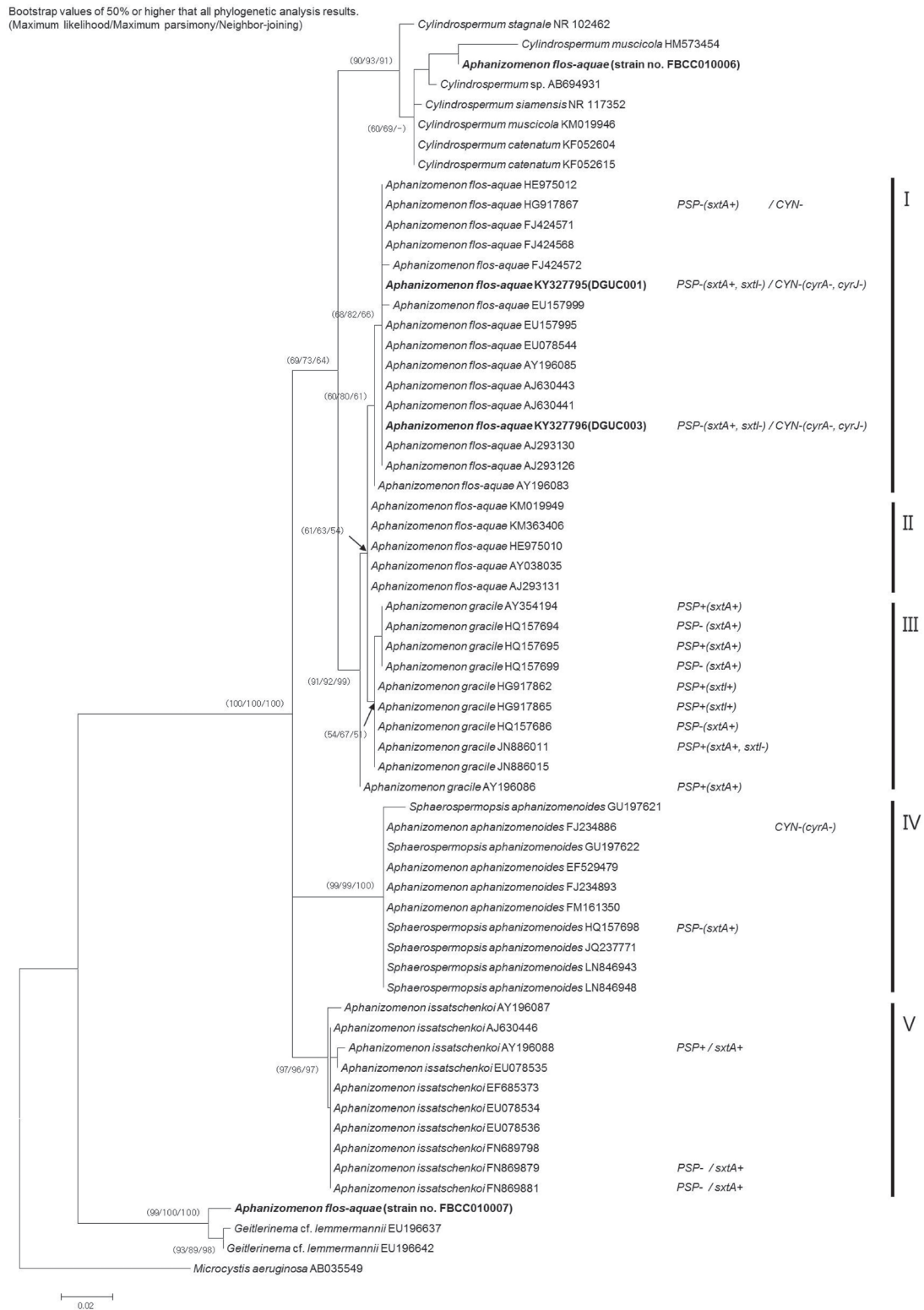


Fig. 3. Phylogenetic relationships of *Aphanizomenon* spp. inferred using Maximum likelihood, Maximum parsimony and Neighbor-joining analysis. The tree was based on Maximum likelihood tree. The analysis was based on partial 16S rRNA sequences. Strains of this study are marked bold. Scale bar indicates 2% sequence divergence. PSP + (CYN +) and PSP - (CYN -) denote PSP (CYN)-toxin producing and non-producing strains, respectively. *sxtA* + denotes strains in which *sxtA* gene has been amplified.

Table 3. Characteristic of cyanotoxins produced by *Aphanizomenon* spp. strains. Modified from Cirés *et al.*, 2014.

Cyanotoxin group	Toxic effect in mammals	Chemical analogues	Production by <i>Aphanizomenon</i> spp.			
			AFAQ	AGRC	CISA	SAPH
Anatoxins	Neurotoxins	Anatoxin-a	? ¹		○	
Cylindrospermopsins	Cytotoxins	Cylindrospermopsin	? ² /X	○		
Microcystins	Hepatotoxins	Putative MC-LA	?			? ⁴
		Putative MC-LY	?			? ⁴
		Putative MC-LW	?			? ⁴
PSP toxins	Neurotoxins	Saxitoxin	? ³ /X	○	○	
		Neosaxitoxin	? ³	○	○	
		Decarbamoylsaxitoxin	? ³	○	○	

Only the production confirmed in isolated strains is included. The symbol '?' stands for toxin-producing strains whose species identification remains unclear. ¹anatoxin-a-producing *Aphanizomenon* sp. (strain 3) (Rapala *et al.*, 1993), ²cylindrospermopsin-producing *Aphanizomenon* sp. (*flos-aquae/fragile*) (Preussel *et al.*, 2006; Stüken *et al.*, 2009; Preussel *et al.*, 2014), ³paralytic shellfish poisoning toxin-producing *Aphanizomenon flos-aquae/Aphanizomenon* sp. NH-5 (Mahmood and Carmichael, 1986) reclassified as *Aph. fragile* by subsequent studies (Li *et al.*, 2000), ⁴*Sphaerospermopsis aphanizomenoides* for which only morphological but not phylogenetic data are available (Sabour *et al.*, 2005). The symbol 'X' stands for isolated strains in which target genes has been not amplified from this study. Abbreviations: AFAQ: *Aphanizomenon flos-aquae*, AGRC: *Aphanizomenon gracile*, CISA: *Cuspidothrix issatschenkoi*, SAPH: *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*; PSP: paralytic shellfish poisoning.

and Ballot, 2016).

한편, 낙동강생물자원관 생물자원은행에서 제공받은 *Aphanizomenon flos-aquae* (FBCC010006, FBCC010007) 균주의 16S rRNA를 정렬하여 분석한 결과, 전체 구간의 길이는 각각 1,500와 1,562 bp로 획득되었으며, 두 개의 균주는 89%의 유전적 유사도를 나타내었다. FBCC010006은 유전자은행의 BLAST 분석을 통해 *Cylindrospermum*속의 분류군과 95~97%의 상동성을 보였고, 계통분석에서도 90~93%의 bootstrap value로 *Cylindrospermum* cluster로의 분지가 지지되었다. FBCC010007은 *Geitlerinema*속의 분류군과 97~98%의 상동성을 보였고, 계통분석에서도 99~100%의 bootstrap value로 지지되었다(Fig. 3).

3. 잠재적 독소 생성능(toxigenicity) 분석

독소 생성 분류군의 정의는 분리된 균주에 의해 동정되어야 하고, 단일배양에 따른 독소 유무와 유전적 검토 확인이 필수적이다(Cirés and Ballot, 2016). 이러한 개념에 의해 정의된 *Aphanizomenon flos-aquae*의 독소 생성능은 아직 논쟁의 여지가 있다(Table 3).

낙동강에서 분리된 균주들의 세포독소(cylindrospermopsin)와 신경독소(saxitoxin)의 잠재적 독소 생성능을 확인하기 위하여 사용된 독소 생합성 유전자 중, cylindrospermopsin 생합성에 관여하는 *cyrA*와 *cyrJ* 유전자는 어떠한 조건에서도 증폭이 되지 않았다. 한편, saxitoxin 생합성에 관여하는 유전자 중 *sxtA*는 DGUC001와 DGUC003에서 각각 534 bp와 524 bp로 증폭되었으며, 522 bp로 정렬되었다(Table 4). 정렬된 목표유전자(target gene)의 염기서열을 NCBI 유전자은행에서 BLAST한 결

과, *Aphanizomenon flos-aquae* (Accession no.: FN552399) 및 *Aphanizomenon gracile* (Accession no.: JN837670, FN552392)의 *sxtA* 유전자와 100%의 상동성을 보여 *sxtA* 유전자가 DGUC001과 DGUC003에서 증폭되었음을 최종적으로 확인하였다. 한편, 독소 생성여부를 결정하는 분자생물학적 지표로서 사용된 *sxtI* 유전자는 어떠한 조건에서도 증폭되지 않았다. 이를 통하여 낙동강에서 분리된 균주들은 cylindrospermopsin과 saxitoxin의 생합성 여부를 결정하는 목표유전자(target gene)인 *sxtI*, *cyrJ*를 가지고 있지 않은 것으로 확인되었다.

saxitoxin 생합성 과정에서 가장 먼저 발현되는 *sxtA* 유전자는 *Aphanizomenon* spp.에서 독소 생합성 유전자로 가장 광범위하게 조사되었으며, PSP 독소 생성 균주뿐만 아니라, 모든 비독성 분류군(*Aphanizomenon gracile*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cuspidothrix issatschenkoi*, *Chryso-sporium ovalisporum*, *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*)의 균주에서도 발견되었다. 이러한 발견으로 인하여 saxitoxin 생성 균주를 확인하기 위한 분자생물학적 지표로서 *sxtA* 유전자는 사용될 수 없었으나(Ballot *et al.*, 2010b; Ledreux *et al.*, 2010), *sxtA* 유전자의 존재를 통하여 수계 내에서 독소 생성 균주와 독소 비생성 균주의 공존 가능성을 추정할 수 있었다(Moustafa *et al.*, 2009). 전체 *sxt* 유전자 집단 중 *sxtI* 유전자를 제외한 *sxtA*, *sxtG*, *sxtH*, *sxtX* 유전자들은 독소 비생성 균주인 *Aphanizomenon flos-aquae* strain NIVA-CYA 689와 *Aphanizomenon gracile* NH-5에서도 동일하게 발견되었다(Ballot *et al.*, 2010b; Casero *et al.*, 2014; Cires *et al.*, 2014). 이러한 발견은 *sxtI* 유전자만이 saxitoxin을 생성하는 *Aphanizomenon* spp.를 검출할 수 있는 특이적인 지표로서 사용될 수 있음을 의미하였다.

Table 4. DNA sequences of saxitoxin biosynthesizing gene (*sxtA*) in *Aphanizomenon flos-aquae* isolated from Nakdong River. Sequence direction is 5' to 3'.

Target gene	Strain no.	Sequence
<i>sxtA</i>	DGUC001	ACTTTTAGGCGTACCTGATGTTTTAGTATTTCCATCTGTAACGCTGCTTCAGATAGGA GTGTTACCGCTATTAACCTGGGAGTAATGGTGTCAATTTGGGTGACATAGCTGCACAT CGTTGTATTTATGAAGCGTGCTGTCTGGCGCAGCAAAAAGGATCCCAGTTCATCCA ATATCGACATAACGATTTGAACGATTTAGCCGAAAAGCTAGCAAAAATATCCGCTTGA GCAAGTAAAGATTATTGTCAATTTGATGGCGTGTATTCCATGTCTGGCAGATTTTCCCG ATCTGCCAGCTTACGTGCGTCTGGCAAAAAGAGTACAATGCTTTTCATTTACATGGGA TGATGCACATGGTTTTGGCATTTTGGGCGAAAATCCCAGCAGCGATATGCCTTAC GGGTATAAAGGAAACGGGATGGTGAATTACTTTGACCTGCAGTTTGCAGAGGAT AATATCATCTATGTCGCCGTTTTGTCCAAAGCCTATTCTTCTATGCAGCATTCTT AACTTGTGGCGATCGCCAAATCAAAACCAA
	DGUC003	AAACTTTTAGGCGTACCTGATGTTTTAGTATTTCCATCTGTAACGCTGCTTCAGATA GGAGTGTTACCGCTATTAACCTGGGAGTAATGGTGTCAATTTGGGTGACATAGCTGC ACATCGTTGTATTTATGAAGCGTGCTGTCTGGCGCAGCAAAAAGGATCCCAGTTCA TCCAATATCGACATAACGATTTGAACGATTTAGCCGAAAAGCTAGCAAAAATATCCG CTTGAGCAAGTAAAGATTATTGTCAATTTGATGGCGTGTATTCCATGTCTGGCAGATTTT CCCGATCTGCCAGCTTACGTGCGTCTGGCAAAAAGAGTACAATGCTTTTCATTTACATG GATGATGCACATGGTTTTGGCATTTTGGGCGAAAATCCCAGCAGCGATATGCCTTAC GGGTATAAAGGAAACGGGATGGTGAATTACTTTGACCTGCAGTTTGCAGAGGATAA TATCATCTATGTCGCCGTTTTGTCCAAAGCCTATTCTTCTATGCAGCATTCTTAACTT GTGGCGATCGCCA

미국 Klamath 호는 *Aphanizomenon flos-aquae*에 의한 녹조현상이 빈번하게 발생하는 수역으로, 신경독소 물질의 검출은 한 번도 보고되지 않았다(Carmichael *et al.*, 2000). 또한 독일 Sechlin호에서 분리된 *Aphanizomenon flos-aquae*의 균주를 이용한 독소 생성능 분석 실험에서는 해당 균주 (Accession no.: FN552398, FN552399, FN552400, FN552401)들이 cylindrospermopsin과 saxitoxin, anatoxin-a의 독소물질을 생성하지 않는 비독성 균주로 확인되었다(Ballot *et al.*, 2010b). 최근 본 연구팀은 낙동강 수계에서 출현하는 *Aphanizomenon flos-aquae* 분리 균주의 독소 생성성을 ELISA 방법을 통해 확인하였으며, 그 결과 다양한 환경조건에서 성장된 조체와 배양액에서 saxitoxin과 cylindrospermopsin이 생성되지 않음을 확인하였다(미발표 자료). 따라서 *Aphanizomenon flos-aquae*의 독소 생성능 및 독소 분류군으로의 분류는 보다 면밀하고 추가적인 검토가 필요할 것으로 판단되었다.

적 요

독소 생성 분류군의 정의는 분리균주에 의해서 동정되고, 단일배양에 의한 독소 생성 여부 및 유전적 검토가 확인된 분류군을 의미한다. 이러한 관점에서 *Aphanizomenon flos-aquae*의 독소 생성능은 세계적으로 아직 논쟁의 여

지가 있다. 본 연구는 낙동강에서 분리한 *Aphanizomenon flos-aquae* (DGUC001, DGUC003)을 대상으로 16S rRNA 염기서열을 이용하여 계통학적 위치를 확인하고, 남세균 독소인 saxitoxin (STX)과 cylindrospermopsin (CYN)의 잠재적 생성능력을 유전자 수준에서 검토하였다. 연구에 사용된 균주는 2016년 8월과 2016년 10월에 낙동강 본류구간의 하천수에서 분리되었다. 계통학적 분석에는 16S rRNA가 사용되었으며, 독소 생성 유전자는 CYN과 STX 생합성에 관여하는 *cyrA*, *cyrJ*, *sxtA*, *sxtI* 유전자가 선택되었다. 분리된 균주 DGUC001과 DGUC003은 육안으로 관찰 가능한 크기의 다발(fascicles)을 형성하였으며, 세포사(trichome)가 병렬 형태로 나열되고, 세포사의 양쪽 끝에 위치한 말단 세포(terminal cell)가 거의 투명하거나 긴 끈 형태의 세포질을 가지고 있었다. 또한, 두 개의 균주는 98.4%의 유전적 유사도를 나타내어 동일종으로 판단되었고, 유전자 은행에서 선별한 Cluster I의 *Aph. flos-aquae* strains과도 계통수에서 66~82%의 bootstrap value의 지지도로 단일 cluster에 포함되었다. 확보된 두 개 균주의 유전자 정보는 유전자은행 NCBI에 등록되었으며, KY327795, KY327796의 Accession no.를 부여받았다. 한편, 세포독소 CYN의 생합성에 관여하는 유전자 *cyrA*와 *cyrJ*는 두 개 균주 모두에서 확인되지 않았다. STX의 생합성을 담당하는 유전자 중 *sxtA* 유전자는 두 개의 균주에서 확보되었으며, 독소 생합성 과정의 분자생물학적 지표 역할을 하는 *sxtI* 유전

자는 발견되지 않았다. 따라서 낙동강 현장시료에서 분리된 두 개의 균주는 형태학적 및 계통분류학적으로 동일종인 *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet et Flahault 1888로 동정되었으며, 두 개의 균주는 CYN과 STX의 잠재적인 독소 비생성 균주로 확인되었다. 이 결과를 통하여 *Aph. flos-aquae*가 독소 생성 분류군으로 분류되는 것에 대한 보다 면밀한 검토가 필요할 것으로 판단되었다.

사 사

본 연구는 2014학년도 대구대학교 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Alam, M., Y. Shimizu, M. Ikawa and J.J. Sasner. 1978. Reinvestigation of toxins from blue-green-alga, *Aphanizomenon flos-aquae*, by a high-performance chromatographic method. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. **13**(7): 493-499.
- Ballot, A., J. Fastner, M. Lentz and C. Wiedner. 2010a. First report of anatoxin-a-producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in Northeastern Germany. *Toxicon* **56**(6): 964-971.
- Ballot, A., J. Fastner and C. Wiedner. 2010b. Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(4): 1173-1180.
- Brient, L., M. Lengronne, M. Bormans and J. Fastner. 2009. First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France. *Environmental Toxicology* **24**(4): 415-420.
- Campo, E., R. Agha, S. Cirés, A. Quesada and R. El-Shehawy. 2013. First TaqMan assay to identify and quantify the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* in water. *Advances in Microbiology* **3**(5): 430-437.
- Carmichael, W.W., C. Drapeau, D.M. Anderson. 2000. Harvesting of *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born & Flah. var. *flos-aquae* (cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use. *Journal of Applied Phycology* **2**(6): 585-595.
- Casero, M.C., A. Ballot, R. Agha, A. Quesada and S. Cirés. 2014. Characterization of saxitoxin production and release and phylogeny of *sxt* genes in paralytic shellfish poisoning toxin-producing *Aphanizomenon gracile*. *Harmful Algae* **37**: 28-37.
- Cirés, S. and A. Ballot. 2016. A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming *Aphanizomenon* spp. and related species within the Nostocales (Cyanobacteria). *Harmful Algae* **52**: 21-43.
- Cirés, S., L. Wörmer, A. Ballot, R. Agha, C. Wiedner, D. Velázquez, M.C. Casero and A. Quesada. 2014. Phylogeography of cylindrospermopsin and paralytic shellfish toxin-producing Nostocales cyanobacteria from Mediterranean Europe (Spain). *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 1359-1370.
- Edwards, U.T.R., H. Blöcker, M. Emde and E.C. Böttger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* **17**: 7843-7853.
- Gentile, J.H. and T.E. Maloney. 1969. Toxicity and environmental requirements of a strain of *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. *Can. Journal of Microbiology* **15**(2): 165-173.
- Kim, M., H.S. Oh, S.C. Park and J. Chun. 2014. Toward 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**(Pt 2): 346-351.
- KokoCiński, M., J. Mankiewicz-Boczek, T. Jurczak, L. Spoo, J. Meriluoto, E. Rejmonczyk, H. Hautala, M. Vehniäinen, J. Pawelczyk and J. Soininen. 2013. *Aphanizomenon gracile* (Nostocales), a cylindrospermopsin-producing cyanobacterium in Polish lakes. *Environmental Science and Pollution Research* **20**: 5243-5264.
- Komárek, J. 2013. Cyanoprokaryota 3. Teil/3rd part: Heterocytous Genera. pp. 1-1131. In: B. Bübel, G. Gärtner, L. Krienitz and M. Schagerl (eds.), Süßwasser flora von Mitteleuropa, 19/3. *Springer Spektrum*.
- Komárek, J. and J. Komárková. 2006. Diversity of *Aphanizomenon*-like cyanobacteria. *Czech Phycology, Olomouc* **6**: 1-32.
- Ledreux, A., S. Thomazeau, A. Catherine, C. Duval, C. Yéprémian, A. Marie and C. Bernard. 2010. Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. *Harmful Algae* **10**: 88-97.
- Lepère, C., A. Wilmotte and B. Meyer. 2000. Molecular diversity of *Microcystis* strains (cyanophyceae, chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Systematics and Geography of Plants* **70**: 275-283.
- Li, R., W.W. Carmichael and P. Pereira. 2003. Morphological and 16S rRNA gene evidence for reclassification of the paralytic shellfish toxin producing *Aphanizomenon flos-aquae* LMECYA31 as *Aphanizomenon issatschenkoi* (cyanophyceae). *Journal of Phycology* **39**(4): 814-818.
- Li, R., W.W. Carmichael, Y. Liu and M.W. Watanabe. 2000. Taxonomic re-evaluation of *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 based on morphology and 16S rRNA gene sequences. *Hydrobiologia* **438**: 99-105.
- Mahmood, N.A. and W.W. Carmichael. 1986. Paralytic shellfish

- poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon* **24**(2): 175-186.
- Mazmouz, R., F. Chapuis-Hugon, S. Mann, V. Pichon, A. Mejean and O. Ploux. 2010. Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicyclindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: Identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(15): 4943-4949.
- McDonald, K.E. and J.T. Lehman. 2013. Dynamics of *Aphanizomenon* and *Microcystis* (cyanobacteria) during experimental manipulation of an urban impoundment. *Lake Reservoir Management* **29**(2): 272-276.
- Mihali, T.K., R. Kellmann and B.A. Neilan. 2009. Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. *BMC Biochemistry* **10**(1): 8.
- Mihali, T.K., R. Kellmann, J. Muenchhoff, K.D. Barrow and B.A. Neilan. 2008. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 716-722.
- Moustafa, A., J.E. Loram, J.D. Hackett, D.M. Anderson, F.G. Plumley and D. Bhattacharya. 2009. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. *PLoS ONE* **4**(6): e5758.
- Nübel, U., F. Garciapichel and G. Muyzer. 1997. PCR primers *Ti* amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8): 3327-3332.
- Park, H.K., R.Y. Shin, H.J. Lee, K.L. Lee and S.U. Cheon. 2015. Spatio-temporal characteristics of cyanobacterial communities in the middle-downstream of Nakdong River and Lake Dukdong. *Journal of Korean Society on Water Environment* **31**(3): 286-294. (in Korean)
- Preßel, K., G. Wessel, J. Fastner and I. Chorus. 2009. Response of cylindrospermopsin production and release in *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) to varying light and temperature conditions. *Harmful Algae* **8**: 645-650.
- Preussel, K., A. Stüken, C. Wiedner, I. Chorus and J. Fastner. 2006. First report on cylindrospermopsin-producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* **47**(2): 156-162.
- Preussel, K., I. Chorus and J. Fastner. 2014. Nitrogen limitation promotes accumulation and suppresses release of cylindrospermopsins in cells of *Aphanizomenon* sp. *Toxins* **6**(10): 2932-2947.
- Rajaniemi, P., P. Hrouzek, K. Kaštovská, R. Willame, A. Rantala, L. Hoffmann, J. Komárek and K. Sivonen. 2005a. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (nostocales, cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 11-26.
- Rajaniemi, P., J. Komárek, R. Willame, P. Hrouzek, K. Kastovská, L. Hoffmann and K. Sivonen. 2005b. Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotypic evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. *Algological Studies* **117**: 371-391.
- Rapala, J., K. Sivonen, R. Luukkainen and S.I. Niemela. 1993. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non toxic *Anabaena* strains a laboratory study. *Journal of Applied Phycology* **5**(6): 581-591.
- Ryu, H.S., H.K. Park, H.J. Lee, R.Y. Shin and S.U. Cheon. 2016. Occurrence and succession pattern of cyanobacteria in the upper region of the Nakdong River: Factors influencing *Aphanizomenon* bloom. *Journal of Korean Society on Water Environment* **32**(1): 52-59. (in Korean)
- Sabour, B., M. Loudiki, B. Oudra, V. Vasconcelos, S. Oubraim and B. Fawzi. 2005. Dynamics and toxicity of *Anabaena aphanizomenoides* (cyanobacteria) water-blooms in the shallow Brackish OuedMellah lake (Morocco). *Aquatic Ecosystem Health and Management* **8**(1): 95-104.
- Shirai, M., K. Matumaru, A. Ohotake, Y. Takamura, T. Aida and M. Nakano. 1989. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (cyanobacteria). *Applied and Environmental Microbiology* **55**(10): 2569-2571.
- Stüken, A. and K.S. Jakobsen. 2010. The cylindrospermopsin-gene cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6: Organization and recombination. *Microbiology* **156**: 2438-2451.
- Stüken, A., R.J. Campbell, A. Quesada, A. Sukenik, P.K. Dadheech and C. Wiedner. 2009. Genetic and morphologic characterization of four putative cylindrospermopsin producing species of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *Journal of Plankton Research* **31**(5): 465-480.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA 5: Molecular evolution genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**(10): 2731-2739.
- Wilmotte, A., C. Demonceae, A. Goffart, J.H. Hecq, V. Demoin and A.C. Crossley. 2002. Molecular and pigment studies of the picophytoplankton in a region of the Southern Ocean (42-54 degrees S. 141-144 degrees E) in March 1998. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **49**(16): 3351-3363.
- Yu, J.J., H.J. Lee, K.L. Lee, H.S. Lyu, J.H. Hwang, L.Y. Shin and S.U. Chen. 2014. Relations between distribution of the dominant phytoplankton species and water temperature in the Nakdong River, Korea. *Korean Journal of Ecology and Environment* **47**(4): 247-257. (in Korean)
- Zhang, D., S.Y. Liu, J. Zhang, C.X. Hu, D.H. Li and Y.D. Liu. 2015. Antioxidative responses in zebrafish liver exposed to sublethal doses *Aphanizomenon flos-aquae* DC-1 aphanotoxins. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **113**: 425-432.