

Original article

DNA 메타바코딩을 이용한 광양만 및 어시장 해양 생물 위 내용물 분석

오건희¹ · 김용준¹ · 김원석¹ · 홍 철¹ · 지창우² · 곽인실^{1,2,*}

¹전남대학교 해양융합과학과, ²전남대학교 수산과학연구소

Analysis of Stomach Contents of Marine Organisms in Gwangyang Bay and Yeosu Fish Market Using DNA Metabarcoding. Gun Hee Oh¹ (0000-0001-6089-7292), Yong Jun Kim¹ (0000-0001-6217-1559), Won-Seok Kim¹ (0000-0003-3368-3891), Cheol Hong¹ (0000-0002-5444-7743), Chang Woo Ji² (0000-0001-6133-9399) and In-Sil Kwak^{1,2,*} (0000-0002-1010-3965) (¹Department of Ocean Integrated Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; ²Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea)

Abstract Gut contents analysis is essential to predict the impact of organisms on food source changes due to variations of the habitat environment. Previous studies of gut content analysis have been conducted using traditional methods, such as visual observation. However, these studies are limited in analyzing food sources because of the digestive process in gut organ. DNA metabarcoding analysis is a useful method to analyze food sources by supplementing these limitations. We sampled marine fish of *Pennahia argentata*, *Larimichthys polyactis*, *Crangon affinis*, *Loligo beka* and *Sepia officinalis* from Gwangyang Bay and Yeosu fisheries market for analyzing gut contents by applying DNA metabarcoding analysis. 18S rRNA v9 primer was used for analyzing food source by DNA metabarcoding. Network and two-way clustering analyses characterized the relationship between organisms and food sources. As a result of comparing metabarcoding of gut contents for *P. argentata* between sampled from Gwangyang Bay and the fisheries market, fish and Copepoda were analyzed as common food sources. In addition, Decapoda and Copepoda were analyzed as common food sources for *L. polyactis* and *C. affinis*, respectively. Copepoda was analyzed as the primary food source for *L. beka* and *S. officinalis*. These study results demonstrated that gut contents analysis using DNA metabarcoding reflects diverse and detailed information of biological food sources in the aquatic environment. In addition, it will be possible to provide biological information in the gut to identify key food sources by applying it to the research on the food web in the ecosystem.

Key words: gut contents, DNA metabarcoding, 18S rRNA, feeding, fish

서 론

섭식은 생태계에 서식하는 생물의 영양분을 얻는 과정

일 뿐 아니라, 다른 생물과의 경쟁 및 공생, 포식 등과 연관된다(Ji *et al.*, 2021). 특히 포식 활동은 군집 구조에 직접적인 영향을 주고받는 중요한 요소로 그와 관련된 먹이원 연구는 군집 내에서 생물 간의 영향을 파악할 수 있고, 서식지와 환경 변화에 따른 먹이원 변화가 생물에 주는 동향을 파악할 수 있기에 중요하다(Carreon-Martinez and Heath, 2010). 어류는 해양 생태계 내 고차 소비자로서 생물학 및

Manuscript received 2 December 2022, revised 14 December 2022, revision accepted 14 December 2022

* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148, Fax: +82-61-653-6620
E-mail: inkwak@hotmail.com, iskwak@chonnam.ac.kr

© 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.

생태학적으로 다양한 연구가 이루어지고 있지만, 어류 먹이원 연구는 현장에서 시료 채집의 어려움과 보관 등의 문제로 다른 연구 주제에 비해 희소하다(Ji *et al.*, 2020). 국내의 어류 데이터베이스 구축 연구(Kim *et al.*, 2011b; Jung *et al.*, 2014)에서도 어류의 먹이원 정보는 섭식 길드와 같이 짧게 서술하거나 없는 경우도 많으며 국외 어류 데이터베이스 FishBase' (<http://www.fishbase.in>)에도 형태 및 생태 정보에 비해 먹이원 정보는 비율(%)로 짧게 언급하는 것이 대부분이다. 따라서 해양생태계의 먹이망과 관련된 연구를 위해서는 어류와 같은 상위 소비자인 먹이원 연구 정보가 필요하다.

우리나라 어류는 4강 45목 223과 724속 1,291종(National Institute of Biological Resources (NIBR) 2019)이 보고되어 있다. 이 중 담수 어류는 기수종을 포함하여 216종이 알려져 있으며 해양 어류는 1,075종(Lee *et al.*, 2018)이 알려져 있다. 하지만 먹이원이 보고된 어류는 1969년 풀망둑(*Acanthogobius hasta*)부터 현재까지 총 120편이 보고되었고, 해외 연구에서도 어류의 먹이원 연구는 1938년에 갈색송어 이외 약 200여 종이 보고(Kim, 2017)되어 있어 전체 어류에 비해 먹이원 정보가 보고된 종수는 아직 많지 않다. 한편 과거의 식성연구는 대부분 현미경을 이용한 위 내용물의 형태적인 분석을 통해 이루어졌기 때문에 위 내용물에 대한 형태적 확인은 소화과정에서 소실되는 동정키와 연구자 숙련도에 따라 먹이원 파악에 제한점이 많았다(Ji *et al.*, 2020). 아울러 식물플랑크톤과 동물플랑크톤 같은 미세 먹이원은 육안으로 식별이 힘들고, 종 동정에 있어서 전문 지식을 가지고 있지 않다면 오동정을 할 수도 있다. 이와 같이 위 내용물에 대한 먹이 구성 요소를 직접적으로 파악하는 데 어려움이 있기 때문에 최근 분자적 기술을 이용한 먹이원 파악에 대한 다양한 시도가 진행되고 있다(Na *et al.*, 2020; Heo *et al.*, 2021).

DNA 메타바코딩(DNA-metabarcoding)은 먹이원 연구에 새로운 접근법으로서 다양한 수서생물을 대상으로 시도되고 있다. 남극 수심 1,000m에서 서식하는 Myctophids는 요각류(Copepoda)와 같은 크기가 작은 먹이원을 섭식하여 정확한 먹이원 파악이 쉽지 않아 DNA 메타바코딩을 이용하여 먹이원을 분석한 결과 크릴류에 속하는 *Thysanoessa macrura*와 *Euphausia superba*가 가장 많이 섭식한 먹이원으로 밝혀졌다(Clarke *et al.*, 2020). 국내 연구에서도 살오징어(*Todarodes pacificus*)와 갯장어(*Muraenesox cinereus*), 문치가자미(*Pleuronectes yokohamae*)의 위 내용물을 DNA 메타바코딩을 이용하여 분석하였다(Kim, 2017). 과거 문헌 자료에서는 살오징어의 주요 먹이원이 어류(Pisces), 갑각류(Crustacea), 연체동물

(Mollusca)로 알려져 있는데, DNA 메타바코딩 분석 결과 살오징어의 위 내용물이 멸치, 꼼치, 자주새우류, 등가시치류 등으로 나타나 문헌자료와 유사하였다(Kim, 2017). 또한 연안에 서식하는 갯장어에서는 저서생물을, 외해에서 사는 갯장어는 어류를 주로 섭식하는 것을 확인하여 서식처에 따른 먹이원 이질성도 확인할 수 있었다(Kim, 2017). 위의 사례를 종합해 보면 DNA 메타바코딩은 앞서 지적한 어류의 위 내용물 육안 확인에 대한 어려움을 넘어서 정확한 먹이원 정보를 제공하고 있다.

본 연구에서는 최근 주목받고 있는 DNA 메타바코딩을 이용하여 어류의 정확하고 다양한 먹이원을 분석하고자 하였다. 이를 위해 광양만에서 보구치(*Pennahia argentata*)와 참조기(*Larimichthys polyactis*), 자주새우(*Crangon affinis*), 꼴뚜기(*Loliginidae beka*)를 채집하여 위 내용물에 대한 DNA 메타바코딩을 수행하였다. DNA 메타바코딩에서 얻은 먹이원 정보를 이용하여 채집 및 구입한 수산물의 섭식생태도 분석하였다. 섭식생태 해석을 위해 Levin niche breadth 이용한 각 어류의 먹이원 다양성을 분석하였고, 네트워크 분석을 이용하여 어류와 먹이원 섭식관계를 비교하였다. 아울러 본 연구의 결과와 다른 먹이원 연구와의 비교 검증을 위하여 영양단계(Trophic level) 분석을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 위 내용물 샘플 확보 및 DNA 메타바코딩

위 내용물 분석을 위해 2020년 5월 광양만에서 새우조망(망폭 1.5×0.5 m, 망목 10 mm)을 이용하여 수서생물을 채집하였다. 채집한 수서생물은 참조기와 보구치, 자주새우, 꼴뚜기 4종으로 현장에서 위를 적출하여 15 mL conical tube에 80% ethanol로 보관하였다. 채집한 생물 종과 비교 분석을 위해 여수 어시장에서 동일 생물 종을 구입하여 위 내용물을 적출하였다. 여수 어시장에서 구입한 생물 종은 참조기와 보구치, 자주새우는 동일한 어종을 구입하였으나 꼴뚜기는 같은 두족류인 갑오징어를 구입하여 위를 적출하였다. 구입한 어종은 당일 조업하여 입항하는 어선의 생물로 새벽에 위관장에서 구입하였다.

DNA 추출 전 위 조직 내용물에 대한 오염을 방지하기 위해, 1X PBS (Phosphate-buffered saline)를 이용하여 위를 세척하였다. 위 내용물은 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 관련 프로토콜에 따라 genomic DNA 추출하고 Microplate reader (Thermo Fisher, USA)을 이용하여 DNA 정량을 진행하

였다. 어류 위 내용물을 탐지하기 위해 진핵생물 파악을 위해 사용하는 18S rRNA V9 (1380F-1510R) 프라이머 (Forward: 5'-CCCTGCCHTTTGTACACAC-3'와 Reverse: 5'-CCTTCYGCAGGTTACCTAC-3')를 이용하여 PCR 분석을 진행하였다 (Amaral-Zettler *et al.*, 2009). 18S rRNA V9 프라이머는 진핵생물을 확인할 수 있는 범위가 넓다는 장점이 있다 (Heo *et al.*, 2021).

PCR 진행은 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 이용하였으며, PCR 조건은 94°C 3분간 초기 진행 후 94°C에서 30초 변성, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초간 합성 과정을 30회 진행한 후 72°C에서 10분 진행하였다. PCR 산물은 1.5% Agarose gel 전기영동을 이용하여 시각화로 확인하였으며, Qubit (Invitrogen, USA)을 이용하여 DNA 농도를 확인하였다. 라이브러리 제작은 Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, USA)를 이용하여 2차 PCR을 수행하였다. NGS (Next Generation Sequencing) 분석으로는 iSeq100 (Illumina, USA)을 통해 시퀀싱을 진행하였다. 시퀀싱된 데이터는 Qiime2 파이프라인 (Bolyen *et al.*, 2019)을 이용하여 ASV (Amplicon sequence variant) 산출하였으며, 레퍼런스 데이터 베이스로 NCBI nt 데이터 베이스 (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov>)를 이용하여 97% 일치도로 분석하였다. PCR 과정에서 위 내용물과 함께 포식 어류의 DNA도 증폭되기 때문에, 포식 어류와 같은 목의 ASV 빈도 값은 삭제 후 분석하였다.

2. 섭식상태 분석

DNA 메타바코딩 분석을 통해 추출된 위 내용물의 ASV 빈도 정보를 이용하여 먹이원의 상대빈도 분석 및 다양성 분석, 영양단계 분석, 네트워크 분석, 계층적 군집 분석을 수행하였다. 먹이원 상대빈도 분석은 채집 및 구입한 각 생물의 위 내용물 DNA ASV 빈도 정보를 활용하였으며, 먹이원 다양성 분석은 섭식폭 지수 (Dietary breadth index, Bi)를 계산하였다. 섭식폭 지수는 레빈 표준 생태지위 폭 (Levin's standardized niche breadth) (Levins, 1968)을 이용하여 구하였으며, 다음의 식을 통해 계산할 수 있다.

$$\hat{B}_A = \frac{\hat{B} - 1}{n - 1}$$

여기서 \hat{B}_A 는 레빈 표준 생태지위 폭이며 생태지위 폭의 레빈 측정 (Levin's measure of niche breadth, $\hat{B}_A = 1/\sum \hat{p}_j^2$)를 이용하여 구한다. 이때, P_j 는 먹이원 j 를 섭식할 확률이며 n 은 전체 먹이원 종수 또는 종류의 수를 나타낸다. 계산된 지수 값이 1에 가까울 경우 다양한 먹이원을 먹은 생물

을 나타내고 0이면 한 종류의 먹이만 먹는 것으로 해석할 수 있다.

영양단계 (trophic level, TL_K) 분석은 Cortés (1999)의 식을 이용하였다.

$$TL_K = 1 + \left(\sum_{j=1}^n P_j \times TL_j \right)$$

TL_j 는 먹이생물 분류군 j 의 영양 단계이며, Pauly and Christensen (1995), Sanger (1987), Hobson and Welch (1992), Hobson *et al.* (1994), Hobson (1993)를 참고하여 먹이원의 영양단계 평균값을 사용하였다. P_j 는 먹이생물 분류군 j 가 차지하는 확률을 나타낸다.

섭식한 수서 생물과 먹이원과의 관계를 유추하기 위하여 계층적 군집 분석 (Dray and Legendre 2008)과 네트워크 분석을 수행하였다 (Csardi and Nepusz, 2006; Bae and Park, 2019). 계층적 군집 분석은 Bray-Curtis 거리 (Beals, 1984)를 구한 후 Ward 연결법 (Ward Jr, 1963)을 이용하여 먹이원의 유사성에 따라 섭식한 생물을 그룹화하였다. 네트워크 분석은 먹이원과 생물을 정점 (node)으로, 먹이원과 생물의 관계를 연결선 (link)으로 네트워크를 구성하였다. 네트워크에서 연결선의 굵기 (width)는 각 생물과 해당 먹이원 간 섭식 비율을 의미한다. 계층적 군집 분석과 네트워크 분석은 먹이원을 분류군으로 묶어 표준화하여 입력 자료로 활용하였다. 네트워크 분석과 계층적 군집 분석은 R (ver. 4.1.2; <https://www.r-project.org>) 프로그램을 이용하였으며 네트워크 분석은 igraph (Csardi and Nepusz, 2006) 패키지를 이용하였으며, 계층적 군집 분석은 vegan 패키지 (Oksanen *et al.*, 2019)를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 18S rRNA V9을 이용한 위 내용물 분석

DNA 메타바코딩을 이용한 채집 및 구입한 5종의 먹이원은 6문 (phylum), 8강 (class), 14목 (order), 23과 (family), 24속 (genus), 25종 (species)이 분석되었다. 광양만에서 채집한 보구치 (PSP1)의 먹이원은 단각류 (Amphipoda)가 62.5%, 어류 (Fish)가 28.3%, 십각류 (Decapoda)가 6.4%, 올챙이새우류 (Cumacea)가 1.5%, 요각류 (Copepoda) 1.3%를 섭식하는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 하지만 어시장에서 구입한 보구치 (PYM)의 먹이원은 어류 (Fish)가 82.3%, 요각류 (Copepoda)는 16.6%, 곤쟁이류 (Mysida)는 1.1% 섭식하는 것으로 나타났다. 이 중 두 어류의 공통 먹이원

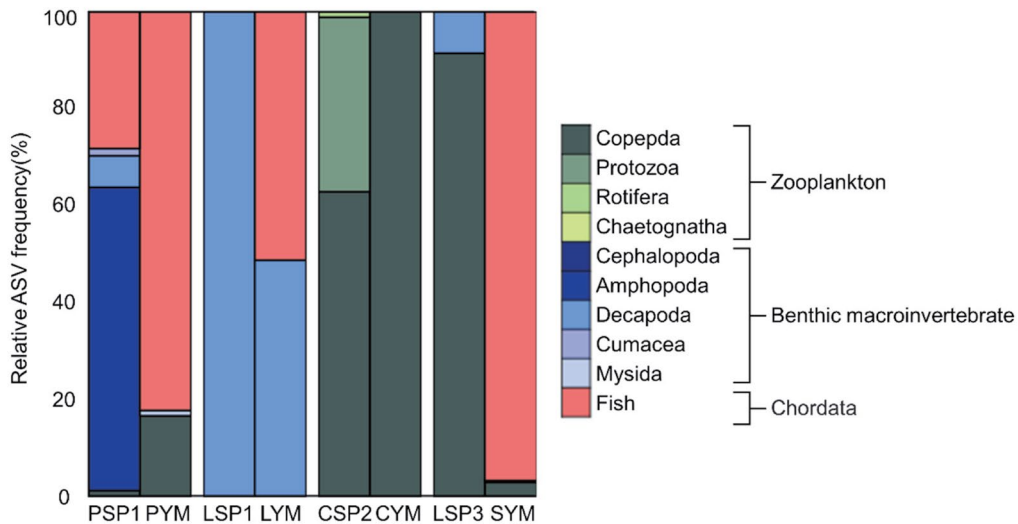


Fig. 1. The relative abundance of food source taxon in the 8 marine species. The abbreviations can be seen in Table 1.

Table 1. Information of the survey area location with survey sample.

	Code	Latitude	Longitude	Specific name	Total length (cm)
Gwangyang bay	PSP1	N 34°54'42"	E 127°48'18"	<i>Pennahia argentata</i>	13.52
	LSP1			<i>Larimichthys polyactis</i>	13.8
	CSP2	N 34°51'33"	E 127°47'28"	<i>Crangon affinis</i>	6.04
	LSP3	N 34°47'2"	E 127°46'7"	<i>Loliginidae beka</i>	12.28
Market	PYM	N 34°73'4"	E 127°43'43"	<i>Pennahia argentata</i>	13.52
	LYM			<i>Larimichthys polyactis</i>	18.42
	CYM			<i>Crangon affinis</i>	7.84
	SYM			<i>Loliginidae beka</i>	27.7

은 요각류로 나타났다. 광양만에서 채집한 참조기(LSP1)의 먹이원은 단각류가 99.9%, 윤충류(Rotifera)가 0.1%로 조사되었지만, 어시장에서 구입한 참조기(LYM)는 어류가 51.2%, 십각류가 48.8%로 나타나 채집한 어류와 구입한 어류의 먹이원의 차이가 있었다. 광양만에서 채집한 자주새우(CSP2)는 요각류(92.6%)가 주 먹이원으로 조사되었으나 어시장에서 구입한 자주새우(CYM)는 위 내용물에서 요각류(100%)만 검출되어 채집한 자주새우와 구입한 자주새우의 먹이원이 거의 일치하였다. 광양만에서 채집한 꼴뚜기(LSP3)의 먹이원은 요각류(91.4%)와 일부 십각류(8.6%)가 검출되었으며, 어시장에서 구입한 갑오징어(SYM)의 위 내용물은 어류가 96.6%로 조사되어 두 두족류의 먹이원이 차이가 있었다. 동일한 생물의 위 내용물을 조사한 보구치와 참조기, 자주새우의 경우 위 내용물 비율은 다소 차이가 있었지만 주요 먹이원의 목록은 채집 및

구입한 어종에서 유사하였다(Fig. 1). 예를 들어 보구치의 경우, 비율은 차이가 있었지만 어류와 절지동물류가 두 개체에서 공통적으로 출현하였고, 자주새우의 경우에는 요각류가 주요 먹이원으로 유사하였다. 하지만 꼴뚜기와 달리 갑오징어는 육식성 두족류(Kim, 2017)로 섭식 길드의 차이로 인해 위 내용물의 구성에 큰 차이를 보였다. 위 내용물은 계절적, 공간적 변화에 따라 변이가 있는 것으로 알려져 있다(Ji *et al.*, 2020). 추후 연구에서는 반복구를 늘려 이러한 오차를 줄일 필요가 있을 것으로 판단된다.

계층적 군집 분석 결과 올챙이새우목류와 단각류는 보구치(PSP1)이 다른 생물에 비해 섭식 비율이 높았고, 십각류는 참조기(LSP1)이, 어류와 화살벌레류는 갑오징어(SYM)가 다른 생물에 비해 섭식 비율이 높았다(Fig. 2). 또한 원생생물과 요각류, 윤충류는 자주새우(CSP2)의 섭식률이 높았고 보구치(PYM)가 다른 생물에 비해 곤쟁이

류를 섭식하는 비율이 높은 것으로 나타났다. 꼴뚜기 및 채집된 자주새우와 구입한 자주새우는 먹이원이 유사하여 같은 그룹으로 묶이는 경향성이 있었다. 채집 및 구매한 보구치와 참조기, 갑오징어는 앞서 꼴뚜기와 자주새우와 먹이원이 다소 차이가 있어 별도의 그룹으로 묶인 것을 확인하였다.

본 연구 조사의 결과를 검증하기 위해 과거의 먹이원 연구 결과와 비교하였다(Table 2). 문헌에 보고된 보구치의 위 내용물은 십각류가 65.1%, 갑각류가 27.1%, 다모류가 7.1% 순으로 나타났다. 하지만 DNA 메타바코딩을 이용한 본 연구에서는 어류가 67.2% 단각류가 17.4%, 요각류가 12.4%, 십각류가 1.8%, 곤쟁이류가 0.8%, 올챙이새우목류가 0.4%로 나타나 과거의 조사 결과와 다소 차이를 보였다. 두 가지 방법에서 보구치는 절지동물류를 공통적으로 섭식하였으나 척추동물인 어류를 섭식하는 등의 이질성이 있는 것으로 조사되었다. 참조기는 조사 방법에 따라 비율이 차이가 있었지만 절지동물류와 어류를 주로 섭식한 것으로 나타났다. 육안으로 확인된 자주새우의 주요 먹이원은 갑각류와 다모류, 십각류로 조사되었으나 DNA 메타바코딩으로 조사된 자주새우의 먹이원은 요각류가 대부분이었다. 꼴뚜기와 갑오징어는 과거 먹이원이 보고된 연구가 적어 먹이원의 양적 정보가 부족하여 비교하지 않았다. 본 조사의 DNA 메타바코딩을 통해 조사된 먹이원 정보와 과거의 문헌 자료의 먹이원 정보를 고찰해보면, 어류의 섭식 유무와 같은 차이도 있었으며 절지동물과 같은 공통된 먹이원도 있으나 양적인 차이도 보였다. 또한 채집한 보구치와 참조기의 경우에도 섭식한 먹이원의 양적인 차이를 보였다. 따라서 수서생물의 정확한 먹이원 정보를 확보하기 위해서는 조사 시기 및 장소 등을 고려한 반복 조사가 필요할 것으로 판단된다.

2. 먹이원 정보에 따른 섭식생태 분석

채집 및 구입한 포식 생물과 섭식한 먹이원의 정보를 이용하여 네트워크 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. 요각류는 참조기를 제외한 모든 생물이 포식한 것으로 나타났다. 이는 요각류가 해양 생물내에 중요한 먹이원 역할을 하는 것으로 생각되며 다른 연구에서도 요각류가 보구치를 비롯한 다양한 해양 생물의 중요한 먹이원인 것으로 보고되었다(Cha and Park, 2001; Lee et al., 2010). 자주새우의 경우 요각류가 주요 먹이원으로 강하게 연결되고 특히 시장에서 구입한 자주새우(CYM)의 경우에는 요각류만 섭식한 것으로 조사되었다. 어류는 보구치(PSP1, PYM)와, 참조기(LYM)가 많이 섭식한 것으로 조사되었다. 특히 보구치와

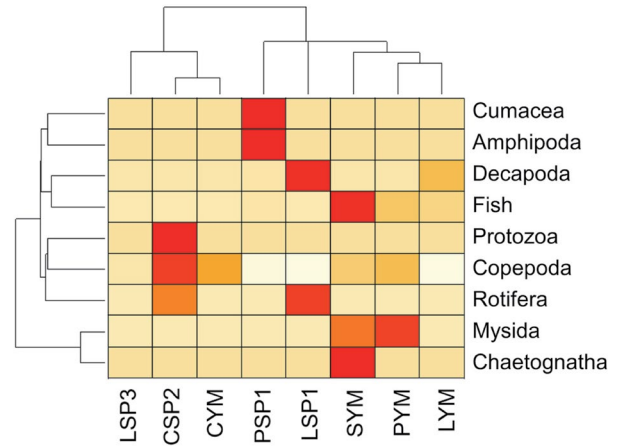


Fig. 2. Hierarchical clustering of 8 marine organisms according to the food sources and cluster distance. The abbreviations can be seen in Table 1.

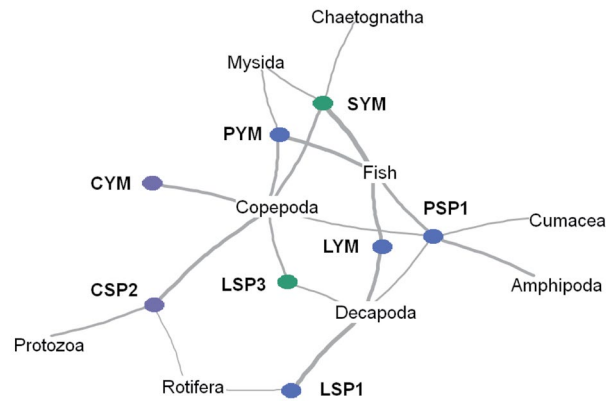


Fig. 3. Network analysis of food source in the marine organisms. In network nodes and link appear group between organisms and food sources. The abbreviations can be seen in Table 1.

참조기 같은 농어목은 먹이원을 한 입에 삼켜 먹는 섭식방법을 가지고 있고(Huh et al., 2018), 어류가 다른 먹이원에 비해 크기와 근육이 발달해 있어 소화과정에서 시간이 걸려 위 내용물 분석 시 높은 값을 가지는 것으로 추측된다(Clarke et al., 2020).

DNA 메타바코딩을 통해 확인한 해양생물 내 먹이원 다양성을 확인하기 위해 먹이원 폭(Bi)을 분석하였다(Fig. 4). 보구치는 정점에서 잡은 개체(PSP1)가 0.28의 Bi 지수 값을 보이며 어시장에서 구입한 보구치(PYM)에 비해 상대적으로 조금 높은 값이 나타났다. 참조기는 다른 생물 종과는 다르게 어시장에서 구입한 참조기(LYM)가 0.89를 보이며 전체 생물 그룹에서 가장 높은 먹이원 폭을 보였다. 자주새우는 광양만에서 채집된 자주새우(CSP2)에서

0.08값을 보였으며, 어시장에서 구입한 자주새우(CYM)에서는 먹이원 폭 값이 0으로 나타났다. 두족류인 꼴뚜기(LSP3), 갑오징어(SYM)를 대상으로 관찰한 먹이원 폭에서는 꼴뚜기가 0.19, 갑오징어가 0.02로 갑오징어에 비해 꼴뚜기가 상대적으로 높은 먹이원 폭을 보였다.

영양단계 분석 결과 (Fig. 5) 보구치의 영양단계는 채집

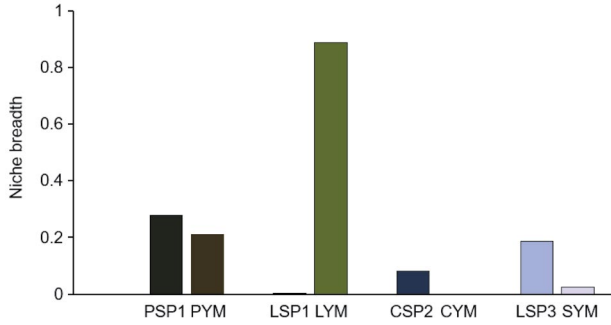


Fig. 4. Levin's niche breadth index of 8 marine organisms for comparison to field and fish market. The abbreviations can be seen in Table 1.

한 보구치는 2.0, 구입한 보구치는 3.2로 평균 2.6이 나왔고, 참조기는 2.6±0.4, 자주새우는 2.7±0.2, 꼴뚜기는 2.6, 갑오징어는 3.9의 값이 나왔다. 앞서 영양단계를 분석한 문헌에서는 농어목(Perciformes)이 3.46의 값을 가지는데 (Romanuk *et al.*, 2010), 평균 2.6을 가지는 보구치와 참조기와는 약 0.8의 차이를 가진다. 이는 문헌에서 최대 체장이 35.6 cm인 것에 비해 본 조사의 보구치와 참조기의 길

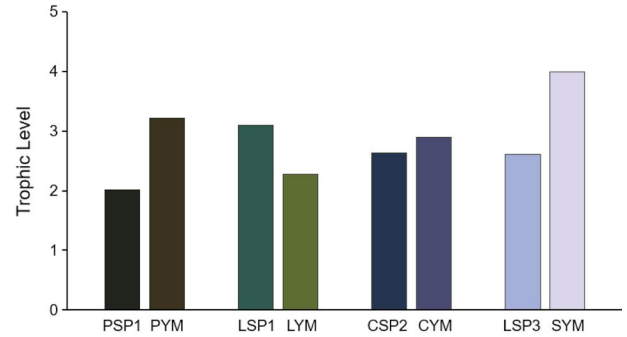


Fig. 5. Comparison of trophic level between field and fish market. The abbreviations can be seen in Table 1.

Table 2. Comparison of food sources contents in bibliographic data.

Species	Method	Food source	%
<i>Pennahia argentata</i>	Microscope (Huh <i>et al.</i> , 2018)	Decapoda	65.1
		Crustacea	27.1
		Polychaeta	7.1
	DNA metabarcoding (this study)	Fish	67.2
		Amphipoda	17.4
		Copepoda	12.4
<i>Larimichthys polyactis</i>	Microscope (Kang <i>et al.</i> , 2022)	Decapoda	1.8
		Mysida	0.8
		Cumacea	0.4
	DNA metabarcoding (this study)	Fish	46.5
		Crustacea	31.3
		Decapoda	21.4
<i>Crangon affinis</i>	Microscope (Hong <i>et al.</i> , 1989)	Decapoda	88.8
		Fish	11.1
		Rotifera	0.1
	DNA metabarcoding (this study)	Crustacea	32.6
		Polychaeta	15.2
		Decapoda	10.9
DNA metabarcoding (this study)	Copepoda	95.2	
	Protozoa	4.7	
	Rotifera	0.1	

이는 절반 수준에 미치지 못해 섭식할 수 있는 먹이원이 제한되어 영양단계에서 차이를 가지는 것으로 사료된다. 문헌(Cortés, 1999)에서 조사된 새우류와 갑각류의 영양단계는 2.52로 나타나는데, 본 조사의 자주새우 영양단계도 평균 2.7 ± 0.2 로 비슷한 값을 보였다. 두족류 중, 오징어와 문어는 3.2의 값이 나왔는데(Cortés, 1999), 본 조사의 꼴뚜기는 2.9로 다소 낮았다. 이는 오징어와 문어의 크기에 비해 꼴뚜기의 크기가 작아 섭식하는 먹이원의 차이에 의해 영양단계가 낮게 나온 것으로 판단된다. 반면에 갑오징어의 경우, 3.9로 나와 다른 두족류에 비해 높은 값을 보였다. 본 연구(Fig. 2)에서 다른 생물에 비해 갑오징어는 어류를 많이 섭식하여 문헌에서의 영양단계보다 비교적 높은 수치를 보인 것으로 생각된다. 이상의 결과를 요약하면, 먹이원 분석을 통한 영양단계 평가는 생물의 형태적 특징과 서식처 및 조사 시기 등 여러 가지 요인에 의한 먹이원 변동을 통해 달라지는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 먹이원 분석에서 전통적인 방법인 육안 조사의 단점인 섭식과정에서 일어나는 먹이원의 형태 변형과 연구자의 숙련도에 따른 동정의 오차 범위가 크다는 점을 보완하기 위해 DNA 메타바코딩 방법을 이용하였다. 현미경을 이용한 방법에서는 어류와, 갑각류와 같은 크기가 비교적 큰 생물이 상위 먹이원을 차지하는 반면, DNA 메타바코딩을 이용한 방법에서는 비교적 크기가 작은 요각류 등도 상위 먹이원으로 나타났다(Table 2). 하지만 같은 종이라도 생활하는 환경과 생물의 크기 등에 따라 섭식하는 먹이의 종류와 섭식 다양성, 생물의 영양단계가 달라지는 것을 확인하였다(Figs. 4, 5). 차후 연구에서는 조사하는 시기와 장소 등 채집 방법을 통일하고, 반복 수를 늘려 오차를 줄일 필요가 있는 것으로 판단된다.

적 요

보구치는 어류와 요각류가 공통 먹이원으로 분석되었다. 광양만에서 채집한 보구치가 가장 많이 먹은 먹이원은 단각류로 ASV 빈도가 62.5%로 나타났으며 여수 어시장에서 구입한 보구치는 어류의 ASV 빈도가 16.6%로 가장 많았다. 광양만에서 채집한 참조기의 우점 먹이원은 십각류로 ASV 빈도가 99.9%로 나타났으며 어시장의 참조기는 어류의 ASV 빈도가 51.2%로 조사되었다. 광양만과 어시장의 자주새우 우점 먹이원은 각각 요각류로 92.6%와 100%로 조사되었다. 광양만에서 채집한 꼴뚜기는 요각류(91.4%)를 가장 많이 먹었으나 어시장에서 구입한 갑오징어는 어류(96.6%)를 가장 많이 섭식하였다. 계층적 군집

분석 결과, 꼴뚜기 및 채집한 자주새우와 구입한 자주새우는 먹이원이 유사하였으며 보구치와 참조기, 갑오징어와는 차이가 있는 것으로 조사되었다. 네트워크 분석 결과, 요각류는 참조기를 제외한 모든 수서 생물과 연결되어 있어 가장 중요한 먹이원인 것으로 조사되었다. 먹이원 폭 분석 결과 광양만에서 채집한 참조기의 먹이원 폭 값은 0.001로 낮았으나 어시장에서 구입한 참조기의 먹이원 폭 값은 0.886으로 먹이원 다양성이 가장 높았다. 영양단계 분석 결과, 어류를 주로 섭식했던 갑오징어가 3.98로 가장 높았으며, 광양만에서 채집한 보구치가 2.0으로 영양단계가 가장 낮은 것으로 조사되었다. 이를 통해 위 내용물의 DNA 메타바코딩을 활용한 먹이원 분석 연구는 육안을 통한 먹이원 분석 사이에서 상호보완하여 섭식생태 연구에 활용할 수 있을 것이다.

저자정보 오건희(전남대학교 해양융합과학과 학부과정), 김용준(전남대학교 해양융합과학과 석사과정), 김원석(전남대학교 해양융합과학과 박사과정), 홍철(전남대학교 해양융합과학과 박사과정), 지창우(전남대학교 연구교수), 박인실(전남대학교 교수)

저자기여도 연구설계: 박인실, 지창우, 자료 수집 및 관리: 지창우, 김원석, 자료분석: 지창우, 김원석, 원고작성: 모든 저자, 과제관리: 박인실, 원고 수정 및 검토: 모든 저자

이해관계 본 연구는 이해관계의 충돌 여지가 없음.

연구비 본 결과물은 한국연구재단의 지원(NRF-2018 R1A6A1A03024314)과 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원 수생태계 건강성 확보 기술개발사업의 지원(과제번호: 2021003050001) 및 해양수산부의 재원으로 해양수산과학기술진흥원-해양 미세플라스틱 오염대응 및 관리 기술 개발사업(KIMST-2022-0383)의 지원을 받아 연구되었습니다.

REFERENCES

- Amaral-Zettler, L.A., E.A. McCliment, H.W. Ducklow and S.M. Huse. 2009. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *PLoS One* **4**: e6372.
- Bae, M.-J. and Y.-S. Park. 2019. Evaluation of precipitation impacts on benthic macroinvertebrate communities at three different stream types. *Ecological Indicators* **102**: 446-456.
- Beals, E.W. 1984. Bray-Curtis ordination: an effective strategy for analysis of multivariate ecological data. *Advances in*

- Ecological Research* **14**: 1-55.
- Bolyen, E., J.R. Rideout, M.R. Dillon, N.A. Bokulich, C.C. Abnet, G.A. Al-Ghalith, H. Alexander, E.J. Alm, M. Arumugam and F. Asnicar. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* **37**: 852-857.
- Carreon-Martinez, L. and D.D. Heath. 2010. Revolution in food web analysis and trophic ecology: diet analysis by DNA and stable isotope analysis. Wiley Online Library.
- Cha, S.S. and K.J. Park. 2001. Feeding Selectivity of Postlarvae of White Croaker (*Argyrosomus argentatus*) in Kwangyang Bay, Korea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **34**: 27-31.
- Clarke, L.J., R. Trebilco, A. Walters, A.M. Polanowski and B.E. Deagle. 2020. DNA-based diet analysis of mesopelagic fish from the southern Kerguelen Axis. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **174**.
- Cortés, E. 1999. Standardized diet compositions and trophic levels of sharks. *ICES Journal of Marine Science* **56**: 707-717.
- Csardi, G. and T. Nepusz. 2006. The igraph software package for complex network research. *InterJournal, Complex Systems* **1695**: 1-9.
- Dray, S. and P. Legendre. 2008. Testing the species traits-environment relationships: the fourth-corner problem revisited. *Ecology* **89**: 3400-3412.
- Heo, Y.J., H.B. Jo., E.S. Jung and H.W. Kim. 2021. Application of NGS Analysis for the Food Source of Bivalve. *Korean Journal of Ecology and Environment* **54**: 257-264.
- Hobson, K.A. 1993. Trophic relationships among high Arctic seabirds: insights from tissue-dependent stable-isotope models. *Marine Ecology-Progress Series* **95**: 7-7.
- Hobson, K.A. and H.E. Welch. 1992. Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Marine Ecology Progress Series*: 9-18.
- Hobson, K.A., J.F. Piatt and J. Pitocchelli. 1994. Using stable isotopes to determine seabird trophic relationships. *Journal of Animal Ecology*: 786-798.
- Hong, S.Y. and C.W. OH. 1989. Ecology of sand shrimp, *Crangon affinis* in the Nakdong River Estuary, Korea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **22**: 351-362.
- Huh, S.H., H.C. Choi and J.M. Park. 2018. Feeding Relationship between Co-occurring Silver Croaker (*Pennahia argentata*) and Japanese Sillago (*Sillago japonica*) in the Nakdong River Estuary, Korea. *Korean Journal of Ichthyology* **30**: 224-231.
- Ji, C.W., D.S. Lee, D.Y. Lee, I.S. Kwak and Y.S. Park. 2020. Analysis of Food Resources of 45 Fish Species in Freshwater Ecosystems of South Korea (Based on Literature Data Analysis). *Korean Journal of Ecology and Environment* **53**: 311-323.
- Ji, C.W., D.S. Lee, D.Y. Lee, Y.S. Park and I.S. Kwak. 2021. Analysis of Food Resources of 20 Endangered Fishes in Freshwater Ecosystems of South Korea using Non-metric Multidimensional Scaling and Network Analysis. *The Korean Society of Limnology* **54**: 130-141.
- Jung, J.H., J.Y. Park, Y.H. Yoon, H.M. Lim and W.J. Kim. 2014. A Survey on fish habitat conditions of domestic rivers and construction of its database. *Journal of Korean Society of Environmental Engineers* **36**: 221-230.
- Kang, D.Y., G.C. Seong, D.G. Kim, S.Y. Jin, H.Y. Soh and G.W. Baeck. 2022. Feeding Habits of Small Yellow Croaker, *Larimichthys polyactis* in Coastal Waters of Korea. *Korean Journal of Ichthyology* **34**: 201-207.
- Kim, I.S., J.Y. Park, H. Yang, H.H. Lee, Y.S. Seo and G.P. Park. 2011b. Construction of Korean freshwater fishes DB. Korea Institute of Science and Technology Information.
- Kim, S.T. 2017. Application of next generation sequencing (NGS) technique for the stomach content analysis of marine fish. Pukyong National University.
- Lee, D.J., I.S. Kwak, H.W. Bang and W.C. Lee. 2010. Effects of Antibiotics, Fenbendazole and Lincomycin, in Benthic Copepod, *Tigriopus japonicus* s.l. *Environmental Health and Toxicology* **25.3**: 197-205.
- Lee, W.O., M.Y. Song and H.W. Park. 2018. Freshwater fish status and management plan for Inland fishery resources. *The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science*: 86-86.
- Levins, R. 1968. Evolution in changing environments: some theoretical explorations. Princeton University Press.
- Na, Y.K., H.B. Jo., J.W. Park., K.H. Chang and I.S. Kwak. 2020. The Gut Content Analysis of *Polypedilum scalaenum* in the Large-scale Weirs of 4 Major River Ecosystems. *Korean Journal of Ecology and Environment* **53**: 55-62.
- Oksanen, J., F.G. Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlenn, P.R. Minchin, R.B. O'Hara, G.L. Simpson, P. Solymos, M.H.H. Stevens, E. Szoecs and H. Wagner. 2019. vegan: Community Ecology Package. (R package version 2.5-6.).
- Pauly, D. and V. Christensen. 1995. Primary production required to sustain global fisheries. *Nature* **374**: 255-257.
- Romanuk, T.N., A. Hayward and J.A. Hutchings. 2011. Trophic level scales positively with body size in fishes. *Global Ecology and Biogeography* **20**: 231-240.
- Sanger, G.A. 1987. Trophic levels and trophic relationships. Seabirds: Feeding ecology and role in marine ecosystems: 229.
- Tue, N.T., H. Hamaoka, T.D. Quy, M.T. Nhuan, A. Sogabe, N. T. Nam and K. Omori. 2014. Dual isotope study of food sources of a fish assemblage in the Red River mangrove ecosystem, Vietnam. *Hydrobiologia* **733**: 71-83.
- Ward Jr, J.H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* **58**: 236-244.