

Original article

## DNA metabarcoding을 이용한 이매패류 공식 전후 먹이원 분석

고봉순<sup>1</sup> · 박재원<sup>1</sup> · 지창우<sup>2</sup> · 곽인실<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 해양융합과학과, <sup>2</sup>전남대학교 수산과학연구소

**Analysis of Food Sources of Pre- and Post-diet in a Bivalve Using DNA Metabarcoding.** Bong-Soon Ko<sup>1</sup> (0000-0003-2761-0231), Jae-won Park<sup>1</sup> (0000-0002-4067-7089), Chang Woo Ji<sup>2</sup> (0000-0001-6133-9399) and Ihn-Sil Kwak<sup>1,2,\*</sup> (0000-0002-1010-3965) (<sup>1</sup>Department of Ocean Integrated Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; <sup>2</sup>Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea)

**Abstract** Research on food sources through DNA metabarcoding is being used for various organisms based on high resolution and reproducibility. In the study, we investigated the difference in food sources between pre and post-starving in the three bivalve species (*Anemina acaeformis*, *Anodonta woodiana*, and *Unio douglasiae*) through DNA metabarcoding using 18S rRNA V9 primer. The food source of pre-starving appeared in 87 genera, 71 families, 51 orders, 35 classes, and 22 phyla. The primary food sources were the zoo and phytoplankton, including Chlamydomonadales, Euglenales, Ploima, Sphaeropleales, and Stephanodiscales. However, all zoo and phytoplankton were not observed after starving except Schizopyrenida and Rotifera. In Levin's niche breadth analysis, the Bi index of *A. woodiana* is 0.3, which was higher than *A. acaeformis* (0.14) and *U. douglasiae* (0.21), indicating that they feed on various food sources. The niche overlap of *A. acaeformis* was measured as 0.78 in *A. woodiana*, 0.7 in *U. douglasiae* showing a relative high value compared to other bivalves. The trophic level of *A. acaeformis*, *A. woodiana*, and *U. douglasiae* based on the food source information were investigated as 2.0, 2.0, and 2.5, respectively. The results of the previous study on the trophic level using stable isotopes showed 1.8 to 2.4 values were similar to the results of this study. These results suggest that DNA metabarcoding can be an effective analyzing tool for the gut content in the bivalves.

**Key words:** food source, gut content, bivalve, DNA metabarcoding, 18S rRNA primer

### 서 론

수생물의 형태적 특징이나 지리적 분포, 서식환경, 생물 다양성에 대한 연구는 활발히 보고된 것에 비해, 위 내용물 분석을 통한 먹이원 추정과 그에 따른 먹이원 종류, 경

쟁에 대한 분석은 극히 제한적이다(Ji *et al.*, 2020). 하지만 먹이원 연구는 수생태계의 포식-피식 상호작용을 파악하고, 종간의 생태적인 특성을 파악할 수 있어 먹이망 분석에 기초 자료로 이용되어 활용성이 높다(Carreón-Martínez and Heath, 2010). 특히 이매패류와 같은 1차 소비자는 식물플랑크톤, 박테리아 및 입자성 유기물질을 걸러내는 걸러먹는 무리(filter feeder)로 전 세계의 수생 서식지에서 발견되는 무척추동물이다. 또한 이매패류는 많은 종이 식용으로 양식되기 때문에 수산자원으로서도 중요한 분류군

Manuscript received 29 November 2022, revised 29 November 2022, revision accepted 12 December 2022

\* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148, Fax: +82-961-0244  
E-mail: iskwa@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.

이다(Vaughn and Hakenkamp, 2001; Heo *et al.*, 2021). 따라서 이매패류의 먹이원 연구는 수서생태계의 먹이구조에 대한 이해 및 생물자원 확보에도 도움이 될 수 있다.

국내 담수에 서식하는 이매패류는 총 3목, 14과, 18종이 서식한다고 알려져 있다(Lee, 2019). 국내 이매패류 중 먹이원이 보고된 연구는 소수에 불과하다(Heo *et al.*, 2021). Lee *et al.* (2008b)은 식물플랑크톤인 *Microcystis aeruginosa*의 밀도에 따라 이매패류 말조개(*Unio douglasiae*)의 여과율을 관찰하였으며, Lee *et al.* (2008a)은 식물플랑크톤인 규조류의 일정한 농도에서 말조개의 개체수에 따른 섭식률을 보고한 바 있다. 또한 Choi *et al.* (2014)은 클로로필-a의 농도에 따라 펄조개(*Anodonta woodiana*)의 여과율을 보고한 바 있다. 위의 연구는 야외 서식중인 이매패류의 위 내용물을 분석하여 먹이원 정보를 제공하지는 못하였다. 해수에 서식하는 이매패류의 경우, 진주 조개(*Pinctada fucata*)와 꼬끼리조개(*Panope japonica*)의 위 내용물을 분석하여 규조류를 포함한 식물플랑크톤이 주요한 먹이원임을 보고되었으며(Chang *et al.*, 1988; Lee, 1997), 최근에 가라맛조개(*Sinonovacula constricta*)의 먹이원을 NGS (Next Generation Sequencing)기법을 적용하여 보고하였지만(Heo *et al.*, 2021) 담수 이매패류에 대한 조사는 거의 없는 실정이다.

수생물의 먹이원 연구가 어려운 이유는 직접적인 관찰이 힘들기 때문이다. 또한 식물플랑크톤이나 동물플랑크톤과 같은 미세 먹이원은 정확한 분류가 어려우며 저서무척추동물이나 어류와 같은 큰 먹이원도 파편화되어 있어 분류가 쉽지 않다(Kim *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2020). 특히 이매패류의 먹이원은 대부분 식물 및 동물플랑크톤이기 때문에 정확한 먹이원 동정이 어렵고 소화과정에서 분해되기도 하여 정확한 먹이원 정보를 확보하기가 쉽지 않다(Heo *et al.*, 2021). 이를 해결하기 위해, 최근 NGS 기법을 이용한 DNA metabarcoding을 통해 앞서 언급한 정확한 분류가 어려운 먹이원 연구에 활용되고 있다(Deagle *et al.*, 2005). DNA metabarcoding은 위 내용물에 존재하는 다양한 생물종의 genomic DNA를 분석할 수 있으며 기존 생물 모니터링 방법과 비교했을 때 비용과 시간 및 비용적인 측면에서 효율적인 장점이 있다.

본 연구에서는 국내 담수 생태계에서 가장 큰 이매패류로 알려져 있으며(Kown *et al.*, 2013), 부영양화로 대발생하는 식물플랑크톤 제거하고자 하는 연구가 이루어진(Lee *et al.*, 2008b) 대칭이(*Anemina acaeformis*), 펄조개(*Anodonta woodiana*), 말조개(*Unio douglasiae*)의 위 내용물에 대한 DNA metabarcoding을 수행하여 먹이원 정보를 확보하고자 하였다. 펄조개와 말조개의 식물플랑크톤 여과율

은 보고되었으나 실제 야외에 서식하고 있는 개체의 위 내용물 분석을 통한 먹이원 정보는 아직 없다. 따라서 본 연구에서는 이매패류인 대칭이, 펄조개, 말조개를 야외에서 채집하여 자연상태에서 섭식한 먹이원을 분석하고자 18S rRNA V9 primer를 이용한 DNA metabarcoding을 수행하였다. 또한 채집한 이매패류의 시간에 따른 위 내용물 변화를 분석하기 위해, 채집 직후의 대칭이와 펄조개, 말조개의 위 내용물과 채집 후 48시간 뒤의 위 내용물을 비교 분석하였다. 나아가 섭식 생태를 확인하기 위해 먹이원 비율 및 먹이원 종류, 먹이원 경쟁, 영양 단계도 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 이매패류 채집 및 DNA 메타바코딩

위 내용물 분석에 사용된 이매패류인 대칭이와 펄조개, 말조개는 충청남도 부여군과 청양군 사이에 설치된 금강의 백제보에서 수변부로부터 2 m까지 드렛지(50 cm×30 cm)를 사용하여 채집하였다. 채집한 이매패류의 분류는 원색한국패류도감(Kwon *et al.*, 1993)에 따라 종 동정을 진행하였다. 채집한 이매패류는 패각 외부에 붙어있는 부착물을 제거하기 위해 탈염수로 2~3회 세척하였고 현장에서 즉시 해부하여 위(gut)를 적출하였다. 적출한 위는 15 mL conical tube에 100% ethanol로 보관하였다. 일부 개체는 공식 뒤의 위 내용물을 분석하기 위해 살아있는 상태로 연구실에서 48시간 순치한 후 위를 적출하였다. 이매패류의 순치는 담수여과장치가 구축된 유리 수조(450×300×350 mm, 47 L)의 바닥에 자갈 약 10 cm 두께로 깔고, 탈염수를 넣어 순치하였다. 온도는 실온 20°C로 유지하였고, 광주기는 9L:15D로 맞추었으며 48시간 동안 먹이는 주지 않고 제한하였다. 공식 후, 적출한 위는 마찬가지로 15 mL conical tube에 100% ethanol로 보관하였다.

이매패류의 위 내용물 genomic DNA 추출은 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany)에서 제공되는 Protocol을 활용하여 진행하였다. 위 내용물 추출과정으로는 1×PBS로 위 내부를 씻은 후 PBS와 함께 1.75 mL 튜브에 넣어준 후 180 μL ATL buffer와 20 μL Proteinase K를 첨가하여 56°C Water bath에 1~2시간 incubation을 진행하였다. 그 후 진행은 DNeasy Blood & Tissue Kit의 제공된 Protocol에 따라 진행하였다. 추출한 DNA는 microplate reader (Thermo Fisher, USA)로 DNA 순도 및 농도를 측정하였다. 위 내용물 내 먹이원을 파악하기 위해 진행생물을 타겟으로 하는 18S rRNA V9 Primer (Forward: CCCTGCCHTTTGTACACAC, Reverse:

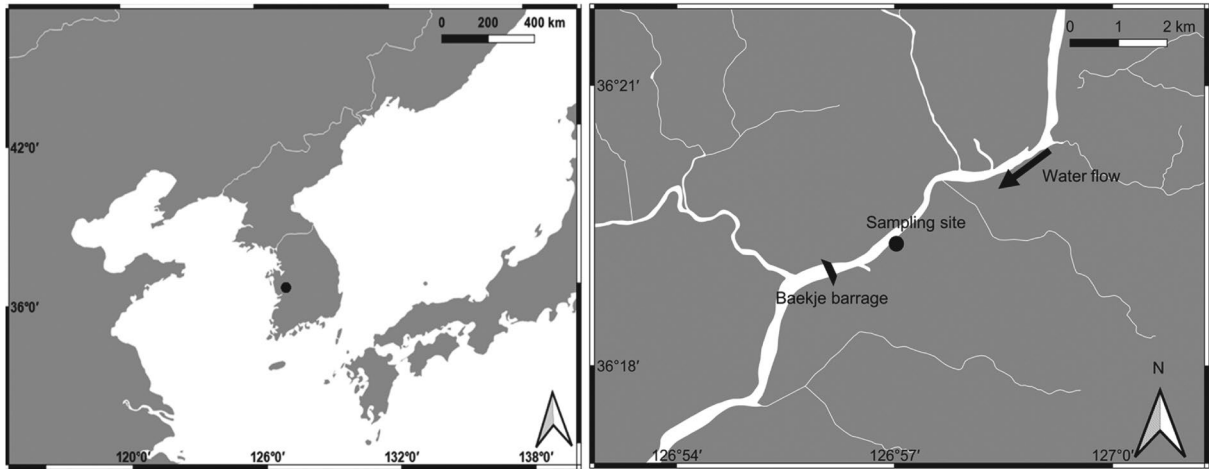


Fig. 1. The sampling site of the Baekje barrage in the Geum River.

CCTTCYGCAGGTTACCT AC)를 이용하여 PCR을 수행하였다(Amaral-Zatteler *et al.*, 2009). PCR 조건은 94°C 3분 후 94°C에서 30초, 57°C에서 1분, 72°C 1분 30초 과정을 35회 반복하여 증폭하였으며, 72°C에서 5분간 추가 진행하여 1차 PCR을 진행하였다. 2차 PCR은 Nextera XT index kit (Illumina, USA)를 이용하여 진행하였다. 수행된 PCR product는 1.5% Agarose gel을 이용한 전기 영동을 통해 PCR 결과물을 확인하였다. NGS 분석은 Iseq 100 (Illumina, USA)을 이용하여 수행하였고, 획득한 염기서열은 Qiime2 pipeline을 이용하여 Amplicon sequence variant (ASV)를 산출하였다. 산출된 ASV는 BLAST의 nucleotide 데이터베이스(Blastn, NCBI, 2021)(NCBI, 2021)를 이용하여 taxonomy assignment ( $\geq 97\%$ )를 진행하였다.

## 2. 섭식 생태 분석

이매패류의 위 내용물에서 획득한 ASV 빈도 정보를 이용하여 먹이원의 상대빈도 분석 및 먹이원 다양도 분석, 영양 단계를 분석하였다. 먹이원 상대빈도 분석은 대칭이와 펄조개, 말조개의 공식 전, 후 ASV 정보로 얻은 먹이원의 속, 과, 목, 강, 문의 분류군 수와 분류군에 따른 ASV의 빈도를 이용하였다. 3종의 먹이원 다양성은 섭식 폭 지수(Dietary breadth index, Bi)를 이용하여 계산하였다. Bi 지수는 레빈 표준 생태지위 폭(Levin's standardized niche breadth)(Le vins, 1968)을 사용하여 계산하였다.

$$\hat{B}_A = \frac{\hat{B} - 1}{n - 1}, \quad \hat{B} = \frac{1}{\sum \hat{p}_j^2}$$

$\hat{B}_A$ 는 레빈 표준 생태지위 폭을 말하며,  $p_j$ 는 먹이원  $j$ 를

섭식할 확률이며  $n$ 은 전체 먹이원 하위분류군 수이다. 계산된 지수 값이 1에 가까울수록 다양한 먹이원을 먹은 이매패류를 나타내고 0이면 한 종류의 먹이만 먹은 것으로 해석될 수 있다.

이매패류 3종의 중간 경쟁 관계 분석은 생태지위중첩(niche overlap) 분석 방법 중 혼 지수(Horn's Index)(Horn, 1966)를 사용하였다.

$$\hat{R}_0 = \frac{\sum(\hat{p}_{ij} + \hat{p}_{ik})\log(\hat{p}_{ij} + \hat{p}_{ik}) - \sum \hat{p}_{ij}\log \hat{p}_{ij} - \sum \hat{p}_{ik}\log \hat{p}_{ik}}{2\log 2}$$

여기서,  $\hat{R}_0$ 는 2종의 이매패류  $j$ 와  $k$ 의 생태지위중첩 지수이며,  $\hat{p}_{ij}$ 와  $\hat{p}_{ik}$ 는 먹이원  $i$ 에 대한 이매패류  $j$ 와  $k$ 의 섭식 비율을 나타낸다. 계산된  $\hat{R}_0$ 값이 높을수록 두 이매패류는 같은 먹이원을 두고 경쟁관계가 높다고 해석될 수 있다.

채집한 이매패류의 먹이원을 통한 영양 단계(Trophic levels ( $TL_k$ ))는 각각의 문(phylum,  $k$ )에 대해 다음과 같이 구하였다(Cortés, 1999).

$$TL_k = 1 + \left( \sum_{j=1}^{11} P_j \times TL_j \right)$$

여기서  $TL_j$ 는 각 먹이원  $j$ 의 영양 단계이다.

추가적으로 이매패류 3종과 먹이원과의 관계를 파악하기 위하여 네트워크 분석을 실시하였다(Csardi and Nepusz, 2006; Bae and Park, 2019). 이매패류와 먹이원을 정점(node)으로 설정하고 이매패류 먹이원 섭식 비율은 연결선(link)의 굵기(width)로 네트워크를 구성하였다. 네트워크 분석을 위하여 입력자료는 분류군(예, 구조류) 수준의 자료를 사용하였다. 본 연구에서 수행한 네트워크 분

**Table 1.** Change of taxon number on the pre- and post-starving of *Anemina acaeformis*, *Anodonta woodiana*, and *Unio douglasiae*.

Host	Starving	Source	Genus	Family	Order	Class	Phylum
<i>Anemina acaeformis</i>	Pre-	Zooplankton	4	4	3	2	2
		Phytoplankton	20	15	9	7	5
	Post-	Zooplankton	1	1	1	1	1
		Phytoplankton	0	0	0	0	0
<i>Anodonta woodiana</i>	Pre-	Zooplankton	4	4	4	4	3
		Phytoplankton	32	25	14	8	5
	Post-	Zooplankton	3	3	3	3	2
		Phytoplankton	2	2	2	2	2
<i>Unio douglasiae</i>	Pre-	Zooplankton	7	7	2	2	2
		Phytoplankton	18	14	12	9	5
	Post-	Zooplankton	0	0	0	0	0
		Phytoplankton	2	2	2	2	2

석은 R 프로그램 (version 3.6.3; <https://www.r-project.org>) 을 이용하여 분석하였으며, igraph (Csardi and Nepusz, 2006) 패키지를 통해 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. DNA metabarcoding을 이용한 이매패류의 위 내용물 분석

이매패류 3종(대칭이, 펄조개, 말조개)의 공식 전, 후 위 내용물을 분석하기 위하여 DNA metabarcoding을 이용하였다. 그 결과, 공식 전 먹이원은 22문, 35강, 51목, 71과, 87속으로 나타났으며, 공식 후 먹이원은 11문, 13강, 13목, 13과, 13속으로 나타났다. 공식 전 대칭이의 위 내용물 중 동물플랑크톤에 해당하는 먹이원은 2문, 2강, 3목, 4과, 4속으로 조사되었으며 식물플랑크톤 먹이원은 5문, 7강, 9목, 15과, 20속으로 나타났다 (Table 1). 공식 후 대칭이의 위 내용물 중 검출된 내용물은 동물플랑크톤이 1속에 불과하였고 식물플랑크톤은 출현하지 않았다. 공식 전 펄조개의 위 내용물 중 동물플랑크톤에 해당하는 먹이원은 3문, 4강, 4목, 4과, 4속으로 조사되었으며 식물플랑크톤 먹이원은 5문, 8강, 14목, 25과, 32속으로 나타났다 (Table 1). 공식 후 펄조개의 위 내용물 중 동물플랑크톤은 2문, 3강, 3목, 3과, 3속으로 나타났으며 식물플랑크톤 먹이원은 2문, 2강, 2목, 2과, 2속으로 조사되었다. 공식 전 말조개의 위 내용물 중 동물플랑크톤에 해당하는 먹이원은 2문, 2강, 2목, 7

과, 7속으로 조사되었으며 식물플랑크톤에 해당하는 먹이원은 5문, 9강, 12목, 14과, 18속으로 나타났다 (Table 1). 공식 후 말조개의 위 내용물 중 동물플랑크톤은 출현하지 않았으며 식물플랑크톤에 해당하는 먹이원은 2문, 2강, 2목, 2과, 2속으로 조사되었다.

Fig. 2는 이매패류 3종의 먹이원 중 공식 전, 후 상위 10목을 보여주고 있다. 공식 전 대칭이는 구조류인 고리돌기돌말목 (Stephanodiscales)의 ASV 빈도가 3,432로 가장 높게 나타났으며 녹조류인 스파이로플레아목 (Sphaeropleales)의 빈도가 678로 두 번째로 높았다. 공식 후에는 모든 구조류와 녹조류가 출현하지 않았다. 반면에 펄조개는 녹조류인 스파이로플레아목의 ASV 빈도가 895로 가장 높았으며 같은 녹조류인 좁쌀공말목 (Chlamydomonadales)의 ASV 빈도가 675로 두 번째로 높았다. 하지만 공식 후의 펄조개 개체에서는 원생생물 (Protistia)인 분열균목 (Schizopyrenida)과 윤충류 (Rotifer)인 유영목 (Ploima)의 ASV가 각각 529와 20으로 나타났다. 공식 후에 나타난 유영목은 대칭이와 말조개의 공식 전 위 내용물에도 출현하였고 공식 후에는 출현하지 않아 먹이원인 것으로 예측되지만 분열균목은 공식 후 펄조개에서만 출현하여 않았다. 말조개의 공식 전 가장 높은 ASV 비율을 보인 위 내용물은 유영목으로 2,947의 빈도를 보였으나 공식 후 개체에서는 0으로 조사되었다. 추가적으로 말조개의 경우, 어류 (Fish)가 일부 출현 (171)하기도 하였다. 이러한 결과를 종합해 보면, 담수에 서식하는 대칭이와 펄조개, 말조개의 주요 먹이원은 식물플랑크톤

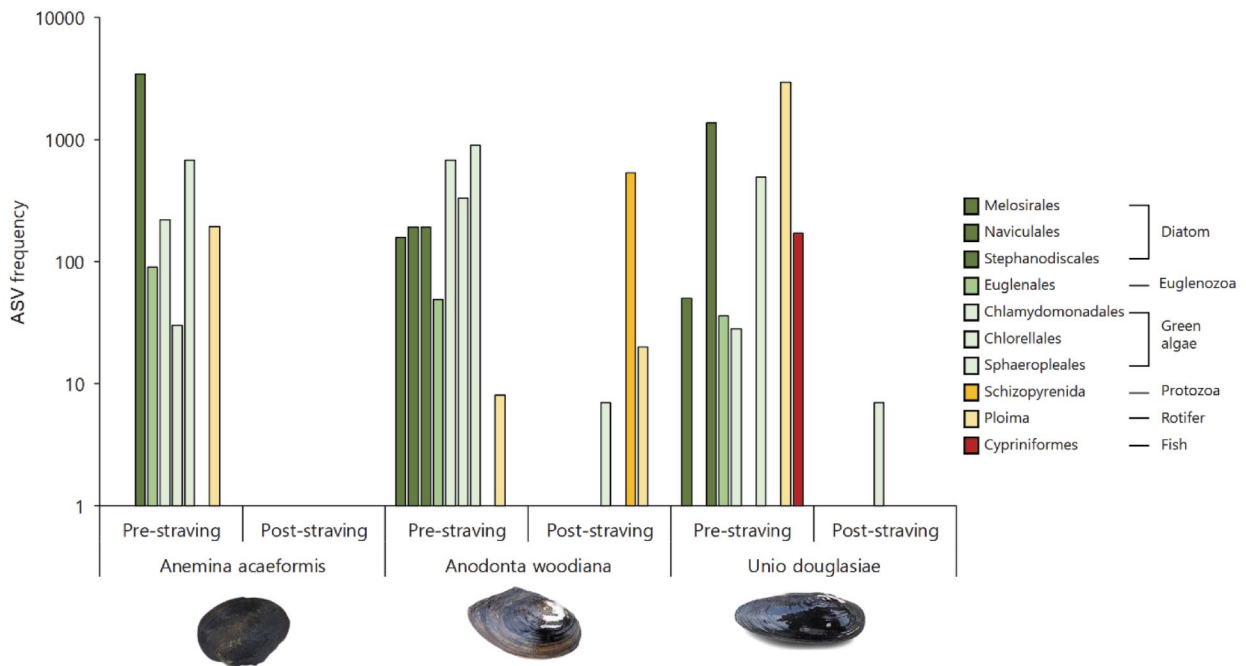


Fig. 2. ASV (Amplicon sequence variant) frequency of gut content between pre- and post-straving in the *Anemina acaeformis*, *Anodonta woodiana*, and *Unio douglasiae*.

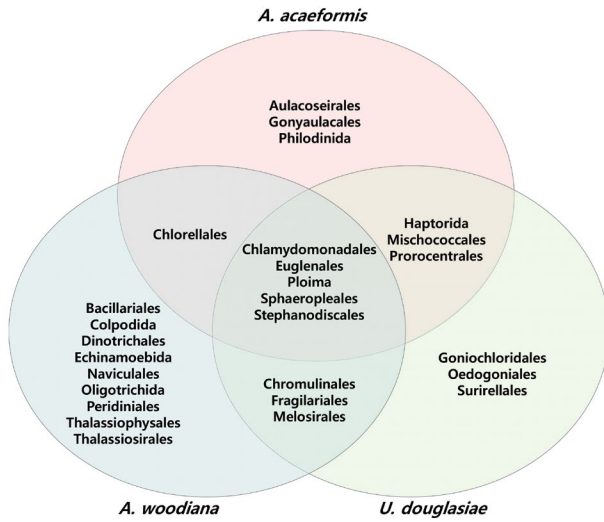
인 규조류와 녹조류 및 동물플랑크톤인 윤충류로 나타났고 48시간 공식 후에는 식물플랑크톤이 나타나지 않아 소화 및 흡수, 배출된 것으로 보여진다.

국내 수생물의 DNA metabarcoding을 이용한 먹이원 연구는 주로 COI (Cytochrome c oxidase subunit I) 유전자를 이용한 프라이머 (Kim, 2017)와 18S rRNA를 이용한 프라이머 (Heo *et al.*, 2021)가 주로 사용되었다. NCBI nucleotide 데이터베이스에 등록된 국내 수생물은 대상 프라이머로 활용되는 유전자의 등록된 수에 따라 차이가 있음이 보고되었다 (Kwak *et al.*, 2022). 국내에 서식하는 동식물플랑크톤은 NCBI nucleotide 데이터베이스에서 18S rRNA가 가장 많이 등록된 것으로 조사되었으며 저서무척추동물은 COI 유전자가 가장 많이 등록되어 있으며 어류의 경우에는 12S rRNA 유전자가 가장 많이 등록된 것으로 알려져 있다. 물을 섭식하여 걸러 먹는 Collector-Filter인 이매패류의 주요 먹이원은 동식물플랑크톤이므로 이매패류의 먹이원 연구에 가장 적합한 프라이머는 18S rRNA 프라이머로 사용하고 있다 (Lindeque *et al.*, 2015; Bergmeier *et al.*, 2021). 본 연구에서도 이매패류 3종 (대칭이, 펄조개, 말조개)의 공식 전후의 위 내용물을 분석을 위해 18S rRNA 프라이머를 적용한 결과 먹이원인 동식물플랑크톤의 다양한 분석이 가능하였다.

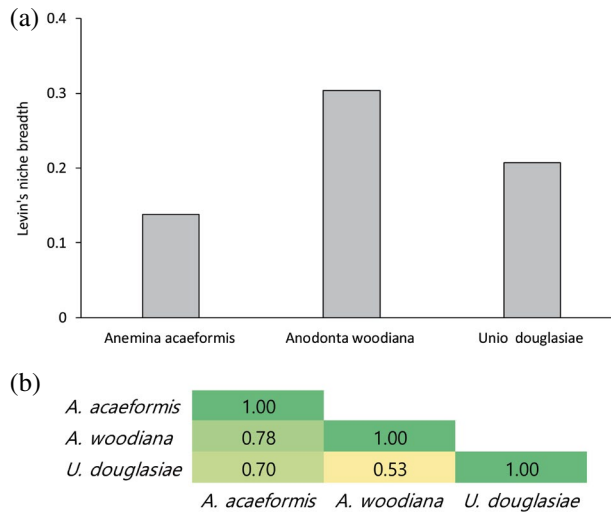
## 2. 먹이원 정보를 이용한 이매패류의 섭식 생태 분석

3종의 이매패류의 주요한 먹이원인 동식물플랑크톤의 목 수를 보여주고 있다 (Fig. 3). 공식 전 이매패류 3종의 공통 먹이원은 좁쌀공말목과 유글레나목, 유영목, 스파이로플레아목, 고리돌기돌말목 5목으로 조사되었다. 펄조개와 말조개의 공통된 먹이원은 총 8목으로 조사되었고 펄조개 먹이원은 스파이로플레아목 외 9목인데 비해 말조개는 3목 (Goniochloridales, 방패돌말목, 붓뚜껑말목)에 불과하였다. 대칭이의 경우 펄조개와는 6목이 공통적인 먹이원이었고 8목이 말조개와 공통적인 먹이원이었다. 대칭이 먹이원은 고니아올락스목과 대롱돌말목, 선윤충목 3목으로 조사되었다.

공식 전 레빈 표준 생태지위 폭은 펄조개가 0.3으로 가장 높아 대칭이와 말조개에 비해 먹이원 다양성이 높은 것으로 조사되었다. 말조개의 먹이원 폭 지수는 0.21로 조사되었으며 대칭이는 0.14로 가장 낮아 먹이원 다양성이 상대적으로 약간 낮았다 (Fig. 3). 본 연구에서도 대칭이의 먹이원은 스파이로플레아목과 좁쌀공말목의 ASV 빈도가 각각 895와 675로 분산되어 먹이원 다양성이 높은 것으로 판단되나 대칭이의 경우 다른 먹이원보다 고리돌기돌말목의 ASV 빈도가 3,432로 조사되어 다른 먹이원에 비해 한 종류의 먹이원에 대한 의존성이 다소 높은 것으로 조사되



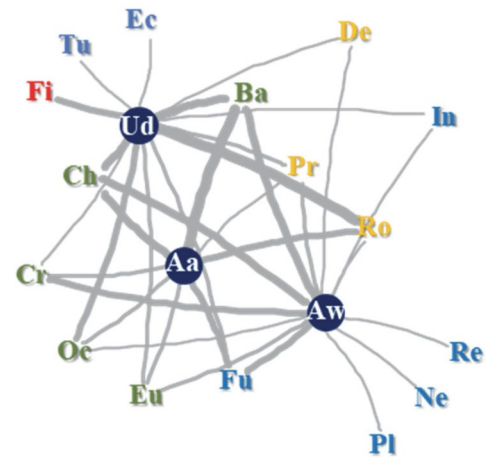
**Fig. 3.** The Venn diagram of overlap in feeding pre-starving zoo and phytoplankton in *Anemina acaeformis*, *Anodonta woodiana*, and *Unio douglasiae*. Numbers in the Venn diagram indicate the number of orders which ate at each species.



**Fig. 4.** Dietary breadth index (a) and Horn's index (b) in *Anemina acaeformis*, *Anodonta woodiana*, and *Unio douglasiae*.

었다. Horn 지수를 이용한 생태지위중첩 조사에서는 대칭이가 펄조개와 말조개에 대하여 0.78, 0.7의 값을 보여 서로 겹치는 먹이원이 많음을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 펄조개는 말조개와 먹이경쟁 값이 0.53을 보였으며 이는 대칭이에 비해 상대적으로 겹치는 먹이원 관계가 적어 먹이경쟁이 다소 약함을 보여주었다.

공식 전 이매패류 3종과 먹이원과의 네트워크 분석 결과는 Fig. 5와 같다. 네트워크 정점인 이매패류의 경우 학



**Fig. 5.** The network analysis of gut contents in *Anemina acaeformis*, *Anodonta woodiana*, and *Unio douglasiae*. Abbreviation bivalves are colored circle nodes, and links appear in the association between bivalves and food sources. The link width is proportionate to the fed frequency. Abbreviations of figure are followed; Ud: *Unio douglasiae*, Aa: *Anemina acaeformis*, Aw: *Anodonta woodiana*, Ba: Bacillariophyta, Ch: Chlorophyta, Cr: Cryptophyta, De: Decapoda, Ec: Ectoprocta, Eu: Euglenophyta, Fi: Fish, Fu: Fungi, Ne: Nematomorpha, Oc: Ochrophyta, Pl: Platyhelminthes, Pr: Protozoa, Re: Retaria, Ro: Rotifera, Tu: Tubificida.

명의 대소문자를 이용하여 나타내었으며 네트워크의 또 다른 정점인 먹이원은 문(phylum)의 알파벳 첫 두 글자로 표기하였다. 펄조개 (Aw)는 구조류 (Ba)와 녹조류 (Ch), 은편모조류 (Cr)와 강하게 연결되어 있으나 편형동물류 (Pl), 유선형동물류 (Ne), 유공충류 (Re)와는 연결성이 약하게 나타났다. 하지만 펄조개는 편형동물류와 유선형동물류, 유공충류는 섭식하는 것으로 나타났다. 말조개 (Ud)는 구조류와 윤충류 (Ro), 녹조류와 연결이 강하였으나 펄조개, 대칭이에 비해 은편모조류와는 연결이 약하게 나타났다. 말조개와 대롱편모조류 (Oc)의 연결강도는 다른 두 이매패류에 비하여 강한 것으로 나타났다. 추가적으로 말조개는 다른 두 조개에 비해 어류 (Fi), 실지렁이류 (Tu)와 태형동물류 (Ec)도 섭식하여 동식물플랑크톤 외에 다른 먹이원도 섭식한 특징이 있었다. 대칭이 (Aa)는 구조류, 녹조류, 윤충류, 진균류 (Fu)와 연결이 강하였으며 이들 먹이원은 펄조개와도 연결강도가 마찬가지로 높아 생태지위중첩을 네트워크 상에서도 확인할 수 있었다.

이매패류 3종의 영양 단계 결과는 Fig. 6과 같다. 대칭이와 펄조개의 영양 단계는 2.0, 말조개의 영양 단계는 2.5로 조사되었다. 영양단계가 2.0으로 조사된 대칭이와 펄조개는 동식물플랑크톤만 주로 섭식하여 수서 군집에서 1차 소비자인 것으로 조사되었다. 어류도 섭식한 말조개는 다

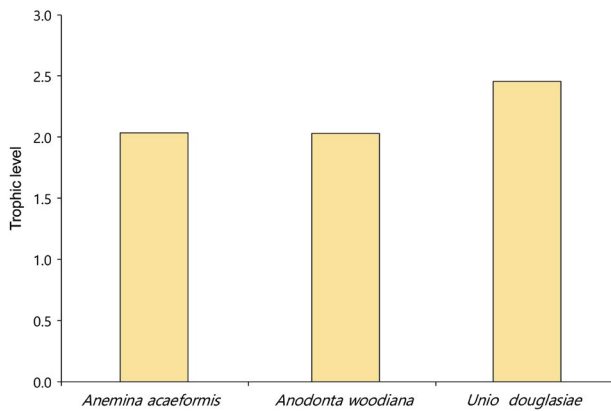


Fig. 6. The trophic level of *Anemina acaeformis*, *Anodonta woodiana*, and *Unio douglasiae*.

른 두 이매패류에 비해 높은 2.5의 값을 보여 1차 소비자인 동시에 스캐빈저(scavenger)의 역할도 하는 것으로 생각된다. 국외 연구에서도 많은 수의 이매패류가 스캐빈저 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Morton, 1978).

DNA metabarcoding 분석은 먹이원 크기가 작아 분석하기 어려운 먹이원을 효과적으로 탐지할 수 있는 것으로 알려져 있다(Guillerault *et al.*, 2017). 본 연구에서는 담수 이매패류 중 비교적 크기가 큰 대칭이와 말조개, 펄조개의 위 내용물을 18S rRNA V9 primer를 이용하여 분석한 결과, 상위 10목의 먹이원은 대부분 크기가 작은 동식물플랑크톤인 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 기존의 육안 확인을 통해 분석이 어려웠던 이매패류의 먹이원 분석에 새로운 방법으로 DNA metabarcoding이 효과적일 수 있음을 시사한다. 아울러 공식 전, 후의 비교 결과 대부분의 먹이원은 48시간 후에 소화됨을 알 수 있었으나 일부 분열균목과 같은 위에 아직 남아 있는 내용물도 확인할 수 있었다. 차후 연구에서는 시간에 따른 먹이원 소화 비율 연구에도 DNA metabarcoding이 활용될 수 있을 것이다. 아울러 본 연구에서 위 내용물을 조사한 3종 이매패류의 상위 10목의 먹이원은 대부분 동식물플랑크톤이었으며 이는 영양 단계 분석에서도 1차 소비자에 가까운 값을 보였다. 안정동위원소 연구에서도 이매패류의 영양 단계는 1.8~2.4 사이로 조사되어, DNA metabarcoding을 이용한 본 연구 결과와 유사하였으며 이를 통해 섭식 생태 분석에도 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

## 적 요

본 연구에서는 이매패류 3종인 대칭이, 펄조개, 말조개

의 위 내용물을 DNA metabarcoding으로 분석한 결과, 공식 전 먹이원은 22문, 35강, 51목, 71과, 87속으로 나타났다. 3종의 공식 전 공통 동식물플랑크톤은 좁쌀공말목, 유글레나목, 유영목, 스파이로플레아목, 고리돌기돌말목으로 조사되었다. 공식 후에는 대부분의 동식물플랑크톤이 검출되지 않아 소화 및 흡수, 배출된 것으로 보여진다. 먹이원 폭 분석 결과, 펄조개의 Bi 지수가 0.3으로 대칭이(0.14)와 말조개(0.21)에 비해 높아 다양한 먹이원을 섭식하는 것으로 확인되었다. 대칭이의 생태지위중첩(niche overlap)은 펄조개(0.78)와 말조개(0.7)와 다른 이매패류에서 높은 값을 보였다. 먹이원 정보를 바탕으로 계산된 대칭이, 말조개, 펄조개의 영양 단계는 각각 2.0, 2.0, 2.5로 조사되었다. 이러한 결과는 안정동위원소 문헌조사 연구에서도 이매패류의 영양 단계가 1.8~2.4로 나타나 유사하였다. 본 연구 결과는 동식물플랑크톤을 주로 섭식하는 이매패류의 먹이원 분석에 DNA metabarcoding이 적용이 효과적이며 섭식 생태 분석에도 활용할 수 있음을 시사한다.

**저자정보** 곽인실(전남대학교 교수), 고봉순(전남대학교 해양융합학과 대학원생), 박재원(전남대학교 해양융합학과 대학원생), 지창우(전남대학교 연구교수)

**저자기여도** 연구설계: 곽인실, 자료 수집 및 관리: 고봉순, 박재원, 자료분석: 고봉순, 지창우, 원고작성: 모든 저자, 과제관리: 곽인실, 원고 수정 및 검토: 모든 저자

**이해관계** 본 연구는 이해관계의 충돌 여지가 없습니다.

**연구비** 본 결과물은 한국연구재단의 지원(NRF-2018 R1A6A1A03024314)과 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원 수생태계 건강성 확보 기술개발사업의 지원(과제번호: 2021003050001) 및 K-WATER(2020 K-water 개방형 R&D 과제)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(7): 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.
- Bergmeier, F.S., L. Ostermair and K.M. Jörger. 2021. Specialized predation by deep-sea Solenogastres revealed by sequenc-

- ing of gut contents. *Current Biology* **31**(13): R836-R837.
- Carreon-Martinez, L. and D.D. Heath. 2010. Revolution in food web analysis and trophic ecology: diet analysis by DNA and stable isotope analysis. *Molecular Ecology* **19**(1): 25-27.
- Chang, M., J.-S. Hong and H.T. Huh. 1988. Environmental conditions in the pearl oyster culture grounds and food organisms of *Pinctata fuscata martensii* (Dunker) (Bivalvia, Pterioidea). *Ocean Research* **10**(1): 67-77.
- Choi, H.-S., G.-S. Nam, M.-S. Kim, H.-J. Shin, M.-H. Park, S.-J. Hwang and B.-H. Kim. 2014. Response Surface Methodology for Optimization of the Removal of Organic Matters in Eutrophic Waters by Korean Freshwater Bivalves. *Korean Journal of Ecology and Environment* **47**(4): 312-318.
- Cortés, E. 1999. Standardized diet compositions and trophic levels of sharks. *ICES Journal of Marine Science* **56**(5): 707-717.
- Csardi, G. and T. Nepusz. 2006. The igraph software package for complex network research. *InterJournal, Complex Systems* **1695**(5): 1-9.
- Deagle, B., D. Tollit, S. Jarman, M. Hindell, A. Trites and N. Gales. 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Molecular Ecology* **14**(6): 1831-1842.
- Guillerault, N., S. Bouletreau, A. Iribar, A. Valentini and F. Santoul. 2017. Application of DNA metabarcoding on faeces to identify European catfish *Silurus glanis* diet. *Journal of Fish Biology* **90**(5): 2214-2219.
- Heo, Y.-J., H. Jo, E. Jung and H.-W. Kim. 2021. Application of NGS Analysis for the Food Source of Bivalve. *Korean Journal of Ecology and Environment* **54**(3): 257-264.
- Horn, H.S. 1966. Measurement of "overlap" in comparative ecological studies. *The American Naturalist* **100**(914): 419-424.
- 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**(4): 311-323.
- Kim, H.-J., T.-K. Lee, S.W. Jung, I.-K. Kwon and J.-W. Yoo. 2018. Analyzing Vomit of *Platalea minor* (Black-faced Spoonbill) to Identify Food Components using Next-Generation Sequencing and Microscopy. *Korean Journal of Environmental Biology* **36**(2): 165-173.
- Kim, S. 2017. Application of next generation sequencing (NGS) technique for the stomach content analysis of marine fish. Pukyong National University.
- Kwak, I.-S., C.W. Ji, W.-S. Kim and D. Kong. The List of Korean Organisms Registered in the NCBI Nucleotide Database for Environmental DNA Research. *Korean Journal of Ecology and Environment* **55**(4): 365-372.
- Kwon, O.K., G.M. Park and J.S. Lee. 1993. Korean Mollusks with Color Illustrations. Academy Book.
- Kown, S.J., Y.C. Jeon and J.H. Park. 2013. Aquatic Organism Encyclopedia: Benthic Macroinvertebrates. Nature and Ecology.
- Lee, C.S. 1997. Studies on the Feeding Activity and Environmental Tolerance of Geoduck Clam, *Panope japonica*. *Journal of Aquaculture* **10**(2): 213-218.
- Lee, J.-S. 2019. Invertebrate Fauna of Korea. National Institute of Biological Resources.
- Lee, S.-H., S.-J. Hwang and B.-H. Kim. 2008a. Grazing Effects of Freshwater Bivalve *Unio douglasiae* on the Hibernial Diatom Bloom in the Eutrophic Lake and Stream. *Korean Journal of Ecology and Environment* **41**(2): 237-246.
- Lee, Y.-J., B.-H. Kim, N.-Y. Kim, H.-Y. Um and S.-J. Hwang. 2008b. Effects of temperature, food concentration, and shell size on filtering rate and pseudofeces production of *Unio douglasiae* on *Microcystis aeruginosa*. *Korean Journal of Ecology and Environment* **41**: 61-67.
- Levins, R. 1968. Evolution in Changing Environments: Some Theoretical Explorations. Princeton University Press.
- Lindeque, P.K., A. Dimond, R.A. Harmer, H.E. Parry, K.L. Pemberton and E.S. Fileman. 2015. Feeding selectivity of bivalve larvae on natural plankton assemblages in the Western English Channel. *Marine Biology* **162**(2): 291-308.
- Morton, B. 1978. The biology and functional morphology of *Philobrya munita* (Bivalvia: Philobryidae). *Journal of Zoology* **185**(2): 173-196.
- NCBI, N.C.f.B.I. 2021. NCBI Nucleotide database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.
- Vaughn, C.C. and C.C. Hakenkamp. 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology* **46**(11): 1431-1446.