

## 어구조사 및 환경 DNA 메타바코딩을 이용한 태화강, 창원천 하구 생태계의 어류 군집 구조 및 종 다양성 평가

최희규<sup>1</sup>, 김유림<sup>1</sup>, 황순영<sup>1</sup>, 추연수<sup>2,3</sup>, 김평범<sup>2</sup>, 이혁제<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>상지대학교 생명과학과 분자생태및진화학실험실, <sup>2</sup>국립생태원 습지연구팀, <sup>3</sup>인하대학교 바이오시스템융합학과

### Investigation of fish community structure and species diversity in two river estuary ecosystems, the Taehwa River and Changwon Stream, based on conventional survey and eDNA metabarcoding

Hee-kyu Choi<sup>1</sup>, Yu Rim Kim<sup>1</sup>, Soon Young Hwang<sup>1</sup>, Yeonsu Chu<sup>2,3</sup>, Pyoungbeom Kim<sup>2</sup> and Hyuk Je Lee<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Ecology and Evolution Laboratory, Department of Biological Science, Sangji University, Wonju 26339, Republic of Korea

<sup>2</sup>Wetlands Research Team, National Institute of Ecology, Changnyeong 50303, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Biological Science and Bioengineering, Inha University, Incheon 22212, Republic of Korea

#### Contribution to Environmental Biology

- The river estuary ecosystems harbored diverse fish species, such as carp, goby, and marine fish, with divergent life histories.
- Some migratory fish were observed in the Taehwa River, suggesting a relatively high connectivity from the mouth to down-to-mid stream and a branch of the river.
- The study findings suggest that eDNA can be utilized as a complementary and versatile tool to monitor fish community structure and species diversity in river systems.

#### \*Corresponding author

Hyuk Je Lee

Tel. 033-730-0436

E-mail. [hyukjelee@sangji.ac.kr](mailto:hyukjelee@sangji.ac.kr)

**Received:** 9 October 2023

**First revised:** 8 November 2023

**Second revised:** 3 December 2023

**Third revised:** 13 December 2023

**Revision accepted:** 22 December 2023

**Abstract:** River estuaries are dynamic and productive ecosystems with high regional biodiversity. Environmental DNA (eDNA) has become a useful approach to assessing biodiversity in aquatic ecosystems. This study was conducted to investigate fish community characteristics and species diversity in two river estuary ecosystems, the Taehwa River and Changwon Stream. We further compared conventional and eDNA metabarcoding analyses of the fish communities. The conventional survey was performed in May, July, and October 2022, while the eDNA analysis was conducted only in May. We observed various fish species with different life histories, including carp, goby, and marine fish. We also found that migratory fish, such as dace *Tribolodon hakonensis*, sweetfish *Plecoglossus altivelis*, and eel *Anguilla japonica*, occurred in the Taehwa River, suggesting high river connectivity. Marine fish species were predominant in the Changwon Stream, as this river is located close to the sea. The diversity indices showed that the Taehwa River generally had higher species richness, evenness, and diversity values than the Changwon Stream. A total of 9–19 species were detected in the

conventional survey for the three sites, whereas 11–18 species were found from eDNA analysis. The findings indicate that the sensitivity of eDNA was similar to or higher than that of the conventional method. Our study findings suggest the efficiency and efficacy of eDNA-based fish community monitoring, although with some shortcomings in applying the genetic marker to Korean fish, including no clear-cut distinction for Korean endemic species and/or genetically closely related species groups.

**Keywords:** amphidromous fishes, aquatic ecosystem monitoring, environmental DNA (eDNA), fish community, river-estuarine ecosystem

## 1. 서 론

환경변화와 인간 활동으로 인하여 전 세계적으로 생물 다양성(biodiversity)이 감소하고 있으며, 특히 담수생태계는 최근 지구상에서 가장 취약한 생태계 중 하나로서 종 다양성이 급감하고 있다(Harrison *et al.* 2018; Kim and Song 2021; Hu *et al.* 2022). 최근 세계자연기금(World Wildlife Foundation, WWF)에서 2018년에 발표한 지구생명지수 보고서(The 2018 Living Planet Index, LPI)에 의하면 1970년 이후 담수생물종 개체군은 평균 83% 감소하여 육상과 해양생물에 비해 훨씬 더 가파른 속도로 감소하고 있다고 보고되었다(Harrison *et al.* 2018; WWF 2018). 담수생태계에서 소비자로서 중요한 생태적 기능을 수행하는 어류는 기후변화, 수질오염, 서식지 파괴, 외래종의 침입, 남획 등의 영향으로 개체수가 현저히 감소하고 있다(Dudgeon *et al.* 2006; Reid *et al.* 2019; Kim and An 2021; Hu *et al.* 2022). 담수와 해수(염수)가 만나는 기수역인 하구(estuary) 생태계는 특히 높은 생산성을 나타내어 생물 다양성이 높고 고유 생물종들이 많이 분포하며 높은 생태계서비스 가치를 지니고 있다(Kumari *et al.* 2020). 하구 생태계는 하천과 바다의 경계를 나타내는 지리적인 특성으로 인해 1차 담수어류, 기수성(brackish) 어류, 회유성(amphidromous) 어류 및 해양성 어류 등 다양한 생활사 특성을 나타내는 어류들이 출현하며, 상류에서 내려오는 유기물과 영양분이 밀집되어 생물에게 풍부한 먹이 자원을 제공함으로써 종 다양성이 높은 특성을 나타낸다(Elliott and McLusky 2002; Kim *et al.* 2022; Park *et al.* 2022). 하구 생태계를 구성하는 대표 생물인 어류의 군집 구조 특성 및 어류상, 종 다양성을 파악하는 것은 수생태계 모니터링의 핵심 지표 중 하나로서 생태적 보전 가치를 평가할 수 있다(Zou *et al.* 2020).

수생태계 군집의 안정성과 건강성 평가를 위해서는 생물 다양성에 대한 주기적인 모니터링이 중요하다(McCann

2000; Kim and Song 2021). 전통적인 어류 생물 다양성 모니터링 방법은 직접 포획 조사 방법으로 족대와 투망과 같은 어구를 이용하여 생물을 물리적으로 포획하고 관찰에 의존하여 동정하고 있다. 하지만 이러한 방법은 많은 노력과 시간이 소요되고, 연구대상종 및 생태계를 교란할 수 있으며, 개체수가 적은 희귀종이나 멸종위기종을 탐지하기 어렵고, 조사자의 조사 방법과 분류학적 지식에 따라 결과가 달라질 수 있다(Hopkins and Freckleton 2002; Alam *et al.* 2020; Kim and Song 2021). 이러한 직접 포획 조사의 단점을 보완할 수 있는 효과적인 방법으로는 환경 DNA (environmental DNA, eDNA)를 활용한 접근법이 있다(Pikitch 2018).

환경 DNA는 물, 토양, 대기 등 다양한 환경에 존재하는 생물의 DNA를 말하며 피부조직, 점액질, 분비물, 타액, 땀, 털, 생식세포 등 다양한 형태로 존재한다(Bohmann *et al.* 2014; Thomsen and Willerslev 2015). 담수생태계에서 환경 DNA를 활용한 모니터링 방법은 환경 시료만 확보되면 되기 때문에 조사 환경에 의한 영향이 적고, 조사 시간 및 인력, 비용이 절감될 수 있다(Pikitch 2018; Kim *et al.* 2020a). 또한, 동정이 가능한 분류군 또는 종 탐지 범위가 넓어 환경 DNA를 통해 누락되는 생물종 없이 민감하게 종의 유무를 판별하여 종 다양성 평가에 유용하며, 종 동정의 재현성과 정확성이 높아 분류학적 해상도를 높일 수 있는 장점이 있다(Smart *et al.* 2015; Creer *et al.* 2016; Ruppert *et al.* 2019). 환경 DNA는 특정 분류군의 범용 프라이머(universal primer)를 사용하여 타겟 유전자 마커를 증폭하고, 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing, NGS)을 통해 확보된 짧은 단편의 염기서열 정보를 분석하여 종을 탐지하고 종 구성을 파악할 수 있는데, 이를 메타바코딩(metabarcoding) 기법이라 한다(Ruppert *et al.* 2019).

국외에서는 환경 DNA 메타바코딩 기법을 적용하여 담수생물을 포함한 생물 다양성 모니터링 기술로서 효율성과 과학적 정확성이 검증되었다(Taberlet *et al.* 2012;

Thomsen *et al.* 2012; Bohmann *et al.* 2014; Bálint *et al.* 2018). 호주 남부 2개의 하천을 대상으로 어구를 이용한 현장조사와 환경 DNA를 통한 담수어류 군집 구조 (community structure) 비교 분석 결과, 환경 DNA 분석 기반 어류 종 탐지가 100%의 성공률을 나타낸 바 있다 (Shaw *et al.* 2016). 일본에서는 환경 DNA 분석을 통해 절멸위기종인 뱀장어 개체군의 하천 내에서의 분포, 개체수 및 생물량을 추정하여 61개 하천 지점 중 56개 지점에서 탐지하여 92%의 탐지율을 나타냈다 (Thomsen *et al.* 2012; Itakura *et al.* 2019). 국외에서는 환경 DNA 연구가 정성적 조사(대상 생물종 존재 유무)뿐만 아니라 정량적 분석(개체수/생물량 추정)으로 확장되고 있으며, 더 나아가 현재의 종 구성을 정확하게 파악하기 위해서 환경 RNA (environmental RNA, eRNA) 연구가 수행되고 있다 (Cristescu 2019).

환경 DNA를 활용한 국내 생물모니터링 연구로는 해양생태계를 대상으로 침입종 조기 탐지를 위한 기법 개발 (Kim *et al.* 2018), 인간 활동이 해양 미소 생물 군집 구조에 미치는 영향 (Won *et al.* 2017), 연안 생태계의 식물 플랑크톤 군집의 시·공간적 변동양상 (Boopathi *et al.* 2015) 연구 등이 수행되었다. 또한, 도시 생태하천을 대상으로 현장조사와 환경 DNA를 통한 종 다양성 비교를 통해 어류

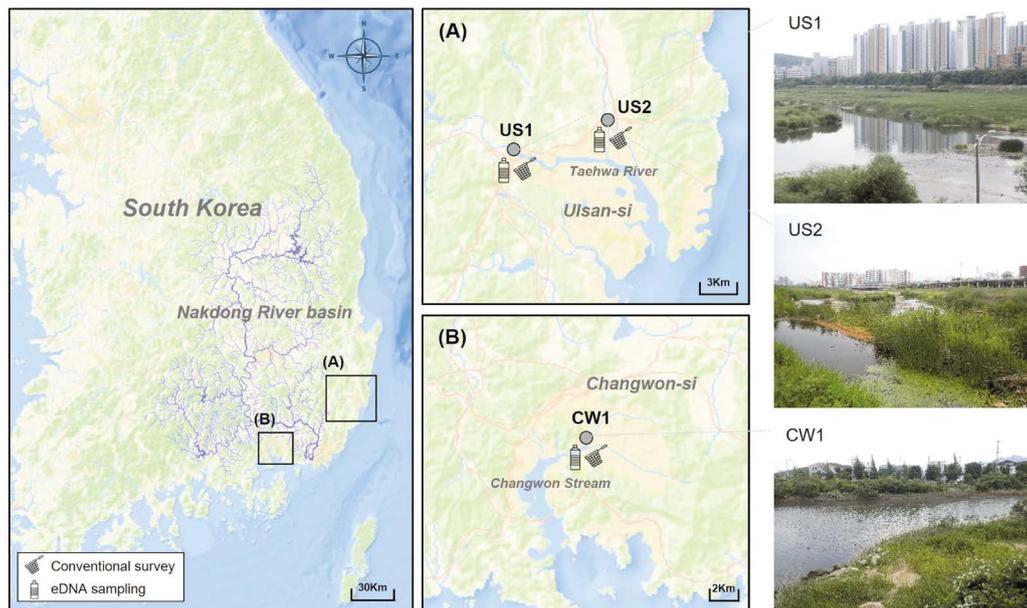
군집조사 적용 가능성 검증 및 담수어류 종 다양성 평가 연구 등이 수행되었다 (Song *et al.* 2019; Alam *et al.* 2020). 하지만 국내 담수생태계를 대상으로 환경 DNA를 이용한 생물다양성 연구사례는 아직 미흡한 실정이며, 환경 DNA를 활용한 수생태계 모니터링 연구(외래종 확산 모니터링 등)의 확대가 필요할 것으로 생각된다 (Song *et al.* 2019; Kim *et al.* 2020a; Jung *et al.* 2022; Kang *et al.* 2023).

본 연구에서는 국내 낙동강 수계 하구 생태계를 대표하는 내륙 습지인 태화강과 창원천의 어류 군집 구조와 종 다양성을 평가하고, 각 하천별 어류 군집의 계절적 변동 양상을 파악하고자 하였다. 더 나아가 어구를 이용한 현장조사와 환경 DNA 메타바코딩 분석을 함께 병행하여 각각 방법으로 확인된 어류 군집 구조와 종 다양성을 비교 분석하여 환경 DNA를 이용한 국내 수생태계 모니터링의 유효성을 검증하고 활용 방안을 논의하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 연구대상 지역

본 연구는 국립생태원 하구 생태계 조사의 일환으로 수행되었으며, 연구대상 하천은 낙동강 수계 하구 생태계를



**Fig. 1.** (A) Map showing the two study sites, US1 and US2, at the Taehwa River in Ulsan, and (B) a single site, CW1, at the Changwon Stream in Changwon in South Korea (US1: 35°33'32.53"N 129°15'56.25"E; US2: 35°33'35.73"N 129°21'11.69"E; CW1: 35°13'25.65"N 128°38'9.44"E).

대표하는 내륙 습지 하천인 태화강(Taehwa River)과 창원천(Changwon Stream)으로 선정하였다. 하천 내 조사지점은 태화강 분류 1개 지점(US1)과 지류 1개 지점(US2), 창원천 분류 1개 지점(CW1)으로 총 3개의 지점을 대상으로 수행되었다. 어구를 이용한 어류 현장조사의 경우 2022년 5월, 7월, 10월 3회, 환경 시료 물을 이용한 환경 DNA 메타바코딩 분석은 2022년 5월 1회 실시하였다(Fig. 1, Table 1).

## 2.2. 조사 방법

### 2.2.1. 어류의 채집 및 분류

어류의 채집은 투망(망목, 7×7 mm)과 족대(망목, 5×5 mm)를 이용하여 정량조사를 수행하였다. 투망은 조사지점 내 각기 다른 장소에서 12회, 족대는 다양한 미소서식처에서 40분 동안 실시하였다. 채집된 어류는 도설(Kim 1997; Kim and Park 2002)을 참고하여 동정하였으며, 사진 촬영 및 동정 후 모두 채집지점에 즉시 방류하였다. 종 동정은 Nelson (2006)의 분류체계를 따라 실시하였다. 추가적으로 2016~2021년도 기간 수행된 수생태계건강성평가(Survey and Evaluation of Aquatic Ecosystem Health, SEAEH) 현장조사 결과(하구: 태화강01, 태화강02, 태화강03, 태화강04, 하천: 창원천1)를 참고하여 본 조사 결과와 비교 분석하였다(MOE/NIBR 2016~2021).

### 2.2.2. 이·화학적 환경 특성

조사지점의 이·화학적 환경특성을 파악하기 위해서 수심, 유속 등 물리적 수환경과 수온, 염도(salinity) 등 이·화학적 수환경데이터를 확보하였다(Table 1). 수온과 염도는 Hanna Multi parameter (HI98194; Hanna Instruments, Netherlands)를 이용하여 3회 측정하였으며, 유속과 수심은 Water Velocity Meter (Fp1111; Global Water, USA)를 이용하여 측정하였다.

### 2.2.3. 환경 시료 채수 및 환경 DNA 추출

환경 시료의 채수 시 조류의 시간은 태화강 인근인 울산항에서 간조 11:17분, 만조 18:05분, 창원천 인근의 마산항에서 간조 12:01분, 만조 18:46분으로 확인되었으며, 채수된 시간은 US1에서 13:30분, US2 15:14분, CW1 10:07분으로 세 지점 모두 밀물 시간에 채수가 수행되었다(Table 1). 각 지점별 수면으로부터 5 cm 이하의 표층

**Table 1.** Physicochemical characteristics of fish community structure and species diversity at three sampling sites based on a conventional survey using cast nets and kick nets and environmental DNA (eDNA) analysis of water samples from two rivers (the Taehwa River and Changwon Stream) in the Nakdong River basin in South Korea

River	Date	Station	GPS location	eDNA water sampling time (date)	Tidal time (low/high)	Survey	Water depth (cm)	Water flow rate (m s <sup>-1</sup> )	Temperature (°C)	Salinity (psu)
Ulsan Taehwa River	2022.05.13-14 (1st)	US1	35°33'32.53"N 129°15'56.25"E	13:30 (05/13)	11:17/18:05	1st	22.75	0.08	20.82	0.21
	2nd					25.94	0.38	28.13	0.17	
	3rd					27.50	0.25	21.30	0.19	
Changwon Taehwa River	2022.07.07-08 (2nd)	US2	35°33'35.73"N 129°21'11.69"E	15:14 (05/13)	12:01/18:46	1st	15.50	0.36	21.39	0.34
	2nd					25.55	0.36	29.27	0.28	
	3rd					28.25	0.56	20.80	0.29	
Changwon Changwon Stream	2022.05.11-12 (1st)	CW1	35°13'25.65"N 128°38'9.44"E	10:07 (05/11)	12:01/18:46	1st	35.29	0.22	21.99	11.99
	2nd					29.54	0.05	28.40	11.32	
	3rd					31.32	0.44	21.68	11.42	

에서 2 L씩 채수하였으며, 채집한 모든 시료는 무균 채수 병(2 L)에 담아 4°C 이하의 온도에서 보관하여 실험실로 운반하였다. 담수 시료는 0.45 µm membrane filter (GN-6 MetriCel®, Pall, USA)와 진공펌프(GAST, USA), 필터링 용기(NALGENE®, USA)를 이용하여 지점마다 500 mL씩 2번 필터링하였다(Alam *et al.* 2020). 필터링 시 발생 가능한 오염 방지를 위하여 10% 표백제에 필터링 용기(NALGENE®, USA)와 핀셋을 소독 후, 증류수로 완전히 헹군 뒤 이용하였으며, 이후 여과된 필터지는 lysis buffer (Qiagen, Germany)가 들어있는 2 mL tube (Eppendorf, Germany)에 넣어 즉시 DNA 추출에 이용하였다(Helbing and Hobbs 2019). 환경 DNA의 추출은 여과된 필터지를 ~1 mm 크기로 잘게 자른 후 Tissue Lyser II motorized homogenizer (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 균질화하였다. 전처리가 완료된 샘플은 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)를 이용하여 농도 측정 후 -80°C 초저온냉동고에 보관하였다.

#### 2.2.4. NGS 및 생물정보 분석

환경 DNA를 이용한 NGS 기반의 담수어류종 분석을 위해 미토콘드리아 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 12S rRNA 유전자를 표적으로 하는 MiFish 범용 프라 이머(Miya *et al.* 2015)를 이용하여 library를 구축하였다(MiFish-U-F: 5'-GTCGGTAAAACTCGTGCCAGC-3'; MiFish-U-R: 5'-CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGT TTG-3'). NGS 분석을 위한 1차 amplicon 생성은 genomic DNA (10 ng µL<sup>-1</sup>)를 사용하여 94°C에서 3분간 초기 변성 후, 94°C에서 20초, 60°C에서 15초, 72°C에서 15초를 35회 반복, 이후 72°C에서 5분간 최종 신장하였다. 증폭한 PCR product는 전기영동 후 예상 product size인 240 bp gel을 Accuprep® Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제하였다. Nextera XT index Kit (Illumina, USA)를 이용하여 라이브러리를 제작하고, Illumina MiSeq platform (2 × 300 bp)를 사용하여 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열 분석 결과는 CLC genomic Workbench ver 8.0 (CLC Bio, USA)를 이용하여 quality filtering을 하였으며(QV > 20), Miseq data analysis pipeline에 따

라 생물정보분석을 수행하였다. 획득한 조작분류단위 (operational taxonomic unit, OTU)는 BLASTn를 이용하여 description을 하였으며, 97% 이상의 동일성(identity)을 나타내면 종(species), 97%에서 90%의 동일성은 속(genus), 90% 미만의 동일성은 미확인(unknown)으로 기술하였다. 생태적 해석을 위해 각 할당된 OTU read 수의 상대적 풍부도(relative abundance) 수치를 이용하여 각 지점별 군집 내 조성 비율을 계산하였으며, Primer-e v7 (PRIMER-E Ltd, UK)를 이용하여 군집유사도 클러스터링 분석(clustering analysis) 및 heat-map 분석을 수행하여 각각의 결과를 시각화하였다(Clarke and Gerley 2015).

#### 2.2.5. 군집 분석

어류 현장조사 결과를 이용한 군집 분석은 각 지점, 시기의 어류 출현종과 개체수 데이터를 이용하였고 환경 DNA를 이용한 군집 분석은 각 조사지점에서 확인된 OTU read 수를 기준으로 우점도지수(Dominance Index, DI), 다양도 지수(Shannon Index, SI), 균등도지수(Pielou's Evenness, J'), 풍부도지수(Species Richness, d)를 산출하였다(Shannon and Weaver 1949; Pielou 1966; McNaughton 1967; Margalef 1968).

### 3. 결 과

#### 3.1. 이·화학적 환경 특성

조사지역에서 총 3회 이·화학적 수환경을 측정한 결과 US1 지점의 경우 수심 22.75 (1차), 25.94 (2차), 27.50 (3차) cm, 유속 0.08 (1차), 0.38 (2차), 0.25 (3차) m s<sup>-1</sup>, 수온 20.82 (1차), 28.13 (2차), 21.30 (3차)°C, 염도 0.21 (1차), 0.17 (2차), 0.19 (3차) psu, US2 지점에서 수심 15.50 (1차), 25.55 (2차), 28.25 (3차) cm, 유속 0.36 (1차), 0.36 (2차), 0.56 (3차) m s<sup>-1</sup>, 수온 21.39 (1차), 29.27 (2차), 20.80 (3차)°C, 염도 0.34 (1차), 0.28 (2차), 0.34 (3차) psu, CW1 지점에서 수심 35.29 (1차), 29.54 (2차), 31.32 (3차) cm, 유속 0.22 (1차), 0.05 (2차), 0.44 (3차) m s<sup>-1</sup>, 수온 21.99 (1차), 28.40 (2차), 21.68 (3차)°C, 염도 11.99 (1차), 11.32 (2차), 11.42 (3차) psu로 연안에 더 인접한 창원천 CW1 지점이 태화강 두 지점보다 염도가 모든 시기에 더 높게 나타났다(Table 1). 유속은 태화강 지류 지점인 US2(평균 0.43 m

$s^{-1}$ )에서 본류 지점인 US1 (평균  $0.24 m s^{-1}$ )과 창원천 지점인 CW1 (평균  $0.24 m s^{-1}$ )보다 높게 나타났다(Table 1).

### 3.2. 어구를 이용한 어류 군집 구조 및 종 다양성

현장 어류 군집 조사 결과, 태화강 전체 지점에서 출현한 종 및 개체수는 총 5목 9과 23종 666개체로 확인되었으며, 전체 출현종 중 우점종은 피라미(*Zacco platypus*, 29.0%), 아우점종은 송어(*Mugil cephalus*, 25.2%), 다음으로 민물검정망둑(*Tridentiger brevispinis*, 10.1%), 배스(*Micropterus salmoides*, 8.7%), 누치(*Hemibarbus labeo*, 4.5%), 황어(*Tribolodon hakonensi*, 3.6%), 블루길(*Lepomis macrochirus*, 3.5%), 은어(*Plecoglossus altivelis*, 3.2%) 등 순으로 출현하였다(Table 2). 고유종은 동방종개(*Iksookimia yongdokensis*), 참물개(*Squalidus chankaensis tsuchigae*), 얼룩동사리(*Odontobutis interrupta*), 동사리(*Odontobutis platycephala*) 4종(4.5%)의 서식이 확인되었으며, 생태계교란생물의 경우 블루길, 배스 2종(12.2%)이 관찰되었다. 각 지점별로 나누어 분석한 결과 태화강 본류 US1 지점의 전체 출현종 및 개체수는 총 4목 7과 17종 360개체로 확인되었으며, 우점종은 피라미(40.3%), 아우점종은 배스(15.0%), 다음으로 민물검정망둑(14.7%), 송어(6.1%), 누치(4.7%), 블루길(4.7%), 참물개(3.3%) 등 순으로 출현하였다(Table 2). 고유종은 참물개, 동사리 2종(1.2%)의 서식이 확인되었으며, 생태계교란생물의 경우 블루길, 배스 2종(19.7%)이 관찰되었다. 시기별 조사 결과에서는 1차(5월) 4목 6과 11종 64개체, 2차(7월) 4목 7과 14종 175개체, 3차(10월) 4목 7과 12종 121개체로 7월 조사에서 가장 많은 종과 개체수가 확인되었다. 태화강 지류 US2 지점의 경우 총 5목 9과 19종 306개체로 우점종은 송어(47.7%), 아우점종은 피라미(15.7%)가 확인되었고 황어(7.5%), 민물검정망둑(4.6%), 누치(4.2%), 은어(3.9%), 잉어(*Cyprinus carpio*, 2.3%) 등 순으로 출현하였다(Table 2). 고유종은 얼룩동사리 1종(0.5%)이 확인되었으며, 생태계교란생물인 블루길, 배스 2종(1.1%)이 관찰되었다. 시기별 조사 결과에서는 1차 5목 8과 11종 51개체, 2차 5목 8과 15종 168개체, 3차 4목 6과 12종 87개체로 채집되었으며 US1 지점과 동일하게 2차 조사에서 가장 많은 종과 개체수가 확인되었다. 창원천 CW1 지점에서 채집된 전체 출현종을 종합한 결과, 4목 5과 9종 466개체로 우점종은 송

어(65.0%), 아우점종은 민물검정망둑(17.8%)이 확인되었으며, 두줄망둑(*Tridentiger trigonocephalus*, 7.0%), 잉어(3.9%), 꼭저구(*Gymnogobius urotaenia*, 2.8%), 문절망둑(*Acanthogobius flavimanus*, 1.9%) 등 순으로 출현하였다(Table 2).

각 지점에서 시기별(계절별) 산란시기에 이동성을 나타내는 양측회유성(amphidromous), 소하성(anadromous) 및 강하성(catadromous) 어류의 출현 양상을 조사한 결과 US1 지점과 US2 지점에서 양측회유성 어류인 은어, 소하성 어류 황어, 강하성 어류 뱀장어(*Anguilla japonica*)가 관찰되었다. US1 지점에서 황어가 1차, 3차 조사에서는 관찰되지 않았지만 2차 조사에서 1개체가 확인되었으며, 은어는 1차 1개체, 2차 5개체, 3차 3개체로 조사 기간 모두 관찰되었다. US2 지점의 경우 1, 2차 조사에서 뱀장어 각각 1개체씩 관찰되었으며 3차 조사에서는 관찰되지 않았다. 황어의 경우 1차 3개체, 2차 15개체, 3차 5개체가 확인되었다. 은어는 1차 6개체, 2차 3개체, 3차 3개체로 모든 조사 시점에서 관찰되었다(Table 2). 태화강과 달리 창원천 CW1 지점은 회유성 어류가 모든 조사 시기에 관찰되지 않았다.

어구를 이용한 어류 군집 현장조사 결과를 기반으로 종 다양성 수치를 계산한 결과 우점도지수(DI)는 US1 지점에서 0.641 (1차), 0.594 (2차), 0.694 (3차), 0.553 (전체), US2 지점에서 0.569 (1차), 0.667 (2차), 0.667 (3차), 0.634 (전체), CW1 지점에서 0.757 (1차), 0.922 (2차), 0.767 (3차), 0.828 (전체), 풍부도지수(d)는 US1 지점에서 2.171 (1차), 2.823 (2차), 2.389 (3차), 3.474 (전체), US2 지점에서 2.171 (1차), 3.040 (2차), 2.389 (3차), 3.909 (전체), CW1 지점에서 1.086 (1차), 1.520 (2차), 1.303 (3차), 1.737 (전체), 균등도지수(J')는 US1 지점에서 0.742 (1차), 0.738 (2차), 0.616 (3차), 0.696 (전체), US2 지점에서 0.765 (1차), 0.644 (2차), 0.718 (3차), 0.655 (전체), CW1 지점에서 0.756 (1차), 0.270 (2차), 0.702 (3차), 0.525 (전체), 다양도지수(SI)는 US1 지점에서 1.779 (1차), 1.947 (2차), 1.530 (3차), 1.971 (전체), US2 지점에서 1.835 (1차), 1.745 (2차), 1.785 (3차), 1.930 (전체), CW1 지점에서 1.355 (1차), 0.562 (2차), 1.366 (3차), 1.154 (전체)로 확인되었다(Table 3). 각 시기별 다양도지수를 비교한 결과 US1 지점의 경우 2차 조사 시 가장 낮은 우점도지수(0.594)와 높은 풍부도지수(2.823), 다양도지수(1.947), US2 지점은 1차 조사 시 가장 낮은 우점도지수(0.569)와 높은 균등도지수(0.765),

**Table 2.** Results of the fish community structure at three sites (the Taehwa River: US1, US2; the Changwon Stream: CW1) in the Nakdong River basin based on a conventional survey and environmental DNA (eDNA) analysis. The conventional survey was undertaken three times on a seasonal basis in 2022 (May, July, and October), while the eDNA investigation was conducted only in May

Species detected	US1						US2						CW1						
	Conventional survey			eDNA analysis			Conventional			eDNA			Conventional			eDNA			
	1st	2nd	3rd	Total	Number of reads	%	1st	2nd	3rd	Total	Number of reads	%	1st	2nd	3rd	Total	Number of reads	%	
<i>Anguilla japonica</i>							1	1		2	129	0.1							
<i>Oryzias latipes</i>											75	<0.1							
<i>Konosirus punctatus</i>																			
<i>Cobitis hankugensis</i>	1	2	1	5							380	0.3					19,419	9.0	
* <i>Iksookimia yongdokensis</i>					692	1.3													
<i>Kichulchoia multifasciata</i>				1			1		1										
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>				1	1,860	3.6		4	4	4	1,715	1.5					6,471	3.0	
<i>Carassius auratus</i>	1			1							58	<0.1							
<i>Coreoleuciscus splendidus</i>				3	420	0.8		7	7	7			4	13	1	18			
<i>Cyprinus carpio</i>	7	7	3	17			1	7	5	13									
<i>Hemibarbus labeo</i>				3															
<i>Opsariichthys uncirostris</i>	1		2	3					6	6	217	0.2							
<i>Rhynchoypris oxycephalus</i>				3				3	3	3	97	<0.1							
* <i>Squalidus chankaensis tsuchigae</i>	1	11		12															
<i>Tribolodon hakonensis</i>	1			1	1,060	2.1	3	15	5	23	26,369	23.2							
<i>Zacco koreanus</i>					1,233	2.4					144	0.1							
<i>Zacco platypus</i>	16	57	72	145			1	25	22	48									
<i>Mugil cephalus</i>	4	11	7	22	23,095	44.7	23	87	36	146	81,692	71.8	9	257	37	303	169,220	78.4	
<i>Plecoglossus altivelis</i>	1	5	3	9	175	0.3	6	3	3	12	1,256	1.1					330	0.1	
† <i>Lepomis macrochirus</i>				5	4,117	8.0	5		1	6									
† <i>Micropterus salmoides</i>	47	7	54	108	2,818	5.5		3	1	4	321	0.3							
<i>Coreoperca herzi</i>								2		2									
<i>Acanthogobius flavimanus</i>							2	3	1	6			1	4	4	9	2,746	1.2	
<i>Acanthogobius lactipes</i>														1		1			
<i>Gymnogobius urotaenia</i>							1		1	1	31	<0.1			12	13			

Table 2. Continued

Species detected	US1						US2						CW1					
	Conventional survey			eDNA analysis			Conventional			eDNA			Conventional			eDNA		
	1st	2nd	3rd	Total	Number of reads	%	1st	2nd	3rd	Total	Number of reads	%	1st	2nd	3rd	Total	Number of reads	%
<i>Mugilogobius abei</i>																	3,967	1.8
<i>Pseudogobius masago</i>																	4,987	2.3
<i>Rhinogobius brunneus</i>	2	3	4	9	5,440	10.5			2	2	549	0.5						
<i>Rhinogobius giurinus</i>																	676	0.3
<i>Tridentiger brevispinis</i>	25	20	8	53			5	6	3	14			29	12	42	83		
<i>Tridentiger obscurus</i>					18	<0.1							24	3	6	33	3,084	1.4
<i>Tridentiger trigonocephalus</i>																	4,359	2.0
<i>Nuchequula nuchalis</i>																	476	0.2
<i>Lateolabrax japonicus</i>																		
<i>Lateolabrax maculatus</i>																		
<i>*Odontobutis interrupta</i>							3	1	2	6	81	<0.1						
<i>*Odontobutis platycephala</i>	4	2	1	7	705	1.4					482	0.4						
<i>Platichthys stellatus</i>													3					
<i>Oncorhynchus masou</i>																	109	0.1
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>																	36	<0.1
Number of species	11	14	12	17	12		11	15	12	19	18		6	8	7	9	11	
Number of individuals (reads)	64	175	121	360	51,633		51	168	87	306	113,741		70	293	103	466	215,735	

\*: Korean endemic species, †: Introduced species

다양도지수(1.835)로 확인되었으나, CW1 지점의 종 다양성 수치는 2차 조사 시 가장 높은 우점도지수(0.922), 가장 낮은 균등도지수(0.270)와 다양도지수(0.562)를 나타냈다(Table 3). 각 지점별로 다양성 전체 수치 비교 분석 결과, 창원천의 CW1 지점이 태화강의 두 지점보다 0.194~0.275 높은 우점도지수와 1.737~2.172 낮은 풍부도지수, 0.130~0.171 낮은 균등도지수, 0.776~0.817 낮은 다양성지수 수치가 확인되었다(Table 3).

### 3.3. 환경 DNA 어류종 탐지 및 종 다양성

전체 3개 조사지점에서 담수시료에 대해 환경 DNA 분석 결과, 총 749,303개의 raw reads를 얻었으며, 이 중

381,109개의 merged reads (50.86%)가 확인되었다(Table 4). 현재 국내에 서식하는 어종들의 12S rRNA 유전자 마커에 대한 DB 정보가 상대적으로 부족하여 고유종이거나, 유전적으로 가까운 근연종의 경우 명확하게 종 판별이 되지 않는 경우가 존재하였다. 따라서, 본 연구에서 검출이 확인된 DNA reads 중 국내 서식이 확인되지 않거나 국외(일본, 중국)의 근연종으로 확인된 경우는 Jang *et al.* (2001)에 의해 동일 하천에서 실시된 어류 조사 결과와 2016~2021 년도에 수행된 수생태계건강성평가(MOE/NIBR 2016~2021) 현장조사 결과(하구: 태화강01, 태화강02, 태화강03, 태화강04, 하천: 창원천1)를 참고하여 보정하였다. 구체적인 예시로는, 기벨리오붕어(*Carassius gibelio*)는 국

**Table 3.** Diversity indices (Dominance Index, DI; Species Richness; d, Pielou's Evenness; J' and Shannon Index; SI) estimated from three sites in two rivers (the Taehwa River: US1, US2; the Changwon Stream: CW1) based on a conventional survey and environmental DNA (eDNA) analysis (Shannon and Weaver 1949; Pielou 1966; McNaughton 1967; Margalef 1968)

Site	Survey	Number of species	Dominance Index (DI)	Species Richness (d)	Pielou's Evenness (J')	Shannon Index (SI)
US1	Conventional (1st)	11	0.641	2.171	0.742	1.779
	Conventional (2nd)	14	0.594	2.823	0.738	1.947
	Conventional (3rd)	12	0.694	2.389	0.616	1.530
	Conventional (total)	17	0.553	3.474	0.696	1.971
	eDNA	12	0.677	2.389	0.661	1.642
US2	Conventional (1st)	11	0.569	2.171	0.765	1.835
	Conventional (2nd)	15	0.667	3.040	0.644	1.745
	Conventional (3rd)	12	0.667	2.389	0.718	1.785
	Conventional (total)	19	0.634	3.909	0.655	1.930
	eDNA	18	0.950	3.692	0.288	0.834
CW1	Conventional (1st)	6	0.757	1.086	0.756	1.355
	Conventional (2nd)	8	0.922	1.520	0.270	0.562
	Conventional (3rd)	7	0.767	1.303	0.702	1.366
	Conventional (total)	9	0.828	1.737	0.525	1.154
	eDNA	11	0.874	2.171	0.379	0.910

**Table 4.** Summary of the taxonomic assignments of DNA reads generated by Illumina MiSeq from three sites in two rivers (the Taehwa River and Changwon Stream)

	Ulsan Taehwa River		Changwon Changwon Stream	Total
	US1	US2	CW1	
Raw reads	204,354	171,197	373,752	749,303
Processed merged reads	51,633	113,741	215,735	381,109
Total number of species	12	18	11	30

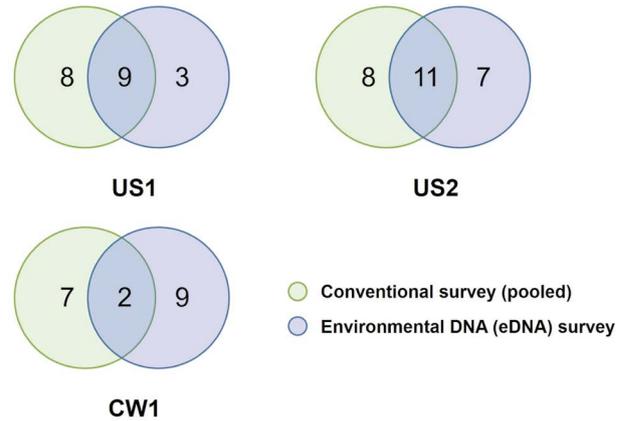
**Table 5.** Corrections to assigned fish species by the Mifish pipeline, based on the results of a previous ecological survey

Before correction	After correction	Reference
<i>Carassius gibelio</i>	<i>Carassius auratus</i>	Jang et al. (2001);
<i>Zacco temminckii</i>	<i>Zacco koreanus</i>	MOE/NIBR
<i>Rhinogobius</i> sp.	<i>Rhinogobius brunneus</i>	(2016–2021)

내 서식이 보고되지 않았기 때문에 조사지점에 서식하는 것으로 알려진 붕어(*Carassius auratus*)로, 갈겨니(*Zacco temminckii*)의 경우 울산 태화강의 상류부에 서식하는 참갈겨니(*Zacco koreanus*)로, 밀망둑류(*Rhinogobius* spp.)의 경우 대상 하천에 밀망둑속(genus *Rhinogobius*)은 밀어(*Rhinogobius brunneus*) 한 종만 서식하는 것으로 보고되어 밀어로 보정하였다(Table 5). 각 지점의 어류탐지 결과 US1 지점에서 204,354 raw reads 중 51,633개의 merged reads로 4목 7과 12종이 확인되었다. 우점종은 송어(44.7%), 아우점종은 밀어(10.5%)로 확인되었으며, 블루길(8.0%), 배스(5.5%) 등의 순으로 확인되었으며, 다양성 분석 결과 우점도지수는 0.677, 풍부도지수는 2.389, 균등도지수는 0.661, 다양도지수는 1.642로 나타났다(Table 3). US2 지점의 경우 171,197 raw reads 중 113,741개의 merged reads로 8목 11과 18종이 확인되었다. 우점종은 송어(71.8%), 아우점종은 황어(23.2%)로 확인되었으며, 붕어(1.5%), 은어(1.1%) 등의 순으로 확인되었다. 다양성 분석 결과 우점도지수는 0.950, 풍부도지수는 3.692, 균등도지수는 0.288, 다양도지수는 0.834로 확인되었다. CW1 지점은 373,572 raw reads 중 215,735개의 merged reads로 5목 7과 11종으로 우점종은 송어(78.4%), 아우점종은 전어(*Konosirus punctatus*, 9.0%)로 확인되었으며, 붕어(3.0%), 애기망둑(*Pseudogobius masago*, 2.3%) 등의 순으로 확인되었으며, 우점도지수는 0.874, 풍부도지수는 2.171, 균등도지수는 0.379, 다양도지수는 0.910으로 확인되었다(Tables 2, 3).

### 3.4. 어구를 이용한 어류 군집 현장조사와 환경 DNA 분석 결과 비교

어구를 이용한 현장조사와 환경 DNA 어류 종 분석 결과를 합하여 태화강 US1 지점에서 총 20종이 확인되었으며, 송어, 배스, 잉어, 황어, 블루길, 은어, 밀어, 동사



**Fig. 2.** Venn diagram of fish species identified at the three stations in the two rivers (the Taehwa River: US1 and US2, and the Changwon Stream: CW1) by conventional (in green) and eDNA (in blue) surveys. The results of the conventional survey (i.e., species detected) were pooled over the three sampling periods (May, July, and October of 2022).

리, 붕어 9종(45.0%)이 두 조사 방법 모두에서 확인되었다(Figs. 2, 3). 현장조사에서 확인되었으나 환경 DNA에서 검출되지 않은 위음성(false negative)종으로는 8종(40.0%)으로 피라미, 민물검정망둑, 누치, 참물개, 끄리, 동방종개, 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*), 기름종개(*Cobitis hankugensis*)로 나타났으며, 현장조사에서 확인되지 않았으나, 환경 DNA에서만 검출된 위양성(false positive)종은 3종(15.0%)으로 수수미꾸리(*Kichulchoia multifasciata*), 참갈겨니, 검정망둑(*Tridentiger obscurus*)으로 확인되었다. US2 지점의 경우 총 26종이 확인되었으며 송어, 배스, 황어, 은어, 꼭저구, 밀어, 끄리, 얼룩동사리, 붕어, 버들치(*Rhynchocypris oxycephalus*), 뱀장어 11종(42.3%)이 두 조사 방법에서 모두 관찰되었다. 위음성 결과는 8종(30.7%)으로 피라미, 민물검정망둑, 누치, 잉어, 블루길, 문절망둑, 미꾸리, 꺾지이며 위양성 결과는 7종(26.9%)으로 동사리, 동방종개, 송사리(*Oryzias latipes*), 쉬리(*Coreoleuciscus splendidus*), 참갈겨니, 산천어/송어(*Oncorhynchus masou*), 동자개(*Pseudobagrus fulvidraco*)로 확인되었다. CW1 지점에서 확인된 18종 중 송어, 문절망둑 2종(11.1%)만 두 조사 모두에서 확인되었으며, 위음성 결과는 7종(38.9%) 민물검정망둑, 두줄망둑, 잉어, 꼭저구, 강도다리(*Platichthys stellatus*), 점농어(*Lateolabrax maculatus*), 흰발망둑(*Acanthogobius lactipes*), 위양성 결과는 9종(50.0%)으로 은어, 붕어, 전어, 모치망둑

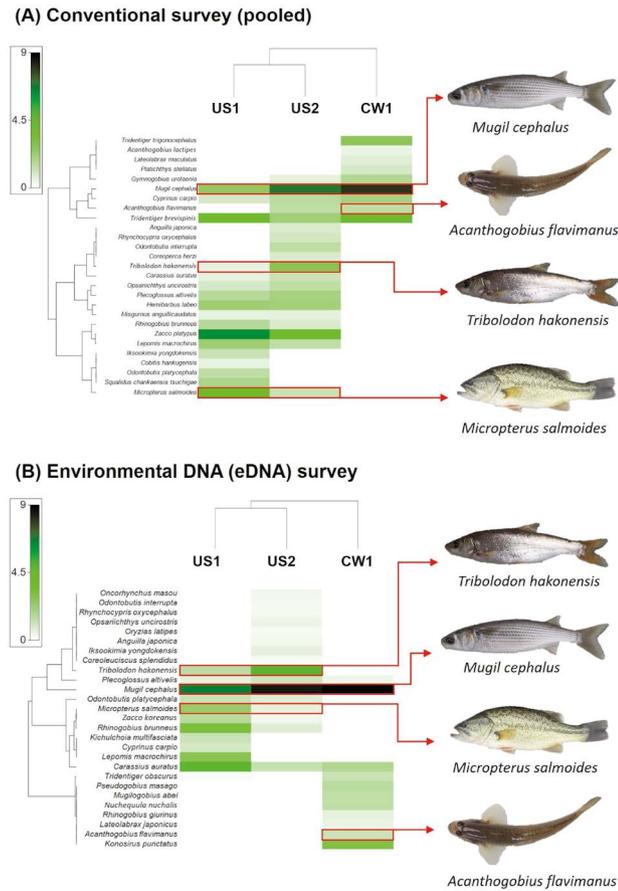
Detection  
 Non-detection

Species	US1		US2		CW1	
	Conventional survey (pooled)	eDNA survey	Conventional survey (pooled)	eDNA survey	Conventional survey (pooled)	eDNA survey
<i>Anguilla japonica</i>						
<i>Oryzias latipes</i>						
<i>Konosirus punctatus</i>						
<i>Cobitis hankugensis</i>						
<i>Iksookimia yongdokensis</i>						
<i>Kichulchoia multifasciata</i>						
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>						
<i>Carassius auratus</i>						
<i>Coreoleuciscus splendidus</i>						
<i>Cyprinus carpio</i>						
<i>Hemibarbus labeo</i>						
<i>Opsariichthys uncirostris</i>						
<i>Rhynchocypris oxycephalus</i>						
<i>Squalidus chankaensis tsuchigae</i>						
<i>Tribolodon hakonensis</i>						
<i>Zacco koreanus</i>						
<i>Zacco platypus</i>						
<i>Mugil cephalus</i>						
<i>Plecoglossus altivelis</i>						
<i>Lepomis macrochirus</i>						
<i>Micropterus salmoides</i>						
<i>Coreoperca herzi</i>						
<i>Acanthogobius flavimanus</i>						
<i>Acanthogobius lactipes</i>						
<i>Gymnagobius urotaenia</i>						
<i>Mugilogobius abei</i>						
<i>Pseudogobius masago</i>						
<i>Rhinogobius brunneus</i>						
<i>Rhinogobius giurinus</i>						
<i>Tridentiger brevispinis</i>						
<i>Tridentiger obscurus</i>						
<i>Tridentiger trigonocephalus</i>						
<i>Nuchequula nuchalis</i>						
<i>Lateolabrax japonicus</i>						
<i>Lateolabrax maculatus</i>						
<i>Odontobutis interrupta</i>						
<i>Odontobutis platycephala</i>						
<i>Platichthys stellatus</i>						
<i>Oncorhynchus masou</i>						
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>						

**Fig. 3.** Comparisons of species detected at the three stations in the two rivers (the Taehwa River: US1 and US2, and the Changwon Stream: CW1) by conventional and environmental DNA (eDNA) surveys. The boxes filled in grey represent species detected, and those not filled (in white) represent species not detected. The results of the conventional survey (i.e., the species detected) were pooled over the three sampling periods (May, July, and October of 2022).

(*Mugilogobius abei*), 애기망둑, 갈문망둑 (*Rhinogobius giurinus*), 검정망둑, 주둥치 (*Nuchequula nuchalis*), 농어

(*Lateolabrax japonicus*)로 확인되었다(Figs. 2, 3). 조사지점 및 조사 방법 간의 군집 유사도 평가를 위한 어



**Fig. 4.** Heatmap analyses of fish species identified at three sampling stations in the two rivers (the Taehwa River: US1 and US2, and the Changwon Stream: CW1). (A) Conventional survey results (pooled over the three sampling periods) and (B) environmental DNA (eDNA) analysis results.

류 군집 클러스터링 분석 결과 두 조사 방법 모두 울산 태화강의 두 지점(US1, US2)이 창원천(CW1)보다 상대적으로 더 유사한 군집 구조를 나타냈다(Fig. 4A, B). Heatmap 분석을 이용한 각 조사 방법의 어류 상대풍부도 비교 결과 울산 태화강의 두 지점에서 송어(US1; 현장조사: 6.1%/환경 DNA: 44.7%, US2; 47.7%/71.8%), 배스(US1; 15.0%/5.5%, US2; 1.3%/0.3%), 황어(US1; 0.3%/2.1%, US2; 7.5%/23.3%) 등 현장조사 시 개체수가 많이 확인된 종의 환경 DNA read 수 비율이 높게 나타나는 상관성을 보였지만, 현장조사 시 높은 비율로 확인된 피라미, 누치, 참물개 등의 경우에는 환경 DNA read가 검출되지 않은 경우도 존재하였다. 창원천의 경우는 송어(65.0%/78.4%)와 문절망둑(1.9%/1.3%)이 두 조사 방법에서 유사한 비율로 확인되었다(Fig. 4).

## 4. 고 찰

### 4.1. 내륙습지(태화강, 창원천) 하구 생태계의 환경적 특성, 어류 군집 구조 및 종 다양성

본 연구에서는 낙동강 수계 내륙 습지 하천인 태화강과 창원천 2개 하천을 대상으로 이·화학적 환경 특성, 어류 군집 구조 및 종 다양성을 평가하였다. 두 하천은 바다와 인접한 하구 생태계로 특히 창원천(CW1)의 경우 인근 봉암갯벌과 약 1.5 km 거리로 떨어져 있어 바다와 가장 가까이 위치하여, 해수의 강한 영향으로 염도 또한 태화강 두 지점에 비해 11.28~11.39 psu 더 높게 확인되었다. 종 다양성 평가 결과 태화강의 경우 창원천에 비해 조사지점과 시기에 상관 없이 더 낮은 우점도지수와 높은 풍부도, 균등도, 다양도지수 수치를 나타냈다(Table 3). 우점도지수는 수치가 높을수록 서식처의 우점종이 차지하는 개체수의 비율이 높아 소수의 종이 우세하여 단순한 군집 구조임을 판단할 수 있으며, 풍부도, 균등도, 다양도지수는 수치 값이 클수록 군집을 구성하는 종과 개체수가 많고 고르게 분포하여 특정 서식처 환경에서 군집 상태가 양호하다고 추정할 수 있다(Shannon and Weaver 1949; Pielou 1966; McNaughton 1967; Margalef 1968). 따라서, 태화강 두 지점이 창원천 지점보다 상대적으로 양호한 어류 군집의 상태를 나타내는 것으로 해석할 수 있다. 우리나라 동해, 서해, 남해를 포함한 전체 하구의 다양성 지수를 평가한 이전 연구와 비교 시, 태화강은 상위 90% 이상의 높은 풍부도와 다양도지수의 값이 확인되어 어류 군집 구조가 비교적 건강한 하천임을 알 수 있었다. 반면, 창원천의 경우에는 상위 90% 이상의 높은 우점도지수, 하위 10%, 30%의 낮은 균등도와 다양도지수가 확인되어 어류 군집 구조가 비교적 건강하지 않은 것을 파악할 수 있었다(Park *et al.* 2022). 태화강이 창원천보다 1.737~2.172 더 높은 전체 종 풍부도지수와 0.773~0.817 더 높은 전체 종 다양성지수 수치를 나타냈으며(Table 3), 수심이 얕고 유속이 더 빠른 환경적 특성을 보이는 것으로 조사되었다(Table 1). 실제 현장조사 결과에서도 태화강에서 유속이 빠른 여울부와 수변부를 서식처로 선호하는 잉어과 어류가 8종(붕어, 잉어, 누치, 꼬리, 버들치, 참물개, 황어, 피라미)으로 가장 많이 관찰되었다(Lee *et al.* 2013; Kim *et al.* 2014). 이와 같은 결과는 이전 태화강 유역의 어류 군집조사에서 관찰된 44종 중 잉어과에 속하는 어류가 18종으로 가장 많이 관찰된 결

과와 일치하였다(Jang *et al.* 2001). 우점종과 아우점종은 피라미와 송어로 참갈겨니와 버들치가 우점종으로 관찰된 2010년도 이전 연구 결과와는 상이하였다(Kim and An 2010). 또한, 생태계교란생물인 블루길과 배스가 확인되어 하천의 생태계교란생물 제거 매뉴얼에 따른 개체수의 조절이 필요할 것으로 판단된다(Heo *et al.* 2016). 태화강에서 양측회유성, 소하성 및 강하성 어류인 은어, 황어, 뱀장어가 확인되어 연안과 강 하구의 연결성이 상대적으로 원활한 하구 생태계를 나타내었다(Ege 1939; Nakamura 1969; Nishida 1986). 황어는 주요 소하성 어류 중 하나로 봄철에 상류로 소상하여 자갈이 잘 발달된 장소에 주로 산란한다고 알려져 있어 태화강 상류 서식처 보존 관리가 필요할 것으로 생각된다. 태화강 지류에서 황어 개체가 상대적으로 다수 관찰되어(조사 시기별 평균 ~8개체) 이 지류 상류 서식처의 보존 관리가 필요하다(Kim *et al.* 2012).

창원천의 경우 기수역에 주로 서식하는 망둑어과 어류가 총 9종 중 5종(문절망둑, 흰발망둑, 꼭져구, 민물검정망둑, 두줄망둑)으로 가장 많이 확인되었다(Hwang *et al.* 2006). 이러한 결과는 2022년도 수생태계건강성평가 시 창원천1 지점에서 수행된 어류 군집조사 결과 망둥어류 5종이 높은 상대비율로 확인된 이전 결과와 일치하였다. 또한, 창원천의 경우는 송어와 민물검정망둑이 우점종, 아우점종으로 나타났다. 연안과 가장 가깝게 위치하여 해수의 영향을 받아 비교적 높은 염도를 나타내는 환경적 특성으로 인해서 창원천 하구 생태계는 해산어류 종이 우점하는 생태적 특성을 나타낸 것으로 판단된다. 태화강 하구 생태계와는 달리 창원천에서는 회유성 어종이 본 조사에서 관찰되지 않았으나, 은어는 환경 DNA에서 검출된 점과 이전 문헌(MOE/NIBR 2016~2021)에서 서식이 확인된 점을 고려하면 실제 서식 분포하고 있을 가능성이 높을 것으로 판단된다. 본 연구대상지점인 창원천에서 생태계교란생물은 확인되지 않았지만, 인접 하천인 남천에서의 동일 시기 진행된 내륙 습지 어류 군집 조사 결과 생태계교란생물 배스가 확인되어 창원천에서도 잠재적인 서식 가능성을 배제할 수 없을 것으로 생각된다. 기수역 하구 생태계는 생산성이 높아 종 다양성이 높고 연안 어류의 보육장으로서 매우 중요한 생태적 기능과 서비스를 제공하기 때문에 우리나라 기수역 하구를 대상으로 보다 면밀한 생태적 연구가 필요하다(Kostecki *et al.* 2010).

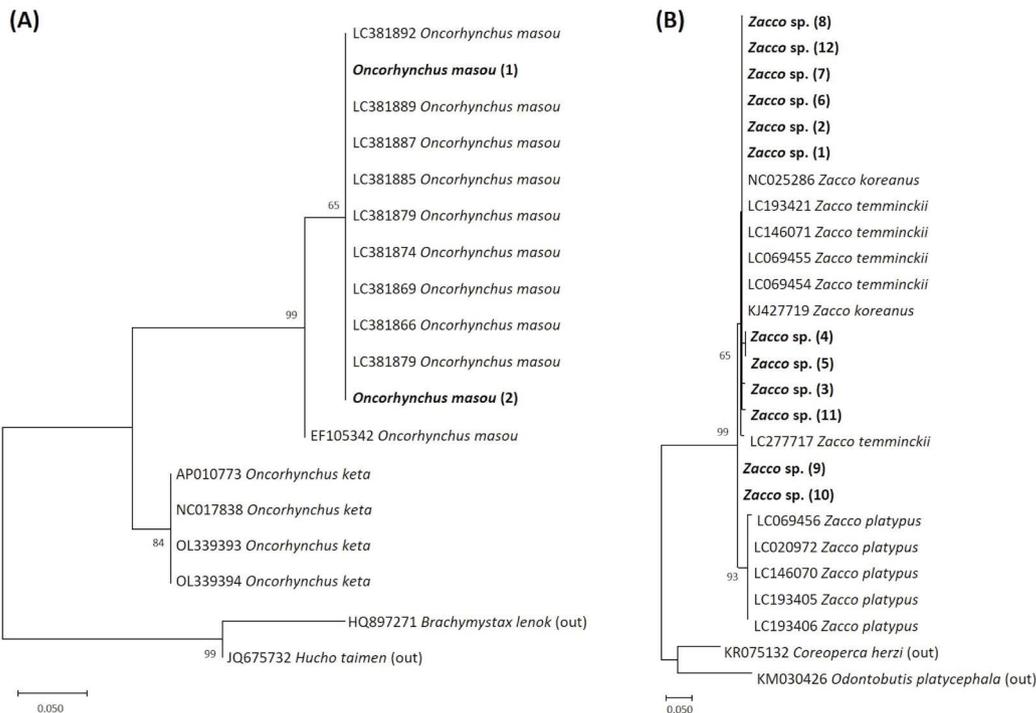
## 4.2. 어구를 이용한 현장조사와 환경 DNA 분석 결과 비교

환경 DNA를 이용한 수생태계 모니터링 효율성을 파악하기 위해 태화강과 창원천을 대상으로 어구를 이용한 현장조사와 환경 DNA 결과를 비교 분석하였다. 어구를 이용한 3회 현장조사 결과 9~19종이 확인되었고 환경 DNA 1회(5월) 분석 결과 11~18종이 관찰되어 환경 DNA 분석은 1회 조사만 수행했음에도 현장조사와 유사한 수준의 종 탐지율을 확인할 수 있었다. 어구를 이용한 5월 현장조사 결과 6종(CW1)~11종(US1, US2)이 확인된 점을 고려하면 환경 DNA가 종 탐지에서 민감도가 더 높음을 알 수 있었다(Shaw *et al.* 2016; Song *et al.* 2019; Lee *et al.* 2024 in press). 환경 DNA를 수집한 동일 시기(5월)의 두 방법 간 종 출현 일치율은 US1에서 20.0%, US2 20.8%, CW1 13.3%로 확인되었고, 모든 조사 시기를 종합한 결과와의 일치율은 US1에서 45.0%, US2 42.3%, CW1 11.1%로 창원천을 제외한 태화강 지점에서 더 높은 일치율을 확인할 수 있었다. 다만, 창원천 CW1의 경우 기수역과 인접한 지점으로 담수어류 포획 어구(족대, 투망)를 이용한 조사 결과로 해산어류(전어, 주둥치, 농어)와 망둑어류(모치망둑, 애기망둑) 채집이 제한되어 환경 DNA 탐지 결과와 낮은 일치율을 보인 것으로 판단된다. Song *et al.* (2019)에 의하면 다회 수행된 어류 현장조사와 1회 수행된 환경 DNA 분석 결과에서 환경 DNA 분석 동일 시기(5월)에 35%의 종 탐지 일치율을 보였지만, 모든 시기(4~11월)의 현장 조사 결과와 비교 시 45%로 더 높은 종 탐지 일치율을 보였다. 서로 다른 두 방법에서 분석된 종 탐지 결과를 이용하여 종 다양성 분석 시 풍부도지수가 US1 지점에서 현장조사 2.171 (1차)~2.823 (2차), 환경 DNA 2.389, US2 지점 현장조사 2.171 (1차)~3.040 (2차), 환경 DNA 3.692, CW1 지점 현장조사 1.086 (1차)~1.520 (2차), 환경 DNA 2.171로 환경 DNA를 이용한 분석에서 유사하거나 더 높은 수치로 확인되었다. 이러한 결과는 환경 DNA 어류 탐지 결과가 어구를 이용한 조사 시 발생하는 조사 시기(계절)에 따른 종 탐지율의 편차를 보완하고 채집에 제한되는 종을 보다 민감하게 탐지할 수 있음을 시사한다(Shaw *et al.* 2016; Itakura *et al.* 2019; Song *et al.* 2019; Lee *et al.* 2024 in press).

하지만, 환경 DNA 어류 종 탐지 결과 현장조사 시 관

찰되지 않은 종이 환경 DNA에서 검출된 위양성(false positive; Type I 에러) 결과와 현장조사 시 관찰되었으나 환경 DNA에서 미검출된 위음성(false negative; Type II 에러)의 한계점이 존재하였다(Evans *et al.* 2017). 본 연구 결과에서 위양성 결과의 경우 태화강에서 송사리, 수수미꾸리, 쉬리, 참갈겨니, 검정망둑, 산천어/송어, 동자개 7종이 확인되었다. 이 중 송사리, 수수미꾸리, 참갈겨니, 검정망둑의 경우 과거 문헌과 2016~2021년도 기간 수행된 수생태계건강성평가(MOE/NIBR 2016-2021) 시 관찰되었던 종으로 확인되었으나, 쉬리, 산천어/송어, 동자개의 경우 이번 환경 DNA에서만 처음 관찰되었다(Jang *et al.* 2001). 산천어/송어의 경우 연어속(genus *Oncorhynchus*)의 어류로 태화강으로 매년 회귀하는 태평양 연어(chum salmon; *Oncorhynchus keta*)의 DNA가 검출되었을 가능성이 있다(Jang *et al.* 2022). 이러한 가설을 검증하기 위해 NCBI (national center for biotechnology information)의 GenBank에 등록된 연어( $n=4$ ), 산천어/송어( $n=10$ )의 12S rRNA와 본 연구 환경 DNA에서 산천어/송어(*O. masou*)로 할당된 DNA reads ( $n=2$ )를 추출하여 계통수

(phylogeny) 분석 결과 환경 DNA 2개 reads가 산천어/송어 분기군(clade)에 위치하여 연어일 가능성이 낮아 산천어/송어 DNA 가능성을 지지하였다(Fig. 5A). 쉬리의 경우 쉬리속(genus *Coreoleuciscus*)의 어류로서 우리나라에 쉬리 1종이 서식하는 것으로 알려져 있었으나, 최근 쉬리와 참쉬리(*Coreoleuciscus aeruginos*) 2종으로 분류되었다(Song and Bang 2015). 쉬리, 산천어/송어, 동자개와 같은 종은 기존 태화강에 서식하는 종으로 보고된 바가 없으며, DNA reads의 비율 또한 0.1% 이하로 DNA 오염(contamination) 및 인위적인 이입 등 다른 외부적 요인에 의해 검출되었을 가능성을 추정해 볼 수 있다(Yoon *et al.* 2018). 창원천의 위양성 결과는 은어, 붕어, 전어, 모치망둑, 애기망둑, 갈문망둑, 검정망둑, 주둥치, 농어 8종이 확인되었다. 이 중 은어, 붕어, 전어, 모치망둑, 주둥치, 농어는 2016~2021년도 수행된 수생태계건강성평가(MOE/NIBR 2016-2021) 시 관찰되었던 종으로 확인되었으며, 애기망둑, 갈문망둑, 검정망둑의 경우 환경 DNA에서만 확인되었다. 창원천의 경우 바다와 매우 가까우며(봉암곶별과 약 1.5 km 이격), 밀물 시간에 환경 시료가 채수된 영향으로



**Fig. 5.** Phylogenetic relationships of three species in the genus *Oncorhynchus* (A) and genus *Zacco* (B) based on mtDNA 12S rRNA sequences (169–177 bp). DNA reads extracted from the eDNA results of this study are bolded. Numbers at the branches represent the bootstrap support values for maximum likelihood (ML). Information on DNA sequences used for phylogenetic analysis is given in Supplementary Table A1.

인해 인근 연안이나 갯벌에 서식하는 망둑어류의 DNA가 물 시료에서 검출된 것으로 판단된다.

환경 DNA 위양성 결과의 주원인은 세 가지 - (1) 물 시료 내 DNA의 오염, (2) 분석 과정에서 비표적 종의 부정확한 검출, (3) 해당 지점에서 죽은 생물체의 DNA 검출 - 가 제시된 바 있다(Darling and Mahon 2011; Rees *et al.* 2014, 2015). 해결방안은 과거 조사된 문헌 및 생태적 관점에서의 해석을 통한 데이터 보정이 필요하다(Evans *et al.* 2017; NIBR 2020). 또한, 본 연구를 통해 환경 DNA 위양성 결과 자료도 확인할 수 있었다. 특히 피라미의 경우 현장조사 시 태화강의 두 지점에서 높은 상대 비율로 확인되었으나, 환경 DNA에서 검출되지 않았다. 국내 서식하는 피라미속(genus *Zacco*)은 갈겨니, 참갈겨니, 피라미 3종이 서식하고 있으며, 이 종들은 공통조상에서 분기된 자매종(sister species)으로 알려져 있다(Kim *et al.* 2005; Oh and Park 2009; Kim *et al.* 2020b). 미토콘드리아 DNA *cyt b* (cytochrome *b*) 유전자 1,140 bp를 이용하여 국내 피라미속 세 분류군의 계통수 분석을 통해 종판별 연구가 수행된 바 있다(Oh and Park 2009). 하지만, 본 연구에서 이용된 MiFish 범용 프라이머의 경우 12S rRNA 240 bp의 짧은 염기서열 단편을 표적으로 하는 특성상 해당 유전자 부위에 국내 자매종인 갈겨니, 참갈겨니, 피라미를 구별할 수 있는 염기서열 변이, 즉 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)이 존재하지 않는 것을 확인하였다. 추가적인 검증을 위해 NCBI의 GenBank에 등록된 갈겨니( $n=5$ ), 참갈겨니( $n=2$ ), 피라미( $n=5$ )의 12S rRNA와 환경 DNA에서 갈겨니속(*Zacco spp.*)으로 할당된 DNA reads ( $n=12$ )를 무작위로 추출하여 계통수 분석 결과 피라미와 갈겨니/참갈겨니 두 분기군으로 구분되었으나, 갈겨니와 참갈겨니 계통은 종별로 분기군이 나뉘지 않았다(Fig. 5B). 또한, 현장조사 시 태화강의 두 지점에서 모두 확인된 누치, 미꾸리, 민물검정망둑, US1 지점에서만 확인된 참물개, 기름종개, US2 지점에서만 확인된 꺾지, 문절망둑과 같은 종들도 환경 DNA에서 검출되지 않았다. 창원천 또한 민물검정망둑, 두줄망둑, 잉어, 꼭져구, 강도다리, 점농어, 흰발망둑 7종이 위양성 결과로 확인되었다. 위양성 결과의 원인은 두 가지 - (1) 채취한 물 시료에 실제로 존재하는 표적 종의 DNA를 감지하지 못하는 경우, (2) 표적 종이 서식처에 있음에도 물 시료에 존재 가능한 DNA가 부족 - 가 있다(Darling and Mahon 2011; Rees *et al.* 2014,

2015). 위양성 결과의 해결 방안으로는 환경 DNA 분석을 위한 물 시료 지점 및 시료 수 증가와 local 종의 데이터베이스 구축이 필요하다(Evans *et al.* 2017; NIBR 2020).

본 연구는 낙동강 수계 하구 생태계를 대표하는 내륙 습지 하천인 태화강과 창원천을 대상으로 환경적 특성, 어류 군집 구조 및 종 다양성을 평가하였다. 태화강 현지조사 결과 양측회유성(은어), 소하성(황어) 및 강하성(뱀장어) 어류의 서식이 확인되어 하천과 강 하구의 연결성이 비교적 원활한 생태계임을 알 수 있었다. 하지만, 생태계교란생물(블루길, 배스)의 서식이 확인되어 원활한 연결성을 이용한 서식처 확산에 대한 우려도 동시에 존재하였다. 창원천 하구 생태계는 바다와 인접하여 해수의 영향으로 주로 해산어류가 우점하는 기수역 하천의 생태적 특성을 나타내었다. 환경 DNA를 이용한 수생태계 모니터링 효율성을 평가하기 위해 어구를 이용한 현장조사와 환경 DNA 분석 결과를 군집 구조 및 종 다양성 관점에서 비교하였다. 환경 DNA 분석 결과 어구 현장조사와 전반적으로 유사한 수준의 종 탐지 및 종 다양성을 확인할 수 있었지만, 위양성과 위음성 결과와 같은 한계점도 동시에 존재하였다. 향후, 환경 DNA 기법의 성공적인 국내 적용을 위해서는 다음과 같은 개선방안이 필요할 것으로 판단된다; 1) 환경 DNA 시료 확보에 대한 표준화된 조사 매뉴얼 구축, 2) 고유종 및 근연종에 대한 염기서열 확보 및 Local DB 구축, 3) 한국 자생종을 정확하게 식별할 수 있는 국내 표준 마커 개발을 통해 보완한다면 수생태계 모니터링에 아주 효율/효과적이며 실용적인 조사 방법으로 적용될 수 있을 것으로 판단된다(NIBR 2020).

## 적 요

강 하구는 높은 생산성을 나타내는 생물다양성이 가장 높은 대표 수생태계이다. 환경 DNA (eDNA)를 이용한 수생태계 모니터링은 현장의 환경 시료를 확보하여 시료 내 존재하는 생물로부터 유래된 DNA를 추출하는 방법으로서 기존의 어구를 이용한 현장조사 모니터링에 비해 효율적이고 민감도가 높아 보완적인 방법으로 이용되고 있다. 본 연구는 낙동강 수계 하구 생태계를 대표하는 내륙 습지 하천인 태화강과 창원천을 대상으로 환경특성, 어류 군집 구조와 종 다양성을 파악하였다. 태화강에서는 양측회유

성, 소하성 및 강하성 어류인 은어, 황어 및 뱀장어의 서식이 대부분의 조사 시기 동안 확인되어 연안에서부터 중류 및 지류까지 비교적 원활한 서식처 종적 연결성을 나타내는 생태계임을 알 수 있었다. 또한, 창원천의 경우 특히 바다와 가까운 내륙 습지 하천으로 많은 다양한 해산어류 및 망둑어류의 서식이 확인되었으나, 회유성 어종인 은어는 환경 DNA에서만 검출되었고 현장조사에서는 관찰되지 않았다. 어구조사를 통한 종 다양성 평가 결과 태화강이 창원천에 비해 낮은 우점도지수, 높은 풍부도, 균등도, 다양도지수 수치를 나타내어 상대적으로 양호한 어류 군집 구조 상태를 나타냈다. 어구를 이용한 현장조사와 환경 DNA 메타바코딩 기법을 이용하여 태화강과 창원천 하구 생태계 어류 군집 구조 및 종 다양성을 비교 분석하였다. 어구를 이용한 3회 현장조사 결과 9~19종이 확인되었고 환경 DNA 1회 분석 결과 11~18종으로 환경 DNA 분석이 현장조사 결과와 유사한 수준의 종 수를 확인할 수 있었다. 어구를 이용한 5월 현장조사 결과는 6~11종이 확인된 점을 고려하면 환경 DNA가 종 탐지에서 민감도가 더 높음을 알 수 있었다. 환경 DNA를 이용한 수생태계 모니터링을 위한 어류 종 탐지의 잠재적인 효용성을 확인할 수 있었으나 우리나라 고유종 및 유전적으로 가까운 근연종들의 경우 명확한 종 동정에 어려움이 있었으며, 현장조사 시 관찰되었으나 환경 DNA에서 검출되지 않은 경우 (위음성; false negative)와 현장조사 시 관찰되지 않은 종이 환경 DNA에서 검출 (위양성; false positive)되는 자료의 한계점도 존재하였다. 향후 국내 고유종의 local DB 확보, 환경 DNA 조사 표준화 방법 구축, 국내 담수어류 대상 분자마커 개발 등이 확립된다면 수생태계 모니터링에 아주 효율적이며 실용적인 조사 방법으로 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

## CRedit authorship contribution statement

**Hk Choi:** Methodology, Investigation, Software, Formal analysis, Data curation, Writing - Original draft, Visualization. **YR Kim:** Investigation, Writing - Review & editing. **SY Hwang:** Investigation, Data curation, Writing - Review & editing. **Y Chu:** Funding acquisition. **P Kim:** Funding acquisition. **HJ Lee:** Conceptualization, Methodology, Validation, Data curation, Writing - Original draft, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## 사 사

본 연구는 국립생태원 습지센터 (과제번호: NIE-A-2022-20, 과제명: 하구 생태계 조사('22)), 한국환경산업기술원(과제번호: 2020003050004, 과제명: 수생태계 건강성 확보 기술개발사업) 및 상지대학교 대학원의 지원을 받아 수행되었습니다. 본 연구 수행을 위하여 현장 시료 채집에 도움을 준 상지대학교 생명과학과 분자생태및진화확실협실 대학원 및 학부 학생들께 감사사를 포함합니다.

## REFERENCES

- Alam MJ, NK Kim, S Andriyono, HK Choi, JH Lee and HW Kim. 2020. Assessment of fish biodiversity in four Korean rivers using environmental DNA metabarcoding. *PeerJ* 8:e9508. <https://doi.org/10.7717/peerj.9508>
- Bálint M, M Pfenninger, HP Grossart, P Taberlet, M Vellend, MA Leibold, G Englund and D Bowler. 2018. Environmental DNA time series in ecology. *Trends Ecol. Evol.* 33:945-957. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.09.003>
- Bohmann K, A Evans, MTP Gilbert, GR Carvalho, S Creer, M Knapp, WY Douglas and M de Bruyn. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol. Evol.* 29:358-367. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>
- Boopathi T, JB Lee, SH Youn and JS Ki. 2015. Temporal and spatial dynamics of phytoplankton diversity in the East China Sea near Jeju Island (Korea): A phyrosequencing-based study. *Biochem. Syst. Ecol.* 63:143-152. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.10.002>
- Chen IS, YW Liu, SP Huang and CN Shen. 2016. The complete mitochondrial genome of the Korean minnow *Nipponocypris koreanus* (Cypriniformes, Cyprinidae). *Mitochondrial DNA Part A.* 27:708-710. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.913153>
- Clarke KR and RN Gorley. 2015. Getting Started with PRIMER v7. PRIMER-E: Plymouth. Plymouth Marine Laboratory. Plymouth, UK.
- Creer S, K Deiner, S Frey, D Porazinska, P Taberlet, WK Thomas, C Potter and HM Bik. 2016. The ecologist's field guide to sequence based identification of biodiversity. *Methods Ecol. Evol.* 7:1008-1018. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12574>

- Cristescu ME. 2019. Can environmental RNA revolutionize biodiversity science? *Trends Ecol. Evol.* 34:695–697. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.05.003>
- Darling JA and AR Mahon. 2011. From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environ. Res.* 111:978–988. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.02.001>
- Dudgeon D, AH Arthington, MO Gessner, ZI Kawabata, DJ Knowler, C Lévêque, RJ Naiman, AH Prieur-Richard, D Soto, MLJ Stiassny and CA Sullivan. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* 81:163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Ege V. 1939. A revision of the genus *Auguilla* Shaw, a systematic, phylogenetic and geographical study. *Dana Rep.* 16:1–256.
- Elliott M and DS McLusky. 2002. The need for definitions in understanding estuaries. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 55:815–827. <https://doi.org/10.1006/ecss.2002.1031>
- Evans NT, PD Shirey, JG Wieringa, AR Mahon and GA Lamberti. 2017. Comparative cost and effort of fish distribution detection via environmental DNA analysis and electrofishing. *Fisheries* 42:90–99. <https://doi.org/10.1080/03632415.2017.1276329>
- Garvin MR, K Saitoh, DY Churikov, VA Brykov and AJ Gharrett. 2010. Single nucleotide polymorphisms in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) mitochondrial DNA derived from restriction site haplotype information. *Genome* 53:501–507. <https://doi.org/10.1139/G10-026>
- Harrison I, R Abell, W Darwall, ML Thieme, D Tickner and I Timboe. 2018. The freshwater biodiversity crisis. *Science* 362:1369. <https://doi.org/10.1126/science.aav9242>
- Helbing CC and J Hobbs. 2019. Environmental DNA Standardization Needs for Fish and Wildlife Population Assessments and Monitoring. Canadian Standards Association Group. Toronto, Canada.
- Heo JW, HS Kang, HG Lee, SH Park, KW Kim, SY Jeong, JH Lee, JW LEE, JS Han, KH Kim, SC Han, MS Kong and BS Choi. 2016. Monitoring on Aquatic Ecosystem to Capture of Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*): 2<sup>nd</sup> Report. Water Management Committees of the Geum River. Daejeon, Korea.
- Hopkins GW and RP Freckleton. 2002. Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: Implications for conservation. *Anim. Conserv.* 5:245–249. <https://doi.org/10.1017/S1367943002002299>
- Hu W, C Su, Q Liu, Y Kong, S Hua and Z Hu. 2022. Comparison of fish communities using environmental DNA metabarcoding and capture methods in a freshwater lake: A new set of universal PCR primers. *Fish. Res.* 253:106365. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106365>
- Hwang SY, KH Han, WK Lee, SM Yoon, CC Kim, SH Lee, WI Seo and SS Roh. 2006. Early life history of the *Tridentiger obscurus* (Pisces, Gobiidae). *Dev. Reprod.* 10:47–54.
- Itakura H, RWakiya, SYamamoto, K Kaifu, T Sato and T Minamoto. 2019. Environmental DNA analysis reveals the spatial distribution, abundance, and biomass of Japanese eels at the river basin scale. *Aquat. Conserv.-Mar. Freshw. Ecosyst.* 29:361–373. <https://doi.org/10.1002/aqc.3058>
- Jang JE, JK Kim, SM Yoon, HG Hwang, WO Lee, JH Kang and HJ Lee. 2022. Low genetic diversity, local-scale structure, and distinct genetic integrity of Korean chum salmon (*Oncorhynchus keta*) at the species range margin suggest a priority for conservation efforts. *Evol. Appl.* 15:2142–2157. <https://doi.org/10.1111/eva.13506>
- Jang MH, KR Choi and GJ Joo. 2001. Fish community of headwater streams in Gaji mountain, Ulsan. *Korean J. Ecol. Environ.* 34:239–250.
- Jung SW, JH Lee, T Kawai, PJ Kim and S Kim. 2022. Distribution status of invasive alien species (*Procambarus clarkii* (Girard, 1852)) using biomonitoring with environmental DNA in South Korea. *Korean J. Ecol. Environ.* 36:368–380. <https://doi.org/10.13047/KJEE.2022.36.4.368>
- Kang Y, JE Jeon, SW Han, S Won and Y Song. 2023. Feasibility of environmental DNA metabarcoding for invasive species detection according to taxa. *J. Environ. Impact Assess.* 32:94–111. <https://doi.org/10.14249/eia.2023.32.2.94>
- Kato-Unoki Y, K Umemura and K Tashiro. 2020. Fingerprinting of hatchery haplotypes and acquisition of genetic information by whole-mitogenome sequencing of masu salmon, *Oncorhynchus masou masou*, in the Kase River system, Japan. *PLoS One* 15:e0240823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240823>
- Kim CH, EJ Kang, H Yang, KW Kim and WS Choi. 2012. Characteristics of fish fauna collected from near estuary of Seomjin River and population ecology. *Korean J. Environ. Biol.* 30:319–327. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2012.30.4.319>
- Kim G and YK Song. 2021. Identification of freshwater fish species in Korea using environmental DNA technique. *J. Environ. Impact Assess.* 30:1–12. <https://doi.org/10.14249/eia.2021.30.1.1>
- Kim IS. 1997. Illustrated Encyclopedia of Fauna & Flora of Korea. Vol. 37, Freshwater Fishes. Ministry of Education. Seoul, Korea.
- Kim IS and JY Park. 2002. Freshwater Fishes of Korea. Kyohaksa. Seoul, Korea.
- Kim IS, MK Oh and K Hosoya. 2005. A new species of cyprinid fish, *Zacco koreanus* with redescription of *Z. temminckii* (Cyprinidae) from Korea. *Korean J. Ichthyol.* 17:1–7.
- Kim JE and KG An. 2021. Long-term distribution trend analysis of largemouth bass (*Micropterus salmoides*), based on

- National Fish Database, and the ecological risk assessments. Korean J. Environ. Biol. 39:207–217. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2021.39.2.207>
- Kim JH, H Jo, MH Chang, SH Woo, Y Cho and JD Yoon. 2020a. Application of environmental DNA for monitoring of freshwater fish in Korea. Korean J. Ecol. Environ. 53:63–72. <https://doi.org/10.11614/KSL.2020.53.1.063>
- Kim JW, KJ Kim, BM Choi, KL Lee, MH Jang and JD Yoon. 2022. The application of a fish-based multi-metric index for the assessment of ecological qualities of estuaries in the Korean Peninsula. Sustainability 14:11608. <https://doi.org/10.3390/su141811608>
- Kim P, D Kim, TJ Yoon and S Shin. 2018. Early detection of marine invasive species, *Bugula neritina* (Bryozoa: Cheilostomatida), using species-specific primers and environmental DNA analysis in Korea. Mar. Environ. Res. 139:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.04.015>
- Kim SH, WO Kim and KH Cho. 2014. Effects of habitat disturbance on fish community structure in a gravel-bed stream, Korea. Ecol. Resil. Infrastruct. 1:49–60. <https://doi.org/10.17820/eri.2014.1.2.049>
- Kim YP and KG An. 2010. Characteristics of physico-chemical water quality characteristics in taehwa-river watershed and stream ecosystem health assessments by a multimetric fish model and community analysis. Korean J. Ecol. Environ. 43:428–436.
- Kim YR, JE Jang, HK Choi and HJ Lee. 2020b. Phylogeographic and population genetic study of a Korean endemic freshwater fish species, *Zacco koreanus*. Korean J. Environ. Biol. 38:650–657. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2020.38.4.650>
- Kostechi C, F Le Loch, JM Roussel, N Desroy, D Huteau, P Riera, H Le Bris and O Le Pape. 2010. Dynamics of an estuarine nursery ground: the spatio-temporal relationship between the river flow and the food web of the juvenile common sole (*Solea solea* L.) as revealed by stable isotopes analysis. J. Sea Res. 64:54–60. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2009.07.006>
- Kumari R, SK Shukla, K Parmar, N Bordoloi, A Kumar and P Saikia. 2020. Wetlands conservation and restoration for ecosystem services and halt biodiversity loss: An Indian perspective. pp. 75–85. In: Restoration of Wetland Ecosystem: A Trajectory Towards a Sustainable Environment (Upadhyay AK, R Singh and DP Singh, eds.). Springer. Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7665-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7665-8_6)
- Lee HG, CR Jang and JK Choi. 2013. The characteristics of fish fauna by habitat type and population of *Zacco platypus* in the Hongcheon River. Korean J. Environ. Ecol. 27:230–240.
- Lee HJ, YR Kim, H-k Choi, SY Byeon, SY Hwang, K-G An, SJ Ki and D-Y Bae. 2024. Seasonal variation in longitudinal connectivity for fish community in the Hotancheon from the Geum River, as assessed by environmental DNA (eDNA) metabarcoding. J. Ecol. Environ. in press.
- Margalef R. 1968. Perspectives in Ecological Theory. Chicago University Press. Chicago, Illinois, USA.
- McCann KS. 2000. The diversity-stability debate. Nature 405:228–233. <https://doi.org/10.1038/35012234>
- McNaughton SJ. 1967. Relationship among functional properties of California Grassland. Nature 216:114–168. <https://doi.org/10.1038/216168B0>
- Miya M, Y Sato, T Fukunaga, T Sado, JY Poulsen, K Sato and M Kondoh. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. R. Soc. Open Sci. 2:150088. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>
- MOE/NIBR. 2016–2021. The Survey and Evaluation of Aquatic Ecosystem Health in Korea. Ministry of Environment/National Institute of Biological Resources. Sejong/Incheon, Korea.
- Nakamura M. 1969. Cyprinid Fishes of Japan: Studies on the Life History of Cyprinid Fishes of Japan. Research Institute for Natural Resources. Tokyo, Japan.
- Nelson JS. 2006. Fishes of the World. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, USA.
- NIBR. 2020. Analysis of Species Diversity for Freshwater Ecosystems Based on Environmental DNA (eDNA) Metabarcoding Analysis. National Institute of Biological Resources. Incheon, Korea.
- Nishida M. 1986. Geographic variation in the molecular, morphological and reproductive characters of the ayu *Plecoglossus altivelis* (Plecoglossidae) in the Japan-Ryukyu Archipelago. Jpn. J. Ichthyol. 33:232–248. <https://doi.org/10.11369/jji1950.33.232>
- Oh MK and JY Park. 2009. A molecular systematics of Korean *Zacco* species inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequence. Korean J. Ichthyol. 21:291–298.
- Park SH, SH Baek, JH Kim, DH Kim, MH Jang, DH Won, BK Park and JS Moon. 2022. Fish community structure and biodiversity of the Korean Peninsula Estuaries. Korean J. Ecol. Environ. 55:35–48. <https://doi.org/10.11614/KSL.2022.55.1.035>
- Pielou EC. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. J. Theor. Biol. 13:131–144. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)
- Pikitch EK. 2018. A tool for finding rare marine species. Science 360:1180–1182. <https://doi.org/10.1126/science.aao3787>
- Rees HC, BC Maddison, DJ Middleditch, JRM Patmore, KC Gough and E Crispo. 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA: A review of eDNA as a survey tool in ecology. J. Appl. Ecol. 51:1450–1459. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>
- Rees HC, KC Gough, DJ Middleditch, JRM Patmore, BC Maddison and E Crispo. 2015. Applications and limitations of

- measuring environmental DNA as indicators of the presence of aquatic animals. *J. Appl. Ecol.* 52:827–831. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12467>
- Reid AJ, AK Carlson, IF Creed, EJ Eliason, PA Gell, PT Johnson, KA Kidd, TJ MacCormack, JD Olden, SJ Ormerod, JP Smol, WW Taylor, K Tockner, JC Vermaire, D Dudgeon and SJ Cooke. 2019. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biol. Rev.* 94:849–873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>
- Ruppert KM, RJ Kline and MS Rahman. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob. Ecol. Conserv.* 17:e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Shannon CE and W Weaver. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. The University of Illinois Press. Urbana, Illinois, USA.
- Shaw JL, LJ Clarke, SD Wedderburn, TC Barnes, LS Weyrich and A Cooper. 2016. Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biol. Conserv.* 197:131–138. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.03.010>
- Shigenobu Y, K Saitoh, KI Hayashizaki and H Ida. 2005. Nonsynonymous site heteroplasmy in fish mitochondrial DNA. *Genes Genet. Syst.* 80:297–301. <https://doi.org/10.1266/ggs.80.297>
- Smart AS, RTingley, AR Weeks, AR van Rooyen and MA McCarthy. 2015. Environmental DNA sampling is more sensitive than a traditional survey technique for detecting an aquatic invader. *Ecol. Appl.* 25:1944–1952. <https://doi.org/10.1890/14-1751.1>
- Song HY and IC Bang. 2015. *Coreoleuciscus aeruginos* (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae), a new species from the Seomjin and Nakdong rivers, Korea. *Zootaxa* 3931:140–150. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3931.1.10>
- Song YK, JH. Kim, SY Won and C Park. 2019. Possibility in identifying species composition of fish communities using the environmental DNA metabarcoding technique with the preliminary results at urban ecological streams. *J. Korean Environ. Res. Tech.* 22:125–138. <https://doi.org/10.13087/kosert.2019.22.6.125>
- Taberlet P, E Coissac, M Hajibabaei and LH Rieseberg. 2012. Environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21:1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Thomsen PF and E Willerslev. 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.* 183:4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Thomsen PF, J Kielgast, LL Iversen, C Wiuf, M Rasmussen, MTP Gilbert, L Orlando and E Willerslev. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21:2565–2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>
- Wang Y, X Zhang, S Yang and Z Song. 2011. The complete mitochondrial genome of the taimen, *Hucho taimen*, and its unusual features in the control region. *Mitochondrial DNA* 22:111–119. <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.624605>
- Won NI, KH Kim, JH Kang, SR Park and HJ Lee. 2017. Exploring the impacts of anthropogenic disturbance on seawater and sediment microbial communities in Korean coastal waters using metagenomics analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14:130. <https://doi.org/10.3390/ijerph14020130>
- WWF. 2018. *Living Planet Report - 2018: Aiming Higher* (Grooten M and REA Almond, eds.). World Wildlife Foundation. Gland, Switzerland.
- Yoon JD, JH Kim, SH Park and MH Jang. 2018. The distribution and diversity of freshwater fishes in Korean peninsula. *Korean J. Ecol. Environ.* 51:71–85. <https://doi.org/10.11614/KSL.2018.51.1.071>
- Zou K, J Chen, H Ruan, Z Li, W Guo, M Li and L Liu. 2020. eDNA metabarcoding as a promising conservation tool for monitoring fish diversity in a coastal wetland of the Pearl River Estuary compared to bottom trawling. *Sci. Total Environ.* 702:134704. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134704>

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

**Supplementary Table A1.** Information on DNA sequences used for phylogenetic analysis (Fig. 5), including species names, GenBank accession numbers, and relevant references, if available

Accession No.	Species	References
AP010773	<i>Oncorhynchus Keta</i>	Shigenobu <i>et al.</i> (2005)
EF105342	<i>Oncorhynchus masou</i>	Hsiah <i>et al.</i> (Unpublished)
HQ897271	<i>Brachymystax lenok</i>	Wang <i>et al.</i> (2011)
JQ675732	<i>Hucho taimen</i>	Yu and Kwak (Unpublished)
KJ427719	<i>Zacco koreanus</i>	Chen <i>et al.</i> (2016)
KM030426	<i>Odontobutis platycephala</i>	Jeon and Suk (Unpublished)
KR075132	<i>Coreoperca herzi</i>	Park <i>et al.</i> (Unpublished)
LC020972	<i>Zacco platypus</i>	Miya and Sado (Unpublished)
LC069454	<i>Zacco temminckii</i>	Miya and Sado (Unpublished)
LC069455	<i>Zacco temminckii</i>	Miya and Sado (Unpublished)
LC069456	<i>Zacco platypus</i>	Miya and Sado (Unpublished)
LC146070	<i>Zacco platypus</i>	Miya and Sado (Unpublished)
LC146071	<i>Zacco temminckii</i>	Miya and Sado (Unpublished)
LC193405	<i>Zacco platypus</i>	Miya and Sado (Unpublished)
LC193406	<i>Zacco platypus</i>	Miya and Sado (Unpublished)
LC193421	<i>Zacco temminckii</i>	Miya and Sado (Unpublished)
LC277717	<i>Zacco temminckii</i>	Miya and Sado (Unpublished)
LC381869	<i>Oncorhynchus masou</i>	Kato-Unoki <i>et al.</i> (2020)
LC381874	<i>Oncorhynchus masou</i>	Kato-Unoki <i>et al.</i> (2020)
LC381879	<i>Oncorhynchus masou</i>	Kato-Unoki <i>et al.</i> (2020)
LC381879	<i>Oncorhynchus masou</i>	Kato-Unoki <i>et al.</i> (2020)
LC381885	<i>Oncorhynchus masou</i>	Kato-Unoki <i>et al.</i> (2020)
LC381887	<i>Oncorhynchus masou</i>	Kato-Unoki <i>et al.</i> (2020)
LC381889	<i>Oncorhynchus masou</i>	Kato-Unoki <i>et al.</i> (2020)
LC381892	<i>Oncorhynchus masou</i>	Kato-Unoki <i>et al.</i> (2020)
NC017838	<i>Oncorhynchus Keta</i>	Garvin <i>et al.</i> (2010)
NC025286	<i>Zacco koreanus</i>	Chen <i>et al.</i> (2016)
OL339393	<i>Oncorhynchus Keta</i>	Dziedzic (Unpublished)
OL339394	<i>Oncorhynchus Keta</i>	Dziedzic (Unpublished)