

Original article

수생태계 건강성 조사·평가를 위한 실내분석 정도관리 방법: 부착돌말류 영구표본 분석도구 개발

신재기 · 김난영¹ · 박용은² · 이경락³ · 김백호⁴ · 김용재⁵ · 김한순⁶ · 이정호⁷ · 이학영⁸ · 황순진^{1,*}

수생태원 한강(韓江), ¹건국대학교 환경보건과학과, ²건국대학교 사회환경공학부,
³국립환경과학원 물환경연구부, ⁴한양대학교 생명과학과, ⁵대진대학교 생명과학과,
⁶경북대학교 생물학과, ⁷대구대학교 생물교육과, ⁸전남대학교 생물학과

The Quality Control Method in the Laboratory Analysis of Aquatic Ecosystem Health Monitoring and Assessment: Permanent Mounting Slides Tool Development Using Benthic Attached Diatoms.

Jae-Ki Shin (0000-0002-5380-5078), Nan-Young Kim¹ (0000-0001-5949-2095), Yongeun Park² (0000-0002-1959-0843), Kyung-Lak Lee³ (0000-0001-7276-0445), Baik-Ho Kim⁴ (0000-0002-7144-0770), Yong-Jae Kim⁵ (0000-0003-3326-8372), Han-Soon Kim⁶ (0000-0002-8186-3849), Jung Ho Lee⁷ (0000-0002-1426-4555), Hak Young Lee⁸ (0000-0001-8561-7568) and Soon-Jin Hwang^{1,*} (0000-0001-7083-5036) (Limnoecological Science Research Institute Korea (THE HANGANG), Gyeongnam 50440, Republic of Korea; ¹Department of Environmental Health and Science, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea; ²School of Civil and Environmental Engineering, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea; ³Water Environmental Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Republic of Korea; ⁴Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 04763, Republic of Korea; ⁵Department of Life Science, Daejin University, Gyeonggi 11159, Republic of Korea; ⁶Department of Biology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea; ⁷Department of Biology Education, Daegu University, Gyeongbuk 38453, Republic of Korea; ⁸Department of Biology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea)

Abstract Benthic attached diatoms (BADs), a major primary producer in lotic stream and river ecosystems are micro-sized organisms and require a highly magnified microscopic technique in the observation work. Thus, it is often not easy to ensure accuracy and precision in both qualitative and quantitative analyses. This study proposed a new technique applicable to improve quality control of aquatic ecosystem monitoring and assessment using BADs. In order to meet the purpose of quality control, we developed a permanent mounting slide technique which can be used for both qualitative and quantitative analyses simultaneously. We designed specimens with the combination of grid on both cover and slide glasses and compared their efficiency. As a result of observation and counting of BADs, the slide glass designed with the color-lined grid showed the highest efficiency compared to other test conditions. We expect that the method developed in this study could be effectively used to analyze BADs and contributed to improve the quality control in aquatic ecosystem health monitoring and assessment.

Key words: aquatic ecosystem assessment, benthic attached diatoms, grid method, permanent mounting slides, quality control

Manuscript received 7 August 2023, revised 30 August 2023,
revision accepted 1 September 2023

* Corresponding author: Tel: +82-2-450-3748
E-mail: sjhwang@konkuk.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.

서론

돌말류(diatoms, 硅藻)는 계통분류학적으로 황색조식물문(Chrysophyta) 돌말강(Bacillariophyceae)에 속하는 단세포의 진핵생물(Round *et al.*, 1990; Falcitore and Bowler, 2002; Alers-Garcia *et al.*, 2021)로써 미세조류 군집 중 규산질 세포벽의 독특한 형태학적 구조를 가지는 중요한 구성원이다(Valentin *et al.*, 2019; Alers-Garcia *et al.*, 2021). 이들은 담수, 기수 및 해수에 걸쳐 연중 부유 또는 부착하여 생활하는 식물군으로 종수가 가장 풍부하고(Round *et al.*, 1990; Stevenson *et al.*, 1996; Barbour *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2007; Snell *et al.*, 2019), 기초 및 응용과학 분야에서 연구 재료로 널리 활용되고 있다(Barbour *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2011). 또한, 수생태계에서 광합성을 하는 주요 기초 생산자로서 전지구적 일차생산력(총 탄소 고정량)의 약 20%를 차지하고 있으며(Cox, 1996; Falkowski *et al.*, 1998; Barbour *et al.*, 1999; Mann, 1999), 생지화학적 요소 및 상위영양단계(예, 초식성 1차소비자)에 고영양 식물성 먹이원 제공을 통해 물질 또는 에너지 순환에 지대한 역할을 담당하는 독립영양체이다(Treguer *et al.*, 1995; Cox, 1996; Stevenson *et al.*, 1996; Barbour *et al.*, 1999; Yool and Tyrrell, 2003). 특히, 부착돌말류는 수중 또는 수변에 있는 다양한 생물 또는 무생물의 기질들을 폭 넓게 이용하여 광범위한 서식처를 점유하고 있을 뿐만 아니라 자연적·인위적 또는 구조적·비구조적 요인들로 인한 서식환경의 매 순간적 변화에 종 조성 및 생물량 증감 변동을 통해 잘 반응하여 생태학적 지표로도 가치가 있다(Barbour *et al.*, 1999; Underwood and Kromkamp, 1999; Stevenson *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2011; Snell *et al.*, 2019; Alers-Garcia *et al.*, 2021).

돌말류는 품질보증(quality assurance, QA) 및 정도관리(quality control, QC) 절차를 실행함에 있어 다른 생물군에 비해 우수하고 유용한 생물재료이다(Munro *et al.*, 1990; Kelly and Lewis, 1996; Kelly, 2001; TDEC, 2010). 무엇보다도 생리생태학적 측면에서 빠른 생식률, 짧은 생활사, 광범위한 수질 및 환경변화(예, 물리, 화학 및 생물학적 다양한 스트레스 교란)에 대한 민감도 또는 내성 그리고 미세한 크기와 다양한 형태를 띠어 손쉽게 다룰 수 있는 장점을 가진다(Davis and Simon, 1995; Stevenson *et al.*, 1996; Barbour *et al.*, 1999; Allan and Castillo, 2007; Lavoie *et al.*, 2014). 또한, 질적인 생물정보를 지니고 있을 뿐만 아니라 그 정보를 직접 보여줄 수 있는 소형 영구표본의 제작이 가능하여, 시간에 구애 받지 않고 공간적으로 편리한 이동성에 의해 연구자들 간 원활한 상호 교류가 가능하다(USEPA, 1979; Munro *et al.*, 1990; Kelly and Lewis, 1996; Alers-Garcia *et al.*, 2021).

그렇지만 돌말류를 이용한 수생태계 조사·평가 과정은 현장 채집, 실험실 분석 및 데이터 분석관리 단계까지 시공간적으로 다양한 불확실성을 포함할 수 있으며(Besse-Lototskaya *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2009), 이렇게 직면하는 어려움과 오류를 미리 제거하거나 최소화할수록 최적의 결과에 도달하게 된다(Kelly *et al.*, 1998).

국내외적으로, 돌말류를 이용하여 수질·수생태계 및 기타 환경상태를 진단 평가하는 프로젝트에서 정도관리는 신뢰성 기반의 데이터 획득을 위해 중요한 절차로써 요구되고 있다(USEPA, 1979; Munro *et al.*, 1990; Davis and Simon, 1995; Kelly and Lewis, 1996; Alers-Garcia *et al.*, 2021). 특히, 이러한 정도관리는 종 분류·동정에 중점을 두고 있으며, 데이터 분석·관리 과정에서 동료 간 또는 전문가의 검토를 권고하고 있다(USEPA, 1979; Fancy *et al.*, 1998; MOE-NIER, 2022). 반면에, 정량적 시험측정과 실행도구에 관한 자세한 내용은 언급하고 있지 않다. 따라서 신속하고 효과적인 정도관리와 함께 무엇보다도 데이터의 신뢰성을 확보할 수 있는 방법적 연구가 필요하다.

현재까지, 국내외에서 이에 관한 직접적이고 구체적인 연구는 많지 않았다. Munro *et al.* (1990)은 고옥수학(Palaeolimnology) 프로그램의 돌말류 부문 중 호수 표층수의 산성화 프로젝트에서 여러 다국적 실험실 데이터를 다루었다. 이때 분류 또는 분석기술 차이에 의한 문제점(예, 돌말류 명명법 차이, 분류군의 분리와 병합 및 다른 동정 기준 등)을 연구자 워크숍 교류, 돌말류 표본 슬라이드 교환 및 합의된 분류체계를 배포하는 등 정도관리의 전 과정을 통해 방법적 표준화로 무난히 해결하였다. 또한, USEPA (1995), Barbour *et al.* (1999) 및 Kelly (2001)는 돌말류의 군집 유사도와 종 풍부성에 의한 정도관리 방법을 제시하였다. 최근 국내에서 돌말류와 연관된 정도관리를 언급한 것은 분석 결과의 일관성을 위한 자료관리에만 국한하고 있다(Kim *et al.*, 2021). 특히, 형태학적 기반의 돌말류 분류는 분석자료를 해석하는 분류학자들 간의 일관된 종 식별을 요구하는 한편, 분자생물학적 기반 분류는 신뢰성 있는 참조 데이터의 필수적 요건을 강조하였다. 더욱이, 국내 돌말류 분석자료에 대한 정도관리의 신뢰성 향상을 위한 제언으로써 생태분류학자 양성 프로그램 운영과 형태적 메타정보 데이터베이스를 기본으로 하는 DNA 바코드 데이터베이스 구축의 필요성을 역설하였다.

국내에서는 2007년부터 ‘하천 수생태계 현황조사 및 건강성 평가’ 프로그램이 매년 정기적으로 수행되고 있다(MOE-NIER, 2017). 그 과정에서 부착돌말류를 포함한 수생생물(저서성대형무척추동물, 어류) 및 서식수변환경, 수변식

생 등 5개 분야에 대한 조사지점의 확대와 현장 및 실내분석에 대한 조사·평가 지침을 수립하여 국가생물측정망 운영에 대한 방법론적 근거를 마련해 두고 있다(MOE, 2017; MOE-NIER, 2017). 이 중에서 부착돌말류는 대부분 세포 크기가 매우 작아 관찰과 분석에 고배율의 현미경적 방법을 요구하므로 정성·정량적 분석에 있어 정확도와 정밀도를 확보하기가 쉽지 않은 특성을 가지고 있다(Hendey, 1964; McLaughlin, 2012; APHA, 2017). 본 연구는 부착돌말류 분야에서 요구되는 실내분석 정도관리 방법(MOE-NIER, 2022)의 개선을 위한 간편한 분석도구를 신규로 개발하여 그 효용성을 검토하기 위해 수행되었다. 정도관리의 목적에 부합하기 위해 정성 및 정량분석이 동시에 가능하도록 영구 표본을 제작함에 있어 격자가 있는 커버 글라스와 슬라이드 글라스를 이용한 시험방법으로 비교하였다.

재료 및 방법

1. 부착돌말류 실내분석 정도관리용 영구표본 슬라이드 제작 준비

본 연구를 위한 부착돌말류 시료는 2022년 9월~10월 동안에 우리나라 주요 하천의 200개 지점(산지 10%, 농촌 70% 및 도시 20%)에서 채집하였다. 부착돌말류 채집, 전처리(세정), 영구표본 제작(봉입) 및 관찰(동정 및 계수)의 순차적 절차를 요약한 내용은 Table 1과 같다. 영구표본 시료는 각 지점별로 전처리한 후 동량으로 혼합해서 사용하였다. 이때 현장의 원시료에서 돌말류의 조체량보다 토양성분의 무기물 미립자가 월등히 많이 포함된 경우, 높은 탁도 방해물질에 의한 부정적 영향이 지배적이어서 제외시켰다.

2. 부착돌말류 실내분석 정도관리용 영구표본 슬라이드 개발 및 비교

부착돌말류를 이용한 조사·평가 정도관리의 목적에 부합하는 정성 및 정량적 분석을 동시에 고려하기 위해(MOE-NIER, 2022), 특정 구획 내에서 종조성 및 현존량을 함께 파악하고자 정형화된 격자(grid) 도구로 디자인하였다(Fig. 1, Table S1). 유리 재질인 커버 글라스(cover glass, CG)와 슬라이드 글라스(slide glass, SG)에 격자가 표시되어 있는 기존 성형 제품을 그대로 또는 일부 변형하여 직접 가공한 후 영구표본 슬라이드를 만들었다(Fig. 1, Table S1). 이때 커버 글라스는 유리 표면을 레이저로 식각(etching) (이하 유격자 CG)한 것(Cat No. 72264-18, Lot No. 221209; Electron Microscopy Sciences (EMSs), USA)을, 슬라이드 글라스는 내부에 유색선화(color-line drawing) (이하 유격자 SG)한 것(Cat No. S6117; Matsunami, Japan)을 각각 채택하였다(Table S1). 무격자 CG (Lot No. 37848-017 (0.1 mm), Cat No. 0350000 (0.4 mm); Marienfeld, Germany)와 SG (Lot No. 44643-317; Marienfeld, Germany)는 일반적으로 통용되고 있는 상용 제품을 각각 사용하였다. 테스트 표본 슬라이드에서 한 격자 내에 돌말류 피각의 밀도는 20~30 frustules 범위로서 랜덤 분포하도록 시료 농도를 조절하였고, CG 위에 옮겨놓은 액상의 세정 돌말류 시료는 상온의 건조 과정에서 피각의 응집 또는 뭉침 현상이 최소화되도록 완속 처리하였다(Table 1, STEP C 참조)(McBride, 1988; McLaughlin, 2012).

실험분석에 사용한 CG (3종)와 SG (2종)의 주요 규격 제원은 Table 2와 같으며, 유격자 CG와 SG는 각 1종씩 포함하였다. 유격자 CG (18×18 mm)는 내부(16×16 mm)에 총 494 grids의 정사각형(ca. 0.22 mm size)이 식각되어 있으며, 격자의 선은 투명한 무색을 띠고 있다(Fig. 1, Table S1).

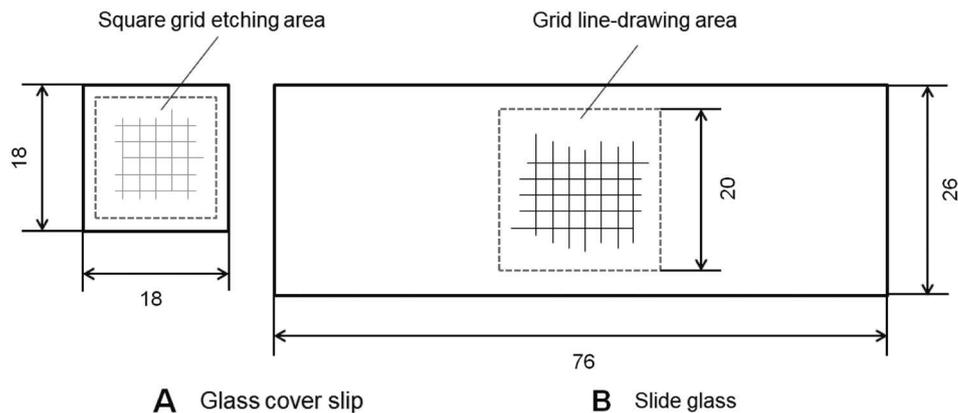


Fig. 1. Structural diagram showing the size dimensions (width (W), length (L), mm) and external- and internal-shapes of a cover glass slip (A) with etched regular grids (grid size ca. 0.22 mm) and a slide glass (B) with colored lines (grid size 1.0 mm).

Table 1. The experimental procedure and detailed method for sequential pre- and post-processing of benthic attached diatom samples by acid treatment using HNO₃ and K₂Cr₂O₇ reagents.

STEP A. SAMPLING DIATOMS

- (1) Collect stone and rock substrates in stream running water.
- (2) Brush or scrape the surface biofilm from the substrate with a brush (e.g., toothbrush). Rinse the substrate with distilled water and repeating until completely removed.
- (3) Measure the collected volume (mL) using a mass-cylinder.
- (4) Measure the area (cm²) of the scraped substrate using a ruler or a small plastic quadrat (e.g., 5 × 5 cm).
- (5) Prepare samples for the purpose of analyses (e.g., chlorophyll-*a*, ash-free dry matter (AFDM), species composition and standing crops).

Method references: Barbour *et al.*, 1999; Nagy, 2011; McLaughlin, 2012; APHA, 2017

STEP B. CLEANING

- (1) Transfer about 5 mL of subsample to the 50 mL Pyrex[®] glass beaker.
- (2) Add about 5 mL of concentrated Nitric acid (HNO₃, 63%) to the beaker.
- (3) Mixing raw subsample and con. HNO₃.
- (4) Digest the sample for 5~10 minutes on a hot plate filled with fine sand of a homogeneous particle size.
- (5) Add a small amount of Potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) powder and then mix well.
- (6) Continue the digestion until the sample becomes sticky.
- (7) Cool down to the room temperature and add a small amount of distilled water.
- (8) Transfer digested material to the 15 mL centrifuge tube.
- (9) For centrifuge, rotate more than 50 times (2,500 rpm) about 10 minutes using a manual centrifuge equipped with a swinging-bucket rotor.
- (10) Discard 1/2 the supernatant and refill with distilled water. Then, wash repeatedly (approximately 10 times) with distilled water until the sample becomes transparent.

Method references: Hendey, 1964; Barbour *et al.*, 1999; Joh, 2010; Nagy, 2011; McLaughlin, 2012; APHA, 2017; Trobajo and Mann, 2019

STEP C. MOUNTING (Making permanent slides for light microscopy)

- (1) Transfer and spread a drop of the cleaned sample onto a glass cover slip on a firmly fixed table.
- (2) Dry at wind- and dust-free room temperature for at least 48 hrs.
- (3) Using a glass pipette, put a drop of the Pleurax[®] mounting media (high-refractive index mountant, RI = 1.8) to the slide glass.
- (4) Transfer the dry side cover glass slip, turn it upside down, to the slide glass on which mountant is placed.
- (5) Evaporate media solvent on the slide-warmer.
- (6) Put a label on the permanent slide, and use it for light microscopically observation of diatoms.

Method references: Hendey, 1964; McBride, 1988; Barbour *et al.*, 1999; Joh, 2010; Nagy, 2011; McLaughlin, 2012; APHA, 2017

STEP D. IDENTIFICATION AND COUNTING

- (1) Primarily observe and identify diatoms under 1,000 × magnification using a light microscope (e.g., Zeiss Axioscope, AXIO Vert.A1, Germany).
- (2) And then, subsequently count under 400 × magnification.

Method references: Krammer and Lange-Bertalot, 1997~2004; Barbour *et al.*, 1999; Joh, 2010; Nagy, 2011; McLaughlin, 2012; MOE-NIER, 2011, 2016b; APHA, 2017

STEP E. PHOTOGRAPHING

Take micrographs of diatoms frustules (e.g., valve outline, stria structure, striae arrangement, raphe, punctum(-a), etc.) using a light microscope (e.g., Zeiss Axioscope, AXIO Vert.A1, Germany) equipped with the Axiocam 503 or 506.

Method references: Nagy, 2011; McLaughlin, 2012

유격자 SG (76 × 26 mm)는 중앙부 (20 × 20 mm)에 총 400 grids의 정사각형 (1.0 mm size)이 짙은 황색선화 되어 있다 (Fig. 1, Table S1). 비교실험을 위한 영구표본은 유격자 CG-

무격자 SG와 무격자 CG-유격자 SG의 조합으로 제작하였다 (Tables 2, 3 and S1). 무격자 CG의 경우, 영구표본 SG 내 돌말류 피각의 해상도를 비교하기 위해 (McLaughlin, 2012),

Table 2. Specification and characteristics of the main materials used in comparative experiment in this study. Size dimensions represent width (W), length (L), and thickness (T), respectively.

Specification	Grids		Remarks
	With	Without	
Cover glass (CG, mm)			
① 18×18×0.1	•	●	Standard
② 18×18×0.1	●	•	Square grid pattern, colorless and transparent line
③ 26×20×0.4	•	●	Counting chamber type
Slide glass (SG, mm)			
① 76×26×1.0	•	●	Standard
② 76×26×1.0	●	•	Square grid pattern, colored stripes

Table 3. Results of comparative experiments using permanent specimens of attached diatoms made with a combination of various tool materials. For the detailed composition of the samples, refer to the contents described in Table 2. +, usable; -, unusable.

Factors\ Experimental design and magnification	Sample A (CG①+SG②)		Sample B (CG③+SG②)		Sample C (CG②+SG①)	
	400×	1000×	400×	1000×	400×	1000×
Glass surface quality	Clean	Clean	Clean	-	Unclean	Unclean
Focus precision	High	High	High	-	High	High
Grid resolution	High	High	High	-	Low	Low
Operation convenience	Easy	Easy	Easy	-	Hard	Hard
Working time	Fast	Fast	Fast	-	Slow	Slow
Analytical accuracy	High	High	High	-	Low	Low
Qualitative QC test	+	+	+	-	-*	-*
Quantitative QC test	+	+	+	-	-*	-*

* Impossible to check frustules and grids (boundary) at the same time.

두께가 다른 1종(0.4 mm thickness)을 추가하였다(Tables 2, S1). CG와 SG의 조합은 무격자 CG(0.1 mm)-유격자 SG(Sample A, CG①+SG②), 무격자 CG(0.4 mm)-유격자 SG(Sample B, CG③+SG②) 및 유격자 CG(0.1 mm)-무격자 SG(Sample C, CG②+SG①)로 각각 구성하였다(Tables 2, 3). 광학현미경(정립 기준)의 400×과 1,000× 배율하에서 기계적 관찰 가용성, 격자·경계 식별 용이성 및 단위면적(특정 지정격자)내의 돌말류 피각 동정·계수 효율성 중심으로 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 부착돌말류 실내분석 정도관리용 영구표본 슬라이드 분석도구의 특성 비교

광학현미경하에서, 부착돌말류 영구표본 슬라이드의 기

계적 관찰 가용성은 두께 0.1 mm인 유·무격자 CG의 경우, 400×과 1,000× 배율하에서 모두 적합하였다(Table 3). 반면에, 두께가 0.4 mm 무격자 CG는 단지 400× 배율하에서만 쓸 수 있었고, 1,000× 배율하에서는 어려웠다. CG의 두께가 0.4 mm인 경우, 대상 조체 피각의 광학적 해상도는 0.1 mm에 비해 조금 더 선명하였으나(McLaughlin, 2012), 정립광학현미경을 사용할 경우 1,000× 배율하에서 대물렌즈가 CG에 부딪혀서 조작 자체가 쉽지 않았다. 그리고 유격자 SG 표본의 외형적 표면은 깨끗한 반면에, 유격자 CG는 그렇지 못하였다(Table 3). 이러한 차이는 무엇보다도 유격자 CG의 경우, CG에 격자를 새기면서 식각한 가장자리와 그 주변에 비정형 유리 조각들의 이물질이 흩어져 잔존하였기 때문이었다. 이를 제거하기 위해 가장 손쉬운 방법으로써, 증류수 또는 중성 세제에 의한 일반적 세척과 초음파(35 kHz, max. 30 min, Model-Sonorex Digitec DT 1028 F, Bandelin, Germany)를 이용한 기계적 세정을 시도하였는데 효과가 없

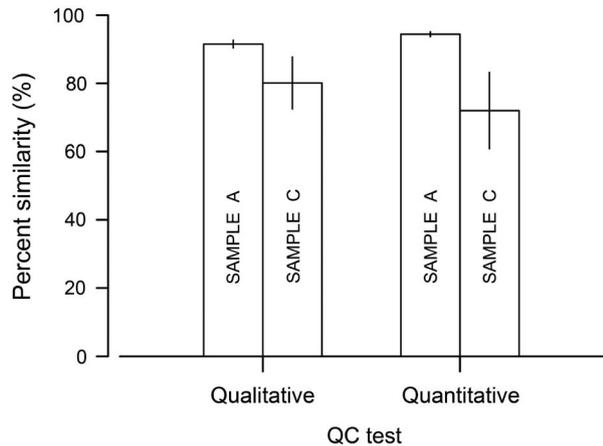


Fig. 2. Comparison of quality control (QC) test results between analysts ($n=3$) using Sample A (CG①+SG②, $n=5$) and Sample C (CG②+SG①, $n=5$). For the detailed composition of the samples, refer to the contents described in Tables 2 and 3.

었다. 결과적으로, 이것은 높은 열을 수반하는 식각 작업과 동시에 연이어 깎인 유리 파편 부스러기가 튀어서 격자 선과 그 주변에 비교적 단단하게 달라붙은 것으로 짐작되었다(EMSs, personal communication 2023).

광학현미경하에서, 검경 초점은 전체 표본시료를 통해 돌말류의 피각 또는 격자를 정밀하게 조정하여 맞출 수 있었다(Table 3). 격자의 해상도는 유격자 CG에 비해 유격자 SG가 비교적 우수하였는데, 이는 격자 표시를 위한 선의 색상에 따른 효과로 볼 수 있었다. 또한, 유격자 CG에는 식각된 흠이 있어 그 깊이만큼 상(phase)의 높낮이 변동 차이가 현저하였다. 그로 인한 직접적 영향으로, 실험분석 과정에서 조작 편의성과 작업 소요시간은 유격자 CG보다 유격자 SG 표본이 훨씬 손쉽고 단축되었으며, 미동 조절 없이 피각과 격자를 동시에 안정적이고 편리하게 검경 가능한 유격자 SG 표본에서 높은 정확도를 가졌다(Table 3, Fig. 2). 돌말류 피각에 대한 동정 및 계수의 효용성은 다소 상이하였다. 격자·경계의 식별과 돌말류 피각의 동정(정성분석)·계수(정량분석)를 함께할 수 있는 표본시료는 무격자 CG와 유격자 SG로 조합된 「Sample A, B」에서만 가능하였고, 광학현미경의 검경 배율에 무관하게 쓸 수 있는 표본시료는 「Sample A」가 유일하였다(Tables 3, S1). 또한, 유격자 표본슬라이드에 해당하는 「Sample A」($n=5$)와 「Sample C」($n=5$)에 대해 정도관리를 테스트한 결과, 정성 및 정량분석에서 「Sample A」는 각각 91.5%, 94.4%이었고, 「Sample C」는 각각 80.1%, 72.0%로써 유격자 SG 도구가 더 효과적이었다(Fig. 2). 이때 분석자($n=3$) 간에 차이(표준편차)도 「Sample A」가 현저하게 작았다. 이러한 결과는 전술한 Table 3 내용에서, 표본시료의 여

러 가지 질적 성능(McLaughlin, 2012; Alers-Garcia *et al.*, 2021)에 의한 효과 또는 영향도 다소 관련되었을 것으로 판단된다.

2. 부착돌말류 실내분석 정도관리용 슬라이드 분석도구 개발의 기대효과 및 제언

수생태계의 생물정보 확보를 위한 조사·분석 정도관리는 환경데이터의 질적 수준에 대해 필수 보증으로써 점점 더 인식되고 있다(Kelly and Lewis, 1996; Alers-Garcia *et al.*, 2021). 수질과 관련된 화학적 데이터와 일부 생물학적 데이터(예, chlorophyll-*a*, ash-free dry matter)의 질적 평가를 위한 기술은 현재까지 꾸준히 잘 개발되어 왔으며, 개념적으로도 아주 간단하다. 예를 들어, 시스템에 따라 시료의 일부를 독립적으로 분석하거나, 일상적인 분석과정 중 알려진 농도의 시료를 중간에 삽입 추가하여 측정함으로써 가능하다(USEPA, 1979, 1995; APHA, 2017). 그러나 군집구조 분석을 포함하는 생물학적 방법은 분류군의 오동정(mis-identification) 또는 시료 내에 존재하는 전체 분류군을 다 찾지 못하는 것과 또 다른 관련된 오류의 원인(예, 분석자 간 차이)이 추가될 수도 있다(Kelly, 2013). 또한, 이러한 유형의 분석은 쉽게 자동화할 수 없으며, 다소 불확실성을 가진 실패한 시료 또는 데이터는 그 만큼 최종 개별 결과에 직접적으로 반영될 수도 있을 것이다(Kelly, 2013; APHA, 2017).

부착돌말류 정도관리는 품질보증 프로그램 계획을 근간으로 하여, 국가적 규모로 일시에 수행되는 대단위 프로젝트의 수행상 중요한 과정 중 하나로써 요구되어진다(Munro *et al.*, 1990; USEPA, 1995; Kelly and Lewis, 1996; Barbour *et al.*, 1999). 품질보증(QA) 프로그램은 실내분석에서 두 가지의 기능을 가진다(USEPA, 1979). 하나는 품질을 측정하는 것으로써, 결과의 신뢰성(정확도와 정밀도)을 지속적으로 모니터링하는 것이다. 또 하나는 품질의 정도관리(QC) 즉, QC-check로서 다양한 목적의 평가에 사용되는 데이터의 신뢰성 보장을 부여하는 것이다. 단일 연구의 조사 및 평가는 비교 대상이 없으므로 정도관리가 불필요한 반면에, 광역의 공간적 조사를 다수의 연구자 또는 팀이 수행하게 될 경우, 조사·분석 방법 절차의 일관된 표준화를 통한 자료의 신뢰성을 제고할 수 있는 정도관리 계획 및 실행은 중요하고 반드시 필요하다(Kelly and Lewis, 1996; Barbour *et al.*, 1999). 이것은 무엇보다도 엄격한 데이터의 품질관리를 통해 다양한 목적에 맞는 생물학적 평가가 왜곡되지 않고 정확하게 이루어지게 하기 위한 것이다(Alers-Garcia *et al.*, 2021).

부착돌말류를 기반으로 하는 정도관리는 현장조사, 실내 분석, 데이터관리 및 자료분석의 각 과정에 대해 필요하다

Box 1. QUALITY CONTROL IN THE LABORATORY ANALYSIS USING BENTHIC DIATOMS

1. 부착돌말류의 모든 시료와 영구표본 슬라이드의 채집 내용을 관리한다. 시료는 정확하게 라벨링하고, 나중에 참고하기 위해 고정하여 보관한다. 부착돌말류 슬라이드 표본은 위치를 찾기 쉽게 하기 위해 마커(예, diamond marker)나 유성 펜을 이용하여 명기한다. 표본에 대한 기록을 관리하고, 표본 사진을 통해 실내분석 정도관리를 향상시킨다.
2. 모든 시료의 충분한 정도관리를 위해 몇 개의 습식표본(wet mount)을 만들고, 그중 2반복 샘플 내의 상대 풍부도와 종 풍부성을 평가한다. QA/QC 시료는 가능한 경우, 분류학적 정확성을 가지기 위해 다른 전문가에게 동정을 의뢰한다.
3. 공통적인 주요 부착돌말류 종들은 동일한 구간의 시료로 만든 2개의 슬라이드 표본에서 같은 결과가 나와야 하며, 군집 유사도(percent community similarity, PSc) 지수(값)이 75%를 넘어서야 한다.

$$\text{Percent Community Similarity (PSc)} = 100 - 0.5 \sum_{i=1}^s |a_i - b_i| \sum_{i=1}^s \min(a_i, b_i)$$

a_i : percentage of species i in sample A

b_i : percentage of species i in sample B

4. QA/QC 시료에 대한 다른 전문가의 동정 의뢰가 어려우면, 습식표본과 부착돌말류 슬라이드의 분류학적 결과를 확인하고, 주기적인 무작위 점검(spot-check)을 통해 외부의 다른 분류학자 의견을 들도록 한다. 습식표본의 모든 일반 속과 부착돌말류 슬라이드의 모든 주요 종(상대 풍부도 3% 이상)은 두 분석자에 의해 비슷하게 분류되어야 한다. 또한, 분류에 대한 차이점은 토의하고, 필요에 따라 수정한 후 업데이트 한다.

(USEPA, 1995; Barbour *et al.*, 1999). 이와 관련한 예로써, 현재 국내의 지킴(MOE-NIER, 2016a, 2017, 2019a, 2019b, 2022)에서 소개하고 있는 실내분석 정도관리 방법의 주요 내용은 다음의 Box 1과 같다.

국내외적으로, 돌말류를 이용한 수생태계 조사·평가 프로젝트에서 정도관리는 주로 전체 대상의 10% 범위로 설정하고 있다(USEPA, 1995; Barbour *et al.*, 1999). 실내분석 방법은 전술한 Box 1과 같이 부착돌말류 표본 시료와 슬라이드의 관리 및 종 동정 기반의 정성 분석법에 대해서만 주로 언급하고 있으며, 무격자 표본 슬라이드를 이용한 제한적인 절대 계수량(예, 200~500 frustules)에 의해 산정된 상대 풍부도(%)와 군집 유사도(%) 결과를 비교함으로써 정도관리를 수행하고 있다(Munro *et al.*, 1990; USEPA, 1995; Kelly and Lewis, 1996; Barbour *et al.*, 1999). 반면에, 부착돌말류의 영구표본 슬라이드에서 특정 구획 내에 존재하는 단위 면적당 피각 밀도 및 계수에 대한 정량분석 방법은 전혀 다루고 있지 못하다. 그 이유는, 다름아닌 실내분석 정도관리에서 요구되는 분석도구(예, 유격자 슬라이드)에 관한 연구 및 논의가 충분하지 않았기 때문으로 짐작된다. 게다가 부착돌말류의 실내분석 정도관리 분석도구는 유사 분야의 식물플랑크톤 분석(예, Sedgewick-Rafter counting chamber, APHA, 2017)에 비해 상대적으로 미흡하다.

본 연구를 통해 소개되는 부착돌말류의 영구표본 분석도구는 신속성, 정확성, 경제성, 효율성, 편의성 및 다중 동시 분석성(예, 정성·정량분석) 등을 부여할 수 있었다. 그 결과, 수

생태계 조사·평가의 실내분석 정도관리 방법에서 고려되어야 하는 양질의 데이터 확보에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 하천, 하구 및 저수지 등 공간적으로 다양한 수생태계 영역의 대상 시료에 공통적으로 적용 가능할 것이며, 지속적인 후속연구로서 더 나은 방법이 도출될 것으로 기대한다. 아울러, 부착돌말류의 실내분석 방법뿐만 아니라 프로젝트의 전 과정에 걸친 방법적 내용의 자세한 검토를 통해 보다 효과적인 정도관리가 강구될 필요가 있으며, 무엇보다도 조사·평가 수행 단계별 불확실성 또는 오류를 최소화하기 위해 QC-check 시스템(USEPA, 1979)의 체계적인 정도관리 절차 정립을 고려해야 할 필요가 있다.

적 요

하천생태계의 주요 1차 생산자인 부착돌말류는 대부분 세포 크기가 매우 작아 관찰과 피각 계수에 고배율의 현미경적 방법을 요구하며, 그로 인해 정성적, 정량적 분석에 있어 정확도와 정밀도를 확보하기가 쉽지 않다. 본 연구는 부착돌말류를 이용한 수생태계 조사·평가에 있어 정도관리를 향상시키기 위한 방법을 제안하였다. 정도관리의 목적에 부합하기 위해, 정성 및 정량분석이 동시에 가능한 영구표본 슬라이드의 분석도구를 신규로 개발하였다. 영구표본을 제작함에 있어 커버 글라스와 슬라이드 글라스에 격자 유무의 조합으로 표본을 만들어 상호 특성을 비교하였다. 그 결과, 다른 시험

조건에 비해 유색선형 격자 슬라이드를 사용하는 방법이 가장 효과적이었다. 향후, 더 개선된 방법의 개발이 기대되지만, 본 연구에서 개발된 방법은 그 효율성과 적용성에 있어 기존 부착돌말류의 실내분석 정도관리를 개선하는 데 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

저자정보 신재기(수생태원 한강(韓江) 원장), 김난영(건국대학교 환경보건과학과 연구교수), 박용은(건국대학교 사회환경공학부 교수), 이경락(국립환경과학원 물환경연구부 환경연구사), 김백호(한양대학교 생명과학과 교수), 김용재(대진대학교 생명과학과 교수), 김한순(경북대학교 생물학과 교수), 이정호(대구대학교 생물교육과 교수), 이학영(전남대학교 생물학과 교수), 황순진(건국대학교 환경보건과학과 교수)

저자기여도 개념설정: J.K. Shin, N.Y. Kim, and S.J. Hwang, 조사 및 실험 방법론: J.K. Shin, Y. Park, N.Y. Kim, and S.J. Hwang, 자료제공관리: Y. Park, N.Y. Kim, and S.J. Hwang, 자료분석: J.K. Shin, N.Y. Kim, and Y. Park, 원고 초안작성: J.K. Shin and S.J. Hwang, 원고교정 및 최종검토: Y. Park, K.L. Lee, B.H. Kim, Y.J. Kim, H.S. Kim, J.H. Lee, H.Y. Lee, and N.Y. Kim, 과제관리: N.Y. Kim and S.J. Hwang, 연구비 수주: S.J. Hwang. 본 논문의 모든 공저자들은 내용을 면밀히 검토하였고, 전적으로 동의합니다.

이해관계 본 논문에는 저자간 이해관계 충돌의 여지가 전혀 없습니다.

연구비 본 연구는 환경부(국립환경과학원) 2022년~2024년도 하천 수생태계 현황조사 및 건강성 평가 연구사업의 지원으로 수행되었습니다.

사사 본 논문의 심사과정에서 세밀하게 검토해 주신 익명의 심사위원들께 감사드립니다.

REFERENCES

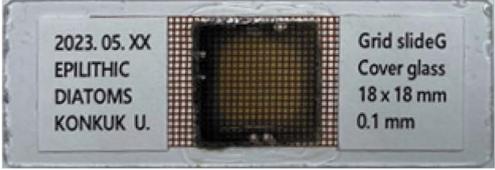
- Alers-Garcia, J., S.S. Lee and S.A. Spaulding. 2021. Resources and practices to improve diatom data analysis. *American Society of Limnology and Oceanography* May, pp. 48-53.
- Allan, J.D. and M.M. Castillo. 2007. *Stream Ecology: Structure and Function of Running Waters*. 2nd eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 436p.
- APHA. 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23rd Edition, American Public Health Association; Washington, D.C., USA.
- Barbour, M.T., J. Gerritsen, B.D. Snyder and J.B. Stribling. 1999. *Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish*, Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C., USA.
- Besse-Lototskaya, A., P.F.M. Verdonshot and J.A. Sinkeldam. 2006. Uncertainty in diatom assessment: Sampling, identification and counting variation. *Hydrobiologia* **566**: 247-260.
- Cox, E.J. 1996. *Identification of Freshwater Diatoms from Live Material*. Chapman and Hall, London, UK. 158p.
- Davis, W.S. and T.P. Simon. 1995. *Biological Assessment and Criteria: Tools for Water Resource Planning and Decision Making*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA. 415p.
- Evans, K.M., A.H. Wortley and D.G. Mann. 2007. An assessment of potential diatom 'barcode' genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist* **158**: 349-364.
- Fakciatore, A. and C. Bowler. 2002. Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 109-130.
- Falkowski, P.G., R.T. Barber and V. Smetacek. 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* **281**: 200-206.
- Francy, D.S., A.L. Jones, D.N. Meyers, G.L. Rowe, M. Eberle and K.M. Sarver. 1998. *Quality-Assurance/Quality-Control Manual for Collection and Analysis of Water-Quality Data in the Ohio District*, U.S. Geological Survey. Water-Resources Investigations Report 98-4057, U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey. Columbus, Ohio, USA. 71p.
- Hendey, N.I. 1964. *An Introductory Account of the Smaller Algae of British Coastal Waters. Part V: Bacillariophyceae (Diatoms)*. Fishery Investigations Series IV. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. British Crown Publisher. London, UK. pp. 18-20.
- Hwang, S.J., N.Y. Kim, S.A. Yoon, B.H. Kim, M.H. Park, K.A. You, H.Y. Lee, H.S. Kim, Y.J. Kim, J. Lee, O.M. Lee, J.K. Shin, E.J. Lee, S.L. Jeon and H.S. Joo. 2011. Distribution of benthic diatoms in Korean rivers and streams in relation to environmental variables. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* **47**: S15-S33.
- Joh, G. 2010. *Algal Flora of Korea. Volume 3, Number 1. Freshwater Diatoms I - Chrysophyta, Bacillariophyceae*, Centrales. Flora and Fauna of Korea. National Institute of Biological Resources, Ministry of Environment, The Republic of Korea. Incheon, Korea. 161p.
- Kelly, M.G. 2001. Use of similarity measures for quality control of benthic diatom samples. *Water Research* **35**: 2784-2788.
- Kelly, M. 2013. Building capacity for ecological assessment using diatoms in UK rivers. *Journal of Ecology and Environment* **36**: 89-94.
- Kelly, M. and A. Lewis. 1996. Assessing the quality of water quality assessment: An analytical quality control protocol

- for benthic diatoms. *Freshwater Forum* **7**: 23-32.
- Kelly, M., H. Bennion, A. Burgess, J. Ellis, S. Juggins, R. Guthrie, J. Jamieson, V. Adriaenssens and M. Yallop. 2009. Uncertainty in ecological status assessments of lakes and rivers using diatoms. *Hydrobiologia* **633**: 5-15.
- Kelly, M.G., A. Cazaubon, E. Coring, A. Dell'Uomo, L. Ector, B. Goldsmith, H. Guasch, J. Hurlimann, A. Jarlman, B. Kawecka, J. Kwadrans, R. Laugaste, E.A. Lindstrom, M. Leitao, P. Marvan, J. Padisak, E. Pipp, J. Prygiel, E. Rott, S. Sabater, H. van Dam and J. Vizinet. 1998. Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of Applied Phycology* **10**: 215-224.
- Kim, H., J. Khim and J. Park. 2021. Current status and prospects for the data quality control in terms of diatom analysis. *Journal of the Korean Society Oceanography* **26**: 238-247.
- Krammer, K. and H. Lange-Bertalot. 1997-2004. Susswasserflora von Mitteleuropa. Band 2. Parts 1-5. Bacillariophyceae. Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fisher. Heidelberg, GmbH Berlin, Germany.
- Lavoie, I., S. Campeau, N. Zugic-Drakulic, J.G. Winter and C. Fortin. 2014. Using diatoms to monitor stream biological integrity in Eastern Canada: An overview of 10 years of index development and ongoing challenges. *Science of The Total Environment* **475**: 187-200.
- Mann, D.G. 1999. The species concept in diatoms. *Phycologia* **38**: 437-495.
- McBride, T.P. 1988. Preparing random distributions of diatom valves on microscopic slides. *Limnology and Oceanography* **33**: 1627-1629.
- McLaughlin, R.B. 2012. An Introduction to the Microscopical Study of Diatoms. Edited by J.G. Dely and S. Gill. Anonymous Publisher. pp. 229-255.
- Munro, M.A.R., A.M. Kreiser, R.W. Battarbee, S. Juggins, A.C. Stevenson, D.S. Anderson, N.J. Anderson, F. Berge, H.J.B. Birks, R.B. Davis, R.J. Flower, S.C. Fritz, E.Y. Haworth, V.J. Jones, J.C. Kingston and I. Renberg. 1990. Diatom quality control and data handling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **327**: 257-261.
- Nagy, S.S. 2011. Collecting, cleaning, mounting, and photographing diatoms. pp. 1-18. *In: The Diatom World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* 19 (Seckbach, J. and J.P. Kocielek, eds.). Springer Science & Business Media.
- Ministry of Environment/National Institute of Environmental Research (MOE-NIER). 2011. Korean Diatoms. NIER-GP2011-1406. Incheon, Republic of Korea. 331p.
- Ministry of Environment/National Institute of Environmental Research (MOE-NIER). 2016a. Biomonitoring Survey and Assessment Manual. NIER-2016-372. Incheon, Republic of Korea. 313p.
- Ministry of Environment/National Institute of Environmental Research (MOE-NIER). 2016b. Korean Diatoms. NIER-GP2016-044. Incheon, Republic of Korea. 333p.
- Ministry of Environment (MOE). 2017. Water Quality Monitoring Program. MOE-11-1480000-001481-14. Sejong, Republic of Korea. 457p.
- Ministry of Environment/National Institute of Environmental Research (MOE-NIER). 2017. Biomonitoring Survey and Assessment Manual. NIER-GP2017-198. Incheon, Republic of Korea. 302p.
- Ministry of Environment/National Institute of Environmental Research (MOE-NIER). 2019a. Guideline on Current Status, Survey and Method of the Korean Aquatic Ecosystem: Streams and Rivers Field. NIER-2019-52. Incheon, Republic of Korea. 127p.
- Ministry of Environment/National Institute of Environmental Research (MOE-NIER). 2019b. Guideline on Current Status, Survey and Method of the Korean Aquatic Ecosystem: River Estuaries Field. NIER-2019-52. Incheon, Republic of Korea. 97p.
- Ministry of Environment/National Institute of Environmental Research (MOE-NIER). 2022. Quality Control Guidance on Current Status, Survey and Method of the Korean Aquatic Ecosystem. NIER-GP2022-030. Incheon, Republic of Korea. 44p.
- Round, F.E., R.M. Crawford and D.G. Mann. 1990. The Diatoms. Cambridge, New York, USA. 747p.
- Snell, M.A., P.A. Barker, B.W.J. Surridge, C. McW.H. Benskin, N. Barber, S.M. Reaney, W. Tych, D. Mindham, A.R.G. Large, S. Burke and P.M. Haygarth. 2019. Strong and recurring seasonality revealed within stream diatom assemblages. *Scientific Reports* **9**: 3313.
- Stevenson, R.J., M.X. Bothwell and R.L. Lowe. 1996. Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems. Academic Press, New York, USA. 753p.
- Stevenson, R.J., Y. Pan and H. van Dam. 2010. Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. pp. 57-85. *In: The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*, 2nd Edition (Smol, J.P. and E.F. Stoermer, eds.). Cambridge University Press, UK.
- Tennessee Department of Environment and Conservation (TDEC). 2010. Quality System Standard Operating Procedure for Periphyton Stream Surveys. Division of Water Pollution Control, Department of Environment and Conservation, State of Tennessee, USA.
- Treguer, P., D.M. Nelson, A.J. van Bennekom, D.J. Demaster, A. Leynaert and B. Queguiner. 1995. The silica balance in the world ocean: A reestimate. *Science* **268**: 375-379.
- Trobajo, R. and D.G. Mann. 2019. A rapid cleaning method for diatoms. *Diatom Research* **34**: 115-124.
- Underwood, G.J.C. and J. Kromkaml. 1999. Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. *Advanced in Ecological Research* **29**: 93-153.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1979.

- Handbook for Analytical Quality Control in Water and Wastewater Laboratories. EPA-600/4-79-019. Environmental Monitoring and Support Laboratory (EMSL) USEPA; Cincinnati, Ohio, USA.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1995. Generic Quality Assurance Project Plan Guidance for Programs Using Community Level Biological Assessment in Wadable Streams and Rivers. EPA 841-B-95-004. Office of Water; Washington, D.C., USA.
- Valentin, V., R. Frederic, D. Isabelle, M. Olivier, R. Yorick and B. Agnes. 2019. Assessing pollution of aquatic environments with diatoms' DNA metabarcoding: Experience and developments from France Water Framework Directive networks. *Metabarcoding and Metagenomics* **3**: e39646.
- Yool, A. and T. Tyrrell. 2003. Role of diatoms in regulating the ocean's silicon cycle. *Global Biogeochemical Cycles* **17**: 1103.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S1. Actual photos of each permanent specimen slides according to the experimental design. For the detailed composition of the samples, refer to the contents described in Table 2. Sample N means permanent mounting slide without grids.

Experimental design	Permanent mounting slides	Remarks
Sample A (CG①+SG②)		Square grid pattern, colored stripes
Sample B (CG③+SG②)		Square grid pattern, colored stripes
Sample C (CG②+SG①)		Square grid pattern, colorless and transparent line
Sample N (CG①+SG①)		Standard, common materials Both cover and slide glasses are gridless.