

Original article

종 다양성 평가를 위한 호소 생태계 동물플랑크톤 조사 방법 연구: 희박화 분석(rarefaction analysis)을 이용한 적정 시료 농축 정도 및 부차 시료 추출량의 검증

오혜지* · 최예림 · 김현준 · 홍근혁 · 박영석¹ · 김용재^{2,*} · 장광현*

경희대학교 환경학및환경공학과, ¹경희대학교 생물학과, ²대진대학교 생명과학과

Validation of Suitable Zooplankton Enumeration Method for Species Diversity Study Using Rarefaction Curve and Extrapolation. Hye-Ji Oh* (0000-0003-2098-8485), Yerim Choi (0000-0002-8600-1391), Hyunjoon Kim (0000-0002-7573-985X), Geun-Hyeok Hong (0000-0001-5771-7238), Young-Seuk Park¹ (0000-0001-7025-8945), Yong-Jae Kim^{2,*} (0000-0003-3326-8372) and Kwang-Hyeon Chang* (0000-0002-7952-4047) (Department of Environmental Science and Engineering, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea; ¹Department of Biology, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea; ²Department of Life Science, Daejin University, Pocheon 11159, Republic of Korea)

Abstract Through sample-size-based rarefaction analyses, we tried to suggest the appropriate degree of sample concentration and sub-sample extraction, as a way to estimate more accurate zooplankton species diversity when assessing biodiversity. When we collected zooplankton from three reservoirs with different environmental characteristics, the estimated species richness (S) and Shannon's H' values showed different changing patterns according to the amount of sub-sample extracted from the whole sample by reservoir. However, consequently, their zooplankton diversity indices were estimated the highest values when analyzed by extracting the largest amount of sub-sample. As a result of rarefaction analysis about sample coverage, in the case of deep eutrophic reservoir (Juum) with high zooplankton species and individual numbers, it was analyzed that 99.8% of the whole samples were represented by only 1 mL of sub-sample based on 100 mL of concentrated samples. On the other hand, in Soyang reservoir, which showed very small species and individual numbers, a relatively low representation at 97% when 10 mL of sub-sample was extracted from the same amount of concentrated sample. As such, the representation of sub-sample for the whole zooplankton sample varies depending on the individual density in the sample collected from the field. If the degree of concentration of samples and the amount of sub-sample extraction are adjusted according to the collected individual density, it is believed that errors that occur when comparing the number of species and diversity indices among different water bodies can be minimized.

Key words: observational efforts, sample concentration, sub-sample extraction, R package iNEXT, Hill number

Manuscript received 8 December 2022, revised 21 December 2022, revision accepted 23 December 2022

* Corresponding author: Tel: +82-31-201-3399, Fax: +82-31-204-8114
E-mail: ohg2090@naver.com
Tel: +82-31-539-1851, Fax: +82-31-539-1850
E-mail: yjkim@daejin.ac.kr
Tel: +82-31-201-2977, Fax: +82-31-204-8114
E-mail: chang38@khu.ac.kr

서론

생물다양성 (biodiversity)은 동일한 생물 기능군의 공존과 상이한 영양단계에 위치한 개체군 간 피-포식과 같은

© 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.

생물학적 상호작용에 의해 생태계 내 공급되는 자원의 양 및 질적 측면에 대상 생태계가 가지고 있는 생태계의 크기 및 공간적 이질성과 같은 구조적 특징이 복합적으로 작용하여 나타나는 구조적 결과물이다(Soininen *et al.*, 2012). 일반적으로 생물다양성 평가에는 총 출현 종수 및 개체 수를 기반으로 하는 종 풍부도 지수(RI, Richness Index-e.g., Margalef's diversity index)와 출현 종의 개체수 비율, 즉 종별 상대풍부도로 계산되는 종 다양도 지수(Species diversity index-e.g., Shannon's H' , Simpson index)를 비롯하여 종균등도(Pielou's evenness index)와 종우점도 지수(DI, Dominance Index-e.g., McNaughton's DI, Simpson's DI) 등이 사용되고 있다(Shannon, 1948; Simpson, 1949; Margalef, 1958; McNaughton, 1967; Pielou, 1975; Cairns *et al.*, 1993; Oh *et al.*, 2022). 이 같은 생물다양성 지수는 생태계의 복합적인 특성을 함축하여 단일 지표로 요약 가능하다는 장점을 가지고 있어 국내의 경우에도 동·식물 플랑크톤, 저서성 대형무척추동물 및 어류 등의 군집 분석 및 구성 매트릭스로서 건강성 평가에 활용하고 있다(NIER, 2017, 2019).

생물다양성은 군집 내 존재하는 종의 수, 즉 종 풍부도(species richness; S)와 각 종이 얼마나 균일하게 풍부한지 종의 양적 분포를 나타내는 균등도(evenness)를 포함한다(Soininen *et al.*, 2012). 종 풍부도의 변화는 조사 대상이 되는 생태계 내 서식하는 종의 현존량(abundance) 분포, 부피나 면적과 같은 플롯(plot)당 개체수로 표현되는 개체 밀도 및 동일 종의 개체 공간 분포를 의미하는 공간 집합(spatial aggregation) 총 세 가지 요소로 분해될 수 있다(McGlenn *et al.*, 2018). 따라서 현장 조사 시 채집된 생물 시료를 동정·계수하는 과정에서 검출되는 종의 수는 조사를 수행하는 공간의 면적, 채집 시간, 채집 도구의 선정과 같은 채집 시 노력과 개체의 계수와 같은 관찰 노력이 증가할수록 함께 증가하게 된다. 특히 관찰 노력의 경우, 노력 여하에 따라 시료로부터 추출한 표본이 시료를 대표하는 정도를 의미하는 sample coverage (최대 1.0-표본이 시료를 완전히 대표함)와 그에 따른 완전성(sample completeness)이 달라지기 때문에 중요하게 여겨진다. 이는 여러 수체 및 지점 간 종 풍부도의 상대 비교를 위해서는 채집 노력과 관찰 노력의 정도가 유사해야 할 필요성을 시사한다(Gotelli and Colwell, 2001; Hsieh *et al.*, 2016).

국내에서 수행되는 생물 조사 중 어류와 같은 대형 생물의 경우, 조사 시기 및 장소 등의 차이로 인한 채집 개체의 차이가 발생하지만, 조사 시 투망을 던지는 횟수, 족대를 사용하는 시간 등 채집 노력의 통일을 통해 단위 노력 당 어획량(CPUE, Catch Per Unit Effort)으로 대상 종의 풍부

도를 간접적으로 나타내며 채집된 모든 개체들을 대상으로 종의 동정 및 계수가 수행되므로 상대 비교 시 오차를 줄일 수 있다(NIER, 2017). 반면, 네트(net)를 이용하여 개체 채집이 이루어지는 동물플랑크톤의 경우, 채집된 개체의 밀도와 밀접한 연관이 있는 원수의 여과량이 가장 중요한 채집 노력 요소로 작용한다. 원수 여과량은 대상 수체와 선정된 지점에서의 수심에 맞추어 네트를 견인함에 따라 달라지기 때문에, 호소를 대상으로 동물플랑크톤 군집 조사를 수행할 때 조사 호소에 따라 시료의 채집 노력 차이가 발생하게 된다(Oh *et al.*, 2020). 또한, 일반적으로 채집된 동물플랑크톤 시료를 분석할 때 시료를 적정량 농축 후 부차시료(sub-sample)를 추출하여 이에 포함된 개체를 대상으로 동정 및 계수가 수행되어지기 때문에, 시료의 농축량과 부차시료의 추출량은 검출 종수 및 개체수와 관련하여 sample coverage 및 완전성에 영향을 주는 관찰 노력 요소로서 수체 및 지점 간 종 풍부도 상대 비교 시 오차를 발생시킬 수 있는 요인으로 작용할 수 있다.

현재 호소 등의 수생태계 건강성 조사에 활용되고 있는 '생물측정망 조사 및 평가지침'에서는 호소에서 동물플랑크톤 군집 분석을 수행할 때 동정 및 계수 방법으로 1회 검경 시 400개체 이상 계수하라는 기준을 제시하고 있으나, 시료의 농축 정도와 부차시료 추출량에 대해서는 제안하고 있지 않은 실정이다(NIER, 2017). 해당 지침의 '보구간편'에서는 계수 기준(전체 개체수가 200~400개체 이상)을 비롯한 분류군별 시료 농축량(지각류 및 요각류: 10~50 mL, 윤충류 및 요각류 유생: 50~100 mL), 부차시료 추출량(1 mL)과 같은 시료 분석 방법이 명시되어 있으나, 그 범위가 넓고 오차 및 기준에 대한 정량적인 비교 결과가 제시되지 않았다(NIER, 2017; Oh *et al.*, 2020). 따라서 본 연구에서는 희박화 분석(rarefaction analysis)을 이용하여 채집된 동물플랑크톤 시료의 농축 정도와 검경 개체수에 따른 풍부도, 다양도 및 sample coverage의 경향 비교를 통해 군집 분석 시 적절한 시료의 농축량과 부차시료 추출량을 추정하였다. 이러한 분석은 수생태계 생물다양성 평가를 수행할 때보다 정확한 동물플랑크톤 종 다양성을 산정할 수 있도록 동정 및 계수를 위한 가이드라인(guideline)을 제시하는데 활용될 수 있다.

재료 및 방법

1. 동물플랑크톤 채집 대상지

본 연구에서는 동물플랑크톤 군집 조성과 개체수 특성

Table 1. Summary of environmental conditions of study sites. Physicochemical water quality variables are average values in 2021. The variables were obtained from the Water Environment Information System (<https://water.nier.go.kr>). Values in the parentheses present a range of each variable in 2021. DER: deep eutrophic reservoir, SER: shallow eutrophic reservoir, DOR: deep oligotrophic reservoir, TOC: total organic carbon, TN: total nitrogen, TP: total phosphorus.

Reservoir	Depth and trophic status	Location (Lat., Lng.)	Chlorophyll a (mg m ⁻³)	TOC (mg L ⁻¹)	TN (mg L ⁻¹)	TP (mg L ⁻¹)	Zooplankton collection	
							Method	Towing depth (m)
Juam	DER	34°59'10.6"N, 127°13'30.5"E	18.6 (1.4~62.9)	4.8 (3.6~6.9)	5.3 (4.0~7.0)	0.034 (0.022~0.065)	Vertical	25
Shingal	SER	37°14'26.8"N, 127°05'29.7"E	8.1 (2.2~21.8)	1.8 (1.4~2.3)	0.8 (0.7~1.3)	0.020 (0.011~0.035)	Vertical	3
Soyang	DOR	38°02'05.5"N, 127°57'45.7"E	1.9 (0.4~3.1)	1.7 (1.6~1.8)	2.3 (1.6~2.9)	0.009 (0.004~0.015)	Vertical	4

에 따른 종 포화 경향을 비교하기 위해, 수심, 부영양화 정도 등 환경 조건이 서로 다른 세 호소를 대상으로 동물플랑크톤 군집 출현 특성이 상이한 시료를 선별하여 분석을 수행하였다. 수심이 깊고 부영양의 대형호(DER, Deep Eutrophic Reservoir)인 주암호와 얕고 부영양의 중형호(SER, Shallow Eutrophic Reservoir)인 신갈지에서는 각각 2021년 9월과 8월에 시료를 채집하였으며, 수심이 깊고 빈영양의 대형호(DOR, Deep Oligotrophic Reservoir)인 소양호에서는 같은 해 11월에 시료를 채집하였다. 각 호소의 동물플랑크톤 시료는 점정의 전층에 분포하고 있는 개체들의 채집을 위해 수심을 고려하여 동물플랑크톤 네트(망구 30 cm, 망목 60 µm)의 수직 견인(vertical towing)을 통해 채집되었다(Table 1). 125 mL 광구병(wide-mouth bottle)에 채집된 시료는 최종 농도가 3~5%가 되도록 포르말린 용액으로 고정하였으며, 실온 상태로 실험실로 운반하여 동정 및 계수되었다.

2. 동물플랑크톤 시료의 농축과 부차시료 분석

실험실로 운반된 동물플랑크톤 시료는 원형 메스실린더를 이용하여 24시간 침전시킨 후, 시료의 농축 정도 및 부차시료 추출량에 대한 추정을 보다 용이하게 하기 위해서 상등액을 사이펀(siphon)으로 제거하여 총량이 100 mL가 되도록 농축하였다. 농축된 시료는 교반 후 최초로 1 mL의 부차시료를 추출하여 현미경(CKX 41; Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 ×100 배율로 동정 및 계수하였으며, 검경 시 시료 분석량(추출된 부차시료량 / 농축된 전체 시료량)에 따른 동물플랑크톤 종수 및 개체수의 검출 정도를 파악하기 위해 부차시료량을 증량하여 추가 분석을 실시하였다. 부영양의 주암호와 신갈지의 경우, 총 100 mL 시료로부터 1 mL, 2 mL, 4 mL, 5 mL의 부차시료를 추출하였으

며, 상대적으로 동물플랑크톤 출현량이 적은 소양호의 경우, 동량의 시료로부터 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL의 부차시료를 추출하여 검경하였다. 부차시료 검경 시 최소 100개체 이상을 기준으로 계수하였으나, 소양호의 경우 최대 시료 분석량(1/10)에서도 동물플랑크톤 개체수가 매우 적게 확인되어 64개체까지 계수, 출현 종을 동정하였다.

시료 내 동물플랑크톤 종 동정 및 계수 시 발생할 수 있는 오차를 최소화 하기 위해 비교적 명확하게 종 동정이 가능한 지각류와 윤충류를 대상으로 연구를 수행하였으며, 유생 시기에 종의 구분이 불분명한 요각류는 본 연구의 분석에서 제외하였다. 검출된 종들은 최대한 종 수준으로 동정하였으나, 종 구분이 모호한 일부 분류군의 경우 속 수준에서 동정이 이루어졌다. 동물플랑크톤 종 동정은 국내·외 도감과 국립생물자원관의 『국가생물종목록-II. 척추동물·무척추동물·원생동물』을 참고하였다(Mizuno and Takahashi, 1991; Cho, 1993; NIBR, 2019).

3. 희박화 분석(rarefaction analysis)

희박화 분석은 생물 시료의 표본 추출 결과로부터 종 풍부도를 평가하기 위한 통계적 기법으로, 희박화 곡선(rarefaction curve)의 구성(e.g., sample-size-based, coverage-based)을 기반으로 시료에 대한 종 풍부도의 계산이 가능하다(Willis, 2019). 희박화 곡선은 시료로부터 N개의 표본(동물플랑크톤 시료의 경우, 부차시료를 의미)을 추출했을 때 표본 풀(pool)을 여러 차례 무작위적으로 재표본화시켜 각 표본으로부터 검출된 평균 종수를 표시하여 만들어지기 때문에 N개의 표본 풀로부터 검경 개체수(counted individual numbers)에 따라 검경되는 종수를 비롯한 생물다양성 지수는 물론, sample coverage를 예측하는 데 사용할 수 있다(Chakraborty *et al.*, 2022). 이때 주어

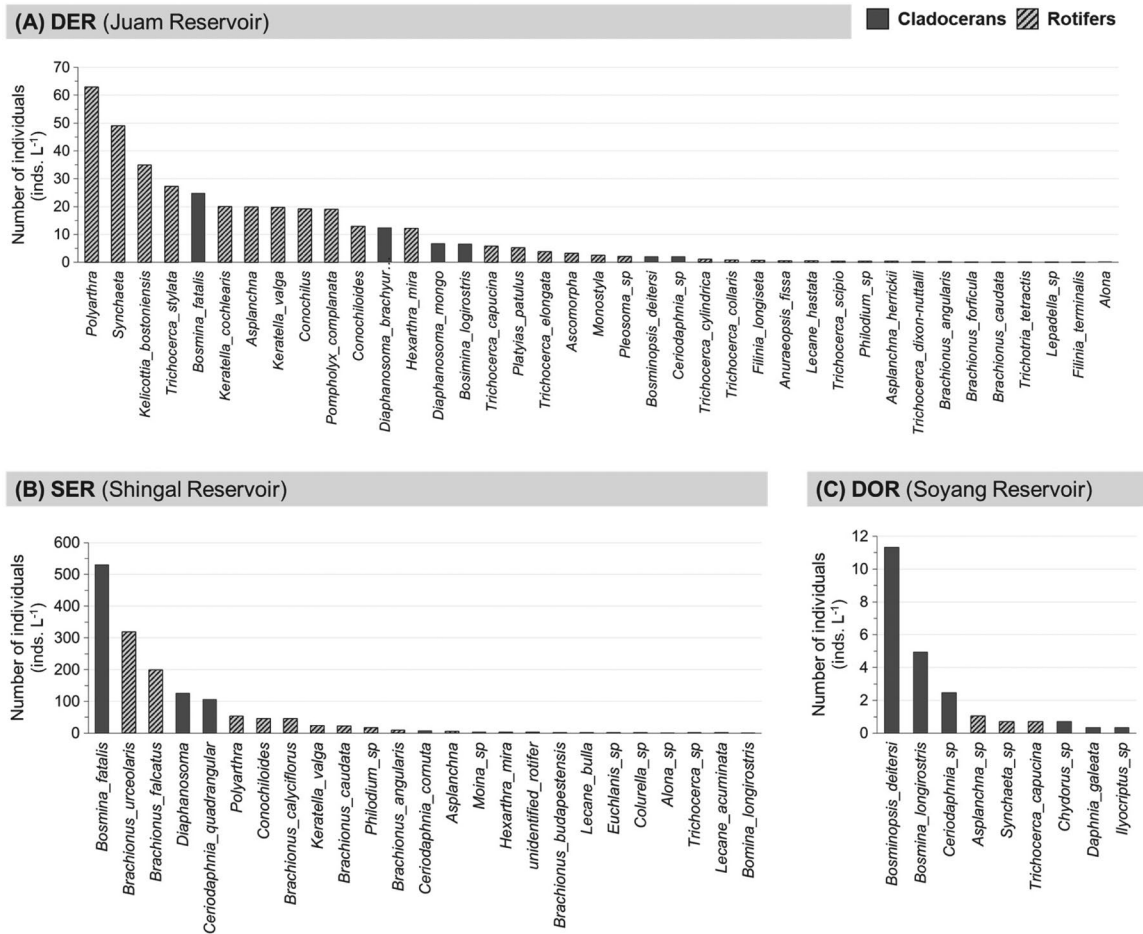


Fig. 1. Abundance of zooplankton species at three different reservoirs. Zooplankton collections for (A) DER: deep eutrophic reservoir, (B) SER: shallow eutrophic reservoir, and (C) DOR: deep oligotrophic reservoir were conducted in September, August, and November 2021, respectively.

진 검경 개체수에 대한 출현 종수를 기준으로 삼아, 그 보다 적은 개체수 구간은 일정 간격의 임의의 값을 추정하는 보간법(interpolation)을, 보다 많은 개체수 구간은 범위 밖의 값을 추정하는 보외법(extrapolation)을 이용하여 검경 개체수 증가에 따른 생물다양성 지수 및 sample coverage의 추세를 추정하게 된다(Chao and Jost, 2012; Chao *et al.*, 2014).

본 연구에서는 서로 다른 환경의 호소로부터 채집된 동물플랑크톤 시료를 이용하여 시료의 농축 정도와 부차시료 내 검경 개체수에 따른 풍부도, 다양도 및 sample coverage의 변화 경향 비교를 위해 표본 크기 기반(sample-size-based) 희박화 분석을 실시하였다. 표본 크기 기반의 희박화 곡선은 표본 크기(검경 개체수)가 증가함에 따라 유효 종수(the effective number of species) - 즉, 힐 넘버(Hill number, qD)가 포화되는 경향을 보여준다(Chao *et al.*, 2014). 힐 넘

버는 다양성 차수 q 값에 의해 종의 상대풍부도에 대한 측정 민감도가 결정되며(Eq. 1), 그 값에 따라 종 풍부도, Shannon's H' , Simpson 역지수(Inverse Simpson index)와 같은 다양성 지수가 계산된다(Hill, 1973).

$${}^qD = (\sum_{i=1}^S p_i^q)^{1/(1-q)} \quad (\text{단, } q \neq 1) \quad (\text{Eq. 1})$$

S 는 군집 내 종수, p_i 는 i 번째 종의 상대풍부도($i=1, 2, \dots, S$)를 의미한다. $q=0$ 일 때, 군집 내 각 종의 풍부도는 qD 값에 기여하지 않게 됨으로 단순히 종 풍부도 값을 의미하게 된다. $q=1$ 일 경우, qD 식은 정의되지 않지만 q 값이 1에 수렴할 때 Shannon 지수(index)의 지수값(exponential), 즉, Shannon's H' 가 계산되며(Eq. 2), $q=2$ 일 경우에는 Simpson 역지수라는 다양성 지수가 계산된다(Eq. 3)(Chao *et al.*, 2014).

$${}^1D = \lim_{q \rightarrow 1} {}^qD = \exp(-\sum_{i=1}^S p_i \log p_i) \quad (\text{Eq. 2})$$

$${}^2D = 1/\sum_{i=1}^S p_i^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

이 중 본 연구에서는 종 풍부도 및 Shannon's H' 와 함께 sample coverage의 포화 정도를 분석하였으며, 분석은 통계 분석 소프트웨어 R program의 'iNEXT' package를 이용하였다(Hsieh *et al.*, 2016; R core Team, 2022).

결 과

1. 동물플랑크톤 군집 출현 특성

9월에 채집된 수심이 깊은 부영양호(주암호)의 100 mL로 농축된 시료로부터 5 mL의 부차시료를 추출하여 동물플랑크톤의 동정 및 계수를 수행한 결과, 7종의 지각류와 32종의 윤충류(총 39종)가 검정되었으며, 총 동물플랑크톤 개체수 380 inds. L^{-1} 중 지각류가 55 inds. L^{-1} 로 14.4%, 윤충류가 326 inds. L^{-1} 로 85.6%의 비율을 차지해 윤충류가 우점하는 환경으로 나타났다. 개체수 기준 상위 5종이 총 개체수의 52.3% (199 inds. L^{-1})를 차지했으며, 그 중 4종이 윤충류 종들(*Polyarthra sp.* > *Synchaeta sp.* > *Kellicottia bostoniensis* > *Trichocerca stylata*)로 확인되었다(Fig. 1A).

8월에 채집된 수심이 얇은 부영양호(신갈지) 시료의 경우, 주암호와 같은 조건에서 지각류 6종과 윤충류 16종(총 22종)이 검정되었으며, 총 동물플랑크톤 개체수 1,535 inds. L^{-1} 중 지각류가 776 inds. L^{-1} 로 50.6%, 윤충류가 759 inds. L^{-1} 로 49.4%의 비율로 분석되었다. 개체수 기준 상위 5종은 총 개체수의 83.5% (1,282 inds. L^{-1})를 차지했으며, 지각류 3종(*Bosmina fatalis* > *Diaphanosoma sp.* > *Ceriodaphnia quadrangular*)과 윤충류 2종(*Brachionus urceolaris* > *B. falcatus*)이 포함되었다(Fig. 1B).

11월에 채집한 수심이 깊은 빈영양호(소양호)에서는 동량의 농축된 시료로부터 10 mL의 부차시료를 추출하여 동물플랑크톤의 동정 및 계수를 수행하였으며, 그 결과 6종의 지각류와 3종의 윤충류(총 9종)가 검정되었다. 23 inds. L^{-1} 의 총 동물플랑크톤 개체수 중 지각류가 89.1% (20 inds. L^{-1}), 윤충류가 10.9% (3 inds. L^{-1})를 차지해 지각류가 우점하는 것으로 나타났다. 상위 5종(지각류 - *Bosminopsis deitersi* > *B. longirostris* > *Ceriodaphnia sp.*; 윤충류 - *Asplanchna sp.* > *Synchaeta sp.*)의 개체수는 21 inds. L^{-1} 로 총 개체수의 90.6%를 차지했다(Fig. 1C).

2. 시료 농축 및 부차시료 추출량에 따른 동물플랑크톤 검정 결과

세계 호소 중 동물플랑크톤 출현 종수가 가장 많았던 주암호의 경우, 100 mL의 농축된 시료로부터 1 mL의 부차시료를 추출하여 검정했을 때 5종의 지각류 68개체와 20종의 윤충류 535개체가 확인되었으며, 부차시료 추출량을 5 mL까지 증량했을 때 지각류 7종 430개체, 윤충류 32종 2,556개체가 동정 및 계수되었다(Fig. 2A). 해당 시료를 100개체가 계수될 때까지 검정했을 때 총 16종(지각류 2종, 윤충류 14종)의 동물플랑크톤만이 확인되었으나, 계수 개체를 늘려감에 따라 검출 종수는 증가하여 3,000개체까지 계수했을 때 지각류 7종과 윤충류 32종, 총 39종이 출현하는 것으로 분석되었다(Fig. 2B).

높은 동물플랑크톤 현존량이 특징적으로 나타나는 신갈지에서는 1 mL의 부차시료를 추출하여 검정 시 지각류 4종 150개체와 윤충류 13종 170개체, 5 mL에서는 지각류 6종 731개체와 윤충류 16종 715개체가 확인되었다. 해당 시료의 경우, 100 mL의 농축 시료로부터 2 mL 이상의 부차시료를 추출하여 검정했을 때 5 mL 기준 90% 이상의 지각류 및 윤충류 종들이 검출이 이루어지는 것으로 나타났다(Fig. 2C). 신갈지 시료는 100~200개체까지 계수했을 때 총 14종(지각류 3종, 윤충류 11종), 300~400 개체까지 계수했을 때 총 18종(지각류 4종, 윤충류 14종)의 동물플랑크톤이 확인되었으며, 이후 1,000개체 계수 시 총 20종(지각류 5종, 윤충류 15종), 2,000개체까지 계수 시 총 24종(지각류 7종, 윤충류 17종)이 검정되었다(Fig. 2D).

동물플랑크톤 출현 종수 및 현존량이 모두 적게 분석된 소양호의 경우, 1 mL의 부차시료를 추출하여 검정했을 때 지각류 3종 8개체와 윤충류 1종 1개체, 5 mL에서는 지각류 4종 27개체와 윤충류 3종 5개체가 동정 및 계수되었다. 이후 부차시료 추출량을 10 mL까지 증량했을 때 총 9종(지각류 6종; 57개체, 윤충류 3종; 7개체)이 검정되었으며, 이때 부차시료량을 늘려감에 따라 계수되는 개체수는 윤충류 대비 지각류에서 보다 많은 양 증가하는 것으로 분석되었다(Fig. 2E). 소양호의 시료는 100 mL로 농축된 시료로부터 10 mL의 부차시료를 추출하여 검정했음에도 100 개체 이상의 계수가 이루어지지 않아 검정 개체수에 따른 검출 종수에 대한 분석을 진행할 수 없었다(Fig. 2F).

3. 희박화 분석을 통한 시료 농축 및 부차시료 추출량에 따른 다양성과 sample coverage 양상의 추정

각 호소별로 부차시료 추출량에 따른 다양성(qD)에 대한 표본 크기 기반 희박화 곡선을 그리고 종 풍부도($q=0$)

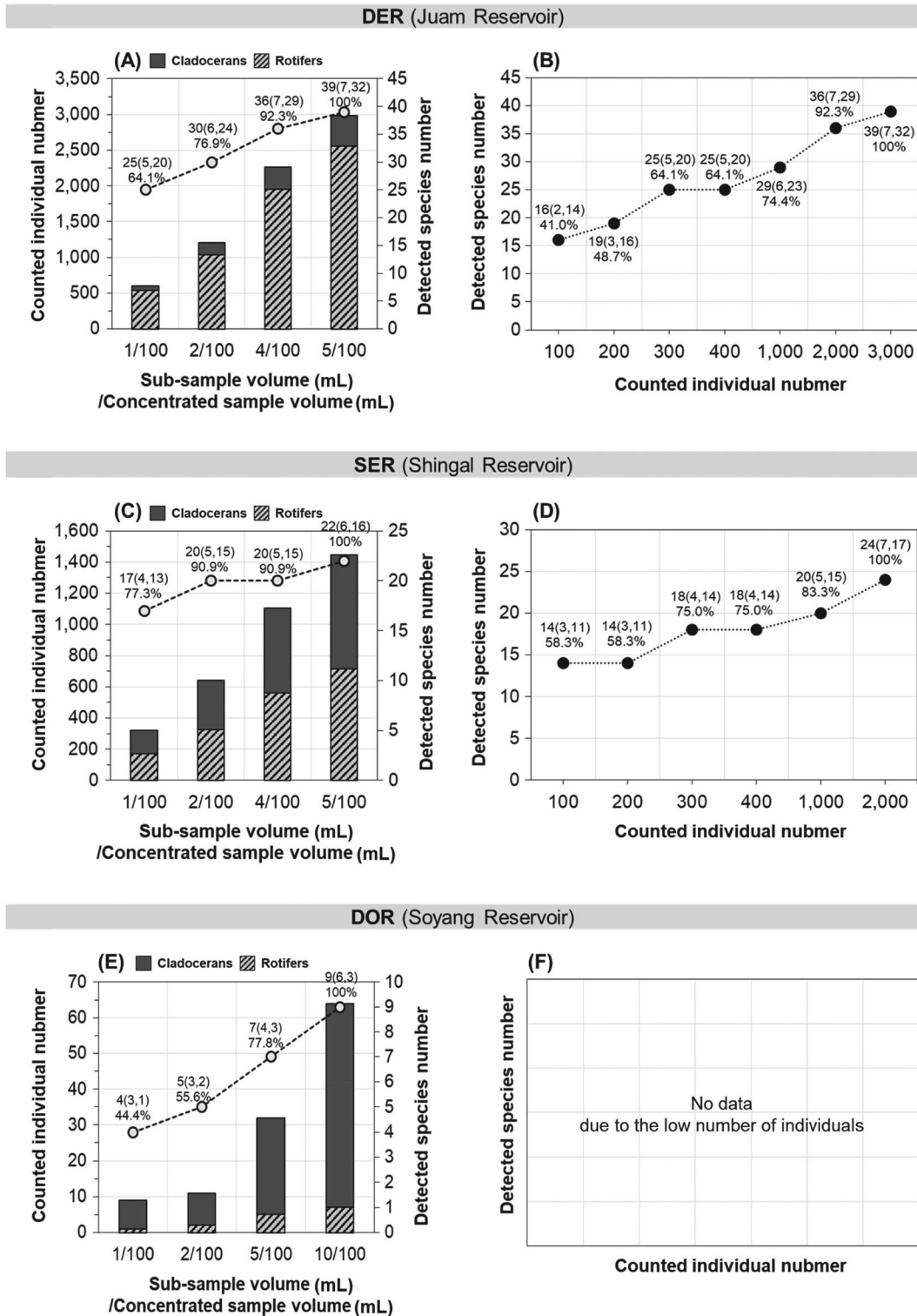


Fig. 2. Changes of counted individual number and detected species number according to the amount of sub-sample (A, C, E) and the detected species number according to the counted individual number (B, D, F) at three different reservoirs. The number at the top of the dotted line graph refers to the total detected species number (cladocerans', rotifers'), and the percent value represents the ratio of the detected species number during each sub-sample extraction based on the detected species number when the maximum amount of sub-sample was extracted from the 100 mL concentrated sample.

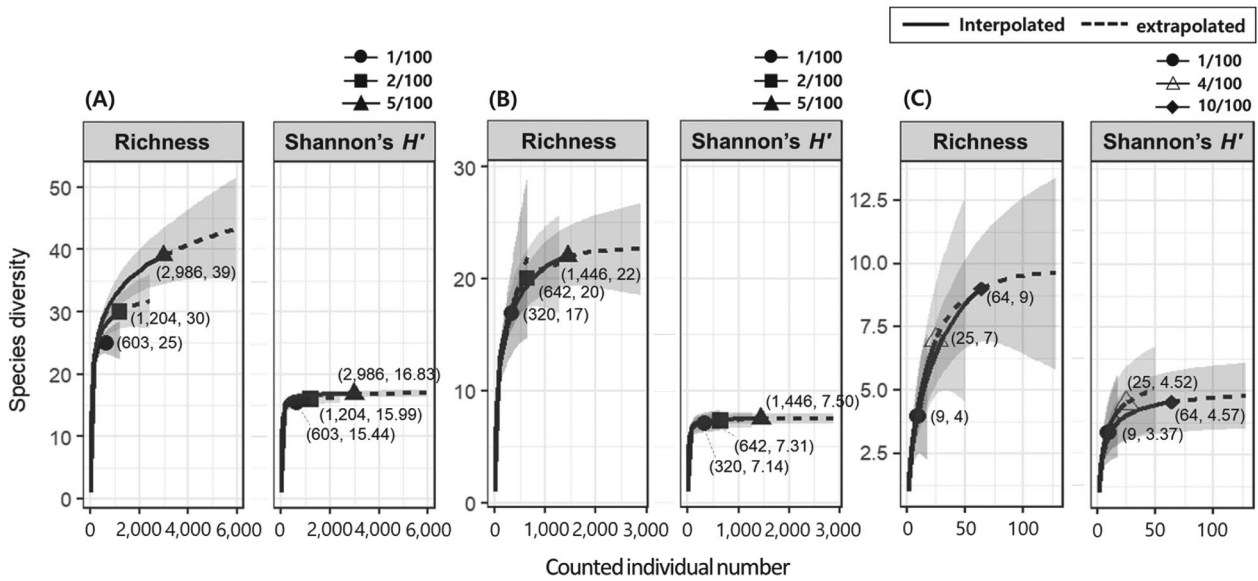


Fig. 3. Comparison of sample-size-based rarefaction (interpolation) and extrapolation of zooplankton species diversity for Hill numbers (qD) of order $q=0$ (Richness) and $q=1$ (Shannon's H') according to the amount of sub-sample (sub-sample volume (mL) / concentrated sample volume (mL) - 1/100 (●), 2/100 (■), 4/100 (△), 5/100 (▲), 10/100 (◆)) in three reservoirs of different environmental conditions - (A) DER, Juam Reservoir; (B) SER, Shingal Reservoir; (C) DOR, Soyang Reservoir. The qD is estimated by extrapolation up to twice the reference sample size. The gray-shaded region means the 95% confidence interval. The numbers in parentheses are the reference sample size (counted individual number) and consequence observed qD values for the amount of sub-sample.

와 Shannon's H' ($q=1$)를 추정·비교하였다(Fig. 3). 주암호에서는 100 mL로 농축된 시료로부터 1 mL의 부차시료를 추출했을 때 기준 표본 크기(reference sample size), 즉 검경 개체수가 603개체로, 해당 기준 표본 크기에 대해 종 풍부도와 Shannon's H' 값이 각각 25종과 15.44로 분석되었다. 부차시료 2 mL의 경우 기준 표본 크기 1,204개체에 대해 각각 30종과 15.99, 부차시료 5 mL에서는 기준 표본 크기 2,986개체에 대해 39종과 16.83으로 종 풍부도와 Shannon's H' 값이 계산되었다(Fig. 3A). 점근적(asymptotic)으로 추정된 주암호의 동물플랑크톤 종 풍부도와 Shannon's H' 값은 부차시료 추출량이 증가함에 따라 그 값이 증가하는 경향을 보였으며, 최대 시료 분석량(부차시료 5 mL) 기준 종 풍부도는 약 48종, Shannon's H' 값은 16.97로 추정되었다(Table 2A).

신갈지의 경우, 농축 시료 100 mL로부터 1 mL, 2 mL 및 5 mL의 부차시료를 추출했을 때의 기준 표본 크기는 각각 320개체, 642개체, 1,446개체로, 해당 기준 표본 크기에 대해 각각 17종, 20종, 22종의 종 풍부도가 분석되었다(Fig. 3B). Shannon's H' 값은 부차시료 1 mL, 2 mL, 5 mL에서 각각의 기준 표본 크기에 대해 7.14, 7.31, 7.50로 계산되었으며, 주암호에 비해 부차시료 추출량에 따른 종 다양도 지수 값의 변화 정도가 상대적으로 작게 나타났다(Fig.

3A; Fig. 3B). 최대 시료 분석량(부차시료 5 mL) 기준, 신갈지의 동물플랑크톤 종 풍부도는 약 23종, Shannon's H' 값은 7.56으로 추정되었으나, 최대 시료 분석량에서 가장 높은 종 풍부도를 보였던 주암호와는 달리 신갈지에서는 부차시료 1 mL 경우에서 약 32종으로 종 풍부도가 가장 높게 추정되었다. 한편, 농축 시료 100 mL로부터 2 mL의 부차시료를 검경했을 때 가장 작은 종 풍부도 및 Shannon's H' 값이 추정되었다(Table 2B).

소양호에서는 농축 시료 100 mL로부터 부차시료 1 mL를 추출했을 때 기준 표본 크기 9개체에 대해 종 풍부도가 4종, Shannon's H' 값이 3.37로 분석되었으며, 부차시료 5 mL에서는 기준 표본 크기 25개체에 대해 종 풍부도와 Shannon's H' 값이 각각 7종과 4.52로 분석되었다(Fig. 3C). 농축 시료로부터 부차시료 5 mL를 추출했을 때 대체로 종 풍부도와 Shannon's H' 값을 추정하는 희박화 곡선이 포화되는 경향을 보였던 주암호와 신갈지와는 달리, 동물플랑크톤 출현 종수 및 개체수가 적었던 소양호에서는 계속적으로 증가하는 추세를 보였다(Fig. 3). 소양호에서는 부차시료 추출량을 10 mL까지 증량했을 때 희박화 곡선이 비교적 포화되는 경향을 보였으며, 이때의 기준 표본 크기(64개체)에 대한 종 풍부도는 9종으로 부차시료 5 mL 대비 2종 증가하였으나, Shannon's H' 값은 4.57로 큰 차이

Table 2. Summary of observed diversity based on the enumeration results and asymptotically estimated diversity from sample-size-based rarefaction (interpolation) and extrapolation according to the amount of sub-sample (sub-sample volume (mL)/ concentrated sample volume (mL)) at three different reservoirs. Estimated diversity is presented with S.E. (standard error), LCL (the 95% lower confidence limit), and UCL (the 95% upper confidence limit).

Reservoir	Biodiversity	Sub-sample volume (mL) / Concentrated sample volume (mL)	Observed	Estimated	S.E.	LCL	UCL	
(A) DER	Juam	Species richness	1/100	25.00	25.50	1.32	25.03	33.43
			2/100	30.00	32.25	3.39	30.27	49.02
			5/100	39.00	48.00	10.17	40.52	92.26
	Shannon's H'	1/100	15.44	15.77	0.54	15.44	16.82	
		2/100	15.97	16.21	0.43	15.99	17.04	
		5/100	16.83	16.97	0.31	16.83	17.57	
(B) SER	Shingal	Species richness	1/100	17.00	31.95	13.61	20.26	85.55
			2/100	20.00	21.50	2.29	20.17	32.87
			5/100	22.00	22.67	1.31	22.06	29.80
	Shannon's H'	1/100	7.14	7.48	0.46	7.14	8.39	
		2/100	7.31	7.44	0.33	7.31	8.08	
		5/100	7.50	7.56	0.21	7.50	7.98	
(C) DOR	Soyang	Species richness	1/100	4.00	4.89	1.95	4.07	15.96
			4/100	7.00	9.16	3.27	7.25	25.37
			10/100	9.00	9.66	1.29	9.06	16.71
	Shannon's H'	1/100	3.37	4.38	1.04	3.37	6.42	
		4/100	4.52	5.47	1.04	4.52	7.51	
		10/100	4.57	4.93	0.64	4.57	6.19	

를 보이지 않았다(Fig. 3C). 최대 시료 분석량(부차시료 10 mL) 기준 소양호의 동물플랑크톤 중 풍부도 및 Shannon's H' 값은 각각 약 10종과 4.93으로 추정되었다. 종 풍부도는 부차시료 추출량의 증량에 따라 증가하는 경향을 보여 부차시료 10 mL에서 가장 높은 추정치를 보인 반면, Shannon's H' 의 경우 부차시료 4 mL에서 5.47로 추정되어 가장 높은 값을 보였다(Table 2C).

호소별 채집한 동물플랑크톤 시료를 검경하는 데 있어 표본, 즉 부차시료가 전체를 대표할 수 있는 적정 농축 정도 및 부차시료량을 이론적으로 추정하기 위해 sample coverage에 대한 표본 크기 기반의 희박화 분석을 수행하였다(Fig. 4). 주암호의 경우, 농축 시료 100 mL로부터 1 mL, 2 mL, 5 mL의 부차시료를 추출했을 때 모두 0.998의 sample coverage 값을 보여 부차시료 1 mL 이상 검경 시 부차시료가 채집 시료의 대부분을 대표하는 것으로 분석되었다(Fig. 4A). 신갈지의 경우, sample coverage가 부차시료 1 mL에서 0.981, 2 mL에서 0.995, 5 mL에서 0.999로 분석되었다. 100 mL 농축 시료 기준 5 mL 이상의 부차시

료 추출 시 해당 표본이 시료를 거의 완전히 대표할 수 있을 것으로 사료되며, 100 mL 농축 시료 기준 최소 2 mL 이상 부차시료를 추출하여 검경하는 것이 표본 완전성 측면에서 적합할 것으로 보여진다(Fig. 4B). 소양호에서는 부차시료 1 mL와 부차시료 2 mL에서 희박화 곡선이 포화하는 경향을 보이지 않았으며, 최대 시료 분석량인 10 mL의 경우에도 sample coverage가 0.970으로 낮게 분석되었다(Fig. 4C).

고찰

희박화 분석은 시료 검경 시 표본을 추출할 때 표본 내 포함되어 있는 개체가 많을수록 더 많은 종이 검출되는 점을 고려하여 이론적으로 이를 보완하기 위해 사용되며(Gotelli and Colwell, 2001), 표본 추출 정도가 종 다양성을 추정하기에 충분했는지 여부를 보여줄 수 있다는 특징을 가진다(Wang *et al.*, 2019). 본 연구에서는 수심, 수체의 영

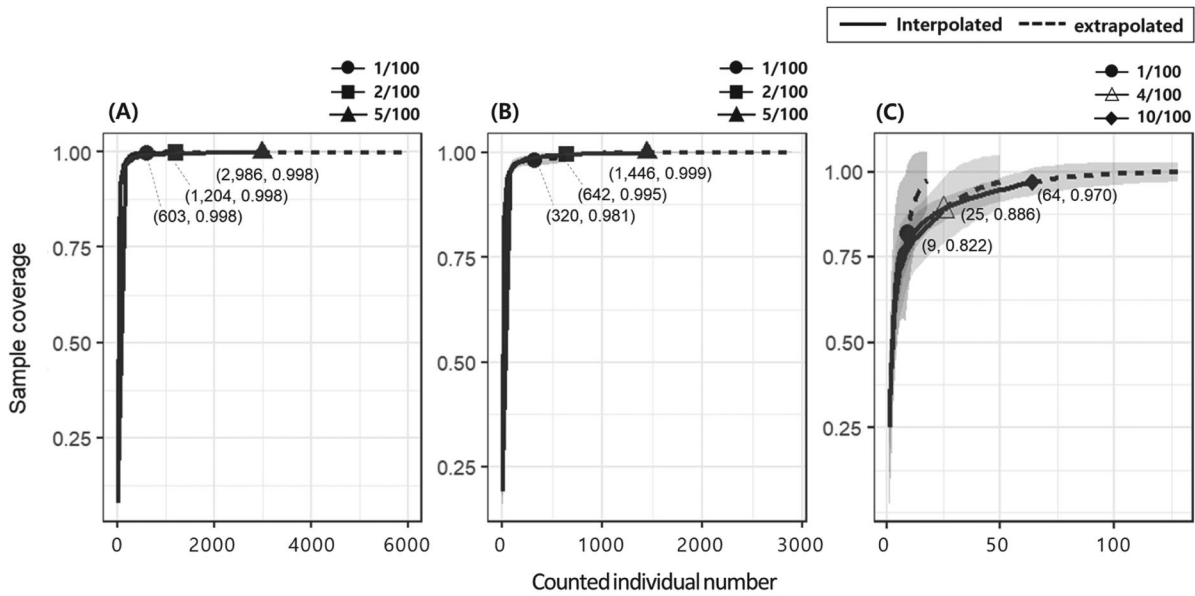


Fig. 4. Comparison of sample-size-based rarefaction (interpolation) and extrapolation of sample coverage according to the amount of sub-sample (sub-sample volume (mL) / concentrated sample volume (mL) - 1/100 (●), 2/100 (■), 4/100 (△), 5/100 (▲), 10/100 (◆)) in three reservoirs of different environmental conditions - (A) DER, Juam Reservoir; (B) SER, Shingal Reservoir; (C) DOR, Soyang Reservoir. The sample coverage is estimated by extrapolation up to twice the reference sample size. The gray-shaded region means the 95% confidence interval. The numbers in parentheses are the reference sample size (counted individual number) and consequence observed sample coverage for each amount of sub-sample.

양상태 및 동물플랑크톤 군집 출현 특성이 상이한 세 개의 호소를 대상으로 동물플랑크톤 시료를 채집, 시료의 농축 정도와 부차시료 추출량을 달리하여 검정했을 때 종 풍부도와 종 다양성(Shannon's H')의 포화 경향을 비교하고, 시료를 충분히 대표하기 위해 적절한 이론적 부차시료량을 추정하기 위해 표본 크기 기반의 희박화 분석을 실시하였다.

부차시료 추출량은 일정량으로 농축된 시료를 대상으로 증량할수록 검출되는 종의 수가 증가하는 것이 일반적이거나, 이에 의해 추정되는 다양성 지수(종 풍부도, Shannon's H')의 변화 경향은 호소의 특성에 따라 상이하게 나타났다. 수심이 깊은 부영양의 주암호에서 채집한 동물플랑크톤 시료에서는 추출한 부차시료 양이 많을수록 종 풍부도 및 Shannon's H' 의 추정치가 일정하게 증가하는 경향을 보였으며, 이로 인한 sample coverage는 농축 시료 100 mL 기준 부차시료의 추출량 1 mL 이상에서 모두 99% 이상으로 나타났다. 이를 통해 채집된 동물플랑크톤 시료 내 종 및 개체가 풍부한 경우 소량의 부차시료로부터 전체 시료를 대표할 만큼 충분한 동정 및 계수가 이루어질 수 있음을 추측할 수 있었으며, 이는 현장에서의 여과량이 많아 시료 내 많은 개체가 농축되었기 때문인 것으로 판단된다. 동물플랑크톤 시료 내 종수는 많지 않았으나 개체가 풍부했던 얇은 수심의 부영양호 신갈지에서는 부차시료 1

mL 검정 시 전체 채집 시료를 대표하는 정도가 98.1%로 상대적으로 낮았으며, 2 mL와 5 mL에서는 그 값이 각각 99.5%, 99.9%로 100 mL 농축 시료 기준 최소 2 mL 이상의 부차시료를 추출해야 대표성이 99% 대에 이르는 것으로 나타났다. 반면, 동물플랑크톤 출현 종수뿐만 아니라 시료 내 개체 또한 적었던 소양호에서는 농축 시료 100 mL로부터 10 mL까지 부차시료를 추출하여 검정했을 때에도 해당 표본의 대표성이 전체 시료의 97% 밖에 되지 않아, 농축 시료 100 mL 기준 최소 10 mL 이상의 부차시료 추출, 실제 농축·분석 과정의 경우, 최대 10 mL까지 농축하여 1 mL 이상의 부차시료 추출을 통한 동물플랑크톤 군집 분석의 수행이 요구되는 것으로 판단되었다.

이처럼 동물플랑크톤 전체 채집 시료에 대한 부차시료의 대표성은 현장으로부터 채집된 시료의 개체 밀도 등과 같은 상태에 영향을 받는다. 현장 조사에서 채집된 동물플랑크톤 개체 밀도가 낮을수록 시료의 동정 및 계수 결과를 기반으로 한 군집 다양성 산정에 있어 보다 많은 관찰 노력이 요구된다. 서로 다른 수체 간 동물플랑크톤 군집의 절대적인 비교를 위해서는 채집 노력의 통일이 필요하지만, 통일된 채집 노력일지라도 대상지 혹은 조사 정점의 특성에 따른 개체 분포 등의 결과에 차이가 나타날 수 밖에 없기 때문에 채집 결과물의 상태를 바탕으로 관찰 노

력의 조절을 통해 상대 비교 시 오차를 최소화하는 방향이 보다 적절할 수 있다. 따라서, 현장으로부터 채집된 동물플랑크톤 시료 내 개체 밀도를 기반으로 부차시료 추출량을 결정함으로써 시료의 대표성을 확보하고, 특히 타 지점 간의 비교 시 이와 같은 시료의 대표성을 표준화하여 시료의 관찰 노력의 차이로 인한 출현 종수 및 다양도 산정의 오류가 발생하지 않도록 하는 것이 중요하다.

한편, 생물다양성 지수 중 종 풍부도 지수는 대상 생물의 군집 내 상대풍부도와 상관없이 최상위 포식자, 희귀종 등을 포함하는 전체 군집의 출현 정도를 바탕으로 그 값이 산출되는 반면, 출현 종별 개체수의 비율을 이용하여 계산되는 종 다양도 지수는 군집 내 차지하는 비율이 적은 종의 기여도가 낮게 반영될 수 있다(Delang and Li, 2013). 따라서 동물플랑크톤 조사 및 군집 평가 시 그 목적과 대상 분류군의 특징에 따라 적절한 지수를 선정하고 산정하는 데 있어서도 시료의 농축 정도 및 부차시료 추출량을 고려해야 할 필요가 있다.

적 요

본 연구에서는 수생태계 생물다양성을 평가할 때보다 정확한 동물플랑크톤 종 다양성을 산정하고 수체 간 상대 비교 시 오차를 줄이기 위한 방안으로서, 관찰 노력, 즉 시료의 농축 정도 및 부차시료 추출량의 적정안을 제시하기 위해 수심, 영양상태 및 동물플랑크톤 군집 출현 양상이 서로 다른 세 개 호소를 대상으로 표준 크기 기반 희박화 분석(sample-size-based rarefaction analysis)을 수행하였다. 현장에서 동일한 채집 도구를 이용, 조사 정점의 수심을 고려하여 채집된 동물플랑크톤 시료로부터 부차시료 추출량을 달리함에 따라 추정되는 생물다양성(richness, Shannon's H')은 호소에 따라 변화 양상이 다르게 나타났으나, 세 호소 모두 최대 시료 분석량에서 다양성 지수 값이 가장 높게 추정되었다. Sample coverage에 대한 희박화 분석 결과, 채집 시료 내 동물플랑크톤 출현 종수 및 개체 밀도가 모두 많은 주암호의 경우 농축 시료 100 mL 기준 1 mL의 부차시료만 검경해도 해당 표본이 전체 시료의 99.8%를 대표하는 것으로 나타났으나, 매우 적은 출현 종수 및 개체 밀도를 보인 소양호에서는 동량의 농축 시료로부터 10 mL의 부차시료를 추출했을 때도 97%로 비교적 낮은 대표성을 보였다. 이와 같이 동물플랑크톤 전체 채집 시료에 대한 부차시료의 대표성은 현장으로부터 채집된 시료 내 개체 밀도에 따라 다르게 나타나며, 채집 개체 밀도에 따라 시료의 농축 정도 및 부차시료 추출량을 조절

한다면 최소의 관찰 노력으로 지점 간 출현 종수 및 다양성 지수 비교 시 발생하는 오차를 최소화할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 본 연구 결과는 호소 동물플랑크톤 군집 분석 및 수체 간 상대 비교를 위한 동물플랑크톤 시료 검경 방법에 있어 시료 여과량, 농축 및 부차시료 추출 방법을 표준화하는데 기준이 될 수 있는 정보를 제공한다.

저자정보 오혜지(경희대학교 박사수료), 최예림(경희대학교 석사과정), 김현준(경희대학교 석사과정), 홍근혁(경희대학교 학부생), 박영석(경희대학교 교수), 김용재(대진대학교 교수), 장광현(경희대학교 교수)

저자기여도 개념설정: H.J. Oh, Y.J. Kim & K.H. Chang, 방법론: H.J. Oh & K.H. Chang, 자료수집: H.J. Oh, Y. Choi, H. Kim & G.H. Hong, 자료 관리: H.J. Oh & Y. Choi, 분석: H.J. Oh & K.H. Chang, 원고 초안작성: H.J. Oh, 원고 교정: Y.J. Kim & K.H. Chang, 원고 편집: H.J. Oh & K.H. Chang, 과제관리: Y.S. Park, 연구비 수주: Y.S. Park

이해관계 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없습니다.

연구비 본 결과물은 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원 수생태계 건강성 확보 기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다(과제번호: 2020003050003).

REFERENCES

- Cairns, J., P.V. McCormick and B.R. Niederlehner. 1993. A proposed framework for developing indicators of ecosystem health. *Hydrobiologia* **263**:1-44.
- Chakraborty, J., K. Palit and S. Das. 2022. Metagenomic approaches to study the culture-independent bacterial diversity of a polluted environment—a case study on north-eastern coast of Bay of Bengal, India, p. 81-107. *In: Microbial Biodegradation and Bioremediation* (Das, S. and H.R. Dashi, eds.). Elsevier, Amsterdam.
- Chao, A. and L. Jost. 2012. Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology* **93**: 2533-2547.
- Chao, A., N.J. Gotelli, T.C. Hsieh, E.L. Sander, K.H. Ma, R.K. Colwell and A.M. Ellison. 2014. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs* **84**: 45-67.
- Cho, G.S. 1993. Illustrated book for Korean freshwater zooplankton. Academy book, Seoul. pp. 208-354.
- Delang, C.O. and W.M. Li. 2013. Species Richness and Diversity, p. 39-66. *In: Ecological Succession on Fallowed Shifting Cultivation Fields*. Springer, Dordrecht.

- Gotelli, N.J. and R.K. Colwell. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* **4**: 379-391.
- Hill, M.O. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* **54**(2): 427-432.
- Hsieh, T.C., K.H. Ma and A. Chao. 2016. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* **7**: 1451-1456.
- Margalef, R. 1958. Information theory in biology. *General Systems Yearbook* **3**: 36-71.
- McGlenn, D.J., X. Xiao, F. May, N.J. Gotelli, T. Engel, S.A. Blowes, T.M. Knight, O. Purschke, J.M. Chase and B.J. McGill. 2018. Measurement of biodiversity (MoB): a method to separate the scale-dependent effects of species abundance distribution, density, and aggregation on diversity change. *Methods in Ecology and Evolution* **10**: 258-269.
- McNaughton, S.J. 1967. Relationships among functional properties of Californian grassland. *Nature* **216**(5111): 168-169.
- Mizuno, T. and E. Takahashi. 1991. An illustrated guide to freshwater zooplankton in Japan, pp. 1-305. Tokai University press, Tokyo.
- NIBR. 2019. National species list of Korea - II. Vertebrates · Invertebrates · Protozoans. National Institute of Biological Resources, Incheon, Korea.
- NIER. 2017. Biomonitoring Survey and Assessment Manual. National Institute of Environmental Research, Incheon, Korea.
- NIER. 2019. Guideline for estuary aquatic ecosystem survey and health assessment. National Institute of Environmental Research, Incheon, Korea.
- Oh, H.J., Y.J. Chae, D. Ku, Y.J. Kim, J.H. Wang, B. Choi, C.W. Ji, I.S. Kwak, Y.S. Park, G.S. Nam, Y.J. Kim and K.H. Chang. 2020. A comparative study on the information of zooplankton community based on towing type and depth in the lake ecosystems. *Korean Journal of Ecology and Environment* **53**: 365-373.
- Oh, H.J., M.H. Jang, J.H. Kim, Y.J. Kim, S.H. Lim, D.H. Won, J.S. Moon, S. Kwon and K.H. Chang. 2022. Comparative analysis of diversity characteristics (γ -, α -, and β -diversity) of biological communities in the Korean Peninsula estuaries. *Korean Journal of Ecology and Environment* **55**: 84-98.
- Pielou, E.C. 1975. Ecological diversity. Wiley, New York.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Shannon, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* **27**(3): 379-423.
- Simpson, E.H. 1949. Measurement of diversity. *Nature* **163**(4148): 688-688.
- Soininen, J., S. Passy and H. Hillebrand. 2012. The relationship between species richness and evenness: a meta-analysis of studies across aquatic ecosystems. *Oecologia* **169**: 803-809.
- Wang, L., L. Jin, B. Xue, Z. Wang and Q. Peng. 2019. Characterizing the bacterial community across the gastrointestinal tract of goats: Composition and potential function. *Microbiologyopen* **8**(9): e00820.
- Willis, A.D. 2019. Rarefaction, alpha diversity, and statistics. *Frontiers in Microbiology* **10**: 2407.