

Note

이매패류(*Sinonovacula constricta*) 먹이원 NGS 분석 적용에 대한 연구

허유지¹ · 조현빈^{2,3} · 정은송³ · 김현우^{1,*}

¹순천대학교 환경교육과, ²부산대학교 환경·에너지연구소, ³부산대학교 생명과학과

Application of NGS Analysis for the Food Source of Bivalve. Yu-Ji Heo¹ (0000-0002-6721-5482), Hyunbin Jo^{2,3} (0000-0001-8064-7880), Eunsong Jung³ (0000-0002-0707-2846) and Hyun-Woo Kim^{1,*} (0000-0003-3898-5864) (¹Department of Environmental Education, Suncheon National University, Suncheon 57922, Republic of Korea; ²Institute for Environment and Energy, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea; ³Department of Integrated Biological Science, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea)

Abstract In this study, we analyzed the food components in the release product that sampled *Sinonovacula constricta* from the foreshore littoral at Byeongnyang-myeon, Suncheon Bay. We used microscopy and next-generation sequencing (NGS) to evaluate the applicability of morphological and molecular methods to analyze release products. The higher species diversity observed in the NGS method is due to the different levels of species identification, as microscopy displays morphological and anatomical levels of plankton species identification in *S. constricta*. Moreover, NGS can identify the level of species in the organic matter by using the 18s_V9 primer.

Key words: NGS, microscopy, *Sinonovacula constricta*

서 론

수생태계에서 생산자(producer), 소비자(consumer)와 분해자(decomposer)가 각 영양단계에서 유기적으로 연결되어 먹이사슬을 형성하고, 망처럼 얽혀 먹이망(food-web)을 형성한다(McCann, 2000). 이매패류의 섭식활동은 먹이망의 영양단계뿐만 아니라 물질순환에 영향을 미친다. 일반적으로 이매패류는 식물플랑크톤을 주요 먹이원으로 높은 섭식 능력을 보이거나(Cloern, 1982), 최근 동물플랑크톤과 박테리아와 같은 다른 분류군도 중요한 먹이원으로 사용되는 것으로 밝혀졌다(Davenport *et al.*, 2000; Lehane and Davenport,

2006; Davenport *et al.*, 2011). 따라서 이매패류의 주요 먹이원의 정확한 종 분석은 대상 서식처의 먹이망 구조 및 물질순환을 밝히는 데 중요하다. 동·식물플랑크톤 식별 및 분류는 현미경을 사용한 전통적인 형태학적 및 해부학적 특성에 기반을 두고 있다. 이매패류 먹이원의 경우 섭식활동과 소화과정을 통해 분해되어, 전통적인 형태·해부학적 동정을 통해 먹이 생물을 파악하는 데 어려움이 있다(Alfaro, 2006). 현미경을 이용한 형태학적 동정의 한계를 극복하기 위해 최근 토사물 및 위 내용물 분석에 분자생물학적 방법이 도입되고 있다(Deagle *et al.*, 2005). 분자생물학적 방법은 진핵생물의 넓은 범위 동정이 가능한 18S rDNA 유전자의 V9 영역(Amaral-Zettler *et al.*, 2009; Albaina *et al.*, 2016)와 종내 중간 유전학적 관계를 파악하는 데 유용하다고 알려진 미토콘드리아 유전자 내의 cytochrome *c* oxidase subunit I (COI)

Manuscript received 13 September 2021, revised 15 September 2021, revision accepted 15 September 2021
* Corresponding author: Tel: +82-61-750-3384, Fax: +82-61-750-3308
E-mail: hwkim@snu.ac.kr

가 널리 사용되고 있다 (Carroll *et al.*, 2019). 가리맛조개 (*Sinonovacula constricta*)는 조간대 갯벌에서 서식하며, 현장 어획과 양식이 활발하게 이루어지는 이매패류이다. 경제적 가치가 높은 생물자원으로 (Feng *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2013; Lukwambe *et al.*, 2018) 성장 (Niu *et al.*, 2015)과 발달 (Niu *et al.*, 2013), 염도 (Maoxiao *et al.*, 2019) 관련 연구가 보고되어 있다. 하지만 먹이망과 섭식에 대한 학술적 연구는 그 중요성에 비해 상대적으로 적으며, 국내에서 보고된 내용은 없다. 본 연구의 목적은 NGS (Next Generation Sequencing) 기법을 활용하여 가리맛조개 (*S. constricta*)의 토사물을 먹이원 분석에 이용하여 섭식 먹이원을 분석하고, 형태학적 분석의 결과와 비교 분석해 보았다.

재료 및 방법

1. 생물 시료 채집 및 먹이원생물 형태학적 동정

본 연구에서 사용한 가리맛조개 (*S. constricta*)로 2021년 7월 별량면 (Fig. 1)에서 채집된 개체 ($n=15$)를 사용하였다. 채집된 가리맛조개 (*S. constricta*)는 흐르는 물로 (3차 증류수) 깨끗이 세척하고, 무게 (g), 각장 (mm), 각고 (mm)를 측정 한 후 멸균된 3차 증류수에서 24시간 해감을 실시하여 먹이원 분석용 토사물을 확보하였다. 동·식물플랑크톤 형태학적 동정을 위한 시료는 토사물의 일부를 각각 포르말린 (Formalin, YAKURI, Japan)과 루골 (L6146-1L, SIGMA, Germany) 용액 (10%)을 이용하여 염색 및 고정 후 광학현미경 (Axioskop 40, Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany)으로 검경하였다. 식물플랑크톤의 형태학적 동정은 부유하는 식물플랑크톤을 대상으로 Foged (1978), Cassie (1989), Round *et al.* (1990)에 기반하여 속 또는 종 수준까지 동정하고 세포의 일부 파편이 발견되는 경우 동정 분류기를 확인하여 동정하였다. 식물플랑크톤의 시료는 duplicates를 평균하였으며, 정량적 평가는 Sedgewick-Rafter (S-R) chamber로 $\times 200$ 및 $\times 400$ 배율 이하의 독립 셀을 계산하여 수행되었다. 동물플랑크톤의 형태학적 분류는 Koste (1978), Smirnov and Timms (1983), Einsle (1993)을 기반으로 속 수준까지 동정하였고, 이때 분해되어 형태가 불분명한 동물플랑크톤의 부속지 등은 분류학적 특징을 이용하여 문 또는 아문 수준으로 동정하였다. 동물플랑크톤의 정량적 평가는 Sedgwick-Rafter (S-R) chamber로 $\times 100$ 배율 이하의 독립 셀을 계산하여 수행되었다. 종 특이적 특성이 소실된 생물들은 미동정 생물 조직으로 구분하였다. NGS 분석을 위한 시료는 상등액과 침전물을 혼합하여 air compressor vacuum pump (FAS 20W, FALCON,

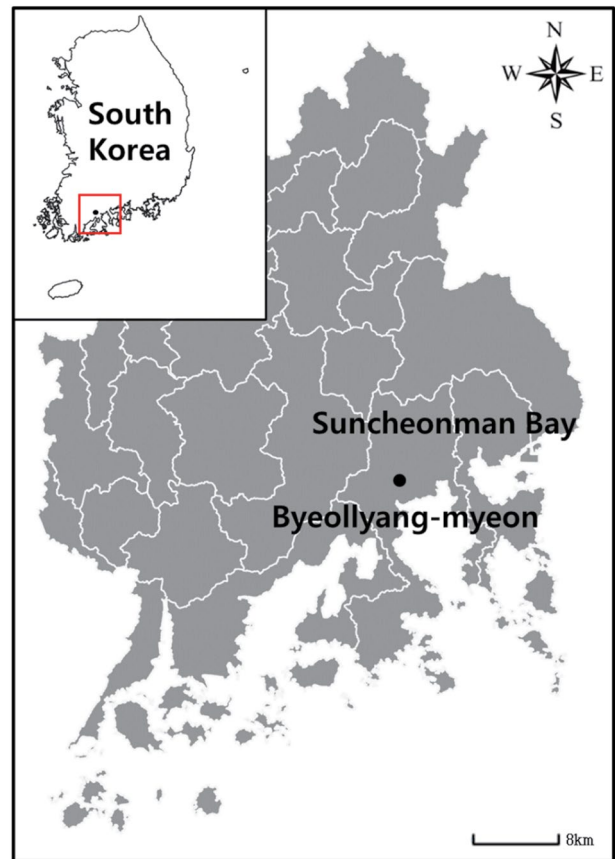


Fig. 1. Map of the study site at Byeongnyang-myeon, Suncheon Bay.

China)를 사용하여 $0.7 \mu\text{m}$ 여과지에 98 mL을 여과하고, 60°C 드라이 오븐에서 10분 건조하여 실리카겔과 함께 냉동 보관 후 (-20°C) NGS 분석을 진행하였다.

2. NGS 분석

NGS 분석은 본 연구에서 사용된 샘플 중 형태학적 검경 결과와 비교할 수 있는 5개체를 (육안동정가능 2개체, 육안동정불가능 3개체) 선택하여 (주)마크로젠에서 진행되었다. 먹이원 분석용 토사물을 필터하여 DNA Extraction을 진행하고, 진핵생물의 DNA 염기서열을 증폭하기 위해 Primer 18S_V9를 선정하였다 (Table 1). 분석을 위해 사용된 NGS 플랫폼은 Illumina사의 MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA)을 사용하였다. MiSeq을 통해 산출된 서열 데이터 (fastq)는 종 동정을 위하여 프로그램 FASTH (Fast Length Adjustment of SHort reads) 버전 1.2.11을 이용하여 Paired-End 데이터를 하나의 서열로 병합하였다 (Macgoč and Salzberg, 2011). 병합된 데이터는 CD-HIT-EST

Table 1. Universal primer information applied to the study.

Target organisms (region)	Name	Primer sequences	References
18S_V9	Forward Primer	5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTGCCHTTTGTACACAC3'	Jo <i>et al.</i> , 2019
	Reverse Primer	5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTTCYGCAGGTTACCTAC3'	

기반의 OTU (Operational Taxonomic Unit) 분석 프로그램인 CD-HIT-OTU (Li *et al.*, 2012)를 이용하여 시퀀싱 에러로 간주되는 낮은 품질의 서열(error-correction)과 모호한(Ambiguous) 서열을 1차적으로 제거하였고, rDnaTools (Schloss *et al.*, 2009)를 사용하여 키메라(Chimera) 서열을 식별 및 제거하는 두 번째 과정을 거친 뒤 마지막으로 97% 이상의 유사성을 갖는 서열의 OTU로 클러스터링 (clustering)을 하였다. 각 OTU의 서열은 NCBI의 참조 DB와 비교하여 BLASTn (Zhang *et al.*, 2000)를 수행하여, 각 서열마다 유사성이(97% identity이상) 가장 높은 분류군 정보로 동정된 (taxonomic assignment)정보를 이용하였다. Uncultured 및 bacteria 분류군, OTU가 할당되지 않은 read와 <0.1% 검출 비율을 나타내는 OTU는 삭제하였다.

결 과

1. 현미경을 이용한 가리맛조개 먹이원 분석

본 연구에서 가리맛조개(*S. constricta*)의 먹이원 조성을 확인하기 위해 15개 개체의 토사물을 광학현미경 (Axioskop 40, Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany)으로 검정하였다. 전체 개체의 무게는 24.4~43.2 g (평균 34.3±6.7), 각장은 68~87 mm (평균 78.3±5.6), 각고는 23~30 mm (평균 25.8±2.1)의 범위로 나타났다 (Table 2). 토사물의 먹이원 현미경 검정 결과 대부분 소화된 유·무기물 조직 외에 식물 플랑크톤, 동물플랑크톤, 일부 개체의 껍질과 알, 미동정 생물 조직의 파편이 관찰되었다. 이 중 식물플랑크톤은 규조류 (Bacillariophyta), 녹조류 (Chlorophyta), 남조류 (Cyanophyta)에 속하는 총 8속 10종이 출현하였고, 동물플랑크톤은 윤충류 (Rotifera)에 속하는 *Notholca* sp. 1종, 요각류 (Copepods)의 유생 copepodite 1종이 출현하였다. 중 동정이 불가능한 원생생물 (protozoa), 지각류 (Cladocerans), 요각류 (Copepodas)의 파편이 총 7개, 미동정 동물플랑크톤이 1개의 가리맛조개(*S. constricta*)개체에서 관찰되었다 (Table 3).

Table 2. Object information of the *Sinonovacula constricta* sample.

Sample No.	Shell length (mm)	Shell breadth (mm)	Total weight (g)
01	72	24	24.4
02	87	27	42.6
03	87	26	38.8
04	80	24	41.4
05	68	24	30.0
06	78	26	35.1
07	76	25	29.4
08	72	24	25.5
09	78	24	29.6
10	82	30	38.1
11	81	28	41.3
12	73	23	39.2
13	76	27	28.3
14	82	29	43.2
15	83	26	27.8
Average	78.3	25.8	34.3
S.D.	5.6	2.1	6.7

Shell length and breadth: mm, total weight: g

2. NGS 기법을 이용한 가리맛조개 먹이원 분석

NGS 분석을 통해 얻어진 염기서열 (paired end)은 총 1,215,608개이며, 샘플당 평균 243,122개의 염기서열이 얻어졌다. Unique OTUs는 총 2,717개를 확인하였다. 이후 NCBI GenBank의 데이터를 바탕으로 BLASTn 분석을 실시하여, 전문가 검토를 통해 총 16개의 OTUs를 확인하였다 (Table 4). 샘플별 최종 OTUs에 대한 염기서열의 개수는 5번 개체 샘플이 273개로 가장 많았으며, 1번 개체 샘플이 15개로 가장 적었다. 이 중 곰팡이류 (*Aspergillus penicillioides*)와 이매패류 (*Atrina pectinate*)는 모든 시료에서 관찰되었으며, 곰팡이류 (*A. penicillioides*)는 72.44%로 먹이원의 대부분을 구성하고 있었다. 이매패류에 속하는 *A. pectinate* (1.88%)은 전체 개체에서, *Ruditapes philippinarum* (1.46%)

Table 3. List of identified particles based on microscopic analysis in food source of *Simonovacula constricta*.

Phylum	Genus + Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total
Arthropoda	unidentified	1.00				1.00											2.00
Arthropoda	copepodite	1.00	1.00														2.00
Arthropoda	unidentified				1.00			1.00									2.00
Chlorophyta	<i>Scenedesmus</i> sp.			1.26													1.26
Cyanobacteria	<i>Microcystis</i> sp.					1.33	1.33	22.86						1.22			25.41
Ochrophyta	<i>Pinnularia</i> sp.	1.47															1.47
Ochrophyta	<i>Navicula</i> sp.					1.33											1.33
Rotifera	<i>Notholca</i> sp.	1.00															1.00
Chlorophyta	<i>Chlamydomonas</i> sp.			1.26													1.26
Chlorophyta	<i>Actinastrum gracillimum</i> var. <i>elongatum</i>														15.40		15.40
Bacillariophyta	<i>Aulacoseira</i> sp.			1.26													1.26
Bacillariophyta	<i>Aulacoseira ambigua</i> f. <i>japonica</i>														4.40		4.40
Bacillariophyta	<i>Aulacoseira granulata</i>														2.20		2.20
Bacillariophyta	<i>Nitzschia</i> sp.											1.19					1.19
Protozoa	unidentified			1.00	1.00										1.00		3.00
unidentified zooplankton	unidentified			1.00										1.00			2.00
Number of species		4	1	4	3	2	1	2	0	0	0	1	0	2	4	0	16
Number of individual (ind. L ⁻¹)		4.47	1.00	4.51	3.26	2.33	1.33	23.86	0.00	0.00	0.00	1.19	0.00	2.22	23.00	0.00	67.17

Table 4. List of identified particles based on NGS analysis in food source of *Sinonovacula constricta*.

Phylum	Genus + Species	1	5	8	12	15	Total	Identities	Accession number
Ascomycota	<i>Aspergillus penicillioides</i>	13	261	51	9	13	347	99	NG_063229.1
Ascomycota	uncultured <i>Aspergillus</i>		3	1			4	100	KR131440.1
Arthropoda	<i>Oulenziella bakeri</i>		1				1	99	KM277810.1
Basidiomycota	<i>Malassezia restricta</i>		3				3	99	CP033152.1
Chlorophyta	uncultured Chlorophyta			5	6		11	98	AY180027.1
Platyhelminthes	<i>Euryhelms costaricensis</i>				19		19	98	AB521800.1
Platyhelminthes	<i>Holostephanus</i> sp.				61		61	99	MT668950.1
Mollusca	<i>Atrina pectinata</i>	1	5	1	1	1	3	99	EF613241.1
Mollusca	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1		3	3		7	99	JN807342.1
Nematoda	<i>Dichromadora</i> sp.					4	4	92	MN250081.1
-	uncultured eukaryote			6	4		10	98	KU743755.1
-	uncultured eukaryote					3	3	93	AY180006.1
Number of reads		15	273	67	103	21	473		
Number of OUTs		3	5	6	7	4	12		

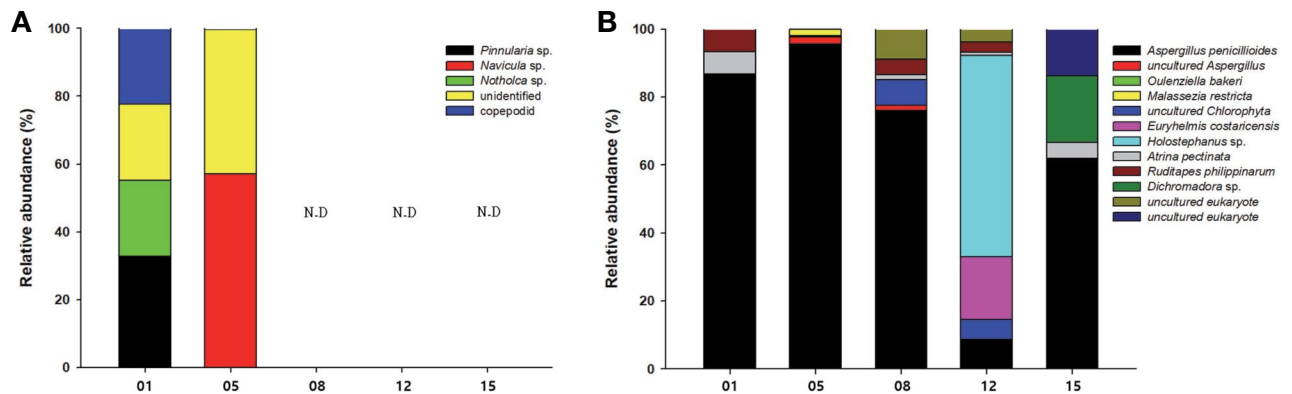


Fig. 2. Comparison of identified particles in food source of *Sinonovacula constricta* between microscopic and NGS analysis (N.D.: No Detection).

은 3개 개체의 가리맛조개 (*S. constricta*)에서 먹이원으로 출현하여 총 3.34%를 차지하였고, 미동정 진핵생물이 전체 개체에서 확인되어 2.71%를 차지하였다. 흡충류 기생충에 속하는 *Holostephanus* sp.와 *Euryhelms costaricensis*은 12번 개체에서만 확인되었으나, 개체 내에서 각각 59.22%과 18.45%으로 높은 비율로 확인되었다.

3. 형태학적 동정과 NGS 기법을 이용한 먹이원 결과 비교

NGS 분석을 진행한 가리맛조개 (*S. constricta*)의 먹이원은 곰팡이류, 흡충류 기생충, 이매패류, 거미류, 녹조류, 균류, 선충류, 미동정 진핵생물로 구성되어 있었으며, 형태학적 동정에서 확인된 동·식물플랑크톤은 포함되어 있지 않아 차이를 보였다(Fig. 2 and Table 5).

고찰

본 연구를 통해 가리맛조개 (*S. constricta*)의 먹이원을 형태학적 분석과 NGS 분석 결과를 비교 분석하였다. NGS 분석을 통해 형태학적 분석에서 확인되지 않은 먹이원을 확인하였으며, 상대적으로 높은 종 다양성을 확인하였다. 형태학적 동정 시 식물플랑크톤이 동물플랑크톤보다 높은 종 동정 해상도를 보였다. 하지만 두 결과 모두 침전물로 인해 먹이원 종 동정에 한계가 있었다. 식물플랑크톤 분석용 시료에 포함된 다양한 침전물(유기물)로 인해 전처리를 진행하는 데 어려움이 있었으며, 상등액에 부유하는 식물플랑크톤을 대상으로만 동정이 가능하였다. 크기가 상대적으로 큰 동물플랑크톤 형태학적 동정에서는 식물플랑크톤과 달리 침전물을 함

Table 5. Lists of identified particles in food source of *Simonovacula constricta* between microscopic (ind. L⁻¹) and NGS analysis (number of reads).

Phylum	Genus + Species	01		05		08		12		15		Total	
		Micro	NGS	Micro	NGS	Micro	NGS	Micro	NGS	Micro	NGS	Micro	NGS
Arthropoda	<i>Oulenziella bakeri</i>				1								1
Arthropoda	unidentified	1.00		1.00									2.00
Arthropoda	copepodid	1.00											1.00
Ascomycota	<i>Aspergillus penicillioides</i>		13		261		51		9		13		347
Ascomycota	uncultured <i>Aspergillus</i>				3		1						4
Basidiomycota	<i>Malassezia restricta</i>				3								3
Chlorophyta	uncultured <i>Chlorophyta</i>						5		6				11
Mollusca	<i>Atrina pectinata</i>		1		5		1		1		1		9
Mollusca	<i>Ruditapes philippinarum</i>		1				3		3				7
Nematoda	<i>Dichromadora</i> sp.										4		4
Bacillariophyta	<i>Pinnularia</i> sp.	1.47											1.47
Bacillariophyta	<i>Navicula</i> sp.			1.33									
Platyhelminthes	<i>Euryhelminthes costaricensis</i>								19				19
Platyhelminthes	<i>Holostephanus</i> sp.								61				61
Rotifera	<i>Notholca</i> sp.	1.00											
-	uncultured <i>eukaryote</i>						6		4				10
-	uncultured <i>eukaryote</i>										3		3
Number of species		4	3	2	5	0	6	0	7	0	4	3	12

계 현미경 동정이 가능하였다. 혼합물의 경우 대부분 유기물과 혼합된 상태로 보였으나, 동물플랑크톤 파편 외 해양 갑각류(Arthropoda)의 껍데기와 담수 윤충류(*Brachionus* sp.)와 지각류(*Alona* sp.)의 껍데기가 확인되었다. 토사물의 형태학적 동정은 전체 시료를 검경하는 과정에서 누락되는 종과 소화된 개체는 동정의 형질을 찾는 데 어려움이 있으나, 요각류 유생(copepodite)과 동물플랑크톤 알(egg) 등 생활사에 따른 동정이 가능하고 정량화된 정보 제공이 가능하다. 따라서 NGS 분석과 형태학적 동정을 병행하여 실시하게 되면 상호 보완적 먹이원 분석이 가능할 것이다.

본 연구에서 먹이원 NGS 분석 결과 곰팡이류, 균류, 이매패류 서열의 상대풍부도 높게 나타났다. 가리맛조개(*S. constricta*)는 침전물과 식물플랑크톤을 주요 먹이원으로 하는 해저 여과섭식 종으로 알려졌으나(Guo *et al.*, 2017), 식물플랑크톤 생물량이 낮거나 이매패류의 에너지 수요를 충족할 수 없는 시기에는 다른 공급원도 중요한 먹이원으로 작용하는 것으로 알려져 있다(Peharda *et al.*, 2012). 가리맛조개(*S. constricta*)는 수심 30~50 cm 이내의 갯벌에 파고들어 잠입 서식하는 종이다(Koh *et al.*, 1997; Suh *et al.*, 2017). 잠입 서식하는 여과섭식성 이매패류는 수관을 활용하여 주변 해수에 존재하는 각종 유기물질을 섭취하거나, 밀물 시 재

부유된 저서성 식물플랑크톤과 수중에 존재하는 부유성 식물플랑크톤을 섭취하게 된다. 특히 조간대에서 재부유된 저서성 식물플랑크톤은 조간대 저서동물뿐만 아니라 조하대로 수송되어 조하대에 서식하는 동물의 먹이원으로 크게 이용된다(Kim, 2016). 따라서 해안 습지인 갯벌은 조석의 영향으로 이매패류의 섭식행동은 가변적일 것으로 판단되며(Wong and Cheung, 2001; Alfaro, 2006) 곰팡이 및 균류가 먹이 활동 및 소화, 흡수에 중요한 역할을 할 것으로 판단된다.

이번 연구에 사용된 분석 시료인 토사물에서 동정된 종의 경우 전처리 과정에서 패각에 부착된 유기물과 이매패류 막 사이의 생물도 포함되어 출현하였을 것으로 판단된다. 따라서 먹이원생물을 확인할 경우 분석 시료는 소화관을 직접적으로 사용(Kim *et al.*, 2018; Na *et al.*, 2020)할 경우보다 정확한 먹이원생물 확인이 가능할 것이다. 또한 대상 생물에 따라 DNA 염기서열을 증폭하기 위해 다양한 유전자 마커(genetic marker)를 이용하여 식물플랑크톤(Yoon *et al.*, 2016), 동물플랑크톤(Clarke, 2017)을 대상으로 적용하면 종 동정 결과의 정확도가 향상될 것이다.

위 내용물 분석과 달리 동위원소 및 지방산 분석은 흡수된 영양소를 평가하기 때문에 상대적으로 장기적인 먹이 공급원 파악과 생물의 영양 위치, 먹이 공급원 추정이 가능하다. 뿐

만 아니라 먹이원생물의 종 탐지와 동시에 먹이그물의 위치를 이해하는 것은 수생태계에서 필수적이다(Kharlamenko *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 2014). 향후 플랑크톤을 대상으로 하는 먹이원 연구에서 분석대상 시료의 전처리 방법 및 분석 시료를 보완하여 형태학적 동정과 메타바코딩, 동위원소분석 등의 최신 분석방법을 적용하여 병행한다면 보다 정확하고 정량적인 생태학적 분석과 먹이원 군집분석이 가능할 것이다.

적 요

본 연구에서는 가리맛조개(*S. constricta*)의 토사물을 현미경 검경과 차세대염기서열분석(NGS) 기법으로 먹이원을 확인하고, 이를 통해 형태학적 및 분자학적 방법에 따른 먹이원 분석을 비교하였다. 가리맛조개(*S. constricta*)의 먹이원은 분석방법에 따라 차이를 보였다. 먹이원생물은 위 내에서 분해되어 현미경 분석을 통한 생활사 확인과 정량적 분석이 가능하였으나 형태학적 및 해부학적 특성 파악이 불완전하였다. NGS 분석은 유기물 형태로 잔존하는 생물의 DNA 확인이 가능하여 현미경 검경 결과와의 상호보완적 적용 가능성을 확인하였다.

저자정보 허유지(순천대학교 환경교육과학과 석사과정), 조현빈(부산대학교 환경·에너지연구소 연구교수), 정은송(부산대학교 생명과학과 박사과정), 김현우(순천대학교 환경교육과 교수)

저자기여도 개념설정: 허유지, 조현빈, 자료분석: 허유지, 조현빈, 정은송, 원고작성: 허유지, 조현빈, 연구지도: 김현우

이해관계 본 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

연구비 순천대학교 교연비 사업에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Albaina, A., M. Aguirre, D. Abad, M. Santos and A. Estonba. 2016. 18S rRNA V9 metabarcoding for diet characterization: a critical evaluation with two sympatric zooplanktivorous fish species. *Ecology and Evolution* **6**(6): 1809-1824.
- Alfaro, A.C. 2006. Evidence of cannibalism and benthopelagic coupling within the life cycle of the mussel, *Perna canaliculus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **329**(2): 206-217.
- Amaral-Zettler, L.A., E.A. McCliment, H.W. Ducklow and S.M. Huse. 2009. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *PLoS ONE* **4**(7): e6372.
- Carroll, E.L., R. Gallego, M.A. Sewell, J. Zeldis, L. Ranjard, H.A. Ross and R. Constantine. 2019. Multi-locus DNA metabarcoding of zooplankton communities and scats reveal trophic interactions of a generalist predator. *Scientific Reports* **9**(1): 1-14.
- Cassie, V. 1989. A contribution to the study of New Zealand diatoms. *Bibliotheca Diatomologica* **17**: 1-266, 13 pls.
- Clarke, L.J., J.M. Beard, K.M. Swadling and B.E. Deagle. 2017. Effect of marker choice and thermal cycling protocol on zooplankton DNA metabarcoding studies. *Ecology and Evolution* **7**(3): 873-883.
- Cloern, J.E. 1982. Does the benthos control phytoplankton biomass in south San Francisco Bay. *Marine Ecology Progress Series. Oldendorf* **9**(2): 191-202.
- Davenport, J., D. Ezgeta-Balić, M. Peharda, S. Skejić, Z. Ninčević-Gladan and S. Matijević. 2011. Size-differential feeding in *Pinna nobilis* L. (Mollusca: Bivalvia): Exploitation of detritus, phytoplankton and zooplankton. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **92**: 246-254.
- Davenport, J., R.J. Smith and M. Packer. 2000. Mussels *Mytilus edulis*: significant consumers and destroyers of mesozooplankton. *Marine Ecology Progress Series* **198**: 131-137.
- Deagle, B.E., D.J. Tolli, S.N. Jarman, M.A. Hindell, A.W. Trites and N.J. Gales. 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Molecular Ecology* **14**(6): 1831-1842.
- Dubois, S., H. Blanchet, A. Garcia, M. Massé, R. Galois, A. Grémare and N. Savoye. 2014. Trophic resource use by macrozoobenthic primary consumers within a semi-enclosed coastal ecosystem: stable isotope and fatty acid assessment. *Journal of Sea Research* **88**: 87-99.
- Einsle, U. 1993. Crustacea, Copepoda, Calanoida und Cyclopoida. Süsswasswefuna von Mitteleuropa, vol. 8, part 4-1. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.
- Feng, B., L. Dong, D. Niu, S. Meng, B. Zhang, D. Liu and J. Li. 2010. Identification of immune genes of the Agamaki clam (*Sinonovacula constricta*) by sequencing and bioinformatic analysis of ESTs. *Marine Biotechnology* **12**(3): 282-291.
- Foged, N. 1978. Diatoms in eastern Australia. *Bibliotheca Phycologica* **41**: 1-243, 48 pls.
- Guo, K., W. Zhao, Z. Jiang and S. Dong. 2017. A study of organic carbon, nitrogen and phosphorus budget in jellyfish-shellfish-fish-prawn polyculture ponds. *Aquaculture Research* **48**(1): 68-76.
- Jo, H., D.K. Kim, K. Park and I.S. Kwak. 2019. Discrimination of spatial distribution of aquatic organisms in a coastal ecosystem using eDNA. *Applied Sciences* **9**(17): 3450.
- Kharlamenko, V.I., S.I. Kiyashko, A.B. Imbs and D.I. Vyshkvar-tzev. 2001. Identification of food sources of invertebrates from the seagrass *Zostera marina* community using carbon and sulfur stable isotope ratio and fatty acid analyses. *Marine Ecology Progress Series* **220**: 103-117.

- Kim, H.J., T.K. Lee, S.W. Jung, I.K. Kwon and J.W. Yoo. 2018. Analyzing Vomit of Platalea minor (Black-faced Spoonbill) to Identify Food Components using Next-Generation Sequencing and Microscopy. *Korean Journal of Environmental Biology* **36**(2): 165-173 (in Korean).
- Kim, H.S. 2016. Phytoplankton variability in digestive tract of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Gomso Bay, west coast of Korea. *The Korean Journal of Malacology* **32**(3): 165-174 (in Korean).
- Koh, C.H., M.R. Yang and W.K. Chang. 1997. Growth and production of *Sinonovacula constricta* (Bivalvia) from the Hwaseong tidal flat in the Namyang Bay, Korea. *The Sea* **2**(1): 21-30 (in Korean).
- Koste, W. 1978. Rotatoria. Die Radertiere Mitteleuropes begründer von Max Voigt, 2nd edn., Vol. 1. Textband, p. 673, Vol. 2. Tafelband, p. 234, Borntraeger, Stuttgart.
- Lehane, C. and J. Davenport. 2006. A 15-month study of zooplankton ingestion by farmed mussels (*Mytilus edulis*) in Bantry Bay, Southwest Ireland. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **67**: 645-652.
- Li, W., L. Fu, B. Niu, S. Wu and J. Wooley. 2012. Ultrafast clustering algorithms for metagenomic sequence analysis. *Briefings in Bioinformatics* **13**(6): 656-668.
- Lukwambe, B., W. Yang, Y. Zheng, R. Nicholas, J. Zhu and Z. Zheng. 2018. Bioturbation by the razor clam (*Sinonovacula constricta*) on the microbial community and enzymatic activities in the sediment of an ecological aquaculture wastewater treatment system. *Science of the Total Environment* **643**: 1098-1107.
- Magoč, T. and S.L. Salzberg. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**(21): 2957-2963.
- Maoxiao, P., L. Xiaojun, N. Donghong, Y. Bo, L. Tianyi, D. Zhiguo and L. Jiale. 2019. Survival, growth and physiology of marine bivalve (*Sinonovacula constricta*) in long-term low-salt culture. *Scientific Reports* **9**(1): 1-9.
- McCann, K.S. 2000. The diversity-stability debate. *Nature* **405**(6783): 228-233.
- Na, Y.K., H. Jo, J.W. Park, K.H. Chang and I.S. Kwak. 2020. The Gut Content Analysis of *Polypedium scalaenum* in the Large-scale Weirs of 4 Major River Ecosystems. *Korean Journal of Ecology and Environment* **53**(1): 55-62 (in Korean).
- Niu, D., L. Wang, F. Sun, Z. Liu and J. Li. 2013. Development of molecular resources for an intertidal clam, *Sinonovacula constricta*, using 454 transcriptome sequencing. *PLoS ONE* **8**(7): e67456.
- Niu, D., L. Wang, L.Z. Bai, S. Xie, H. Zhao and J. Li. 2015. Identification and expression characterization of the myostatin (MSTN) gene and association analysis with growth traits in the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Gene* **555**(2): 297-304.
- Round, F.E., R.M. Crawford and D.G. Mann. 1990. The Diatoms: Biology & morphology of the genera. Cambridge [England: Cambridge University Press.
- Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Van Horn and C.F. Weber. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(23): 7537-7541
- Smirnov, N.N. and B.V. Timms. 1983. A revision of the Australian Cladocera (Crustacean). *Records of the Australian Museum Supplement* **1**: 1-132.
- Suh, J., T. Kim, S. Shin, H.Y. Kahng, S. Ahn, J.S. Jung and N.I. Won. 2017. Geochemical Characteristics and Benthos Distribution in the Three Shellfish Farms in Suncheon Bay, Korea. *Journal of Environmental Science International* **26**(6): 691-710 (in Korean).
- Thomsen, P.F. and E. Willerslev. 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* **183**: 4-18.
- Wong, W.H. and S.G. Cheung. 2001. Feeding rhythms of the green-lipped mussel, *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Mytilidae) during spring and neap tidal cycles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **257**(1): 13-36.
- Yoon, T.H., H.E. Kang, C.K. Kang, S.H. Lee, D.H. Ahn, H. Park and H.W. Kim. 2016. Development of a cost-effective metabarcoding strategy for analysis of the marine phytoplankton community. *PeerJ* **4**: e2115.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* **7**(1-2): 203-214.