

환경DNA 메타바코딩 기술을 활용한 수생태계 어류종 군집조사의 가능성*

- 도시 생태하천 초기분석 자료를 중심으로

송영근¹⁾ · 김종희²⁾ · 원수연²⁾ · 박찬³⁾

¹⁾ 서울대학교 환경대학원 환경조경학과 교수 · ²⁾ 서울대학교 환경대학원 환경조경학과 학생 ·
³⁾ 서울시립대학교 조경학과 교수

Possibility in identifying species composition of fish communities using the environmental DNA metabarcoding technique*

- with the preliminary results at urban ecological streams

Song, Young-Keun¹⁾ · Kim, Jong-Hee²⁾ · Won, Su-Yeon²⁾ and Park, Chan³⁾

¹⁾ Dept. of Landscape Architecture, Graduate School of Environmental Studies, Seoul National University, Professor,
²⁾ Dept. of Landscape Architecture, Graduate School of Environmental Studies, Seoul National University, Student,
³⁾ Dept. of Landscape Architecture, University of Seoul, Professor.

ABSTRACT

This study aims to highlight the possibility in identifying species composition of fish communities using the environmental DNA (eDNA) metabarcoding technique, from both of the technical introduction and the pilot test at urban ecological streams. This new emerging survey technique using eDNA is getting popular in the world as a compensating way for the conventional field survey. However, the application to the domestic cases has yet to be studied. We attempted to use this technique for identifying fish species observed at four survey points in Hwangguji-chon, Suwon City. As a result, the detected number of species by eDNA sampled once in May was significantly matched with the total number of observed species in annual field surveys. Additionally eDNA results indicated the presence possibility of the unobserved species in field last year, even though the validation may be required. This survey technique seems to be more efficient and applicable to diverse situations of

* 본 결과물은 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원의 도시생태 건강성 증진 기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다(No. 2019002760001).

First author : Song, Young-Keun, Associate Professor, Dept. of Landscape Architecture, Graduate School of Environmental Studies, Seoul National University, Professor,
Tel : +82-2-880-8860, E-mail : songyoung@snu.ac.kr

Corresponding author : Park, Chan, Assistant professor, Dept. of Landscape Architecture, University of Seoul, Professor,
Tel : +82-2-6490-2849, E-mail : chaneparkmomo7@uos.ac.kr

Received : 21 November, 2019. **Revised** : 24 December, 2019. **Accepted** : 21 December, 2019.

the fields and species, thereby needs to be studied further. We discussed the pros and cons of the application and summarized the research directions in future.

Key Words : eDNA, Next Generation Sequencing, PCR, Hiseq, freshwater ecosystem

I. 서론

생물다양성 보전에 대한 시대적인 요구가 지속되고 있는 가운데, 생태학 연구의 보틀넥이라고 할 수 있는 생물종 조사를 보다 효율적으로 정확하게 수행하기 위해, 환경 DNA를 활용한 새로운 방법론에 대한 이해와 적용 가능성에 대한 검토가 요구되고 있다(Minamoto *et al.*, 2012; Bohmann *et al.*, 2014; Biggs *et al.*, 2015). 환경 DNA란 물, 토양, 공기 등 환경시료로부터 추출된 DNA를 통칭한다. 이러한 DNA의 단편들에는 생물종이나 개체에 대한 정보가 포함되어 있고, 어류, 포유류, 조류 등 생물 개체에서 유래한 환경 DNA의 기원은 배설물, 점액, 정자, 알 등 다양하다(Jo *et al.*, 2019). 배출 후 환경 DNA는 일반적으로 박테리아나 자외선에 의해 자연분해되는 과정을 거친다. 그러나 수중에 남아있는 환경 DNA의 경우 1주일까지 잔존하며 그 이후에는 검출이 불가능하게 되는데, 이러한 시간적 제약조건 내에서 해당 종이나 개체의 흔적이 환경 DNA에 보존된다는 특성 때문에 생물 검출이나 생물상 조사에 이용하는 것이 가능하다(Fukumoto *et al.*, 2015; Yamamoto *et al.*, 2017).

환경 DNA 분석은 주로 미생물생태학에서 대기를 흡입하거나 물을 여과시키는 과정에서 필터에 걸리지는 DNA 추출하여 미생물 분석에 활용하는 것을 들 수 있다. 이를 대형생물 조사에 활용한 사례들은 고생태학 분야에서 찾아볼 수 있는데, 수천, 수만년 전의 아이스 코어나 토양 코어 샘플로부터 맘모스 등 포유류의 DNA를 검출하거나 고대 DNA로부터 식물상 천이를 재현한 연구(Willeslev *et al.* 1999, 2003) 등을 들 수 있다. 우리가 관심을 가지게 되는 시공간

규모에서의 생물종 조사에 대한 최초 학계보고는 Ficetola *et al.*(2008)로써, 일정 밀도의 황소개구리(*Rana catesbeiana*) 서식이 확인된 자연 습지의 물 샘플에서 이 종의 DNA가 PCR에 의해 검출되었고, 서식밀도에 따라 검출빈도가 변화하고 서식하지 않는 습지의 물 샘플에서는 검출이 되지 않음을 밝힌 연구이다. 이후에도 수중 환경 DNA의 보존과 분해의 특성을 활용하여, 주로 담수 정수 생태계 조사에서 관련 연구가 발전해왔다. Takahara *et al.* (2013)에서는 외래종인 블루길(*Lepomis macrochirus*)의 침입 여부를 물 샘플로부터 PCR로 검출함으로써, 현장 목시조사로 확인된 정수습지에서는 예외 없이 검출되는 것은 물론, 현장 목시조사에서 일차적으로 확인이 어려웠던 11개소의 습지에 대해서도 환경 DNA를 통해 추가적으로 블루길의 서식을 확인한 사례를 들 수 있다. 하천의 회유성 어류 3종이 하천 중상류부이 댐까지 회유하는 것을 밝힌 연구(Yamanaka and Minamoto, 2016), 소하천별로 일본장수도롱뇽(*Andrias japonicus*)과 근연 외래종의 서식비율 분포지도를 작성한 연구(Fukumoto *et al.*, 2015) 등 복수의 수생태계 생물종에 대한 공간분포 추정에 활용된 연구들이 있다. 또한 일본에서는 2017년 전국 해양 어류상을 일제히 조사하기 위해 환경 DNA 메타바코딩 기술을 활용, 전국 해변 528지점의 물 샘플로부터 1220여종의 어류종 군집구조의 공간분포를 밝히기도 하였다. 이같은 광역 생태계 조사에 환경 DNA를 응용하고자 하는 시도는 미국 캘리포니아 연안 생물종 조사(Andruszkiewicz *et al.*, 2017), 호주 하천 생물종 조사(Bylemans *et al.*, 2018), 아마존 회귀생물 조사(Smithsonian Voices, 2018) 등 전세계로 확

산되고 있다. 또한 어류종 뿐만 아니라 산림 내 정수습지 물 샘플로부터 추출된 환경 DNA로부터 포유류 출현종 검출에 성공(Ushio *et al.*, 2017) 하는 등, 그 응용의 범위가 날로 커지고 있다. 이렇듯 간접 생물조사 기법에 의한 디지털 고빈도 관측을 통해 광역 생태계 자료를 효율적으로 획득할 수 있다는 점에서 향후 발전이 더욱 기대된다고 할 수 있다.

환경 DNA 분석(Miya *et al.*, 2015)은 일반적으로 채수, 여과를 통한 환경 DNA 농축 및 추출, 분자생물학적 실험 순서로 이루어진다. 현장에서 샘플링 한 채수 시료로부터 환경 DNA 농축 및 추출하는 과정에서는 주로 카트리지식 필터를 활용하는 방법과 glass fiber 필터를 활용하는 방법이 있다. 추출된 DNA를 증폭하는 분자생물학적 실험에는 realtime PCR을 활용한 특정 목표종에 대한 단일종 검출법과 환경 DNA 메타바코딩 법으로 불리우는 특정 분류군(예를 들어 어류)의 차세대 시퀀싱(Next Generation Sequencing)을 통한 다중 동시 검출법이 사용된다. 단일종 검출법에서는 특정 대상종이 저렴한 처리비용에 높은 정확도로 검출된다는 장점이 있으나, 대상 종에 따라 프라이머 구축 등 검출 체계를 맞춤형으로 설계하는 수고가 요구될 수 있다. 다중 동시 검출법에서는 비교적 처리의 과정이 번거롭고 비용이 많이 드는 반면, 다양한 종의 정보를 한꺼번에 얻을 수 있다는 이점이 있다. 따라서 조사의 목적과 규모에 따라 이 두 방법을 상호보완적으로 활용하는 것이 필요하다. 이렇게 얻어진 DNA 배열 자료는 생물정보학 데이터베이스와의 상호대조를 통해 종 동정이나 DNA의 양을 분석하는 과정을 거쳐 원하는 종의 유무나 군집구조를 파악할 수 있게 된다.

국내에서도 생물자원 데이터베이스 구축과 보전, 희귀종 식별을 위한 DNA 자료 수집은 활발히 이루어지고 있으나, 환경 DNA를 활용한 생물종 조사로 응용되는 연구사례는 수생태계

의 어종 분류(Park *et al.*, 2008), 식물성 플랑크톤 군집(Yoon *et al.*, 2016) 및 두족류 탐지(Kim *et al.*, 2019)로 적용범위를 확장하고 있으나 아직 초기단계라고 할 수 있다. 특히 본 연구에서 초점을 두고자 하는 수생태계 어류종 조사에서는, 전통적인 방식의 현장조사에서 한계로 알려진 지형이나 식생에 따라 어망 투척이 힘든 경우, 물이 혼탁하여 목시로 확인이 어려운 경우, 바위 틈이나 돌 밑으로 숨어 들어간 생물종을 포획 확인하는 것이 어려운 경우, 종 동정 등에 전문지식에 요구되는 경우 등을 보완해줄 수 있는 환경 DNA와 같은 기술에 대한 요구도가 높다고 할 수 있다.

따라서 본 연구는 환경 DNA 메타바코딩 기술을 통해 국내 수생태계 어류종 군집조사의 가능성을 검토하는 것을 목적으로 한다. 이를 위해 먼저, 기존 조사방법의 한계로부터 본 기술 적용의 중요성과 향후 연구 방향을 제시한다. 둘째로, 실제 본 기술의 적용 가능성을 가늠하기 위해 출현종 목록이 제한적인 도시 내 생태하천을 대상으로 파일럿 테스트를 실시하여, 그 결과를 바탕으로 기술도입의 가능성을 논하고자 한다.

II. 연구 내용 및 방법

환경 DNA 메타바코딩 기술의 시범 적용을 위해 본 연구는 수원시 황구지천을 대상으로 선정하여 자연환경에서의 eDNA 검출 가능성 기존 수생태계 어류종 모니터링 보고서와의 비교를 통해 분석하고자 하였다. 본 연구는 기존 모니터링 보고서의 조사지점과 동일한 하천 지점에서 물 샘플을 채취한 후 필터를 통해 수집된 시료의 DNA를 추출 및 증폭하여 분석하였다. 전체적인 처리 과정은 Miya *et al.*(2015)의 방법을 준용하였다.

1. 대상지 개요

본 연구에서는 경기도 의왕시·수원시·화성시·오산시·평택시를 지나는 황구지천으로 수원시 지속가능도시재단 모니터링 보고서(2018)를 참고하여 경기도 권선구에 위치한 상류부터 하류까지의 4지점을 선정하고자 하였다.

1지점은 상류로서 왕송 제2낙차공(37°18'01.1"N, 126°56'40.6"E)아래, 2지점은 중상류로서 금곡교(37°16'21.7"N, 126°57'43.8"E)아래, 3지점은 중하류로서 탑리보(37°15'04.0"N, 126°58'16.0"E)아래, 4지점은 하류로서 제1산업단지보 아래(37°14'23.1"N, 126°58'24.4"E)로 선정하였다(Figure 1). 각 대상지의 지점별 하천의 폭은 1지점 17m, 2지점 18m, 3지점 25m, 4지점 37m으로 측정되었다.

2. 하천 시료 채취

먼저, 환경 DNA를 분석하기 위해서 2019년 5월 17일에 황구지천의 각 조사지점에 대한 하천수 샘플을 채취하였다. 시료 채취 시 발생할 수 있는 혼합물질에 의한 오차를 최소화하기 위하여 멸균 장갑, 멸균 팩, 일회용 주사기를 이용하여 실시하였으며 샘플링마다 각각 별도의 장갑과 보존팩, 주사기를 이용하였다.

각 지점별로 채수된 하천수 샘플은 일회용 주사기를 이용하여 약 5회에 걸쳐 200~500ml의 용량을 0.45 μ m 카트리지를 필터를 장착하여 필터링하였으며 다만 각 조사지점의 녹조 등으로 인한 수질 상태에 따라 필터링 되는 물의 양에는 다소 차이가 발생하였다. 필터링 작업이 완료된 시료들은 즉시 아이스박스에 보관하여 DNA 분해 및 외부의 영향을 최소화하였다.

3. DNA 메타바코딩 및 분석결과 도출

DNA 추출에서부터 증폭에 이르는 차세대 시퀀싱 분석은 전문기관(NICEM; National Instrumentation Center for Environmental Management)의 협력으로 진행되었다. Miya *et al*

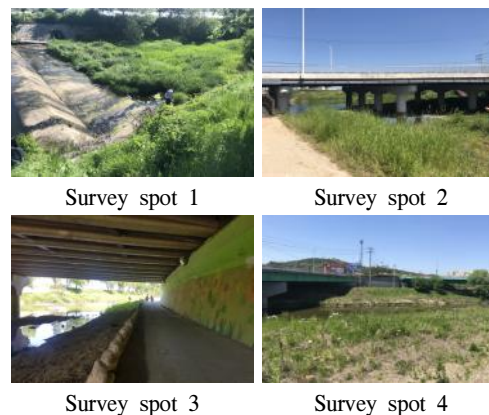


Figure 1. Study site

(2015)의 방법을 준용하되, 사용기에 있어서 는 읽어들이는 리드수가 길지 않아도 된다고 판단하여 미 Illumina 사의 HiSeq 2500을 사용하

였다.

4. 생물종 유전자 정보와의 매칭

MiFish pipeline (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish>) 을 통해 파이프라인 내의 생물종 유전자 정보 DB와 매칭을 실시하였다. HiSeq 분석 결과로 제공되는 FASTA 파일에 기재된 염기서열과 기존 생물종 유전자 정보 DB와의 유사도에 따라 시료별로 존재하는 생물종 리스트와 각 리드 수가 도출된다. 본 연구에서는 유사도 97% 이상의 분류군의 군집, 계열, 종, 총 리드 수 등의 결과를 활용하였다. 다만 대상지에 맞는 유전자 정보 DB를 사전에 따로 구축하지는 못했고 MiFish 에 기 구축되어있는 일본 담수어종의 DB를 그대로 활용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 환경 DNA 기법을 통한 황구지천 출현종 분석 결과

2019년 5월 17일, 환경 DNA 기법을 통해 황구지천의 상류-중류-하류에 걸친 네 개 지점의 출현종을 분석한 결과, 1지점에서는 4목 6과 12종, 2지점에서는 3목 4과 11종, 3지점에서는 4목 4과 12종, 4지점에서는 5목 6과 13종이 각각 검출되었다. 환경 DNA 분석 결과에서는 채수한 시료에 존재하였던 각 종별 DNA 정보가 분석 과정에서 증폭, 정제 등의 과정을 거친 뒤, total read 수로 도출된다. 따라서 조사지점별로 증명 뿐 아니라, 시료에 존재하였던 DNA의 양과 관련된 정보 또한 함께 확인할 수 있다. 각 조사지점에서 검출된 종의 목록 및 환경 DNA total read 수와 관련된 세부 결과는 아래와 같다.

1) 조사 1지점

황구지천 1지점에서는 환경 DNA 조사방법으로 2019년 5월 17일 조사에서 총 4목 6과 12

종의 어류가 검출되었다. Total read 수는 붕어(*Carassius auratus*)가 1,448,988로 가장 많이 읽힌 것으로 나타났으며, 다음으로는 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)가 107,018, 밀망둑속(*Rhinogobius sp.*)이 98,260로 많이 검출된 것으로 확인되었다. 이외에도 배스(*Micropterus salmoides*)가 53,148, 떡붕어(*Carassius cuvieri*)가 52,484, 참붕어(*Pseudorasbora parva*)가 49,168 등의 순으로 조사되었으며, 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)가 5,647로 가장 적게 검출되었다(Table 1).

2) 조사 2지점

황구지천 2지점에서는 환경 DNA 조사방법으로 2019년 5월 17일 조사에서 총 3목 4과 11종의 어류가 검출되었다. Total read 수는 참붕어(*Pseudorasbora parva*)가 618,282로 가장 많이 읽힌 것으로 나타났으며, 다음으로는 떡붕어(*Carassius cuvieri*)가 177,726, 붕어(*Carassius auratus*)가 74,084로 많이 검출된 것으로 확인되었다. 이외에도 *Pseudogobio vaillanti*가 19,462, *Silurus soldatovi*가 13,068 등의 순으로 조사되었으며, 잉어(*Cyprinus carpio*)가 66으로 가장 적게 검출되었다(Table 2).

3) 조사 3지점

황구지천 3지점에서는 환경 DNA 조사방법으로 2019년 5월 17일 조사에서 총 4목 4과 12종의 어류가 검출되었다. Total read 수는 붕어(*Carassius auratus*)가 433,859로 가장 많이 읽힌 것으로 나타났으며, 다음으로는 참붕어(*Pseudorasbora parva*)가 412,249, 얼룩동사리(*Odontobutis interrupta*)가 118,689로 많이 검출된 것으로 확인되었다. 이외에도 피라미(*Zacco platypus*)가 48,864, 떡붕어(*Carassius cuvieri*)가 38,425, 대륙송사리(*Oryzias sinensis*)가 35,139, 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)가 28,158, 큰납지리(*Acheilognathus macropterus*)가 17,045 등

의 순으로 조사되었으며, 붕어속(*Carassius sp.*) 이 7,391로 가장 적게 검출되었다(Table 3).

4) 조사 4지점

황구지천 4지점에서는 환경 DNA 조사방법으로 2019년 5월 17일 조사에서 총 5목 6과 13종의 어류가 검출되었다. Total read 수는 참붕어(*Pseudorasbora parva*)가 1,366,134로 가장 많이 읽힌 것으로 나타났으며, 다음으로는 붕어(*Carassius auratus*)가 245,108으로 많이 검출된 것으로 확인되었다. 이외에도 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)가 36,017, 떡붕어(*Carassius cuvieri*)가 32,389, 가물치(*Channa argus*)가 19,645, 밀망둑속(*Rhinogobius sp.*)이 14,646, 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)가 13,403, 꼭저구(*Gymnogobius urotaenia*)가 11,725 등의 순으로 조사되었으며, 잉어(*Cyprinus carpio*)가 162로 가장 적게 검출되었다(Table 4).

2. 모니터링보고서(2018)에 의한 황구지천 출현종

수원시지속가능도시재단의 시민참여형 수질 및 수생태계조사 보고서(Suwon Sustainable City Foundation, 2018)에는 4월부터 11월동안 각 조사지점에서 출현한 것으로 확인된 종이 보고되어 있다. 4월부터 11월의 기간동안 1지점에서는 3목 6과 11종, 2지점에서는 3목 5과 10종, 3지점에서는 4목 5과 11종, 4지점에서는 4목 4과 10종이 출현한 것으로 보고되었다. 각 조사지점에서 월별로 출현하였던 종의 목록 및 월별 우점종과 관련된 세부 정보는 아래와 같다.

1) 조사 1지점

황구지천 1지점에서는 모니터링 조사방법으로 4월-11월 기간동안 총 3목 6과 11종의 어류가 출현한 것으로 나타났다. 4월 출현종으로 참붕어(*Pseudorasbora parva*) 등 2종이 보고되었으며, 5월 출현종으로는 붕어(*Carassius auratus*)

등 5종, 6월은 떡붕어(*Carassius cuvieri*) 등 4종, 7월은 붕어(*Carassius auratus*) 등 4종, 9월은 살치(*Hemiculter leucisculus*) 등 4종, 10월은 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 4종, 11월은 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*) 등 5종이 보고되었다. 우점종으로는 참붕어(4월), 살치(5월, 10월), 갈문망둑(7월), 배스(11월)가 보고되었으며, 출현종 중 살치는 모든 시기에 출현, 붕어는 4월을 제외한 모든 월에 출현하였다(Table 1).

2) 조사 2지점

황구지천 2지점에서는 모니터링 조사방법으로 4월-11월 기간 동안 총 3목 5과 10종의 어류가 출현한 것으로 나타났다. 4월 출현종으로 잉어(*Cyprinus carpio*) 1종이 보고되었으며, 5월 출현종으로는 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 3종, 6월은 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 4종, 7월은 붕어(*Carassius auratus*) 등 6종, 9월은 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 9종, 10월은 붕어(*Carassius auratus*) 등 4종, 11월은 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*) 등 4종이 보고되었다. 우점종으로는 피라미(5월, 7월, 10월, 11월), 붕어(6월, 7월), 갈문망둑(7월), 모래무지(9월)가 보고되었으며, 출현종 중 피라미는 4월을 제외한 모든 월에 출현, 붕어는 4월과 5월을 제외한 모든 월에 출현하였다(Table 2).

3) 조사 3지점

황구지천 3지점에서는 모니터링 조사방법으로 4월-11월 기간 동안 총 4목 5과 11종의 어류가 출현한 것으로 나타났다. 4월 출현종으로 모래무지(*Pseudogobio esocinus*) 등 3종이 보고되었으며, 5월 출현종으로는 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 2종, 6월은 붕어(*Carassius auratus*) 1종, 7월은 붕어(*Carassius auratus*) 등 2종, 9월은 붕어(*Carassius auratus*) 등 6종, 10월은 참붕어(*Pseudorasbora parva*) 등 4종, 11월은 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 4종이 보고되었다. 우

점종으로는 붕어(5월, 9월), 피라미(10월)가 보고되었으며, 출현종 중 붕어는 4월과 10월을 제외한 모든 월에 출현한 것으로 확인되었다 (Table 3).

4) 조사 4지점

황구지천 4지점에서는 모니터링 조사방법으로 4월-11월 기간동안 총 4목 4과 10종의 어류가 출현한 것으로 나타났다. 4월 출현종으로 잉어(*Cyprinus carpio*) 1종이 보고되었으며, 5월 출현종으로는 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 6종, 9월은 가물치(*Channa argus*) 4종, 10월은 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 7종, 11월은 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 4종이 보고되었다. 우점종으로는 줄물개(5월), 떡붕어(9월), 잉어(10월), 피라미(11월)가 보고되었으며, 출현종 중 대륙송사리, 살치, 모래무지, 피라미는 다른 종에 비해 출현한 달이 비교적 많았다(Table 4).

3. 환경 DNA 조사와 모니터링 조사의 비교

본 연구에서는 환경 DNA 기술에서 검출된 종의 실제 출현 여부를 검증하기 위하여 기존 모니터링 출현종과 비교하는 과정을 거쳤다. 본 연구에서 환경 DNA 샘플 수집은 5월 중에 진행되었고, 모니터링보고서(Suwon Sustainable City Foundation, 2018)에는 월별 출현종 목록이 제시되어있다. 본 연구에서는 조사 시의 미확인종을 감안하여 환경 DNA 조사(5월)를 통한 황구지천에서의 검출종을 모니터링보고서의 5월 출현종 및 전월(4월-11월) 출현종 목록과 비교하였다. (Table 1-4)

기존 모니터링 출현종 중 본 환경 DNA에서 검출된 종과 일치하였던 종의 비율은 다음과 같다; 5월 모니터링의 출현종 중 35% 가량이 금번 환경 DNA 조사에서 검출되었으며, 전월(4-11월) 모니터링의 출현종 중 약 45%에 해당하는 종이 금번 환경 DNA 조사에서 검출되었다. 이처럼 모니터링보고서에 보고된 모든 출현종이

검출되지는 않았지만, 단번의 환경 DNA 조사를 통해 상당수의 종이 일치하였고 기존 보고서에 보고되지 않았던 종도 다수 검출되었음을 확인하였다(Figure 2). 본 결과는 모니터링 기법으로는 시기별 다회 조사가 이루어진 것이지만, 환경 DNA 기법으로는 1회 조사로 도출된 결과라는 점에서도 의의가 크다. 각 조사지점 별로 출현한 종을 비교한 세부 내용은 이하 내용과 같다.

1) 조사 1지점

황구지천 1지점의 환경 DNA 검출 결과와 모니터링보고서 출현종의 비교 결과, 공통 출현종은 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*), 붕어(*Carassius auratus*), 잉어(*Cyprinus carpio*), 떡붕어(*Carassius cuvieri*), 참붕어(*Pseudorasbora parva*)로 총 5종이 일치하게 검출되었다. 모니터링 보고서에 보고된 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 6종이 환경 DNA 조사에서 검출되지 않았으며, 환경 DNA 조사를 통해 배스(*Micropterus salmoides*) 등 7종이 추가로 검출되었다(Table 1).

2) 조사 2지점

황구지천 2지점의 환경 DNA 검출 결과와 모니터링보고서 출현종의 비교 결과, 공통 출현종은 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*), 붕어(*Carassius auratus*), 잉어(*Cyprinus carpio*)로 총 3종이 일치하게 검출되었다. 모니터링 보고서에 보고된 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 7종이 환경 DNA 조사에서 검출되지 않았으며, 환경 DNA 조사를 통해 떡붕어(*Carassius cuvieri*) 등 8종이 추가로 검출되었다(Table 2).

3) 조사 3지점

황구지천 3지점의 환경 DNA 검출 결과와 모니터링보고서 출현종의 비교 결과, 공통 출현종은 대륙송사리(*Oryzias sinensis*), 붕어(*Carassius*

auratus), 떡붕어(*Carassius cuvieri*), 잉어(*Cyprinus carpio*), 참붕어(*Pseudorasbora parva*), 피라미(*Zacco platypus*), 얼룩동사리(*Odontobutis interrupta*)로 총 7종이 일치하게 검출되었다. 모니터링 보고서에 보고된 모래무지(*Pseudogobio esocinus*) 등 4종이 환경 DNA 조사에서 검출되지 않았으며, 환경 DNA 조사를 통해 큰납지리(*Acheilognathus macropterus*) 등 4종이 추가로 검출되었다(Table 3).

4) 조사 4지점

황구지천 4지점의 환경 DNA 검출 결과와 모니터링보고서 출현종의 비교 결과, 공통 출현종은 가물치(*Channa argus*), 떡붕어(*Carassius cuvieri*), 잉어(*Cyprinus carpio*), 참붕어(*Pseudorasbora parva*)로 총 4종이 일치하게 검출되었다. 모니터링 보고서에 보고된 대륙송사리(*Oryzias sinensis*) 등 6종이 환경 DNA 조사에서 검출되

지 않았으며, 환경 DNA 조사를 통해 뱀장어(*Anguilla japonica*) 등 9종이 추가로 검출되었다(Table 4).

4. 환경 DNA 기술 활용의 장단점

기존 방식의 수생태계 어류종 현장조사의 한계(Hobbs & Bright, 2016)와 환경 DNA 기술 활용으로 기대되는 장점은 다음과 같이 정리할 수 있다(Table 5).

1) 기존의 현장조사에서는 시공간적 제한에 따라 발견률, 어획률, 종 판별 등에 불확실성 발생할 수 있고, 어종에 따라 포획률이나 발견률이 상이할 수 있어 종간 표준화 문제가 있을 수 있다. 환경 DNA 기술 도입을 통해 이러한 불확실성이 해소되고 종간 편차없이 고른 샘플링을 기대할 수 있다.

2) 기존의 현장조사에서는 시간적 경제적 비용, 즉 어획, 포획이나 사전조사에 대해 사전 허

Table 1. Comparing environmental DNA(eDNA) and monitoring survey in Spot 1 of Hwangguji stream

Order	Family	Species	eDNA (Total read)	Field survey (monitoring report)	Detection period							
					Apr.	May	Jun.	Jul.	Sep.	Oct.	Nov.	
Beloniformes	Adrianichthyidae	<i>Oryzias sinensis</i>										
Centrarchiformes	Centrarchidae	<i>Micropterus salmoides</i>	53,148		●							
		<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	5,647		●							
Cypriniformes	Cobitidae	<i>Misgurnus mizolepis</i>	107,018		●							
		Cyprinidae	<i>Carassius auratus</i> (<i>Carassius gibelio</i>)	1,448,988		●						
			<i>Cyprinus carpio</i>	24,516		●						
	<i>Carassius cuvieri</i>		52,484		●							
	<i>Carassius sp.</i>		34,158		●							
	<i>Hemiculter leucisculus</i>											
	<i>Pseudorasbora parva</i>		49,168			●						
	<i>Zacco platypus</i>											
	Gobiiformes	Gobiidae	<i>Rhinogobius sp.</i>	98,260		●						
		Odontobutidae	<i>Odontobutis interrupta</i>	20,264		●						
Perciformes	Centrarchidae	<i>Micropterus salmoides</i>										
	Channidae	<i>Channa argus</i>										
	Gobiidae	<i>Rhinogobius giurinus</i>										
Siluriformes	Bagridae	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	9,083		●							
Total number of species observed			12	11								

□ : Detection species in each investigate, ● : Detected species in eDNA survey, □ : Observed species in monitoring survey, ■ : Dominant species in monitoring survey

가절차가 필요하거나 조사자 안전을 확보하기 위한 비용이 발생할 수 있다. 반면 환경 DNA 기술은 최소한의 물 샘플만 허용되면 조사가 가능하다.

Table 2. Comparing environmental DNA(eDNA) and monitoring survey in Spot 2 of Hwangjuji stream

Order	Family	Species	eDNA (Total read)	Field survey (monitoring report)	Detection period							
					Apr.	May	Jun.	Jul.	Sep.	Oct.	Nov.	
Beloniformes	Adrianichthyoidae	<i>Oryzias sinensis</i>										
	Cypriniformes	Cobitidae	<i>Misgurnus mizolepis</i>	8,528		●						
Cyprinidae		<i>Carassius auratus</i> (<i>Carassius gibelio</i>)	74,084		●							
		<i>Carassius cuvieri</i>	177,726		●							
		<i>Carassius sp.</i>	6,203		●							
		<i>Cyprinus carpio</i>	66		●							
		<i>Hemiculter leucisculus</i>										
		<i>Paramisgurnus dabryanus</i>	8,630		●							
		<i>Pseudogobio esocinus</i>										
		<i>Pseudogobio vaillanti</i>	19,462		●							
		<i>Pseudorasbora parva</i>	618,282		●							
		<i>Rhodeus notatus</i>										
<i>Zacco platypus</i>												
Gobiiformes		Gobiidae	<i>Rhinogobius sp.</i>	8,190		●						
Perciformes	Centrarchidae	<i>Micropterus salmoides</i>										
	Gobiidae	<i>Rhinogobius giurinus</i>										
Siluriformes	Siluridae	<i>Silurus soldatovi</i>	13,068		●							
Total number of species observed			11	10								

■ : Detection species in each investigate, ● : Detected species in eDNA survey, □ : Observed species in monitoring survey, ■ : Dominant species in monitoring survey

Table 3. Comparing environmental DNA(eDNA) and monitoring survey in Spot 3 of Hwangjuji stream

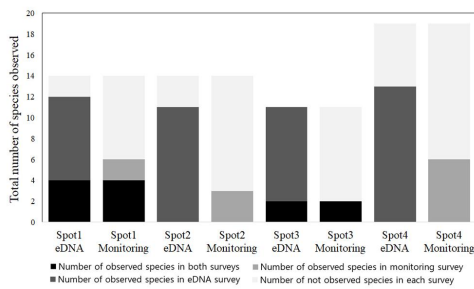
Order	Family	Species	eDNA (Total read)	Field survey(m onitoring report)	Detection period							
					Apr.	May	Jun.	Jul.	Sep.	Oct.	Nov.	
Beloniformes	Adrianichtyidae	<i>Oryzias sinensis</i>	35,139			●						
Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Acheilognathus macropterus</i>	17,045			●						
		<i>Carassius auratus</i> (<i>Carassius gibelio</i>)	433,859			●						
		<i>Carassius cuvieri</i>	38,425			●						
		<i>Carassius sp.</i>	7,391			●						
		<i>Cyprinus carpio</i>	12,267			●						
		<i>Misgurnus mizolepis</i>	28,158			●						
		<i>Pseudogobio esocinus</i>										
		<i>Pseudorasbora parva</i>	412,249				●					
		<i>Zacco platypus</i>	48,864				●					
		Gobiiformes	Odontobutidae	<i>Odontobutis interrupta</i>	118,689			●				
Perciformes	Centrarchidae	<i>Lepomis macrochirus</i>										
		<i>Micropterus salmoides</i>										
	Gobiidae	<i>Rhinogobius giurinus</i>										
Total number of species observed			11	11								

■ : Detection species in each investigate, ● : Detected species in eDNA survey, □ : Observed species in monitoring survey, ■ : Dominant species in monitoring survey

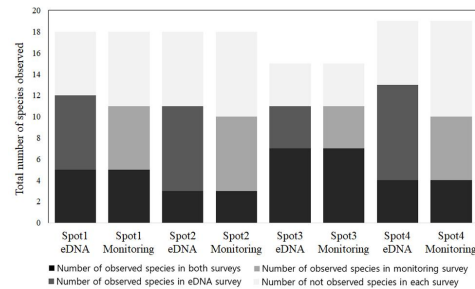
Table 4. Comparing environmental DNA(eDNA) and monitoring survey in Spot 4 of Hwangguji stream

Order	Family	Species	eDNA (Total read)	Field survey(monitoring report)	Detection period				
					Apr.	May	Sep.	Oct.	Nov.
Anabantiformes	Channinae	<i>Channa argus</i>	19,645			●			
Anguilliformes	Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i>	8,655			●			
Beloniformes	Adrianichthyoidae	<i>Oryzias sinensis</i>							
Cypriniformes	Cobitidae	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	13,403			●			
		<i>Misgurnus mizolepis</i>	36,017			●			
	Cyprinidae	<i>Carassius auratus</i>	245,108				●		
		<i>(Carassius gibelio)</i>					●		
		<i>Carassius cuvieri</i>	32,389				●		
		<i>Carassius sp.</i>	10,807				●		
		<i>Cyprinus carpio</i>	162				●		
		<i>Gnathopogon strigatus</i>							
		<i>Hemiculter leucisculus</i>							
		<i>Pseudogobio esocinus</i>							
Gobiiformes	Gobiidae	<i>Gymnogobius urotaenia</i>	11,725				●		
		<i>Rhinogobius sp</i>	14,646				●		
Perciformes	Centrarchidae	<i>Micropterus salmoides</i>							
Siluriformes	Siluridae	<i>Silurus soldatovi</i>	10,258						
Total number of species observed			13	10					

: Detection species in each investigate,
 : Detected species in eDNA survey,
 : Observed species in monitoring survey,
 : Dominant species in monitoring survey



(a) Comparing the total number of species detected by eDNA with field monitoring survey (May)



(b) Comparing the total number of species detected by eDNA with field monitoring survey (April to November)

Figure 2. Comparing the total number of species detected by eDNA with field monitoring survey

3) 기존의 현장조사에서는 인적 자원의 확보도 중요한 문제인데, 종 동정에 고도의 전문지식이나 경험이 필요하며, 따라서 조사자에 의해 결과 자료에 바이어스가 생길 수 있다. 환경 DNA

기술은 비전문가도 정해진 프로토콜에 의해 현장에서 물 샘플링만 수행하면 되기 때문에 시간적 경제적 인적 비용을 줄일 수 있다. 다만 분자생물학, 생물정보학적 분석에는 추가적인 전문

Table 5. Comparison of traditional field survey and the survey using environmental DNA technique

	Traditional field survey	Survey using environmental DNA technique
Uncertainty in species detection	High	Low
	The rates of detection, capture and identification are often dependent of species, site condition, and survey period.	The rates of detection, capture and identification are relatively stable across the species and survey conditions.
Cost in time and labor	High	Low
	Permission for survey and safety measures are often required in advance.	It simply requires the small amount of water sampling with low cost.
Required Human resources	High	Low
	Highly-experienced professionals are required at every field survey.	Any crews are allowed in survey if they can do simple water sampling based on the determined protocol.
Survey range	Limited	Widely applicable
	The limited range is only allowed depending on the site accessibility and the attributes of target species.	It can be applicable to more diverse cases with little consideration of location and target species.
Disturbance in the survey results	High	Low
	Invasive survey methods may affect the result.	Disturbance during survey is minimized.

가 식견이 요구된다.

4) 기존의 현장조사에서는 어획이 되지 않는 종, 발견이 곤란한 종의 경우에는 조사가 어려워 대상 종이 제한적이며, 어획이 곤란한 해수역, 감염지역, 오염수역이나 보호구의 경우와 같이 조사 수역이 제한될 수도 있다. 환경 DNA 기술 도입을 통해 조사 대상종과 조사 수역의 제한으로부터 상대적으로 자유롭게 조사를 수행할 수 있다.

5) 기존의 현장조사에서는 조사방법이 침입적이어서 조사 자체가 교란으로 작용하여 자료에 오류 발생할 우려가 있다. 환경 DNA 기술로는 용기로 물만 샘플링하면 되기 때문에 이러한 조사 시의 교란이 최소화 된다.

이상과 같은 장점이 기대되고 있으나, 본 연구의 한계에 비추어 단점들도 제기될 수 있다. 본 연구에서는 MiFish pipeline (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish>) 상에 구축된 어종의 DB를 활용하였는데, 이는 세계 및 일본 어종 DB에 기반한 것으로, 국내에서 활용하기 위

해서는 분석에 앞서 양질의 국내 DB에 대한 구축과 대조과정이 요구된다. 또한 본 연구에서 활용한 Miya *et al.* (2015)의 어류종 프라이머와 Hiseq은 참조하거나 읽어오는 염기쌍(base pair) 길이가 짧아 근연종의 과다추정 등의 문제가 있을 수 있다. 또한 샘플링에서부터 분석과정 전반에 이르기까지 외부요인 개입(contamination)을 철저하게 통제하는 것이 결과의 정확성을 좌우하는 요인으로 알려져 있어, positive·negative control을 고려한 분석계획 및 분석결과에 대한 통계적 정제과정에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 마지막으로, 본 연구에서는 단 한차례 시험을 통해서도 정확한 데이터가 나올 수 없는 한계가 발생하기 때문에 추후 연구를 통해 보완이 필요하다.

IV. 결 론

생물종의 출현여부를 보다 효율적으로 파악하는 기술은 생태조사의 가장 고전적인 기술개

발의 과제이자 걸림돌이었다. 기존의 조사 고도화 기술들은 주로 대상종이 서식하기 적합한 물리적 환경을 원격탐사자료로부터 추정한다거나, 기존 조사자료로부터 실제 조사가 어려운 지점까지 추정가능한 종분포모델을 개발한다거나 하는 쪽에 치우쳐있다고 할 수 있다. 그러나 본 기술은 다양한 대상종들의 존재 여부를 일정량의 물 샘플만으로부터 검출해냄으로써 기존 수생태계 조사의 문제점들을 해결할 수 있을 것으로 기대된다. 관련 연구의 향후 전개 방향을 나누어 보면 다음과 같다.

먼저, 특정 어류종 분포 및 생체량 측정을 위한 모니터링 기술개발로의 전개이다. 특정 종에 대한 프라이머 설계로 PCR을 통해 정확도 높게 대상종의 유무를 판독할 수 있는 경우, 공간적으로 확장된 샘플을 통해 그 종이 어디에 얼마만큼 있는가를 추정할 수 있다. 관심 생물종의 프라이머 설계로부터 환경 DNA 추출, 서식여부 검증, 환경 DNA의 동태(생성, 이입, 유입, 확산, 소멸) 분석과 나아가 얼마나 많은 개체들이 존재하는지, 생체량을 추정하는 추정기법 개발 분야가 될 수 있다. 둘째로, 어류종 군집의 종구성 모니터링 기술개발로의 전개이다. 즉 대상지에 어떤 종들이 있는가에 대한 것으로, 본 연구에서 파일럿테스트를 실시한 환경 DNA 메타바코딩 기반 기술개발 및 개량이 이에 해당한다. 고비용과 검증의 문제 이외에도, 기술적으로는 통상 분자생물학에서 실시되는 DNA 메타바코딩 프로세스와 상이한 부분, 예를 들어 물 샘플링에서부터 처리과정에 이르기까지 의도되지 않은 혼합물질(contamination)에 따른 오류발생의 가능성 등 한계가 있어 안정적이고 표준화된 프로토콜 개발이 요구된다. 셋째로는 이러한 분석결과를 활용한 군집구조 평가기술 개발로의 전개이다. 종간 상호관계 분석이 그 내용이 되며, 다양한 종들의 시계열 자료 분석에 따라 종간 상호작용의 추정하고 시계열 자료에 기반한 생태계 안정성 평가기법을 개발하는 것이다.

나아가 개체군 크기 추정, 생태계 먹이그물 평가 등 개체군 생태학이나 군집생태학의 핵심적인 이론을 실증할 수 있는 도구가 될 수 있다. 또한, 조사의 효율화는 곧 시공간적인 확장성을 의미하기 때문에, 다양한 생태환경의 변동이나 교란, 군집 구성 종들의 생활사 및 계절이동의 실증에도 중요한 도구로 활용되고 있다. 나아가 유전적 생물다양성 보전, 교란종 외래종 관리, 희귀종 보호종 검출, 수생태계 건강성 평가, 보전구역 설정과 관리에도 직접적으로 관련되는 기술로써 이미 각광받고 있으며, 이러한 발전과 함께 본 기술은 점차 더 고도화, 표준화 될 것으로 예상된다.

References

- Andruszkiewicz, E. A. · Starks, H. A. · Chavez, F. P. · Sassoubre, L. M. · Block, B. A. and Boehm, A. B. 2017. Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding. *PLoS One*. 12(4): e0176343.
- Biggs, J. · Ewald, N. · Valentini, A. · Gaboriaud, C. · Dejean, T. · Griffiths, R. A. · Foster, J. · Wilkinson, J. W. · Arnell, A. and Brotherton, P. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*. 183: 19-28.
- Bohmann, K. · Evans, A. · Gilbert, M. T. P. · Carvalho, G. R. · Creer, S. · Knapp, M. · Yu, D. W. and De Bruyn, M. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in ecology & evolution*. 29(6): 358-367.
- Bylemans, J. · Gleeson, D. M. · Lintermans, M. · Hardy, C. M. · Beitzel, M. · Gilligan, D. M. and Furlan, E. M. 2018. Monitoring riverine fish communities through eDNA metabarcoding:

- determining optimal sampling strategies along an altitudinal and biodiversity gradient. *Metabarcoding and Metagenomics* 2: e30457.
- Choi JK · Choi MK and Choi CB. 2015. Follow-up Monitoring & Adaptive Management after Ecological Restoration for the Stream -Focused the Hakui Stream in Anyang City-. *Journal of the Korea Society of Environmental Restoration Technology*, 18(6), 85-95. (in Korean with English summary)
- Ficetola, G. F. · Miaud, C. · Pompanon, F. and Taberlet, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*. 4(4): 423-425.
- Fukumoto, S. · Ushimaru, A. and Minamoto, T. 2015. A basin scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. *Journal of Applied Ecology*. 52(2): 358-365.
- Fukumoto, S. · Ushimaru, A. and Minamoto, T. 2015. A basin scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. *Journal of Applied Ecology*. 52(2): 358-365.
- Hobbs, J. and Bright, D. 2016. Environmental DNA : implementation for resource development projects in BC and beyond. [Online]. Available: <https://open.library.ubc.ca/cIRcle/collections/59367/items/1.0354681>. [Accessed: 17-Dec-2019]
- Jo, T. · Arimoto, M. · Murakami, H. · Masuda, R. and Minamoto, T. 2019. Particle size distribution of environmental DNA from the nuclei of marine fish. *Environmental science & technology*. 53(16): 9947-9956.
- Kim EB · Lee SR · Lee CI · Park H and Kim HW. 2019. Development of the cephalopod-specific universal primer set and its application for the metabarcoding analysis of planktonic cephalopods in Korean waters. *PeerJ* 7: e7140.
- Minamoto, T. · Yamanaka, H. · Takahara, T. · Honjo, M. N. and Kawabata, Z. I. 2012. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*. 13(2), 193-197.
- Miya, M. · Sato, Y. · Fukunaga, T. · Sado, T. · Poulsen, J. Y. · Sato, K. and Kondoh, M. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*. 2: 150088.
- Park HC · Lim JC · Lee JH and Lee GG. 2017. Predicting the Potential Distributions of Invasive Species Using the Landsat Imagery and Maxent : Focused on “*Ambrosia trifida* L. var. *trifida*” in Korean Demilitarized Zone. *Journal of the Korea Society of Environmental Restoration Technology*, 20(1), 1-12. (in Korean with English summary)
- Park HC · Kil SH and Seo OH. 2019. The Use of Unmanned Aerial Vehicle for Monitoring Individuals of *Ardeidae* Species in Breeding Habitat: A Case study on Natural Monument in Sinjeop-ri, Yeosu, South Korea. *Journal of the Korea Society of Environmental Restoration Technology*, 22(1), 73-84. (in Korean with English summary)
- Park TG · Kang YS · Seo MK · Kim CH and Park YT. 2008. Rapid detection and quantification of fish killing dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae) in environmental samples using real-time PCR. *Fisheries and aquatic sciences*. 11(4): 205-208.
- Smithsonian Voices. 2018. National Museum of Natural History, Discovery and Danger: The

- Shocking Fishes of the Amazon's Final Frontier
<http://www.smithsonianmag.com/blogs/national-museum-of-natural-history/2018/07/30/discovery-and-danger-shocking-fishes-amazons-final-frontier/#zxOETCL0mtLe8YdS.9>
 9
- Suwon Sustainable City Foundation. 2018. Survey report for water quality and the aquatic ecosystem by citizen participation. (in Korean)
- Takahara, T. · Minamoto, T. and Doi, H. 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PloS one*. 8(2): e56584.
- Ushio, M. · Fukuda, H. · Inoue, T. · Makoto, K. · Kishida, O. · Sato, K. and Takeshita, M. 2017. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources*. 17(6): e63-e75.
- Willerslev, E. · Hansen, A. J. · Binladen, J. · Brand, T. B. · Gilbert, M. T. P. · Shapiro, B. and Cooper, A. 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science*. 300(5620): 791-795.
- Willerslev, E. · Hansen, A. J. · Christensen, B. · Steffensen, J. P. and Arctander, P. 1999. Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(14): 8017-8021.
- Yamamoto, S. · Masuda, R. · Sato, Y. · Sado, T. · Araki, H. · Kondoh, M. · Minamoto, T. · Miya, M. 2017. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific reports*. 7: 40368.
- Yamanaka, H. and Minamoto, T. 2016. The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators*. 62: 147-153.
- Yoon TH · Kang HE · Kang CK · Lee SH · Ahn D H · Park H and Kim HW. 2016. Development of a cost-effective metabarcoding strategy for analysis of the marine phytoplankton community. *PeerJ* 4: e2115.
<http://mitofish.auri.u-tokyo.ac.jp/mifish>