

Research Paper

환경DNA 기술을 이용한 국내 담수어류종 탐지 가능성

– 경기도 민물고기생태학습관 중심으로 –

김가우 · 송영근

서울대학교 환경대학원 환경조경학과

Identification of Freshwater Fish Species in Korea Using Environmental DNA Technique

– From the Experiment at the Freshwater Fish Ecological Learning Center
in Yangpyeong, Gyeonggi Do –

Gawoo Kim · Youngkeun Song

Dept. of Landscape Architecture, Graduate School of Environmental Studies, Seoul National University

요약: 본 연구는 환경DNA 기술을 이용한 국내 담수어류종 탐지방법 도입 및 적용가능성을 확인하기 위해 수행되었다. 환경DNA를 이용한 모니터링 기술은 기존의 현장조사 모니터링 방식에 비하여 교란이 적고 편의성이 높으며 조사에 대한 감도가 높아 급변하는 하천 생태계 모니터링을 위한 효율적인 방법으로 주목 받고 있다. 본 연구의 대상지는 경기도 민물고기 생태학습관으로 수족관 내 수조, 생태연못, 양식장에 서식하는 국내 대표적 담수어류종에 대해 7월부터 10월까지 3차례의 물 환경시료를 수집하여 환경DNA 분석을 실시하였다. 국내 담수생태계의 다양한 서식환경을 고려하여 선정된 종에 대해 기 구축된 유전자생물종 DNA 염기서열 특성을 검토하고, 종 검출 여부 확인을 위해 채수된 16개의 환경시료를 Miya et al(2015)에서 제시된 환경DNA 분석 프로토콜에 준하여 분석하였다. 그 결과 대상 어종 총 7목 11과 50종 중 7목 11과 45종(90%)이 검출되었다. 이는 환경DNA 기술과 기 구축된 어류종 DNA DB를 활용하여 다양한 환경 조건에서도 단순한 채수 샘플링으로부터 국내 서식하고 있는 주요 민물고기 어종이 검출되었다는 점에서 의의가 있다. 나아가 실험 중 발생된 수족관 내 시료 오염, 불균질한 DNA 채집, 생물종 유전자정보 누락 등의 오차요인들을 분석하여 자연환경에서 적용 시 앞으로의 보완 방향에 대하여 제시하였다.

주요어: 담수생태계, 어류군집, 어류종조사, 수생태계 모니터링

Abstract: This study focused on verifying the identification of freshwater fish species in Korea using Environmental DNA (eDNA) technique. The research of DNA is increasing in the field of ecology, since this is more sensitive of identify rather than traditional investigation method. Which is difficult to detect species hidden in water and be easily influenced by diverse factors (sites, bad weather, researchers and so on). We applied the pilot test in aquarium (Freshwater Fish Ecological

Learning Center in Yangpyeong, Gyeonggi Do), where freshwater fish species are inhabits. We conducted to sampling and analyzing the sixteen water samples (50 species from 7 orders and 13 families) using MiFish primer set. The results showed that 45 species (90%) was investigated by eDNA. It highlight that eDNA with universal primer is possible to detect freshwater fish species of Korean. However, the errors on species identification seems to be caused by the primer that be not suited perfectly and the pollution such as aquarium, sampling collectors.

Keywords: Freshwater ecosystem, Fish community, Fish species survey, Aquatic ecosystem monitoring

I. 서론

자연생태계는 생태계 보전, 경관 향상, 대기오염 완화 등 인간의 생존에 있어 필요한 다양한 물질과 서비스를 제공해 준다. 그중에서도 담수생태계는 지구 전체의 3%도 차지하지 않는 극히 일부임에도 어류종의 40% 이상이 서식하는 높은 종 다양성을 보이고 있다(Nelson 1994). 동시에 인간의 생명에 직결되는 수원 공급, 기후조절 완화 등의 중요한 서비스를 제공한다. 그러나 인간의 거주 특성상 수변 중심으로 밀집하기 때문에 상대적으로 주거 밀집도가 높은 도시 하천의 경우 오염물질과 환경 변화에 쉽게 노출되어 급격한 비율로 종 다양성이 감소되고 있다(Naiman et al. 2006). 따라서 하천 생태계의 건강성을 유지하기 위해서는 보다 정밀하고 빈도 높은 모니터링을 통해, 과학적인 보전관리 계획을 수립해야 한다.

전통적인 어류 모니터링은 육안으로 보이지 않는 수면 아래의 유기체를 연구자가 주로 투망, 족대, 전기 낚시 장비와 같은 어구를 이용한 물리적 채집을 통해 동정하고 있다. 따라서 연구자의 실질적인 시간과 노력의 양, 그리고 조사 방식에 따라 결과값이 좌우된다(Hopkins and Freckleton 2002; Wheeler et al. 2004; Song YK et al. 2019).

기존 현장조사 방법으로는 지형 및 기후적 요소에 따라 채집하기 어려운 제한적 상황에서는 직접 조사에 한계가 있으며 특히 개체수가 적은 희귀종 혹은 멸종위기종 조사에 어려움이 예상된다. 조사자가 환경에 직접 접근하거나 장비를 투입하는 과정에서 실험 결과에 교란으로 작용할 우려가 있으며 안전사고에 노출될 위험성도 있다(Song YK et al. 2019).

본 연구는 이러한 한계점을 해결하기 위해 조사 지역에서 채집한 환경 시료 속 DNA를 이용하여 종 탐지가 가능한 환경 DNA 기술을 사용하고자 하였다. 환경DNA란 물, 토양, 공기 등 환경 시료로부터 얻을 수 있는 생물종의 DNA를 말한다. 외부 환경으로 배출된 생물종의 DNA는 자외선, 박테리아 등에 의해 자연스럽게 소멸되나 수중에서는 1주일까지 잔존하는 특성이 있다(Fukumoto et al. 2015; Yamamoto et al. 2017). 이렇게 환경에 잔존하는 생물종의 DNA는 단일 종 식별뿐 아니라 다양한 종 조성 파악 등 특정 환경의 생물다양성을 파악하는 데 활용될 수 있다(Alice Valentini et al. 2009). 이 기술을 수생태계 조사에 활용한다면 조사자, 장비 등에 의한 외부 개입이 적어져 장소 특성에 따른 한계 뿐 아니라 전문 인력과 소요시간을 절감할 수 있어 효율적으로 조사할 수 있다.

환경DNA 기술은 2000년대 이후 유전자 분석 기술이 개발되면서 습지의 환경시료 내 DNA를 추출하여 황소개구리(*Rana Catesbeiana*)의 검출 여부 확인(Ficetola et al. 2008) 하는 등 생태계 내 생물종 서식 유무를 파악하는 연구가 활발히 수행되었다. 하천, 습지, 해양과 같이 수생태계에서 서식하는 수생생물의 경우 서식환경이 다양한 조류나 육상생물과 달리 물 시료 내 DNA 획득이 비교적 용이하기 때문에, 외래종 블루길 검출(Takahara et al. 2013), 목표 종 분포도 조사를 통한 생물다양성 파악(Thomsen et al. 2015), 어류 종 880종이 식별 가능한 범용 프라이머 제시(Miya et al. 2015), 이를 활용한 어류 군집 모니터링(Zhang et al. 2019) 등 관련 연구들이 활발하게 이루어지고 있다. 국내에서도 환경DNA를

이용한 연구가 진행되고 있으나 주로 필드조사를 위주로 이루어지고 있다(Song YK et al. 2019; Kim HM et al. 2020). 그러나 필드조사는 조사 강도 및 빈도에 따라 모든 어종이 검출되지 않는다. 따라서 환경DNA로 미 검출되었을 때 실제로 서식하지 않아서 검출되지 않은 것인지 현존하지 않아서 검출이 실패한 것인지 알 수 없다. 반면 수족관과 같이 제한된 공간에서 대상 종이 확실하게 파악된 경우에는 물 시료 내에 목표 종의 DNA 조각이 반드시 있다고 가정할 수 있으므로 미 검출 시 검출 실패 여부를 확실하게 판단할 수 있어 본 기술의 신뢰성을 검증할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 수족관과 같은 제한된 조건 내에서 환경DNA를 활용하여 국내 하천에 서식하는 어류 종을 조사하였다. 어류종 조사 시 사용되는 MiFish primer와 분석 프로토콜(Miya et al. 2015)

을 사용하여 국내 어류종 다양성 검출 가능성과 결과의 신뢰성을 검증하고자 하였다.

II. 연구 내용 및 방법

본 연구는 국내 하천 어류종을 대상으로 랩 스케일의 실험을 위해 수족관에서 실시하였다. 수족관은 경기도 양평군 용문면에 소재하고 있는 경기도 민물고기 생태학습관으로 선정하였다. 본 민물고기 생태학습관 내 어류종이 담긴 수조에서 물 시료를 채집하여 시료 속의 어류종 DNA로부터 종의 유무를 검출하고자 하였다. 환경DNA로부터 검출된 결과 값과 시료를 채집한 수조의 어류 현황을 비교하여 종 탐지 가능성과 검출 정확도를 확인하였다.



Freshwater Fish Ecological Learning Center in Yangpyeong, Gyeonggi Do



Internal aquarium



Farm



River (Heukcheon)



Pond

Figure 1. Study site.

1. 대상지 개요

경기도 민물고기생태학습관은 수족관과 양식장, 생태연못 등으로 구성되어 있다. 민물고기 수족관은 약 60여개의 수조가 있으며 약 65종 1,200여 마리의 민물고기가 서식하도록 관리되고 있다. 해당 수족관과 야외에 위치한 양식장, 생태연못의 원수는 인근 하천인 흑천에서 유입시켜 정기적으로 공급하고 있다 (Figure 1). 외부에 위치한 생태연못은 그대로 원수를 유입하고 있으며 수족관 내부 수조와 양식장은 질병 예방을 위하여 원수를 소독하여 사용하고 있다.

2019년 6월 현장조사 당시, 민물고기 생태학습관 내 보유 어종 중 외래종인 배스, 블루길 등을 제외한 국내 하천 생태계에서 발견되는 민물고기는 총 7목 11과 50종이었다. 어종마다 기본적으로 개별 수조로 분류되어 전시되고 있으나, 서식유형에 따라 계곡어류종 및 외래종은 공동 수조에서 관리되고 있다.

2. 채수방법 및 현황

본 연구는 대상지 내 수조를 2019년 7월부터 10월 까지 3차례(7월 24일, 8월 21일, 10월 10일)에 걸쳐 시료를 채집하여 DNA를 분석하였다.

다양한 환경에서 종 검출이 가능한지 확인하기 위해, 실내·외 수조, 단일종 서식 수조, 다수 종 혼합 서식 수조에서 각각 시료를 채취하여 검출 여부를 분석하였다. 또한 종 DB로 활용한 MiFish pipeline에서 제공하는 어류종 DNA 정보로부터 대상 어류종이 검출되는 지 분석하였다. 특히 주요 출현 어종에 대해서는 시기를 달리하며 반복 채수하여 검출의 정확성을 확인하고자 하였다. 채수하는 시료 오염문제(contamination)를 방지하기 위하여 일회용 주사기(30ml), 멸균 장갑, 멸균 보관팩 등을 이용하여 실시하였다. 각 수조 당 300ml씩 채수한 후 현장에서 0.45um 카트리지가 필터

(Sterivex, Millipore사)에 주사기를 활용하여 시료를 통과시켰고, 시료가 농축된 필터를 각각 따로 밀봉하여 아이스박스에 보관하여 운반 후 PCR 및 메타바코딩 분석 전까지 -20°C 이하의 냉장고에서 보관하였다.

Miya et al. (2015)의 분석방법에 따라 1차, 2차 PCR을 실시하였다. 시료 속 환경DNA에 존재하는 민물고기 DNA 염기서열을 증폭하기 위해 MiFish primer를 유니버설 프라이머(Universal primer)로 선정하였다(Table 1). 본 프라이머는 880종의 다양한 어류를 식별할 수 있으며 Web 기반의 MiFish pipeline이 구축되어있다. 먼저 unique dual index identifier(UDI) P5, P7를 포함하는 Adaptor primer를 이용하여 index 과정을 거쳤으며, KAPA HiFi Hot Start Ready Mix 6ul, D.W. 1ul, P5(1uM) 2ul, P7(1uM) 2ul, DNA template 1ul, 총 12ul로 구성하였다. 2차 PCR에선 95°C 에서 3분, 98°C 에서 20초 (DNA 변성, Denaturation), 65°C 에서 15초(어닐링 과정, Annealing), 72°C 에서 15초(프라이머 신장, Extension), 72°C 에서 5분을 유지한 후 4°C 에서 보관하였다. 이후 증폭된 생산물의 크기는 모든 시료에서 동일하므로 증폭된 양을 기준으로 동량으로 풀링(Pooling)하였다.

도출된 염기 서열은 FASTP 프로그램을 통해 Operational Taxonomic Unit(OTU)을 분석하여 분류학적으로 종을 분류하였다. 염기서열 정보에서 어댑터 서열을 제외한 후 두 서열을 읽을 때 정보가 겹치는 영역을 확인하여 오류를 보정하였다. 이후 FLASH(Macgoc & Salzberg 2011)을 이용하여 각각의 시료별 페어드-엔드(Paired-end) 데이터를 하나로 조립하고 그 중 100bp 미만의 길이를 가진 서열은 제거하였다. 그 밖에도 키메라(Chimera) 서열, 시퀀

Table1. Universal primer information

Target biology	Primer name	Primer Sequence	Region amplified	Reference
fish	MiFish_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNN NNNGTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC	12S rRNA (163-185bp)	Miya et al. 2015
	MiFish_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNN NNNCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG		

싱 에러로 간주되는 낮은 품질의 서열 등 불분명하고 오류가 있는 서열을 제거한 후 97% 이상의 유사성을 갖는 서열끼리 클러스터링(Clustering)하여 Unique OTUs를 산출하였다. 산출된 OTUs는 유전자은행 자료(GenBank Database)에 등록되어 있는 염기서열 정보와의 비교를 통해 동정하고, MiFish pipeline 내 기 구축된 생물종 유전자 정보와 비교함으로써 종명을 할당하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 환경DNA 기법을 통한 분석 결과

2019년 7월 24일(1차 조사), 8월 21일(2차 조사), 10월 10일(3차 조사) 총 3차례에 걸쳐 16개의 물 시료를 채취하여 DNA 메타바코딩 분석을 실시한 결과, 총 7목 11과 50종 중 7종 11목 45종의 어종이 검출되었다. Table 2에서 기재된 바와 같이 3가지 목적으로 가지고 다음과 같은 종을 채집하였다. 각 검출 종별

Table 2. Sampling method

Sampling	Objectives	Number of samples
1st	Possibility for identifying eDNA depending on fish species and environmental factors	8 samples for 4 order 6 family 29 species
2nd	Application of DNA database in Mifish pipeline to detect the target species of this study	4 samples for 5 order 8 family 36 species
3rd	Possibility of identifying eDNA for the fish species in urban streams of Korea	4 samples for 3 order 3 family 18 species
Total	16 integrated samples for 7 order 11 family 50 species	

Table 3. Comparing environmental DNA (eDNA) and the list of Aquarium (first survey)

Name	order	family	Species	eDNA (total read)	No.*
Aq1**	<i>Perciformes</i>	<i>Centrarchidae</i>	<i>Micropterus salmoides</i>	115,520	9
	<i>Perciformes</i>	<i>Centrarchidae</i>	<i>Lepomis macrochirus</i>	223,110	2
Aq2	<i>Perciformes</i>	<i>Sinipercaidae</i>	<i>Siniperca scherzeri</i>	407,419	5
Aq3	<i>Acipenseriformes</i>	<i>Acipenseridae</i>	<i>Acipenser sinensis</i>	389,990	6
Aq4	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Hemiculter eigenmanni</i>	-	10
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Hemibarbus maculatus</i>	309,000	15
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Erythroculter erythropterus</i>	-	10
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Hemibarbus longirostris</i>	356	10
Aq5	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	8,634	7
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Carassius carassius</i>	408,159	3
Aq6	<i>Acipenseriformes</i>	<i>Acipenseridae</i>	<i>Acipenser sinensis</i>	133,525	15
	<i>Osmeriformes</i>	<i>Osmeridae</i>	<i>Plecoglossus altivelis</i>	4,140	5
Aq7	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanakia koreensis</i>	5,672	25
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Squalidus multimaculatus</i>	199,239	24
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Rhodeus ocellatus</i>	19,888	25
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Acheilognathus macropterus</i>	181,052	10
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Nipponocypris temminckii</i>	401	9
Aq8	<i>Acipenseriformes</i>	<i>Acipenseridae</i>	<i>Acipenser sinensis</i>	85,284	5
	<i>Perciformes</i>	<i>Sinipercaidae</i>	<i>Siniperca scherzeri</i>	34,601	5
Total number of species observed			17 to 19 (The list of Aquarium)		

* No(Number) means the number of fish population at the time of collection

** Aq N(Sequence) : The sequence of sampling in aquarium

Table 4. Comparing environmental DNA (eDNA) and the list of Aquarium (Second survey)

Name	order	family	Species	eDNA (total read)	No.
Aq9	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Squalidus gracilis</i>	8,963	7
	<i>Salmoniformes</i>	<i>Salmonidae</i>	<i>Oncorhynchus masou</i>	1,442	5
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Hemibarbus labeo</i>	284	18
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Pungtungia herzi</i>	1,272	10
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Zacco platypus</i>	337,571	25
Aq10	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Acheilognathus signifer</i>	24,576	7
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Phoxinus oxycephalus</i>	104,017	20
	<i>Siluriformes</i>	<i>Bagridae</i>	<i>Pseudobagrus emarginatus</i>	1,064	9
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Acheilognathus rhombeus</i>	58,718	20
	<i>Siluriformes</i>	<i>Bagridae</i>	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	25,094	10
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Hemibarbus longirostris</i>	4,512	2
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Rhodeus notatus</i>	-	18
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Coreoleuciscus splendidus</i>	158,826	3
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Pseudorasbora parva</i>	98,722	5
	<i>Siluriformes</i>	<i>Bagridae</i>	<i>Pseudobagrus brevicarpus</i>	2,619	5
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Pseudopungtungia nigra</i>	38,539	6
	<i>Perciformes</i>	<i>Gobiidae</i>	<i>Tridentiger obscurus</i>	72,789	8
Aq11	<i>Siluriformes</i>	<i>Amblycipitidae</i>	<i>Liobagrus mediadiposalis</i>	214,213	8
	<i>Siluriformes</i>	<i>Bagridae</i>	<i>Pseudobagrus koreanus</i>	140,810	9
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Carassius auratus</i>	798	5
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	2,779	3
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Rhodeus uyekii</i>	363,659	2
	<i>Perciformes</i>	<i>Gobiidae</i>	<i>Rhinogobius brunneus</i>	343,086	28
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Acheilognathus intermedia</i>	179,430	29
<i>Perciformes</i>	<i>Gobiidae</i>	<i>Gymnogobiusurotaenia</i>	341,092	15	
Aq12	<i>Siluriformes</i>	<i>Amblycipitidae</i>	<i>Liobagrus andersoni</i>	282,012	27
	<i>Perciformes</i>	<i>Sinipercidae</i>	<i>Coreoperca herzi</i>	20,390	9
	<i>Perciformes</i>	<i>Odontobutidae</i>	<i>Odontobutis platycephala</i>	282,012	1
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Sarcocheilichthys nigripinnis</i>	15,471	3
	<i>Perciformes</i>	<i>Odontobutidae</i>	<i>Odontobutis interrupta</i>	19,779	1
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanakia koreensis</i>	105,348	21
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Sarcocheilichthys wakiyae</i>	-	6
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Squalidus multimaculatus</i>	60,875	15
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Acheilognathus yamatsutae</i>	15,554	6
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Rhynchocypris kumgangensis</i>	65,584	31
	<i>Gasterosteiformes</i>	<i>Gasterosteidae</i>	<i>Pungitius kaibarae</i>	105,523	35
Total number of species observed			34 to 36 (The list of Aquarium)		

Table 5. Comparing environmental DNA (eDNA) and the list of Aquarium (Third survey)

Name	order	family	Species	eDNA (total read)	No.
Aq13	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Phoxinus oxycephalus</i>	38,314	5
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Pseudogobio esocinus</i>	164,179	5
	<i>Siluriformes</i>	<i>Bagridae</i>	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	46,312	9
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Pseudorasbora parva</i>	98,036	5
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Squalidus gracilis</i>	24,145	28
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Acheilognathus rhombeus</i>	222,657	16
Aq14	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	1,888	14
	<i>Perciformes</i>	<i>Gobiidae</i>	<i>Tridentiger obscurus</i>	217,431	8
	<i>Perciformes</i>	<i>Gobiidae</i>	<i>Gymnogobiusurotaenia</i>	-	4
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Gnathopogon strigatus</i>	-	12
	<i>Perciformes</i>	<i>Gobiidae</i>	<i>Rhinogobius brunneus</i>	71	11
Aq15	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Rhodeus uyekii</i>	26,286	6
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Acheilognathus intermedia</i>	131,023	14
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Nipponocypris temminckii</i>	1,190	9
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Rhodeus ocellatus</i>	21,134	20
Aq16	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Pseudorasbora parva</i>	62,906	13
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Pungtungia herzi</i>	358	27
	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Zacco platypus</i>	100,454	14
Total number of species observed			16 to 18 (The list of Aquarium)		

Total read 수를 통해 DNA 양과 관련된 정보도 확인하였다. 시료 분석 결과 도출된 종과 실제 시료 속 어류 현황을 비교한 결과는 표(Table 3, 4, 5)로 정리하고 그래프와 그림(Figure 2, 3)으로 도식화하였다.

2. 환경DNA 분석 결과와 수족관 현황 비교

환경 DNA 분석 결과 검출된 어종의 목록과 수족관 내 실제 어종 현황을 비교한 결과, 3차(Table 5)에서는 검출되지 않았으나 2차(Table 4)에서는 검출되었던 꼭져구(*Gymnogobius urotaenia*)를 포함하여 총 7목 11과 45종의 어종 즉, 수족관 내 수집된 어종 중 90%에 해당하는 종이 확인되었다. 소량의 물 시료 채취를 통한 조사로 90% 이상의 검출률을 보인다는 점에서 환경DNA 기술을 국내의 어류종 조사에 도입할 수 있는 가능성을 확인하였다. 이 실험에서 도출된 Total read 수는 가장 높게는 십만 단위에서 낮게는 십 단위까지의 높은 차이가 있었다. 본 연구에서는 수족관 내 대상종이 파악된 상태에서 검출된 종 데이터의 정확성을 확인하기 위함으로 DNA 분석 결과

97%의 서열 유사성을 갖는 종들에 한하여 유효범위를 한정하지 않고 모든 값을 고려하여 검출 목록에 포함시켰다. DNA 검출의 전체 어종 중에서는 붕어(*Carassius carassius*)가 408,159로 가장 많은 리드 수가 기록되었고, 밀어(*Rhinogobius brunneus*)가 71로 가장 낮게 나왔다(Table 3, 4, 5). Total read 수와 수조 내 개체수간의 상관관계가 항상 보이는 것은 아니었다.

1) 서식환경과 종 현황에 따른 환경DNA 검출 가능성 확인 실험

2019년 7월 24일에 진행된 환경DNA 조사는 국내 민물고기 어종의 서식환경의 특성과 종 구성도의 차이에 따라 환경DNA 검출에 영향을 끼치는가의 여부를 확인하기 위함이다. 환경DNA 분석 결과 Aq4 샘플을 제외한 모든 샘플에서 해당 수조들의 생물종이 모두 검출되었다(Table 3). 특히, 외래종인 블루길과 배스도 모두 검출되었다. Aq4 시료에서는 치리(*Hemiculter eigenmanni*)와 강준치(*Erythroculter*

erythropterus)가 검출되지 않았다. 이로써 총 4목 6과 19종 중 4목 6과 17종이 검출되어 93.10%의 검출률을 보였다. 기존의 선행연구에서는 수조 및 연못 실험 결과 검출 종의 환경DNA의 Total read 수와 바이오매스의 양, 그리고 개체수가 양의 상관관계를 보인다고 하였다(Takahara et al. 2012). 따라서 본 실험에서도 검출된 종들의 Total read수와 개체수와의 상관관계를 비교해 본 결과, 동일종의 Total read 수를 비교했을 때 일부 Total read수와 개체수와의 상관관계가 높지 않았다. 세부적으로 살펴보면, Table 3의 독립된 수조(Aq2, 3)을 개별로 300ml 채수했을 때와 연달아 150ml씩 채수하여 300ml로 섞었을 때의 Total read수의 결과값은 동일하지 않았다. Table 3 내 양식장에서 채수한 Aq6과 수족관에서 채수한 Aq8의 철갑상어(*Acipenser sinensis*)의 Total read수를 비교한 결과, Aq6은 15마리, Total read수 133,525, Aq8은 5마리에 Total read수는 85,284로 Total read 수와 개체 수가 일정한 관계를 가지지 않았다.

2) 기 구축된 생물종 DNA DB 적용 가능성 확인 실험

2019년 8월 21일 실시된 환경DNA 조사는 기 구축된 MiFish pipeline 중 목록을 그대로 적용한 국내 민물어종 탐지가능성을 확인하기 위해서 수족관 내 단일종이 서식하는 모든 수조를 대상으로 실시하였다. 총 5목 8과 36종의 어종이 담긴 수조에서 각각 샘플을 채취하여, 4개의 시료로 통합하여 환경DNA 메타바코딩을 실시하였다. 그 결과, 참중고기(*Sarococheilichthys wakitae*)와 떡납줄갱이(*Rhodeus notatus*)를 제외한 총 5목 8과 34종이 확인되어

94.44%의 검출률을 보였다(Table 4). 기존의 MiFish DB 목록에서 36종 중 35종에 대한 염기서열 DB는 존재하는 것으로 확인하였으나, 강준치(*Erythroculter erythropterus*) 및 참중고기(*Sarococheilichthys wakiyae*)는 DB에 존재하지 않았다.

MiFish pipeline을 통해 매칭되는 DB는 주로 해외 및 일본 서식종 위주로 구성되어 있어 국내 고유종은 누락되어 있거나 잘못 분류되어 있는 경우가 있다. 그럼에도 본 실험에서는 94.44%의 높은 검출률을 보여주었다는 점에서 국내 적용가능성을 확인할 수 있었다. 생태학습관에서는 비단잉어와 잉어를 구분하여 기재하였으나 품종 자체는 동일 품종으로 본 연구에서 사용되었던 MiFish 종 목록에서는 잉어(*Cyprinus carpio*)로 통일하여 사용하였다. 검출되지 않은 떡납줄갱이(*Rhodeus notatus*)는 MiFish pipeline 내 종 목록에는 존재하는 것으로 확인되었다. 미 검출 사유로는 시료 내 해당 종의 DNA가 누락되지 않았다는 가정 하에 DB 내 시퀀스나 분류학적 동정기가 실제 채취한 떡납줄갱이의 시퀀스와 상이하기 때문으로 판단된다. 따라서 해당 종 염기서열 정보에 대한 국내 자료의 확인이나 직접적 조직 샘플을 통한 지역성이 있는 염기서열정보 구축이 필요하다.

Table 3의 Aq7 샘플 내 같은 잉어목인 칼납자루(*Tanakia koreensis*)가 25마리, 점몰개(*Squalidus multimaculatus*) 24마리, 흰줄납줄개(*Rhodeus ocellatus*) 25마리로 비슷한 개체 수였으나 Total read 수는 각각 5,672, 199,239, 19,888로 개체 수와 비슷한 추이를 보이지 않았다.

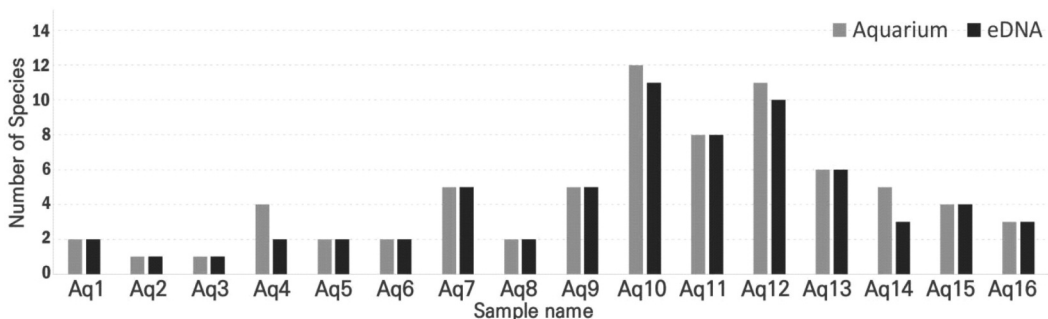


Figure 2. Comparing environmental DNA (eDNA) and the list of Aquarium.

■ Detectoion □ Non-detection

*Water tank : Observed in the water tan **eDNA : Detected by eDNA	1st.		2nd.		3rd.	
	*Water Tank	**eDNA	Water Tank	eDNA	Water Tank	eDNA
<i>Lepomis macrochirus</i>	■	■	□	□	□	□
<i>Micropterus salmoides</i>	■	■	□	□	□	□
<i>Siniperca scherzeri</i>	■	□	□	□	□	□
<i>Odontobutis interrupta</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Odontobutis platycephala</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Rhinogobius brunneus</i>	□	□	■	■	■	■
<i>Tridentiger obscurus</i>	□	□	■	■	■	■
<i>Gymnogobius urotaenia</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Coreoperca herzi</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Tachysurus fulvidraco</i>	□	□	■	■	■	■
<i>Pseudobagrus emarginatus</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Pseudobagrus koreanus</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Pseudobagrus brevicorpus</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Liobagrus andersoni</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Liobagrus mediadiposalis</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Plecoglossus altivelis</i>	■	■	□	□	□	□
<i>Oncorhynchus masou</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Acheilognathus macropterus</i>	■	■	□	□	□	□
<i>Tanakia koreensis</i>	■	■	■	■	□	□
<i>Acheilognathus rhombeus</i>	□	□	■	■	■	■
<i>Acheilognathus intermedia</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Rhodeus uyekei</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Rhodeus ocellatus</i>	■	■	□	□	□	□
<i>Zacco platypus</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Hemiculter eigenmanni</i>	■	□	□	□	□	□
<i>Sarcocheilichthys wakiyae</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Pseudorasbora parva</i>	□	□	■	■	■	■
<i>Hemibarbus longirostris</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Sarcocheilichthys nigripinnis</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Gnathopogon strigatus</i>	□	□	□	□	■	■
<i>Acheilognathus yamatsutae</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Squalidus multimaculatus</i>	□	□	■	■	■	■
<i>Cyprinus carpio</i>	□	□	■	■	■	■
<i>Hemibarbus maculatus</i>	□	□	□	□	□	□
<i>Coreoleuciscus splendidus</i>	□	□	□	□	□	□
<i>Carassius carassius</i>	■	■	■	■	■	■
<i>Phoxinus oxycephalus</i>	□	□	■	■	■	■
<i>Acheilognathus signifer</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Pseudogobio esocinus</i>	□	□	□	□	■	■
<i>Rhodeus notatus</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Pungtungia herzi</i>	□	□	■	■	■	■
<i>Hemibarbus labeo</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Squalidus gracilis</i>	□	□	■	■	■	■
<i>Carassius auratus</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Phoxinus keumkang</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Erythroculter erythropterus</i>	■	□	□	□	□	□
<i>Pseudopungtungia nigra</i>	□	□	■	■	□	□
<i>Nipponocypris temminckii</i>	□	□	□	□	■	■
<i>Acipenser brevirostrum</i>	□	□	□	□	□	□
<i>Pungitius kaibarae</i>	□	□	■	■	□	□

Figure 3. Comparing environmental DNA (eDNA) and the list of Aquarium.

3) 국내 도시 하천에 서식하는 민물고기 종 중심의 반복 실험

2019년 10월 10일 DNA 환경조사는 국내 도시 하천 서식 민물어종 중심의 반복 실험을 통해 종 탐지의 정확성을 확인하였다. 도시하천은 인구밀집도가 가장 높은 수도권 인근 하천을 중심으로 한정하였다. 총 3목 3과 18종의 어종이 담긴 수조로부터 각각 채수하여 4개의 시료를 구성하여 환경 DNA를 분석하였다. 그 결과 꼭져구(*Gymnogobius urotaenia*)와 줄물개(*Gnathopogon strigatus*)를 제외한 총 3목 3과 16종이 검출되어 88.89%의 검출률을 보였다(Table 5). 꼭져구(*Gymnogobius urotaenia*)는 앞선 2차 실험(Table 4)에는 검출되었으나 3차 실험(Table 5)에서는 검출되지 않았다. 이는 수조의 물 속에 해당 DNA가 균질하게 분포하지 않아 채수의 위치, 개소에 따라 시료 내 DNA의 확보 여부가 달랐기 때문으로 사료된다. 또한 환경 DNA 증폭 시 활용된 프라이머가 종 분류할 때 해상도가 떨어져서 누락되는 등에 의해서 오차가 발생된 것으로 추정된다. 줄물개(*Gnathopogon strigatus*)는 MiFish 종 목록에는 있었으나 검출되지 않았는데, 이는 떡밥줄갱이(*Rhodeus notatus*)와 같이 고유의 염기서열이 기존 생물종 목록 내 기재된 서열과 일치하지 않거나, 시료 내 DNA의 확보가 어려웠던 것으로 추정된다.

3. 환경 DNA 기술의 오차 발생 가능성 요인

1) 국제 생물종 유전자 정보를 이용한 매칭

본 연구는 세계 및 일본 어종을 기반으로 한 MiFish pipeline에서 기 구축되어 있는 어종의 Database를 활용하였다. 이에 따라 외국에서 서식하지 않거나 유전적 거리가 먼 국내 자생종의 경우 그 종으로 정확히 매칭, 할당되지 못할 수 있다. 본 연구에서 검출되지 않은 어종 중 강준치(*Erythroculter erythropterus*)는 환경 DNA 분석 후 매칭된 MiFish pipeline 내 생물종 유전자 정보에 존재하지 않았다. 또한 검출되지 않은 동사리(*Odontobutis platycephala*)와 달리 근연종인 얼룩동사리(*Odontobutis interrupta*)는 검출되었다는 점과 우리나라에서 동일한 종임에도 비단

잉어(*Cyprinus carpio*)와 잉어(*Cyprinus carpio*)로 다양하게 표현하고 있다는 점에서 국제 DB를 그대로 국내에 적용하기에 한계가 있다. 오랜 유전적 고립에 따라 종 내 변이가 큰 경우 DB상에서는 동일한 종명을 사용할지라도 염기서열로는 유의한 차이가 날 수 있다. 따라서 국내 서식종에 대해서는 우리 지역에 맞는 유전적 특성이 DB에 반영되어 있는가를 확인할 필요가 있다. 나아가 국내 생물종 유전자 풀을 구축할 필요가 있다.

2) 채수 샘플링 내 외부요인 영향

본 연구는 랩스케일에서의 제어된 환경이라는 전제로써 수족관의 어종에 대해 실시된 연구이나, 환경 시료 내 미량의 DNA를 증폭하면서 예기치 않았던 외부요인들의 영향이 반영되었을 것으로 생각된다. 수족관 수조의 물은 인근 자연하천인 흑천으로부터 물을 끌어오고 있었으며, 다만 외부에서 유입될 수 있는 바이러스나 질병을 예방하기 위해 여과 및 소독을 실시하고 있었다. 수조 내 물은 에어펌프 및 순환을 통해 반개방계로 운용되고 있었으며, 또한 각 수조에는 어분을 재료로 하는 사료를 정기적으로 투여하고 있었다. 이러한 외부요인들은 각각의 물 시료 내 환경 DNA 분석의 정확도에 영향을 끼칠 것으로 예상된다. 대상 종의 DNA가 수조에 전반적으로 균일하게 분포되어 있지 않아 우리가 채취한 환경시료 내에 포함되지 않았던 부분 역시 향후 샘플링 디자인 시 필히 고려해야 할 사항으로 지적할 수 있다.

IV. 결론

본 연구에서는 환경DNA 메타바코딩 기술을 활용하여 경기도 민물고기생태학습관에서 관리하고 있는 우리나라 담수어종 총 7목 11과 50종 중 7목 11과 45종(90%)을 시료로부터 성공적으로 검출하였다(Figure 2, 3). 검출되지 못한 종은 총 5종으로 치리(*Hemiculter eigenmanni*), 강준치(*Erythroculter erythropterus*), 참중고기(*Sarococheilichthys wakitae*), 떡밥줄갱이(*Rhodeus notatus*), 줄물개(*Gnathopogon strigatus*)이다. 꼭져구(*Gymnogobius urotaenia*)는 2차 실

험에서는 검출되었으나 3차에서는 검출되지 못하였다. 일정하게 검출되지 못한 이유는 채수 및 분석 과정 중 발생된 오류로 보인다. 강준치(*Erythroculter erythropterus*)와 참중고기(*Sarococheilichthys wakitae*)는 기존 MiFish pipeline DB 내 미 기록된 종이었으며, 치리(*Hemiculter eigenmanni*), 떡밥줄갱이(*Rhodeus notatus*), 줄몰개(*Gnathopogon strigatus*)는 염기서열 정보가 불일치하여 누락되었다.

본 실험을 통하여 국내 주요 담수어종에 대해서 기존 MiFish Pipeline DB를 활용하여 종 탐지가 가능함을 확인함과 동시에 발생된 요차들에 의한 한계를 확인하였다.

향후 국내 필드조사에서의 성공적인 환경 DNA 기술 도입을 위해서는 다음과 같은 오차 요인을 개선하여야 할 것으로 보인다. 첫째, 국내 민물고기 어종의 자체 생물종 유전자 정보를 구축, 확인하는 과정을 통해 DB를 보완해야 한다. 고유종 정보를 추가하는 것은 물론, 기존 기재종의 경우에도 활용에 앞서 유전적 거리가 타당한지 점검이 필요하다. 둘째, 주요 종에 대해서는 프라이머를 신규 개발하고 시료채취에서 분석에 이르기까지의 프로토콜을 보완해야 한다. 특히 수생태계 건강성 지표로 활용되는 어류종이나 생태계교란종과 같이 위협요인에 해당하는 종에 대해서는 결과 값을 보완하는 것이 필요하다. 셋째, 하천과 같은 조사현장에서 채수 시에는 유량, 유속 및 하안의 미지형 수문학적 특성에 따라 환경DNA 분석을 통한 종 탐지 결과가 영향 받을 수 있다는 점(Rees et al. 2014)을 고려하여야 한다. 본 연구에서는 랩스케일 제어된 환경을 구현하기 위해 수족관에서 실시하였으므로 비교적 검출률이 높게 나왔을 가능성이 있다. 고찰에서도 언급하였듯이, 샘플링에서부터 분석에 이르는 과정에서 외부요인을 최대한 제어하고 해당 공간에서 충분하고 고른 샘플링을 실시하기 위한 노력이 필요하다.

환경DNA 기술을 활용한 기존 조사방법의 보완과 효율화는 단순히 특정 장소에서 특정 종의 존재 여부를 확인하고 나아가 서식분포 파악, 개체군 크기 추정, 시간에 따른 변동 등으로 확대할 수 있는 기초자료가 될 것으로 중요한 시사점을 가진다.

사사

본 연구는 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원의 환경정책기반공공기술개발사업 지원을 받아 연구되었습니다(과제번호 : 2018000210007).

References

- Alice V, Francois P, Pierre T. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24(2): 110-117.
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4(4): 423-425.
- Ficetola GF, Coissac E, Zundel S, Riaz T, Shehzad W, Bessiere J, Taberlet P, Pompanon F. 2010. An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics* 11(434): 2-8.
- Fukumoto S, Shimaru 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.
- Hopkins GW, Freckleton RP. 2002. Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: implications for conservation. *Animal Conservation* 5: 245-249.
- Kim HM, Kim SY, Park YS, Lee HJ, Kim KT, Kim Y, Kim HJ, Kawk MH, Lim TY, Park C, Song WK. 2020. Review and application of environmental DNA (eDNA) investigation of terrestrial species in urban ecosystem. *The Korea Society of Environmental Restoration Technology* 23(2): 69-89. [Korean Literature]
- Magoč T, Salzberg SL. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve

- genome assemblies. *Bioinformatics* 27(21): 2957-2963.
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, S Araki H, Kondoh M, Iwasaki W. 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(7): p. 3-34.
- Nelson JS. 1994. *Fishes of the world*. 3rd edn Wiley, New York, p. 600.
- Naiman R, Prieur-Richard A, Arthington A, Dudgeon D, Gessner M, Kawabata Z, Knowler D, O'Keefe J, Leveque C, Soto D, Stiassny M, Sullivan C. 2006. Challenges for freshwater biodiversity research : Science plan and implementation strategy. *DIVERSITAS*, Report No. 5. *DIVERSITAS*, Paris, pp. 13-15.
- Rees HC, Maddison BC, Middleditch DJ, Patmore JR, Gough KC. 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology* 51: 1450-1459.
- Song YK, Kim JH, Won SY, Park C. 2019. Possibility in identifying species composition of fish communities using the environmental DNA metabarcoding technique – with the preliminary results at urban ecological streams. *The Korea Society of Environmental Restoration Technology* 22(6): 125-138. [Korean Literature]
- Thomsen PF, Willerslev E. 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity, *Biological Conservation* 183: 4-18.
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z. 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE*. 7(4): e35868(1)-e35868(9).
- Takahara T, Minamoto T, Doi H. 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PloS one*. 8(2): e56584.
- Wheeler Q, Raven P, Wilson E. 2004. Taxonomy: impediment or expedient. *Science* 303: 285.
- 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): 2-11.