

## 도시 내 육상 생물종 모니터링을 위한 환경DNA 리뷰 및 적용\*

김휘문<sup>1)</sup> · 김성열<sup>1)</sup> · 박일수<sup>1)</sup> · 이현정<sup>2)</sup> · 김경태<sup>2)</sup> ·  
김영<sup>2)</sup> · 김혜정<sup>2)</sup> · 곽민호<sup>2)</sup> · 임태양<sup>1)</sup> · 박찬<sup>3)</sup> · 송원경<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 단국대학교 환경원에·조경학과 대학원 학생 · <sup>2)</sup> 단국대학교 환경원에·조경학부 학생 ·  
<sup>3)</sup> 서울시립대학교 조경학과 교수 · <sup>4)</sup> 단국대학교 환경원에·조경학부 교수

## Review and application of environmental DNA (eDNA) investigation of terrestrial species in urban ecosystem\*

**Kim, Whee-Moon<sup>1)</sup> · Kim, Seoung-Yeal<sup>1)</sup> · Park Il-Su<sup>1)</sup> · Lee, Hyun-Jung<sup>2)</sup> ·  
Kim, Kyeong-Tae<sup>2)</sup> · Kim, Young<sup>2)</sup> · Kim, Hye-Joung<sup>2)</sup> · Kwak, Min-Ho<sup>2)</sup> ·  
Lim, Tae-Yang<sup>1)</sup> · Park, Chan<sup>3)</sup> and Song, Won-Kyong<sup>4)</sup>**

<sup>1)</sup> Dept. of Environmental Horticulture and Landscape Architecture, Dankook University, Postgraduate student,  
<sup>2)</sup> School of Environmental Horticulture and Landscape Architecture, Dankook University, Undergraduate student,  
<sup>3)</sup> Dept. of Landscape Architecture, University of Seoul, Professor,  
<sup>4)</sup> School of Environmental Horticulture and Landscape Architecture, Dankook University, Professor.

### ABSTRACT

Scientific trust and quantification of traditional species investigation and results that have been used in ecology for decades has always been a problem and concern for ecologists. Global ecologists have

\* 본 결과물은 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원의 도시생태 건강성 증진 기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다.(2019002760001)

\* 이 연구는 2019년 ICLEE (International Consortium of Landscape and Ecological Engineering) 추계학술대회에서 발표한 것을 발전시켰습니다.

**First author** : Kim, Whee-Moon, Dept. of Environmental Horticulture and Landscape Architecture, Dankook University. Ph.D Student, 119, Dandae-ro, Dongnam-gu, Cheonan-si, Chungnam 330-714, Korea, Tel : +82-41-550-6273, E-mail : 72190301@dankook.ac.kr

**Corresponding author** : Song, Wonkyong, School of Environmental Horticulture and Landscape Architecture, Dankook University. Professor, 119, Dandae-ro, Dongnam-gu, Cheonan-si, Chungnam 330-714, Korea, Tel : +82-41-550-3636, E-mail : wksong@dankook.ac.kr

**Received** : 19 March, 2020. **Revised** : 23 April, 2020. **Accepted** : 23 April, 2020.

proposed DNA-based species investigation studies to find answers to problems. In this study, we reviewed the global trend of research on environmental DNA(eDNA), which is a method for monitoring species by detecting DNA of organisms naturally mixed in environmental samples such as water, soil, and feces. The first eDNA research confirmed the possibility of species investigation at the molecular level, and commercialization of NGS(Next Generation Sequencing) and DNA metabarcoding elicits efficient and quantitative species investigation results, and eDNA research is increasing in the field of ecology. In this study, mammals and birds were detected using MiMammal universal primers from 23 samples(3 natural reserves; 20 water bowls) out of 4 patches to verify eDNA for urban ecosystems in Suwon, and eDNA was verified by performing camera trapping and field survey. Most terrestrial species were detected through eDNA, and particularly, mice(*Mus musculus*), and Vinous-throated Parrotbill (*Sinosuthora webbiana*) were identified only with eDNA, It has been confirmed to be highly effective by investigating techniques for small and internal species. However, due to the lack of resolution of the primer, weasels(*Mustela sibirica*) and squirrels(*Melanochromis auratus*) were not detected, and it was confirmed that the traditional investigation method was effective only for a few species, such as *Mogera robusta*(*Mogera robusta*). Therefore, it is judged that the effects of species investigation can be maximized only when eDNA is combined with traditional field survey and Camera trapping to complement each other.

**Key words :** DNA Metabarcoding, PCR(Polymerase chain reaction), Camera trapping, OTU(Operational Taxonomic Unit), MiMammal, NGS(Next Generation Sequencing), Suwon city

## I. 서 론

도시생태계는 인간의 편리함과 이익을 위한 물리적 개발과 교란으로 기존 생물종의 서식처와 먹이사슬이 붕괴 등과 같은 생태계의 균형과 질서가 흔들리게 되었다(Levine *et al.*, 2003; Poggieter *et al.*, 2017). 이처럼 도시 생물종은 지속적으로 직·간접적인 인간의 영향을 받고 있어 생물다양성의 건강성 확보가 우려되며, 보전을 위한 꾸준한 관리가 필요하다(Stokes *et al.*, 2006). 도시 생물종의 생태적 온전성을 보전하기 위해서는 도시 생태계의 특수성을 반드시 이해하여야 하며, 특히 환경변화에 민감한 생태계 내 주요 종 등의 생물 자원에 대한 현황을 정확히 파악할 필요가 있다. 국가 및 지자체에서는 도시생태현황지도, 환경영향평가, 전국자연환경조사와 같은 제도를 통해 생

물자원 DB를 주기적으로 구축하여 도시계획 및 환경보전 계획에 활용하고 있다(NIER, 2015; Ministry of Environment, 2017).

그러나, 1986년 환경부 및 국립환경과학원에서 시작된 전국 규모의 자연환경조사 이래로 국내에도 다양한 분류군에 대한 생물자원 DB가 축적되고 있으나, 아직까지 전통적인 조사 기술이 주로 활용되고 있는 것이 현실이다(Ministry of Environment, 2012). 이제껏 활용된 전통적인 생물종 모니터링의 기술과 결과는 연구 및 정책에 활용되기까지 다양한 현실적인 제약이 따르는데, 대표적으로 조사를 위해 분류군별 전문가를 필수적으로 동반해야 함은 물론이고, 전문가 개인 역량에 따라 모니터링 결과의 차이가 매우 다를 수 있다. 또한 종에 따라 계절별 모니터링이 필수적으로 수반되므로 조사 기간이 매우 길

수밖에 없으며, 그 외에도 연구자가 직접 현장에서 생물종을 포획 및 채집하는 경우 불가피하게 생태계에 교란이 발생할 수 있으며, 조사 과정에서도 연구자가 안전을 보장받지 못하는 것도 결코 적지 않은 문제이다. 마지막으로 복잡하고 빠르게 변화하는 도시생태계 특수성이 고려되지 않은 채, 일반적인 종 조사 지침을 따라 진행하기 때문에 도시생태계 내 생물상을 정확히 반영하기는 어려운 현실이다. 이처럼 도시생태계에서 전통적인 생물자원의 조사 기술은 비용적·시간적 한계를 가질 뿐만 아니라, 조사 결과에 대한 표준화와 과학적 신뢰성 보장이 어렵기에, 이를 보완할 수 있는 다차원적인 시각으로 모니터링 기술에 대한 검토가 필요한 시점이다.

최근 생물다양성협약(CBD) 및 국내·외 생태학자들은 생물자원의 효율적인 조사와 과학적인 모니터링 결과를 확보하기 위해 분자생물학(Molecular biology) 분야의 DNA(Deoxyribonucleic Acid) 기반 생물종 조사 기법을 적극 권장하고 있다(Krishnamurthy and Francis, 2012). DNA 기반 생물종 모니터링 기술은 지구 대부분 존재하는 생물체가 DNA 분자를 보유하고 있으며(Watson and Crick, 1953), 중간 유전적 거리(Genetic distance)가 일반적으로 같은 분류군, 같은 종끼리 가깝고 다른 종, 분류군 간에 차이가 크다는 분자생물학의 일반적이고 기초적인 이론에서 시작됐다(Herbert *et al.*, 2003). 나아가 유기체가 자연 환경에 흘리는 털이나 각질, 배변 등이 유역처럼 모이는 물이나 토양에서 시료를 채취하고, DNA를 추출하여 생태계를 구성하는 생물종을 확인하려는 연구가 시도되었다(Taberlet *et al.*, 2012a). 이는 환경DNA(eDNA; Environmental DNA)라는 개념으로 점차 구체화 되었으며, 분자생태학(Molecular ecology) 분야의 응용 학문을 급속도로 발전시켰다(Kelly, 2016).

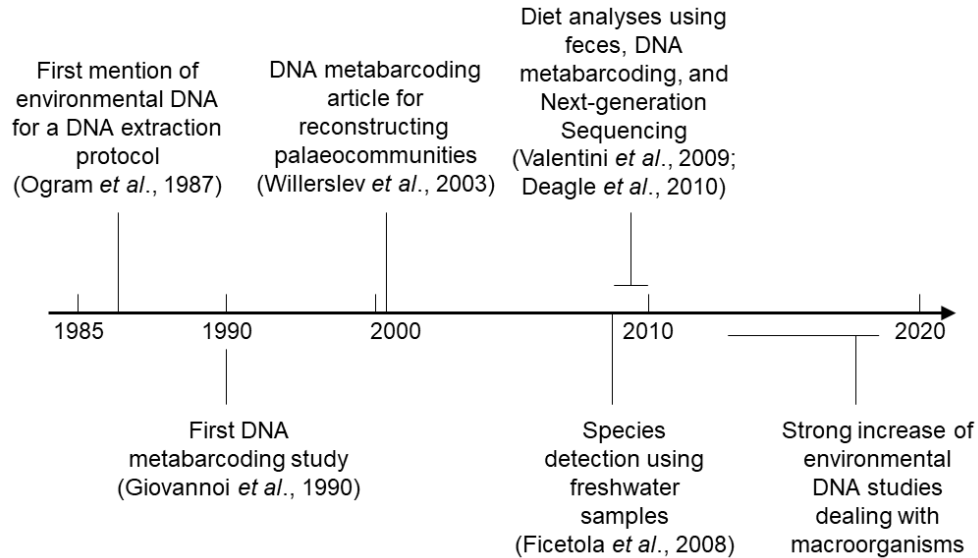
그럼에도 불구하고 생태학자들이 eDNA 기술을 생물종 군집 조사에 접목하기 쉽지 않았는데, eDNA의 전반적인 연구 과정이 생태계 연구

에서 기본적인 이해가 요구되는 경관생태학, 보전생물학 및 환경계획 분야와 함께 DNA 분자, 그리고 DNA 중합효소를 이용해 DNA 서열을 증폭하는 중합효소 연쇄반응(PCR; Polymerase chain reaction) 기술과 같은 전반적인 분자생물학에 대한 이해도가 필요했기 때문이었다(Mullis and Faloona, 1987). 나아가 수십-수백만 길이의 염기쌍(bp; base pair)으로 증폭된 염기서열 정보를 토대로 수십만종 이상, 수백만개 이상의 염기서열 DB가 등록된 라이브러리에서 검색하고, 최종적으로 목표종을 검출하는 생물정보학(Bioinformatics) 분야를 거쳐야만 일련의 eDNA 실험이 완료되었다(Ruppert and Kline., 2019). 이처럼 생태학, 분자생물학, 생물정보학으로 이어지는 eDNA의 융합 연구 프로세스는 생태학자들에게 미지의 영역이었으나, 이제는 전 세계적으로 생태학자와 환경을 관리하는 사람들에게 eDNA는 생물자원 조사 분야에서 핵심 요소가 되고 있는 것이 현대적 흐름임에는 분명하다(Taberlet *et al.*, 2018).

따라서 본 연구는 eDNA가 발전해온 연구의 시대적 흐름을 살펴보고, 생태학 분야에 활용된 국내·외 eDNA 연구들을 고찰하고자 하였다. 나아가 국내 도시생태계에서 eDNA 메타바코딩(metabarcoding) 기술을 포유류와 조류와 같은 육상 종 검출에 직접 적용하고 현장 조사 및 카메라 트래핑을 통해 교차 검증해봄으로써, 장기적으로 eDNA가 도시생태계 생물자원 모니터링에 활용 및 보완될 수 있는 방안을 모색하고자 진행되었다.

## II. 환경DNA의 연구 동향

eDNA는 토양, 물, 심지어 배설물과 같은 환경 시료에서 발견되는 다양한 유기체들의 혼합된 게놈 DNA(Genomic DNA)를 의미한다(Taberlet *et al.*, 2012a). 최초의 eDNA 연구는 Ogram *et al.*(1987)이 퇴적물에서 발견한 DNA에 대한 추출



**Figure 1.** Overview of the emergence of eDNA studies (Tarberlet *et al.*, 2018; modified)

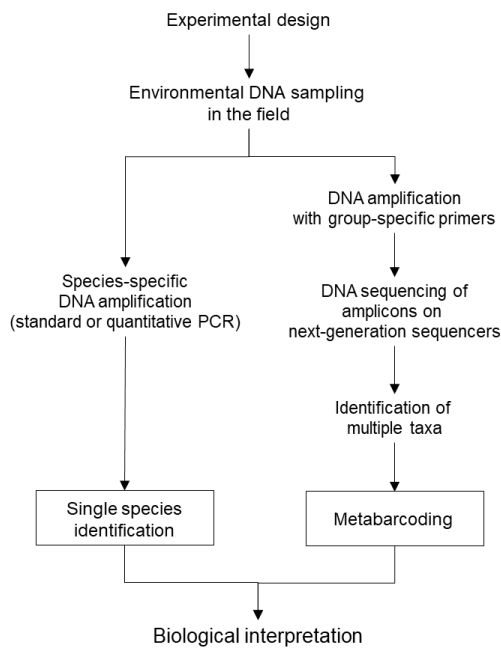
프로토콜을 제안하면서 시작하였다(Figure 1). 최초의 eDNA 연구 3년 이후, 차세대 염기서열 분석(NGS; Next Generation Sequencing)을 이용한 최초의 eDNA 메타바코딩 연구가 보고되었으나 (Giovannoi *et al.*, 1990), PCR에 비해 상대적으로 높은 비용과 하나의 시료에서 여러 종을 추출하는 범용 프라이머의 부재 및 eDNA 분석 한계 등으로 인해 eDNA 메타바코딩 연구는 10여년간 지연되었다. 이후 Willerslev *et al.*(2003)에 의해 eDNA 메타바코딩을 활용한 고생물 군집 분류 및 분석으로 연구가 재개되었으며, Ficetola *et al.*(2008)이 습지 시료 내 DNA 추출 및 PCR을 통해 황소개구리(*Rana catesbeiana*)의 검출 유무를 확인하면서, 생태계 내 생물종 조사로서 eDNA 연구가 최초로 보고되었다. 이후 Valentini *et al.*(2009), Deagle *et al.*(2010)은 종의 배설물을 환경 시료로 활용하여 eDNA 메타바코딩을 통한 종의 먹이원을 분석하는 연구를 진행하였으며, 이렇듯 최근에는 eDNA를 활용해 미생물을 분류하는 것을 넘어, 어류를 비롯한 포유류, 조류 등 거대 생물종을 검출하기 위한 프라이머 개발 및 모니터링 연구가 꾸준히 증가함이 확인되고 있다(Oskam *et al.* 2010;

Miya *et al.*, 2015; Ushio *et al.* 2016).

### 1. 표적 PCR(Quantitative PCR; qPCR)

eDNA 기술을 통해 종을 식별하기 위해서는 분자생물학의 기본 개념인 PCR 기술에 기초한 두 가지 접근 방식이 고려되고 있다(Figure 2; Saiki *et al.*, 1985; Mullis and Faloona 1987). 먼저 멸종위 기종, 외래종, 복원 목표종 등 단일종의 존재 유무를 검출하기 위한 것이 목적인 경우(Bergman *et al.*, 2015; Evans *et al.*, 2016; Minamoto *et al.*, 2017), 200~600bp 정도 길이를 증폭할 수 있는 종 특이적 마커(Species specific marker)와 같은 프라이머 개발을 통해 단일 종을 검출할 수 있는 표적 PCR(qPCR; Quantitative PCR) 기술이 활용되었다(Logan *et al.*, 2009; MacDonald and Sarre, 2017). qPCR 기술은 다양한 종을 한 번에 검출할 수 없는 한계가 있으나, 시간과 비용이 요구되는 NGS 기술이 생략될 수 있어 경제적인 측면에서 복원 및 생태학 분야에서도 적극 활용되고 있다. 대표적으로 Hempel *et al.*(2019)에 의해 하천 복원 공사에도 qPCR이 직접적으로 활용되었는데, 복원 직후 하류에 솜뎀이과인 *Cottus rhenanus*를 방생하

고, 하천 상·하류에 걸친 14곳에서 1년간 물 시료를 채취하여, 미토콘드리아 12s rRNA 유전자를 표적으로 하는 프라이머를 활용해 목표종의 DNA 검출을 성공적으로 진행했다. 이처럼 생태학에서 활용된 eDNA 연구는 시료 채취가 용이한 수생태계에서 단일 어류종을 검출하는 목적으로 주로 활용되기 시작하였다.



**Figure 2.** Process in detecting species and communities through eDNA

## 2. 차세대 염기서열 분석(NGS: Next Generation Sequencing)

두 번째로 차세대 염기서열 분석이 기술의 개발됨에 따라, 대규모 병렬 염기서열(Massive Parallel Sequencing) 분석이 가능해져(Brenner *et al.*, 2000; Margulies *et al.*, 2005), 하나의 시료에서 100종 이상이 검출 가능한 eDNA 메타바코딩(eDNA metabarcoding) 기술의 활용도가 높아지고 있다(Pompanon *et al.*, 2011; Riaz *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2017). eDNA 메타바코딩 기술은 이론적으로 기존 PCR 기술보다 분석

시간을 극적으로 감소시키는 매우 효과적인 장점이 있었으나, 초기에는 PCR보다 훨씬 높은 분석 비용과 모든 종의 염기서열을 증폭할 수 있는 그룹 특이적 마커(Group-specific marker)와 같은 범용적 프라이머(Universal primer)의 개발 부재로 DNA 메타바코딩 연구가 지연되었다. 그러나 고비용의 NGS 분석이 Illumina사의 HiSeq, Miseq, NextSeq 등과 Thermo Fisher사의 Ion GeneStudio 시리즈 등 여러 회사들의 다양한 플랫폼 마련됨에 따라 상용화가 이루어져 누구든지 eDNA 연구를 시도하고 접근할 수 있는 발판이 마련되었다(Shendure and Ji, 2008).

마찬가지로 여러 분류학적 그룹을 증폭하고 여러 종을 검출할 수 있는 범용적 프라이머 개발도 생태학 분야에서 eDNA 연구를 증가시켰다(Drummond *et al.*, 2015). 대표적으로 Miya *et al.*(2015)는 12S rRNA 163-185bp 구간을 표적으로 하여 어류 880여종을 식별할 수 있는 유니버설 프라이머인 MiFish를 개발하였으며, 최근에는 Web기반의 MiFish Pipeline을 이용할 수 있어 쉽고 무료로 eDNA 메타바코딩 기술을 통해 어류 종을 검출할 수 있게 되었다(Table 1; Sato *et al.*, 2018). 이후 전 세계적으로 MiFish 및 기타 범용 프라이머를 활용한 어류 군집 모니터링이 진행되었으며(Schmidt and McDougall, 2018; Closek *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019), 국내에서도 최근 MiFish 어류 범용 프라이머를 활용하여 황구지천의 어류 생물상에 대한 군집 모니터링한 연구가 발표되었다(Song *et al.*, 2019).

어류에 비해 육상 생물종 eDNA 메타바코딩에 대한 연구가 늘 부족한 상황이다. 그러나 육상 생물종 역시 생존을 위해 물과 필수적으로 접촉하므로 하천, 저수지, 자연형 웅덩이와 같은 곳에서 육상 생물종의 DNA가 수집될 수 있음이 제안되고 확인되었다(Rodgers and Mock, 2015). Riaz *et al.*(2011)은 척추동물(Vertebrates)과 양서류(Amphibians), 파충류(Reptiles) 모니터링을 위해 12S rRNA (73-110bp)를 표적으로 하는 12SV5F-R 프라이머

**Table 1.** Primers proposed to detect species from fish and terrestrial animals

Taxa	Example citation	Primer pair	Region amplified
Fish	Miya <i>et al.</i> 2015	Mifish-U/E	12S rRNA (163-185bp)
Vertebrates Amphibians Reptiles	Riaz <i>et al.</i> 2011	12SV5F (TAGAACAGGCTCCTCTAG) 12SV5R (TTAGATACCCACTATGC)	12S rRNA (73-110bp)
Birds	Haile <i>et al.</i> 2007	12Se (CCCACCTAGAGGAGCCTGTTC) 12Sh (CCTTGACCTGTCTTGTTAGC)	12S rRNA (~125bp)
	Oskam <i>et al.</i> 2010	12sf5 (CTAACAAGACAGGTCAAGGTAT) 12sr4 (CCTATTTTACTGCTAAATCCG)	
		12sa (CTGGGATTAGATACCCACTAT) 12sh (CCTTGACCTGTCTTGTTAGC)	12S rRNA (~250bp)
	Patel <i>et al.</i> 2010	COI primers	COI (130-328bp)
Mammals	Andersen <i>et al.</i> 2012	16S A&M Fv2 69 (CCCCGAAACCAGACGAGCTA) 16S A&M Rv2 short (TCACTATTTGCNACATAGA)	16S rRNA (23-31bp)
	Boessenkool <i>et al.</i> 2012	16Smam1 (CGGTTGGGGTGACCTCGGA) 16Smam2 (GCTGTTATCCCTAGGGTAACT)	16S rRNA (~120bp)
	Ushio <i>et al.</i> 2016	MiMammal F (GGGTTGGTAAATTCGTGCCAGC) MiMammal R (CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG)	12S rRNA (~170bp)
	Leempoel <i>et al.</i> 2020	M12S primers M16S primers	12S rRNA (~210bp) 16S rRNA (~70bp)

를 설계하였으며, Haile *et al.*(2007)은 조류 분류군을 검출하기 위해 12S rRNA(~125bp)를 표적으로 하는 12Se-h 프라이머를 제안하였다. Oskam *et al.*(2010)은 조류 분류군 검출을 위해 12S rRNA(~125bp)를 표적으로 하는 12sf5-r4 프라이머와 12S rRNA(~250bp)를 표적으로 하는 12sa-h 프라이머 2가지를 설계하였다. Patel *et al.*(2010)은 조류 검출을 위해 rRNA가 아닌 단백질 암호 유전자인 COI(130-328bp)를 표적으로 하는 COI 프라이머를 제시하기도 하였다. 포유류 검출을 위해서도 다양한 프라이머가 제시되었는데, Andersen *et al.*(2012)은 16S rRNA(23-31bp)의 짧은 구간을 표적으로 하는 16S A&M Fv2 69-Rv2 short 프라이머를 설계하였으며, Boessenkool *et al.*(2012) 역시

포유류 검출을 위해 16S rRNA(~120bp)를 표적으로 하는 16Smam1-2 프라이머를 제안하였다. Ushio *et al.*(2017)은 MiFish 어류 범용 프라이머를 수정·보완하여, 12S rRNA(~170bp)를 표적으로 하는 포유류 프라이머인 MiMammal을 설계하여 수조 및 자연 상태의 물 시료에서 포유류 모니터링을 확인하였다.

다양한 유니버설 프라이머 개발과 함께 최근 eDNA 메타바코딩을 이용하여 육상 생물종 모니터링을 진행한 연구도 많이 제안되고 있다. Haper *et al.*(2019)는 우리 안 포유류들의 거주 형태(반수생, 지상, 수목)에 따른 eDNA 리드 수의 차이를 확인하였으며, 카메라 트래핑(camera trapping)을 통해 포유류가 물을 활용하는 방법

(식수, 수영, 배설, 굶기, 달리기, 소리내기 등)을 관찰하고 eDNA 리드 수에 미치는 영향을 확인 하였으나 거주형태, 물의 이용 행태 등은 eDNA 리드 수에 통계적인 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. Leempoel *et al.*(2020)은 포유류에 대한 조사를 1,132일간 카메라 트래핑과 총 100 개의 토양 시료에서 eDNA 실험을 비교하였으며, 16S rRNA (~70bp)와 12S rRNA(~210bp) 두 가지 메타 바코드를 적용하여 프라이머 간 검출 결과를 비교하였다. 카메라와 eDNA 조사 결과 간 상당한 불일치를 확인하였으며, 특히 소형종의 경우 대부분 eDNA에서만 검출이 확인되었다. 프라이머 간 차이는 대부분의 포유류가 과(Family) 수준에서 16S, 12S rRNA 구간이 거의 일치하였으나, 종(Species) 수준에서 분류학적 해상도(Taxonomic resolution)는 12s rRNA가 16S rRNA보다 높아 육상종 모니터링 시 효율적인 eDNA 조사 방법론을 제안하였다.

이처럼 PCR 및 메타바코딩 등을 활용한 eDNA 기술이 다양한 분류군에 대한 조사에서 활용성이 인정받고 있음이 확인되고 있다. 그러나 아직까지 대부분의 eDNA 연구 사례는 자연 생태계 생물종 조사에서 진행되었으며 인간과 밀접한 관련이 있는 도시생태계에서 적용 사례는 미미한 한계가 있다. 그나마, 도시 하천에서 어류종이나 연체동물에 대한 목표종, 침입종 등

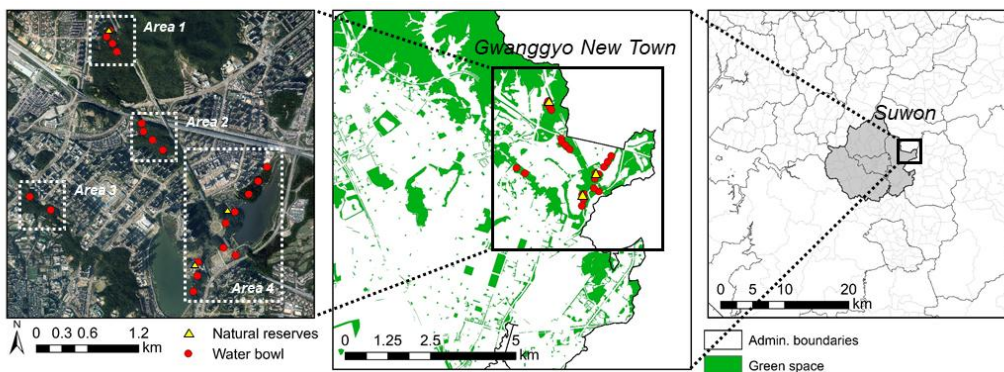
의 검출을 위한 eDNA 연구가 실시되었으나 (Clusa *et al.*, 2017; Hempel *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2019), 이마저도 파편화된 패치가 다양하고 교란이 우려되는 도시 육상생태계에 서식하는 생물종에 대한 모니터링한 연구는 거의 전무했다(Staley *et al.*, 2018).

도시생태계 내 파편화된 녹지 및 공원의 패치 들은 경관생태학 관점에서 생물의 이동을 실현시킬 수 있는 거점이나 서식처로서 중요성이 확인되고 있으며(Song *et al.*, 2012), 도시생태계 내 서식하며 생태적 균형을 유지하는 중요한 위치를 갖는 지표종 혹은 외래종을 정량적으로 모니터링하여 DB를 구축할 필요가 있으며, 이제 eDNA를 활용한 도시 육상종 조사 기술은 전통적인 조사 기술을 상호 보완하여 효율적이며 과학적인 연구 및 조사로써 높은 활용가치가 있을 것으로 생각된다.

### III. 국내 적용 및 고찰

#### 1. 연구대상지

검토된 eDNA 기술의 도시 내 육상생태계 적용 가능성 검토를 위해 도시 내 녹지와 수변 지역이 함께 개발된 경기도 수원시 영통구 광교신도시 일대를 연구의 공간적 범위로 선정하였다. 녹지 패치 및 육상 생물종의 이동성을 고려하여



**Figure 3.** Study area. Sample points of 23 (3 Natural reserves; 20 Water bowls) were selected in 4 types of green patch area with physical distance from Gwanggyo new town in Suwon city.

광고호수공원, 해령공원, 광고중앙공원 및 매봉산 일대 등 4개의 녹지 패치 유형에서 DNA 샘플을 채취하였다(Figure 3). 연구대상지는 약 200만 $m^2$ 의 녹지와 육상 생물종의 산림 패치 간 이동을 위한 생태통로 10개소가 구성되어 있으며, 약 50만 $m^2$ 의 원천호수와 신대호수의 수생태계를 포함하고 있어, eDNA를 통해 도시 내 육상 종을 모니터링하기 적합한 대상지로 판단하였다.

## 2. 샘플링 방법

eDNA 시료는 일반적으로 물(Valière and Taberlet, 2000; Civade *et al.*, 2016; Valentini *et al.*, 2016) 혹은 멸균 증류수에 용해된 토양(Taberlet *et al.*, 2012b; Zinger *et al.*, 2016), 침전물(sediment; Giguet-Covex *et al.*, 2014; Pansu *et al.*, 2015), 낙엽층(litter; Yang *et al.*, 2014) 등을 채취하여 게놈 DNA를 추출하는 방법을 거친다. 본 연구에서는 육상 종이 식수나 목욕, 수영 등으로 이용한 물 시료를 수집하여 eDNA 분석을 진행하였다. 현장에서 발견한 3곳의 자연형 웅덩이와 20곳에서 증류수 2L의 인공 수조를 설치하여 총 23곳에서 물 시료를 취득하였다(Figure 3). DNA는 자연 상태 노출된 후 빠르게 분해되기 때문에(Shapiro, 2008; Dejean *et al.*, 2011), DNA 손실을 최소화하고자 인공 수조를 2019년 7월 22일부터 2019년 7월 30일까지 총 8일간만 설치하고 시료를 채취하였다. 샘플 취득 당일 물에 가라앉아 있는 DNA를 효과적으로 채수하고자 멸균 일회용 막대기로 저은 후(Turner *et al.*, 2015), 오염 방지를 위해 멸균 장

갑과 보관팩, 일회용 주사기를 이용하여 흡과 같은 고분자 성분에 의해 여과기에 투석이 안될 때까지 1-2회에 걸쳐 30-60ml를 채수했다. 채수된 시료는 0.45 $\mu m$  필터에 여과하여 냉동 보관하였다(Figure 4). 추가로 자연적으로 발생한 웅덩이 이외에 수조를 설치한 곳에서 동일 기간 무인카메라(HC-801A, Suntekcam)를 함께 설치하여 대상종의 물 접촉 여부를 파악했으며, 2019년 10월 14일과 22일, 이틀에 걸쳐 전체 대상지에서 생물종의 흔적조사 및 목견 등의 현장조사를 병행하였다. 설치된 모니터링 카메라는 야생동물의 움직임이 포착되는 순간 3장의 연속 사진과 10초간 동영상에 함께 촬영되도록 설정하고, 동일 개체의 중복촬영 방지를 위해 모니터링 카메라는 1회 촬영 이후 5분 이내에 다시 촬영을 제한하였다. eDNA 시료 채취 당일 카메라 내 SD 카드를 함께 수집하여 연구실에서 종 동정을 진행하였다.

## 3. eDNA 메타바코딩 분석

수집된 시료는 QIAGEN blood & Tissue kit & EZ column(Qiagen, Germany)를 이용하여 Miya *et al.* (2015)에서 제안한 방식으로 DNA 추출을 진행했다. 이후 23개 샘플에서 추출한 DNA를 증폭하기 위해 쌍으로 된 2개(forward, reverse)의 범용 프라이머인 MiMammal을 사용하여 2단계 PCR을 진행했다. Ushio *et al.*(2017) 연구에서 Miseq 시퀀싱 분석과 low diversity를 개선하기 위해 6개의 랜덤 염기(N)와 결합된 혼합 MiMammal-mix 프라이머를 사용하였으나, 7base부터 다시 동일한 프라이머 서열이 시퀀싱



**Figure 4.** eDNA sampling process. DNA was collected using a water bowl and verified by camera trapping.



되기 때문에 low diversity가 우려되어, 본 연구에서는 MiMammal 프라이머의 랜덤 염기 수를 0부터 3까지 상이하게 프라이머를 수정하여 문제점을 개선하고자 하였다. 또한 표적으로 증폭하고자 하는 구간이 길지 않다고 판단하여 HiSeq 2500(Illumina) 플랫폼에서 시퀀싱하였다.

1차 PCR은 표적 영역을 증폭시키기 위해 진행되었으며, 1차 PCR의 생성물을 정제하여 2차 index PCR의 주형으로 사용하였다. 1차 PCR은 6.0  $\mu$ l의 KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, USA)를 통해 35회 반복 수행되었다. 또한 1차 PCR는 각각 0.36  $\mu$ l씩 MiMammal 프라이머(10  $\mu$ M)과 3.28 ml의 멸균된 증류수, 2  $\mu$ l의 DNA으로 총 12  $\mu$ l로 혼합되어 진행되었으며, DNA 변성을 위해 98  $^{\circ}$ C에서 20초, 어닐링을 위해 65  $^{\circ}$ C 15초, 프라이머 신장을 위해 75  $^{\circ}$ C에서 각각 15초씩 진행을 35회 반복한 후, 동일한 온도에서 5분간 유지시켰으며, 4  $^{\circ}$ C로 보관하였다. 2차 PCR은 6.0  $\mu$ l의 KAPA HiFi HotStart ReadyMix를 통해 12회 반복 진행되었다. 1차 PCR로 생성된 PCR 산물에 각각의 index 프라이머 2.0  $\mu$ l(1.8  $\mu$ M)와 멸균된 증류수 1.0  $\mu$ l, DNA 1.0  $\mu$ l(0.1ng/ $\mu$ l)로 총 12  $\mu$ l로 혼합되어 진행되었다. DNA 변성을 위해 95  $^{\circ}$ C에서 20초, 어닐링을 위해 65  $^{\circ}$ C 15초, 프라이머 신장을 위해 72  $^{\circ}$ C에서 15초간 진행 후, 동일한 온도에서 5분간 유지시켰으며, 4  $^{\circ}$ C로 보관하였다.

HiSeq 판독 결과 도출된 서열 DB의 분류학적 분류를 위해 FASTP(Chen *et al.*, 2018) 프로그램을 이용하여 OTU(Operational Taxonomic Unit) 분석을 진행하였다. 서열 정보에서 어댑터 서열을 제거하였으며, 두 서열 읽기 정보가 겹치는 영역에 대해서 오류 교정(error-correction)을 진행하였다. 각 시료별로 구분된 페어드-엔드(paired-end) 데이터는 FLAHS (Macgoč and Salzberg, 2011)를 사용하여 하나의 서열로 조립하였다. 하나의 조립된 서열의 길이가 100bp 미만인 서열들은 제거하였으며, 얻어진 서열은

CD-HIT-EST 기반의 OTU 분석 프로그램인 CD-HIT-OTU(Li *et al.*, 2012)를 이용하여 시퀀싱 에러로 간주되는 낮은 품질의 서열과 모호한(Ambiguous) 서열, 키메라(Chimera) 서열 등을 제거한 후, 97% 이상의 서열 유사성을 갖는 서열끼리 클러스터링(clustering)하여 종 수준의 OTU를 형성하였다.

각 OTU의 대표 서열은 NCBI NT의 참조 DB에서 BALSTN(Zhang *et al.*, 2000)를 수행하여, 유사성이 가장 높은 분류군의 유기체(organism) 정보로 분류 할당(taxonomic assignment)을 수행하였다. 이 때, NCBI DB에서 매칭된 서열 정보의 최적 유사성을 보여주는 best hit의 query coverage와 매칭된 영역의 identity가 85% 미만이면 분류체계(taxonomy)를 정의하지 않았다. 위의 OTU 정보는 QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology; Caporaso *et al.*, 2010)를 이용하여, 군집 비교 분석을 실시하였다.

#### 4. 분석 결과 및 고찰

23개의 시료에 대해 eDNA 메타바코딩 분석 결과, 8일간 총 20,337,242개의 염기서열 리드 수를 확인하였다. 시퀀스 클러스터링 등 전처리 과정을 거쳐, 시료별로 최소 332개에서 최대 682,669개가 확인되어 총 9,760,935개(평균 : 424,388; 표준편차 : 141,216)가 8일간 수집되었다. 자연형 웅덩이 중 한 곳에서 확인된 서열 수는 332개의 미소량의 리드 수가 확인되어, 시료 채취 및 eDNA 분석 과정에서 오류가 발생한 것으로 해석하였으나, 해당 지점에서도 너구리 서열이 검출되어 분석 결과에서 제외하지는 않았다.

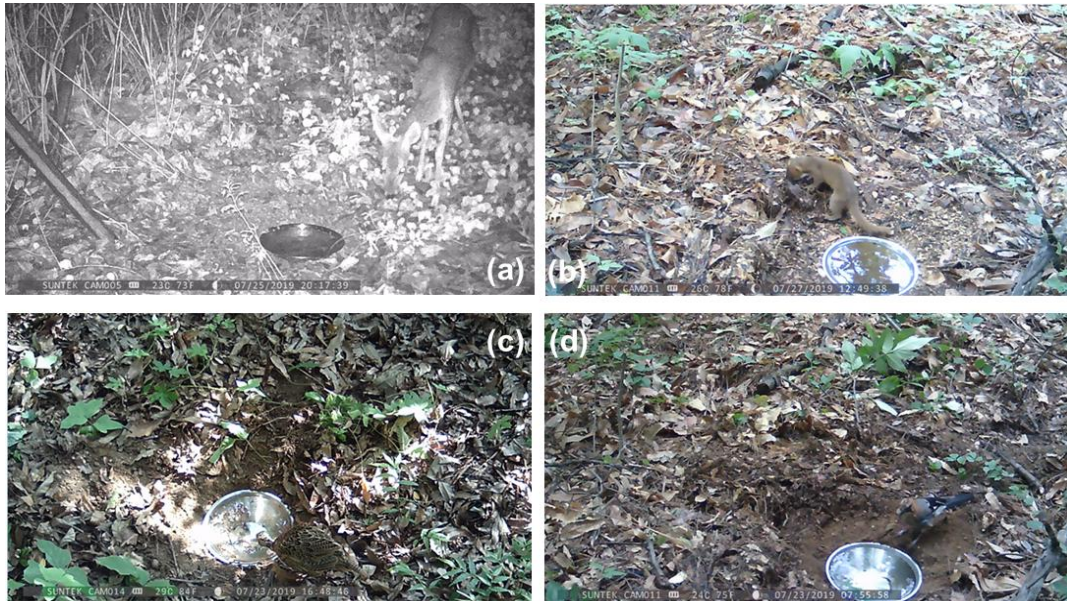
NCBI 라이브러리와 비교하여 분류군 및 종을 도출한 결과, 전체 분류군에서 총 8목 12과 14종이 검출되었다. eDNA 주요 검출 종은 인간(*Homo sapiens*)을 포함해, 개과(*Canidae*), 너구리(*Nyctereutes procyonoides*), 청설모(*Sciurus vulgaris*), 쥐(*Mus musculus*) 등 5종의 포유류가 검출되었으며, 조류는 꿩과(*Phasianidae*), 청둥오리

(*Anas platyrhynchos*), 집비둘기(*Columba livia*), 파랑새(*Eurystomus orientalis*), 여치(*Garrulus glandarius*), 노랑턱멧새(*Emberiza elegans*), 붉은머리오목눈이(*Sinosuthora webbiana*), 까치(*Pica pica*), 직박구리(*Hypsipetes amaurotis*) 등 9종이 검출되었다. 특히 회색늑대(*Canis lupus*) 및 적색야계(*Gallus gallus*)와 같이 국내 미출현종이나 대상지에서 출현이 전무한 종이 검출된 경우, 검출에 활용된 프라이머가 종 수준까지 분류 해상도가 떨어진 것으로 판단하여, 해당 종을 과(Family) 수준에서 분류하였다(Lucek *et al.*, 2019). 따라서 활용한 범용 프라이머가 특정 종에 대해 종 단위까지 해상력을 갖지 못할 경우, 단일종에 대한 qPCR을 추가적으로 활용하여 검출 유무를 검증하는 것이 바람직할 것으로 사료된다. 또한 인간 서열 비율이 전체 검출 서열 가운데 가장 높은 약 12%에 해당하는 수치를 보였으며, 이는 DNA 분자가 매우 민감하여 시료 채취 혹은 실험실 분석 과정에서 오염이 발생한 것으로 판단된다. 해양 및 담수생태계에 비해 육상 생물종의 eDNA 연구 및 오염에 대한 연구는 비교적 검증되지 않았으나, 육상생태계 eDNA 연구에서도 샘플링, DNA 추출, PCR, 시퀀싱 및 데이터 분석과 같은 일련의 eDNA 실험 전 과정에서 인간에 의한 오염은 지속적으로 보고되고 있다. 본 연구처럼 수조를 설치한 상황에서 인간 염기 서열 오염의 비율을 확인한 Ushio *et al.*(2017) 연구에서도 본 연구 결과보다 높은 약 35%의 인간 서열이 검출이 확인된 바 있다. 그 외, 자연 하천 및 토양에서의 인간 서열 발생 비율을 확인한 Ushio *et al.*(2017) 연구에서는 약 62%가 인간 염기 서열이 확인되었으며, Leempoel *et al.*(2020) 연구에서는 100개의 토양 시료에서 타겟 구간이 16S rRNA의 경우 약 49%, 12S rRNA의 경우 약 35%의 높은 인간 염기 서열이 확인되었다. 일반적으로 수조 설치 실험보다 자연환경에서 수집한 시료에서 높은 인간 서열 비율이 나타난 것으로 해석되며, 본 연구에서는 도시생태계 내 수조실험을 통해 시료를 채취하여

인간 서열 오염에 대해 우려가 있었으나, 1주일 간 도시민들의 눈에 띄지 않는 폐쇄적인 대상지에 수조를 설치하였기 때문에 오염 정도가 다른 연구에 비해 높지 않은 것으로 판단되며, 향후 연구에서도 수조 혹은 자연환경에서 채취 여부, 시료 채취 기간, 시료 유형에 따른 인간 서열 오염의 차이를 확인해야 할 필요가 있다.

또한, 인간 서열 오염 이외에도 검출된 종의 결과가 위음성(false negative) 혹은 위양성(false positive) 등이 발생할 수 있음이 보고 되었으며(Ficetola *et al.*, 2016), 이와 같은 오류들을 제어하기 위해서 일반적으로 양성 및 음성 대조군을 함께 설정하여 eDNA 연구 전 단계의 프로세스에서 오염 유무를 확인하는 것과 전기영동 실험이 향후 연구에서 수반되어야 할 것으로 판단된다(Lahoz-Monfort *et al.*, 2016).

시료 유형별로는 인공 수조에서 포유류가 3목 4과 5종, 조류가 5목 8과 9종이 검출되었다. 자연형 웅덩이에서는 포유류가 3목 3과 3종이 확인되었으며, 조류 서열은 미검출된 특징이 있다. 추가로 자연형 웅덩이에는 주변 유역 환경에서 확산된 DNA들이 혼합되어 시료에 5목 7과 10종의 어류 서열이 추가로 검출되었는데, 본 연구에서 활용한 MiMammal 프라이머가 어류 검출을 위한 MiFish 범용 프라이머를 포유류 특이적 변이에 적용, 수정하여 개발된 프라이머로 해당 bp에 겹치는 구간에 한해 어류 혹은 조류의 검출이 가능하기 때문에, 본 연구 결과에 함께 제시하였다. 그러나, 본 연구에서 활용한 프라이머로 포유류와 함께 검출된 조류 및 어류 분류군의 종 탐지 결과는 과학적으로 신뢰할 수 있다고 판단되나, MiMammal 프라이머가 해당 분류군의 전체 종에 대한 해상력을 갖지 못한 한계가 있어, 본 연구 결과가 연구 대상지의 조류 및 어류의 종다양성을 대표할 수는 없을 것으로 사료된다. 따라서 향후 연구에서는 동일 시료 내에서 다양한 분류군을 검출할 수 있도록, 여러 구간의 프라이머들을 함께 활용하여



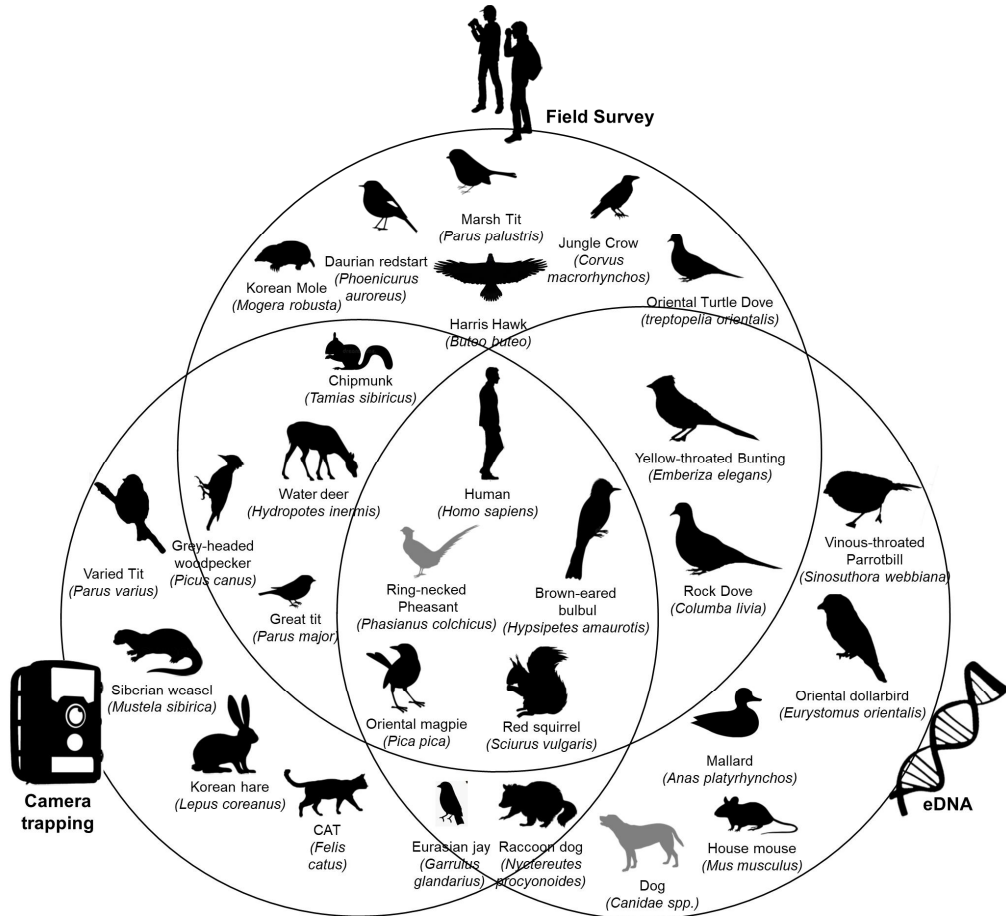
**Figure 5.** Exemplar camera trap photos taken at Water Bowls.  
Water deer(a), Siberian weasel(b), Ring-necked Pheasant(c), Eurasian Jay(d)

종을 검출하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

eDNA 결과를 검증하기 위해 수행된 카메라 트래핑 데이터는 8일간 총 1,268장의 사진 및 영상이 취득되었다. 전체 카메라 이미지에서 연구원이 수동으로 생물종을 직접 식별하였으며, 전체 약 30%인 380여장이 최종 분류되었다. 종별로는 인간을 포함하여, 고라니(*Hydropotes inermis*), 너구리, 족제비(*Mustela sibirica*), 고양이(*Felis silvestris catus*), 청설모, 다람쥐(*Tamias sibiricus*), 멧토끼(*Lepus coreanus*), 까치, 직박구리, 박새(*Parus major*), 곤줄박이(*Parus varius*), 꿩(*Phasianus colchicus*), 어치, 청딱따구리(*Picus canus*) 등으로 포유류는 8종 32개체가 확인되었으며, 조류는 7종 99개체로 확인되었다(Figure 5). 카메라 트래핑으로 종을 관찰한 결과, 포유류보다 조류의 인공 구조 이용이 높은 것으로 확인되었다. eDNA와 카메라 트래핑 결과 중복으로 검출된 종은 약 31%(7종)으로 매우 상이했으며, 이는 Leempoel *et al.*(2020) 연구와 비슷한 결과로 생쥐 등 소형 육상종이나 파랑새, 붉은머리오목눈이와 같이 육안 검토가 어려운 내부

종을 검출할 때 유용한 것으로 확인되었다(Figure 6). 또한 짐비둘기와 같이 도시민 주변에서도 쉽게 관찰되는 종이 카메라 트래핑에서 누락된 경우가 발생하였는데, 이는 카메라가 갖는 기술적인 문제로 적은 움직임으로 인한 미포착하였을 수 있으며, 촬영 직후 동일종 탐지 방지를 위해 5분 촬영이 정지되는데 그 사이 종의 방문 가능성이 있을 것으로 판단된다. 또한 조류의 경우 수목 위, 하늘에 날아다니면서 떨어지는 각질이나 털의 영향을 받았을 수도 있어, 이는 카메라 트래핑 기술을 보완하는 eDNA 조사 기술로 해석된다. 본 연구 결과를 바탕으로 eDNA 조사는 나아가 소형 크기의 멸종위기종 혹은 지표종 등의 탐지 및 보전에도 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 생물종 조사 분야에서 새로운 통찰력과 가능성을 보여준 연구로 사료된다.

물리적 거리로 분류된 4개의 녹지 패치 유형에 따라 eDNA 및 카메라트래핑으로 확인된 종의 출현 차이는 거의 없었으나, 포유류의 경우 다람쥐, 족제비, 멧토끼 등이 한 곳의 패치에서



**Figure 6.** Venn diagram between species recorded by camera trapping, eDNA, and field survey. Only 50% of all species were detected by traditional survey methods such as field survey. Gray-treated species had low primer resolution and detected species at the family level.

만 검출된 특징이 있어, 도시생태계에서 조류에 비해 이동성이 크게 제한된 것으로 확인되나 (Figure 7), 본 연구의 모니터링 기간이 DNA 손실 우려로 인한 1주일로, 한정적이기 때문에 추후 연구 기간 및 횟수를 늘려 장기간 모니터링을 통해 실제 도시 내 육상종이 녹지 패치를 거점 혹은 서식처로서 활용 여부를 파악할 필요가 있다고 판단된다. 나아가 eDNA 및 카메라트래핑 이외에 최근에는 0.3g 이하의 VHF(Very High Frequency; 초단파) 및 GPS 기반의 초소형 추적기의 개발이 진행됨에 따라, 중대형 이외에 소형 종에 대한 개체 단위에서 패치 내 행동권 및 이

동 특성이 규명되고 있으며(Kim *et al.*, 2018; Song, 2020), 무인항공기(Unmanned Aerial Vehicle; UAV) 등을 이용한 개체 분류(Kim *et al.*, 2019) 등 신기술을 접목한 생물종 정보 취득 기술 및 결과에 대한 정량화가 지속적으로 이루어지고 있어, 본 연구에서 도출된 생물종 조사 결과와 함께 종의 출현 및 행동 특성이 종합적으로 고려된다면 도시 생물종에 대한 최적의 관리 전략이 마련될 수 있을 것으로 기대된다.

추가로 대상지 전체 산림에서 육상 생물종에 대한 현장 조사를 수행한 결과, 인간, 고라니, 다람쥐, 청설모를 비롯해 다수의 두더지(*Mogera*

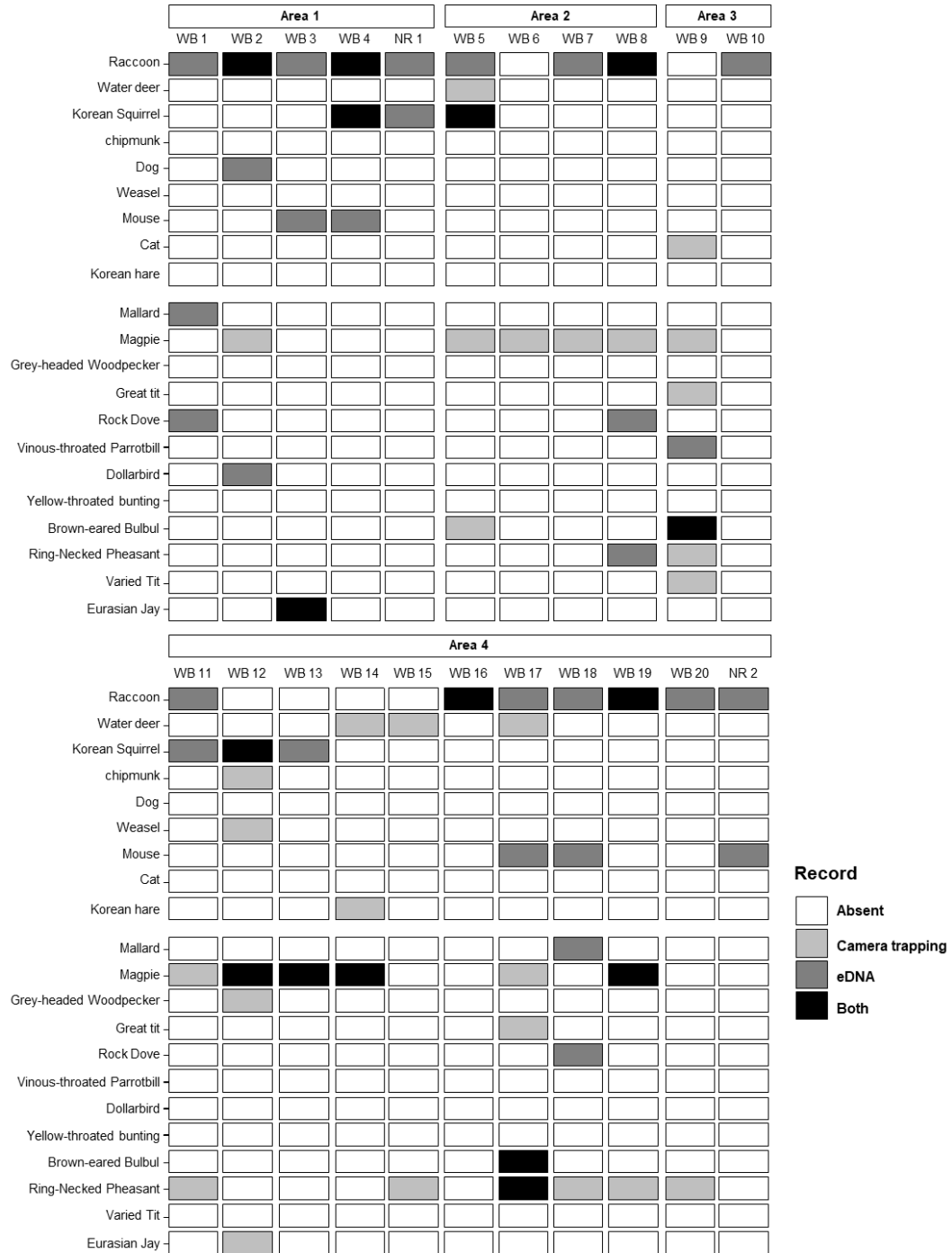
*robusta*) 굴 등의 흔적이 확인되었으며, 조류는 직박구리, 까치, 멧비둘기(*Streptopelia orientalis*), 집비둘기, 말뚝가리(*Buteo buteo*), 꿩, 박새, 쇠박새(*Poecile palustris*), 딱새(*Phoenicurus auroreus*), 큰부리까마귀(*Corvus macrorhynchos*), 노랑턱멧새, 청딱따구리 등 6목 9과 11종을 주로 목견으로 확인하였다. 현장조사 결과, 포유류 가운데 두더지만 새롭게 확인되었는데, 이는 eDNA 혹은 카메라트래핑 조사기법이 포유류의 대부분의 종을 조사할 수 있는 것을 의미하지만, 그럼에도 불구하고, 두더지와 같이 굴에서 주로 생활하거나 그 외 비슷한 생활사를 갖는 종들을 모니터링할 때는 여전히 전통적인 현장 기반의 필드 조사가 가장 효과적임을 보여주는 결과로 해석된다. 조류 역시 땅에 빈번히 착륙하는 종들에 대해서 카메라 트래핑이나 eDNA 기술이 본 연구를 통해 검증되었으나, 주로 수목과 하늘에서 주로 생활하는 조류에 대해서는 목견 등을 통한 조사가 여전히 효과적임이 입증되었으며, 장기적인 관점에서 본 연구가 제시한 생물종 조사 기법들이 상호보완적으로 구축된다면 높은 정확성을 갖은 최적의 조사 결과 데이터를 축적할 수 있을 것으로 기대된다.

그럼에도 불구하고, 고라니, 고양이, 다람쥐, 족제비, 멧토끼, 꿩, 박새, 청딱따구리 등은 카메라 트래핑 결과에서 수조와 직접적인 접촉이 확인되었으나 오히려 해당 종들은 eDNA 결과에서 검출이 미확인되었다(Figure 7). 이와 같은 대표적인 원인으로 국외 연구자들은 시료 채수 과정 중 DNA 분자의 침전 문제로 인한 미채취 혹은 시료 내 DNA의 조기 손상으로 인한 품질 저하로 인한 미검출 등으로 보고되고 있으나, 여전히 eDNA 조기 손상을 지연시키기 위한 최적의 조건에 대한 연구는 아직 미비하다 (Magurran and McGill, 2011; Barnes and Turner, 2016). 높은 여름철의 온·습도는 eDNA 분자가 2주 이상 지속되기 어려운 것이 확인되었으나 (Bithell et al., 2014), 그 이외에 DNA 분자는 물

리적, 화학적, 생물학적 특성의 요인들이 서로 복합적으로 영향을 미치기 때문에 시료 유형과 시료 채취 방법, 분류군 혹은 종에 따라 eDNA 손상에 미치는 영향들이 규명되어야 할 필요가 있다. 또한 본 연구에서 활용한 MiMammal 프라이머가 국내 육상 종에 대한 해상력 부족으로 인해 몇몇 종을 종 수준에서 분류할 수 없는 한계가 발생하였기 때문에, 우선적으로 국내 생물종에 대한 서열 DB 라이브러리가 반드시 확보되어야 하며, 이를 관독할 수 있는 국내형 생물종 프라이머 개발이 수반되어야 eDNA 기반 생물종 조사의 활용성이 높아질 것으로 판단된다.

결과적으로 본 연구를 통해 제안된 eDNA 연구 기술은 기존의 일반적인 생물종 조사 방법의 표준화 및 비용적·시간적 한계를 상당 부분 해소할 수 있음이 증명되었으며, 특히 기존 생물종 조사에서 누락되어 보호 대상에서 제외된 종들에 대한 보전 전략이 가능해질 것으로 판단된다. 그럼에도 불구하고, 여전히 해결되지 못한 eDNA의 기술적인 한계가 있으며 몇몇 분류군 및 종의 생활 특성에 따라 현장 기반의 조사와 카메라 트래핑이 유일하게 갖는 장점도 확인되었다. 따라서 본 연구에서 제안한 eDNA 기술과 함께 현장조사, 카메라트래핑 조사기법이 상호·보완적으로 병행되어야만 가장 효율적이며 과학적인 조사 결과를 도출할 수 있을 것으로 사료된다.

특히 도시생태계는 개발로 인한 급격한 서식처 변화, 인간의 교란, 폐치 단절 등으로 기존 생물종 조사와 차별화되는 다차원적인 조사가 필요했으며, 도시생태계 생물종 조사 분야에서 eDNA 기술의 도입은 내부종 등 육안으로 확인하기 어려운 종 파악 및 하나의 비오톱 및 유역 단위의 종의 분포를 공간적으로 파악할 수 있어 도시 계획, 도시생태현황도 및 보전 지역 설정 등의 기준을 제시할 수 있어 활용 가치가 높을 것으로 사료된다.



**Figure 7.** Tile plot showing species presence-absence at individual Water Bowl(WB) and Nature Reserves(NR) by camera trapping, and eDNA metabarcoding and, both methods. The point where all species were not detected was excluded from the tile plot, and divided into 4 types of green area considering connectivity

## V. 결 론

본 연구는 중 조사 분야에서 세계적으로 활용성이 높아지고 있는 eDNA 기술에 대한 주요 연구 동향을 살펴보고, 국내 도시생태계에 eDNA 기술을 직접 적용하고 검증한 시범적인 연구로서의 의의가 있다. 생태계 중 모니터링 연구에서 최초로 eDNA가 도입된 이래로 주로 수생태계 내 어류 종다양성 탐지를 위한 연구가 실시되었으나, 최근 땅에 사는 육상 생물종 역시 토양 혹은 웅덩이와 같은 환경에 DNA 분자를 남김에 따라 육상 생물종을 eDNA 기술로 검출하고자 하는 노력이 진행되고 있다. 본 연구는 수원시 도시생태계를 대상으로 8일간 축적된 물 시료를 채취하여 eDNA 기술을 적용하여 육상 종을 검출했다. 실험 결과, 대부분의 육상 종이 eDNA로 검출되었으나 아직 프라이머의 해상력 부족 및 eDNA 분석 오류 및 오염 등으로 인해 미검출된 종이 있어, 카메라 트래핑이나 현장조사 등의 조사 방법론이 함께 병행되어야 누락 되는 종 없이 최적의 중 조사 결과를 도출할 수 있을 것으로 해석하였다.

그러나 국내 육상 종에 대한 서열 DB의 구축과 프라이머의 개발 그리고 오염방지 및 샘플링 전략 등 eDNA 연구 프로세스에 대한 표준화가 진행된다면, 가까운 미래에는 eDNA 기술을 이용한 중 조사의 신뢰성을 더 높여 비용과 시간의 한계를 갖는 기존의 중조사 방법의 약점을 해소할 수 있을 것으로 판단된다. 나아가 생태학, 분자생물학, 생물정보학 등의 새로운 융합 기술인 eDNA의 발전은 먼 미래에 조사 현장에서 몇 번의 채수만으로 즉시 생태계를 구성하는 종과 종의 밀도, 종다양성까지도 확인할 수 있지 않을까 기대해본다.

## 감사의 글

eDNA NGS 분석은 마크로젠(Macrogen)과

서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM), 현장조사는 에코앤지오(ECOnGEO)의 도움으로 진행되었습니다.

## References

- Andersen, K · KL Bird · M Rasmussen · J Haile · H Breuning-Madsen · KH Kjaer · L Orlando · MTP Gilbert and E Willerslev. 2012. Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology* 21(8) : 1966-1979.
- Barnes, MA and CR Turnet. 2016. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*. 17 : 1-17.
- Bergmann, GT · JM Craine · MS Robeson 2nd and N Fierer. 2015. Seasonal Shifts in Diet and Gut Microbiota of the American Bison (*Bison bison*). *PLoS One* 10(11) : e0142409.
- Bithell, SL · LTT Tran-Nguyen · MN Hearnden and DM Hartley. 2014. DNA analysis of soil extracts can be used to investigate fine root depth distribution of trees. *AoB Plants*. 7. plu091.
- Boessenkool, S · LS Epp · J Haile · E Bellemain · M Edwards · E Coissac · E Willerslev and C Brochmann. 2012. Blocking Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA. *Molecular Ecology*. 21(8) : 1806-1815.
- Brenner, S · M Johnson · J Bridgham · G Golda · DH Lloyd · D Johnson · S Luo · S McCurdy · M Foy · M Ewan · R Roth · D George · S Eletter · G Albrecht · E Vermaas · SR Williams · K Moon · T Burcham · M Pallas · RB DuBridg e · J Kirchner · K Fearon · J Mao and K

- Corcoran. 2000. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature Biotechnology* 18(6) : 630- 634.
- Caporaso, JG · J Kuczynski · J Stombaugh · K Bittinger · FD Bushman · EK Costello · N Fierer · AG Pěa · JK Goodrich · JI Gordon · GA Huttley · ST Kelley · D Knights · JE Koenig · RE Lay · CA Lozupone · D McDonald · BD Muegge · M Pirrung · J Reeder · PJ Turnbaugh and WA Walters. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 7(5) : 335-336.
- Chen, S · Y Zhou · Y Chen and J gu. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34(17) : i884-i890.
- Civade, R · T Dejean · A Valentini · N Roset · JC Raymond · A Bonin · P Taberlet and D Pont. 2016. Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. *PLoS ONE*. 11(6): e0157366.
- Closek, CJ · JA Santora · HA Starks · ID Schroeder · EA Andruszkiewicz · KM Sakuma · SJ Bograd · EL Hazen · JC Field and AB Boehm. 2019. Marine Vertebrate Biodiversity and Distribution Within the Central California Current Using Environmental DNA (eDNA) Metabarcoding and Ecosystem Surveys. *Front. Mar. Sci*. 6 : 732.
- Clusa, L · L Miralles · A Basanta · C Escot and E García-Vázquez. 2017. eDNA for detection of five highly invasive molluscs. A case study in urban rivers from the Iberian Peninsula. *PLoS ONE* 12(11) : e0188126.
- Degle, BE · A Chiaradia · J McInnes and SN Jarman. 2010. Pyrosequencing faecal DNA to determine diet of little penguins: is what goes in what comes out?. *Conservation Genetics* 11(5) : 2039-2048.
- Dejean, T · A Valentini · A Duparc · S Pellier-Cuit · F Pompanon · P Taberlet and C Miaud. 2011. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS One* 6(8) : e23398.
- Drummond, AJ · RD Newcomb · TR Buckley · D Xie · A Dopheide · BCM Potter · J Heled · HA Ross · S Grosser · D Park · NJ Demetras · MI Stevens · JC Russell · SH Anderson · A Carter and N Nelson. 2015. Evaluating a multigene environmental DNA approach for biodiversity assessment. *Giga-Science*. 4(46) : 1-19.
- Evans, NT · BP Olds and MA Renshaw. 2016. Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 16(1) : 29-41.
- Ficetola, GF · C Miaud · F Pompanon and P Taberlet. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4(4) : 423-425.
- Ficetola, GF · P Taberlet and E Coissac. 2016. How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Molecular Ecology Resources* 16(3) : 604-607.
- Giguët-Covex, C · J Pansu · F Arnaud · PJ Rey · C Griggo · L Gielly · I Domaizon · E Coissac · F David · P Choler · J Poulenard and P Taberlet. 2014. Long livestock farming history and human landscape shaping revealed by lake sediment DNA. *Nature communications*. 5 : 3211.
- Giovannoni, SJ · TB Britschgi · CL Moyer and



- KG Field. 1990 Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345(6270) : 60-63
- Haile, J · R Holdaway · K Oliver · M Bunce · MTP Gilbert · R Nielsen · K Munch · SYW Ho · B Shaprio and E Willerslev. 2007. Ancient DNA chronology within sediment deposits: are paleobiological reconstructions possible and is DNA leaching a factor? *Molecular Biology and Evolution*. 24(4) : 982-989.
- Harper, LR · LL Handley · AI Carpenter · M Ghazali · CD Muri · CJ Macgregor · TW Logan · A Law · T Breithaupt · DS Read · AD McDevitt and B Hänfling. 2019. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biological Conservation* 238 : 108225.
- Hempel, CA · B Peinert · AJ Beermann · V Elbrecht · JN Macher · TH Macher · G Jacobs and F Leese. 2019. Using environmental DNA to monitor the reintroduction success of the Rhine sculpin (*Cottus rhena-nus*) in a restored stream. *PeerJ Preprints* 7:e27574v2.
- Herbert, PD · A Cywinska · SL Ball and JR DeWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270 (1512) : 312-321.
- Kim, KT · Y Kim · HJ Kim · SY Kim · WM Kim and WK Song. 2019. Usage of Waterbirds on the Artificial Floating Islands in Reservoir using UAV. *J. Korean Env. Res. Tech.* 22(5) : 57-67. (in Korean with English summary)
- Kim, SY · WM Kim · WK Song and EJ Hyeong. 2018. Home-range Analysis of Varied Tit (*Parus varius*) in the Post Fledging Period by Using Radio-tracking. *J. Korean Env. Res. Tech.* 21(1) : 95-102. (in Korean with English summary)
- Lahoz-Monfort, JJ · G Guillera-Aroita and R Tingley. 2016. Statistical approaches to account for false-positive errors in environmental DNA samples. *Molecular Ecology Resources* 16(3) : 673-685.
- Leempoel, K · T Hebert and EA Hadly. 2020. A comparison of eDNA to camera trapping for assessment of terrestrial mammal diversity. *Proc. R. Soc. B* 287 : 20192353.
- Levine, JM · M Vilà · CM D'Antonio · JS Dukes · K Grigulis and S Lovorel. 2003. Mechanisms underlying the impacts of exotic plant invasions. *Proc. R. Soc. B.* 270(1517) : 775-781.
- 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.
- Logan, MJ · KJ Edwards and NA Saunders. 2009. Real-time PCR : current technology and applications. Horizon Scientific Press, Norwich, UK.
- Lopes, DM · MD Barba · F Boyer · C Mercier · PJS Filho · LM Heidtmann · D Galiano · BB Kubiak · P Langone · FM Garcias · L Gielly · E Coissac · TRO Freitas and D Taberlet. 2015. DNA metabarcoding diet analysis for species with parapatric vs sympatric distribution: a case study on subterranean rodents. *Heredity* 114(5) : 525-536.
- Lucek, K · A Galli · S Gurten · N Hohmann · A Maccagni · T Patsiou and Y Willi. 2019. Metabarcoding of honey to assess differences in plantpollinator interactions between urban

- and non-urban sites. *Apidologie* 50 : 317-329.
- Kelly, RP. 2016. Making Making environmental DNA count. *Molecular ecology resources* 16(1) : 10-12.
- Krishnamurthy, K and AF Robert. 2012. A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodivers. Conserv.* 21(8) : 1901-1919.
- Kwok, S and R Higuchi. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 339(6221) : 237-238.
- MacDonald, AJ and S Sarre. 2017. A framework for developing and validating taxon-specific primers for specimen identification from environmental DNA. *Molecular Ecology Resources* 17(4) : 708-720.
- Magoč, T and SL, Salzberg. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27(21) : 2957-2963.
- Magurran, AE and BJ McGill. 2011. *Biological diversity-frontiers in measurement and assessment*. Oxford University Press.
- Margulies, M · M Egholm · WE Altman · S Attiya · JS Bader · LA Bembem · J Berka · MS Braverman · YJ Chen · Z Chen · SB Dewell · L Du · JM Fierro · XV Gomes · BC Godwin · W He · S Helgesen · CH Ho · GP Irzyk · SC Jando · MLI Alenquer · TP Jarvie · KB Jirage · JB Kim · JR Knight · JR Lanza · JH Leamon · SM Lefkowitz · M Lei · J Li · KL Lohman · H Lu · VB Makhijani · KE McDade · MP McKenna · EW Myers · E Nickerson · JR Nobile · R Plan · BP Puc · MT Ronan · GT Roth · GJ Sarkis · JF Simons · JW Simpson · M Srinivasan · KR Tartaro · A Tomasz · KA Vogt · GA Volkmer · SH Wang · Y Wang · MP Weinr · P Yu · RF Begley and JM Rothberg. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437(7057) : 376-380.
- Minamoto, T · M Fukuda · KR Katsuhara · A Fujiwara · S Hidaka and S Yamamoto. 2017. Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *PLoS One* 12(2) : e0173073.
- Ministry of Environment. 2012. Fourth National Survey on Natural Environment. (in Korean).
- Ministry of Environment. 2017. Revision of regulations on preparation of environmental impact assessments, etc. (in Korean).
- Miya, M · Y Sato · T Fukunaga · T Sado · JY Poulsen · K Sato · T Minamoto · S Yamamoto · H Yamanaka · H Araki · M Kondoh and W Iwasaki. 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) : 150088.
- Mullis, KB and FA Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155 : 335-350.
- NIER(National Institute of Environmental Research). 2015. Developing guidelines of biotop maps for spatial planning. South Korea. (in Korean with English summary)
- Ogram, A · GS Sayler and T Barkay. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* 7(2-3) : 57-66.
- Oskam, CL · J Haile · E McLay · P Rigby · ME Allentoft · ME Olsen · C Bengtsson · GH Miller · J-L Schwenninger · C Jacomb · R Walter · A Baynes · J Dortch · M Parker-Pearson · MTP Gilbert · RN Holdaway · E

- Willerslev and M Bunce. 2010. Fossil avian eggshell preserves ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B*. 277(1690) : 1991-2000.
- Pansu, J · C Giguët-Covex · GF Ficetola · L Gielly · F Boyer · L Zinger · F Arnaud · J Poulencard · P Taberlet and P Choler. 2015. Reconstructing long-term human impacts on plant communities: an ecological approach based on lake sediment DNA. *Mol. Ecol.* 24(7) : 1485-1498.
- Riaz, T · W Shehzad · A Viari · F Pompanon · P Taberlet and E Coissac. 2011. *ecoPrimers* : inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 39(21) : e145.
- Patel, S · J Waugh · CD Millar and DM Lambert. 2010. Conserved primers for DNA barcoding historical and modern samples from New Zealand and Antarctic birds. *Molecular Ecology Resources* 10(3) : 431-438.
- Pompanon, F · E Coissac and P Taberlet. 2011. Metabarcoding a new way to analyze biodiversity. *Biofutur.* 319(3) : 30-32.
- Potgieter, LJ · M Gaertner · C Kueffer · BMH Larson · SW Livingstone · PJ O'Farrell and DM Richardson. 2017. Alien plants as mediators of ecosystem services and disservices in urban systems: a global review. *Biol Invasions* 19(12) : 3571-3588.
- Riaz, T · W Shehzad · A Viari · F Pompanon · P Taberlet and E Coissac. 2011. *ecoPrimers*: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research* 39(21) : e145.
- Rodger, TW and KE Mock. 2015. Drinking water as a source of environmental DNA for the detection of terrestrial wild life species. *Conservation Genetics Resources.* 7 : 693-696.
- Ruppert, K · RJ Kline. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17: e00547.
- Saiki, RK · S Scharf and F Faloona. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732) : 1350-1354.
- Sales, NG · MB McKenzie · J Drake · LR Harper · SS Browett · I Coscia · OW Wangensteen · C Baillie · E Bryce · DA Dawson · E Ochu · B Hänfling · LL Handley · S Mariani · X Lambin · C Sutherland and AD McDevitt. 2020. Fishing for mammals: Landscape level monitoring of terrestrial and semi aquatic communities using eDNA from riverine systems. *Journal of Applied Ecology.* 57(4) : 707-716.
- Sato, Y · M Miya · T Fukunaga · T Sado and W Iwasaki. 2018. MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding. *Mol. Biol. Evol.* 35(6) : 1553-1555.
- Schmidt, DJ · C McDougall. 2018. Complete mitogenomes of five ecologically diverse Australian freshwater fishes. *Mitochondrial DNA Part B.* 4(1) : 191-193.
- Shapiro, B. 2008. Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA. *Trends Biotechnol.* 26(6) : 285-287.
- Shendure, J and H Ji. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26(10) : 1135-1145.

- Song, WK. 2020. Home Range Analysis of Great Tit (*Parus major*) before and after Fledging in an Urban Park. *J. Korean Env. Res. Tech.* 23(1) : 97-106. (in Korean with English summary)
- Song, WK · EY Kim and DK Lee. 2012. Measuring Connectivity in Heterogenous Landscapes: a Review and Application. *Journal of Environmental Impact Assessment.* 21(3) : 391-407.
- Song, YK · JH Kim · SY Won and C Park. 2019. Possibility in identifying species composition of fish communities using the environmental DNA metabarcoding technique. *J. Korean Env. Res. Tech.* 22(6) : 125-138. (in Korean with English summary)
- Staley, ZR · JD Chuong · SJ Hill · J Grabuski · S Shokralla · M Hajibabaei and TA Edge. 2018. Fecal source tracking and eDNA profiling in an urban creek following an extreme rain event. *Scientific reports* 8(14390) : 1-12.
- Stokes, KE · KP O'Neill · WI Montgomery · JTA Dick · CA Maggs and RA McDonald. 2006. The importance of stakeholder engagement in invasive species management: a cross-jurisdictional perspective in Ireland. *Biodivers Conserv* 15(8) : 2829-2852.
- Taberlet, P · E Coissac · M Hajibabaei and LH Rieseberg. 2012a. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21(8) : 1789-1793.
- Taberlet, P · S Prud'homme · E Campione · J Roy · C Miquel · W Shehzad · L Gielly · D Rioux · P Choler · JC Clément · C Melodellima · F Pompanon and E Coissac. 2012b. Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Mol. Ecol.* 21(8) : 1816-1820.
- Taberlet, P · A Bonin · L Zinger and E Coissac. 2018. Environmental DNA : For Biodiversity Research and Monitoring. Oxford Univ Press.
- Turner, CR · KL Uy · RC Everhart. 2015. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation* 183 : 93-102.
- Ushio, M · H Fukuda · T Inoue · K Makoto · O Kishida · K Sato · K Murata · M Nikaido · T Sado · Y Sato · M Takeshita · W Iwasaki · H Yamanaka · M Kondoh and M Miya. 2017. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Mol. Ecol. Resour.* 17(6) : e63-e75.
- Valentini, A · C Miquel and MA Nawaz. 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Mol. Ecol.* 9(1) : 51-60.
- Valentini, A · P Taberlet · C Miaud · R Civade · J Herder · PF Thomsen · E Bellemain · A Besnard · E Coissac · F Boyer · C Gaboriau d · P Jean · N Poulet · N Roset · GH Copp · P Geniez · D Pont · C Argillier · JM Baudoin · T Peroux · AJ Crivelli · A Olivier · M Acqueberge · M Le Brun · PR Møller · E Willerslev and T Dejean. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 25(4) : 929-942.
- Valière, N and P. Taberlet. 2000. Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Mol. Ecol. Resour.* 9(12) : 2150-2152.
- Watson, JD and FHC Crick. 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356) : 737-738.
- Willerslev, E · AJ Hansen and J Binladen. 2003. Diverse plant and animal genetic records

- from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* 300(5620) : 791-795.
- Yang, C · X Wang · JA Miller · M de Blécourt · Y Ji · C Yang · RD Harrision and DW Yu. 2014. Using metabarcoding to ask if easily collected soil and leaf-litter samples can be used as a general biodiversity indicator. *Ecological Indicators*. 46 : 379-389.
- Zhang, H · S Yoshizawa · W Iwasaki and W Xian. 2019. Seasonal Fish Assemblage Structure Using Environmental DNA in the Yangtze Estuary and Its Adjacent Waters. *Front. Mar. Sci.* 6 : 515.
- 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.
- Zinger, L · J Chave · E Coissac · A Iribar · E Louisanna · S Manzi · V Schilling · H Schimann · G Sommeria-Klein and P Taberlet. 2016. Extracellular DNA extraction is a fast, cheap and reliable alternative for multi-taxa surveys based on soil DNA. *Soil Biology & Biochemistry*. 96 : 16-19.