

PBF방식 금속 3D프린터로 제작된 환경DNA 필터 케이스의 내부 형상이 포집 성능에 미치는 영향

이승민*, 박세현*, 곽인실**, 김형호*, 곽태수*,#

*경상국립대학교 기계공학부, **전남대학교 해양융합학과

Effect of the Internal Shape of eDNA Filter Case made by the PBF method Metal 3D Printer on Water Sampling Performance

Seung-Min Lee*, Se-Hyun Park*, Ihn-Sil Kwak**, Hyoung-Ho Kim*, Tae-Soo Kwak*,#

*School of Mechanical Engineering, Gyeongsang National University

**Department of Ocean Intergrated Science, Chonnam National University

(Received 25 May 2021; received in revised form 05 July 2021; accepted 06 July 2021)

ABSTRACT

This study focuses on designing a filter case using a water pump for application in eDNA filtering systems. Filter cases, channel type and net type were designed based on the flow field and made using a 3D printer for metal. Flow analysis was conducted for each filter case, and the results were consistent with the pressure experiment results. Furthermore, the water sampling performance test showed that the channel-type filter case exhibited a high flow rate and low pressure through the filter. The eDNA extraction experiment showed that the channel type exhibited improved capture ability compared to the net type.

Key Words : Metal 3D Printer(금속3D프린터), eDNA(환경DNA), Filter Case(필터케이스), FEM Analysis(유한요소해석), MCE Membrane Filter(혼합셀룰로오스 에스테르 막 필터)

1. 서 론

환경 DNA(eDNA, Environmental DNA)는 수중, 토양, 대기 중에 존재하는 생물체에서 유래된 DNA를 의미한다^[1,2]. eDNA 분석은 서식처에서 확보된 유기체의 DNA를 추출하여 분석하는 기술로서 다양한 환경에서 서식하는 생물을 모니터링할 수 있는 분석 기술이다. 단일 유기체를 채집하여 단편적인 DNA를 검출하는 기존의 조사 방법은

시간과 비용이 굉장히 많이 소요되는 반면, eDNA 조사 방법은 생물의 종을 더욱 신속하고 정확하게 모니터링하느로서 채집 시간과 비용을 크게 절감할 수 있다. 또한 eDNA 분석은 희귀종 또는 침습성 종의 탐지에 점점 더 많이 사용되고 있으며 eDNA 지속성 연구 및 종 바이오매스, 분포의 추정에도 적용되고 있다. 종래의 조사 방법과 eDNA를 통해 확인한 종의 다양성을 비교한 연구에 따르면, eDNA를 통해 확인된 종의 다양성이 높음이 확인되고 있다^[3,4,5]. 수중에 서식하는 유기체의 eDNA는 채수, 포집, 추출 과정을 거친다. 일정량의 원수를 현장에서 채수하여 실험실에서 진공압

Corresponding Author : tskwak@gnu.ac.kr

Tel: +82-55-772-3317, Fax: +82-55-772-3319

을 이용한 필터링 방식으로 포집하여 eDNA를 추출하고 있어 채수와 별도로 포집과 eDNA 추출이 이루어지고 있다. 이와 같은 방식은 많은 양의 원수를 채수하여 분석실로 이동하는데 시간적, 공간적 제약이 따른다. 조사지에서 채수하고 실험실로 이동하여 필터링하게 되면 채집된 미량의 DNA 분자는 이동 과정에서 효소, 자외선, 온도 등에 의해 점진적으로 분해되므로 DNA 구조의 변성이 일어날 수 있다. 또한 실험실에서 주로 사용하고 있는 진공압을 이용한 필터링 방식은 필터의 막힘 현상에 의해 많은 시간이 소요되고 있다. 펌프를 이용한 eDNA 포집방식은 진공압에 비해 높은 압력을 이용하므로 채수와 포집에 소요되는 시간적 손실을 최소화하고, 채집 현장에서 채수와 동시에 포집할 수 있는 장점이 있다. 또한 DNA 변성을 방지하는 등 시간적, 공간적 제약 없이 eDNA를 효율적으로 포집이 가능하다. 그러나 펌프를 이용한 방식은 포집 과정에서 높은 압력에 의해 필터가 손상될 가능성이 있으므로 유체의 흐름을 방해하지 않고 적절한 압력과 유속을 유지하여 필터의 손상없이 포집하는 기술이 요구된다. 필터의 손상 방지는 유체의 흐름과 압력을 분산시키는 유동 채널을 가지도록 필터 케이스를 설계하여 적용하면 기술적으로 해결할 수 있다.

본 연구에서는 펌프 방식의 eDNA 포집 시스템에 적합한 필터 케이스의 내부 형상 설계 및 유동 해석을 수행하고, 금속 3D프린터로 제작하여 수압 변화와 채수 실험을 수행하였다. 해석 및 실험 결과를 통해 필터 케이스의 내부 형상이 eDNA 포집 성능에 미치는 영향을 평가하였다.

2. 실험 및 해석 방법

2.1 실험방법 및 장치 구성

표준 채수량은 연구 목적에 따라 평균적으로 1L 전후의 물을 필터에 통과시켜 eDNA를 추출하고 있다^[6]. 필터의 공극 크기는 0.2 ~ 0.5um 정도의 필터를 이용하고 있다.

포집이 끝난 여과지는 분리되어 DNA 용해(lysis) 용액에 침지하여 필터에 부착된 DNA를 용출시키는 처리를 거쳐 추출한다. 추출된 eDNA는 특정 종의

유무를 확인할 뿐 만 아니라 포괄적인 군집의 다양성을 규명하는데 이용된다^[7-9]. 펌프 방식의 실험 장치는 채수를 위한 펌프(12V, 7A)와 전원공급을 위한 배터리, 펌프 구동을 위한 컨트롤러(12V, 7A), 포집을 위한 필터케이스 및 MCE(Mixed Cellulose Ester, Pore size 0.45 μm; Diameter 47mm; Advantec, Japan) 멤브레인 필터, 수압 측정을 위한 수압 센서(측정범위: 0~2.5bar)로 구성하였다(Fig. 1). 유동장을 고려하여 설계된 필터 케이스는 유동 해석을 수행하고 3D프린터로 제작하여 실험하였다.

2.2 필터 케이스 설계와 해석

필터 케이스는 좁은 입구로부터 들어오는 유체를 필터 전체에 고르게 전달시켜 필터의 손상을 막고 균일한 샘플 채집에 유리한 형상 설계가 필요하다. 필터 케이스의 입구에는 둠 모양의 공간을 두어 와류가 형성되지 않도록 하고 다수의 채널로 분류하여 채수를 분산시키는 유관 형태의 모델 A와 그물망 모양으로 유체의 유동장을 분산시키는 망상 형태인 모델 B로 각각 설계하고 유동 해석을 수행하였다(Fig. 2). 유동 저항과 유동장을 분석하기 위해 Ansys CFX 모듈을 활용하여 유동 시뮬레이션을 수행하였다. Fig. 3과 같이 입구와

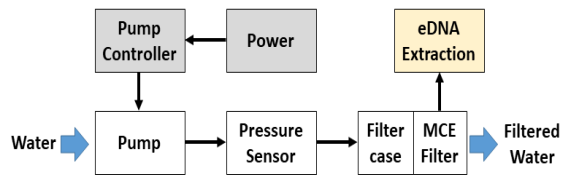
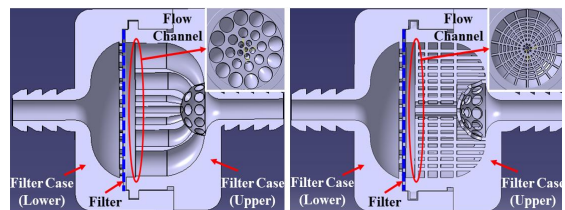


Fig. 1 Block diagram for water sampling experiments using pump type device



(a) Model A (b) Model B

Fig. 2 Figuration of designed (a) Model A, channel type and (b) Model B, net type

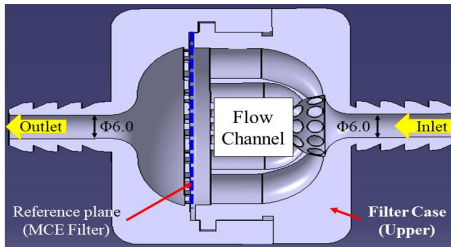
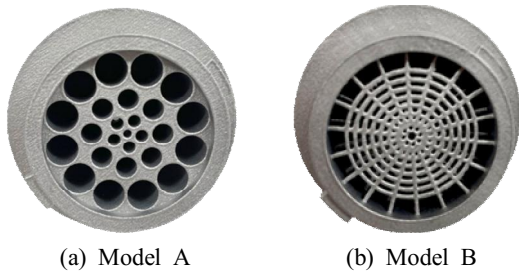


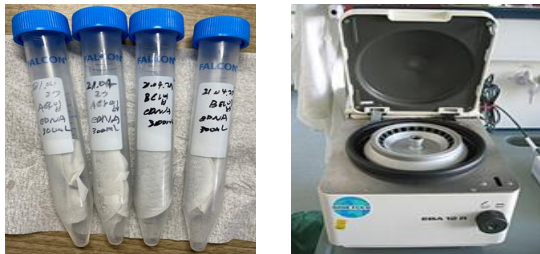
Fig. 3 Filter case modelling for flow analysis



(a) Model A

(b) Model B

Fig. 4 Shape of inner flow channel in 3D printed upper filter case made of Aluminium material



(a) MCE membrane filter

(b) centrifuge

Fig. 5 MCE membrane filter(a) in falcon tube and centrifuge(b) using in experiments

출구, MCE 멤브레인 필터가 삽입되는 위치(reference plane)를 기준으로 압력과 유속을 CAE 해석하고 수압 측정 실험 결과와 비교하였다.

2.3 필터 케이스의 금속 3D프린팅

필터 케이스는 야외에서 주로 사용되기 때문에 가볍고 견고한 알루미늄(AlSi10Mg, EOS GmbH)으로 제작하였다. 유동장을 고려하여 설계된 필터 케이스는 내부 형상이 3차원으로 복잡하므로 절삭, 주조 등의 전통적인 제조 방식으로는 제작이

어렵다. 복잡한 내부 유로의 형상을 표현할 수 있도록 PBF(Powder Bed Fusion)방식의 금속 3D프린터(EOS M290, EOS GmbH)를 이용하여 시제품을 제작하였다. Fig. 4는 금속 3D프린터로 제작된 상부 필터 케이스의 내부 유로 사진이다.

2.4 채수량 평가 및 eDNA 추출

금속 3D프린터로 제작된 모델 A와 B의 필터 케이스를 이용하여 각각 eDNA 포집 및 추출 실험 수행하고 기존의 진공압 포집 방식과 비교하였다. 실험을 위한 원수는 정수 연못의 표층수(수면으로부터 50cm 이내)를 확보하고, 펌프에 의해 각각의 필터 케이스로 채수를 공급하여 MCE 멤브레인 필터를 통과시켰다. 대조군은 진공압을 이용한 기존방식으로 포집하여 eDNA를 추출하고 그 결과를 비교하였다. 필터 교체시 발생할 수 있는 오염방지를 위해서 멸균된 포셉으로 필터를 고정하였다. 채수량은 기존 연구^[10]에서 제시한 기준에 따라 300ml로 설정하였다. eDNA 추출을 위해 포집된 각각의 여과지를 팔콘(Falcon, 15ml) 튜브에 넣고 DNA 키트(DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Germany)를 이용하여 지정된 비율^[11-14]에 따라 3차 멸균수(1,200 μ l), 프로테나제 K(60 μ l) 및 버퍼 ATL(540 μ l)을 혼합하고 혼합 용액을 팔콘 튜브에 분주하였다. 혼합 용액을 분주한 팔콘 튜브는 56 $^{\circ}$ C 항온수조에 넣어 30분 동안 용해시켰으며, 추가적으로 버퍼 AL(200 μ l)을 넣고 56 $^{\circ}$ C 항온수조에 10분 동안 용해시킨 후 원심분리기에서 6,000g의 속도로 원심분리와 버퍼용액 혼합을 반복하여 eDNA를 추출하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1 유동 해석

필터 케이스의 유동 저항을 분석하기 위해 유동해석^[15]을 수행하고, 수압 센서를 이용하여 수압 변화와 각각의 단위 시간당 유량을 측정하였다. 수압 실험 및 해석 결과는 필터 케이스가 없는 경우(Tube only, 관내경 6mm)와 비교하였다. CAE 해석 결과는 Table 1과 같다. Fig. 6은 입구에서 각각 동일한 유량(140ml/s)으로 유동 해석을 수행하

고 수압측정 실험과 비교한 결과이다. 수압에 대한 해석 및 실험 결과, 모델 A는 각각 10.19KPa, 9.96KPa, 모델 B는 각각 9.03KPa, 9.51KPa, 필터 케이스가 없는 경우에는 각각 5.39KPa, 7.45KPa로 해석 및 실험 결과는 비교적 일치하였다. 기준면(reference plane)의 평균 유속과 압력은 각각 모델 A 0.27m/s, 16.78KPa, 모델 B 0.22m/s, 15.24KPa로 모델 A에서 평균 유속과 평균 압력이 모두 높게 나타났다. Fig. 7은 필터 케이스 내부의 유속 분포 해석 결과를 보여주고 있다. 유관 형태의 모델 A는 중앙 부분에서 유속이 빠른 반면에, 망상 형태의 모델 B는 유동 저항으로 인해 전체적으로 유속이 느리게 나타났다.

Table 1 Analysis results for pressure and velocity

	Pressure(KPa)			Velocity(m/s)		
	Tube only	Model A	Model B	Tube only	Model A	Model B
Inlet	5.39	10.19	9.03	5.1	5.1	5.1
Reference Plane	-	16.78	15.24	-	0.27	0.22
Outlet	0.03	0.02	0.04	5.1	5.1	5.1

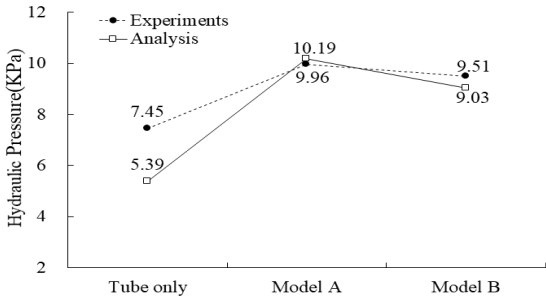
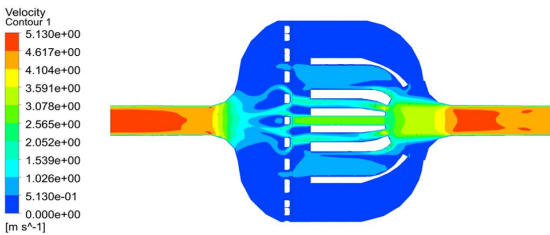
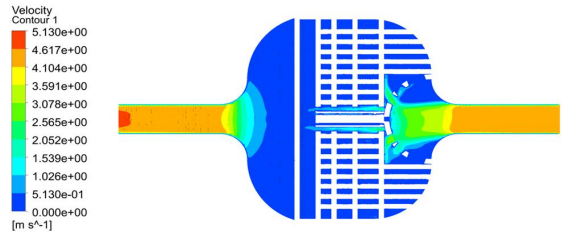


Fig. 6 Comparison of hydraulic pressure of Model A, Model B filter case and tube without filter case



(a) Model A



(b) Model B

Fig. 7 Flow analysis results of velocity at reference plane for (a) Model A and (b) Model B

해석 결과로부터 내부의 압력과 유속 변화는 필터 케이스의 내부 형상에 따른 유동저항의 영향을 확인할 수 있었다.

3.2 단위시간당 채수량

단위 시간당 유량을 측정하기 위해 MCE 멤브레인 필터를 끼워 채수량 300ml에 대해서 포집 성능을 평가하였다. 펌프 방식의 2가지 타입과 기존의 진공압 방식(control)을 비교하였다. 펌프 방식이 진공압 방식에 비해 채수 시간이 크게 단축되었으며, 특히 모델 A는 진공압 방식에 비해 3배 이상 빠른 속도로 채수와 포집이 가능하였다(Fig. 8). Fig. 9는 A와 B타입의 필터 케이스로 필터에 부착물이 증가함에 따른 채수 성능을 관찰하기 위하여 충분한 시간(500s) 동안 수압을 측정한 결과이다. 실험 결과, 모델 A의 압력이 모델 B에 비해 낮게 나타났으며 두 경우 모두 시간 경과에 따라 압력이 증가하는 경향을 보였다. 모델 A의 압력이 모델 B에 비해 낮은 것은 필터를 통과하는 유량이 상대적으로 많기 때문이다. 시간 경과에 따라 두 경우 모두 압력이 증가하였다. 이것은 필터에 걸러지는 부착물의 양이 증가함에 따라 나타나는 현상이다. 따라서 필터를 통과하는 유량이 많고 내부 압력이 낮은 모델 A 필터 케이스의 채수 성능이 보다 우수한 것으로 확인되었다.

3.3 eDNA 추출

펌프 방식의 모델 A와 B의 필터 케이스를 적용하여 eDNA 포집 및 추출 실험을 수행하고 기존의 진공압 방식과 비교하였다. Fig. 10은 동일한

원수를 각각 포집하여 eDNA를 추출한 실험 결과이다. 펌프 방식과 진공압 방식 모두 eDNA가 검출되었다. 모델 A의 필터 케이스를 적용한 펌프 방식은 진공압 포집 방식 결과와 유사하게 나타난 반면, 모델 B의 필터 케이스를 적용한 펌프 방식은 상대적으로 낮은 유량과 높은 압력으로 인해 포집이 충분히 되지 않았다.

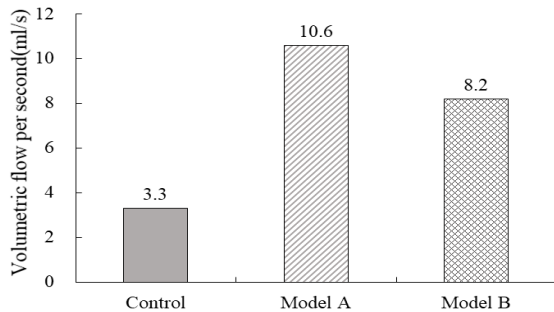


Fig. 8 Volumetric flowrate per second in case of 300ml water sampling

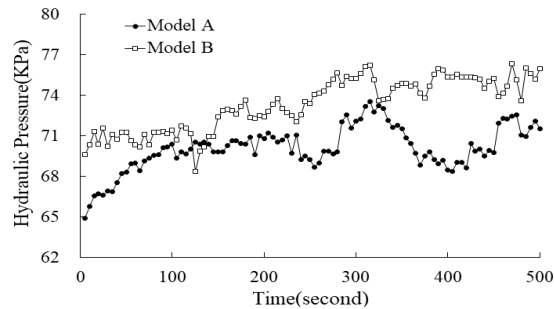


Fig. 9 Hydraulic pressure variation measured in filtering experiments using MCE membrane filter

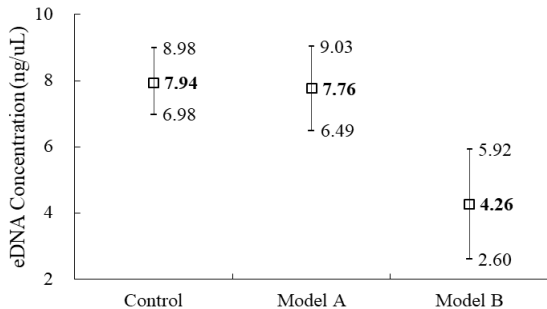


Fig. 10 The results of eDNA extraction experiment

4. 결론

펌프 방식의 eDNA 포집 시스템에 적합한 유관 형태의 모델 A와 망상 형태의 모델 B 필터 케이스를 설계하고 유동해석 및 실험을 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 내부 압력에 대한 CAE 해석 및 실험 결과는 정성적으로 잘 일치하였으며, 모델 B의 필터 케이스가 모델 A에 비해 유동 저항이 높았다.
2. MCE 멤브레인 필터를 이용한 단위시간당 채수량 실험 결과, 모델 A와 B의 채수량은 각각 10.6ml/s, 8.2ml/s으로 기존 진공압 방식에 비해 크게 개선되었으며, 모델 A 필터 케이스의 단위시간당 채수량이 모델 B에 비해 우수하였다.
3. eDNA 포집 및 추출 실험 결과, 펌프 방식과 진공압 방식 모두 eDNA가 검출되었으며, 펌프 방식의 모델 A와 기존 진공압 포집 방식은 각각 7.94ng/uL, 7.76ng/uL로 유사한 반면, 펌프 방식의 모델 B는 4.26ng/uL로 포집 성능이 낮았다.

후기

“이 논문은 2020년도 경상국립대학교 교원 연구활동 지원 사업의 예산지원으로 수행되었음.”

REFERENCES

1. Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., and Taberlet, P. “Species detection using environmental DNA from water samples,” *Biology letters*, Vol. 4 No. 4, pp. 423-425, 2008.
2. Thomsen, P. F., and Willerslev, E., “Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity,” *Biological conservation*, Vol. 183, pp. 4-18, 2015.
3. Shaw, J. L., Clarke, L. J., Wedderburn, S. D., Barnes, T. C., Weyrich, L. S., and Cooper, A., “Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river

- system,” *Biological Conservation*, Vol. 197, pp. 131-138, 2016.
4. Boussarie, G., Bakker, J., Wangensteen, O. S., Mariani, S., Bonnin, L., Juhel, J. B., and Vigliola, L., “Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks,” *Science advances*, Vol. 4, No. 5, eaap9661, 2018.
 5. Jo, H. B., Choi, B. H., Park, K. Y., Kim, W. S. and Kwak, I. S., “First Gut Content Analysis of 4th Instar Midge Larvae (Diptera: Chronomidae) In Large-Scale Weirs Using a DNA Meta-Barcoding Approach,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol. 17, pp. 2856, 2020.
 6. Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R., and Gough, K. C., “The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology”. *Journal of Applied Ecology*, Vol. 51, No. 5, pp. 1450-1459, 2014.
 7. Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., and De Bruyn, M., “Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring,” *Trends in ecology and evolution*, Vol. 29, No. 6, pp. 358-367, 2014.
 8. Lim, N. K., Tay, Y. C., Srivathsan, A., Tan, J. W., Kwik, J. T., Baloglu, B., and Yeo, D. C., “Next-generation freshwater bioassessment: eDNA metabarcoding with a conserved metazoan primer reveals species-rich and reservoir-specific communities,” *Royal Society Open Science*, Vol. 3, No. 11, rsos.160635, 2016.
 9. Bass, D., Stentiford, G. D., Littlewood, D. T. J., and Hartikainen, H., “Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology,” *Trends in Parasitology*, Vol. 31, No. 10, pp. 499-513, 2015.
 10. Gunter G., Ute M. and Michael S., “Water Lice and Other Macroinvertebrates in Drinking Water Pipes: Diversity, Abundance and Health Risk,” *Water*, Vol. 13, No. 3, 276, 2021.
 11. Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J.Y. Poulsen, K. Sato and W. Iwasaki., “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*, Vol. 2, No. 7, 150088, 2015.
 12. Osathanukul, M. and Minamoto, T., “A molecular survey based on eDNA to assess the presence of a clown featherback(*Chitala ornata*) in a confined environment,” *PeerJ*, 8: e10338. 2020.
 13. Sanches, T.M and A.D. Schreier., “Optimizing an eDNA protocol for estuarine environments: Balancing sensitivity cost and time,” *Plos one*, Vol. 15 No. 5, e0233522, 2020.
 14. Schabacker, J. C., Amish, S. J., Ellis, B. K., Gardner, B., Miller, D. L., Rutledge, E. A. and Luikart, G., “Increased eDNA detection sensitivity using a novel high-volume water sampling method,” *Environmental DNA*, Vol. 2, No. 2, pp. 244-251, 2020.
 15. Choi, K. C. and Cho, J. U., “A Study on the Efficient Flow Analysis due to Valve Shape”, *Journal of the Korean Society of Manufacturing Process Engineers*, Vol. 19, No. 6, pp. 17-22, 2020.