

Review

수생태계의 환경유전자(environmental DNA: eDNA) 채집 및 추출기술

김건희* · 류제하¹ · 황순진²

건국대학교 상허생명과학대학 휴먼엔코케어 센터, ¹㈜ 시온 이엔에스,
²건국대학교 상허생명과학대학 환경보건과학과

Sampling and Extraction Method for Environmental DNA (eDNA) in Freshwater Ecosystems. Keonhee Kim* (0000-0002-4113-8146), Jeha Ryu¹ (0000-0002-4008-8495) and Soon-jin Hwang² (0000-0001-7083-5036), (Human and Eco-Care Center, Sanghuh College of Life Sciences, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea; ¹Zion E&S Co. Ltd., Naju 58217, Republic of Korea; ²Department of Environmental Health, Sanghuh College Life Science, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea)

Abstract Environmental DNA (eDNA) is a genetic material derived from organisms in various environments (water, soil, and air). eDNA has many advantages, such as high sensitivity, short investigation time, investigation safety, and accurate species identification. For this reason, it is used in various fields, such as biological monitoring and searching for harmful and endangered organisms. To collect eDNA from a freshwater ecosystem, it is necessary to consider the target organism and gene and a wide variety of items, such as on-site filtration and eDNA preservation methods. In particular, the method of collecting eDNA from the environment is directly related to the eDNA concentration, and when collecting eDNA using an appropriate collection method, accurate (good quality) analysis results can be obtained. In addition, in preserving and extracting eDNA collected from the freshwater ecosystem, when an accurate method is used, the concentration of eDNA distributed in the field can be accurately analyzed. Therefore, for researchers at the initial stage of eDNA research, the eDNA technology poses a difficult barrier to overcome. Thus, basic knowledge of eDNA surveys is necessary. In this study, we introduced sampling of eDNA and transport of sampled eDNA in aquatic ecosystems and extraction methods for eDNA in the laboratory. In addition, we introduced simpler and more efficient eDNA collection tools. On this basis, we hope that the eDNA technique could be more widely used to study aquatic ecosystems and help researchers who are starting to use the eDNA technique.

Key words: environmental DNA, water ecosystem, sampling method, extraction method, methodology

서 론

환경유전자 (environmental DNA: eDNA)는 수중, 토양, 그리고 대기 중에 존재하는 생물체에서 유래된 DNA를 의

미하며 문헌에 따라서 eDNA를 추출하고 분석하는 기술적 부분을 의미하기도 한다(Ficetola *et al.*, 2008; Thomsen *et al.*, 2015). eDNA는 존재 상태에 따라서 Intracellular와 Extracellular의 두 가지 형태로 구분할 수 있다(Ogram *et al.*, 1987; Cheng *et al.*, 2011). Intracellular eDNA는 세포 내부에 존재하며 세포벽 또는 세포막 등이 유전물질을 보호하기 때문에 환경에서 오랜 시간 동안 존재할 수 있

Manuscript received 12 September 2021, revised 17 September 2021,
revision accepted 17 September 2021

* Corresponding author: Tel: +82-2-452-3749
E-mail: passbosko@gmail.com

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

다. Intracellular eDNA는 주로 다세포 생물의 표피세포 또는 산란과정에서 발생하는 체세포뿐만 아니라 단세포 세균의 세포 또한 Intracellular eDNA로 분류된다. Extracellular eDNA는 세포벽 및 세포막이 분해되어 세포 내부물질들이 세포 밖으로 용출된 상태에서 다양한 환경으로 인해 단시간에 자연분해될 수 있다. Extracellular eDNA는 단세포 및 다세포 생물의 세포에서 용출된 DNA가 모두 포함된다.

이러한 eDNA는 수생태에서 생산과 분해 과정을 반복, 순환하며 존재한다(Sassoubre *et al.*, 2016). 일반적으로 수생태계에서 eDNA는 Intracellular 형태로 유입된다(Barnes *et al.*, 2016). 이들은 생물 성장에 따른 표피세포의 탈리(secession) 및 산란과정에 배출되는 체세포의 형태뿐만 아니라 퇴적층 및 생물막에서 남조류의 휴면포자 발아(Germination) 및 세포 분열을 통해 수생태계로 유입된다(Ficetola *et al.*, 2008; Jerde *et al.*, 2011; Merkes *et al.*, 2014; Kim, 2018). 수층으로 유입된 eDNA는 수체의 흐름에 따라서 상류에서 하류로 흐르게 되며 다세포 생물의 세포는 서서히 분해가 발생하지만 단세포 생물의 세포는 지속적으로 분열하면서 eDNA의 농도를 증가시킨다. 수환경에 장시간 노출된 Intracellular eDNA는 세포벽과 세포막이 붕괴됨에 따라 세포 밖으로 용출되며 Extracellular eDNA 형태로 전환되어 수층에 분포하게 된다. 하지만 일부 남조류는 휴면포자의 형태로 전환되어 Intracellular eDNA 형태를 유지하게 되며 퇴적층으로 침강, 퇴적되어 분포하게 된다(Ogram *et al.*, 1987; Levy-Booth *et al.*, 2007). 이렇게 수생태계에서 순환하는 eDNA를 채집하고, 추출함으로써 수생태계에서 서식하는 생물의 다양성을 탐색할 수 있다(Bohmann *et al.*, 2014).

이러한 eDNA를 이용한 수생태계 모니터링은 높은 민감도, 조사 시간 및 비용 절감, 생물 서식처 교란의 최소화, 분석결과와 재현성 부분에 있어 큰 강점을 보여 많은 연구에서 활용하고 있다(Smart *et al.*, 2015; Creer *et al.*, 2016; Shaw *et al.*, 2016; Boussarie *et al.*, 2018). 해외에서는 이미 많은 분야에서 eDNA를 활용하고 있으며 사용자의 범위 또한 시민부터 과학자까지 매우 다양하다. U.S.EPA에서는 eDNA를 이용하여 호소의 유해 남조류 발생과 분포를 파악하고 있으며 남조독소의 기능유전자를 이용하여 특정 독소를 합성할 수 있는 남조류들을 선택적으로 탐색하고 있다(Creer *et al.*, 2016; Hobbs *et al.*, 2017; Howard 2018). 이외에도 수중의 eDNA를 이용하여 어류군집 및 외래 침입종의 분포를 탐색하였다(Lucy *et al.*, 2021; Hoffman *et al.*, 2016; Shu *et al.*, 2020). USGS에서도 강과 하천의 어류 및 양서류·파충류 분포와 멸종위기종 탐색에 eDNA를 활용하여 모니터링을 수행할 뿐만 아니라 eDNA sampling protocol을 공

정시험법의 techniques and methods로 채택하였다(Carim *et al.*, 2015; Laramie *et al.*, 2015). 유럽의 WFD (Water Framework Directive)에서는 EU 소속 국가들 사이에 eDNA network (DNAqua-Net)를 형성하여 유럽 전역에서 eDNA를 이용한 생물 모니터링을 수행하고 있으며 영국과 프랑스에서는 하천 기질의 생물막에 존재하는 돌말류(Diatom)의 eDNA를 기반으로 생물건강성 평가를 수행하고 있다(Kelly *et al.*, 2018; Tapolczai *et al.*, 2019; Apothéloz-Perret-Gentil *et al.*, 2020; Blancher *et al.*, 2021). 일본에서도 eDNA를 이용한 생물모니터링이 활발하게 이루어지고 있으며 담수뿐만 아니라 해수에서 생물자원의 탐색에 eDNA를 활용하고 있다(Takahara *et al.*, 2013; Miya *et al.*, 2015; Hayami *et al.*, 2020; Kitagawa *et al.*, 2020). 더욱이 미국과 많은 유럽 국가에서는 eDNA 연구가 시민과학(Citizen Science)과 결합되어 시민들까지 eDNA를 이용한 생물모니터링에 참여하고 있으며 주로 eDNA를 채집하는 단계에서 시민들의 참여가 이루어지고 있다(Biggs *et al.*, 2015; Pocock *et al.*, 2018; Larson *et al.*, 2020; Westfall *et al.*, 2021). 국내에서는 내성천에서 서식하는 멸종위기종 흰수마자(*Gobiobotia naktongensis*)의 개체를 확인하기 위해 eDNA를 이용하고 있으며, 상수원에서 이취미 물질을 생산하는 남조류의 분포를 eDNA 기반으로 탐색하고 있다(HRWEMD, 2019, 2020; Kim *et al.*, 2020a, 2020b). 또한 광양만 연안의 표층 수층 eDNA 분석을 통해 수생물의 공간분포를 살펴보기도 하였고, 4대 강의 갈따구 유층의 위 내용물 먹이원 분석에도 eDNA 기법을 적용하기도 하였다(Kim *et al.*, 2019; Na *et al.*, 2020). 하지만 아직까지 국내 eDNA의 적용은 매우 미진한 수준이며, 채집법 및 분석법의 높은 난이도로 인해 학교와 일부 기관들을 위주로 eDNA를 이용한 생물모니터링이 수행되고 있다.

본 연구는 eDNA가 수생태계를 연구하기 위한 도구로서 보다 널리 이용되며, eDNA를 이용하기 시작하는 연구자들에게 도움을 주고자 수생태계에서 eDNA를 채집하고 및 운반하는 방법과 실험실에서 eDNA를 추출하는 방법을 소개하였다.

재료 및 방법

1. eDNA 채집 여과지(Sampling filter)

eDNA를 채집(Sampling)하기 위한 여과지 선택은 매우 중요하다. 여과지의 공극 및 여과지의 재질에 따라서 eDNA 채집 효율 및 채집농도의 차이가 발생할 수 있으며 이는 연구 결과에 큰 영향을 미칠 수 있다(Turner *et al.*, 2014a).

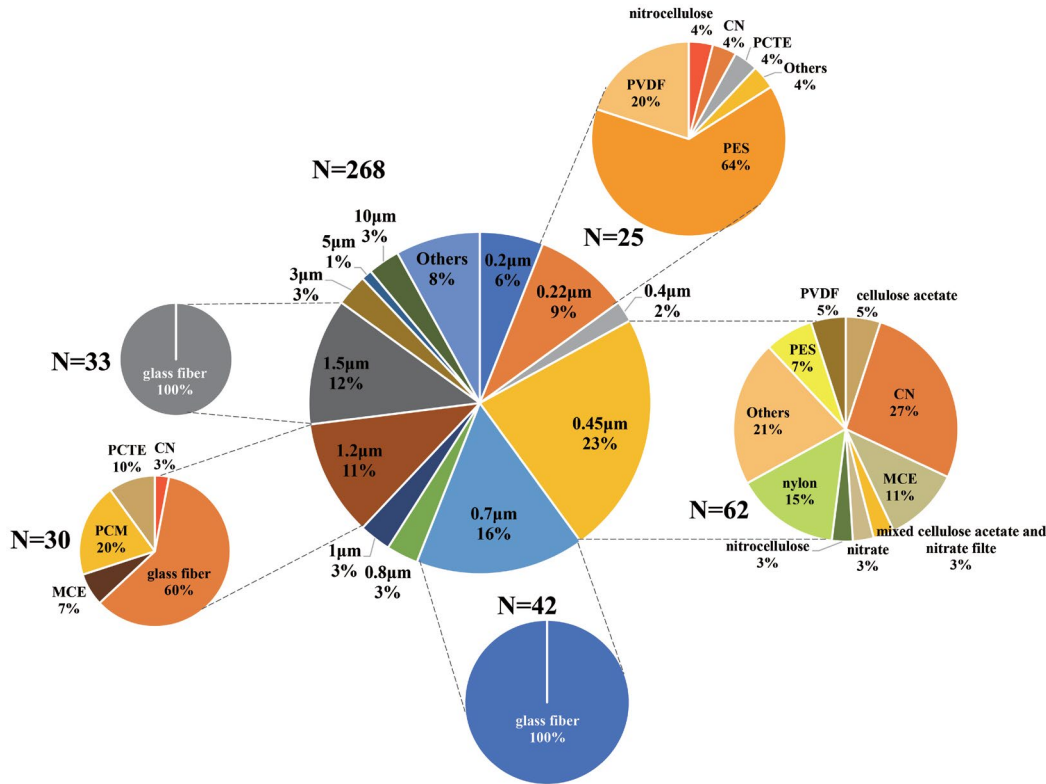


Fig. 1. eDNA capture methods from water samples. Referred from Wang *et al.* (2021) The percentage of pore size and material of filters used for filtration in eDNA capture. (CN): Cellulose nitrate, (MCE): mixed cellulose ester membrane, (PES): Polyether sulfone, (PCM): Polycarbonate membrane, (PCTE) Polycarbonate track etched.

eDNA를 여과하기 위한 여과지는 크게 두 가지 형태로 나눌 수 있다. 여과세트와 함께 사용하는 일반적인 여과지(Filter paper) 형태와 Sterivex filter와 같이 여과세트와 여과지가 하나로 결합되어 있는 형태로 구분할 수 있으며, 현재 두 가지 형태 모두 많은 eDNA 연구에서 사용되고 있다(Spens *et al.*, 2017; Takahashi *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2020; Vautier *et al.*, 2021). 두 가지 형태 모두 장점과 단점이 명확하며 사용 조건에 따라서 적합한 형태를 사용하여 eDNA를 채집한다.

1) 여과지(Filter paper) 형태

종이형태의 여과지는 가장 일반적인 실험도구로서 매우 다양한 재질과 공극(pore size)이 존재한다(Fig. 1). eDNA 채집에서 가장 많이 사용되는 여과지는 membrane 여과지와 유리섬유(Glass fiber: GF) 여과지가 존재하며 이 밖에도 polycarbonate 재질 등의 필름 여과지가 사용된다(Turner *et al.*, 2014b; Hinlo *et al.*, 2017; Pilliod *et al.*, 2017; Majaneva *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020) (Fig. 2a~c).

Membrane 여과지는 재질에 따라서 Cellulose acetate, Cellulose ester, Nitrocellulose 등으로 구분할 수 있으며 공

극의 크기가 0.25~1.00 µm까지 다양하다. Membrane 여과지는 레이저 등 기계를 이용하여 제작하였기에 모든 공극의 크기가 일정하다. 이와 마찬가지로 필름 여과지는 재질에 따라서 Polyether sulfone, Polyvinylidene difluoride, Polycarbonate로 구분할 수 있으며 0.2~1.0 µm까지 공극 종류가 다양하다. Membrane 여과지와 필름 여과지는 공극이 균일하여 수종의 eDNA를 균일하게 채집할 수 있는 장점이 존재하지만, 입자성 물질로 인한 여과지 폐쇄가 발생하기 쉬워서 여과량이 상대적으로 적다. 또한 필름 여과지는 두께가 매우 얇아서 여과 과정 중에 압력으로 인한 파손이 발생할 수 있기 때문에 필름 여과지 밑에 membrane 여과지를 추가하여 이중으로 사용한다. 이로 인해 필름여과지의 경우 eDNA 채집을 위해서 더 높은 압력이 필요할 수 있다.

유리섬유(Glass fiber: GF/F)의 공극 크기는 0.1~5.0 µm 이상으로 범위가 매우 넓으며 유리섬유 여과지의 공극 크기에 따라서 GF/D, GF/C, GF/F 등이 존재한다. 유리섬유를 쌓아서 제작하기 때문에 여러 층(Multi-layer)으로 구성되어 있으며 이로 인해 압력으로 인한 파손이 발생하기 어렵다. 하지만 여러 층으로 구성되어 있기 때문에 하나의 여



Fig. 2. Various type of filter paper and Sterivex filter. (a) Glass fiber filter paper, (b) Cellulose membrane filter paper, (c) Polycarbonate filter paper, (d) Sterivex filter set.

과지에 서로 다른 공극이 존재할 수 있으며 이러한 공극 차이 때문에 균일한 양의 eDNA를 확보하기 어려운 것으로 알려져 있다(Turner *et al.*, 2014b; Barnes *et al.*, 2016; Hinlo *et al.*, 2017). 이와 반대로 일부 연구에서는 유리섬유 여과지에서도 eDNA의 농도가 매우 높았으며, 유리섬유 여과지의 종류와 대상 생물에 따라서 eDNA 농도 차이가 존재하였다(Spens *et al.*, 2017; Sanches *et al.*, 2019; Takahashi *et al.*, 2020; Pall-Corporation, 2021). 이런 이유로 일본 eDNA 학회에서는 eDNA를 채집할 때 GF/F 여과지를 사용하는 것을 제안하고 있으며 이 밖에도 많은 연구에서도 여전히 유리섬유 여과지를 사용하고 있다(Carim *et al.*, 2016; Shu *et al.*, 2020; Minamoto *et al.*, 2021).

2) Sterivex filter 형태

종이형태의 여과지는 eDNA를 채집하기 위해서 반드시 여과세트와 함께 사용해야 하며 지점수가 많은 경우에는 지점별로 여과지만 교체하여 eDNA를 채집한다. 하지만 지속적으로 여과지를 교체하여 eDNA를 채집하는 경우에는 시료 사이의 교차오염(Cross Contamination)이 발생할 수 있기 때문에 여과세트를 지속적으로 세척해야 하는 번거로움이 존재한다. 이러한 번거로움을 줄이고자 여과지와 여과세트를 결합한 일체형 여과세트가 eDNA 채집에 사용되었다(Blankenship *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Majaneva *et al.*, 2018; Pawlowski *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2020).

Sterivex filter는 멸균된 제품이 개별포장되어 있어 사용하

기 매우 간편하다(Fig. 2d). 외부가 플라스틱으로 둘러싸여 있어 eDNA의 유실을 방지하며, 내부의 여과지로 둘러싸인 부위에 eDNA가 채집된다. Sterivex filter를 사용하여 eDNA를 채집하는 경우에는 주사기와 같은 주입장치를 사용하여 Sterivex filter 내부에 현장수를 주입한다. 사용자가 손으로 주사기의 피스톤을 밀어내어 여과하는 것이 일반적이거나, 여과지가 폐쇄되어 여과가 잘 안되는 경우에는 실리콘 주입기(Fig. 3)를 이용하여 주사기의 피스톤을 밀어낸다. Sterivex filter는 1회용 제품으로 eDNA를 채집한 후 보존용액(RNA lysis buffer 또는 에탄올)을 주입하고 밀봉하여 냉암소 상태로 실험실로 운반한다. 실험실로 운반된 Sterivex filter는 eDNA를 추출하기 위해 간단한 전처리 과정이 요구된다. 클램프와 줄톱을 이용하여 Sterivex filter 외부 하단부를 잘라낸 후 내부에 존재하는 여과지를 수술용 메스로 잘라내어 2 mL micro tube에 옮겨 담는다. 이렇게 2 mL tube에 옮겨 담은 여과지에서 eDNA를 추출한다(Kast, 2016; Cruaud *et al.*, 2017).

하지만 많은 수의 Sterivex filter를 일일이 잘라내는 것은 시간소모가 매우 크기 때문에 이를 개선하기 위해 다양한 방법들이 수행되었다. 가장 대표적인 방법은 Sterivex filter 내부에 Lysis Cocktail (Lysis buffer + Proteinase K + Phosphate buffered Saline)을 주입하여 하단부를 절단하지 않고 내부 여과지로부터 eDNA를 추출하는 것이다. 현재는 이러한 Lysis Cocktail 뿐만 아니라 Silica bead를 함께 주입한 후 Vortex 과정을 통해 화학적-물리적 방법으로 eDNA를 추출하고 있다(Ushio, 2019; Minamoto *et al.*, 2021).



Fig. 3. Use of a Sterivex filter for sampling of eDNA in Water column. (1) Injection of field sampling to syringe, (2) Injection of water sample to Sterivex filter, (3) When you hard to push, using silicon injector, (4) Injection of preservation solution.

3) eDNA 채집을 위한 여과지 선정

Sterivex 필터는 부피가 작고 무게가 가벼워서 현장에서 사용하기 매우 용이한 형태이다. 또한 여과지와 여과세트가 일체화되어 있기 때문에 현장에서 즉시 교체하여 사용 가능하며 이로 인해 서로 다른 지점 사이의 교차오염을 최소화할 수 있다. 하지만 가장 큰 단점으로 개당 단가가 매우 비싸기 때문에 조사 지점이 많을 경우에는 모든 지점에서 Sterivex filter를 사용하는 것이 매우 큰 부담으로 작용할 수 있다.

2000년대 초~중반, eDNA 연구 초기에는 대부분의 연구에서 종이 형태의 여과지를 이용하여 eDNA를 채집하였다. 환경에 따라서 서로 다른 공극과 재질의 여과지를 사용하여 eDNA를 채집하였으며 일부 연구에는 현장수를 고정하여 실험실로 운반하였다(Table 1) (Schrock *et al.*, 2013; Turner *et al.*, 2014a; Williams *et al.*, 2016; Schill, 2020). 이후 장비가 개발됨에 따라 종이 및 필름 여과지뿐만 아니라 Sterivex filter를 사용하여 eDNA를 채집하였으며, 현재 Sterivex filter를 기반으로 다양한 방법과, Sterivex filter의 단점을 보완하는 새로운 eDNA 채집 filter가 개발되고 있다(Thomas *et al.*, 2019). 향후 연구 대상 생물의 eDNA를 채집하기 위한 최적의 여과지 유형 및 여과 방법을 비교 검증하는 연구가 반드시 필요하며 이를 기반으로 적절한 여과지와 여과 펌프를 선택함으로써 많은 양의 eDNA를 효율적으로 채집할 수 있을 것으로 판단된다.

2. eDNA 채집 도구 및 방법

(Sampling methods and tools)

수생태계에 존재하는 eDNA를 채집하기 위한 적절한 방법은 현장수를 여과(Filtering) 하는 방법이다. 주로 Intracellular eDNA를 대상으로 하며 여과를 통해 여과지에 남아 있는 eDNA를 추출한다. eDNA를 채집하기 위한 현장수 여과는 1 L를 권장하지만(Laramie *et al.*, 2015; Hobbs *et al.*, 2017), 최소 50 mL부터 최대 톤(ton) 단위로 연구자가 원하는 용량을 여과하며 여과용량이 많을수록 eDNA의 수율(Yield)과 농도가 높다(Schabacker *et al.*, 2020). 현장수 여과를 위해 다양한 여과장치를 사용하고 있으며 eDNA의 변성을 방지하지 위해 가급적 현장에서 여과하는 방식을 사용하고 있다(Hobbs *et al.*, 2017). 현장수를 여과하기 위해서 현장수를 채수하는 방법은 크게 두 가지로 나눌 수 있다(Laramie *et al.*, 2015). 현장수를 채수하여 여과장치에 옮겨 담는 방법(Collect and Pour)과 여과 장치에 연결된 여과지를 현장수에 집어넣어 여과하는 방법(Direct)이 존재하며 사용자의 여과환경에 따라서 적절한 방법을 사용하면 된다. 일반적인 호소 및 저수지와 하천의 경우에는 Direct 방법과 Collect and Pour 방법 모두 사용할 수 있으나, 논이나 수심이 얇은 물 웅덩이의 경우에는 하상의 실트 입자가 여과지 폐쇄를 유발할 수 있기 때문에 Collect and Pour 방법을 통해 상층수를 조심스럽게 채수하여 여과하는 방법이 여과량을 최대화할 수 있다.

Table 1. Overview on published methods and quantities used for filtering eDNA from macrofauna in natural freshwater systems. Modified from Mächler *et al.* (2016).

Year	Organism	Filter material	Filter pore size (μm)	Sampled water volume (mL)
2011	Amphibian	Cellulose nitrate	0.45	5,000~10,000
2011	Carp	Glass fiber	1.5	2,000
2012	Fish	Polycarbonate	3	2,000
2012	Hellbender (amphibian)	Glass fiber	1.5	8,000
2012	Fish	Cellulose acetate	3	2,000
2012	Fish	Nylon	0.45	500
2013	Snail	Cellulose nitrate	0.45	4,000
2013	Carp	Glass fiber	1.5	2,000
2013	Carp	Glass fiber	1.5	2,000
2013	Amphibian	Cellulose nitrate	0.45	1,000
2013	Amphibian	Polyethylensulfone	–	600
2013	Fish	Cellulose acetate	3	1,000
2013	Fish	–	0.45	300
2013	Fish	Glass fiber	1.5	6,000
2014	Carp	Glass fiber	1.5	200
2014	Fish	Glass fiber	1.5	6,000
2014	Fish	Polyethylensulfone	0.22	2,000
2014	Macroinvertebrate	Glass fiber	0.7	900
2014	Amphibian	Cellulose nitrate	0.45	2,000
2015	Carp	Galss fiber	1.5	2,00
2015	Amphibian	Glass fiber	0.7	4,000
2015	Fish	Glass fiber	1.5	2,000
2-15	Fish	Cellulose nitrate	0.45	1,000
2015	Amphibian	Cellulose nitrate	0.45	1,000

**Fig. 4.** Use of a hand pump for eDNA sampling. (1) Pour sample slowly into filter funnel, (2) Engage hand pump to begin filtration, (3) Remove funnel cup, (4) Fold filter, (5) Place filter in 2 mL o-ring tube of ethanol (Goldberg *et al.*, 2017).

1) 핸드펌프

eDNA를 현장에서 여과할 때 가장 쉽게 사용할 수 있는 장비는 핸드펌프(Hand-operated vacuum pump)이다(Fig. 4). 핸드펌프는 수동으로 압력을 형성하여 여과하기 때문에 전기사용이 불필요하다. 더욱이 장비 구입 비용이 저렴할 뿐만 아니라 작동원리가 간단하여 사용자의 사용 접근성이 매우 용이하다. 또한 장비가 소형화되어 소지가 간편하기 때문에 현장에서 운반이 용이하다. 핸드펌프는 여과세트와 결합

하여 사용하며 채수한 현장수를 즉시 여과세트에 옮겨 담고 핸드펌프로 여과세트 내부에 압력을 형성하여 eDNA를 여과한다.

이와 같이 핸드펌프는 사용 난이도가 낮고, 운반이 간편한 장점이 존재하지만 압력을 유지하기 위해서 지속적인 수동 가동해야 하는 번거로움이 존재한다. 또한, 수동으로 형성된 압력은 실험실의 전동진공펌프(Electric vacuum pump)보다 약하기 때문에 많은 양의 현장수를 여

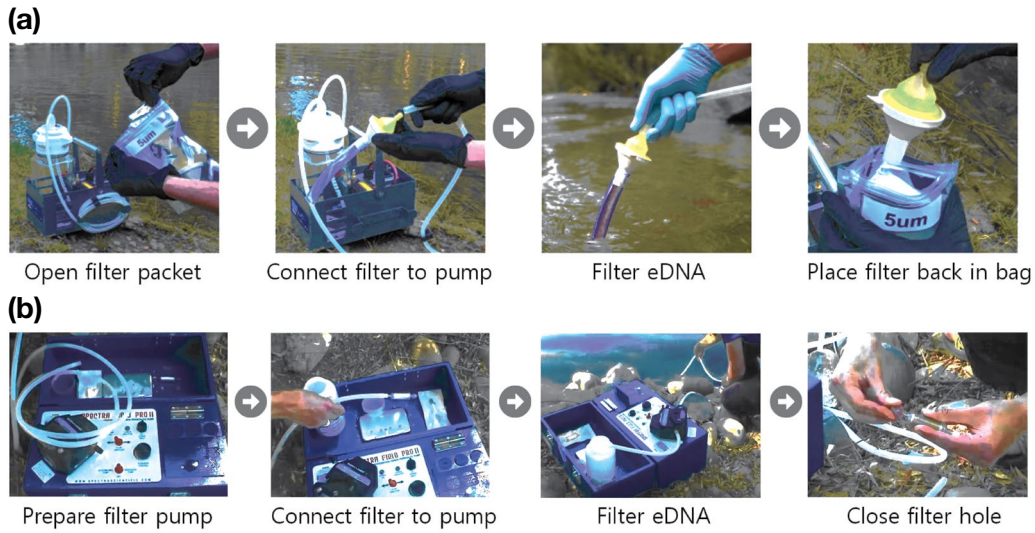


Fig. 5. Process of electronic handy pump for eDNA sampling. (a) Handy vacuum pump that made by smith-root Co. Referred from “<https://www.smith-root.com/>”, (b) Peristaltic pump with Sterivex filter. Referred from “<https://www.fishsciences.net/expertise/>”.

과하는 데 어려움이 존재한다. 더욱이 저수지 및 호소에서 녹조가 발생한 경우에는 핸드펌프의 압력수준으로 여과할 수 있는 현장수의 용량은 매우 낮다. 따라서 Collect and Pour 방법으로 현장수를 채수, 여과하는 방법에 활용되며, Direct 채수 방법과는 혼합 적용이 어렵다.

2) 휴대용 전동펌프

휴대용 전동펌프(Handy Electric pump)는 핸드펌프의 압력한계를 해결하기 위한 방안으로 실험실에서 사용하는 자동펌프와 배터리를 결합하여 현장에서 사용 가능하게 한 것이다. 휴대용 전동펌프는 두 가지 형태가 존재한다. 자동진공펌프(Vacuum pump)의 형태와 롤러펌프(Peristaltic pump) 형태가 존재하며 두 형태 모두 현장에서 사용되고 있다(Fig. 5a, b). 전기로 작동하는 펌프이기 때문에 여과압력이 핸드펌프보다 우수하며, 지속적으로 압력을 유지하기 위한 번거로움이 없다. 따라서 Direct 방법과 Collect and Pour 방법을 모두 사용할 수 있다.

진공펌프 형태는 실험실에서 사용하는 진공펌프의 형태 및 원리가 동일하며 여과된 현장수가 모이는 진공병(Vacuum bottle)과 결합하여 사용한다(Majaneva, 2018; Smith-Root, 2021). 진공펌프 형태는 현재 존재하는 여과장치 중에서 가장 높은 압력으로 여과할 수 있기 때문에 가장 빠른 시간에 많은 용량을 여과할 수 있다. 또한 실험실에서 사용하는 진공펌프와 형태가 유사하기 때문에 사용자가 쉽게 사용할 수 있다. 하지만 진공병과 반드시 결합하여 사용하기 때문에 진공병의 용량을 초과하였을 시, 펌프내부로 물



Fig. 6. eDNA filtration using a peristaltic pump support by power drill.

이 역류하여 기기고장의 원인으로 작용하기도 한다. 또한 펌프의 무게로 인해 손으로 운반하였을 때 무게로 인한 운반 피로도가 발생할 수 있다. 롤러펌프는 롤러가 관을 밀어내는 압력으로 현장수를 여과하며, 깔때기 및 플라스틱 비커와 함께 사용한다(Carim *et al.*, 2015; Morrison *et al.*, 2019). 롤러펌프는 현장수를 여과하는 동안 압력이 균일하며 여과된 물을 즉시 배출하기 때문에 장시간 여과에서 기기고장 및 여과지가 파손되어 eDNA 시료가 손실될 확률이 낮다. 롤러펌프는 펌프기계를 배터리와 연결하여 사용하거나 롤러펌프 헤드를 분리한 후, 전동드릴과 결합하여 사용하기도 한다(Blankenship *et al.*, 2017; Schwartz *et al.*, 2017)(Fig. 6). 전동드릴의 힘을 이용하는 경우에는 롤러펌프 기계보다 소형

화가 가능하며 물리 펌프보다 빠른 속도로 여과할 수 있다. 하지만 전동드릴을 이용하여 롤러펌프를 작동하는 경우 적절한 전동드릴과 배터리의 전압을 선택해야 한다. 전동드릴 전압은 볼트(V)로 표기하며 높을수록 전동드릴 모터의 힘이 증가한다. 배터리의 전압은 암페어(Ah)로 표기하며 현재 시중에 판매되는 일반적인 전동드릴의 배터리는 1.3~1.5 Ah로 구성되어 있다. 현장에서 전동드릴을 장시간 사용하는 경우에는 2.0 Ah 이상의 대용량 배터리가 필요하지만 배터리의 용량이 증가할수록 전동드릴의 크기와 무게가 함께 증가하기 때문에 사용자의 사용환경에 따라서 적절한 제품을 선정해야 한다. 이 밖에도 전동드릴의 분당회전수(rpm)와 회전력(토크: Nm)은 롤러펌프의 여과압력을 결정하는 요인으로서 분당회전수와 회전력이 모두 높을 때 여과압력이 가장 높다. 하지만 전동드릴의 속도를 조절할 수 없으며 장시간 여과할 시, 전동드릴의 모터에 부담이 될 수 있다. 더욱이 전동드릴의 배터리 용량은 롤러펌프 외부 배터리(오토바이 배터리: 6~14 Ah)의 30~40% 정도밖에 안되기 때문에 장시간 지속적으로 전동드릴을 가동하였을 때 배터리가 빠르게 소모될 수 있다.

3) eDNA 채집 전용 여과펌프

최근 기존 eDNA 채집장비들의 단점들을 보완하며 eDNA 채집에 보다 다양한 기능이 존재하는 전문 여과장치가 개발되어 판매되고 있다(Thomas *et al.*, 2018; Edmunds *et al.*, 2019; Sepulveda *et al.*, 2020). eDNA 전문 채집장비는 종류에 따라서 크기와 무게가 다양하여 사용자의 용도 및 필요도에 따라서 선택할 수 있다. 전문 채집장비는 크게 여과펌프, 여과세트, 채집막대 3개 부위로 나눌 수 있으며 사용자의 필요에 따라서 채집막대를 제외하고 사용하기도 한다(Fig. 7b).

eDNA 전문 채집장비의 여과펌프는 롤러펌프 및 전동펌프의 형태로 제작되었으며 가격대에 따라서 다양한 기능이 존재한다. 전문 채집장비는 모두 Direct 방법으로 여과하며 Collect and Pour 방법은 사용하지 않는다. 고가의 전용펌프는 현장수 여과 용량 및 여과압력, 여과유속 등을 설정할 수 있기 때문에 여과지의 부담을 현격히 줄일 수 있다. 또한 수중의 입자성 물질이 다량으로 존재하여 여과지 폐쇄가 발생하였을 때 기기 내부에서 알람을 울려서 여과지 및 펌프의 파손을 막을 수 있다. 고가의 전용펌프는 주로 가방형태로 제작되어 사용자가 운반할 수 있는 형태이지만, 무게가 무겁고, 큰 부피로 인해 장비 운반 시 사용자의 피로도를 증가시킬 수 있다. 저가 전용펌프의 경우 오직 펌프 기능만 존재하는 기기부터 여과속도 및 여과량을 실시간으로 확인할 수 있는 기기까지 다양하게 존재한다(Fig. 7a). 이러한 저가형



Fig. 7. Developed sampling pump for eDNA in freshwater. (a) Hand-held eDNA pump and associated 3D-printed filter cartridge and vinyl tubing (Edmunds *et al.*, 2019), (b) environmental DNA sampling using the ANDe™ system (Thomas *et al.*, 2018).

전용펌프는 무게가 가볍고, 부피가 작아 사용자의 피로도가 상대적으로 낮다.

eDNA 전용 여과펌프는 진공펌프 형태가 아니기 때문에 여과 배출수를 저장할 필요가 없으며 배출 호스를 통해 배출한다. 사용자의 필요에 따라서 배출수를 저장하여 Extracellular eDNA를 채집할 수 있지만 배출호스를 교체하거나 전동펌프 내부의 물을 제거할 수 없기 때문에 지점 사이의 eDNA 오염이 발생할 수 있다.

4) eDNA 채집을 위한 도구 선정

eDNA를 채집할 때 사용자의 채집환경(하천, 강, 호소, 저수지 등) 및 채수 방식에 따라서 적절한 도구를 사용해야 한다. 더욱이 eDNA 분석결과는 eDNA 채집단계부터 많은 영향을 받을 수 있기 때문에 적절한 채집장비를 사용하고 적절한 채수 방법으로 eDNA를 채집하는 것이 매우 중요하다. 하지만 현재 대부분의 eDNA 채집은 현장수를 채수하여 실험실에서 진공펌프를 사용하여 여과하는 방식을 사용하고 있으며 현장 여과를 위한 기반시설 및 장비들이 매우 부족하다. 하지만 현장수를 운반하는 과정에서 발생하는 문제점

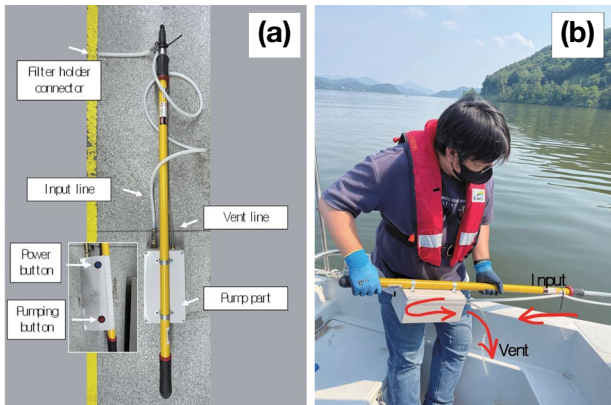


Fig. 8. Prototype of sampling pump of low-cost for eDNA in freshwater (Application number: 10-2021-0124789). (a) Name of each part, (b) Illustrating of eDNA sampling using the low-cost sampling pump.

들을 해결하기 위해서는 현장에서 즉시 여과하여 eDNA를 채집하는 방식으로 변화해야 한다. 이러한 eDNA 현장 채집 방식을 보급화하기 위해 저가형 eDNA 채집 전용 여과펌프는 개발이 진행되고 있으며 Proto-type이 완성되어 현장 검증을 진행하고 있다(Fig. 8). 따라서 이러한 eDNA 채집 전용펌프들이 지속적으로 개발된다면 국내 eDNA 연구가 더욱 활발하게 이루어질 수 있을 것으로 판단된다. 또한 시민 과학과 eDNA가 융합됨에 따라 eDNA 채집 장비를 사용하는 사용자 또한 전문 연구자 부터 일반 시민까지 매우 다양해질 것으로 판단된다. 이를 위해 eDNA 채집 장비는 더욱 단순화되고 사용하기 편리한 방향으로 발달하며 비전문가 집단도 충분히 사용할 수 있는 제품으로 kit화될 것으로 판단된다.

3. eDNA 보존 및 고정(Preservation of Sampled eDNA)

eDNA는 환경에 노출된 순간부터 서서히 분해되기 시작하며 장시간 노출되었을 때 Intracellular eDNA는 Extracellular eDNA로 전환되며, Extracellular eDNA는 조각(fragment) 단위로 분해되어 사라지게 된다(Barnes *et al.*, 2014; Strickler *et al.*, 2015) (Table 2). 이러한 이유로 현장에서 eDNA가 채집된 여과지(Filter paper)를 아무런 처리 없이 실험실로 운반하였을 경우, 실험실로 운반하는 과정에서 eDNA의 농도 차이가 발생할 수 있다. 시료의 변질을 방지 및 최소화하기 위해 가장 보편적으로 사용되는 방법은 냉암소 조건(4°C, 압조건)에서 시료를 보관, 운반하는 것이다.(Rees *et al.*, 2014). 이러한 냉암소 보관법은 eDNA를 2일까지 보존시킬 수 있으나 2일 이후 eDNA가 급속도로 분해되어 PCR 분석이 불가능한 상태로 변질된다(Ladell *et al.*,

2019; Licul *et al.*, 2021). 이러한 이유로 현장에서 채집된 eDNA는 12시간 이내에 여과하거나 즉시 보존용액 또는 고정용액을 첨가하여 eDNA의 양적 변질을 예방해야 한다.

1) 에탄올(Ethanol 99.9%, Ethanol Absolute)

에탄올은 DNA가 구조를 유지하는 데 안정적인 물질로서 많은 연구에서 사용되고 있다(Piškur *et al.*, 1995; Cheatham *et al.*, 1997). USGS의 Snake River Field Station 자체 eDNA protocol에서는 eDNA를 채집하고 보존하는데 에탄올을 첨가하는 것으로 안내하고 있으며 USGS의 공식 protocol에서도 현장에서 채집된 eDNA 시료를 보존하기 위해 Molecular 수준의 에탄올을 첨가하도록 지침을 제시하고 있다(Laramie *et al.*, 2015; Hobbs *et al.*, 2017; Pilliod *et al.*, 2017). 에탄올을 첨가한 eDNA 시료는 7일까지 분해되지 않고 유지되며 에탄올을 첨가하지 않고 저온(4°C)에서 보관하는 방법보다 보존량이 2배 이상 우수하였다(Licul *et al.*, 2021). 뿐만 아니라 eDNA의 보존은 Molecular grade의 에탄올 33 mL와 3 M의 Sodium-acetate를 혼합하여 주입하였을 때 가장 효과적이었으며 7일 이상 보존이 가능하였다(Ladell *et al.*, 2019) (Table 3). 오히려 에탄올과 Sodium-acetate를 주입한 후 저온(4°C)에서 보관하였던 eDNA 시료는 15% 정도 분해되어 농도가 감소하였다. 에탄올과 Sodium-acetate가 저온에 노출되었을 때 불안정해지는 원인에 대해서는 정확히 알려지지 않았으나 이러한 결과를 통해 보존방법을 혼합하여 사용하였을 때 eDNA의 농도가 감소할 수 있는 가능성을 판단할 수 있다.

2) RNA later

에탄올이 eDNA 보존에 있어서 많은 장점이 존재하지만 강력한 휘발성으로 인해 현장에서 운반과정에 부담이 존재한다. 또한 미국에서는 주 정부에 따라서 에탄올 성분의 용액 운반이 금지되어 있기 때문에 현장에서 사용이 어려운 경우가 발생한다(Pilliod *et al.*, 2017). 또한 여름철 기온이 증가함에 따라 에탄올의 휘발속도가 증가하며 이로 인해 시료병이 파손되는 경우가 발생할 수 있다. 따라서 에탄올과 같이 DNA를 안정적으로 보관할 수 있으며 휘발성이 낮은 보존용액의 필요성이 대두되었다. RNA later는 동물세포 배양 실험에서 세포의 RNA를 보존하기 위해 주입하는 용액으로, DNA 보존에도 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2002; Michael *et al.*, 2013; Junior 2020). 일본 eDNA 학회는 현장에서 eDNA를 채집한 후 RNA later 1~2 mL를 주입하여 여과지와 RNA later가 충분히 접촉하는 것을 권장하고 있다(Miya, 2019; Minamoto *et al.*, 2021). RNA later를 주입한 이후에는 여과세트의 주입구를 밀봉하

Table 2. Summary of major finding on eDNA persistence. Modified from Barnes *et al.* (2016).

Environment	Target organism	Major finding
Laboratory freshwater aquaria	Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	eDNA concentration decreased exponentially; after 4 days the probability of detection was <5%. Rare detections occurred as late as 14 days . Degradation rate negatively correlated with indices of microbial activity (biochemical oxygen demand, total DNA concentration, and chlorophyll a concentration) and pH
Laboratory freshwater mesocosms and small natural ponds	American bullfrog (<i>Rana catesbeiana</i>) and Siberian Sturgeon (<i>Acipenser baerii</i>)	eDNA remained detectable with >5% probability for 25 days in glass beakers, while fish eDNA in small ponds demonstrated >5% detection probability for 17 days
Laboratory freshwater aquaria and eutrophic 5th order river	New Zealand mudsnail (<i>Potamopyrgus antipodarum</i>)	eDNA remained detectable for 21 days following snail removal
Lentic environment	Exogenous plasmid pEGFP (Clontech, USA)	Plasmid DNA was undetectable within 170 h in untreated water, while no degradation was observed in the presence of antimicrobial agent EDTA. Culling the bacterial community via filtration also resulted in reduced DNA degradation rates
Mesocosms floated in experimental ponds and laboratory freshwater aquaria	Silver Carp (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>) carcasses, fecal samples of eagles (<i>Haliaeetus leucocephalus</i>) which had eaten Silver Carp	DNA could be recovered from swabbed carcasses for up to 28 days of areal environmental exposure, independent of ambient temperature, humidity, precipitation, and UV exposure. Silver Carp eDNA was also detected from fecal samples of birds who had eaten Silver Carp, and detections occurred from feces which had been deposited up to 30 days prior
Laboratory freshwater aquaria	Idaho giant salamander (<i>Dicamptodon aterrimus</i>)	eDNA decreased exponentially in light and shaded treatments but was no longer detectable in full- sun treatments after 8 days , detectable in shaded treatments after 11 days, and detectable in refrigerated controls after 18 days
Laboratory freshwater mesocosms	Bullfrog (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	eDNA decreased exponentially but remained detectable <1~54 days following organism removal. Higher temperatures and lower pH decreased degradation rates. UV-B intensity interacted with other factors but appeared to have a positive relationship with eDNA degradation
Outdoor freshwater mesocosms	Common spadefoot toad <i>Pelobates fuscus</i> and great crested newt <i>Triturus cristatus</i>	eDNA persisted 7~14 days following removal of live organism
Experimental ponds	Bighead and Silver Carp (<i>Hypophthalmichthys</i> spp.)	eDNA was observed in pond sediments for >130 days after fish removal, but was not detected in pond water after the same period
Groundwater and riverine environments	Transgenic Bt (<i>Bacillus thuringiensis</i>) corn plasmid DNA (<i>Zea mays</i>)	Plasmid DNA degraded to undetectable levels within 48~96 h in aquatic environments; however, eDNA remained detectable throughout a 192 h experiment when water was sterilized by autoclave

여 공기여과세트와의 접촉을 최소화한다. RNA later가 주입된 eDNA는 37°C에서 24시간 동안, 상온(25°C)에서는 1주일 동안 보관이 가능하며 4°C~초냉각(-20~-80°C) 온도에서는 6개월 이상 보관이 가능하다(ThermoFisher, 2021). RNA later가 공기에 장시간 노출되면 용액속의 RNA later 성분이 침전되어 흰색의 가루가 형성되고 수분은 증발하여

굳어버린다. 굳어버린 RNA later는 증류수를 첨가해도 사용이 불가능하며, 여과세트 내부에서 굳어버린 RNA later는 여과세트 배출구 폐쇄 현상의 원인이 될 수 있다. 또한 RNA later는 고가의 용액으로서 비용면에 있어서 연구에 부담이 될 수 있다.

Table 3. Summary of sample collection and preparation methods used to detect eDNA in water bodies. Modified from Rees *et al.* (2014).

Environment	Volume of samples	Filter type	Preservation method	DNA extraction method
Mesocosm	250 mL	Membrane filter	Stored at -20°C	Modified DNA extraction procedure
Containers	15 mL	–	Addition of 3M sodium acetate and 100% ethanol	Quick-gDNA spin-column kit
Beaker, artificial/ experimental/ natural pond	15 mL	–		DNA precipitation followed by DNeasy blood and tissue kit
Aquaria, natural pond	15 mL	–		DNA precipitation followed by QIAamp blood and tissue kit
Stream	5 L or 10 L	Cellulose nitrate	Filter stored in 95% ethanol	Filter air-dried then Qiashredder/DNeasy kit
River	4 L or 5 L	Cellulose nitrate		Filter air-dried then Qiashredder/DNeasy kit
River	2 L	Glass fiber	Filter stored at -20°C	MoBio kit
Aquaria	20 L	Durapore membrane filter	Filter stored at -80°C	Bead beating then DNeasy kit
River	2 L	Glass fiber	Filter stored at -20°C	MoBio kit
River	2 L	isopore polycarbonate filter	Sample immediately transferred to laboratory for filtration	DNeasy kit
Tank	120 mL	–	Addition of 3M sodium acetate and 100% ethanol	DNeasy kit
Tank	2, 4, 8 L	glass fiber	Filter stored at -20°C	MoBio kit
River	2 L	–	Addition of 3M sodium acetate and 100% ethanol	MoBio kit
Tank (trash can)/ field site	5 L	glass fiber	–	MoBio kit or QIAamp DNA Micro kit
Aquaria/glass mason containers Streams	500 mL 1 or 2 L	Cellulose nitrate	Filter stored in 95% ethanol	Filter air-dried then Qiashredder/DNeasy kit
Tank	20 mL or 50 mL	Amicon Ultra 15 centrifugal filter	Filtrate stored at -25°C	DNeasy kit
Pond	2 L	polycarbonate filter		
Pond	1 L	polycarbonate filter		
Pond/lake, stream, mesocosm	15 mL	–	Samples stored at 20°C followed by addition of 3 M sodium acetate and 100% ethanol	DNA precipitation followed by DNeasy kit
Stream	6 L	glass fiber	Filters stored on ice	MoBio kit

3) 그 외 보존방법

에탄올과 RNA later 이외에 eDNA를 보존하는 방법으로는 Silica bead 속에 보관하는 방법, DNA lysis buffer를 주입하여 여과 직후 세포를 파쇄하는 방법, 현장수를 채수한 후 고농도의 Longmire's 용액을 현장수에 주입하여 현장수 자체를 실험실로 운반하는 방법이 있다(Williams *et al.*, 2016; Spens *et al.*, 2017; Licul *et al.*, 2021).

eDNA를 채집한 여과세트를 Silica bead에 보관하는 방법은 여과지에 존재하는 수분을 완전히 제거하여 eDNA를 보존하는 방법으로 사용되었으나 보존기간 및 보존량이 매우 낮아 현장 적용이 매우 어렵다. Silica bead를 이용하여 수분을 완전히 제거하였을 때 7일 이후 eDNA 농도는 에탄올 보존시료의 20~30% 수준을 나타내었다(Allison *et al.*, 2021).

DNA lysis buffer를 주입함으로써 여과직후 세포를 파쇄하는 방법은 Silica bead보다 우수한 보존상태를 나타내었다(Majaneva *et al.*, 2018). 더욱이 eDNA 추출과정에서 Lysis 단계를 미리 선행함으로써 추출과정의 간소화를 가능하게 하였다. Lysis buffer를 주입한 시료에서 eDNA 농도는 에탄올을 주입한 시료의 60~70% 수준을 나타냈으며 Silica bead 보관법보다 약 5배 높은 농도를 유지하였다(Licul *et al.*, 2021). 하지만 eDNA 시료가 Lysis buffer에 장시간 노출될 경우 DNA의 파손원인으로 작용할 수 있기 때문에 장시간 보관에 적합하지 않다.

Silica bead 보관법 및 DNA lysis buffer 주입법은 여과 후, 여과세트에 적용하는 방법이지만 Longmire's 용액 주입법은 현장수에 주입하는 방법으로서 현장에서 여과할 수 없는 경우, 실험실로 운반하는 동안 eDNA 변질을 방지하기 위해서 현장수에 고농도의 Longmire's 용액을 직접 주입하는 것이다(Schrock, 2013; Wegleitner *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2016). 하지만 현장수를 채수하여 실험실로 운반하는 방법은 채수용량 및 운반량의 한계로 인해 많은 지점에서 eDNA를 채집하기에는 적합하지 않은 eDNA 채집방법으로 판단된다.

4) eDNA 보존 및 고정방법 선정

eDNA를 보존하기 위해 다양한 용액(buffer)들이 사용되어 왔으며, 현재까지 에탄올과 RNA later가 가장 많이 사용되었다. 향후 eDNA를 보존하는 방법은 앞선 두 용액을 기반으로 다양한 첨가물을 혼합하여 사용하는 방향으로 연구가 진행될 것으로 판단된다. 하지만 혼합에 사용하는 각각의 용액이 단일로는 eDNA 보존이 우수할 수 있으나, 여러 용액들의 혼합에 따른 영향을 사전연구 없이 적용하는 것은 용매 간 반발작용에 따라 보존 효율을 저해시킬 수 있다. U.S.EPA에서도 공식적인 eDNA protocol 지침서를 발간하

였으며 에탄올과 RNA later 모두 사용 가능하기 때문에 연구 대상생물에 따라서 적합한 보존액을 사용하는 것을 권장하고 있다(Hobbs *et al.*, 2017). 따라서 본격적인 eDNA 채집이 이루어지기 이전에 사용자의 대상 생물군 DNA 보존에 적합한 보존용액을 선정하여 사용해야 한다.

4. eDNA 추출방법(Crude eDNA extract method)

추출과정은 세포 내부에 존재하는 Intracellular eDNA를 세포 밖으로 꺼내는 과정으로서 정제과정까지 포함하여 지칭한다(McDill, 2009). 특히 eDNA 추출 과정에 사용되는 기법과 시약의 종류에 따라서 eDNA의 농도와 순도의 차이가 발생하며 이는 eDNA 실험결과에 많은 영향을 미친다. 현재 eDNA 연구에서 사용되는 DNA 추출 kit는 DNeasy Blood and Tissue DNA extraction kit (hereafter DNeasy, Qiagen, Hilden, Germany), PowerWater DNA Extraction Kit (PowerWater, Qiagen), PowerSoil DNA Extraction Kit (PowerSoil, Qiagen), PowerMax Soil (Qiagen), QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen), DNeasy mericon Food Kit (Qiagen) 등이 사용되고 있으며 kit 종류에 따라서 추출과정과 시약의 성분 및 조합의 차이가 존재한다(Tsuji *et al.*, 2019; Shu *et al.*, 2020). 추출과정과 시약의 차이는 추출하는 eDNA의 농도 및 순도의 차이로 이어질 수 있으며, 이는 동일한 시료에서 서로 다른 결과가 나타날 수 있는 가능성을 증가시킨다. DNA 추출 kit가 다양해짐에 따라 서로 상이한 DNA 추출 Protocol이 존재하지만, 크게 나누어 보면 모든 Protocol은 ① 파쇄 및 추출(Cell lysis and crude extraction), ② 농축 및 정제(Concentration and Purification), ③ 용출(Elution)의 세 단계로 나눌 수 있다. 농축 및 정제 방법은 거의 모든 kit에서 컬럼을 이용한 정제방법을 사용하고 있으며 Nuclease Free water 또는 TAE buffer를 이용하여 eDNA를 용출하고 있다. 따라서 본 연구에서는 파쇄 및 추출방법을 중심으로 기술하였다.

1) eDNA 추출을 위한 세포파쇄

파쇄 및 추출 단계(Lysis and extraction)는 물리적 및 화학적 방법을 이용하여 DNA를 보호하는 세포벽 및 세포막을 파쇄하고 세포 내부에 존재하는 DNA를 용출시키는 과정이다. 물리적 방법(Mechanical lysis)과 화학적 방법(Chemical/Enzymatic Lysis)으로 구분할 수 있으며 다양한 물리적 도구 및 효소물질을 주로 사용한다(Table 4).

물리적 방법에서 많이 이용하는 Freeze thaw 방법은 세포를 -80°C 에서 30분 동안 초냉동(Deep freezing)한 뒤, 즉시 60°C 중탕하여 세포를 급격히 해동하는 과정을 3~5회 반복한다. 이 과정에서 세포가 수축과 팽창을 반복하며 파쇄

Table 4. Overview of variables examined in nucleic acid extraction methods. Modified from Lever *et al.* (2015).

Method		Mechanism
Mechanical methods	Bead-beating	Break up particles containing cells, dislodge cells, and/or mechanically destroy cells
	Homogenizer	Break up particles containing cells, dislodge cells, and/or mechanically destroy cells
	Freeze-thawing	Cell cracking by ice crystals
	Heat	Heat-stimulation of chaotropic chemicals, surfactants, protein, lipid-, and peptidoglycan-degrading enzymes
Chemical and Enzymatic methods	Tris Hydrochloride (Tris-HCl)	Buffers pH of lysis solutions at levels that are suited for enzymatic treatments
	Na ₂ EDTA (EDTA)	Inactivates nucleases
	Guanidium hydrochloride	Denatures proteins
	Triton X-100	Disrupts cell membranes
	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Anionic surfactant that disrupts cell membranes and denatures proteins
	Phenol-chloroform-isoamylalcohol (PCI; 25 : 24 : 1)	Phenol denatures proteins. Chloroform dissolves/ binds nonpolar constituents. Isoamylalcohol stabilizes interface of phenol-chloroform and aqueous extract
	Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)	Cationic surfactant that disrupts cell membranes
	Proteinase K	Destroys proteins (structural, membrane-bound and enzymatic)
	Lysozyme (muramidase)	Hydrolyzes N-acetylmuramic acid N-acetylglucosamine bonds
	Lipase Typ7	Hydrolysis of lipids
	2-hydroxyquinoline	Antioxidant; prevents phenol oxidation.
	β-mercaptoethanol	Antioxidant, prevents phenol oxidation, and reduces disulfide bonds
tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP)	Same as β-mercaptoethanol	

되는 원리로 eDNA를 추출한다(Fraser *et al.*, 2005). 이를 위해 초냉동고(Deep freezer) 또는 액체질소가 반드시 필요하며 주로 수층 eDNA 및 배양시료 DNA를 추출하는 방법으로 사용된다. Bead beating 방법은 eDNA 시료가 담겨있는 Micro tube에 Silica 성분의 Micro bead를 적당량 옮겨 담은 후, 5~10분 동안 Vortex 한다(Tsai *et al.*, 1991; Fujimoto *et al.*, 2004). 이 과정에서 발생하는 Bead의 물리적 충격으로 세포를 파쇄하고 DNA를 용출시킨다. Bead beating 방법은 주로 퇴적층의 eDNA를 추출하기 위한 방법으로 사용된다(MacGregor *et al.*, 1997; Hurt *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2004). Bead-beating 파쇄법은 수층의 eDNA 추출과정에서도 자주 사용되며 수층 eDNA를 추출하는 경우에는 에탄올 보다는 냉동(-10°C 이하) 상태에서 더 많은 eDNA가 추출되었다(Hundermark *et al.*, 2020). 다만 현재 존재하는 토양 DNA kit는 소량(0.5~0.8 g)의 퇴적물을 사용하여 eDNA를 추출한다. 퇴적층 내 존재하는 남조류 및 식물플랑크톤을 대상으로 한다면 0.5~0.8 g은 매우 적은 양이며 충분한 농도의 eDNA를 확보하기 위해서는 3~5 반복의 eDNA 추출이 필요하다.

화학적 방법은 분해효소(ex: Proteinase K) 또는 다양한 세포 용출(Lysis) 용액을 시료에 주입하여 세포를 파쇄하고 eDNA를 추출하는 방법이다(Smalla *et al.*, 1993; Zhou

et al., 1996; Abdel-Latif *et al.*, 2017). Lysis 용액은 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 및 NaOH, EDTA (Ethylene-diamine-tetra acetic acid) 등의 성분으로 많은 DNA 추출 kit에서 제공하는 시약이다(Chauhan, 2018). 해당 시약들은 세포벽 및 세포막에 작용하여 이를 용해시켜 DNA를 추출할 수 있는 작용을 하며, 일부 연구에서는 효소와 화학물질이 혼합된 Lysis Cocktail을 제작하여 사용한다(Osmundson *et al.*, 2013; Gargouri *et al.*, 2018). 화학적 파쇄법은 시약을 주입하는 간편한 방법으로 세포를 파쇄할 수 있으나 세포의 종류와 구조에 따라서 세포파쇄 효율이 달라질 수 있으며, 이로 인해 물리적 파쇄법에 비해서 추출 효율이 낮을 수 있다.

현재 연구자들은 DNA 추출 kit에서 제시하는 Protocol을 사용하거나 연구실 자체에서 kit protocol을 변형하여 eDNA를 추출하고 있으며 대부분 사용이 간편하고, eDNA 추출 효율이 보장된 DNA 추출 kit protocol을 사용하여 eDNA를 추출하고 있다(Ficetola *et al.*, 2008). 특히 과거 2008~2012년에는 거의 대부분 연구에서 eDNA 추출이 DNA 추출 kit를 사용하여 이루어졌으며 2012~14년부터 DNA 추출 kit의 protocol을 변형하여 eDNA를 추출하였다(Barnes *et al.*, 2014; Turner *et al.*, 2014a; Renshaw *et al.*, 2015). 하지만 70% 이상의 많은 연구에서 DNA 추출 kit의 Protocol을 그

대로 적용하였으며 일부 15% 정도의 연구에서만 변형된 Protocol을 사용하였다(Tsuji *et al.*, 2019).

물리-화학 복합 파쇄법은 액체질소를 이용한 Freezing thaw 또는 Bead-beating 과정에서 Lysis 용액(Proteinase K와 SDS 용액) 혹은 보존제(RNA later)를 첨가하여 세포파쇄 효율을 증가시키는 방법으로서 담수 및 해양 환경에서 eDNA를 추출할 때 사용하였다(Ushio, 2019). 이러한 화학적-물리적 방법은 기존의 화학적 파쇄법의 단일 처리군보다 1.5~10배 가까이 DNA 농도가 증가하였을 뿐만 아니라 eDNA를 통해 분석할 수 있는 종 풍부도 또한 1.5배 이상 증가하였다. 이 밖에도 물리-화학 파쇄법을 적용하여 용출된 eDNA 시료의 수율(Yield)을 높이기 위해 Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 용액을 첨가한 후 원심분리하여 상층에 DNA를 농축하는 방법이 사용되었다(Park *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2018)

2) 일본 eDNA 학회의 eDNA 추출 방법

일본은 eDNA 학회를 통해 eDNA 추출만을 위한 전용 추출법을 지침서에 제시하고 있다(Minamoto, 2019; Miya, 2019; Minamoto *et al.*, 2021). 화학적 방법을 기반으로 유리섬유(GF/F) 여과지를 사용하는 방법과 Sterivex filter를 이용하여 추출하는 방법을 모두 제시하였으며 두 방법은 eDNA 학회 추출법만의 특징이 존재한다. 유리섬유 추출법의 큰 특징은 의학계에서 사용하는 Salivette tube를 eDNA 추출과정에 적용함으로써 eDNA가 채집된 여과지를 보관할 뿐만 아니라 언제든지 tube를 교체하지 않고 eDNA를 추출할 수 있다. 또한 Salivette tube는 원심분리를 통해 여과지로부터 추출된 eDNA를 분리할 수 있으며, eDNA가 제거된 여과지를 쉽게 제거할 수 있다. Sterivex filter 추출법은 원심분리를 통해 내부에 존재하는 eDNA 추출물을 수확(Harvesting)할 수 있다. 일본 eDNA 학회 방법은 Sterivex filter를 이용하여 eDNA를 채집한 후, 내부에 Lysis Cocktail을 주입하고 56°C, 30분 동안 Rotator로 회전시키며 배양한다. 배양과정에서 세포가 파쇄되어 세포 밖으로 DNA가 용출되고, 원심분리하여 Sterivex filter 내부에 존재하는 eDNA 용출액을 수거한다. 이를 통해 Sterivex filter를 파손하거나 내부 여과지를 절단하지 않고 eDNA 추출이 가능하다. 두 가지 방법 모두 추출이 완료된 후 DNA extraction kit (Blood and Tissue kit, Qiagen Co.)의 정제 컬럼을 사용하여 eDNA의 순도를 높인다. 이 과정에서 외부오염이 발생하기 쉽기 때문에 실험자의 주의가 요구된다. 더욱이 eDNA 추출과정에서 세포 잔여물이 대량으로 발생하였을 때, 정제과정에서 컬럼 폐쇄현상이 발생할 수 있기 때문에 추출물을 옮기는 과정에서 주의가 필요하다.

3) 수생태계 eDNA 추출 및 정제방법 제시

eDNA는 실제 관찰을 하지 않더라도 생물군집 및 대상생물 탐색을 수행할 수 있는 장점이 특징이다. 또한 한 번에 많은 수의 시료를 분석함으로써 연구자 한 명이 보다 넓은 지역에 대해서 분석할 수 있다. 또한 여과하는 현장수의 부피가 클수록 eDNA의 농도가 증가하기 때문에 보다 다양한 생물의 eDNA를 채집할 수 있다. 하지만 eDNA 시료 수는 지점의 수와 함께 급격히 증가하기 때문에 이로 인한 eDNA 추출 과정의 소요시간을 효과적으로 감소시킬 필요가 있다. 작은 저수지에서 eDNA를 채집한다고 가정하였을 때, 현재 사용되고 있는 Sterivex filter는 여과면적이 약 10 cm²로 평균적으로 100~200 mL의 현장수를 여과할 수 있다. 하지만 100~200 mL의 현장수가 저수지 전체를 대변할 수 없으며, 이를 대변하기 위해 3~4개 지점에서 eDNA를 추가 채집해야 한다. 결과적으로 작은 저수지의 생물다양성을 파악하기 위해서는 3~4개의 Sterivex filter가 소모된다. 더욱이 저수지의 수가 증가하거나 저수지의 크기가 클수록 소모되는 Sterivex filter의 수는 급격히 증가하며 높은 가격으로 인해 연구비의 부담이 발생할 수 있다.

따라서 Sterivex filter보다 여과면적 및 여과량이 우수한 여과세트를 구축, 활용한다면 eDNA 채집 효율을 극대화할 수 있다고 판단된다. 또한 Sterivex filter의 주입구 내경 지름은 약 0.5 cm 수준으로 매우 좁다. 이러한 좁은 내경 지름은 현장수를 주입할 때 높은 압력을 요구한다. 따라서 현장수 주입구 내경 지름을 보다 크게 하여 현장수 여과 시 필요압력 기준을 낮출 필요가 있다. 현재 개발이 진행중인 eDNA 채집 kit는 이러한 Sterivex filter의 한계점을 개선하였고, 기존의 추출과정에 적용할 수 있도록 디자인되었다(Fig. 9). 새로운 eDNA 채집 kit의 여과면적은 약 421.2 cm²로 Sterivex filter 여과면적보다 약 40배 이상 크다. 따라서 Sterivex filter와 비교하여 최소 10배 이상 여과량이 높을 것으로 판단된다. 이는 저수지의 eDNA를 채집한다고 가정하였을 때, 하나의 eDNA 채집 kit를 사용하여 5개 지점에서 200 mL씩 여과할 수 있으며 eDNA 채집 kit 소모량을 대폭 감소시킬 수 있다.

이외에도 DNA 정제 단계에서 많은 DNA 추출 kit는 DNA 순도를 높이기 위해 컬럼을 사용하고 있다. 이러한 컬럼을 이용한 DNA 정제는 간편하지만 6000 G 또는 12,000 rpm으로 고속 원심분리해야 하기 때문에 반드시 초원심분리가 필요하다. 해당 장비들은 전기를 필수적으로 사용하여 하기 때문에 eDNA 추출이 실험실에서만 수행 가능하다. 또한 앞서 설명한 것과 같이 eDNA 추출물에 세포 잔여물(Debris)이 대량으로 존재할 경우에는 컬럼 폐쇄 현상이 발생할 수 있으며 이로 인해 컬럼의 정제효율이 급격히 감소

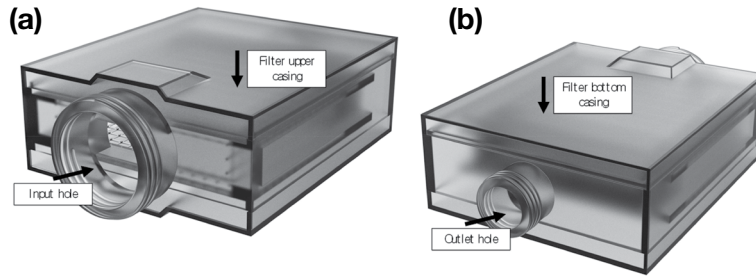


Fig. 9. eDNA filtering kit Prototype design (Application number: 10-2021-0124789). (a) Front view with injection hole, (b) Back side view with outlet hole.

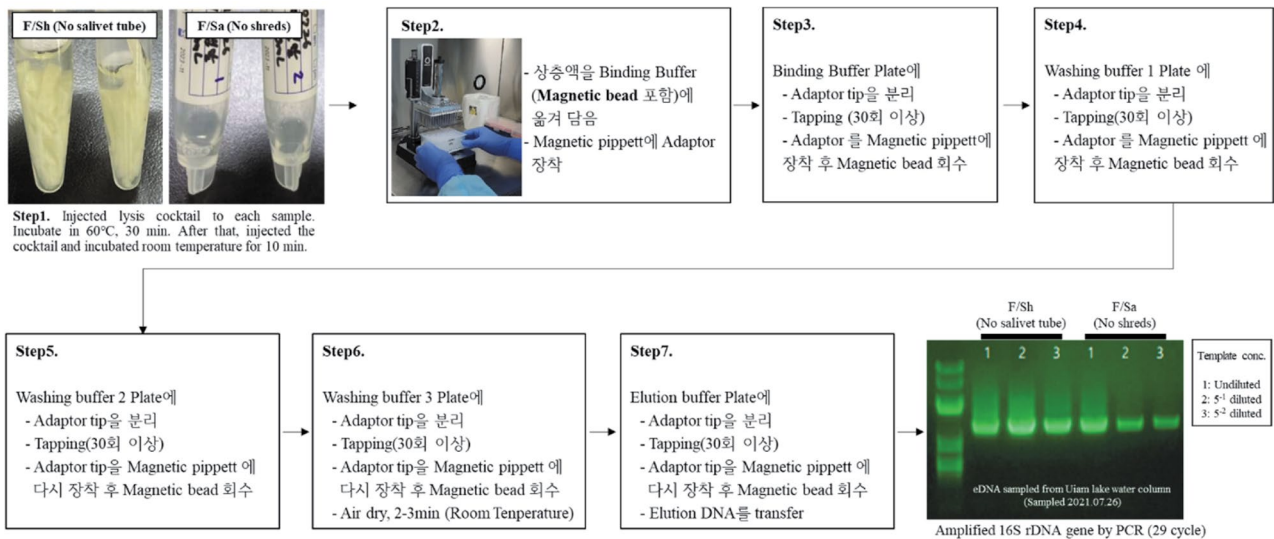


Fig. 10. Suggestion of eDNA extraction and purification methods using magnetic bead. (F/Sh) Filter paper by shred (No salivet tube). (F/Sa) Filter paper with Salivet tube (No Shred).

할 수 있다.

이러한 컬럼의 한계점을 개선하기 위해 일부 DNA 추출 kit는 정제 과정에서 Magnetic bead를 사용하고 있다 (Kovačević 2016; Biofact, 2021). Magnetic bead는 nano (nm) 크기의 자력을 가진 bead로서 표면에 DNA와 결합할 수 있는 물질로 둘러싸여 있다 (Bosnes *et al.*, 1997; Berensmeier, 2006; Azimi *et al.*, 2011). 유리섬유 여과지를 이용하여 채집한 eDNA를 Magnetic bead로 정제하였을 때, eDNA의 수율 (Yield)은 컬럼방식의 수율보다 약 1.5배 이상 우수하였다 (Gane, 2019; Sanches *et al.*, 2019). Magnetic bead가 DNA를 정제하는 과정은 다음과 같다 (Fig. 10). 세포가 파쇄되어 용출된 DNA 물질과 Magnetic bead를 혼합한 후 30초~1분 동안 약하게 교반 (Tapping)하여 DNA와 Magnetic bead를 결합시킨다. 이후 자석을 이용하여 DNA와 결합된 Magnetic bead를 분리하고, DNA 세척용액으로

옮겨 담는다. 30초~1분 동안 약하게 교반하여 배양한 뒤, 자석을 이용하여 새로운 세척용액으로 옮겨 담는다. 동일한 과정을 반복하여 DNA를 정제한다. Magnetic bead를 이용한 eDNA 정제는 원심분리를 하지 않기 때문에 전기가 필요하지 않으며 피펫만 있으면 현장에서 사용이 가능하다. 즉, 현장에서 eDNA의 채집뿐만 아니라 추출 및 정제와 용출까지 가능한 장점이 있다.

결론

eDNA를 이용한 수생태계 생물 모니터링 방법은 대상 생물을 채집하지 않아도 수층에 존재하는 DNA를 분석함으로써 대상 생물의 서식 여부를 판단할 수 있는 기술이다. 이러한 eDNA를 이용한 수생태 모니터링 및 지표생물 탐색은 이

미 세계적으로 많은 지역에서 수행되고 있다. eDNA 기술의 특성으로 인해 생물을 채집하기 위한 전문적인 기술이 필요하지 않으며 eDNA를 채집하기 위한 기본적인 지식만 있으면 수생태계에 존재하는 생물들을 모니터링할 수 있다는 것을 의미한다.

국내 eDNA 연구는 초기 단계로써 방법론 적인 통일이 필요한 시기이다. eDNA 연구가 지속적으로 사용되고 발전하며 나아가 국가적 모니터링 방법으로서 인정받기 위해서는 수질 공정시험법과 같이 공인된 조사 및 분석 지침이 마련되어야 한다. 뿐만 아니라 전문적인 채집도구의 개발이 필수적으로 이루어져야 한다. 이를 위해 다양한 생물과 다양한 도구들을 이용한 eDNA 채집 및 추출 효율이 가장 높은 방법에 대한 개발연구가 수행되어야 한다. 또한 다양한 수환경(하천, 하구, 논, 습지 등) 별로 각각에 최적화된 eDNA를 채집하고 추출하기 위한 방법들이 지침으로서 제시되어야 한다.

현재 국내에서는 공식적으로 통일된 eDNA 추출 방법이 존재하지 않는다. 동일한 환경과 시료에서도 연구자가 사용하는 DNA 추출 kit에 따라서 효율과 추출농도가 다를 수 있으며, 이는 동일한 시료에서 서로 다른 결과를 초래할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 eDNA 전용 추출법의 제안은 유전자를 추출하는 연구자가 서로 다르더라도 유사한 농도와 순도의 추출결과를 얻을 수 있는 안정전장치로 작용할 수 있다. 현재는 일본의 eDNA 추출 방법이 가장 간편하고 빠르며, eDNA 채집 시료 보관도 매우 용이하다. 하지만 이러한 일본의 eDNA 추출 방법을 지속적으로 사용하기에는 국내 연구 방향과 연구환경에 적합하지 않을 수 있으며 이를 위해 국내 환경에 적합한 eDNA 추출 방법을 개발해야 한다.

eDNA를 채집하기 위한 여과지의 공극 및 재질, 여과펌프, 여과세트, eDNA 보존시약, 추출 방법 등 다양한 요인들을 복합적으로 고려해야 하며, 특히 여과지의 재질과 보존시약은 eDNA 추출 방법에 가장 주요한 영향을 미칠 수 있기 때문에 연구 대상 및 환경에 따라 eDNA 실험 전반적인 내용을 고려하여 결정해야 한다. 이러한 지침들과 전문적인 채집도구가 개발되면 eDNA를 이용한 생물 모니터링은 전문가 집단을 넘어 비전문가 집단(예: 시민)까지 활용할 수 있으며 이를 통해 eDNA 연구가 시민과학과 연계되어 한단계 더 발전할 것으로 판단된다.

적 요

환경유전자(eDNA)는 다양한 환경(수중, 토양, 대기)에 존재하는 생물체로부터 유래된 유전물질임을 의미한다. eDNA

는 높은 민감도, 짧은 조사시간 등 많은 장점들이 존재하며 이로 인해 생물 모니터링 및 유해생물과 멸종위기 생물을 탐색하는 분야에 다양하게 활용되고 있다. 이러한 eDNA를 채집하기 위해서는 대상생물 및 대상유전자뿐만 아니라 현장 여과방법 및 eDNA 보존방법과 같이 매우 다양한 항목들을 고려해야 한다. 특히 환경에서 eDNA를 채집하는 방법은 eDNA 농도와 직결되는 항목으로서 적절한 채집방법을 사용하여 eDNA를 채집할 때 정확한 분석결과를 얻을 수 있다. 또한 현장에서 채집한 eDNA를 보존하고 추출하는 과정에서도 정확한 방법을 사용하였을 때 현장에 분포하는 eDNA의 농도를 정확하게 파악할 수 있다. 특히 eDNA 연구를 시작하는 연구자들에게 eDNA 분야는 초기 진입 장벽이 매우 높은 기술로서 이를 위한 기초 자료가 매우 절실하다. 본 연구에서는 본 연구는 eDNA가 수생태계를 연구하기 위한 도구로서 보다 널리 이용되며, eDNA를 이용하기 시작하는 연구자들에게 도움을 주고자 수생태계에서 eDNA를 채집하고 및 운반하는 방법과 실험실에서 eDNA를 추출하는 방법을 소개하고, 보다 간편하고 효율적인 eDNA 채집 도구와 방법을 제시하였다.

저자정보 김건희(건국대학교 상허생명과학대학 휴먼앤에코케어 센터 학술연구교수), 류제하(시온 이엔에스 대표이사), 황순진(건국대학교 상허생명과학대학 환경보건과학과 교수)

저자기여도 개념설정: 김건희, 황순진, 방법론: 김건희, 류제하, 자료제공: 김건희, 류제하, 원고초안작성 및 교정: 김건희, 원고검토: 김건희, 과제관리: 김건희, 연구비 수주: 김건희

이해관계 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

연구비 본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ0150712021)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Abdel-Latif, A. and G. Osman. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods* **13**(1): 1-9.
- Allison, M.J., J.M. Round, L.C. Bergman, A. Mirabzadeh, H. Allen, A. Weir and C.C. Helbing. 2021. The effect of silica desiccation under different storage conditions on filter-immobilized environmental DNA. *BMC Research Notes* **14**(1): 1-6.
- Apothéloz-Perret-Gentil, L., A. Bouchez, T. Cordier, A. Cordonnier, J. Guéguen, F. Rimet, V. Vasselon and J. Pawlowski. 2020. Monitoring the ecological status of rivers with di-

- atom eDNA metabarcoding: A comparison of taxonomic markers and analytical approaches for the inference of a molecular diatom index. *Molecular Ecology* **30**(13): 2959-2968.
- Azimi, S.M., G. Nixon, J. Ahern and W. Balachandran. 2011. A magnetic bead-based DNA extraction and purification microfluidic device. *Microfluidics and Nanofluidics* **11** (2): 157-165.
- Barnes, M.A. and C.R. Turner. 2016. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics* **17**(1): 1-17.
- Barnes, M.A., C.R. Turner, C.L. Jerde, M.A. Renshaw, W.L. Chadderton and D.M. Lodge. 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science & Technology* **48**(3): 1819-1827.
- Berensmeier, S. 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**(3): 495-504.
- Biggs, J., N. Ewald, A. Valentini, C. Gaboriaud, T. Dejean, R.A. Griffiths, J. Foster, J.W. Wilkinson, A. Arnell and P. Brotherton. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* **183**: 19-28.
- Biofact. 2021. DaBead™ Magnetic Bead.
- Blancher, P., E. Lefrançois, F. Rimet and A. Bouchez. 2021. "Strategy for Successful Integration of eDNA-based Methods in Aquatic Monitoring", *ARPHA Conference Abstracts*.
- Blankenship, S.M. and G. Schumer. 2017. Field Collection Procedure for Aquatic Environmental DNA sample collection and analysis, Genidaqs Protocols, GENIDAQS.
- Bohmann, K., A. Evans, M.T.P. Gilbert, G.R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, W.Y. Douglas and M. De Bruyn. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* **29**(6): 358-367.
- Bosnes, M., A. Deggerdal, A. Rian, L. Korsnes and F. Larsen. 1997. Magnetic separation in molecular biology, Springer.
- Boussarie, G., J. Bakker, O.S. Wangenstein, S. Mariani, L. Bonnin, J.-B. Juhel, J.J. Kiszka, M. Kulbicki, S. Manel and W.D. Robbins. 2018. Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks. *Science Advances* **4**(5).
- Carim, K., T. Wilcox, M. Young, K. McKelvey and M. Schwartz. 2015. Protocol for collecting eDNA samples from streams [Version 2.3], Boise, ID: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Boise Aquatic Sciences Lab. 10 p. Online: <http://www.fs.fed.us/research/genomics-center/docs/edna/edna-protocol.pdf>.
- Carim, K.J., K.S. McKelvey, M.K. Young, T.M. Wilcox and M.K. Schwartz. 2016. A protocol for collecting environmental DNA samples from streams. *Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-355*. Fort Collins, CO: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 18 p., 355.
- Chauhan, T. 2018. How to Prepare Lysis Buffer for Different Types of DNA Extraction Methods?. Genetic Education, Cheatham, T.E., M.F. Crowley, T. Fox and P.A. Kollman. 1997. A molecular level picture of the stabilization of A-DNA in mixed ethanol-water solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**(18): 9626-9630.
- Cheng, M., A. Cook, T. Fukushima and P. Bond. 2011. Evidence of compositional differences between the extracellular and intracellular DNA of a granular sludge biofilm. *Letters in Applied Microbiology* **53**(1): 1-7.
- Costa, R., N. Gomes, A. Milling and K. Smalla. 2004. An optimized protocol for simultaneous extraction of DNA and RNA from soils. *Brazilian Journal of Microbiology* **35**: 230-234.
- Creer, S., K. Deiner, S. Frey, D. Porazinska, P. Taberlet, W.K. Thomas, C. Potter and H.M. Bik. 2016. The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution* **7**(9): 1008-1018.
- Cruaud, P., A. Vigneron, M.S. Fradette, S.J. Charette, M.J. Rodriguez, C.C. Dorea and A.I. Culley. 2017. Open the Sterivex-TM casing: an easy and effective way to improve DNA extraction yields. *Limnology and Oceanography: Methods* **15**(12): 1015-1020.
- Edmunds, R.C., M. Cooper, R. Huerlimann, H. Robson and D. Burrows. 2019. Environmental DNA survey of Eureka Creek, Upper Mitchell and Walsh River for two invasive tilapia species, Report.
- Ficetola, G.F., C. Miaud, F. Pompanon and P. Taberlet. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* **4**(4): 423-425.
- Fraser, L. and J. Strzeżek. 2005. Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reproduction in Domestic Animals* **40**(6): 530-536.
- Fujimoto, S., Y. Nakagami and F. Kojima. 2004. Optimal bacterial DNA isolation method using bead-beating technique. *Memoirs Kyushu Univ Dep Of Health Scis Of Medical Sch* **3**: 33-38.
- Gane, A. 2019. Magbeads 101: A guide to choosing and using magnetic beads, Genomics and Diagnostic Solutions.
- Gargouri, H. and H. Hadj Kacem. 2018. Evaluation of alternative DNA extraction protocols for the species determination in turkey salami authentication tests. *International Journal of Food Properties* **21**(1): 733-745.
- Hayami, K., M.K. Sakata, T. Inagawa, J. Okitsu, I. Katano, H. Doi, K. Nakai, H. Ichianagi, R.O. Gotoh and M. Miya. 2020. Effects of sampling seasons and locations on fish environmental DNA metabarcoding in dam reservoirs. *Ecology and Evolution* **10**(12): 5354-5367.
- Hinlo, R., D. Gleeson, M. Lintermans and E. Furlan. 2017. Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples, *PLoS One* **12**(6), e0179251.
- Hobbs, J., C. Helbing and N. Veldhoen. 2017. Environmental

- DNA protocol for freshwater aquatic ecosystems version 2.2. Report for the BC Ministry of Environment.
- Hoffman, J.C., J. Schloesser, A.S. Trebitz, G.S. Peterson, M. Gutsch, H. Quinlan and J.R. Kelly. 2016. Sampling design for early detection of aquatic invasive species in Great Lakes ports. *Fisheries* **41**(1): 26-37.
- Howard, M. 2018. Cyanotoxin and cyanobacteria monitoring in lake elsinore and canyon lake, SWAMP-MR-RB8-2018-0004,
- HRWEMD. 2019. Investigation of the outbreak causes and management measures of the taste and odor compound (2-Methylisoborneol) in the North Han River water system (1), Han River Watershed and Environment Management District, Han River Watershed and Environment Management District.
- HRWEMD. 2020. Investigation of the outbreak causes and management measures of the taste and odor compound (2-Methylisoborneol) in the North Han River water system (2), Han River Watershed and Environment Management District, Han River Watershed and Environment Management District.
- Hundermark, E.L. and M.K. Takahashi. 2020. Improving the yield of environmental DNA from filtered aquatic samples. *Conservation Genetics Resources* **12**(1): 49-51.
- Hurt, R.A., X. Qiu, L. Wu, Y. Roh, A. Palumbo, J. Tiedje and J. Zhou. 2001. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(10): 4495-4503.
- Jerde, C.L., A.R. Mahon, W.L. Chadderton and D.M. Lodge. 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* **4**(2): 150-157.
- Junior, N. 2020. DNA and RNA stabilization, Protocols.io.
- Kast, D. 2016. First step of DNA Extraction, Polar TREC.
- Kelly, M., N. Boonham, S. Juggins, P. Kille, D. Mann, D. Pass, M. Sapp, S. Sato, R. Glover and K. Walsh. 2018. A DNA based diatom metabarcoding approach for Water Framework Directive classification of rivers, *Bristol: Environment Agency* **157**.
- Kim, I., J.H. Choi, S. Kim and C.G. Kim. 2019. Identification of Fish Species in the Busan Coast using eDNA Metabarcoding, *The Joint of Korean Society of Oceanography conference*.
- Kim, J.-H., H. Jo, M.-H. Chang, S.-H. Woo, Y. Cho and J.-D. Yoon. 2020a. Application of Environmental DNA for Monitoring of Freshwater Fish in Korea. *Korean Journal of Ecology and Environment* **53**(1): 63-72.
- Kim, K. 2018. Molecular genetic analysis of cyanobacterial harmful material production potential in the North Han River, Korea, Konkuk University.
- Kim, K., Y. Yoon, H. Cho and S.-J. Hwang. 2020b. Molecular Probes to Evaluate the Synthesis and Production Potential of an Odorous Compound (2-methylisoborneol) in Cyanobacteria. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**(6): 1933.
- Kitagawa, T., K. Muraoka, T. Yamada and K. Nakamura. 2020. Analysis for trial cases of environmental DNA metabarcoding to fish survey in the National Census on River Environments. *Journal of Japan Society of Civil Engineers* **26**: 319-324.
- Kovačević, N. 2016. Magnetic beads based nucleic acid purification for molecular biology applications, Springer.
- Ladell, B.A., L.R. Walleiser, S.G. McCalla, R.A. Erickson and J.J. Amberg. 2019. Ethanol and sodium acetate as a preservation method to delay degradation of environmental DNA. *Conservation Genetics Resources* **11**(1): 83-88.
- Laramie, M.B., D.S. Pilliod, C.S. Goldberg and K.M. Strickler. 2015. Environmental DNA sampling protocol-filtering water to capture DNA from aquatic organisms, US Geological Survey.
- Larson, E.R., B.M. Graham, R. Achury, J.J. Coon, M.K. Daniels, D.K. Gambrell, K.L. Jonassen, G.D. King, N. LaRacune and T.I. Perrin-Stowe. 2020. From eDNA to citizen science: emerging tools for the early detection of invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment* **18**(4): 194-202.
- Lee, D.H., L. Li, L. Andrus and A.M. Prince 2002. Stabilized viral nucleic acids in plasma as an alternative shipping method for NAT. *Transfusion* **42**(4): 409-413.
- Lever, M.A., A. Torti, P. Eickenbusch, A.B. Michaud, T. Šantl-Temkiv and B.B. Jørgensen. 2015. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *Frontiers in Microbiology* **6**: 476.
- Levy-Booth, D.J., R.G. Campbell, R.H. Gulden, M.M. Hart, J.R. Powell, J.N. Klironomos, K.P. Pauls, C.J. Swanton, J.T. Trevors and K.E. Dunfield. 2007. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry* **39**(12): 2977-2991.
- Li, J., L.J. Lawson Handley, D.S. Read and B. Hänfling. 2018. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* **18**(5): 1102-1114.
- Licul, S., R. Impey and A. Weeks. 2021. Alcohol keeps eDNA at the party longer, *ARPHA Conference Abstracts*.
- Lucy, F.E., J. Caffrey, J.T. Dick, E. Davis and N.E. Coughlan. 2021. Prevention, Control and Eradication of Invasive Alien Species. EPA research report, No 368, 2015-NC-MS-4, EPA.
- MacGregor, B.J., D.P. Moser, E.W. Alm, K.H. Neilson and D.A. Stahl. 1997. Crenarchaeota in lake Michigan sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(3): 1178-1181.
- Mächler, E., K. Deiner, F. Spahn and F. Altermatt. 2016. Fishing in the water: effect of sampled water volume on environmental DNA-based detection of macroinvertebrates. *Environmental Science & Technology* **50**(1): 305-312.

- Majaneva, M. 2018. How to best preserve filtered DNA?, NTNU University Museum.
- Majaneva, M., O.H. Diserud, S.H. Eagle, E. Boström, M. Hajibabaei and T. Ekrem. 2018. Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Scientific Reports* **8**(1): 1-11.
- McDill, J. 2009. DNA extraction, Science Learning Hub - Pokapū Akoranga Pūtaiao.
- Merkes, C.M., S.G. McCalla, N.R. Jensen, M.P. Gaikowski and J.J. Amberg. 2014. Persistence of DNA in carcasses, slime and avian feces may affect interpretation of environmental DNA data. *PLoS One* **9**(11): e113346.
- Michael, A.G., A.P. Zoe and A.K. Christina. 2013. Comparison of DNA preservation methods for environmental bacterial community samples. *FEMS Microbiology Ecology* **83**(2): 468-477.
- Minamoto, T. 2019. Water sampling and filtration using glass fiber filters in the laboratory, The eDNA Society.
- Minamoto, T., M. Miya, T. Sado, S. Seino, H. Doi, M. Kondoh, K. Nakamura, T. Takahara, S. Yamamoto and H. Yamana-ka. 2021. An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA* **3**(1): 8-13.
- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamana-ka and H. Araki. 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.
- Miya, M. a. S., T. 2019. Water sampling and on-site filtration using a filter cartridge. The eDNA Society.
- Morrison, C. and C. Kellogg. 2019. Deep search 2019: DEEP Sea exploration to advance research on Coral/Canyon/Cold seep habitats, U.S. Geological Survey, NOAA.
- Na, Y.-K., H. Jo, J.-W. Park, K.-H. Chang and I.-S. Kwak. 2020. The Gut Content Analysis of *Polypedilum scalaenum* in the Large-scale Weirs of 4 Major River Ecosystems. *Korean Journal of Ecology and Environment* **53**(1): 55-62.
- Ogram, A., G.S. Saylor and T. Barkay. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* **7**(2-3): 57-66.
- Osmundson, T.W., C.A. Eyre, K.M. Hayden, J. Dhillon and M.M. Garbelotto. 2013. Back to basics: An evaluation of N a OH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. *Molecular Ecology Resources* **13**(1): 66-74.
- Pall-Corporation. 2021. Advances in filtration techniques and material options are changing the eDNA world, Pall Corporation.
- Park, B.S., S.H. Baek, J.-S. Ki, R.A. Cattolico and M.-S. Han. 2012. Assessment of EvaGreen-based quantitative real-time PCR assay for enumeration of the microalgae *Heterosigma* and *Chattonella* (Raphidophyceae). *Journal of Applied Phycology* **24**(6): 1555-1567.
- Park, B.S., Z. Li, Y.-H. Kang, H.H. Shin, J.-H. Joo and M.-S. Han. 2018. Distinct bloom dynamics of toxic and non-toxic *Microcystis* (cyanobacteria) subpopulations in Hoedong Reservoir (Korea). *Microbial Ecology* **75**(1): 163-173.
- Pawlowski, J., L. Apothéloz-Perret-Gentil, E. Mächler and F. Altermatt. 2020. Environmental DNA applications for biomonitoring and bioassessment in aquatic ecosystems. *Environmental Studies*.
- Pilliod, D.S., R.S. Arkle and M.B. Laramie. 2017. eDNA PROTOCOL SAMPLE COLLECTION, Washington State University, USGS Snake River Field Station
- Piškur, J. and A. Rupprecht. 1995. Aggregated DNA in ethanol solution. *FEBS Letters* **375**(3): 174-178.
- Pocock, M.J., M. Chandler, R. Bonney, I. Thornhill, A. Albin, T. August, S. Bachman, P.M. Brown, D.G.F. Cunha and A. Grez. 2018. A vision for global biodiversity monitoring with citizen science. *Advances in Ecological Research* **59**: 169-223.
- Rees, H.C., B.C. Maddison, D.J. Middleditch, J.R. Patmore and K.C. Gough. 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**(5): 1450-1459.
- Renshaw, M.A., B.P. Olds, C.L. Jerde, M.M. McVeigh and D.M. Lodge. 2015. The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources* **15**(1): 168-176.
- Sanches, T.M. and A.M. Schreier. 2019. Optimizing an eDNA protocol for monitoring endangered Chinook Salmon in the San Francisco Estuary: balancing sensitivity, cost and time, *bioRxiv*, 871368.
- Sassoubre, L.M., K.M. Yamahara, L.D. Gardner, B.A. Block and A.B. Boehm. 2016. Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. *Environmental Science & Technology* **50**(19): 10456-10464.
- Schabacker, J.C., S.J. Amish, B.K. Ellis, B. Gardner, D.L. Miller, E.A. Rutledge, A.J. Sepulveda and G. Luikart. 2020. Increased eDNA detection sensitivity using a novel high-volume water sampling method. *Environmental DNA* **2**(2): 244-251.
- Schill, W.B. 2020. Capture of Environmental DNA (eDNA) from Water Samples by Flocculation. *Journal of Visualized Experiments* **159**: e60967.
- Schrock, S. 2013. Molecular Recipe for Longmire's Solution, Indiana University Ketterson/Nolan research group.
- Schrock, S. and group, K.N.r. 2013. Recipe for Longmire's solution.
- Schwartz, M.K., B.E. Penaluna and T.M. Wilcox. 2017. eDNA - Not just for fisheries biologists anymore - from The Wildlife Professional, U.S Forest service.

- Sepulveda, A.J., J.M. Birch, E.P. Barnhart, C.M. Merkes, K.M. Yamahara, R. Marin, S.M. Kinsey, P.R. Wright and C. Schmidt. 2020. Robotic environmental DNA bio-surveillance of freshwater health. *Scientific Reports* **10**(1): 1-8.
- Shaw, J.L., L.J. Clarke, S.D. Wedderburn, T.C. Barnes, L.S. Weyrich and A. Cooper. 2016. Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation*, **197**: 131-138.
- Shu, L., A. Ludwig and Z. Peng. 2020. Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species. *Genes* **11**(3): 296.
- Smalla, K., N. Cresswell, L.C. Mendonca-Hagler, A. Wolters and J.V. Elsas. 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *Journal of Applied Bacteriology* **74**(1): 78-85.
- Smart, A.S., R. Tingley, A.R. Weeks, A.R. Van Rooyen and M.A. McCarthy. 2015. Environmental DNA sampling is more sensitive than a traditional survey technique for detecting an aquatic invader. *Ecological Applications* **25**(7): 1944-1952.
- Smith-Root. 2021. eDNA Citizen Science Sampler.
- Spens, J., A.R. Evans, D. Halfmaerten, S.W. Knudsen, M.E. Sen Gupta, S.S. Mak, E.E. Sigsgaard and M. Hellström. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution* **8**(5): 635-645.
- Strickler, K.M., A.K. Fremier and C.S. Goldberg. 2015. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms, *Biological Conservation* **183**: 85-92.
- Takahara, T., T. Minamoto and H. Doi. 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS One* **8**(2): e56584.
- Takahashi, S., M.K. Sakata, T. Minamoto and R. Masuda. 2020. Comparing the efficiency of open and enclosed filtration systems in environmental DNA quantification for fish and jellyfish. *PLoS One* **15**(4): e0231718.
- Tapolczai, K., F. Keck, A. Bouchez, F. Rimet, M. Kahlert and V. Vasselon. 2019. Diatom DNA metabarcoding for biomonitoring: strategies to avoid major taxonomical and bioinformatical biases limiting molecular indices capacities. *Frontiers in Ecology and Evolution* **7**: 409.
- ThermoFisher. 2021. How do I use RNAlater to store my tissue/cell sample?.
- Thomas, A.C., J. Howard, P.L. Nguyen, T.A. Seimon and C.S. Goldberg. 2018. eDNA Sampler: A fully integrated environmental DNA sampling system. *Methods in Ecology and Evolution* **9**(6): 1379-1385.
- Thomas, A.C., P.L. Nguyen, J. Howard and C.S. Goldberg. 2019. A self-preserving, partially biodegradable eDNA filter. *Methods in Ecology and Evolution* **10**(8): 1136-1141.
- Thomsen, P.F. and E. Willerslev. 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* **183**: 4-18.
- Tsai, Y.-L. and B.H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **57**(4): 1070-1074.
- Tsuji, S., T. Takahara, H. Doi, N. Shibata and H. Yamanaka. 2019. The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis - A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA* **1**(2): 99-108.
- Turner, C.R., M.A. Barnes, C.C. Xu, S.E. Jones, C.L. Jerde and D.M. Lodge. 2014a. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution* **5**(7): 676-684.
- Turner, C.R., D.J. Miller, K.J. Coyne and J. Corush. 2014b. Improved methods for capture, extraction, and quantitative assay of environmental DNA from Asian bigheaded carp (*Hypophthalmichthys* spp.). *PLoS One* **9**(12): e114329.
- Ushio, M. 2019. Use of a filter cartridge combined with intra-cartridge bead-beating improves detection of microbial DNA from water samples. *Methods in Ecology and Evolution* **10**(8): 1142-1156.
- Vautier, M., C. Chardon and I. Domaizon. 2021. Fish eDNA: water sampling and filtration through Sterivex filter unit, Protocols.io.
- Wang, S., Z. Yan, B. Hänfling, X. Zheng, P. Wang, J. Fan and J. Li. 2020. Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Science of the Total Environment* **142622**.
- Wegleitner, B.J., C.L. Jerde, A. Tucker, W.L. Chadderton and A.R. Mahon. 2015. Long duration, room temperature preservation of filtered eDNA samples. *Conservation Genetics Resources* **7**(4): 789-791.
- Westfall, K.M., T.W. Therriault and C.L. Abbott. 2021. Targeted Next Generation Sequencing of environmental DNA improves detection and quantification of invasive European green crab (*Carcinus maenas*), *bioRxiv*.
- Williams, K.E., K.P. Huyvaert and A.J. Piaggio. 2016. No filters, no fridges: a method for preservation of water samples for eDNA analysis. *Bmc Research Notes* **9**(1): 1-5.
- Wong, M.K.-S., M. Nakao and S. Hyodo. 2020. Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. *Scientific Reports* **10**(1): 1-13.
- Zhou, J., M.A. Bruns and J.M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(2): 316-322.