

Original article

유해남조류 발생 잠재성 분석을 위한 eDNA 기반의 퇴적물 전처리 방법: 밀도 구배 원심분리법(Ludox method)

유경은 · 호혜인 · 김현진² · 김건희^{1,*} · 황순진*

건국대학교 환경보건과학과, ¹건국대학교 휴먼엔에코케어센터, ²주식회사 평화엔지니어링

Efficiency of Density Gradient Centrifugation Method (Ludox method) Based on eDNA for the Analysis of Harmful Algal Bloom Potential. Kyeong-Eun Yoo (0000-0002-2659-5466), Hye-In Ho (0000-0003-0749-531X), Hyunjin Kim² (0000-0001-5600-3655), Keonhee Kim^{1,*} (0000-0002-5725-1447) and Soon-Jin Hwang* (0000-0001-7083-5036) (Department of Environmental Health Science, Sanghuh Life Science College, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea; ¹Human & Eco Care Center, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea; ²Pyunghwa Engineering Consultants, Gwangyang Doosan Venture Digm, Anyang-si, Gyeonggi-do 14056, Republic of Korea)

Abstract Environmental DNA (eDNA) can exist in both intracellular and extracellular forms in natural ecosystems. When targeting harmful cyanobacteria, extracellular eDNA indicates the presence of traces of cyanobacteria, while intracellular eDNA indicates the potential for cyanobacteria to occur. However, identifying the “actual” potential for harmful cyanobacteria to occur is difficult using the existing sediment eDNA analysis method, which uses silica beads and cannot distinguish between these two forms of eDNA. This study analyzes the applicability of a density gradient centrifugation method (Ludox method) that can selectively analyze intracellular eDNA in sediment to overcome the limitations of conventional sediment eDNA analysis. PCR was used to amplify the extracted eDNA based on the two different methods, and the relative amount of gene amplification was compared using electrophoresis and Image J application. While the conventional bead beating method uses sediment as it is to extract eDNA, it is unknown whether the *mic* gene amplified from eDNA exists in the cyanobacterial cell or only outside of the cell. However, since the Ludox method concentrates the intracellular eDNA of the sediment through filtration and density gradient, only the *mic* gene present in the cyanobacteria cells could be amplified. Furthermore, the bead beating method can analyze up to 1 g of sediment at a time, whereas the Ludox method can analyze 5 g to 30 g at a time. This gram of sediments makes it possible to search for even a small amount of *mic* gene that cannot be searched by conventional bead beating method. In this study, the Ludox method secured sufficient intracellular gene concentration and clearly distinguished intracellular and extracellular eDNA, enabling more accurate and detailed potential analysis. By using the Ludox method for environmental RNA expression and next-generation sequencing (NGS) of harmful cyanobacteria in the sediment, it will be possible to analyze the potential more realistically.

Key words: environmental DNA, intracellular eDNA, function gene, Ludox, harmful cyanobacteria

Manuscript received 7 March 2023, revised 20 March 2023,
revision accepted 20 March 2023

* Co-corresponding authors: Tel: +82-2-450-3748, Fax: +82-2-456-5062

E-mail: sjhwang@konkuk.ac.kr

Tel: +82-2-452-3749, Fax: +82-2-456-5062

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.

서론

환경유전자(environmental DNA; eDNA)는 물이나 토양, 대기 등의 환경 중에 분포하는 세포 내부(intracellular) 및 외부(extracellular)의 DNA를 총칭하며, 유기체 및 미생물을 직접 분리하지 않고 다양한 환경(흙, 퇴적물, 수체)으로부터 추출한 생물의 유전자를 의미한다(Ficetola *et al.*, 2008). eDNA는 넓은 조사범위 및 조사 시간 그리고 높은 정확도와 유전자 수준의 잠재성 분석 등의 큰 장점이 존재하여 다양한 분야에서 폭 넓게 이용되고 있으며 최근 남조류의 모니터링 연구에서 널리 활용하고 있다(Portt *et al.*, 2006; Sigsgaard *et al.*, 2015; Harper *et al.*, 2019). 특히 US EPA는 수중의 eDNA를 이용하여 상수원 및 휴양지 호수에서 microcystin을 포함한 남조독소(cyanotoxin) 합성 남조류 및 이취미 물질(odor material)을 합성하는 남조류의 발생을 모니터링하고 있다(Creer *et al.*, 2016; Beng and Corlett, 2020). 또한 일본에서도 다양한 저수지에서 발생하는 microcystis의 모니터링에서 eDNA를 적용하여 microcystin 발생 잠재성을 파악하고 있다(Shin and Cho, 1997; Zhang *et al.*, 2022).

담수생태계에 존재하는 남조류의 eDNA는 남조류의 생활사를 통해 생산과 분해과정을 거치며 순환한다(Sassoubre *et al.*, 2016). 남조류의 발생과 함께 세포 내부 eDNA (intracellular eDNA) 형태로 수층 및 퇴적층에 존재하게 되고 세포벽 또는 세포막 등의 보호를 받으며 오랜 시간 수환경에 존재한다. 이후 남조류의 대발생을 거치며 intracellular eDNA가 급격히 증가하게 되고, 이후 세포가 노화되어 사멸하면서 세포 내부에 존재하는 eDNA는 세포 밖으로 용출(lysis)되며 세포 외부 eDNA (extracellular eDNA)로 변하게 된다. 세포 외부의 환경에 노출된 extracellular eDNA는 다양한 환경조건(광도, 자외선, 수온, 박테리아 등)으로 인해 단시간에 자연 분해될 수 있으나, 반대로 진흙, 모래, 점토 그리고 수분이 있는 기질의 생물막에 존재하여 장시간 extracellular eDNA 형태로 자연에 존재할 수 있다(Corinaldesi *et al.*, 2005; Ceccherini *et al.*, 2007). 따라서 이를 활용한다면 퇴적층에 존재하는 남조류의 휴면세포 및 영양세포를 효과적으로 탐색할 수 있으며 남조류의 발생 기원을 연구하는 데 매우 중요한 정보를 제공할 수 있다(Bohmann *et al.*, 2014).

현재 퇴적물의 eDNA를 추출하는 가장 일반적인 방식은 규산질 미세구슬을 이용한 물리적 충격 분리법(silica bead beating method)이다(Mustafa *et al.*, 2017). 하지만 이러한 물리적 충격 분리법은 퇴적층에서 유해남조류의 유전자를 분석함에 있어서 intracellular eDNA와 extracellular eDNA

의 형태를 구분할 수 없는 문제점이 존재한다. 특히 남조류의 발생 잠재성 측면에서 extracellular eDNA 형태는 실제적인 잠재성이 아닌, 가짜 잠재성(fake potential)으로써 세포의 실존 여부를 정확하게 알 수 없기 때문에 잠재성을 과대평가(bluffing potential) 할 수 있다. 따라서 이를 해결하기 위해서는 퇴적층에 존재하는 intracellular eDNA를 선택적으로 농축할 수 있는 전처리 방법을 반드시 적용해야 한다(Turner *et al.*, 2014).

본 연구는 퇴적층에 존재하는 남조류 발생 잠재성의 분자생태학적 연구를 위해 미세규소입자(nano-silica particle)의 Ludox 용액을 이용한 밀도구배 원심분리법(Ludox method)을 기존의 물리적 충격법(silica bead beating method)과 비교하였으며, 이를 통해 Ludox method의 활용가능성을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 조사지점

본 조사는 남조류 대발생이 주로 나타나는 북한강 수계의 의암호와 금강 수계의 대청호를 대상으로 2017~2022년 동안 조류경보제와 수질측정망에서 *Anabaena* 속의 남조류가 우점하는 지점을 선정하여 2022년 7~9월 사이에 1개월 간격으로 퇴적물 채집을 실시하였다. 조사지점은 각 호수별 3지점씩 총 6개의 지점으로 의암호에서는 춘천 하수처리장 방류구앞(CWWT), 공지천합류구(JGS), 의암댐앞(UAD) 지점을 선정하였으며, 대청호에서는 문의 취수탑앞(DM), 추동 취수탑앞(DC), 서화천(DS)을 지점으로 선정하였다(Fig. 1).

2. 퇴적물 채집방법

퇴적물은 core sampler (Uwitec, Austria)를 이용하여 현장에서 수직으로 채집하였다. Core sampler로 채집한 퇴적물은 냉암소(약 4°C) 조건을 유지하며 실험실로 운반하였고, 실험실에서 5 cm 간격으로 깊이에 따라 분리하였다. 분리된 퇴적물은 100 mL 폴리에틸렌 시료병에 담아 분석 전까지 빛을 차단한 환경에서 냉장 보관하였다.

3. 물리적 충격 분리법(Silica Bead Beating method: SBB method)

Silica bead beating method (SBB method)는 다음과 같은 방법으로 수행되었다. 운반된 퇴적물 0.5 g을 정량하여 2 mL silica bead tube에 옮겨 담은 후, 10분 동안 vortexing

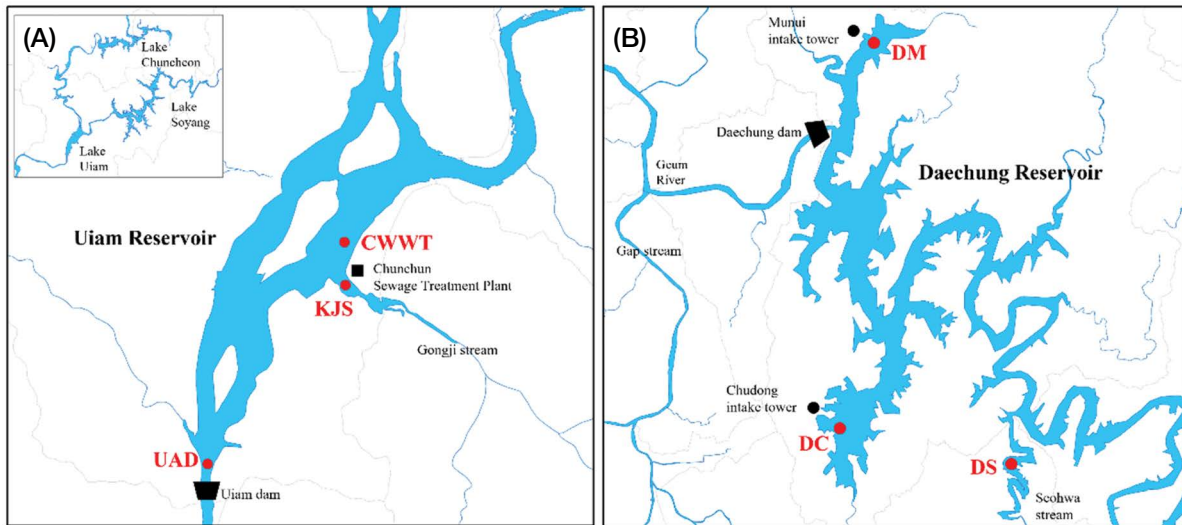


Fig. 1. Study area and sites of sediment sampling (red circles) (A: Uiam Reservoir, B: Daechung Reservoir). The black square indicates Chuncheon Sewage Treatment Plant (CWWT) located in the Uiam Reservoir watershed and the black square indicates intake towers in the Daechung Reservoir watershed. CWWT: the outlet of the sewage treatment plant, KJS: Junction of the Gongji stream, UAD: Uiam dam, DM: Munui intake tower, DC: Chudong intake tower, DS: Seohwa stream.

을 통해 물리적 충격으로 퇴적물과 세포 입자를 분리시키고, 동시에 세포를 파쇄하였다. 토양 입자와 분리된 세포의 DNA 추출은 FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP biomedical, USA)를 이용하여 추출한 후 (Mustafa *et al.*, 2017), 초저온 냉동고 (deep freezer, -80°C)에서 보관하였다. 본 실험에서는 Ludox method와 비교하기 위해 5g의 퇴적물을 0.5g씩 10개의 conical tube에 나누어 담았으며 처리 과정은 기존의 SBB method의 처리 방법을 기준으로 하였다.

4. 밀도 구배 원심분리법 (Ludox method)

Ludox method는 퇴적물을 정량하여 conical tube에 옮겨 담은 후, Ludox용액 (Ludox® HS-40, Grace, USA)을 이용하여 퇴적물과 세포를 분리한 뒤 분리된 세포의 DNA를 추출하는 과정으로 진행하였으며 방법은 다음과 같다. 운반된 퇴적물 5g을 옮겨 담은 conical tube에 퇴적물 용량의 60%의 Ludox 용액을 첨가 후 2000 G 속도로 15분 동안 원심분리하였다. 이후 상등액 25 mL를 pore size 100 μm 와 50 μm 의 Sieve (LABALPHA, USA)를 이용해 size fraction하였고, 마지막으로 20 μm 의 sieve로 여과하여 세포를 수집한 뒤, ϕ 47 mm GF/F 여과지 (Whatman, UK)로 여과·농축하였다. 여과지에 농축된 세포의 DNA는 일본 eDNA 학회에서 제시한 방법에 따라서 추출 후 (Miya and sado, 2019), 초저온 냉동고 (deep freezer, -80°C)에서 보

관하였다. 본 실험에서는 기존의 SBB method와 비교하기 위해 퇴적물의 용량을 0.5g과 5g으로 구분하였으며 전처리 과정은 Ludox method를 기준으로 하였다.

5. PCR 증폭

퇴적물 전처리 방법에 따른 퇴적층의 남조류 DNA 탐색을 비교하기 위해 16S rDNA 유전자, *mic* 유전자를 대상으로 PCR 증폭을 수행하였다. 실험에 사용된 primer 종류와 primer의 활성 조건은 Table 1과 같다 (Nübel *et al.*, 1997; Tsao *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2020b). 실험에 사용된 primer는 100 pmol 농도로 합성하였으며 (Macrogen Co., Korea), 10 pmol 농도로 희석하여 사용하였다. PCR 증폭은 Gradient thermal cycler (A300, LongGene, China)을 이용하여 수행하였으며, 증폭된 PCR 산물은 Dye Loading Star (DYNEBIO, Korea)와 혼합한 뒤, 2% agarose gel에서 30분 동안 전기영동 (MINI-ES, Allsheng, China)하였다. 전기영동이 끝난 agarose gel은 암실에서 UV transilluminator (WUV-M10, DAIHAN Scientific, Korea)의 자외선을 통해 조사하여 사진기 (EOS650D, Canon, Japan)로 촬영하였으며 유전자 증폭 여부 및 증폭된 산물의 크기를 확인하였다. 촬영된 agarose gel 사진에서 Image J (Java 1.8.0, NIH, USA)를 이용하여 증폭 산물의 pixel 값을 확인하였고, 각 증폭 산물의 pixel 값을 비교하여 상대적인 증폭량 (relative amplification)을 확인하였다.

Table 1. Information of primer sequences and target gene used in this study.

Primer	Sequences (5'-3')	Melting temp.	Cycle	Amplicon (bp)	Target gene	Reference
mibC300F mibC300R	TGTTACGCCACCTTCTCTATGTT CAATCTGTAGCACCATGTTGA	53	35	300	2-MIB cyclase gene (<i>mic</i>)	Kim <i>et al.</i> , 2020b
cya106F cya781R(a)	CGGACGGGTGACTAACGCGTGA GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT	60	30	675	16s ribosomal DNA	Nübel <i>et al.</i> , 1997

Temp: Temperature

6. 2-MIB 생합성 유전자(*mic*) 염기서열 계통분석

NCBI의 Genbank에서 *Pseudanabaena*를 비롯한 남조류 strain의 *mic* 염기서열 자료를 이용하여 퇴적물 eDNA에 존재하는 남조류의 *mic* 염기서열을 계통학적으로 분석하였고, 이때 300~700 bp 크기의 유전자 정보를 대상으로 하여 분석을 수행하였다. 유전자 염기서열의 계통수를 분석하기 위해 Clustal W algorithm (Larkin *et al.*, 2007)으로 strain 사이의 염기서열을 정렬한 후, MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021)의 maximum likelihood method를 사용하여 phylogenetic tree를 작성하였다. Phylogenetic tree의 안정성은 bootstrap 분석 (Kosowski *et al.*, 2007)을 사용해 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 퇴적물 전처리 방법에 따른 DNA 증폭효율

DNA 증폭 효율을 비교하기 위해 퇴적물 처리용량을 조절하여 실험실 내에서 비교 분석하였다. 실내검증에서는 퇴적물 0.5 g으로부터 SBB method로 추출한 eDNA는 남조류의 16S rDNA 유전자뿐만 아니라 남조류의 *mic* 유전자까지 모두 증폭되지 않은 반면, Ludox method에서는 675 bp 크기의 16S rDNA 유전자 증폭 산물을 발견할 수 있었으나, *mic* 유전자의 증폭산물을 발견되지 않았다 (Fig. 2A). 퇴적물을 5 g 사용 조건에서도 SBB method는 16S rDNA 유전자를 비롯하여 모든 유전자의 증폭 산물이 발견되지 않았으나, Ludox method에서는 16S rDNA 유전자 증폭 산물과 300 bp의 *mic* 유전자 증폭 산물을 발견할 수 있었다 (Fig. 2B). 또한 Ludox method에서는 퇴적물 0.5 g을 사용하였을 때보다 5 g을 사용하였을 때 더 많은 증폭 산물을 확인할 수 있었다. 또한, 동일한 조건의 퇴적물 용량에서 SBB method보다 Ludox method에서 더 많은 유전자를 증폭할 수 있었다.

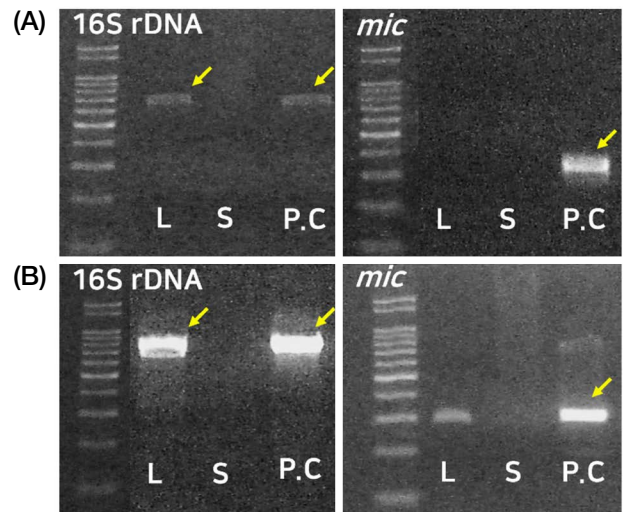


Fig. 2. Comparison of eDNA amplification between sediment pre-treatment method and sediment volume. The volume of sediment sample was 0.5 g (A) and 5 g (B). “L” indicates density gradient centrifugation treatment (Ludox method), and “S” indicates physical bead beating treatment (soil kit method) included in conventional commercial prep kit. “PC” indicates positive control (cyanobacterial strain possessing target genes).

본 실험에서 기존의 SBB method의 처리방법에 따라 퇴적물에서 남조류의 유전자를 분석하였을 때 모든 유전자가 증폭되지 않았으며, 동일한 퇴적물을 10개의 tube에 나누어 담아 5 g의 퇴적물을 분석하였을 때도 유전자가 발견되지 않았다. 이는 SBB method가 가지고 있는 근본적인 한계점으로 SBB method에서 일반적으로 사용되는 silica bead tube는 2 mL의 microtube로써 0.5~1 g의 제한된 퇴적물을 담을 수 있다 (Roose-Amsaleg *et al.*, 2001; Dineen *et al.*, 2010). 또한 SBB method의 처리 시약 효율은 약 0.8 g에서 최대이기 때문에 한 번에 1 g 이상의 퇴적물을 사용하기 어려워 퇴적물의 eDNA 추출에 중요한 요인인 유전자 분석의 해상도 (resolution)에 영향을 미칠 수 있다 (Santoso *et al.*, 2019). 반면에, Ludox method는 conical

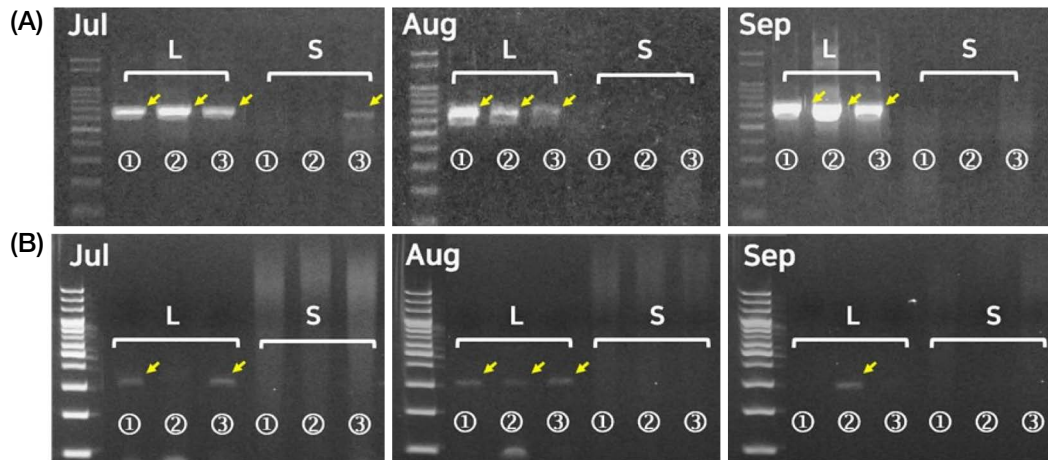


Fig. 3. DNA electrophoresis band of the Uiam Reservoir sediment (A: 16S rDNA, B: *mic*). “L” indicates Ludox separation treatment, and “S” indicates bead beating treatment included in conventional commercial prep kit. Each number on the electrophoresis gel indicates name of sampling site (① UAD, ② JGS, ③ CWWT).

tube를 사용하여 한 번에 30 g까지 처리하기 때문에 유전자 분석 해상도가 더 높은 것으로 판단된다. 또한 기존의 SBB method를 사용하는 soil kit는 퇴적물을 그대로 사용하기 때문에 퇴적물에 존재하는 intracellular eDNA와 extracellular eDNA를 구분할 수 없다(Torti *et al.*, 2015). 반면에 Ludox method는 퇴적물과 세포를 분리하여 DNA를 추출하기 때문에 퇴적물에 존재하는 intracellular eDNA를 선택적으로 분석할 수 있다. 이러한 intracellular eDNA는 실제 수증으로 발아할 수 있는 휴면세포를 의미하기 때문에 남조류의 발생 잠재성을 보다 정확하게 파악할 수 있다(Vuillemin *et al.*, 2017). 따라서 기존의 SBB method보다 Ludox method의 퇴적물 처리가 퇴적물의 남조류 발생 잠재성을 분석하는 데 더욱 효율적인 것으로 판단된다.

2. 밀도 구배 원심분리법의 현장탐색 효율

퇴적물 전처리 방법에 따른 퇴적물 eDNA에 존재하는 남조류 유전자 탐색 결과를 비교 분석하였다. 현장시료에서 남조류의 16S rDNA 유전자와 *mic* 유전자 증폭 결과는 추출법에 따라 차이가 존재하였다. 의암호 수역의 경우, 기존의 SBB method는 7월 CWWT 지점의 퇴적물에서만 16S rDNA 유전자가 발견되었으며, 그 외 모든 시기에 의암호 수역과 대청호 수역에서 *mic* 유전자는 발견되지 않았다. 반면에 Ludox method로 추출한 퇴적물의 eDNA에서 남조류의 16S rDNA 유전자는 조사기간 동안 의암호 수역 모든 지점에서 발견되었다. 또한 *mic*는 7월과 8월에 의암호 수역 UAD, CWWT 지점에서 발견되었으며,

특히 8월에는 모든 지점에서 *mic* 유전자가 발견되었고, 9월에는 JGS 지점의 퇴적물에서만 *mic* 유전자가 발견되었다(Fig. 3B). 대청호 수역의 퇴적물에서도 남조류의 16S rDNA 유전자는 조사기간 동안 모든 지점에서 발견되었다(Fig. 4A). 반면 *mic*는 7월에 모든 지점에서 발견되지 않았으며 8월에는 DC 지점에서만 발견되었고, 9월에는 모든 지점에서 *mic* 유전자가 발견되었다(Fig. 4B). 유전자 증폭 산물의 상대적인 증폭량을 비교하였을 때 Ludox method는 SBB method보다 평균 5배 이상 높았으며, 7월 의암호 수역 CWWT 지점의 퇴적물에서 발견된 16S rDNA 유전자 증폭 산물을 비교하였을 때 Ludox method의 증폭 산물(11,064.54 pixel)이 SBB method의 증폭 산물(2,961.96 pixel)보다 증폭량이 약 3.7배 높았다.

실험결과에서 알 수 있듯이, 본 연구에서 제시한 Ludox method에 따라 전처리한 eDNA에서 SBB method에 비해 높은 빈도로 남조류의 유전자가 발견되었다. 이는 앞서 설명한 바와 같이 처리할 수 있는 퇴적물의 용량이 Ludox method에서 월등히 많은 것으로 해석이 가능하다. 이 밖에도 SBB method는 퇴적물을 그대로 사용하기 때문에 퇴적물에 존재하는 PCR 저해제(inhibitor)를 세척단계에서 제대로 제거하지 않으면 PCR 효율이 급격히 감소할 수 있다(Alaeddini, 2012; Schrader *et al.*, 2012). 반면에 Ludox method는 원심분리 및 여과·농축 과정에서 퇴적물에 존재하는 PCR 저해제(Inhibitor)와 세포가 물리적으로 분리·제거되며, 이로 인해 PCR 증폭이 보다 원활하게 이루어진 것으로 판단된다. 이러한 Ludox method의 특징들로 인해 SBB method보다 퇴적물에 존재하는 남조류의 유전자를

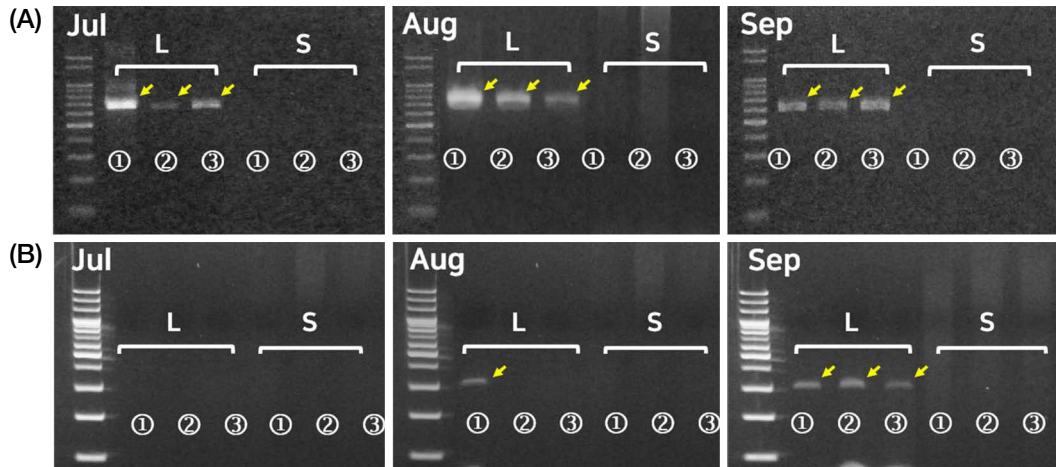


Fig. 4. DNA electrophoresis band of the Daechung Reservoir sediment (A: 16S rDNA, B: *mic*). “L” indicates Ludox separation treatment, and “S” indicates bead beating treatment included in conventional commercial prep kit. Each number on the electrophoresis gel indicates name of sampling site (① DC, ② DM, ③ DS).

보다 세밀하게 탐색할 수 있는 것으로 사료된다.

3. PCR product 염기서열의 계통학적 분석

퇴적물 eDNA에 존재하는 남조류의 *mic* 유전자 염기서열을 계통학적으로 분석하기 위하여, 남조류의 *mic* 유전자 염기서열 사이의 계통수를 분석하였다. 계통수에서 의암호 및 대청호 퇴적층에서 분리된 남조류의 *mic* 유전자는 *Pseudanabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothricoides*의 *mic* 유전자와 매우 가까운 계통군을 형성하였다 (Fig. 5). 의암호 수역에서 발견된 *mic* 유전자는 모두 *Pseudanabaena*의 *mic* 유전자와 하나의 계통군을 형성하였으며 *P. cinerea*의 *mic* 유전자와 매우 가까운 것으로 나타났다. 대청호 수역에서는 DC 지역의 퇴적층에서 발견된 *mic* 유전자가 *Pseudanabaena*의 *mic* 유전자와 하나의 계통군을 형성하였으며 의암호 퇴적층에서 발견된 *mic* 유전자와 계통학적으로 매우 가까웠다. 하지만 DM 지역의 퇴적층에서 발견된 *mic* 유전자는 흔들말목 (*Oscillatoriales*)의 *mic* 유전자와 하나의 계통군을 이루었으며 특히, *Oscillatoria* 및 *Planktothricoides*의 *mic* 유전자와 계통학적으로 매우 가까웠다. 따라서 의암호에서 발생하는 2-MIB는 주로 *Pseudanabaena* 속 남조류가 원인종으로 판단되며, 대청호의 추동과 문의 지점은 각각 *Pseudanabaena* 속과 *Oscillatoria* 속 남조류가 2-MIB 발생 원인종으로 판단된다. 이러한 남조류 유해물질 합성 유전자의 계통학적 특징은 퇴적물 eDNA에서 발생할 수 있는 유해물질 생합성 남조류 종을 파악하고 이를 기반으로 유해물질 발생 원인종

을 파악할 수 있다 (Kim *et al.*, 2020a). 이 밖에도 질소고정 (nitrogen fixation), 세포기낭 (Gas vesicle), 16S rDNA와 같은 기능유전자 및 종 특이적 유전자의 염기서열 분석을 통해 퇴적층에서 발생할 수 있는 남조류의 분자생물학적 분석이 가능하여 퇴적층 남조류 군집 연구에 있어서 매우 중요한 자료를 제공할 수 있을 것으로 판단된다 (Damerval *et al.*, 1989; Hilton *et al.*, 2016). 더욱이 Ludox method을 통해 퇴적층에 존재하는 세포 내부 (intracellular)의 eDNA를 농축하는 것과 함께 세포 밖으로 용출되어 DNA 상태로 존재하는 extracellular eDNA를 원심분리 및 여과과정으로 제거하기 때문에, 퇴적층에서 실제로 발생할 수 있는 세포들의 잠재성 분석이 가능하며 이를 통한 유해남조류 발생 기원 분석 및 잠재성 분석결과의 신뢰도가 더욱 높아질 것으로 판단된다.

결론

물리적 충격 분리법인 SBB method는 원천적으로 퇴적물의 사용량이 매우 적고, 퇴적물을 그대로 사용하기 때문에 퇴적물에 존재하는 extracellular eDNA와 intracellular eDNA를 선택적으로 추출할 수 없다. 이러한 한계점은 퇴적층의 유해남조류 발생 잠재성을 파악함에 있어서 유전자 탐색 해상도의 감소와 extracellular eDNA로 인한 가짜 잠재성으로 인해 퇴적층에 존재하는 유해남조류의 발생 잠재성을 정확하게 파악하기 어렵다. 본 연구에서 적용한 Ludox method는 이러한 SBB method의 한계를 완전

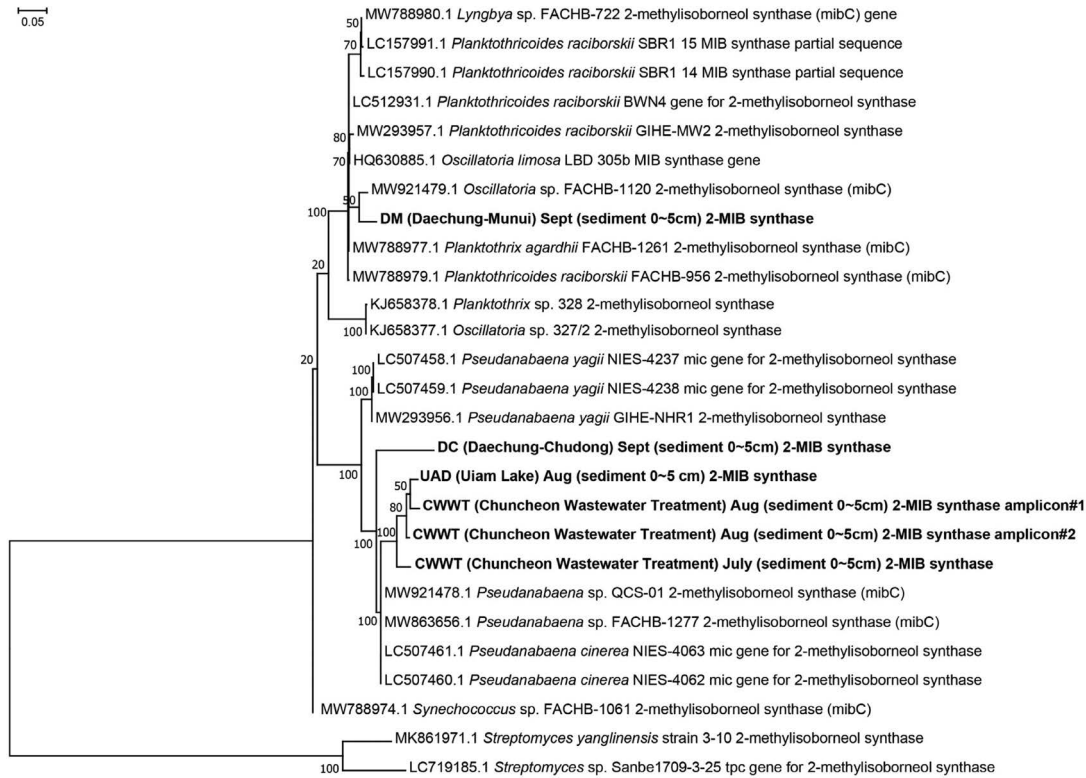


Fig. 5. Phylogenetic relationships of cyanobacterial 2-MIB synthesis gene (*mic*) inferred using neighbor-joining and maximum likelihood analysis. The analyses were conducted based on partial 2-MIB synthesis gene sequence (500 bp). Two strains of *Streptomyces* possessing 2-MIB synthesis gene were used as outgroups for the analysis. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches.

히 극복할 수 있으며, 이를 통해 보다 민감하고 정확한 유해남조류 발생 잠재성 분석을 수행할 수 있다. 더욱이 이러한 Ludox method 과정에서 여과지에 여과·농축된 세포는 eRNA 발현량 및 meta-barcoding 분석에도 사용할 수 있는 장점이 있다. 이를 통해 퇴적층에서 유해남조류 세포의 유해물질 생합성 및 유해물질 생산 원인종과 휴면포자 발아로 인한 유전자 활성 및 휴면포자 종을 유전자 수준에서 파악할 수 있다. 따라서 Ludox를 이용한 밀도구배 원심분리법(Ludox method)은 퇴적층의 남조류 세포 및 eDNA 분석에 있어서 활용성이 매우 높을 것으로 기대된다.

적 요

자연생태계에서 환경유전자 (eDNA)는 세포의 내부 (intracellular)와 외부 (extracellular) 형태로 존재할 수 있다. 유해남조류를 대상으로 할 때, 세포 외부 eDNA는 남조류의 흔적, 세포 내부 eDNA는 남조류의 발생 잠재성을 의

미한다. 하지만 기존의 퇴적물 eDNA 분석법인 silica bead를 이용한 파쇄법으로는 존재 형태를 구분할 수 없기 때문에 실질적인 유해남조류 발생 잠재성을 파악하기 어렵다. 본 연구는 기존의 파쇄법의 한계를 극복하고자 퇴적물 내 세포 내 eDNA를 선택적으로 분석할 수 있는 퇴적물 전처리 방법인 밀도구배 원심분리법(Ludox method)의 적용성을 분석하였다. 그 결과, 기존의 파쇄법은 퇴적물을 그대로 사용하여 eDNA를 추출하기 때문에 eDNA에서 증폭한 *mic* 유전자가 세포 내 존재하는지 혹은 세포 외 DNA로만 존재하는지 알 수 없었다. 하지만 Ludox method는 여과 및 밀도 구배를 통해 퇴적물의 세포 내 eDNA를 농축하므로 남조류 세포 내부에 존재하는 *mic* 유전자만을 증폭할 수 있었다. 결론적으로 Ludox method는 충분한 세포 내부 유전자 농도를 확보하고 세포 내부와 외부의 eDNA를 명확히 구분함으로써 보다 정확하고 세밀한 잠재성 분석이 가능하였다. 이는 퇴적물 유해남조류의 유전자 활성을 확인할 수 있는 eRNA 분석과 차세대염기서열분석(next generation sequencing; NGS)을 이용한 meta-barcoding에

Ludox method를 활용함으로써 보다 현실적인 잠재성을 분석할 수 있을 것으로 판단된다.

저자정보 유경은(건국대학교 환경보건과학과 석사과정), 호혜인(건국대학교 환경보건과학과 석사과정), 김현진(주식회사 평화엔지니어링 수석연구원), 김건희(건국대학교 휴먼앤에코케어센터 학술연구교수), 황순진(건국대학교 교수)

저자기여도 연구설계: 유경은, 김건희, 황순진, 자료수집 및 관리: 유경은, 김건희, 호혜인, 김현진, 자료분석: 유경은, 김건희, 원고작성: 유경은, 김건희, 원고 수정 및 검토: 김건희, 황순진

이해관계 본 연구는 이해관계의 충돌 여지가 없습니다.

연구비 본 연구는 한국환경산업기술원의 ‘수생태계 건강성 확보 기술개발사업’인 ‘최첨단 위치기반 USBL ROV로 붓을 탑재한 휴먼포자 함유 퇴적물 준설 기술 개발’ 과제에 의해 수행되었습니다 (2022003040003).

REFERENCES

- Alaeddini, R. 2012. Forensic implications of PCR inhibition-a review, *Forensic Science International: Genetics* **6**(3): 297-305.
- Beng, K.C. and R.T. Corlett. 2020. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation* **29**: 2089-2121.
- 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.
- Ceccherini, M.T., J. Ascher, G. Pietramellara, T.M. Vogel and P. Nannipieri. 2007. Vertical advection of extracellular DNA by water capillarity in soil columns. *Soil Biology and Biochemistry* **39**(1): 158-163.
- Corinaldesi, C., R. Danovaro and A. Dell'Anno. 2005. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(1): 46-50.
- 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.
- Damerval, T., A.-M. Castets, G. Guglielmi, J. Houmard and N. Tandeau de Marsac. 1989. Occurrence and distribution of gas vesicle genes among cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* **171**(3): 1445-1452.
- Dineen, S., R. Aranda IV, D. Anders and J. Robertson. 2010. An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil. *Journal of Applied Microbiology* **109**(6): 1886-1896.
- 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.
- Harper, L.R., A.S. Buxton, H.C. Rees, K. Bruce, R. Brys, D. Halfmaerten, D.S. Read, H.V. Watson, C.D. Sayer and E.P. Jones. 2019. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia* **826**: 25-41.
- Hilton, J.A., J.C. Meeks and J.P. Zehr. 2016. Surveying DNA elements within functional genes of heterocyst-forming cyanobacteria. *PLoS One* **11**(5): e0156034.
- Kim, K., S. Lee, K. Seo and S.-J. Hwang. 2020a. Molecular Identification of Pseudanabaena Strains and Analysis of 2-MIB Production Potential in the North Han River System. *Korean Journal of Ecology and Environment* **53**(4): 344-354.
- 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.
- Kosowski, R., N.Y. Naik and M. Teo. 2007. Do hedge funds deliver alpha? A Bayesian and bootstrap analysis. *Journal of Financial Economics* **84**(1): 229-264.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm and R. Lopez. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Mustafa, I., Hadiatullah and Sustiyah. 2017. Removal of humic acid from peat soils by using AlCl₃ prior to DNA extraction, AIP Conference Proceedings.
- Miya, M. and T. Sado. 2019. Environmental DNA sampling and experimental manual version 2.1. Ed. by eDNA Methods Standardization Committee, The eDNA Society.
- Nübel, U., F. Garcia-Pichel and G. Muyzer. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8): 3327-3332.
- Portt, C.B., G. Coker, D. Ming and R.G. Randall. 2006. A review of fish sampling methods commonly used in Canadian freshwater habitats. Fisheries and Oceans Canada, Ontario, p. 1-50.
- Roose-Amsaleg, C., E. Garnier-Sillam and M. Harry. 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology* **18**(1): 47-60.
- Santoso, F., B.P. Sampurna, Y.-H. Lai, S.-T. Liang, E. Hao, J.-R. Chen and C.-D. Hsiao. 2019. Development of a simple ImageJ-based method for dynamic blood flow tracking in zebrafish embryos and its application in drug toxicity evaluation. *Inventions* **4**(4): 65.
- 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.
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek and R. Johne. 2012. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* **113**(5): 1014-1026.
- Shin, J. and K. Cho. 1997. Distribution and population dynamics of *Microcystis* (Cyanophyta) in the Naktong River. *Algae* **12**(4): 283-2903.
- Sigsgaard, E.E., H. Carl, P.R. Møller and P.F. Thomsen. 2015. Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation* **183**: 46-52.
- Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* **38**(7): 3022-3027.
- Torti, A., M.A. Lever and B.B. Jørgensen. 2015. Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Marine Genomics* **24**: 185-196.
- Tsao, H.-W., A. Michinaka, H.-K. Yen, S. Giglio, P. Hobson, P. Monis and T.-F. Lin. 2014. Monitoring of geosmin producing *Anabaena circinalis* using quantitative PCR. *Water Research* **49**: 416-425.
- Turner, C.R., D.J. Miller, K.J. Coyne and J. Corush. 2014. Improved methods for capture, extraction, and quantitative assay of environmental DNA from Asian bigheaded carp (*Hypophthalmichthys* spp.). *PLoS One* **9**(12): e114329.
- Vuillemin, A., F. Horn, M. Alawi, C. Henny, D. Wagner, S.A. Crowe and J. Kallmeyer. 2017. Preservation and significance of extracellular DNA in ferruginous sediments from Lake Towuti, Indonesia. *Frontiers in Microbiology* **8**: 1440.
- Zhang, L., J. Yang, Y. Zhang, J. Shi, H. Yu and X. Zhang. 2022. eDNA biomonitoring revealed the ecological effects of water diversion projects between Yangtze River and Tai Lake. *Water Research* **210**: 117994.