

Research Paper

분류군별 외래생물 탐지를 위한 환경 DNA 메타바코딩 활용 가능성

강유진* · 전정은** · 한승우* · 원수연* · 송영근**

서울대학교 협동과정조경학*, 서울대학교 환경대학원 환경조경학과**

Feasibility of Environmental DNA Metabarcoding for Invasive Species Detection According to Taxa

Yujin Kang* · Jeongeun Jeon** · Seungwoo Han* · Suyeon Won* · Youngkeun Song**

Interdisciplinary Program in Landscape Architecture, Seoul National University*

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

요약: 효과적인 외래생물 관리 전략 수립을 위해서는 도입 및 확산 여부 평가를 위한 정기 모니터링이 요구된다. 환경 DNA (eDNA, environmental DNA) 메타바코딩은 높은 검출 민감도를 가지고 다수의 종을 동시에 검출할 수 있어 외래생물의 출현 여부와 그 영향을 평가하는데 활발히 활용되고 있다. 국내에서는 어류를 중심으로 메타바코딩의 적용 가능성 평가가 이루어지고 있으며 타 분류군에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 환경 DNA 메타바코딩을 활용한 국내 외래생물 탐지 가능성을 확인하고자 했다. 분류군별 검출 가능성을 확인하기 위해 어류, 포유류, 조류, 양서류를 목표로 디자인 된 4가지 범용 프라이머(MiFish, MiMammal, MiBird, Amp16S)를 활용하여 대상종 검출 여부를 평가하였다. 그 결과, 총 55개 지점 중 17개 지점(*Trachemys scripta*, 3개 지점; *Cervus nippon*, 3개 지점; *Micropterus salmoides*, 7개 지점; *Rana catesbeiana*, 4개 지점)에서 대상종의 서식이 확인되었다. 대상지 내 조밀한 지점 선정에도 생태적 특성을 반영한 검출 지점에 차이가 나타났다. 큰입배스와 붉은귀거북을 중심으로 외래생물이 출현이 생물 군집구조(종 풍부도, 풍부도, 다양도)에 미치는 영향을 비교한 결과, 외래생물이 서식하는 지점에서의 다양도가 더 높게 나타났다. 또한 외래생물 출현 지점에서 출현 종 수가 1~4종 추가 검출되었으며 풍부도 또한 1.7배 높게 나타났다. 메타바코딩을 통한 외래생물 검출 결과 및 군집구조 비교는 eDNA를 통한 다량의 모니터링 데이터 구축이 다차원적 생태계 평가에 효율적으로 활용될 수 있음을 나타냈다. 또한 환경의 인위적, 자연적 변화에 따른 생물상 변화를 관찰하고 자연생태 분야의 환경영향평가 등 현황 평가 및 예측을 위한 주요한 기초자료로 활용 가능성을 제시하였다.

주요어: 외래종, 차세대 염기서열 분석, 메타바코딩, 생물 모니터링, 환경 DNA

First Author: Yujin Kang, Tel: +82-2-880-8860, E-mail: 202020740@snu.ac.kr, ORCID: 0000-0002-4904-8385

Corresponding Author: Youngkeun Song, Tel: +82-2-880-8860, E-mail: songyoung@snu.ac.kr, ORCID: 0000-0002-6996-3898

Co-Authors: Jeongeun Jeon, Tel: +82-2-880-8860, E-mail: jejeon@snu.ac.kr, ORCID: 0009-0004-9723-730X

Seungwoo Han, Tel: +82-2-880-8860, E-mail: hsw5034@snu.ac.kr, ORCID: 0000-0002-7148-4087

Suyeon Won, Tel: +82-2-880-8860, E-mail: wsy5216@naver.com, ORCID: 0009-9856-9329

Received: 6 February, 2023. Revised: 22 February, 2023. Accepted: 10 March, 2023.

Abstract : In order to establish an effective management strategy for invasive species early detection and regular monitoring are required to assess their introduction or dispersal. Environmental DNA (eDNA) is actively applied to evaluate the fauna including the presence of invasive species as it has high detection sensitivity and can detect multiple species simultaneously. In Korea, the applicability evaluation of metabarcoding is being conducted mainly on fish, and research on other taxa is insufficient. Therefore, this study identified the feasibility of detecting invasive species in Korea using eDNA metabarcoding. In addition, to confirm the possibility of detection by taxa, the detection of target species was evaluated using four universal primers (MiFish, MiMammal, Mibird, Amp16S) designed for fish, mammals, birds, and amphibians. As a result, target species (*Trachemys scripta*, 3 sites; *Cervus nippon*, 3 sites; *Micropterus salmoides*, 7 sites; *Rana catesbeiana*, 4 sites) were detected in 17 of the total 55 sites. Even in the selection of dense sampling sites within the study area, there was a difference in the detection result by reflecting the ecological characteristics of the target species. A comparison of community structures (species richness, abundance and diversity) based on the presence of invasive species focused on *M.salmoides* and *T.scripta*, showed higher diversity at the point where invasive species were detected. Also, 1 to 4 more species were detected and abundance was also up to 1.7 times higher. The results of invasive species detection through metabarcoding and the comparison of community structures indicate that the accumulation of large amounts of monitoring data through eDNA can be efficiently utilized for multidimensional ecosystem evaluation. In addition, it suggested that eDNA can be used as major data for evaluation and prediction, such as tracking biological changes caused by artificial and natural factors and environmental impact assessment.

Keywords : Invasive species, Next generation sequencing, Metabarcoding, Biological monitoring, eDNA

I. 서론

교통수단과 반려동물 시장의 발달로 인해 외국으로부터 의도적·비의도적으로 유입되는 외래생물은 2009년 894종에서 2018년 2,160종으로 대폭 증가하였으며 국내 생태계에 정착 및 확산하는 사례 또한 꾸준히 보고되고 있다(Ministry of Environment, 2019). 국내 생태계로 유입된 외래생물은 토착 생물과 경쟁, 포식, 전염성 질병의 전파를 비롯해 잡종을 형성하는 등 생태적 피해를 초래한다(Vila et al. 2009). 생태계에 정착한 이후에는 방제 및 관리 작업이 어려워지는 만큼 서식 현황을 신속히 파악하고 확산을 방지하는 것이 중요하다. 따라서 국내에서는 외래생물 관리를 위해 주요 외래생물의 분포 및 서식실태 조사를 시행하고 있으며 총 35종(동물 19종, 식물 17종)을 생태계교란 생물로 지정하여 확산 차단 및 퇴

치 사업을 진행하고 있다(Ministry of Environment 2022). 하지만 지역별 특성이나 생물의 생태적 특성 등의 고려가 부족한 일률적인 모니터링 기법을 적용하고 있어, 이를 보완한 체계적이고 면밀한 모니터링 방법이 지속적으로 요구되고 있다.

환경 DNA (eDNA; Environmental DNA)는 생물체에서 유래하여 대기, 토양, 수 환경 등으로 방출된 DNA를 의미한다(Thomsen & Willerslev 2015). 환경 DNA 조사는 미량의 유전물질로도 생물을 검출할 수 있어 서식 밀도가 낮은 멸종위기종 또는 외래생물을 조사하기에 적합하다(Thomsen et al. 2012; Williams et al. 2018). 또한, 생물 동정을 위한 전문 인력이 요구되며 조사 시간 및 시기, 공간적 제약이 있는 전통적인 조사의 한계를 보완하며 신속히 방대한 지점을 대상으로 조사할 수 있다는 장점이 있다(Smart et al. 2015; Song et al. 2019). 환경 DNA

조사 방법론은 표적 PCR을 활용한 단일 종 검출 또는 메타바코딩을 통한 다수의 종 검출에 사용되고 있다. 단일 종 검출은 표적 PCR(quantitative PCR 또는 conventional PCR)과 종 특이적 프라이머(species specific, single-species)를 이용하여 검출 결과를 도출하며 메타바코딩은 차세대 염기서열 분석(NGS, next generation sequencing)을 기반으로 범용 프라이머를 활용하여 검출 여부를 판단한다. 이에 따라 신뢰성 있는 검출 결과 확보를 위한 종 특이적 또는 범용적 프라이머 개발이 이루어지고 있다(Kakuda et al. 2019; Sato et al. 2018; Ushio et al. 2018, 2017). 범용 프라이머는 대표적으로 12S rRNA를 표적으로 한 MiFish universal primer가 있으며 뒤 이어 MiFish를 보완하여 포유류를 대상으로 한 MiMammal, 조류를 대상으로 한 MiBird가 개발되었다. 환경 DNA 검출 결과는 현장에서의 목격 조사를 보완하기 위한 종 출현 데이터로서 대상지 내 생물 종의 시공간적 분포 추정에도 활발히 활용되고 있다. 한 개의 샘플에서 다수의 생물을 동시 검출할 수 있어 어류, 포유류, 양서류·파충류 등 생물상 조사에 적용되고 있으며 군집구조 분석 및 먹이망 분석에도 이용되고 있다(Di Muri et al. 2020; Li et al. 2018; Saenz-Agudelo et al. 2022; Valentini et al. 2016). 국내에서는 환경 DNA의 메타바코딩 활용 가능성을 평가하기 위해 담수 어류를 중심으로 제한된 환경인 수조 및 도시 하천과 같은 수 환경에서 전통적인 조사와 함께 결과 비교 분석이 진행되어 잠재성을 확인한 바 있다(Kim & Song 2021; Kim et al. 2020; Song et al. 2019). 하지만 어류를 제외한 포유류, 양서류·파충류를 대상으로 메타바코딩의 적용 가능성을 평가한 연구는 아직 미비한 실정이며 장기적인 환경 DNA 조사 적용 가능성을 평가하기 위해서는 경험적 데이터의 축적이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 환경 DNA 메타바코딩을 활용한 외래생물 탐지 가능성을 확인하고자 했다. 특히 분류군별 검출 가능성을 확인하기 위해 각 분류군 검출을 목적으로 디자인 된 4가지 범용 프라이머(어류, MiFish; 포유류, MiMammal; 조류, MiBird; 양서류, Amp16S)를 활용하여 대상종 검출 여부를 평가하였다.

II. 연구방법

1. 대상지 및 대상종 개요

범용 프라이머를 활용한 분류군(포유류, 어류, 양서류, 파충류)별 외래생물의 검출 가능성을 살펴보고자 각 외래종의 서식이 보고된 대상지 총 55지점을 선정하고 환경 DNA 샘플링 및 수질 측정을 진행하였다(Figure 1, Table 1). 먼저 외래 포유류 검출 가능성은 굴업도에 서식하고 있는 대만꽃사슴(*Cervus nippon taiouanus*)을 대상으로 조사하고 평가하였다. 대만꽃사슴은 국내에 약 5만 개체가 전국적으로 사육되고 있으며 속리산 국립공원 및 굴업도를 포함한 도서 지역에 일부 자연 서식하고 있는 것으로 알려져 있다(Ministry of Environment 2021). 대상지인 굴업도는 1,710km²의 면적에 높은 밀도로 대만꽃사슴이 서식하고 있으므로 쉽게 육안 관찰이 가능하여 대상지로 선정되었으며 채수가 가능한 9개 지점을 대상으로 조사를 진행하였다. 외래어종 검출 가능성 평가는 큰입배스(*Micropterus salmoides*)를 대상으로 진행되었다. 큰입배스는 1970년대 자원 조성용으로 도입되었으며 현재는 전국적으로 확산해 하천 상류를 제외한 대부분의 수역에 서식하고 있다. 안양천 또한 큰입배스의 서식이 확인된 도시하천으로서 큰입배스의 출현 여부를 확인하기 위해 상류부터 한강 합류부인 하루까지 15개 지점에서 조사를 진행했다(Ministry of Environment 2017a, 2017b). 외래 양서류 검출 가능성 평가는 황소개구리(*Rana catesbeiana*)를 대상으로 진행되었다. 황소개구리 또한 1970년대 식용을 목적으로 도입되어 전국에 분포하고 있으며 1998년 생태계 교란 생물로 지정되었다. 황소개구리는 수온이 비교적 높고 유속이 느린 얇은 물가를 선호하는 종으로 서식이 적합한 충청남도의 논 습지 19개 지점을 대상으로 조사를 진행하였다(Information of Korean Alien Species, 2023.01.10). 외래 파충류의 검출 가능성은 붉은귀거북(*Trachemys scripta*)을 통해 평가되었다. 붉은귀거북은 1970년대 애완용 및 종교계 이용 목적으로 도입되어 유기·방사로 자연생태계에 유입되어 전국에 분포하고 있으며 2001년 생태계 교란 생물로 지정되어 관리되고 있다. 조사 대상지

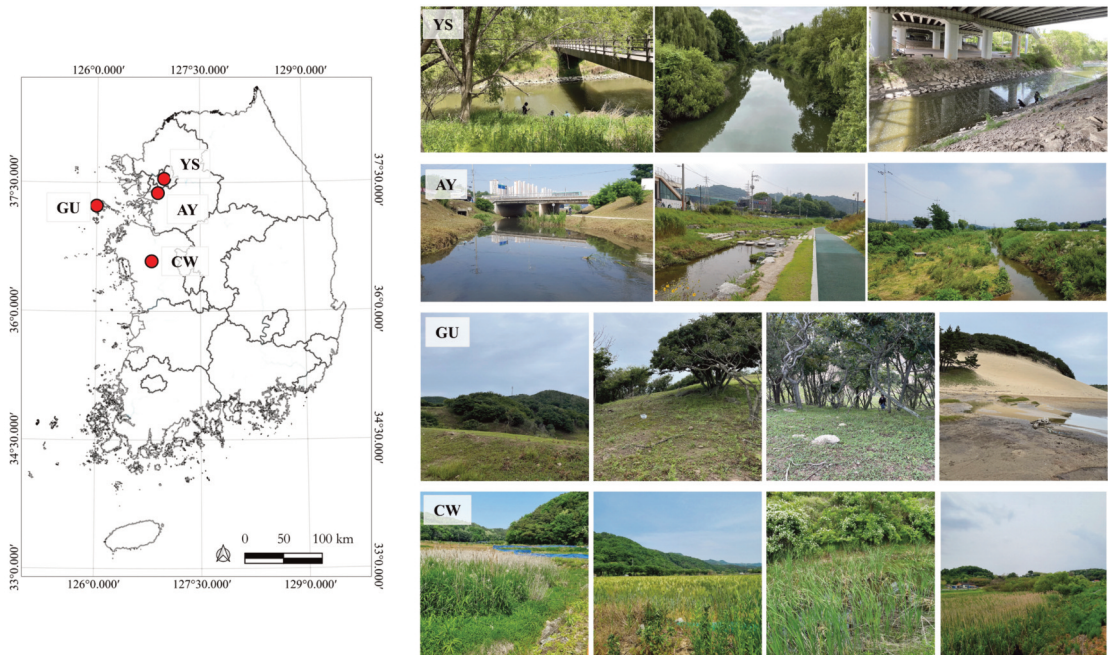


Figure 1. Map of the study area and image. YS, Yeouido Sategang Ecological Park (14 sites); AY, Anyang stream (15 sites); GU, Gulup-do (9 sites); CW, Chungcheongnam-do rice paddy wetlands (19 sites).

Table 1. Coordinates of sampling sites and results of water quality measurement

Sites	Sampling date	Water quality parameters					Coordinate	
		Temp (°C)	DO (mg L ⁻¹)	Cond (µS cm ⁻¹)	Sal	pH	Longitude	Latitude
<i>Gulupdo</i> (Formosan deer, <i>Cervus nippon taiouanus</i>)								
WT10	21.08.26	-	-	-	-	-	125.9778	37.1928
WT11		-	-	-	-	-	125.9810	37.1928
WT9		-	-	-	-	-	125.9737	37.1927
C6		-	-	-	-	-	125.9665	37.1869
C7-1		-	-	-	-	-	125.9709	37.1879
C7-2		-	-	-	-	-	125.9710	37.18788
C7-3		-	-	-	-	-	125.9712	37.18797
Pud1		-	-	-	-	-	125.9673	37.18639
Pud2		-	-	-	-	-	125.9825	37.19287
<i>Anyang stream</i> (Largemouth bass, <i>Micropterus salmoides</i>)								
S1	20.10.24	9.7	10.51	516.6	-	7.85	126.9724	37.34816
S2		8.1	10.73	534.0	-	7.86	126.9562	37.36351
S3		14.8	6.22	681.0	-	7.23	126.9456	37.37318
S4		12.0	9.38	681.0	-	7.88	126.9315	37.39739
S5		11.1	9.77	680.4	-	7.94	126.9148	37.40980
S6		14.2	16.60	662.0	-	9.23	126.8960	37.40367
S7		18.2	7.44	672.0	-	7.12	126.8956	37.41841
S8		18.5	10.29	687.0	-	7.29	126.9008	37.43869
S9		18.5	9.84	669.0	-	7.36	126.8910	37.45816

Table 1. Continued

Sites	Sampling date	Water quality parameters					Coordinate		
		Temp (°C)	DO (mg L ⁻¹)	Cond (μS cm ⁻¹)	Sal	pH	Longitude	Latitude	
S10		17.5	10.32	680.0	-	7.59	126.8772	37.47483	
S11		16.3	8.62	679.0	-	7.71	126.8706	37.49218	
S12		15.9	10.66	662.0	-	7.92	126.8736	37.50847	
S13		15.5	10.64	646.0	-	7.74	126.8798	37.52391	
S14		14.0	8.45	654.0	-	7.70	126.8871	37.53965	
S15		12.9	6.49	634.5	-	7.54	126.8771	37.55331	
<i>Chungchungnamdo (American bullfrog, Rana catesbeiana)</i>									
CW1	22.05.18-19	-	-	-	-	-	127.2162	36.92231	
CW2		21.4	10.32	460.43	0.22	7.72	127.1000	36.86866	
CW3		20.4	7.28	289.03	0.14	7.98	126.9971	36.89619	
CW4		22.7	11.46	114.40	0.05	8.49	126.2729	36.85021	
CW5		21.6	9.78	297.63	0.14	9.14	126.2872	36.82441	
CW6		22.6	6.01	326.70	0.16	7.63	126.3079	36.89586	
CW7		19.8	8.75	328.03	0.16	7.80	126.1978	36.83307	
CW9		18.6	4.07	297.07	0.14	7.63	127.0042	36.75748	
CW10		-	-	-	-	-	127.5543	36.15309	
CW11		19.0	10.20	262.07	0.15	8.38	127.5340	36.13721	
CW12		18.6	12.95	90.03	0.04	7.84	127.4605	36.08862	
CW13		17.4	5.67	164.56	0.08	8.27	126.4296	36.82993	
CW14		-	-	-	-	-	126.4119	36.95936	
CW15		17.6	5.45	364.50	0.18	7.38	126.5207	36.94516	
CW16		17.5	4.12	777.00	12.92	7.21	126.7367	36.91948	
CW17		18.6	5.00	143.76	0.07	7.23	126.7845	36.88839	
CW18		-	-	-	-	-	126.7764	36.87502	
CW20		25.5	5.45	167.87	0.08	7.28	127.2491	36.26105	
<i>Yeouido Saetgang Ecological Park (Red-eared slider, Trachemys scripta)</i>									
YS1		21.07.05	21.33	7.04	313.70	0.15	7.82	126.9201	37.51870
YS2	17.30		7.34	285.97	0.14	7.44	126.9201	37.51804	
YS3	17.90		7.35	284.20	0.14	7.81	126.9159	37.52138	
YS4	18.57		6.59	275.43	0.13	7.57	126.9129	37.52518	
YS5	19.63		7.08	294.80	0.14	7.68	126.9283	37.51586	
YS6	19.50		1.73	346.53	0.17	7.34	126.9392	37.51730	
YS7	20.53		5.04	326.60	0.16	7.54	126.9110	37.52942	
YT1	21.09.04	-	-	-	-	-	126.9302	37.51635	
YT2		-	-	-	-	-	126.9215	37.51834	
YT3		-	-	-	-	-	126.9117	37.52779	
YT4		-	-	-	-	-	126.9175	37.52048	
YT5		-	-	-	-	-	126.9129	37.52607	
YT6		-	-	-	-	-	126.9261	37.51700	
YT7		-	-	-	-	-	126.9315	37.51664	

* Temp, Temperature; DO, Dissolved oxygen; Cond, Conductivity; Sal, Salinity

는 2002년부터 2020년까지 지속해서 붉은귀거북의 출현이 보고되고 있는 여의도 셋강 생태공원 내 육상 7개 지점 및 수상 7개 지점을 선정하여 조사를 진행하였다(Gang et al, 2015; Yeoungdeungpo cultural foundation 2020).

2. 환경 DNA 샘플링 및 추출

환경 DNA 샘플링은 굴업도, 안양천, 여의도, 충청남도 논 습지에서 각각 21년 8월 26일 9개 지점, 20년 10월 24일 15개 지점, 21년 7월 5일과 9월 4일 14개 지점, 22년 5월 18일부터 19일까지 19개 지점 진행하였다(Table 1). 환경 시료 채취를 위해 0.45µm 카트리지 필터(Sterivex, Millipore)와 일회용 30ml 주사기를 이용하여 각 대상지 내에서 채수를 진행하였으며 지점 간 교차오염을 방지하기 위해 지점마다 독립된 실험 재료를 이용하였다. 대상지에 따라 약 100~900ml의 물을 채수하였다. 필터링이 완료된 샘플은 개별적으로 지퍼팩에 보관하고 DNA 손상을 최소화하고자 아이스박스에 담아 실험실로 운반하였으며, DNA 추출 전까지 영하 20℃에 보관하였다. DNA 추출, 증폭 및 시퀀싱 과정은 Miya et al, (2015)을 참고하여 진행하였다. 필터 내 DNA는 QIAgen blood&Tissue 키트(Qiagen, Germany)를 이용하

여 추출하였다. 추출된 DNA는 Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 정량하였고 분석 전까지 영하 20℃에 보관하였다.

3. 라이브러리 제작 및 MiSeq 시퀀싱

DNA 증폭은 각 분류군의 생물상을 확인하기 위해 MiFish, MiBird, MiMammal 3개의 범용 프라이머(universal primer)를 적용하여 NGS 라이브러리 구축을 위해 2 단계의 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 진행하였다(Table 2). 1차 PCR은 2X KAPA HiFi ready mix (KAPA Biosystems, Inc., Wilmington, MA, USA) 6 µL, 범용 프라이머(MiFish, Mimammal, Mibird, 10µM) 정방향 및 역방향 각 0.36µL, DNA template 2µL로 총 반응 용량을 12µL로 맞추어 35 사이클을 증폭하였다. 1차 PCR 조건은 변성(denaturation) 98℃ 20초, 어닐링(annealing) 65℃ 15초, 신장(extension) 72℃ 15초, 72℃ 5분으로 설정하였다. PCR 산물은 1% 아가로스 젤에 전기영동하여 관찰하였다. 이후 증폭물을 1/10로 희석하여 2차 PCR을 진행하였다. 2차 PCR은 어댑터 시퀀스인 Unique dual index identifiers (UDIs) P5와 P7을 포함. 전체 반응 용량을 12µL로 하여 동일 조건으로 12 사이클 증폭을 진행하였다. 증폭된 산물은 동일한

Table 2. List of universal primers applied for identifying fauna in this study

Target Taxa	Primer	Sequeunce	Amplified region	Reference
Fish	MiFish_F (forward)	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG NNNNNN GTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC	12S rRNA	Miya et al. (2015)
	MiFish_R (reverse)	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG NNNNNN CATAGTGGGGTATCTAATCCAGTTTG		
Bird	MiBird-U (forward)	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT NNNNNN GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC		Ushio et al. (2018)
	MiBird-U (reverse)	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT NNNNNN CATAGTGGGGTATCTAATCCAGTTTG		
Mammal	MiMammal_U (forward)	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT NNNNNN GGGTTGGTAAATTCGTGCCAGC		Ushio et al. (2017)
	MiMammal_U (reverse)	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT NNNNNN CATAGTGGGGTATCTAATCCAGTTTG		
Amphibian	Amph_16S_1070F (forward)	ACGAGAAGACCCYRTGGARCTT	16S rRNA	Sakata et al. (2022)
	Amph_16S_1340R (reverse)	ATCCAACATCGAGGTCGTAA		

양으로 풀링(pooling) 과정을 거친 후 MiSeq 300PE 플랫폼(Illumina, San Diego, CA, USA)을 활용 시퀀싱을 진행하였다.

4. 종 목록 확인 및 분포 특성 분석

MiFish로 분석된 FASTAQ 파일은 Mi fish pipeline (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish>) 내 생물 유전정보 DB와 매칭하여 종 목록을 도출하였다. MiMammal과 MiBird, Amph 16S로 분석된 FASTQ 파일은 Ushio et al. (2017)과 Ushio et al. (2018)을 따라 유전 정보 분석을 진행하였다. 분석은 FastQC 기반 quality check, 어댑터 서열 제거(tail trimming), 페어드 엔드 조립(paired end read assembly), 서열 길이 기반 필터링 및 프라이머 제거, 서열 클러스터링(sequence clustering) 순으로 진행되었다. 클러스터링 된 서열 중 97% 미만의 BLASTN Similarity를 가진 모호한 서열 및 키메라 서열(chimeric sequence)은 결과에서 제외되었다. 본 연구의 대상지를 고려해 국내에 유입되지 않은 외래생물을 제외하여 검출된 종 목록에 대한 정제 작업을 거쳤다. 또한, 메타바코딩 결과를 기반 군집구조 계산을 진행하였다. 종 풍부도(species richness)는 출현 종 수, 풍부도(abundance)

는 eDNA 리드 수를 로그 변환하여 도출하였다. 다양도 지수는 Shannon 지수를 활용하여 계산하였다. 이 때 H 는 Shannon 다양도 지수를 의미하며 P 는 전체 풍부도 중 각 종의 풍부도가 차지하는 비율을 나타낸다.

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$$

III. 결과 및 고찰

1. 범용 프라이머를 활용한 환경 DNA 메타바코딩 기반 외래생물 검출 결과

1) 환경 DNA를 통한 종 검출 결과

환경 DNA를 통한 조사 결과 목표 외래생물 4종이 환경 DNA 메타바코딩을 통해 검출되는 것을 확인하였다. 또한, 약 500m~2km 간격으로 동일한 수계 또는 대상 지역에서 샘플링이 진행되었음에도 검출 여부 및 증폭량(리드 수)에 차이를 나타내며 대상종의 분포 지점 및 지역을 추정할 수 있었다. 붉은귀거북은 여의도 셋강 생태공원 14개 지점 중 3개 지점에서 검출되었으며 평균 100.7 ± 84.7 의 리드 수를 나타냈다. 반수생 거북인 붉은귀거북의 생태적 특성을 반영하여

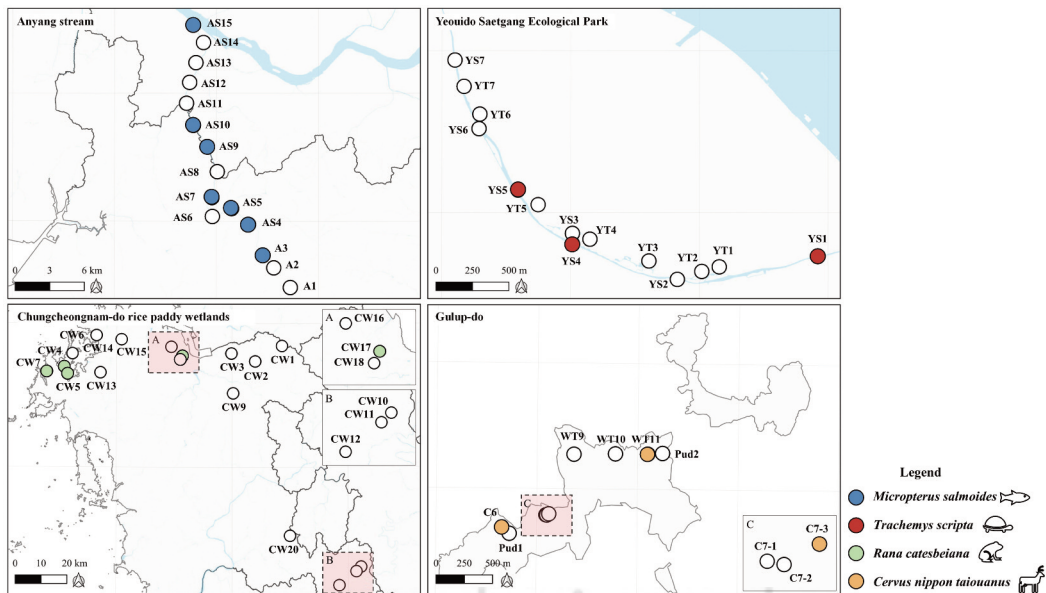


Figure 2. Map of eDNA sampling sites. Each site is marked with a circle and its presence location is colored. Color codes correspond to target species (detected species).

여의도 셋강 생태공원 육상 샘플링 지점인(YT) 지역에서는 미검출된 반면 수상 샘플링 지점(YS)에서 검출이 확인되었다. 특히 이 중 한강 유입부 및 YS4, YS5 등 셋강의 중심부에서의 서식을 선호하는 것으로 판단된다. 대만꽃사슴은 굴업도 7개 샘플링 지점 중 C6, C7-3, WT11 3개 지점에서 각각 13개, 2221개, 13개 리드로 검출되었다. C6, C7-3 지점은 굴업도 내 얽은 물이 흐르는 지점으로서 대만꽃사슴이 음수 가능한 지점을 서식지로서 선호하여 환경 DNA를 통한 검출 가능성이 큰 것으로 추정된다. 큰입배스는 안양천 15개 지점 중 중·하류에 위치한 7개 지점에서 확인되었으며 3300.7±5120.5 리드를 나타냈다. 황소개구리는 충청남도 논 습지 19개 지점 중 태안(CW4, CW5, CW7)과 당진(CW 17)에 위치한 4개 지점에서 확인되었으며 평균 51.0±31.2개의 리드 수를 나타냈다. 국내에 유입되지 않은 생물 종을 제외하고 메타바코딩을 통해 검출된 전체 출현 종은 여의도 셋강 생태공원에서 62종 (포유류 8종, 조류 9종, 어류 41종, 양서파충류 4종), 굴업도에서 26종 (어류 19종, 포유류 4종, 조류 2종, 양서파충류 1종) 안양천에서 56종(포유류 7종, 조류 8종, 어류 40종, 양서파충류 1종), 충남 논 습지에서 25종 (포유류 2종, 조류 2종,

어류 15종, 양서파충류 6종)이 확인되었다(Appendix 1). 한 개 샘플 내 전체 증폭량 중 외래종의 검출 비율은 평균 0.046±0.15으로 목표하는 외래종이 우점하는 환경이 아님에도 환경 DNA를 통해 효과적으로 목표 외래종을 검출할 수 있었음을 시사했다. 하지만 붉은귀거북 또는 대만 꽃사슴의 경우 아종이 존재하는 외래생물로서 보다 정확한 종 동정을 위해서는 아종 수준에 유전적 차이를 확인하고 종 특이적 프라이머를 통해 출현 종을 확인하는 것이 요구된다.

2) 범용 프라이머별 검출 결과

프라이머는 프라이머의 염기서열, 증폭 목표 서열에 따라 증폭 효율에 차이를 나타내며 최종적으로 종 검출 결과에 영향을 미치므로 목표 종을 고려한 적합한 프라이머 선정 및 다수의 범용 프라이머를 다중 이용하여 결과의 신뢰성 확보가 필요하다. 본 연구의 목표종인 대만꽃사슴과 붉은귀거북의 경우 MiBird, MiMammal 2개의 범용 프라이머를 통해 검출되었고, 큰입배스는 4개의 범용 프라이머에서 모두 검출 가능성이 확인되었다. 황소개구리는 Amph16S 프라이머를 통해 확인되었다(Table 3). 하지만 다수의 프라이머를 적용한 여의도셋강생태공원과 굴업도 샘플

Table 3. Invasive species detected by universal primers in study area

Target species (Family, Scientific name)		Study area and applied primer						
		GU		AY	CW	YS		
		MB*	MM*	MF*	Amp*	MF*	MB*	MM*
Mammals								
Cervidae	<i>Cervus nippon</i> §	○	○	-	-	-	-	-
Fish								
Centrarchidae	<i>Micropterus salmoides</i> §	○	○	○	○	○	○	○
	<i>Lepomis macrochirus</i>	○	-	○	-	○	○	-
Cyprinidae	<i>Carassius cuvieri</i>	○	○	○	-	○	○	○
Cobitidae	<i>Paramisgurnus dabryanus</i>	-	-	○	-	○	-	○
Amphibians								
Ranidae	<i>Lithobates catesbeianus</i> §	-	-	-	○	-	-	-
Reptiles								
Emydidae	<i>Trachemys scripta</i> §	○	○	-	-	-	○	-
Geoemydidae	<i>Mauremys sinensis</i>	-	-	-	-	-	○	-
Trionychidae	<i>Pelodiscus sinensis</i>	-	-	○	-	○	-	○

§, Target invasive species in this study

* , MF, MiFish; MM, MiMammal; MB, MiBird; Amp, Amph16S

에서는 적용 프라이머의 차이에 따라 외래종 검출 결과에 차이가 나타났다. 여의도 셋강 생태공원에서는 3개의 프라이머 중 MiBird 프라이머만을 통해 붉은귀거북이 검출되었으며 동일 샘플을 분석하였음에도 MiFish와 MiMammal에서의 검출은 이루어지지 않았다. 반면 대만꽃사슴은 Mibird와 MiMammal 두 가지 범용 프라이머에서 검출되는 것이 확인되었다. 하지만 동일 샘플에서도 프라이머에 따라 Mibird는 2개 지점(C6, C7-3)에서, MiMammal은 1개 지점(WT11)에서 대만꽃사슴이 검출되었으며 증폭량 또한 2234와 13으로 차이를 나타내었다. 생활사가 모두 수 환경에서 이루어지며 전국에 높은 밀도로 서식하는 큰입배스의 경우 프라이머의 종류에 상관없이 검출 결과가 유사하게 나타나지만 낮은 서식 밀도 혹은 일시적으로 수체에 접근하는 대상종은 분석 샘플 및 적용 프라이머에 따라 검출 결과에 차이를 나타냈다. 즉, 대상종의 생활사 및 채수 지점 내 서식 밀도가 검출 결과에 영향을 미친 것이라 추정된다. 특히 본 연구 결과에서는 환경 DNA를 이용한 포유류 검출에 있어 MiMammal에 비해 MiBird가 더 많은 지점에서 높은 증폭량을 나타내며 효과적으로 포유류를 탐지하였다(Appendix 2). 따라서 생물 검출의 가능성을 높이고 검출 결과의 신뢰성을 확보하기 위해서는 다수의 범용 프라이머를 활용하여 샘플을 반복 분석하는 것과 더불어 목견 또는 채집 조사를 통한 검증이 병행되어야 한다고 판단된다.

2. 종 출현 데이터로서 환경 DNA 검출 결과 활용 방안

카메라 트래핑, 투망과 족대 등을 이용한 채집 기반의 전통적인 조사와는 달리 환경 DNA는 간단한 시료 채취 및 분석 과정을 통해 서식종의 수가 풍부한 대상지 내 다수의 지점에서 누락 종을 최소화하여 종 출현 데이터를 동시다발적으로 취득할 수 있다는 장점이 있다(Yamamoto et al. 2017). 따라서 먼저 환경 DNA 메타바코딩은 한 번의 분석 과정으로 여러 생물의 시공간적 분포를 모니터링하여 군집 패턴과 환경 변수와의 연관성을 평가할 수 있는 방법으로 제시된다(Czegledi et al. 2021). 나아가 서식종의 생체

량 또는 개체군 크기에 따라 메타바코딩 시 비례하여 증폭되는 DNA 리드 수를 기반으로 조사지점 내 다양도, 균등도, 풍부도 등 생물의 군집구조를 산출하는데 활용된다(Sard et al. 2019; Yates et al. 2019; Rourke et al. 2022). Minamoto et al. (2012)는 자연하천을 상·중·하류로 구분하여 환경 DNA를 통한 어류 조사를 진행하였을 때 채집 기반의 조사를 통해 확인된 어류 종별 서식 선호 지역을 반영한 환경 DNA 검출 결과가 나타남을 확인하였다. 어류뿐만 아니라 양서류, 포유류, 조류 등 타 분류군에도 환경 DNA 조사방법이 적용되어 습지 및 바다로부터의 거리에 따라 공간적으로 풍부도 및 종 풍부도가 구조화되어 분포에 차이를 나타냄을 확인하거나(Saenz-Agudelo et al. 2022), 멸종위기종을 비롯한 척추동물 속 수준에서의 군집구조를 확인하는데 활용되었다(Lozano Mojica & Caballero 2021). 수 환경에서뿐만 아니라 육상 환경에서도 흙 또는 물 웅덩이 등에서 추출된 DNA를 통해 군집구조 변화를 밝히고자 하는 연구 또한 이루어지고 있다. Leempoel et al. (2020)은 특히 문헌 자료에서 출현이 확인된 바 있는 소형 포유류가 환경 DNA 조사 방법론을 적용하였을 때 목견 조사에 비해 서식 여부를 효과적으로 판단할 수 있음을 시사했다. 본 연구에서 또한 메타바코딩 결과 확인된 생물상을 활용하는 방안으로서 안양천 및 여의도 셋강 생태공원에서 검출된 큰입배스와 붉은귀거북을 중심으로 외래종 서식 여부에 따른 수생태계에 서식하는 어류 및 양서류·조류 생물의 군집구조를 평가하였다(Figure 3). 메타바코딩 결과 도출된 종 출현 여부 및 증폭량을 기반으로 종 풍부도, 풍부도, 다양도를 계산하였을 때 세 가지 항목 모두 외래종이 서식하는 대상지에서 더 높게 나타나는 것을 확인하였다. 큰입배스와 붉은귀거북이 서식하는 대상지에서의 평균 출현 종은 각각 19.9 ± 6.8 종, 25.7 ± 0.9 종이었고, 서식하지 않는 대상지에서는 각각 15.0 ± 5.6 종, 24.5 ± 4.0 종으로 나타났다. 또한 리드 수를 기반으로 한 풍부도 평가에서도 큰입배스가 서식 여부에 따라 $305,157.5 \pm 220,128.1$ 개와 $171,958.7 \pm 155,622.3$ 개로 큰입배스 서식지역에서 약 1.7배 많은 리드 수가 나타났다. 반면 붉은귀거북은 서식 여부에 따라 각각

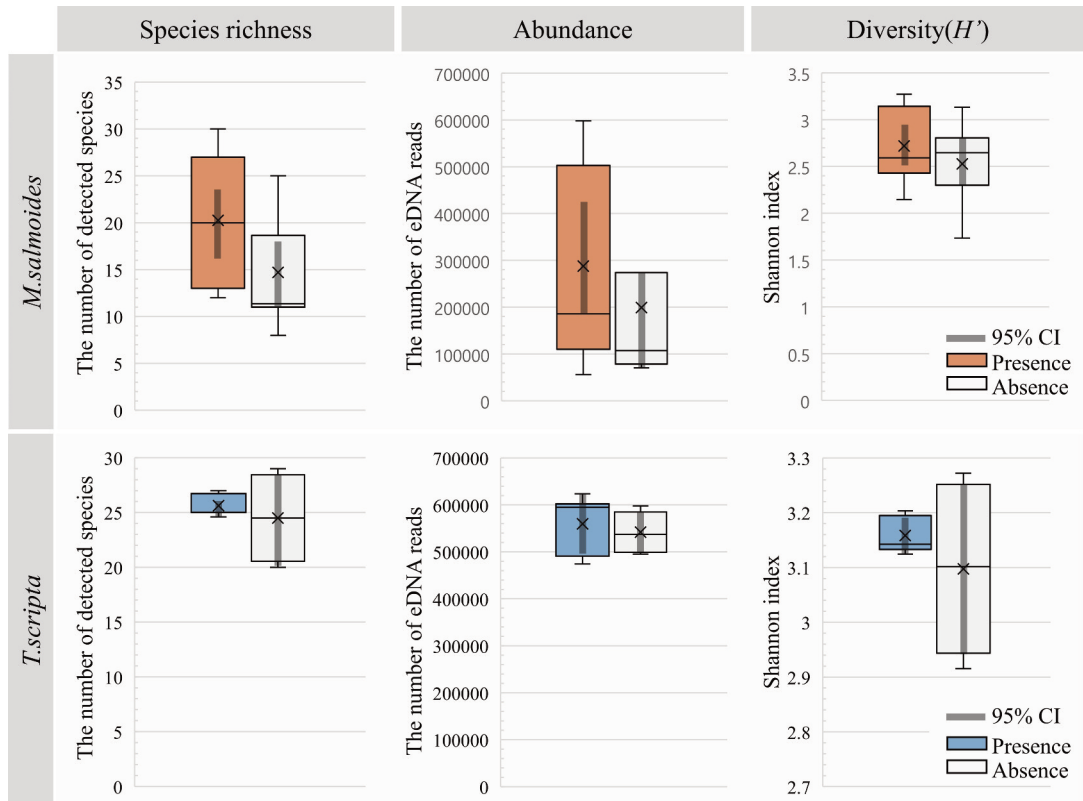


Figure 3. Box plots compared the species community structure of fish, amphibians and reptiles with species richness, abundance and diversity according to presence and absence of invasive species. Red and blue box plots represent *M. salmoides* and *T. scripta*, respectively.

557,134.0±58,654.7와 541,814.5±43,900.4의 근소한 차이를 나타냈다. 다양도는 큰입배스와 붉은귀 거북이 서식하는 지점에서 각각 2.7±0.4 (absence: 2.6±0.4), 3.2±0.0 (absence: 3.1±0.2)로 더 높은 다양도를 나타내었다. 이 같은 결과는 메타바코딩 결과를 활용한 생물 군집 구조 계산의 잠재적인 가능성을 나타낸다. 한편, 본 결과는 외래종의 서식이 군집 구조에 미친 영향이라고 평가하기보다 외래종이 서식하고 있는 대상지 특성에 따른 결과라고 추정되며, 따라서 외래종의 독립적인 영향을 평가하기 위해서는 이화학적인 환경 요인을 고려한 연구 설계가 필요하다고 판단된다.

두 번째로 환경 DNA 조사는 높은 해상도의 종 출현-비출현 자료를 제시할 수 있다는 장점을 바탕으로 높은 해상도의 생물 조사 자료가 요구되거나 출현 자료의 수가 결과의 유의성과 연관된 모델링 분야에

도 활발히 적용되고 있다(Dorazio & Erickson 2018; Muha et al. 2017). 대표적으로 Rubenson & Olden (2020)은 종 분포 모형을 활용하여 외래어종의 서식 확률이 높은 지역을 도출하고, 나아가 기후 변화 양상에 따른 분포확률을 예측하였다. 메타바코딩을 활용한 어류의 종 분포 지도를 도출하여 어류 종 간의 생태적 지위(niche) 분포를 확인하거나(Hashemzadeh Segherloo et al. 2022), 점유 모델(Occupancy model)을 활용하여 외래침입 양서류의 출현과 수질 등의 환경 요인의 상관관계를 평가하는 연구 또한 진행되었다(Mizumoto et al. 2022).

하지만 한편으로 환경 DNA의 특성을 이해하고 이에 적합한 샘플링 및 분석 전략을 수립하는 것 또한 필수적이다. 유전자를 통한 생물 검출 방법론인만큼 높은 민감도를 나타내어 근연종을 과추정하거나 하수 처리장 등 외부에서 유입된 유전 물질을 검출하는 위

양성 오류가 발생할 수 있다(Lahoz-Monfort et al. 2016). 따라서 프라이머를 다중 활용하여 검출 결과의 오류를 최소화하거나 과거 문헌 자료 참고, 채집 또는 목견조사 기반의 전통적인 조사를 병행하여 검출 결과의 신뢰성을 확보할 필요가 있다. 또한, 환경 DNA는 생물에서 자연환경으로 방출된 이후 생물학적 요인 및 이화학적인 요인으로 인해 분해 또는 이동, 침전되어 검출 여부에 영향을 미친다(Stewart 2019). 유수 환경을 대상으로 한 환경 DNA 확산 범위 연구에서 30m~9.1km까지 DNA의 이동 가능성은 있으나 400m 이상에서는 검출의 가능성이 급격히 감소되므로 확산으로 인한 중복 검출을 방지하기 위해서는 400m 이상의 구간 설정이 고려되어야 한다(Deiner & Altermatt 2014; Murakami et al. 2019; Nevers et al. 2020; Stoeckle et al. 2021). 또한 일부 연구에서 환경 DNA의 증폭량과 생물량 또는 밀도와는 높은 연관성이 있음이 확인된 바 있으나(Di Muri et al. 2020, Takahara et al. 2012) 증폭량은 다수의 환경 요인의 영향을 받아 차이를 나타낼 수 있다. 특히 메타바코딩을 통한 단일 종 검출을 목적으로 할 경우 검출 비율이 높은 종이 낮은 종의 검출을 저해하는 '종마스킹(species masking)' 효과로 인해 서식 밀도가 낮은 종의 검출 가능성이 낮아짐에 따라(Lintermans 2016; Yu et al. 2022) 정확한 목표 생물 종의 출현 여부 평가 또는 증폭량을 기반으로 한 정량적 풍부도 비교를 위해서는 채집 기반의 전통적인 조사를 비롯해 표적 PCR을 병행한 추가적인 연구를 통해 보완할 필요가 있다. 이 같은 한계점을 고려한 환경 DNA 조사 방법론 적용을 통한 정확도 높은 생물 조사 결과는 생물 종의 선호 서식처 또는 서식 공간 이용 패턴 등을 평가하는데 활용될 수 있다. 또한 동시에 대량의 출현 자료를 기반으로 대상지의 환경적 특성에 따른 종 분포 현황, 출현 확률 평가 및 예측에 관한 연구는 기존의 모니터링 방법론의 한계를 보완하고 효율적으로 다차원적인 생태계 평가를 가능하게 할 것이다.

IV. 결론

최근 국내에서도 채집기반의 전통적인 조사 방법

론을 보완한 생물모니터링 방법론으로서 환경 DNA 조사 방법론의 잠재성이 평가받고 있다. 하지만 어류를 제외한 포유류, 양서류, 파충류를 대상으로 국내 생태계에 메타바코딩을 적용하는 연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서는 4가지의 범용 프라이머(MiFish, MiMammal, Mibird, Amp16S)를 활용하여 대상지 내 대만꽃사슴(*C. nippon*), 큰입배스(*M. salmoides*), 황소개구리(*R. catesbeiana*) 붉은귀거북(*T. scripta*) 등 분류군별 외래생물 탐지 가능성을 확인하였다. 또한 250m~2km의 조밀한 조사지점 선정에도 외래생물 검출 지점이 각각 3개 지점(3/9 지점), 7개 지점(7/15 지점), 4개 지점(4/19 지점), 3개 지점(3/14 지점)으로 확인되며 대상지 조사 규모에 상관없이 생물 분포 지점을 추정할 수 있었다. 나아가 환경 DNA 기반 종 출현 정보를 연구에 적용한 사례를 고찰하고, 본 연구에서 진행된 메타바코딩 결과를 기반으로 외래종 서식 여부에 따른 생물 군집 구조를 확인하는 것을 통해 환경 DNA 조사 결과의 활용 가능성을 검증하였다. 하지만 적용된 범용 프라이머 종류에 따라 동일한 샘플에서의 검출 결과에 차이가 나타났으며 중수준의 해상도로 아중 수준의 생물 분류에서 한계를 나타냈다. 따라서 정확한 출현 데이터를 취득하기 위해서는 추가적인 범용 프라이머 이용 및 반복 분석이 필요하며 종 특이적인 프라이머를 통해 생물 분류의 해상도를 높이기 위한 노력이 요구된다. 또한, 메타바코딩 시 발생할 수 있는 근연종 과다 추정 또는 외부 오염 요인으로 인한 위양성 오류를 최소화하기 위해 양성대조군, 음성 대조군을 고려한 조사·분석 전략 수립이 요구된다. 더불어 목견 및 채집 조사 등 전통적인 조사방법을 병행하여 신뢰성을 확보하여야 한다. 이를 기반으로 표준화된 환경 DNA 조사 방법론은 시·공간적으로 확장된 연구 대상지를 대상으로 효율적인 모니터링을 가능케 할 것이다. 지속적으로 다량의 모니터링 데이터를 축적하는 것은 환경의 인위적, 자연적 변화에 따른 생물상 변화를 관찰하고 외래생물 관리를 비롯한 멸종위기종 보전, 생물 다양성 확인, 자연생태 분야 환경영향평가 등 평가 및 예측을 위한 주요 자료로 활용될 수 있을 것이다.

Acknowledgement

본 결과물은 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원의 생물다양성 위협 외래생물 관리 기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다(2021002280001).

References

- Czeglédi I, Sály P, Specziár A, Preiszner B, Szalóky Z, Maroda Á, Pont D, Meulenbroek P, Valentini A, Erös T. 2021. Congruency between two traditional and eDNA-based sampling methods in characterising taxonomic and trait-based structure of fish communities and community-environment relationships in lentic environment. *Ecol Indic.* 129. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107952>
- Deiner K, Altermatt F. 2014. Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS One* 9, e88786. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0088786>
- Dorazio RM, Erickson RA. 2018. ednaoccupancy: An R package for multiscale occupancy modelling of environmental DNA data. *Mol Ecol Resour* [Internet]. [accessed 2022 Jul 8] 18(2): 368-380. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12735>
- Gang HS, I BG, Han DH, G HR, Jo SC, Gim TH. 2015. A Study on the Management and Utilization of the Saetgang Stream in the Han River. Korea Environment Institute. <https://doi.org/10.23000/TRKO201800014468> [Korean Literature]
- Hashemzadeh Segherloo I, Tabatabaei SN, Abdolahi-Mousavi E, Hernandez C, Normandeau E, Laporte M, Boyle B, Amiri M, GhaedRahmati N, Hallerman E, Bernatchez L. 2022. eDNA metabarcoding as a means to assess distribution of subterranean fish communities: Iranian blind cave fishes as a case study. *Environmental DNA* [Internet]. [accessed 2022 Oct 23] 4(2): 402-416. <https://doi.org/10.1002/EDN3.264>
- Information of Korean Alien Specie [Internet]. c 2001-2022. National Institute of Ecology; [Cited January 10, 2023]. Available from: <https://kias.nie.re.kr/home/for/for02002v.do?clsSno=20700&searchClsGbn=for>
- Rourke ML, Fowler AM, Hughes JM, Broadhurst MK, DiBattista JD, Fielder S, Wilkes WJ, Furlan EM. 2022. Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4(1), 9-33. <https://doi.org/10.1002/EDN3.185>
- Kakuda A, Doi H, Souma R, Nagano M, Minamoto T, Katano I. 2019. Environmental DNA detection and quantification of invasive red-eared sliders, *Trachemy scripta elegans*, in ponds and the influence of water quality. *PeerJ*. 2019(12): 1-19. <https://doi.org/10.7717/peerj.8155>
- Kim GW, Song YK. 2021. Identification of Freshwater Fish Species in Korea Using Environmental DNA Technique-From the Experiment at the Freshwater Fish Ecological Learning Center in Yangpyeong, Gyeonggi Do. *J Environ Impact Assess* [Internet]. [accessed 2022 Jul 2] 30(1): 1-12. <https://doi.org/10.14249/eia.2021.30.1.1> [Korean Literature]
- Kim JH, Jo H, Chang MH, Woo SH, Cho Y, Yoon JD. 2020. Application of Environmental DNA for Monitoring of Freshwater Fish in Korea. *Korean Journal of Ecology and Environment* 53(1): 63-72. <https://doi.org/10.1002/EDN3.264>

- org/10.11614/ksl.2020.53.1.063 [Korean Literature]
- Leempoel K, Hebert T, Hadly EA. 2020. A comparison of eDNA to camera trapping for assessment of terrestrial mammal diversity. *Proceedings of the Royal Society B* [Internet]. [accessed 2022 Sep 3] 287(1918). <https://doi.org/10.1098/RSPB.2019.2353>
- Li F, Peng Y, Fang W, Altermatt F, Xie Y, Yang J, Zhang X. 2018. Application of Environmental DNA Metabarcoding for Predicting Anthropogenic Pollution in Rivers [Internet]. [accessed 2020 Aug 12]. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03869>
- Lintermans M. 2016. Finding the needle in the haystack: Comparing sampling methods for detecting an endangered freshwater fish. *Marine and Freshwater Research* 67(11): 1740-1749. <https://doi.org/10.1071/MF14346>
- Lozano Mojica JD, Caballero S. 2021. Applications of eDNA Metabarcoding for Vertebrate Diversity Studies in Northern Colombian Water Bodies. *Front Ecol Evol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.617948>
- Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z. 2012. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology (Tokyo).* 13(2): 193-197. <https://doi.org/10.1007/s10201-011-0362-4>
- University. <http://scienceon.kisti.re.kr/srch/selectPORSrchReport.do?cn=TRKO202200004244> [Korean Literature]
- Ministry of Environment. 2022. Act On the Conservation And Use of Biological Diversity [Internet]. [accessed 2022 Oct 23]. <https://law.go.kr/%ED%96%89%EC%A0%95%EA%B7%9C%EC%B9%99/%EC%83%9D%ED%83%9C%EA%B3%84%EA%B5%90%EB%9E%80%EC%83%9D%EB%AC%BC%EC%A7%80%EC%A0%95%EA%B3%A0%EC%8B%9C> [Korean Literature]
- Ministry of Environment. 2017a. 4th National Natural Environment Survey: Ichthyofauna from midstream catchment of Anyang stream [Internet]. https://www.nie-ecobank.kr/ecoki/bitstream/2018.oak/4610/1/안양천상류_101814_어류.pdf [Korean Literature]
- Ministry of Environment. 2017b. 4th National Natural Environment Survey: Ichthyofauna from midstream catchment of Anyang stream [Internet]. https://www.nieecobank.kr/ecoki/bitstream/2018.oak/4611/1/안양천중류_101815_어류.pdf [Korean Literature]
- Ministry of Environment. 2019. The 2nd Alien Speices Management Plan (2019-2023) [Internet]. [accessed 2022 Oct 23]: 1-77. <https://kias.nie.re.kr/home/bbs/bbs01002v.do?bbsSno=11191&bbsManSno=1> [Korean Literature]
- Ministry of Environment. 2022. Developing a real-time web-based positioning surveillance system customized for introduced exotic species [Internet]. Seoul National
- Mizumoto H, Kishida O, Takai K, Matsuura N, Araki H. 2022. Utilizing environmental DNA for wide-range distributions of reproductive area of an invasive terrestrial toad in Ishikari river basin in Japan. *Biol Invasions* [Internet]. [accessed 2022 Oct 23] 24(4): 1199-1211. <https://doi.org/10.1007/S10530-021-02709-Y/FIGURES/3>
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental

- DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R Soc Open Sci* 2, 150088. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>
- Muha TP, Rodriguez-Rey M, Rolla M, Tricarico E. 2017. Using environmental DNA to improve species distribution models for freshwater invaders. *Front Ecol Evol* [Internet]. [accessed 2021 May 12] 5(DEC): 158. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00158>
- Murakami H, Yoon S, Kasai A, Minamoto T, Yamamoto S, Sakata MK, Horiuchi T, Sawada H, Kondoh M, Yamashita Y, Masuda R. 2019. Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fisheries Science* 85: 327-337. <https://doi.org/10.1007/S12562-018-1282-6/FIGURES/7>
- Nevers MB, Przybyla-Kelly K, Shively D, Morris CC, Dickey J, Byappanahalli MN, 2020. Influence of sediment and stream transport on detecting a source of environmental DNA. *PLoS One* 15, e0244086. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0244086>
- Di MC, Handley LL, Bean CW, Li J, Peirson G, Sellers GS, Walsh K, Watson HV, Winfield IJ, Hanfling B. 2020. Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. *Metabarcoding Metagenom.* 4: 97-112. <https://doi.org/10.3897/MBMG.4.56959>
- Rubenson ES, Olden JD. 2020. An invader in salmonid rearing habitat: Current and future distributions of smallmouth bass (*micropterus dolomieu*) in the Columbia river basin. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* [Internet]. [accessed 2022 Oct 15] 77(2): 314-325. https://doi.org/10.1139/CJFAS-2018-0357/SUPPL_FILE/CJFAS-2018-0357SUPPLA.PDF
- Saenz-Agudelo P, Delrieu-Trottin E, DiBattista JD, Martinez-Rincon D, Morales-Gonzalez S, Pontigo F, Ramirez P, Silva A, Soto M, Correa C. 2022. Monitoring vertebrate biodiversity of a protected coastal wetland using eDNA metabarcoding. *Environmental DNA* 4(1): 77-92. <https://doi.org/10.1002/edn3.200>
- Sard NM, Herbst SJ, Nathan L, Uhrig G, Kanefsky J, Robinson JD, Scribner KT. 2019. Comparison of fish detections, community diversity, and relative abundance using environmental DNA metabarcoding and traditional gears. *Environmental DNA* 1(4): 368-384. <https://doi.org/10.1002/edn3.38>
- Sato Y, Miya M, Fukunaga T, Sado T, Iwasaki W. 2018. MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding. *Mol Biol Evol* [Internet]. [accessed 2022 Sep 30] 35(6): 1553-1555. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY074>
- Smart AS, Tingley R, Weeks AR, van Rooyen AR, McCarthy MA. 2015. Environmental DNA sampling is more sensitive than a traditional survey technique for detecting an aquatic invader. *Ecological Applications* [Internet]. [accessed 2021 Jan 26] 25(7): 1944-1952. <https://doi.org/10.1890/14-1751.1>
- Song YK, Kim JH, Won SY, Park C. 2019. Possibility in identifying species composition of fish communities using the environmental DNA metabarcoding technique-with the preliminary results at urban. *Journal of the Korean Society of Environmental Restoration*

- Technology [Internet]. [accessed 2021 Feb 1] 22(6): 125-138. <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201911959029438.page> [Korean Literature]
- Stewart KA. 2019. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodiversity and Conservation* 2019 28:5 28, 983-1001. <https://doi.org/10.1007/S10531-019-01709-8>
- Stoeckle BC, Beggel S, Kuehn R, Geist J. 2021. Influence of stream characteristics and population size on downstream transport of freshwater mollusk environmental dna. *Freshwater Science* 40: 191-201. <https://doi.org/10.1086/713015/ASSET/IMAGES/LARGE/FG3.JPEG>
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z. 2012. Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLoS One* 7, e35868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035868>
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MTP, Orlando L, Willerslev E. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol Ecol* [Internet]. [accessed 2021 Sep 30] 21(11): 2565-2573. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2011.05418.X>
- Thomsen PF, Willerslev E. 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol Conserv.* 183: 4-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Ushio M, Fukuda H, Inoue T, Makoto K, Kishida O, Sato K, Murata K, Nikaido M, Sado T, Sato Y, et al. 2017. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Mol Ecol Resour* [Internet]. [accessed 2021 Feb 1] 17(6): e63-e75. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12690>
- Ushio M, Murata K, Sado T, Nishiumi I, Takeshita M, Iwasaki W, Miya M. 2018. Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Sci Rep* [Internet]. [accessed 2021 Mar 28] 8(1): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22817-5>
- Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, Bellemain E, Besnard A, Coissac E, Boyer F, et al. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* 25(4): 929-942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>
- Vila M, Basnou C, Gollasch S, Josefsson M, Pergl J, Scalera R. 2009. One Hundred of the Most Invasive Alien Species in Europe. *Handbook of Alien Species in Europe* [Internet]. [accessed 2022 Oct 23]: 265-268. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8280-1_12
- Williams KE, Huyvaert KP, Vercauteren KC, Davis AJ, Piaggio AJ. 2018. Detection and persistence of environmental DNA from an invasive, terrestrial mammal. *Ecol Evol* [Internet]. [accessed 2021 Jan 23] 8(1): 688-695. <https://doi.org/10.1002/ece3.3698>
- Yamamoto S, Masuda R, Sato Y, Sado T, Araki H, Kondoh M, Minamoto T, Miya M. 2017. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports* 2017 7:1 [Internet]. [accessed 2022 Oct 5] 7(1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep40368>
- Yates MC, Fraser DJ, Derry AM. 2019. Meta-analysis supports further refinement of

Taxa	Scientific name	YS1	YS2	YS3	YS4	YS5	YS6	YS7	YT1	YT2	YT3	YT4	YT5	YT6	YT7	
Amphibians and reptiles	<i>Bombina orientalis</i>						84									
	<i>Mauremys sinensis</i>						398									
Fish	<i>Pelodiscus sinensis</i>	4277	1092	12116		1138	2248									
	<i>Trachemys scripta</i>		67	217			18									
	<i>Abbottina rivularis</i>	34			436	146	44	155								
	<i>Acanthogobius hastus</i>	553	332		32	75		4								
	<i>Acheilognathus chuanensis</i>	248	1710		487	437	4282	4848		24			812		11	
	<i>Acheilognathus intermedia</i>	601	41	1927	258		100	201					703			
	<i>Acheilognathus macropterus</i>	157	42	114	87	39	765	312		9						5
	<i>Acheilognathus rhombus</i>	25		75	14			140		672						
	<i>Anguilla japonica</i>	772	54	50	165	80										
	<i>Carassius auratus</i>	920	2033		2235	1514	921	1087								
	<i>Carassius cuvieri</i>	31034	41904	63	37044	11519	16000	19228	2227	258	439		337		522	
	<i>Channa argus</i>	887	330	2851	3319	104	1023	2849	26				360		5834	21
	<i>Coilia nasus</i>	36											4			
	<i>Cyprinus carpio</i>	42110	30517	73083	25966	25251	10783	12166	147				2492			
	<i>Gymnogobius breunigii</i>	15														
	<i>Gymnogobius opperidii</i>		30	553		13		136			3201			451		
	<i>Gymnogobius arosiense</i>		60	413		56	4									
	<i>Latolabrus maculatus</i>	102	153				93	40								
	<i>Lepomis macrochirus</i>	11	145	239		237		245	8				4			
	<i>Liza haematocheilus</i>	543	53	25	127		196	199					1258			
	<i>Micropterus salmoides</i>	57		2690	17	37	155	29		9	14					
	<i>Mitichthys mitay</i>							38								
	<i>Misgurnus mizolepis</i>			69			14			81627	4415	231	434	761	2272	19571
	<i>Magil cephalus</i>	688	149	21	313		361	300					8		5	11
	<i>Odontobutis interrupta</i>	17	86	9012		131	79	72	10		46		1467	5	24	21
	<i>Odontobutis platycephala</i>			238				82								
	<i>Oryzias sinensis</i>			221			25			2322	197					
	<i>Paramisgurnus dabryanus</i>							69								
<i>Pseudogobius sinensis</i>																
<i>Pseudorasbora parva</i>	390942	498566	468920	508592	510971	365662	403317	552	4742	634		6336		1509	242	
<i>Rhinogobius giurinus</i>	7004	9739	4060	5470	5209	10205	8475	17	4219			6783				
<i>Rhodesius oxytel</i>	17															
<i>Rhynchocypris oxycephalus</i>														178		
<i>Sarcocheilichthys soldatovi</i>	32	35														
<i>Silurus asotus</i>	1335	443	98	516	986	704	2845	33				301				
<i>Steniperca schrenkii</i>	127	135										775				
<i>Squalius gracilis</i>	37			134		333	26			450		191				
<i>Squalius japonicus</i>		13														
<i>Tachysurus fulvidraco</i>								6								
<i>Tridentiger bifasciatus</i>																
<i>Tridentiger obscurus</i>	2390	1134	10981	5121	4127	40377	19761	58	43897	4		34015	12	29	27	
<i>Tridentiger trigonocephalus</i>												1237				
<i>Zacco platypus</i>	10201	13518	6980	7170	9230	19304	23347	2989	196							
<i>Colombia livia</i>		950	263		7764										8759	
<i>Cyomopsis cyanus</i>	183															
<i>Gallus gallus</i>	11265	1638	159	8652	12493	4023	887				934	2110	249	19608		
<i>Parus major</i>												756	5	654	1680	
<i>Passer montanus</i>									14			11869			331675	
<i>Phalacrocorax carbo</i>		307					2212									
<i>Phasianus versicolor</i>	2019	3659	1233	1782	936	5071	5224									
<i>Pica pica</i>	1526		4629	18												
<i>Psyciomas sinensis</i>																
<i>Canis lupus</i>	220	6		120	4		235				4					
<i>Capra hircus</i>	1571		341				26								142	
<i>Felis silvestris</i>	6															
<i>Hydropotes inermis</i>																
<i>Mus musculus</i>	543	30	43			111	207	249	245	1680	689	258		1618	220	
<i>Nyctereutes procyonoides</i>							587							1671	40	
<i>Rattus norvegicus</i>	652	488	22			3198	362	78		904						
<i>Sus scrofa</i>	9278	2166	163	1812	2763	2572	4863			61	21	2993			1471	
The total number of species	41	33	32	26	27	34	35	19	24	10	24	6	13	16		
The total number of eDNA reads	523438	610878	601373	610300	598569	489332	514432	92188	82682	86265	83920	9705	15315	413014		

(b) Yeouido saetgang ecological park

Taxa	Scientific name	CW1	CW2	CW3	CW4	CW5	CW6	CW7	CW9	CW10	CW11	CW12	CW13	CW14	CW15	CW16	CW17	CW18	CW20
Amphibians and reptiles	<i>Bufo gargarizans</i>				3										7				
	<i>Dryophytes suseonensis</i>													300					225
Fish	<i>Hynobius leechii</i>										86		4						
	<i>Lithobates catesbeianus</i>				65	16		28										95	
	<i>Pelophylax nigromaculatus</i>												47	2226				10	229
	<i>Rana coreana</i>						16							90		6		65	
	<i>Oryzias latipes</i>			1		5		36	3653					120		1			
	<i>Aix galericulata</i>														2				
	<i>Tatia intermedia</i>		155	32	20		78	385	2										
	<i>Micropterus salmoides</i>		18																
	<i>Channa argus</i>					2	22	89											
	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>								61					2081			7		
	<i>Carassius auratus</i>		63	32		7	74	87											
	<i>Carassius cuvieri</i>		313																
	<i>Cyprinus carpio</i>		210						12										
	<i>Pseudorasbora parva</i>						5												
	<i>Zacco platypus</i>										46								
	<i>Rhinogobius brunneus</i>					2	2												
	<i>Pseudorasbora interrupta</i>		15						12	7									
	<i>Phoxinus oxycephalus</i>																		
	<i>Odontobutis poliamophila</i>			68			8			113									
	<i>Monopterus albus</i>													41		3			
<i>Anas platyrhynchos</i>			2																
<i>Passer montanus</i>			2																
<i>Rattus norvegicus</i>																			
<i>Sus scrofa</i>										48					1				
The total number of species	0	6	6	3	6	6	8	4	2	2	1	4	4	4	3	3	3	2	2
The total number of eDNA reads	0	774	137	88	40	197	710	3775	134	76	4	2171	2736	11	14	170	53	454	

(c) Chungcheongnam-do rice paddy wetlands

Taxa	Scientific name	C6	C7-1	C7-2	C7-3	Pad1	Pad2	WT11	WT10	WT9
Amphibians and reptiles	<i>Trachemys scripta</i>							326		
Fish	<i>Channa argus</i>					4				
	<i>Liza haematocheila</i>						683			
	<i>Acheilognathus chunikaensis</i>							5		
	<i>Rhinogobius giurinus</i>					4	4	15		72
	<i>Tridentiger obscurus</i>			186			4			185
	<i>Carassius gibelio</i>	8		535			4			102
	<i>Squalius gracilis gracilis</i>									126
	<i>Acheilognathus rhombus</i>		3162							
	<i>Oryzias sinensis</i>									55
	<i>Carassius cuvieri</i>				26					
	<i>Acanthogobius flavimanus</i>						107			
	<i>Tridentiger bifasciatus</i>	5	8	51	78	104367	16244	10		
	<i>Rhynchocypris oxycephalus korea</i>			712						
	<i>Odonotobutis interrupta</i>			774		6			70	47
	<i>Cyprinus carpio</i>	10796	9629	8126	1523	250	298	1288	2451	3022
	<i>Microporus salmoides</i>							22		
	<i>Zacco platypus Korea</i>									
	<i>Silurus asotus</i>					7		4		
	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>							5		
Birds	<i>Pica pica</i>	5		66						
	<i>Passer montanus</i>	8	5	5						5
Mammals	<i>Cervus nippon</i>	13			2221			13		
	<i>Mus musculus</i>	2014	111	83		8		22	480	
	<i>Bos primigenius</i>				9	10184		6		
	<i>Canis lupus</i>			517						
	The total number of species	12849	12915	11055	3857	114830	17359	1771	3292	3326
	The total number of eDNA reads	7	5	10	5	8	10	9	7	4

(d) Gulup-do

Appendix 2. Comparison of mammal detection results by Mimamal and Mibird primers in Yeouido saetgang ecological park (YUD) and Gulup-do (GU).

Sites	Species	MiBird		MiMammal	
		The number of detection site	The average number of reads	The number of detection site	The average number of reads
YUD (14 sites)	<i>Canis lupus</i>	5	96	2	34
	<i>Capra hircus</i>	2	956.0	-	-
	<i>Felis silvestris</i>	1	6.0	-	-
	<i>Hydropotes inermis</i>	1	53.0	-	-
	<i>Mus musculus</i>	12	466.3	7	40.3
	<i>Nyctereutes procyonoides</i>	2	1084.0	2	41.5
	<i>Rattus norvegicus</i>	7	619.7	6	190.8
GU (10 sites)	<i>Sus scrofa</i>	9	2993.0	5	42.0
	<i>Cervus nippon</i>	2	1117.0	1	13.0
	<i>Mus musculus</i>	2	971.0	5	59.2
	<i>Bos primigenius</i>	2	5096.5	1	6.0
	<i>Canis lupus</i>	1	517.0	-	-