

## 実河川における環境 DNA を用いた底生動物の生物量評価方法の検討

山口大学大学院創成科学研究科	学生会員	○山口	皓平
山口大学大学院創成科学研究科	准教授	正会員	赤松 良久
福岡工業大学社会環境学科	准教授	正会員	乾 隆帝
日本工営中央研究所副参事	総合技術開発第2部	正会員	後藤 益滋
九州大学 農学研究院 資源生物科学部門		非会員	栗田 喜久
山口大学大学院創成科学研究科	学生会員		河野 誉仁

### 1. 結論

水域で採水した水試料に含まれる DNA の情報を調べることで生物の在・不在などを調査する環境 DNA 分析について活用が広まりつつある。先行研究<sup>1)</sup>では、魚類のうち、アユを対象に流水環境中で環境 DNA 濃度が生物量と比例して高くなることを示しており、環境 DNA 調査が河川中の生物量について評価ができるということを示唆している。しかしながら、河川における環境 DNA 分析による生物量の評価を目的とした研究は、魚類のような比較的大型の分類群を対象とした例が多くを占め、底生動物のような小型の分類群を対象とした例は少なく、これらの分類群に対しても適用可能かどうか検討する必要がある。本研究では、島根県の1級河川である高津川において、底生動物の一種であるヒゲナガカワトビケラ *Stenopsyche marmorata* を対象として採集調査と採水調査を行い、同種の環境 DNA について最適な採水位置の検討と実際の生物量との応答性を把握することを目的とした。

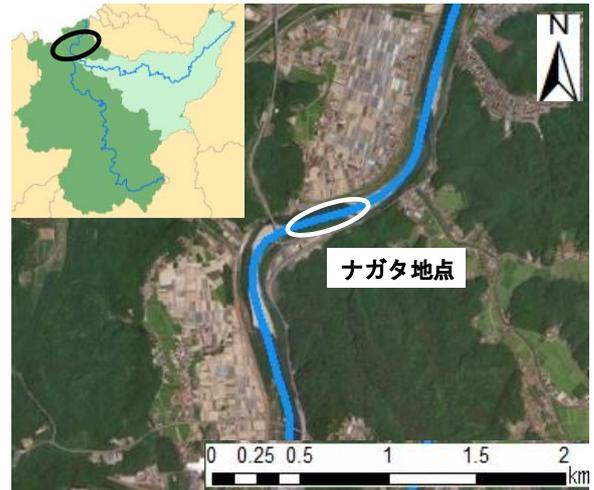


図-1 調査対象地点

した。採水調査では、採集地点の瀬の上流側と下流側の2地点において、表層と底層からそれぞれ1Lずつを採水した。採水には、10%次亜塩素酸ナトリウムで洗浄し、DNA を含まない脱イオン水で洗浄したボトルを用いた。

### 2. 現地観測の概要

#### 2.1. 採集・採水調査

調査地点は図-1に示すナガタ地点とした。この地点は、河口から約4.5kmに位置し、高津川本川と支川である匹見川との合流地点の下流側にある。採集調査は、2018年4月23日、5月17日、6月5日、6月19日、7月25日、8月27日、9月27日、10月12日、11月15日、12月20日、2019年1月15日の合計11回、採水調査は、上記から7月、9月、10月を除いた合計8回実施した。

採集調査では、瀬の上端からトロに当たる位置で横断方向に水深の浅い岸際、深い流心付近、中程度の地点の3地点において、50cm×50cm コドラートを用いて底生動物を採取し、採取した生物群からヒゲナガカワトビケラを同定し、乾燥重量を測定して、1m<sup>2</sup>当たりの生物量を算出

#### 2.2. 環境 DNA 分析

環境 DNA 分析は、乾ら<sup>1)</sup>に従い、GF/F ガラスフィルター0.7μmで濾過、フィルターからDNA抽出キットを用いてDNAサンプルを抽出した後、リアルタイムPCR装置(Thermo fishier science:Piko real)で定量PCRをおこなった。定量PCRの検出系として、佐波川で採取したサンプルから抽出したヒゲナガカワトビケラのDNAからダイレクトシーケンスで読み取ったCO1領域からヒゲナガカワトビケラのみを発現する特異的なプライマーおよびプローブの設計をおこなった。定量化のための検量線は、各PCRごとにプラスミドによってクローニングされたヒゲナガカワトビケラの人工DNAの20000、2000、200、20、2copiesの希釈系列から作成した。定量PCRの測定結果には、サンプルごとに4ウェルの平均値を用いた。

キーワード 環境 DNA, 底生動物, ヒゲナガカワトビケラ, 生物量評価, 河川

連絡先 〒755-8611 山口県宇部市常盤台 2-16-1 山口大学工学部社会建設工学科 TEL0836-85-9339

### 3. 環境 DNA 分析の結果と考察

#### 3.1. 採集調査の結果

図-2 に調査毎の 3 地点平均の生物量( $g/m^2$ )及び調査対象期間の調査地点の流量(神田・隅村の合計流量<sup>2)</sup>) ( $m^3/s$ )を示す。7 月及び 9 月を境に大きく生物量が減少しているが、7 月 6 日の年間最大規模 (ピーク流量  $2018.1m^3/s$ ) の出水と 9 月 30 日 (ピーク流量  $870.5m^3/s$ ) の出水の影響、および羽化による幼虫個体の減少が影響していると考えられる。出水後には軒並み生物量の増加がみられた。

#### 3.2. 採水調査の分析結果

図-3 に上流及び下流における調査毎のヒゲナガカワトビケラの環境 DNA 濃度(copies/mL)を示す。平均濃度が最も高く検出された採水位置は下流底層 (平均:  $19.2copies/mL$ ) で、次いで上流底層( $11.5copies/mL$ )、上流表層( $9.01copies/mL$ )、下流表層( $8.61copies/mL$ )の順であった。6 月 19 日など比較的的生物量が多かった日については全体的に高濃度で検出されているが、季節による変動は見られなかった。また、最低でも  $0.35 copies/mL$  (下流表層, 8 月 27 日) と、全サンプルから検出可能な下限値を上回る環境 DNA が検出された。

#### 3.3. 調査結果の比較

図-4 に生物量( $g/m^2$ )と各採水位置の環境 DNA 濃度(copies/mL)との相関を示す。直線回帰分析をすると、最も相関が高いのは下流底層( $R^2=0.233$ )で、次いで上流底層( $R^2=0.128$ )、上流表層( $R^2=0.013$ )、下流表層( $R^2=0.001$ )の順であった。図-5 に生物量( $g/m^2$ )と各採水位置の環境 DNA フラックス( $\times 10^6copies/s$ )との相関を示す。最も相関が高いのは上流表層 ( $R^2=0.196$ )で、次いで下流底層( $R^2=0.190$ )、下流表層 ( $R^2=0.077$ )、上流底層( $R^2=0.039$ )であった。濃度・フラックス共に下流底層は比較的相関が高かったものの、相関係数は全体的に低く、明確な相関があるとはいえなかった。

### 4. 結論

本研究では、高津川で採集調査と環境 DNA 採水をおこなった結果、採水位置については、下流底層で濃度や相関性が比較的高いという傾向が見られ、生物量との応答については、明確な相関関係は見られなかった。しかしながら、どの採水位置においても継続的に環境 DNA が検出されており、実河川の底生動物に対して環境 DNA 分析

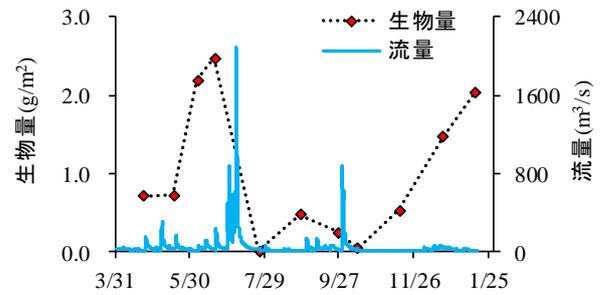


図-2 3 地点の平均生物量 ( $g/m^2$ ) と対象期間の流量 ( $m^3/s$ )

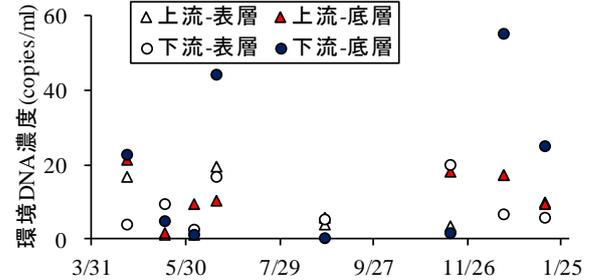


図-3 上流及び下流における調査毎の表層・底層の環境 DNA 濃度 (copies/mL)

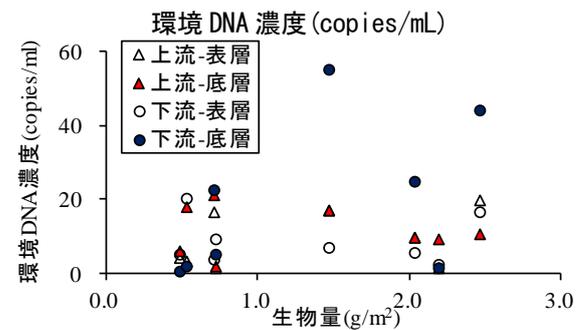


図-4 生物量 ( $g/m^2$ ) と各採水位置の環境 DNA 濃度 (copies/mL) との相関

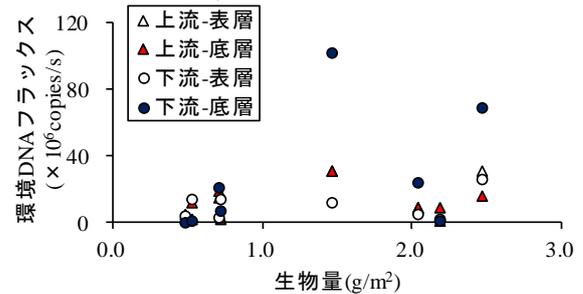


図-5 生物量 ( $g/m^2$ ) と各採水位置の環境 DNA フラックス ( $\times 10^6copies/s$ ) との相関

が有効である可能性が示唆された。

### 参考文献

- 1) 乾隆帝, 赤松良久, 高原輝彦, 後藤益滋, 一松晃弘: 流水中におけるカワムツの生物量と環境 DNA 量の関係性—水路実験と野外への適用—, 河川技術論文集, 第 23 巻, pp.651-656, 2017
- 2) 水文水質データベース <http://www1.river.go.jp/>