

# 環境 DNA 解析を用いた 河川魚類相の多様性に関する基礎的研究

和田 清<sup>1</sup>・寺町 茂<sup>2</sup>・平田 亨<sup>3</sup>・保坂慎太郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup>フェロー会員 (独) 国立高専機構 都城工業高等専門学校 校長 (〒885-8567 宮崎県都城市吉尾町473-1)  
E-mail:wada@cc.miyakonojo-nct.ac.jp

<sup>2</sup>水圏域環境研究会 代表 (〒501-0417 岐阜県本巣市屋井 936-1)

<sup>3</sup>株式会社興栄コンサルタント 技術第一部 (〒500-8288 岐阜県岐阜市中鶯 4-11)

本研究は、長良川流域の中小河川を対象にして、環境 DNA による定量分析と魚類採捕調査結果を比較して、魚類の存・不在のみならず生息量の適合度や種の多様性等を検討した。また、魚道の機能評価、河川改修による経年的な魚類変化などから、生息場の確保や工法の改善策などについて考察した。その結果、魚道評価において、魚類採捕調査で確認された魚種は全て環境 DNA 分析により検出され (両者の適合度: 100%)、河川改修区間の適合度は 65~78%程度となった。また、採捕により確認されなかった希少種等についても検出され、環境 DNA 分析の有効性等が確認された。これらにより、在来種は工事前後を通して年間 24~27 種で推移 (うち 14~17 種が希少種)、希少種が半数を占めており非常に安定していることなどから、河川改修工事による伊自良川の魚類相全体への影響は小さいことなどが明らかにされた。

**Key Words:** *environmental DNA, meta-barcoding, conservation of watersheds, fishway, capturing fishes*

## 1. はじめに

河川の魚類生態環境を保全することは、環境機能の維持改善に大きく関係しており、河川管理上重要な課題である。河川などに設置される魚道は、ダムや堰などの高低差が生じる場所において、魚類の遡上や降下を目的として設置される構造物である<sup>1)</sup>。

岐阜県には 673 ヶ所に魚道が設置されているが、現状で良好な魚道は全体の約 3 割であり、約 4 割は破損や土砂・流木の堆積等による機能低下が課題となっている<sup>2)</sup>。これは魚類の回遊行動の障害となることを示唆している。このように魚道や河川改修工事等の人的要因により縦断的連続性が損なわれることで、魚類生息場の減少が危惧され、希少種だけでなく在来種の生息場の保全・再生が求められている。そのためには、河川横断構造物が魚類の縦断的連続性に与える影響の調査や、生態系保全のために水生生物の生息状況を把握し、河川環境の経年的な評価を行なうことが必要である。しかしながら、水域の生物量の把握は陸域と比べて困難を伴うことが多い。一般には、生息情報を知るための方法として目視調査、採捕調査等が用いられるが、多くの時間と労力が必要とする上、正確な現存量が把握できていないという課題がある<sup>2)3)</sup>。

近年、上述の課題を補完する新たな手法として環

境 DNA 解析を用いた手法が適用されている。たとえば、稚アユの放流等により数多くの遡上が確認されている山口県佐波川において、環境 DNA を用いて対象魚類 (アユ) の現存量推定の可能性について、一般化線形モデル (GLM) によるアユの空間分布予測や、環境 DNA が反映するアユの総重量の算定と環境 DNA フラックスとの関係性を評価した事例<sup>4)</sup>がある。

生物細胞などにはその生物固有の DNA が含まれている。生物の身体からは新陳代謝により絶えず組織片が剥がれ落ち、排泄物に付着するなどして体外へと放出される。魚類の場合、生息域の水中には上記のような組織片が含まれており、採水中から DNA を取り出し分析すれば生物の存・不在や生物量、個体数、遺伝情報などのデータを得ることができる。このような河川水などの環境試料中の DNA が環境 DNA である。環境 DNA の解析方法には、主に、①網羅的解析、②種特異的解析、③遺伝的多様性解析の 3 つが挙げられる<sup>5)</sup>。

上述したアユの生息分布等の事例は、特定の生物種 (1 種類) に着目して、生物種によって異なる種特異的なプライマーを使用し、リアルタイム PCR を使用した解析 (②種特異的解析) である。また、同じ生物種で遺伝的に異なる (遺伝的多様性がある) 集団を検出する場合、在来・外来遺伝子型頻度を検

討する場合が、③遺伝的多様性解析である。本研究では、次世代シーケンサーを使用し、調査箇所に生息する対象生物種を網羅的に把握するために、環境中の DNA を PCR 増幅した後、シーケンサーによる魚類データベース (MiFish) と照らし合わせて、相同性の高い魚類候補をリストアップして推定する、①網羅的解析を採用した<sup>9)</sup>。

本研究は、長良川流域の中小河川を対象にして、魚類採捕モニタリング調査時と同時期に採水を行い、環境DNAによる定量分析（網羅的解析）の結果と比較して、魚類の存・不在（在来種、希少種）のみならず両者の適合度や種の多様性等を把握した。また、魚類採捕調査を補完する手法として環境DNA分析により、希少種の生息場保全流域の絞り込み等への適応性を検討した。さらに、魚道の機能評価、河川の縦断的連続性などの観点から、河川改修による経年的な魚類変化などを明らかにし、生息場の生態系保全の機能評価や工法の改善策などを考察した。

## 2. 研究方法

対象河川は、横断構造物（魚道や堰など）を含む岐阜県の牧田川、白川、伊自良川、長護寺川の4河川である。牧田川と白川は魚道評価、伊自良川と長護寺川は河川改修の生態系保全機能評価を対象として、その期間は、伊自良川：2012～2020年、長護寺川：2018～2020年である。各河川の魚道調査は改修工事前から2021年度まで継続的に実施されている。環境DNA分析は、2019年～2021年の期間に実施し、調査期間が重なる時期について両者を比較検討した。

### (1) 対象河川の生物調査および環境DNA分析

魚道調査は2019年10月23～24日、牧田川中流部に位置する田村頭首工魚道（大垣市）、下流部の鴻ノ巣頭首工魚道、白川の白川魚道（中津川市）の3箇所において、魚類採捕調査と環境DNA分析を実施した。支川と本川の合流部が存在する伊自良川（岐阜市）は2019年11月30日、長護寺川（瑞穂市）では12月7日に魚類および水生生物調査を行ない、それ以降2021年まで、定期的に生物調査と同期して採水および環境DNA分析を実施した。

田村頭首工魚道と白川魚道では、岐阜県自然共生工法研究会の魚道モニタリング調査の他に、タモ網、一昼夜トラップ等を用いた簡易的な魚類採捕調査が行われた。調査位置については魚道機能の確認のため魚道上流側、魚道下流側の採捕を行なった。伊自良川では1kmの調査対象区間をA～Dの4つに分割し、それぞれの区間でタモ網等を用いて水生生物の採捕、長護寺川についても同様にそれぞれの区間でタモ網等を用いた採捕を実施した。

### (2) メタバーコーディング解析

河川水中に存在している生物由来のDNA断片を採取・分析することにより、生物の存・不在や生物

量、個体数、遺伝情報などのデータを得ることができる。環境DNA分析では、採水した1ℓのサンプル水をフィルター濾過し（0.22～0.7μm）、フィルターに残った物質からDNAを抽出する。その後、網羅的な魚種の把握が可能となるメタバーコーディング解析を用いる<sup>7)</sup>。この解析方法は、分析結果に対し解析対象領域（MiFish）をターゲットとしてライブラリー作製（PCR）を行ないDNAの部分配列を増幅させる。その後次世代シーケンサーを用いてシーケンシング解析による塩基配列を決定した後、データベース配列と比較し、生物種の推定を行なう方法である。なお、データベースと一致した配列名（種名：学名）、その配列が一致した割合（相同性：%）塩基長（bp）などを参考に、相同性の高い順10位までの内、上位2番目までを魚種として採用した。

本研究では、対象場所の各地点で採水を水深方向に複数分割して行ない、得られたサンプル水に殺菌処理を施して冷蔵し、外部機関に分析を依頼した。その際、より正確なデータを得るために、PCRを標準の4反復から8反復へ倍増し、DNAコピー数の算定が可能な定量解析についても同時に実施した。なお、採水箇所については、河川横断線を設定して魚類のDNA断片を補足しやすい比較的緩流域を選定した。

## 3. 結果および考察

### (1) 魚道における環境DNAの適合度

2019年の白川魚道調査において採捕された魚種は、遊泳魚（アマゴ、タカハヤ、アブラハヤ）、底生魚（カジカ、カワヨシノボリ）の5種類である。岐阜県魚道カルテを用いた定期点検は毎年複数回実施されており、魚道評価は比較的良好なため、採捕された魚類は遡上可能な状態に保たれ、魚道は機能していることが確認できる。

図-1は、白川魚道における環境DNA解析の結果を示したものである。同図には、魚類採捕により確認された魚種（5種類）を★印、環境省、岐阜県、岐阜市の絶滅危惧種レッドリスト対象魚が併記されている。同図から、採捕された魚類5種すべてが環境DNA解析によっても確認されており適合度100%となっている。また、それ以外の魚種について、上流側で8種類、下流側で6種類の存在が推定されている。

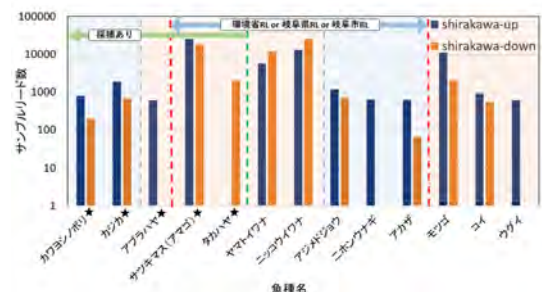


図-1 環境DNA解析結果（白川魚道，2019年）

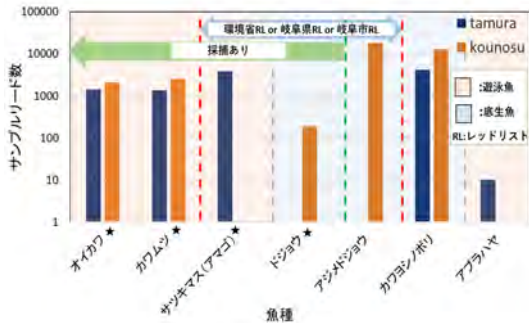


図-2 環境 DNA 解析結果 (田村魚道, 2019年)

なお、データベース配列により、冷水性の魚類ニコウイワナとヤマトイワナの生息地域は本州全土、種の特定が困難であるため、両種が存在すると判断した。また、アジメドジョウ、アカザ、モツゴ、ウナギ、コイ、ウグイは、過去に実施された魚類採捕調査結果で生息が確認されている。

図-2は、牧田川の田村魚道における環境 DNA 解析の結果を示したものである。同図には、魚類採捕により確認された魚種 (4 種類) を★印で併記している。同図から、両者の適合度は 100% であり、環境 DNA により、アジメドジョウ、カワヨシノボリ、アブラハヤの生息が推定された。なお、2015 年 10 月 10 日において同魚道周辺で実施された魚類採捕調査結果によれば、これら 3 種類以外にも、ネコギギ、モツゴ、カマツカの生息が確認されている。

以上のことから、環境 DNA 解析で推定された魚種は、過去の採捕調査データと比較検討することにより、魚類採捕調査を補完し、採捕できず存在の確認ができなかった魚種の生息状況を推定する手法としての環境 DNA の有用性が示唆された。

## (2) 河川改修区間における環境 DNA の適合度

図-3は、伊自良川における調査場所を示したものであり、区間長は全体で約1km、区間を通して河川環境の変化は比較的単調であるが、C区間において、排水樋門及び掘削護岸工事が行われている。A区間とB区間には転倒型の取水堰が設置されている。灌漑期は取水堰により魚類が遡上しにくい状況であるが、非灌漑期は取水堰は転倒しており、魚類遡上の分断の影響は小さいものと推定される。また、図-4は長護寺川の調査区間を示したものであり、全区間において河岸に植物が繁茂している。中でもC区間では両岸を植物が覆い、水中には多くの抽水性植物が繁茂しており、ハリヨの生息が過去の水生生物調査によって確認されている。そのため、C～Eの3区間のうち、C区間はさらに4つに細分割し、詳細に調査が行われている。なお、C～D区間にかけて左岸の片側護岸工事が行われている。

図-5は伊自良川および長護寺川において採捕された遊泳魚と底生魚の個体数の割合、その魚種と個体数を希少種 (環境省レッドリスト: RL, 岐阜県 RL, 岐阜市 RL) で示したものである (2019年 11



図-3 伊自良川調査区間

図-4 長護寺川調査区間

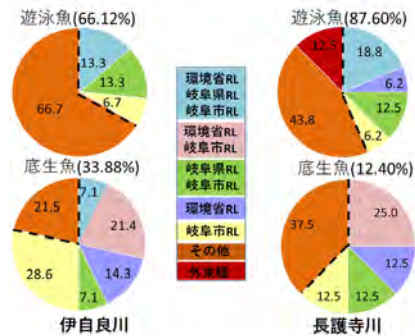


図-5 遊泳魚と底生魚の個体数割合 (2019年調査)

月 30 日調査)。同図より、両結果とも遊泳魚が底生魚よりも多く採捕されたことがわかる (伊自良川: 遊泳魚 66.1%, 長護寺川: 遊泳魚 87.6%)。これは、底生魚に比べ遊泳魚が遡上や降下といった縦断的移动を生活史としているため、その場に生息する底生魚に比べ、多くの個体数の採捕に至ったと考えられる。また、希少種が占める割合は、伊自良川で遊泳魚の場合 33.3% (優占種: アブラボテ、ヤリタナゴ)、底生魚の場合 78.5% (優占種: カワヒガイ、ゼゼラ、ウキゴリ) であり、長護寺川では遊泳魚が 56.2% (優占種: ミナミメダカ、アブラボテ)、底生魚が 62.5% (優占種: ゼゼラ、ドンコ、トウカイコガタスジシマドジョウ) となっており、調査区間全体で多くの割合を占めていることがわかる。希少種は河川環境によって存・不在や個体数が大きく左右される。特に、長護寺川で採捕されたハリヨは生息場の減少や河川環境の悪化により環境省レッドリストに絶滅危惧 1A 類として分類されている。このようにハリヨを含む希少種が多く確認されたということは調査箇所が魚類生息場としてかなり良好な環境であるということを示唆している。しかしながら、長護寺川では希少種のみならず外来種 (タイクバラタナゴ、カダヤシ) が採捕されている。これは今回の調査のみではなく、過去同様の調査箇所で行われた水生生物調査 (2012~2015 年) においても存在が確認されているため、調査箇所が生息し繁殖している。外来種の繁殖は在来種の生態系を脅かすため、別途対策が必要である。

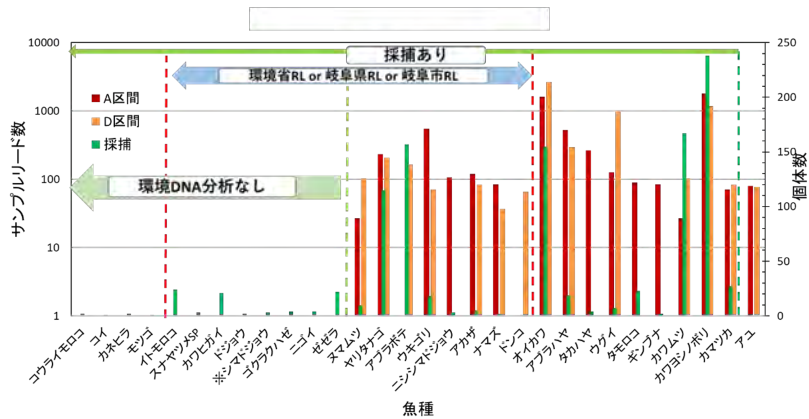


図-6 魚類採捕個体数と環境 DNA 解析（伊自良川，2019年調査）

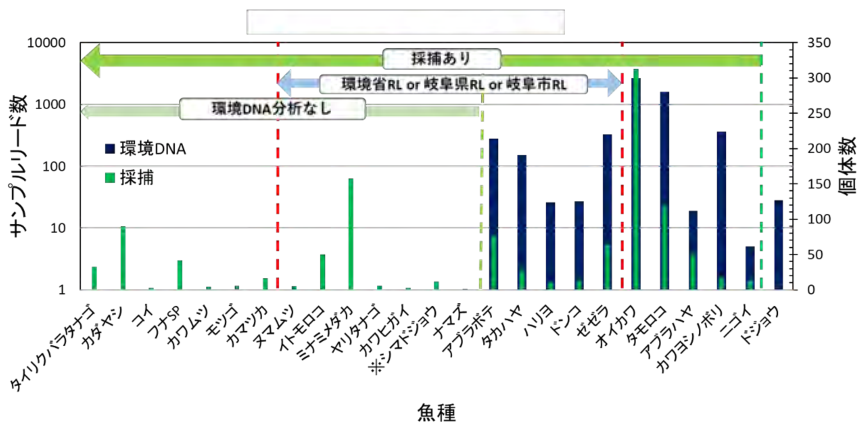


図-7 魚類採捕個体数と環境 DNA 解析（長護寺川，2019年調査）

図-6 および図-7 は、伊自良川と長護寺川における環境 DNA 解析結果と採捕された個体数の関係を示したものである。同図には、環境省などのレッドリスト、魚類が採捕されたものの環境 DNA では判定できなかった魚種を图中左側に併記している。

両図から、魚道の適合度結果とは異なり、比較的広い範囲の河川区間を対象とする場合には、魚類採捕による種類数が環境 DNA 分析結果を上回ることになった。詳細には、図-6 から、伊自良川で採捕された個体数が 10 尾未満の魚種は 16 種存在し、これらを除いた適合度は 76.9% である。長護寺川の場合（図-7 参照）では、10 尾未満の魚種は 7 種存在し、適合度は 58.8% となった。なお、他期間における適合度は、58～76% 程度の範囲内となっている。

一方、100 尾以上採捕された魚種は、伊自良川で 5 種、長護寺川で 3 種であり、長護寺川の 1 種を除き、すべて環境 DNA より推定されている。これらより対象河川に生息する個体数がきわめて少ない魚種の場合、環境 DNA により推定される確率は低くなり、個体数が多い魚種の場合ほど存在が判定されることになる。河川中に多く存在する魚種に対して広域な範囲の生息場の把握に、環境 DNA 解析手法

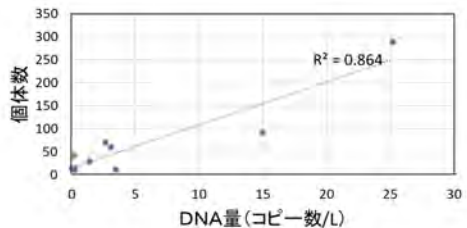


図-8 DNA コピー数と個体数（長護寺川）

が適応可能であることが示唆された。

図-8 は、長護寺川の D 区間下流部での DNA コピー数と個体数を示したものである。同図から、個体数が多い 300 尾を超えるオイカワの DNA コピー数は多いため、決定係数 ( $R^2=0.864$ ) は高いものの、魚種やサイズ等による詳細な検討の余地がある。また、長護寺川では、ミナミメダカは 100 尾以上個体数が採捕されたにも関わらず環境 DNA から推定されなかった。ミナミメダカは体長約 3.5cm 程度と小さく、大きい魚類に対して 1 尾当たりから水中に放出される DNA 量は少なくなり、個体数が多く採

捕されたにもかかわらず環境 DNA から推定されなかったものと考えられる。逆に、個体数が少ないにもかかわらず、希少種（ハリヨ等）が採捕と環境 DNA により確認されている。これらの希少種に対しては、本研究で実施した網羅的解析により存在を把握した後、種特異的解析を実施することなどにより、希少種の生息場の保全流域の調査や絞り込みを行ない、保全活動等に役立てることが可能である。

### (3) 河川改修における魚類生息数の変化

伊自良川の河川改修の概要は、以下のようである。

- 2012年：CD 区間～右岸護岸改修工事
- 2014年：AB 区間～安食取水堰右岸部工事
- 2015年：AB 区間～安食取水堰左岸部工事
- 2016年：AB 区間～安食取水堰上部工設置工事  
既設取水堰撤去工事
- 2018年：A 区間～左岸護岸改修工事
- 2019年：C 区間～左岸護岸改修工事
- 2021年：D 区間下流～左岸護岸改修工事

安食取水堰の改築工事、2018年の護岸改修の際に下流側へ土砂が堆積したため河床環境が悪化し、河川改修の影響を受けた生物の回復状況の概略は、以下のようである。

#### ・カワヨシノボリ

河床空隙を利用するカワヨシノボリは 2016年に急減し、現在回復途上である。2015年の個体数を100とすると、2017年に17%まで減少後、40%前後まで回復している。直近2年間の河川水位低下（流量減少）により回復速度は鈍化している。

#### ・スナヤツメ類

湧水のある砂泥質を好むスナヤツメ類は、2015年を100とすると、2018年は19%に減少、その後生息数は回復していない。良好な砂泥環境の創出に時間を要している可能性がある。

#### ・ウキゴリ

2018年に顕著に増加（前年までの3年間平均の18.8倍）、その後徐々に減少している。

#### ・ゴクラクハゼ

2019年に初確認され、その後個体数が増加しており、確認区間の拡大が続いている。本調査において新規に安定して確認されるようになった魚類は本種のみである。

#### ・ドンコ

工事後やや増加傾向になっている。

ウキゴリとゴクラクハゼは、いずれも河川下流～河口で産卵・孵化後に遡上する両側回遊魚であり、河川の連続性が改修後も確保されている。上記3種は流れの緩やかな水域を好む種であり、河川改修後に緩流域が増加している可能性がある。また、C区間の水際植生に生息する魚類は、改修工事後、減少傾向（改修直前と比べて2021年の個体数は31.4%）である。改修時に造成した自然河岸が侵食され、植生が減少したためと考えられる。環境配慮のために自然河岸を造成するだけでなく、河岸侵食が生じ



図-9 自然河岸のヌートリアの営巣穴（長護寺川）

くく、土砂堆積を生じやすくするための水制工設置等の工夫が今後の検討課題である。

伊自良川の在来種、外来種等の変化は、工事前後を通して、在来種は年間24～27種（うち14～17種が希少種）で推移している。また、外来種は工事前後を通して、年間1～4種で推移しており、河川区間では概ね安定した生態系となっている。前述のように、伊自良川の魚類の希少種は約半数を占めており良好な魚類相であり、河川改修工事による伊自良川の魚類相全体への影響は小さいと考えられる。

一方、小河川の長護寺川における河川改修の場合、たとえば、希少種ハリヨが繁殖、生育する上で必要となる環境条件を考えると以下のようである。

- ・湧水（1年を通して水温20°Cを下回る環境）
- ・砂や砂泥質の河床（巣の形成場、餌等）
- ・水生植物、水際植生（巣の形成材料、餌、洪水時の退避場等）
- ・洪水時にも流れが緩やかな水域（流下しにくい環境）
- ・水中の大型生物が少ない（巣が破壊されない環境）

ヌートリア個体数の定量的なデータは把握していないため詳細な検討はできないが、研究報告<sup>8)</sup>などから、以下のように推論される。D区間において実施された河川改修により、自然河岸水際部の土手が減少し、特定外来生物であるヌートリアの生息環境が喪失したため、ヌートリアが上流側のC区間へ生息地を移した。ヌートリアの個体数が増加したC区間では、自然河岸の土手部に多数の営巣穴が掘られ、水際植生の減少、自然河岸の崩壊、河川への土砂流出が生じた（ハリヨの餌場、隠れ処、出水時の避難場所等の喪失）。

また、自然河岸の崩壊により湍筋幅が拡大した結果、平時時の流速が低下し、河床へのシルト堆積を進行させた。この影響は、ハリヨが巢材に用いる水生植物の減少、湧水噴出量の減少、シルト増加による産卵適地の縮小などが考えられる。このように、ヌートリアの増加に伴い、繁殖期にハリヨの巣が破壊されるリスクが増加していることが推定され、移入動物等の総合的な対策の必要性がある。

#### 4. おわりに

本研究により、以下の成果が得られた。

- 1) 魚道評価において、魚類採捕調査で確認された魚種は全て環境 DNA 分析により検出され(適合度:100%)た。一方、河川改修区間では、両者の適合度は 58~76%程度の範囲内となった。また、採捕により確認されなかった希少種等についても検出され、環境 DNA 分析の有効性等が確認された。
  - 2) 伊自良川では、在来種は工事前後を通して年間 24~27 種で推移(うち 14~17 種が希少種)、希少種が半数を占めており非常に安定していることなどから、河川改修工事による伊自良川の魚類相全体への影響は小さい。
  - 3) 長護寺川では、河川改修による外来種ヌートリアの生息場の移動と考えられる生物相の変化が顕在化しており、水際環境が急激に改変された結果、希少種ハリオの個体数が減少している。水生植物および土壌基盤の保全の重要性が指摘された。
- 今後は、維持管理を含めた河道の機能維持・強化について、モニタリングを継続する予定である。

謝辞： 本研究を遂行するにあたり、岐阜大学名誉教授 藤田裕一郎先生には多大な助言をいただいた。また、現地調査については、岐阜県自然共生工法研究会、水圏域環境研究会会員の皆様、河川改修の実施計画等の資料提供については、岐阜県河川課および岐阜土木事務所のご協力を得た。最後に記して謝意を表します。

本研究は、JSPS科研費 (19K04627, 代表：和田 清)の助成を受けたものである。

#### 参考文献

- 1) 中村 俊六：魚道のはなし，リバーフロント整備センター，山海堂，225p., 1995.
- 2) 和田 清，森 誠一，遠藤協一，藤井孝文：岐阜県魚道カルテの評価軸の分析と既設魚道の改善策，土木学会河川技術論文集，第 22 巻， pp.397-402，2016.
- 3) Minamoto, T., M. Miya, T. Sado, S. Seino, H. Doi, M. Kondoh, K. Nakamura, T. Takahara, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, W. Iwasaki, A. Kasai, R. Masuda and K. Uchii: An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols, *Environ. DNA*, <https://doi.org/10.1002/edn3>. 121, 2020.
- 4) 赤松良久，乾隆帝，一松晃弘，河野誉仁，土居秀幸：環境 DNA を用いた河川内の魚類現存量推定に関する基礎的検討，土木学会論文 B1(水工学)Vol.73, No.4, pp.1111-1116, 2017.
- 5) 高原輝彦，山中裕樹，源 利文，土居秀幸，内井喜美子：環境 DNA 分析の手法開発の現状～湛水域の研究事例を中心として～，日本生態学会誌，第 66 巻， pp.583-599，2016.
- 6) 北川哲郎・村岡敬子・山田拓也・中村圭吾：河川水辺の国勢調査(魚類)における環境 DNA メタバーコーディングの試行事例分析，河川技術論文集，Vol.26, pp.319-324，2020.
- 7) 環境 DNA 学会:環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.1, URL: <http://ednasociety.org/manual>, 2019 年 5 月 1 日取得, 2019.
- 8) 赤松良久，後藤 益滋，乾隆帝，山中 裕樹，小室 隆，河野 誉仁：環境 DNA を用いた山口県内 2 級河川におけるヌートリアの侵入状況と生息適地の把握，応用生態工学論文集，Vol.21, No.1, pp.1-8，2018.
- 9) 三浦貴弘：移入動物ヌートリアの分布拡大と被害問題，奈良大学大学院研究年報，第 8 号， pp.138-146，2003.

(2022.8.22 受付)

## STUDY ON BIODIVERSITY USING ENVIRONMENTAL DNA ANALYSIS WITH CAPTURING FISHES IN NAGARA RIVER BASIN

Kiyoshi WADA, Shigeru TERAMACHI, Toru HIRATA and Shintaro HOSAKA

The purpose of this study is to clarify adaptability using environmental DNA analysis to compare the capturing fishes in Nagara River basin including the river crossing structure such as irrigation weir and fishways. In comparison with the capturing fish, ecosystem services in ensuring sustainable development were discussed. As a result, the adaptability using e-DNA in fishway data were 100% in Tamura and Shirakawa fishways, the fish that existence was not confirmed were estimated. It is suggested that the fishway have good function with supported for migration of fish from other hydraulic reasons. In Ijira and Chogoji river, the adaptability of e-DNA for all fish species was about 60%. On limiting condition of fish species with many populations, the adaptability improve up to 80% or more. Endangered species were also speculated, so their existence was grasped by e-DNA. Therefore, it was clarified that comprehensive analysis using e-DNA is effective for grasping of the change of habitats in watersheds. Applying with comprehensive analysis and species-specific analysis can be used to investigate for conservation basins on ecosystem services.