

環境DNAによるヨシ帯の モニタリングについて

後藤 彦幸¹・帰山 淳²

¹近畿地方整備局 琵琶湖河川事務所 河川環境課 (〒520-2279 滋賀県大津市黒津 4-5-1)

²近畿地方整備局 九頭竜川ダム総合管理事務所 真名川ダム管理支所 (〒912-0423 福井県大野市下若生子 25-1-36)

近年、個体を捕獲せずに魚類の生息状況を把握する新たな手法として環境 DNA 分析が注目されている。自然再生事業の順応的管理として、市民と連携したモニタリング調査が行われている滋賀県・野洲川河口部に再生されたヨシ帯を調査地として、「河川水辺の国勢調査マニュアル」に準拠した採捕調査によって確認される魚種と環境 DNA 分析により検出される魚種を比較することで、魚類相調査における環境 DNA 分析の性能評価を行った。その結果、総種数、重要な種数、特定外来種の種数のいずれでも、環境 DNA 分析による確認種数は、捕獲確認による確認種数を上回り、環境 DNA 分析が魚類相を把握する強力なツールとなりうる可能性が示された。

キーワード ヨシ帯, 環境 DNA, 魚類相, モニタリング, 河川水辺の国勢調査, 性能評価

1. はじめに

近年、個体を捕獲せずに、水域の生物の生息状況を把握する新たな手法として環境 DNA 分析が注目されている¹⁾。環境 DNA 分析による調査は、現地調査は採水のみであるため、専門的なスキルが必要とされる従来の採捕調査と比較して、調査結果が調査員の技能に依存しないことが期待されることから、市民が参加する調査での利用も検討されつつある²⁾。

一方で、環境アセスメント等で実施されている従来の標準的な採捕による調査手法と、環境 DNA 分析による生物の検出力を比較した事例が少ない。そこで、自然再生事業の順応的管理としてモニタリング調査の簡易手法を検討している滋賀県・野洲川河口部に再生されたヨシ帯を調査地として、従来の標準手法である「河川水辺の国勢調査マニュアル」に準拠した採捕調査によって確認される魚種と環境 DNA 分析により検出される魚種を比較し、環境 DNA 分析の魚類相調査における性能評価を行った。

2. 方法

(1) 捕獲調査

捕獲調査は、2016年の夏季(7月28日~29日)及び秋季(10月12日~13日)に、琵琶湖に流入する一級河川である野洲川の河口の両岸、約360m区間で実施した(図-1)。

調査範囲は、河川水辺の国勢調査の調査地点でもあり、「河川水辺の国勢調査マニュアル」(以下、水国マニュアル)に準拠した採捕調査が経年的に実施されている。本調査でも同様にタモ網、投網、定置網、刺網、はえなわ、どう、地曳き網、カゴ網、セルビンを使用した捕獲調査を、マニュアルに準拠した努力量で行った(表-1)。

(2) 環境 DNA 分析

a) 環境 DNA 試料の採水

各季に実施した採捕調査の初日(調査開始前)に、環境 DNA 分析のため、1検体あたり1Lの表層水をポリエチレン製容器に採水した。野洲川河口左右岸で、ヨシ帯の水際(植生外)5箇所で各1検体(合計10検体)の採水を行った(図-1)。

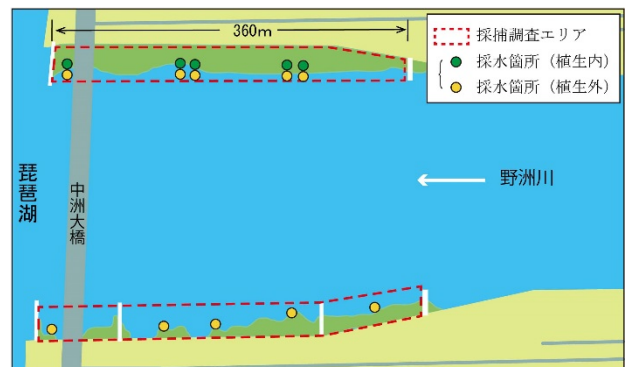


図-1 捕獲調査範囲と採水箇所の配置

表-1 使用漁具の仕様と努力量

漁具・漁法	規格	努力量
タモ網	袋網は目合いが 2mm 程度	1人×60分 (／岸)
投網	目合 12mm	10投 (／岸)
	目合 18mm	10投 (／岸)
定置網 (大)	袖部 3m×2m 目合 12mm わたり目合 12mm 袋部径 60cm (3段) 目合モジ 7mm	1張り×一晚設置 (／岸)
刺網 (一枚網)	目合 15~20mm 丈 1~2m 長さ 20~30m	1張り×一晚設置 (／岸)
刺網 (三枚網)	内目 40~50mm 外目 200~250mm 丈 1m 長さ 20~30m	1張り×一晚設置 (／岸)
はえなわ	幹縄 20m 針 10本 小魚等を餌として使用	1張り×一晚設置 (／岸)
どう	径 10cm×60cm 程度 小魚等の餌を入れて使用	2統×一晚設置 (／岸)
地曳き網	袖部 3m×50cm 目合 3mm	1回×5m 程度 (／岸)
カゴ網	25cm×25cm×35cm 程度 さなぎ粉等の餌を入れて使用	3個×120分設置 (／岸)
セルびん	直径 18cm 長さ 25~30cm さなぎ粉等の餌を入れて使用	3個×120分設置 (／岸)

b) DNA 分析

採水した試料水は、採水から 24 時間以内に濾過・冷凍し、分析時まで-20℃以下で保存した。

試料に含まれる魚類のミトコンドリア 12SrRNA の遺伝子を対象として、ユニバーサルプライマー MiFish³⁾により約 172 塩基対の領域を増幅後、次世代シーケンサーを用いて配列を決定し、データ・ベースと照合し 97%以上の相同性を基準として同定し、魚種の検出を行った。

3. 結果

(1) 確認状況

a) 捕獲調査

調査の結果、右岸では 4 目 6 科 15 種、左岸では 3 目 5 科 16 種、両岸を併せた、野洲川河口全体では、4 目 6 科 18 種の魚類が確認された (表-2)。主に、琵琶湖に流入する河川の中流域から下流域、及び琵琶湖沿岸に見られる種が確認された。

個体数として最も多かったのはカネヒラで、合計 355 個体が確認された。次いで多かったのはニゴイ属 (323 個体)、オイカワ (197 個体)、ブルーギル (110 個体)、オオクチバス (75 個体) で、これら 5 種 (分類群) で、全捕獲個体数の 80%以上を占めた。

b) 環境 DNA 分析

次世代シーケンサーを用いた環境 DNA 分析では、4 目 9 科 32 種の魚種が検出された (表-2)。

琵琶湖に流入する河川の中流域から下流域、及び琵琶湖沿岸に生息している種が網羅的に検出された。

捕獲調査のみで確認された種は、ヤリタナゴ 1 種であったが、環境 DNA 分析のみで検出された魚類は、16 種 (フナ属を除く) であった。分類群 (科) 単位で見ると、いずれの分類群 (科) でも環境 DNA 分

表-2 採捕調査及び環境 DNA 分析による確認状況

水国 No.	種名	夏季		秋季		2季	
		環境DNA	捕獲	環境DNA	捕獲	環境DNA	捕獲
1	コイ	○	●	○	●	○	●
2	ゲンゴロウブナ	○		○		○	
3	ニゴロブナ	○		○		○	
4	キンギョ	○		○		○	
	フナ属		●		●		●
5	ヤリタナゴ				●		●
6	カネヒラ	○	●	○	●	○	●
7	ハス	○		○	●	○	●
8	オイカワ	○	●	○	●	○	●
9	カワムツ			○		○	
10	モツゴ	○	●	○	●	○	●
11	ビワヒガイ			○		○	
12	タモロコ			○		○	
13	ゼゼラ	○				○	
14	カマツカ	○		○	●	○	●
	カマツカ属			○		○	
15	ズナガニゴイ			○		○	
16	コウライニゴイ	○	●	○	●	○	●
	ニゴイ属		●		●		●
17	コウライモロコ	○		○		○	
	スゴモロコ類	○	●	○	●	○	●
18	ドジョウ	○				○	
	ドジョウ属	○		○		○	
19	アジメドジョウ			○		○	
20	シマドジョウ属			○		○	
21	ナマス	○		○	●	○	●
22	アユ		●		●	○	●
23	ビワマス			○		○	
24	オヤニラミ	○		○		○	
25	ブルーギル		●		●		●
26	オオクチバス		●		●		●
27	コクチバス	○		○		○	
28	ウキゴリ		●		○		○
29	イサザ	○				○	
	ウキゴリ属		●				●
30	ヨシノボリ属	○	●	○	●	○	●
31	ヌマチチブ	○	●	○	●	○	●
	ハゼ科		●				●
32	ドンコ			○		○	
33	カムルチー	○	●	○	●	○	●
計	33種	24種	14種	30種	17種	32種	18種

析によって、捕獲調査による確認種数と同程度か、より多くの種数が検出された (表-3)。特にコイ科では、捕獲調査と比較して 5~6 種、多く検出された。

捕獲調査では魚類を外部形態で分類するため、主要な分類形質が発達していない仔稚魚についてはコイ科やフナ属と記録することが多いが、環境 DNA 分析の場合には、基本的に種まで同定が可能である。

表-3 分類群別確認状況

分類群 (科)	夏季		秋季		合計		内容
	環境DNA	採捕	環境DNA	採捕	環境DNA	採捕	
コイ科	12	7	15	10	16	10	
コイ科 (ドジョウ類)	1	0	3	0	3	0	
ナマズ科	1	0	1	1	1 ^b	1 ^b	b. ナマズ
アユ科	1	1	1	1	1 ^d	1 ^d	d. アユ
サケ科	0	0	1	0	1 ^e	0	e. ビワマス
ケツギョ科	1	0	1	0	1 ^f	0	f. オヤニラミ
サンフィッシュ科	3	2	3	2	3 ^g	2 ^h	g. オオクチバス、コクチバス、ブルーギル h. オオクチバス、ブルーギル
ハゼ科	4	3	3	2	4	3	
ドンコ科	0	0	1	0	1 ⁱ	0	i. ドンコ
タイワンドジョウ科	1	1	1	1	1 ^j	1 ^j	j. カムルチー
合計	24種	14種	30種	17種	32種	18種	-

表-4 重要種の確認状況

No.	目名	科名	種名	環境DNA				捕獲調査		環境省 RL	滋賀県 RDB	外来 生物法
				野洲川河口		新庄大橋		野洲川河口	野洲川河口			
				夏季	秋季	夏季	秋季	夏季	秋季			
1	コイ	コイ	コイ	○	○	○	○	○	○	LP ^{注2}	希少 ^{注2}	
2			ゲンゴロウブナ	○	○					EN	希少	
3			ニゴロブナ	○	○		○			EN	希少	
			フナ属					○	○	注	注	
4			ヤリタナゴ						○	NT	危増	
5			カネヒラ	○	○			○	○		危増	
6			ハス	○	○	○			○	VU	希少	
7			ヌマムツ				○				分布	
8			モツゴ	○	○			○	○		希少	
9			ビワヒガイ		○						希少	
10			ゼゼラ	○						VU	希少	
11			ズナガニゴイ		○		○				危増	
12			コウライニゴイ	○	○	○	○	○	○		要注	
13			ドジョウ	○						DD	要注	
14			アジメドジョウ		○					VU	希少	
15	ナマズ	ナマズ	ナマズ	○	○	○			○		要注	
16	サケ	アユ	アユ	○	○	○	○	○	○		分布	
17		サケ	ビワマス		○		○			NT	要注	
18	スズキ	サンフィッシュ	ブルーギル	●	●			●	●			特定
19			オオクチバス	●	●		●	●	●			特定
20			コクチバス	●	●							特定
21		ハゼ	イサザ	○						CR	危惧	
22		ドンコ	ドンコ		○		○				その他	
計	4目7科22種	重要種	12種	14種	5種	8種	5種	8種	10種	19種	3種	
			17種				10種					8種
			3種	3種	0種	1種	2種	2種				
		特定外来生物	3種				1種		2種			

表-5 確認種数の比較

項目	捕獲調査	環境 DNA
確認種数	18 種	32 種
希少種	8 種	17 種
特定外来生物	2 種	3 種

c) 希少種の確認状況

環境 DNA 分析により検出された重要種は、ゲンゴロウブナ、カネヒラ、ハス、ナマズなど夏季・秋季を通じて合計 17 種であった。

一方、捕獲調査ではヤリタナゴ、ナマズ、アユなど 8 種が確認された (表-4)。確認された 8 種のうち、ヤリタナゴを除く 7 種は、環境 DNA 分析でも検出された。

環境 DNA 分析では、捕獲調査で確認されていない

重要種として、ビワヒガイ、ゼゼラ、ズナガニゴイ、ドジョウ、アジメドジョウ、ビワマス、イサザ、ドンコを検出した。

d) 特定外来生物の確認状況

捕獲調査ではブルーギル及びオオクチバスの 2 種が確認された (表-4)。

一方、環境 DNA 分析では、捕獲調査で確認されたブルーギル、オオクチバスに加えて、コクチバスが検出された。

以上、捕獲調査、及び環境 DNA 分析で確認された総種数、希少種の種数、特定外来生物の種数は表-5 のとおりである。総種数、重要な種数、特定外来種の種数のいずれでも、環境 DNA 分析による検出種数は、捕獲調査による確認種数を上回った。

(2) 魚類相調査における採水地点数の検討

季節別・左右岸別の捕獲調査による確認種数は、表-6 のとおりである。

季節別・左右岸別に集計した、環境 DNA 分析による 1 検体（ヨシ帯外側の検体）あたりの平均検出種数は 13.1 種であり、捕獲確認種数（全ての漁法による確認種数：平均 11.8 種）より多い値となった。

ただし、従来の漁獲手法に代替可能な手法としての環境 DNA 分析による検出効果を評価するために、環境 DNA 分析による確認種が、捕獲確認された魚種のどれくらいの割合を検出しているか（捕獲種適合率）をみると、1 検体あたりで平均 68.3%（最大 82.0%、最小 58.5%）であった。

本業務では、右岸・左岸のヨシ帯の外側で各 5 検体を採水しており、5 検体に含まれる種を合わせた捕獲種適合率は、平均 87.2%（最大 100%、最小 76.9%）であった。さらに、右岸では補足的にヨシ帯の内側でも採水していたことから、ヨシ帯の内側の検体を加えた合計 10 検体に含まれる捕獲種適合率をみると、平均 90.5%（夏季 90.0%、秋季：90.9%）を検出していた。

1 検体平均の捕獲種適合率が 68.3%であり、5 検体で 87.2%、10 検体で 90.5%に達することから、この間の増加を対数モデルで近似すると図-2 のようになる。この推定に基づけば、野洲川河口ヨシ帯の左右岸スケールの魚類相については、1Lの採水容器 3 検体程度の環境 DNA を分析することにより、従来の漁獲調査で確認できる魚種の 80%を網羅する種を検出することが期待できる。

また、5 検体から 10 検体に増加することで、捕獲種適合率について 3.3%の上昇が期待されるが、これは実質的に 1 種数の増加にとどまっており、5 検体より多い検体数による適合率向上の効果は限定的であると考えられる。

(3) ヨシ帯の内側と外側で検出される種の比較

多くの種で、夏季・秋季のいずれかの季節ではヨ

シ帯の内外いずれでも確認されていたが、ビワヒガイ、タモロコなど 9 種は、両季を通じて、ヨシ帯の内外いずれかのみで検出された（表-7）。

このうち、ヨシ帯の外側でのみ検出されたのは、ビワヒガイ、タモロコ、ズナガニゴイ、スゴモロコ類、アジメドジョウ、シマドジョウ属、コクチバスであった。一方、ドジョウおよびイサザは、ヨシ帯の内側でのみ検出された。

外側でのみ検出された種には、ビワヒガイ、ズナガニゴイ、シマドジョウ属、コクチバスなど、主に砂～砂礫底で、比較的、流れのある開放水面側の環境を好む種が多く含まれている。また、採水箇所はヨシ帯の外側ではあるが、抽水植物の近傍であったことから、タモロコやスゴモロコ類等の生息環境の付近であり、採水環境と検出された種は概ね整合的であるといえる。また、止水の泥底環境を好む種であるドジョウはヨシ帯の内側でのみ確認されており、ドジョウについても、生息環境と採水箇所の環境は整合的であるといえる。

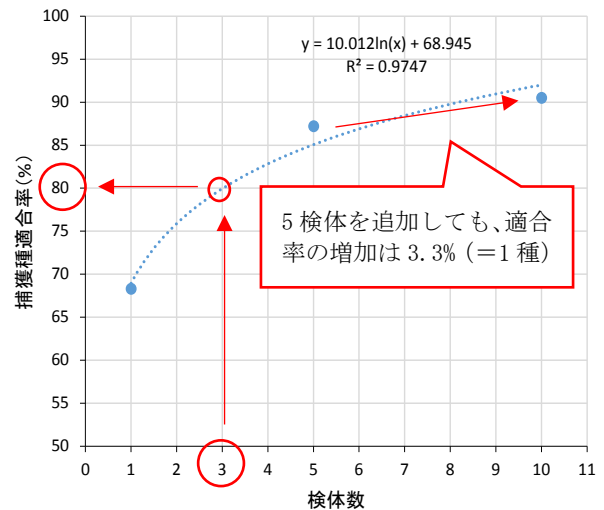


図-2 検体数の増加の効果に関する対数モデル

表-6 季節別の検出種及び捕獲確認種

項目	夏		秋		平均
	右岸	左岸	右岸	左岸	
捕獲確認種数	10 種	13 種	11 種	13 種	11.8 種
環境 DNA 分析による 1 検体あたりの平均検出種数(ヨシ帯外側の検体)	15.2 種	10.2 種	13.2 種	13.6 種	13.1 種
1 検体平均・捕獲種適合率 ⁽¹⁾	82.0%	58.5%	63.6%	69.2%	68.3%
5 検体に含まれる捕獲確認種数	9 種	10 種	9 種	13 種	10.3 種
5 検体合計・捕獲種適合率 ⁽²⁾	90.0%	76.9%	81.8%	100%	87.2%
ヨシ帯内側を含めた 10 検体に含まれる捕獲確認種数 ⁽³⁾	9 種	-	10 種	-	9.5 種
ヨシ帯内側を含めた 10 検体合計・捕獲種適合率 ⁽⁴⁾	90.0%	-	90.9%	-	90.5%

(4) 種別の検出箇所数の季節変化

環境 DNA で検出された種が、各調査時期にどれくらいの箇所で検出されたかを、表-8 に示した。

表では、右岸のヨシ帯外側 5 箇所、ヨシ帯内側の 5 箇所、左岸のヨシ帯外側 5 箇所を単位として、それぞれの種が、5 箇所中の何箇所かで検出されたかを検出箇所の割合として整理し、以下の 3 階級で整理した。

- ・青色：5 箇所中 4~5 箇所検出
- ・黄色：5 箇所中 2~3 箇所検出
- ・薄赤色：5 箇所中の 0~1 箇所検出

秋季は確認種数が多いが、秋のみに確認された種であるビワヒガイ、タモロコ、ズナガニゴイ、アジメドジョウ等は 1 箇所での検出、カワムツは 3 箇所での検出と、検出箇所数が少なかった

一方、ビワマスについては、秋季に全ての検体で検出された。

コイ・フナ類をみると、コイは、夏・秋季いずれも多くの箇所で検出されたが、ゲンゴロウブナとニ

ゴロブナは、夏季には多くの箇所で確認されたが、秋季は確認箇所数が少なかった。

以上の結果から、注目種であるコイ・フナ類や、秋季のみに検出された種について、秋季の検出箇所数は少なく、安定して検出されるかどうかには不確実性が残る。調査結果の安定性の観点からは、夏季調査と秋季調査の両季で調査を実施することが望ましいと考えられる。

表-7 ヨシ帯の外側のみ、または内側のみで検出された種

種名	夏季		秋季	
	外側	内側	外側	内側
ビワヒガイ			1	
タモロコ			2	
ズナガニゴイ			2	
スゴモロコ類	2		1	
ドジョウ		1		
アジメドジョウ			1	
シマドジョウ属			1	
コクチバス	1		1	
イサザ		1		

表-8 ヨシ帯種別の検出箇所数の季節変化

確認種	検出箇所数						検出箇所の割合 (%)								ヨシ帯外側 検出箇所数	
	右岸			左岸			右岸				左岸					
	ヨシ帯外側		ヨシ帯内側	ヨシ帯外側			ヨシ帯外側		ヨシ帯内側		ヨシ帯外側					
	夏季	秋季	夏季	秋季	夏季	秋季	夏季	秋季	夏季	秋季	夏季	秋季	夏季	秋季		
コイ	5	4	4	3	3	3	100	80	80	60	60	60	5	4		
ゲンゴロウブナ	4	0	3	1	3	0	80	0	60	20	60	0	4	1		
ニゴロブナ	5	0	5	1	3	0	100	0	100	20	60	0	5	1		
キンギョ	5	1	5	0	3	2	100	20	100	0	60	40	5	2		
カネヒラ	5	5	4	5	5	5	100	100	80	100	100	100	5	5		
ハス	5	1	1	0	5	4	100	20	20	0	100	80	5	4		
オイカワ	4	5	0	5	4	5	80	100	0	100	80	100	4	5		
カワムツ	0	2	0	3	0	1	0	40	0	60	0	20	0	3		
モツゴ	0	0	1	1	1	0	0	0	20	20	20	0	1	1		
ビワヒガイ	0	1	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	1		
タモロコ	0	1	0	0	0	1	0	20	0	0	0	20	0	1		
ゼゼラ	3	0	1	0	0	0	60	0	20	0	0	0	3	0		
カマツカ	2	3	1	2	0	5	40	60	20	40	0	100	2	5		
カマツカ属	0	2	0	1	0	0	0	40	0	20	0	0	0	2		
ズナガニゴイ	0	1	0	0	0	1	0	20	0	0	0	20	0	1		
コウライニゴイ	5	5	4	5	5	5	100	100	80	100	100	100	5	5		
コウライモロコ	5	2	0	2	1	2	100	40	0	40	20	40	5	2		
スゴモロコ類	2	0	0	0	0	1	40	0	0	0	0	20	2	1		
ドジョウ	0	0	1	0	0	0	0	0	20	0	0	0	1	0		
ドジョウ属	0	0	3	1	0	1	0	0	60	20	0	20	3	1		
アジメドジョウ	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	20	0	1		
シマドジョウ属	0	1	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	1		
ナマズ	1	0	0	1	0	1	20	0	0	20	0	20	1	1		
アユ	0	5	1	5	0	5	0	100	20	100	0	100	1	5		
ビワマス	0	5	0	5	0	5	0	100	0	100	0	100	0	5		
オヤニラミ	1	2	1	1	0	0	20	40	20	20	0	0	1	2		
ブルーギル	5	3	5	3	2	3	100	60	100	60	40	60	5	3		
オオクチバス	5	4	3	5	5	3	100	80	60	100	100	60	5	5		
コクチバス	1	1	0	0	0	0	20	20	0	0	0	0	1	1		
ヨシノボリ属	5	5	5	5	5	5	100	100	100	100	100	100	5	5		
ヌマチチブ	5	5	5	5	5	5	100	100	100	100	100	100	5	5		
ウキゴリ	3	4	1	3	0	3	60	80	20	60	0	60	3	4		
イサザ	0	0	1	0	0	0	0	0	20	0	0	0	1	0		
ドンコ	0	1	0	1	0	0	0	20	0	20	0	0	0	1		
カムルチー	2	1	2	3	1	0	40	20	40	60	20	0	2	3		

4. 考察

夏季調査では、環境 DNA 分析で検出された 24 種に、捕獲調査で確認された 14 種全てが含まれていた。秋季調査では、環境 DNA 分析で検出された 30 種に、捕獲調査で確認された 17 種のうち、ヤリタナを除く 16 種が含まれていた。以上の結果から、野洲川河口で捕獲確認された魚種は、概ね環境 DNA 分析で網羅的に検出されていたといえる。

また、環境 DNA 分析は、希少種の検出及び特定外来種についても、従来の採捕調査を上回る種数を検出しており、MiFish を用いたメタバーコーディングによる手法が、淡水魚類について高い検出力を持つことが示された。

以上の結果は、野洲川河口で自然再生事業の順応的管理として行われている魚類のモニタリングの場で、環境 DNA 分析の手法が、ヨシ帯を利用している魚種を把握する手法としての利用可能性を示すものである。また、魚類相把握を目的とした環境 DNA 分析用の試料としては、片岸で 5 検体程度の試料数が目安になると考えられる。

季節別での確認状況を見ると、捕獲調査と環境 DNA 分析のいずれでも、秋季の確認種数が多い傾向がみられ、特に、環境 DNA 分析では、秋季調査のみで、夏・秋季の合計の検出種（32 種）のうち 30 種（約 94%）の種が確認できている。ただし、秋季のみに確認された種であるビワヒガイ、タモロコ、アジメドジョウ等は 1 箇所での検出、カワムツは 3 箇所での検出と、検出箇所数が少なかった。コイ・フナ類をみると、コイは、夏・秋季いずれも多く箇所で検出された。ゲンゴロウブナとニゴロブナは、夏季には多くの箇所で確認されたが、秋季は確認箇所数が少なかった。

一方、ビワマスについては、湖の深層に生息する夏季には確認されなかったが、遡上・産卵期の秋季には全ての検体で検出された。

コイ・フナ類や秋季のみに検出された種について、秋季の検出箇所数は少なく、安定して検出されるかどうかには不確実性が残ることや、生活史の一時期を

河川で過ごす種がいることから、野洲川河口域の魚類相を環境 DNA 分析により網羅的に検出するためには、複数の季節で調査を実施することが望ましいと考えられる。

一方、河川のような開放水域では、調査地点で捕捉された環境 DNA が、上流から流入してきた分子である可能性があり、検出されても、必ずしも採水箇所を検出された魚種が生息していることを示すものではない。環境 DNA の流下過程における分散や河床への捕捉、及び時間経過に伴う分解等による環境 DNA 濃度の減衰と検出限界の関係については、今後、さらに知見を深めていく必要がある。

謝辞：調査業務を行ったパシフィックコンサルタンツ(株)、DNA 分析で専門的なご助言をいただいた兵庫県立大学大学院の土居准教授に謝意を表す。

参考文献

- 1) Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z. (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13 : 193-197. doi:10.1007/s10201-011-0362-4
- 2) Biggsa J, Ewald N, Valentinib A, Gaboriaudb C, Dejeanb T, Griffithsc RA, Fosterd J, Wilkinsond JW, Arnelld A, Brothertone P, Williams P. (2015) Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183:19-28.
- 3) Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, J. 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. *Royal Society open science*. DOI: 10.1098/rsos.150088