

**Liite 3 Raportti Ailangantunturin pumppu-
voimalaitoksen YVA-menettely - uhanalaisen
nilviäislajin ja nieriän havainnointi eDNA-
menetelmällä. AFRY & Spring-DNA 5.12.2024**

Pekka Heiskanen

Raportti (05.12.2024) Ailangantunturin pumppuvoimalaitoksen YVA-menettely- raakun ja nieriän havainnointi eDNA-menetelmällä

Johdanto

Kemijoki Oy:n Ailangantunturille suunnitteleman pumppuvoimahankkeen ympäristövaikutusten arviointimenettelyä (YVA) toteuttaa AFRY. Osana YVA-menettelyä käytetään eDNA-menetelmää jokihelmisimpukoiden (raakut) ja nieriöiden havainnointiin alueen Tunturilammesta ja siitä laskevista virtavesistä.

Raakun ekologia

Jokihelmisimpukka eli raakku (*Margaritifera margaritifera*) on suuri makeanveden simpukka, joka on Suomessa rauhoitettu vuonna 1955 ja joka on luokiteltu vuodesta 2010 lähtien Suomessa erittäin uhanalaiseksi. Lisäksi laji kuuluu EU:n luontodirektiivin lajilistoihin II ja V joissa sen todetaan olevan Euroopan unionin tärkeänä pitämä laji, jonka suotuisa suojelutaso on pyrittävä säilyttämään tai palauttamaan.

Suurimpia uhkia lajille ovat vesirakentaminen, ojitus ja turpeenotto, lohikantojen heikentyminen, ja vesistöjen saastuminen. Kantoja on saatu osittain elvytettyä tehokkaan suojelun ansiosta. Lajin suurimmat esiintyvyydet Suomessa ovat pohjoisen puhtaissa ja aktiivisesti virtaavissa joissa. Etelä-Suomessa lajin ainoa lisääntyvä kanta löytyy Ylöjärven Ruonanjoesta ja paikoitellen sitä esiintyy myös muualla Länsi-Suomessa. Laji pysyy pitkään paikallaan ja se saa ravintonsa vedestä suodattamalla.

Raakku voi kasvaa kooltaan jopa yli 15cm mittaiseksi ja elää yli 200-vuotiaaksi. Raakku saavuttaa sukukypsyyden n. 20-vuotiaana. Lisääntyäkseen raakku tarvitsee joessa elävän lohi- tai taimenkannan, jonka kiduksiin sen glockidium-toukat voivat kiinnittyä ja elää niissä kiinnittyneinä talven yli. Keväällä toukat tiputtautuvat joen pohjalle ja kaivautuvat sedimenttiin n. 2-3 vuodeksi. Nuorien raakkujen määrä Suomen populaatioissa on pieni ja ne muodostuvat pääasiassa vanhoista yksilöistä.

<https://laji.fi/taxon/MX.212403>

<https://www.metsa.fi/luonto-ja-kulttuuriperinto/lajien-suojelu/raakku/>

<https://punainenkirja.laji.fi/>

Nieriän ekologia

Nieriä (*Salvelinus alpinus*), Lapissa tunnettu myös nimellä rautu, on kylmien vesien lohikala, joka esiintyy Lapissa kuudella päävesistöalueella: Kemi-, Tornion-, Teno-, Näätämön-, Uutuan- ja Paatsjoen vesistöissä. Lapin nieriäkannat ovat kokonaisuudessaan elinvoimaisia, mikä poikkeaa merkittävästi eteläisemmistä populaatioista.

Lapin nieriäkantojen elinvoimaisuudesta huolimatta lajiin kohdistuu uhkia kuten Ilmastonmuutos, sillä kylmän veden lajina nieriä on erityisen herkkä ilmaston lämpenemiselle. Tämä uhka on jo havaittavissa eteläisemmissä kannoissa ja voi tulevaisuudessa vaikuttaa myös Lapin populaatioihin. Tämän lisäksi jääkauden jälkeen järviin eristyksiin jääneet populaatiot ovat geneettisesti ainutlaatuisia ja siten erityisen arvokkaita suojelun kannalta. Lapin nieriäkannoissa esiintyykin mielenkiintoista geneettistä monimuotoisuutta ympäristön pirstaloitumisesta johtuen jääkauden jälkeen.

Tietoja mahdollisen nieriän esiintymisestä on myös esitetty, mutta kanta on mahdollisesti tuhottu Tunturilammessa. Reliktinieriää on voinut esiintyä Ailanganjärvässä ja mahdollisesti myös muissa lammissa alueella (Lumme & Koutaniemi 2023)

<https://luontoportti.com/t/2057/nieria>

<https://web.archive.org/web/20200113011740/https://www.luke.fi/tietoa-luonnonvaroista/kalat-ja-kalatalous/kalat-ja-muuttuva-ymparisto/kalat-kalastus-ilmastonmuutos/>

<https://www.luke.fi/fi/luonnonvaratieto/tiedetta-ja-tietoa/kalalajit/kaikki-kalalajit/nieria>

Näytteenotto

Raakun ja nieriän havainnointia toteutettiin eDNA-menetelmällä. eDNA on eliöiden ympäristöön päästämää DNA-materiaalia joko vapaina DNA-fragmentteina, sitoutuneina irrallisiin soluihin, kudoksiin, limaan, karvoihin yms. Tämä eDNA on mahdollista kerätä tarkoitukseen valmistetuilla eDNA-filttereillä. Kun eDNA on kerätty, tulee se säilöä asianmukaisesti säilöntäaineeseen ja toimittaa laboratorioon analysoitavaksi.

Näytteenoton toteutti AFRYn näytteenottaja, joka on saanut eDNA näytteenottokoulutuksen. Näytteenotto tehtiin 12-14.8.2024. Näytteenotto toteutettiin yleisten eDNA -standardien mukaisesti niin, että jokaiselta näytteenottopaikalta otettiin 2kpl biologisia näytteitä, sekä toisiaan lähellä olevien näytteenottopaikkojen suhteen otettiin negatiivisia kenttäkontrolleja. Näytteenottopaikat merkitty kuvissa nieriän, raakun ja positiivisen kenttäkontrollin (Ailanganjoki) mukaan.

Lopulta filtrit varastoitettiin omiin näytteenottopaikkakohtaisiin steriileihin pusseihin ja koottiin omiin isompiin steriileihin pusseihin valmiina toimitusta varten laboratorioon.

Yksi merkittävimmistä keinoista luotettavuuden parantamiseksi eDNA menetelmissä on näyttemäärien kasvattaminen. Pienempien huokoskokojen filtrit toisaalta sitovat tehokkaammin eDNA:ta, mutta tukkeutuvat nopeammin jolloin näytetilavuuden määrä laskee. Aiemmissä raakkuselvityksissä ja muiden asiantuntijoiden ohjeistamana olemme nykytiedon perusteella todenneet 0.8µm filtrit sopivaksi raakun havainnointiin.

Sylphiumin suodattimet on erityisesti suunniteltu kestämään tukkeutumista ja mahdollistamaan suurten vesimäärien suodattamisen, mikä on tärkeää jokiympäristössä. Lisäksi Sylphiumin tarjoamat eDNA-eristyskitit ja qPCR-testit ovat optimoitu toimimaan hyvin humuspitoisten vesien kanssa, mikä on tyypillistä monille Suomen joille. Nämä ominaisuudet tekevät Sylphiumin suodattimista luotettavan valinnan jokihelmisimpukan eDNA-tutkimuksiin Suomen vesistöissä. (Sylphium, 2023)

Laboratorioanalyysit

eDNA analysoitiin laboratoriossa qPCR-menetelmällä.. Yhden tai muutaman lajin havainnointi toteutetaan normaalisti PCR menetelmillä ja tätä kutsutaan yleisesti termillä "barcoding". PCR soveltuu barcodaukseen mainiosti, sillä se on nopea ja tarkka menetelmä DNA molekyylien havaitsemiseen, sekä niiden lukumäärien laskemiseen.

Eliölajit poikkeavat toisistaan DNA -sekvenssin perusteella evolutiivisista syistä johtuen. Nämä eroavaisuudet toimivat perustana niiden erottelulle molekulaarisesti. Ympäristönäytteistä kerättyjen DNA-molekyylien analyysi perustuu useimmiten mitokondriaalisten geenien havainnointiin kahdesta syystä. Ensinnäkin mitokondrioita on vähintään 10-100 kertainen määrä soluihin verrattuna, ja esimerkiksi yksi lihassolu voi pitää sisällään jopa tuhansia mitokondrioita. Toiseksi mitokondriaalisen DNA:n konservoitumisaste on optimaalinen, eli sen mutaationopeus on tarpeeksi suuri, jotta eri lajien geneeissä on tunnistettavia eroja mutta toisaalta mutaationopeus on tarpeeksi hidas, jotta lajien sisäinen vaihtelu pysyy keskimäärin tunnistettavana. Yleisimpiä barcodauksessa käytettäviä genejä ovat mitokondriaaliset COI (sytokromioksidaasi 1) ja CYB (sytokromi B).

PCR (Polymerase chain reaction) on lämpötilan ohjaama reaktio, joka tapahtuu koeputkessa PCR-laitteen sisällä. DNA on 2-juosteinen molekyyli, jonka juosteet voidaan erottaa toisistaan korkeissa lämpötiloissa.

PCR-reaktion 1. vaiheessa PCR-laite nostaa lämpötilan korkeaksi n. 95 asteeseen, jolloin DNA-juosteet erkanevat toisistaan. 2. vaiheessa lämpötilaa lasketaan hieman n. 60 asteeseen, jolloin DNA-juosteet pääsevät takaisin pariutumaan. Jos reaktioon on lisätty pieni fragmentti (aluke) DNA:ta tutkittavasta kohteesta, tarrautuu tämä aluke vapaana oleviin DNA-juosteisiin. 3. vaiheessa lämpötilaa nostetaan taas hieman, koska reaktioon lisätty DNA-polymeraasi aktivoituu tietyssä lämpötilassa. Tällöin DNA-polymeraasi tarrautuu alukkeen kohtaan ja alkaa syntetisoidaan uutta DNA-juostetta vastinparille. Tämä johtaa siihen, että kohde eliön DNA:n määrä tuplaantuu jokaisen 3-vaiheisen syklin tuloksena jos näytteessä on DNA:ta, johon lisäämämme aluke tarrautuu kemiallisesti. Jos DNA molekyylien tuplaantumista tapahtuu, voidaan tämä havaita PCR-laitteisiin

rakennetuilla luminometrisillä antureilla. Toisin sanoen, jos DNA:n tuplaantumista tapahtuu PCR-reaktiossa, on näyte positiivinen ja jos sitä ei tapahdu on näyte negatiivinen.

Alla lueteltuna projektissa käytetyt primerit ja probet:

Jokihelmisimpukka:

Forward primer: 5'- TTG TTG ATT CGT GCT GAG TTA GG-3'

Reverse primer: 5'- GCA TGA GCC GTA ACA ATA ACA TTG-3'

Probe: 5'-6-FAM 5'- CCT GGT TCT TTG CTG GGT-3'

<https://edna-validation.com/edna-validation-scale/validated-assays/validated-assays/>

Nieriä

Forward primer: 5'- GAC TGC CTT TGT AGG CTA CGT T-3'

Reverse primer: 5'- CAG CGG AGA GGA GGT TTG TG- 3'

Probe: 5'-6-FAM 5'- GGG CAA ATA TCC TTC TGA GGA GCC A-BHQ-1- 3'

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226638>

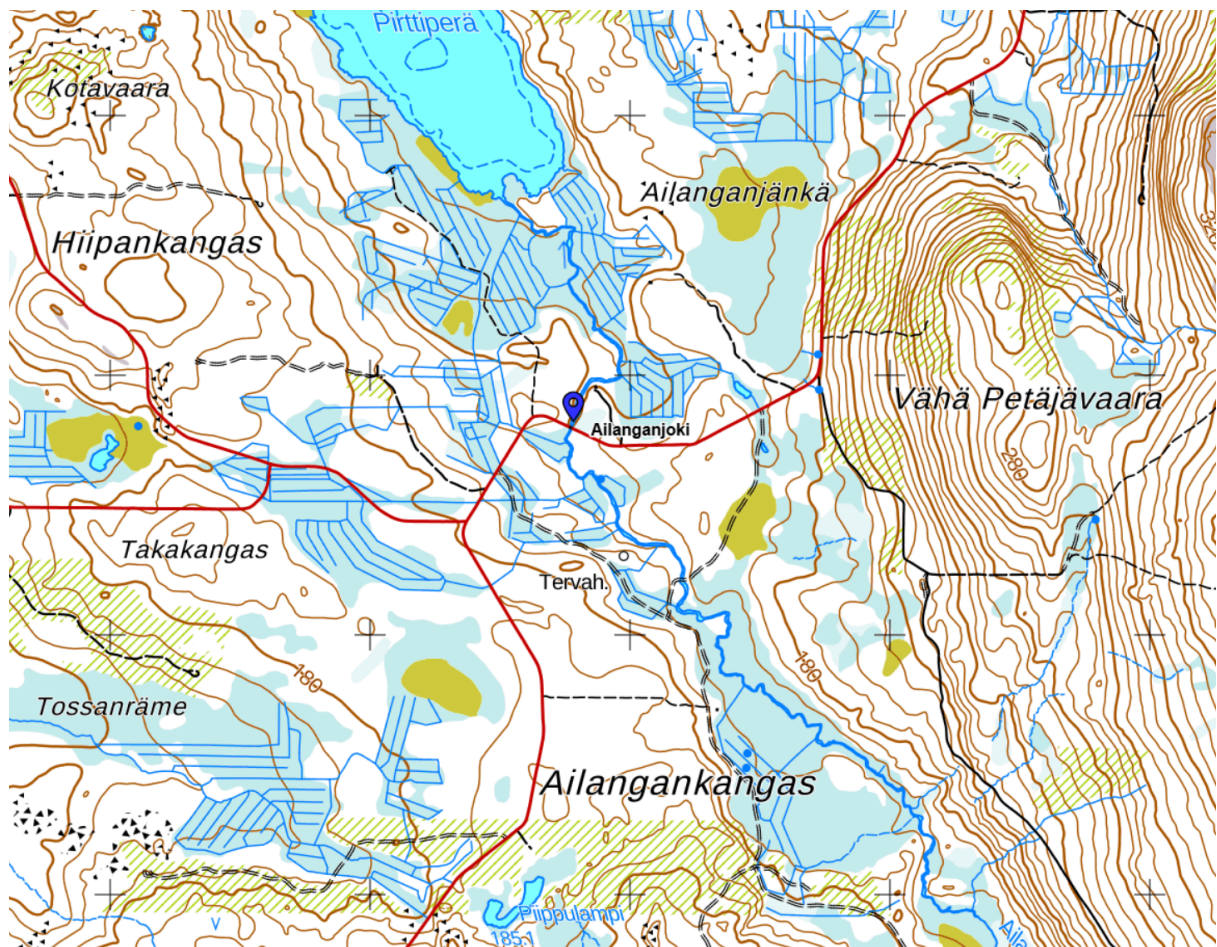
Tulokset (AFRY näytteenotto)

Tunturilampi nieriä 1 ja 2: **Negatiivinen**

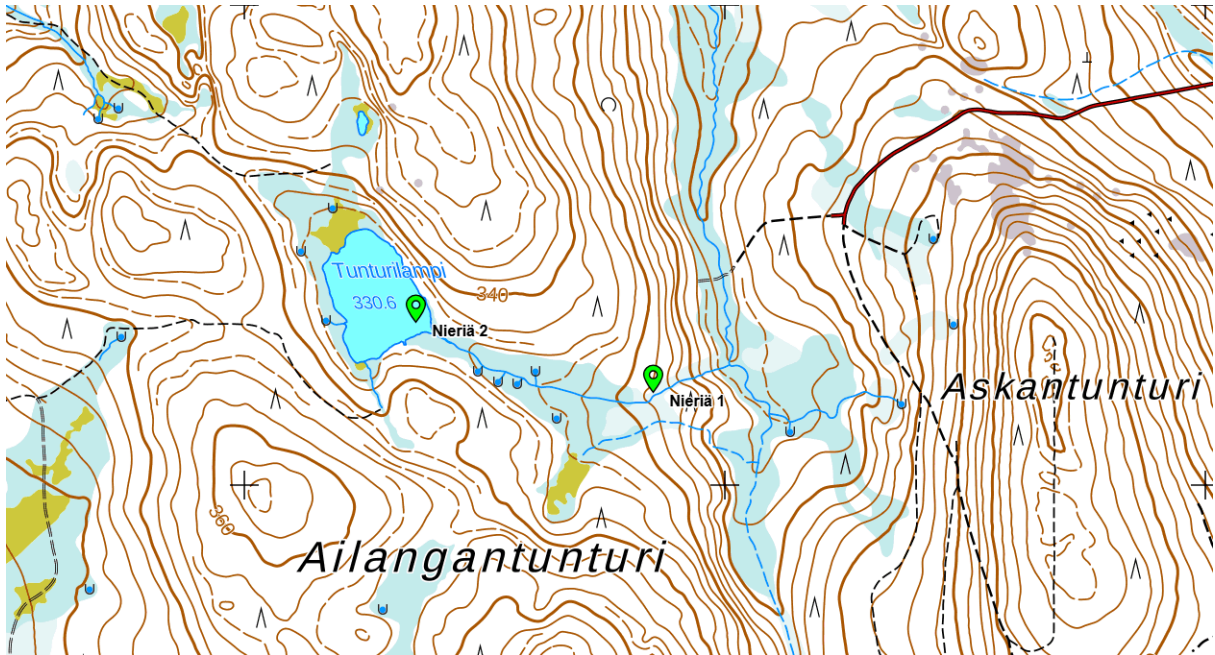
Raakku 1, 2, 3, 4, 5: **Negatiivinen**

Ailanganjoki (kenttäpositiivinen): **Positiivinen**

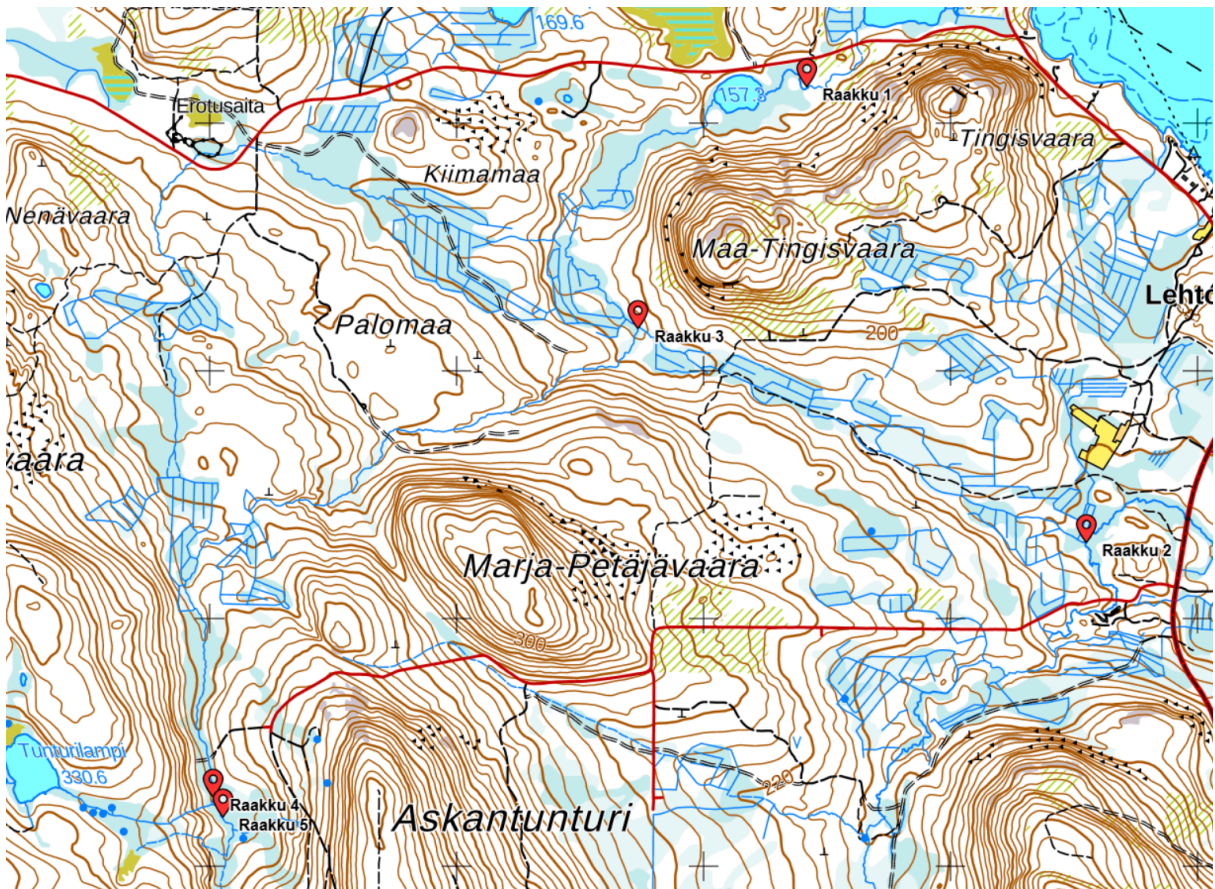
Ailanganjoen näytteenottoaikka



Tunturilammen nieriän näytteenottoapaikat



Raakun näytteenottoapaikat (1-5)



Johtopäätökset & Biologin lausunto – Pekka Heiskanen | SpringDNA

Tutkittava kohde ja tulokset olivat eDNA tutkimuksen perusteella selkeästi negatiivisia ja positiivinen kenttäkontrolli selkeästi positiivinen, joka tukee merkittävästi tulosten luotettavuutta. Näytteiden tulkinnan jälkeen parhaan tiedon perusteella voimme todeta, että näiden eDNA tulosten perusteella tutkitut vesistöt eivät ole raakun tai nieriän elinaluetta.

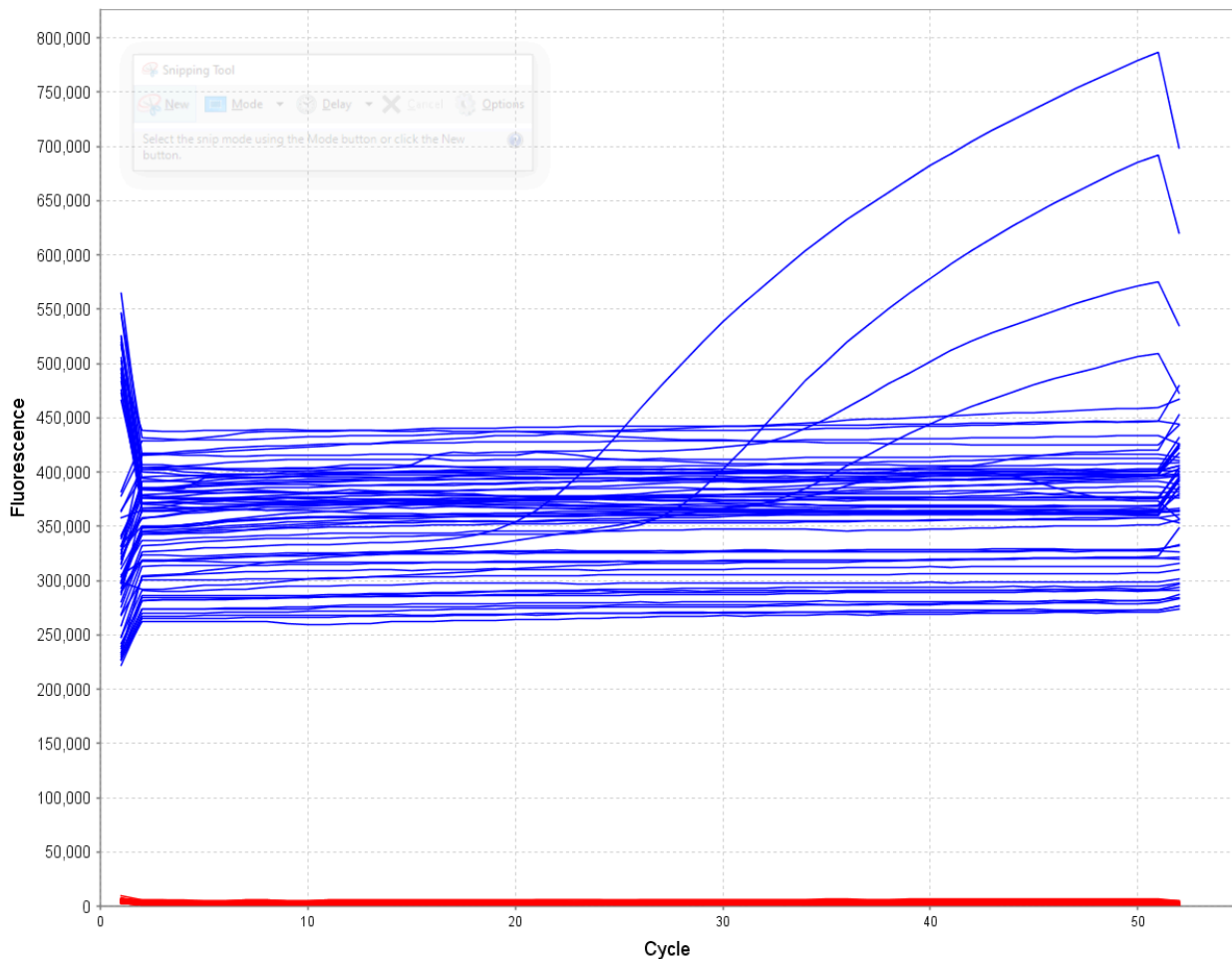
Näytteenotto toteutettiin AFRYn toimesta viikolla 33/2024, jonka jälkeen näytteet analysoitiin laboratoriossa.

Tulokset ovat kaikkien näytteenottopaikkojen, sekä biologisten toistojen suhteen negatiivisia, eli tämän eDNA selvityksen perusteella kaikki näytteenottopaikat ja niiden läheiset vesistöt eivät ole raakkujen tai nieriän elinaluetta.

Näytteet on otettu kentällä, sekä analysoitu laboratoriossa parhaan tieteellisen tiedon ja taidon mukaan. Viittaamme edellä mainittuun julkisten eDNA auktoriteettien sekä viimeisimmän parhaan tutkimustiedon nojalla. Toteamme siis, että näytteitä ja niistä saatuja tuloksia voidaan pitää luotettavina.

qPCR yhdistelmätulokset

Selite: Kuvassa olevat siniset viivat kuvastavat näytteitä. Kaikki vaakasuorassa olevat näytteet ovat yksiselitteisesti negatiivisia. Sykliin 15–25 kohdalla nousevat näytteet ovat positiivisia kontrolleja. 2 nopeiten nousevaa käyrää ovat positiivisia laboratorionkondroleja ja seuraavat 2 nousevaa käyrää edustavat Ailanganjoen 1 ja 2 näytteitä. Positiivisen kontrollin käyttö on tärkeää sen takia, että voimme todeta qPCR reaktiossa käytettävien alukkeiden, probejen ja muiden reagenssien toimivan halutulla tavalla suhteessa tutkittavaan lajiin.

**Lähteet**

(Takahashi et al., 2023) <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322>

(Bruce et al., 2021) <https://doi.org/10.3897/ab.e68634>

(Wacker et al., 2019) <https://doi.org/10.1002/edn3.10>

(Sylphium., 2023) https://drive.google.com/file/d/1OwOuqtfXwI-UGENbhHdgavb33_1UNAUh/view

Yhteystiedot

Projektivastaava:

Pekka Heiskanen

Sähköposti: pekka.heiskanen@springdna.com

Puh. +358 44 366 6560

Toimitusjohtaja:

Riku Kokkonen

Sähköposti: riku.kokkonen@springdna.com

Puh. +358 400 757 862

Web. www.springdna.com

RKO Holdings Oy / SpringDNA