



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# Linnunpoikasten ruokavalio ja suolistomikrobisto

Kaisa Merimaa

Ekologia ja evoluutiobiologia

Pro gradu -tutkielma

Laajuus: 30 op

25.5.2023

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

**Pääaine:** Ekologia ja evoluutiobiologia

**Tekijä(t):** Kaisa Merimaa

**Otsikko:** Linnunpoikasten ruokavalio ja suolistomikrobisto

**Ohjaaja(t):** Suvi Ruuskanen, Eero Vesterinen, Toni Laaksonen

**Sivumäärä:** 42 sivua + liitteet 13 sivua

**Päivämäärä:** 25.5.2023

---

Suolistomikrobiston merkitys eläimille on tunnistettu jo pitkään, mutta sen koostumukseen vaikuttavat tekijät ovat yhä osittain tuntemattomia. Tässä tutkielmassa pyrin selvittämään luonnonvaraisten linnunpoikasten suolistomikrobiston ja ruokavalion koostumuksen, sekä mitkä asiat ovat yhteydessä niiden suolistomikrobiston koostumukseen. Kolmenkymmenen lintulajin poikasilta kerättiin ulostenäytteitä, ja niistä selvitettiin DNA-menetelmillä poikasten ravinto sekä suolistomikrobisto. Tärkeimmät ravintolahkot olivat kaksisiipiset ja perhoset. Suolistomikrobisto koostui useimmilla lajeilla Actinobacteria-, Firmicutes-, ja Proteobacteria-pääjaksojen bakteereista. Lintulajien välillä oli eroa yhteydessä sekä ruokavalion että suolistomikrobistojen koostumuksessa. Lintujen aikuisiän ruokavalio oli yhteydessä niiden suolistomikrobiston koostumukseen siten, että kasvin- ja siemensyöjillä yleisin pääjakso oli Firmicutes, selkärangattomia syövillä Proteobacteria ja sekasyöjillä Actinobacteria. Kasvin- ja siemensyöjien sekä selkärangattomia syövien erot suolistomikrobistoissa selittyvät todennäköisimmin kasvi- ja eläinravinnon määrän eroilla. Linnunpoikasten iän ei havaittu tässä aineistossa olevan yhteydessä niiden ruokavalioon tai suolistomikrobistoon.

---

**Avainsanat:** DNA-viivakoodi, suolistomikrobisto, ruokavalio, ravintoverkko

## Sisällysluettelo

1. Johdanto .....	1
1.1 Ruokavalion ja suolistomikrobiston tutkimus .....	1
1.2 Lintujen ravintoekologia .....	1
1.3 Poikasten ruokavalio .....	2
1.3.1 Selkärangattomat .....	2
1.3.2 Kasvit .....	3
1.4 Suolistomikrobit .....	4
1.4.1 Suolistomikrobit linnuilla .....	4
1.4.2 Poikasten suolistomikrobiston muodostuminen .....	6
1.4.2 Suolistomikrobit ja ruokavalio .....	6
1.5 Molekyyliomenetelmät ravinto- ja mikrobiomianalyseissä .....	7
1.5.1 Molekyyliomenetelmät ravintoanalyseissä .....	7
1.5.2 Molekyyliomenetelmät suolistomikrobistotutkimuksissa .....	8
1.6 Tutkimuksen tavoitteet .....	9
2. Aineisto ja menetelmät .....	10
2.1 Ruokavalion ja suolistomikrobiston tutkimus .....	10
2.2 Lintujen ravintoekologia .....	11
2.3 Kohdegeenien monistaminen .....	12
2.4 DNA-kirjastojen teko .....	14
2.5 DNA-kirjastojen puhdistus ja laaduntarkistus .....	15
2.6 Sekvensointi .....	16
2.7 Bioinformatiikka .....	16
2.8 Tilastolliset analyysit .....	16
3. Tulokset .....	17
3.1 Sekvenssidata ja aineiston peruskuvaajat .....	17
3.2 Ravinnon koostumus .....	19
3.3 Suolistomikrobiston koostumus .....	24
3.4 Ravinnon ja suolistomikrobiston alfadiversiteetti .....	26
4. Tulosten tulkinta .....	27
4.1 Ravinnon koostumus .....	27
4.2 Suolistomikrobiston koostumus .....	28
4.3 Ravinnon ja suolistomikrobiston alfadiversiteetti .....	31
4.4 Virhelähteet .....	32
4.5 Yhteenveto .....	32
5. Eettisyys .....	34
6. Kiitokset .....	34
7. Kirjallisuus .....	34
Liitteet	

## 1. Johdanto

### 1.1. Ruokavalion ja suolistomikrobiston tutkimus

Ornitologit ovat tutkineet lintujen ruokavalioita jo vuosikymmenien ajan havannoimalla lintujen ruokailua ja poikasten ruokkimista. Niiden ruokavalio onkin ajateltu olevan hyvin tiedossa, mutta silti uudet tutkimukset ja tutkimusmenetelmät, etenkin uuden sukupolven sekvensointimenetelmät eli massasekvensointi (engl. *next-generation sequencing*, NGS) tuovat uutta ja erityisesti tarkempaa tietoa (esim. Orłowski ym., 2017; Rytönen ym., 2019). Lintujen suolistomikrobiston koostumusta ja sitä selittäviä tekijöitä taas on tutkittu 2000-luvulla enenevässä määrin, kun suolistomikrobiston merkitystä eläimille on alettu ymmärtää (Grond ym., 2018). Suolistomikrobien koostumusta selittävät tekijät ovat viime aikoina olleet selvityksen aiheina, ja tulevina vuosina esimerkiksi mikrobilajien toiminta ja merkitys lintujen ruoansulatuksessa ja immuunipuolustuksessa ovat todennäköisesti polttavimpia tutkimusaiheita (Bodawatta ym., 2022; Grond ym., 2018). Tässä opinnäytetyössä selvitän, miten luonnonvaraisten linnunpoikasten ruokavalion ja suolistomikrobiston koostumukset ja diversiteetit ovat yhteydessä toisiinsa, ja mitkä muut tekijät mahdollisesti vaikuttavat niihin.

### 1.2. Lintujen ravintoekologia

Ravintoekologia tutkii eläinten ruokailukäyttäytymistä, ympäristön vaikutusta siihen sekä sen evoluutiota. Eläimet ovat sopeutuneet käyttämään monenlaisia ravinnonlähteitä esimerkiksi koevoluution eli yhteisevoluution ja kilpailun seurauksena. Lajit ovat kehittyneet täyttämään erilaisia ekologisia lokeroita, mikä sallii niiden selviytymisen potentiaalisten kilpailijoiden ympäröimänä. Koevoluution avulla esimerkiksi jotkin kolibrit ja orkideat ovat kehittyneet niin, että kolibrit ovat riippuvaisia orkideoista ravinnonlähteenä, ja orkideat kolibreista pölyttäjinä (Stiles, 1978). Tällöin kolibrien ei myöskään tarvitse kilpailla muiden lintujen tai pölyttäjien kanssa ravinnosta. Kilpailun ja ravintopulan välttämiseksi eläimet voivat olla kehittyneet spesialistien lisäksi myös generalisteiksi, jolloin ne eivät ole riippuvaisia yhdestä ravinnonlähteestä, vaan pystyvät käyttämään hyödyksi useita ympäristöstään löytyviä lähteitä.

Varpuslinnut ovat ruokavalioltaan ja ravinnonhankintatavoiltaan monimuotoinen heimo. Ne voidaan jakaa useisiin eri ryhmiin sekä niiden ruokavalion (esim. Lopes ym., 2016) että ruokavalion ja ravinnonhankintatavan eli ravintokillan mukaan (Root, 1967). Ruokavalion mukaan nimettyjä ryhmiä ovat esimerkiksi hyönteissyöjät (eng. *insectivore*)

ja siemensyöjät (engl. *granivore*) (Lopes ym., 2016). Ravintokiltoja ovat vastaavasti esimerkiksi hyönteissyöjä: kuoren kaivaja (engl. *insectivore: bark excavator*) tai siemensyöjä: maasta poimija (eng. *granivore: ground gleaner*) (De Graaf ym., 1985). Wilman ym. (2014) esittelivät standardoidun EltonTraits 1.0 -järjestelmän, jossa jokaiselle tunnetulle lintulajille on haettu kirjallisuudesta tieto sen käyttämistä ravinnonlähteistä ja niiden prosentuaalisesta määrästä, sekä lintujen ravinnonhankintakerrokset (pohjakerros, aluskasvillisuus ym.). Ravinnonlähteiden suhteellisen käytön perusteella ne on myös lajiteltu ryhmiin, vastaavalla tavalla kuin edellä mainitut Lopes ym. (2016). Tässä tutkielmassa linnut luokitellaan EltonTraits 1.0 -järjestelmän avulla.

### **1.3. Poikasten ruokavalio**

#### **1.3.1. Selkärangattomat**

Vaikka aikuiset linnut eroavat suuresti toisistaan ruokavalioltaan ja ravinnonhankintatavoiltaan, monet lajit ruokkivat poikasiaan aluksi hyönteisravinnolla sen korkean proteiini- ja rasvapitoisuuden vuoksi (White, 2011). Proteiinia tarvitaan kasvun aikana runsaasti kudosten rakentamiseen, sillä eläimet eivät pysty tuottamaan kaikkia tarvitsemiaan aminohappoja itse. Esimerkiksi luiden rakentamiseen tarvitaan proteiinia, tai luista tulee heikot ja murtumisherkät (Bonjour ym., 2001). Rasvaa poikaset tarvitsevat täyttämään suuren energiantarpeensa. Hyönteisten kuivapainosta on proteiinia noin 20–80 % ja rasvaa 2–60 % (Capinera, 2010). Esimerkiksi Orlowskin ym. (2017) mukaan keltasirkkujen poikasia ruokitaan niiden ensimmäisenä päivänä vähäkitiinisellä hyönteisravinnolla, kuten hämähäkeillä ja kärpäsillä. Toisena päivänä, kun poikasten ruoansulatus on jo hieman kehittynyt, ne saavat kitiinipitoisempaa hyönteisravintoa, kuten kovakuoriaisia. Kolmannesta päivästä eteenpäin ne alkavat saada siemenravintoa, jonka osuus kasvaa poikasten vanhetessa.

Hollandin ym. (2006) katsausartikkelin mukaan viljelyalueiden linnunpoikaset syövät yleensä monipuolisemmin eri hyönteistaksoneita kuin saman lajin aikuiset. Tärkeimmät hyönteislahkot poikasten ravinnossa olivat järjestyksessä aikuiset kaksisiipiset (Diptera), kovakuoriaiset (Coleoptera), hämähäkieläimet (Arachnida), perhosentoukat (Lepidoptera), nivelkärsäiset (Hemiptera), aikuiset perhoset, kaksisiipisten toukat, pistiäiset (Hymenoptera) ja suorasiipiset (Orthoptera). On huomattava, että ravintolajien määrittäminen vaihteli lähdeartikkeleissa, joten tulokset eivät ole täysin vertailukelpoisia keskenään. Useimmissa katsausartikkeliin otetuissa tutkimuksissa ravintolajit tunnistettiin mahan sisällöstä morfologian perusteella, mutta mukana oli myös suoraa

havaintoja, kaulapantoja ja ulostenäytteitä. Molekyyliomenetelmiä ei tällöin vielä käytetty eläinten ruokavalion selvittämiseen.

Moreby & Stoate (2001) vertailivat rautiaisen, pensaskertun ja keltasirkun ruokavalioita pesäpoikasaikana 1990-luvulla. Näille tärkeimpiä hyönteislahkoja olivat perhoset, hämähäkit (Araneae), nilviäiset (Gastropoda), nivelkärsäiset, kaksisiipiset, pistiäiset ja kovakuoriaiset. 2010-luvulla molekyyliomenetelmät olivat kehittyneet, kun Rytönen ym., (2019) selvittivät neljän tiaislajin ravintohyönteisiä noin 2–3 viikon iässä. Jopa 75–80 % hyönteisravinnosta oli perhosia, kuten oli odotettavissa aiempien tutkimusten perusteella, mutta tutkimuksen otoskoko oli liian pieni luotettavan ravintoverkon koostamiseksi. Jonkin verran löytyi myös hämähäkkejä, kovakuoriaisia, kaksisiipisiä, pistiäisiä ja jäytiäisiä (Psocodea).

Myös ympäristö ja saatavilla oleva ravinto vaikuttaa poikasten ruokavalioon. Esimerkiksi ympäristösaasteet vaikuttavat hyönteislajistoon, ja talitiaisit syövätkin saastuneemilla alueilla enemmän kovakuoriaisia ja muita lentäviä hyönteisiä, ja vähemmän perhosentoukkia ja yökkösiä kuin tausta-alueilla (Eeva ym., 2005). Tällä voi olla vaikutusta lintujen lisääntymismenestykseen. Esimerkiksi talitiaisilla on alhaisempi poikastuotto, jos ne saavat vähemmän perhosentoukkia, mutta kirjosiepot pärjäävät yhtä hyvin vaihtelevalla ruokavaliolla (Eeva ym., 2005).

### **1.3.2. Kasvit**

Perinteisesti on ajateltu, että hyönteiset ovat varpuslintujen poikasten pääravintoa, ja että siemensyöjätkin ruokkivat poikasiaan siemenillä vain, jos hyönteisravinnon saatavuus on huono (Douglas ym., 2012; Morris ym., 2001). Tällöin viime vuosikymmeninä havaittu kasvu siemenravinnon osuudessa saattaisi johtua maatalouden tehostumisesta (Morris ym., 2001). Tämä näkemys on myös kyseenalaistettu, sillä siemensyöjien on havaittu ruokkivan etenkin vanhempia (3–14 vuorokauden ikäisiä) poikasiaan myös siemenillä riippumatta hyönteisten saatavuudesta, ja poikasten on todettu kasvavan ja kehittyvän normaalisti (Holland ym., 2006; Orłowski ym., 2017).

Moreby & Stoate (2001) tutkivat rautiaisen, pensaskertun ja keltasirkun poikasajan ruokavaliota Englannissa. Rautiainen ja pensaskerttu ovat hyönteissyöjiä, ja niiden ravinnosta kasvimateriaalia oli alle yksi prosentti. Keltasirkulla, joka on siemensyöjä, taas kasvimateriaalia oli noin puolet ruokavaliosta. Kasvien lajeja ei kuitenkaan määritetty niiden sulaneisuuden vuoksi. Holland ym., (2006) selvittivät katsausartikkelissaan 22:n

viljelysmaiden lintulajin ruokavalion, joista 17:lle siemenravinto oli tärkeää. Heidän aineistonsa mukaan monen lajin poikaset syövät osittain kasviravintoa pesäaikana. Viherpeipon ja hempon ruokavaliosta ne muodostavat jopa yli 90 %, ja jotkin lajit, kuten tikli, siirtyivät siemenravintoon 7–14 päivän ikäisenä. Järjestyksessä tärkeimmät kasviheimot viljelysmaiden linnunpoikasille olivat heinäkasvit (Poaceae), tatarkasvit (Polygonaceae), kohokkikasvit (Caryophyllaceae), ristikukkaiskasvit (Brassicaceae) ja asterikasvit (Asteraceae) (Holland ym., 2006).

Kypsymättömissä siemenissä on linnuille välttämättömiä aminohappoja, lysiniä ja treoniiniä, joka vähenee siemenistä kypsymisen jälkeen. Myös histidiiniä ja fenyylialaniiniä on enemmän kypsymättömissä siemenissä. (Allen & Hume, 1997) Tämän vuoksi siemeniä syöttävät kasvinsyöjälinnut käyttävät niitä poikasten ruokinnassa. Myös aikuisten proteiinintarve kasvaa lisääntymisaikana. Vaikka ne selviävät muuna aikana kypsillä siemenillä, lisääntymisaikana nekin syövät kypsymättömiä siemeniä (White, 2011).

#### **1.4. Suolistomikrobit**

Suolistomikrobiston tärkeyttä eläinten elämälle ja hyvinvoinnille on alettu ymmärtää viime vuosikymmeninä, ja etenkin massasekvensointimenetelmien kehittämisen jälkeen vuodesta 2005 eteenpäin tutkimusten määrä on kasvanut eksponentiaalisesti. Niiden tiedetään näyttelevän tärkeää roolia muun muassa ruoansulatuksessa, immuunipuolustuksessa ja hormonitoiminnassa (Grond ym., 2018). Tutkimus on kuitenkin keskittynyt nisäkkäisiin ja ihmisiin, ja lintututkimuksia on tehty vain murto-osa näiden määrästä. Linnuissakin on keskitytty lähinnä tuotantoeläimiin niiden ekonomisen tärkeyden ja helpon tutkittavuuden takia. Tutkimusten perusteella lintujen ja nisäkkäiden suolistomikrobien funktiot muistuttavat toisiaan, mutta jo lintujen erilaisen suoliston rakenteen takia yleistykseen pitää suhtautua varauksella ja lintujen mikrobiston tutkimusta olisi lisättävä luotettavan tiedon saamiseksi.

##### **1.4.1. Suolistomikrobit linnuilla**

Lintujen ruoansulatuskanava koostuu suusta, ruokatorvesta, kuvusta, rauhasmahasta, lihasmahasta, ohutsuoletta, umpisuolista, paksusuolesta ja kloakista. Ruoansulatuskanavan eri osilla on eri tehtävät, ja siksi myös erilaiset mikrobikannat. Kanavan ulommat osat ovat osittain hapellisia, ja sisemmät osat taas hapettomia. Niinpä niissä elää joko aerobisia tai anaerobisia bakteereja riippuen ympäristöstä. Jotkin bakteerit voivat pärjätä sekä hapellisissa ja hapettomissa osissa. (Grond ym., 2018)

Kupu on ruokatorven laajentuma, jossa ruokaa voidaan säilöä väliaikaisesti. Sieltä ruoka jatkaa matkaansa rauhasmahaan, jossa siihen sekoittuu entsyymejä ja mahahappoa ennen sen kulkeutumista lihasmahaan, jossa ruoka hajotetaan mekaanisesti. Ohutsuolessa ruokaa sulatetaan entsyymeillä ja sapella. Useimmilla linnuilla on kaksi umpisuolta, jossa tapahtuu esimerkiksi fermentoitumista sekä veden ja suolojen takaisinimeytymistä. Umpisuolia ei ole lajeilla, joilla on proteiini- tai sokeririkas ruokavalio, kuten lihan- ja kalansyöjät, medensyöjät ja hedelmänsyöjät. Umpisuolten jälkeen on paksusuoli, joka on lyhyt ja johtaa kloaakkiin. Paksusuolessa tapahtuu suolojen ja veden takaisinimeytymistä. Kloaakki on yhteissuoli, josta sulamaton ravinto ja virtsa poistuu. Myös sukupuolielinten tiehyet avautuvat kloaakkiin, eli sitä käytetään myös parittelemiseen ja munimiseen. (Grond ym., 2018)

Neotrooppisten lintujen uloste- ja kloaakinäytteiden perusteella muodostettu niin sanottu 'ydinmikrobiomi' koostuu Firmicutes-, Bacteroidetes-, Actinobacteria- ja Proteobacteria-pääjaksojen bakteereista (Hird ym., 2015). Samat pääjaksot muodostavat myös nisäkkäiden ydinmikrobiomin, mutta ihmisillä se koostuu suurimmaksi osaksi Firmicutes- ja Bacteroidetes-bakteereista. Myös muilla nisäkkäillä pääjaksojen lukusuhteet ovat erilaiset kuin linnuilla, eli lintujen ja nisäkkäiden suolistomikrobistot eroavat toisistaan. Kesykanoilla suolistomikrobisto on melko samanlainen kuin villeillä linnuilla. (Grond ym., 2018)

Neotrooppisilla varpuslinnuilla Proteobacteria- ja Firmicutes-bakteerit olivat yleisimpiä paksusuolen bakteereja, muodostaen yhteensä yli 80 % havaituista bakteereista. Bacteroidetes- ja Actinobacteria-bakteereja oli yhteensä alle 10 %. Tikkalinnuilla taas Proteobacteria- ja Firmicutes-bakteereita oli vähemmän, yhteensä noin 60 %, Bacteroidetes-bakteereja noin 10 % ja Actinobacteria-bakteereja vain häviävän pieni osa. Muita pääjaksoja tai tuntemattomia pääjaksoja taas oli yli 20 %. (Hird ym., 2015)

Grond ym., (2018) listaavat katsausartikkelissaan useita sisäisiä ja ulkoisia tekijöitä, jotka vaikuttavat suolistomikrobiston lajistoon. Sisäisiä tekijöitä ovat linnun ruokavalio, terveys, fysiologia, lisääntyminen, ikä ja sukupuoli sekä fylogenia eli evolutiivinen kehityshistoria. Ulkoisia tekijöitä ovat ympäristö, paikalliset ravinnonlähteet ja käyttäytyminen. Tutkijat eivät vaikuta vielä päässeeseen yhteisymmärrykseen siitä, onko jokin tekijä tärkeämpi kuin muut, ja mikä se olisi. Nykytietämyksen mukaan kuitenkin lintujen ruokavalio, ympäristö ja lentämisen mahdollistavat suolistoadaptaatiot selittävät sitä vahvemmin kuin fylogenia (Bodawatta ym., 2022).



### 1.4.2. Poikasten suolistomikrobiston muodostuminen

Linnunpoikasilla on kuoriutuessaan vain pieniä määriä suolistomikrobeja. Tästä syystä oletetaan, että lajista ja ympäristöstä riippuen poikasten mikrobisto kehittyy suurimmaksi osaksi vasta kuoriutumisen jälkeen. Pesäviipyisten lajien, kuten varpus- ja tikkalintujen, poikaset ovat riippuvaisia emojensa ruokinnasta, ja emojen saaliinvalinta ja sylki voivat auttaa poikasten suoliston kolonisoimisessa (Grond ym., 2018). Myös pesämateriaalista voi siirtyä bakteereja poikasten kloaakkiin (Grond ym., 2018; van Veelen ym., 2017). Käkien poikasia ja näiden pesäsisaruksia tutkimalla on kuitenkin huomattu, että pelkästään ympäristö, vanhempien sylki ja saatu ravinto eivät määrää poikasten mikrobiston kehitystä, vaan myös suoliston morfologia ja fysiologia vaikuttavat siihen (Lee ym., 2020).

Pikkukajavien poikasten kloaakkinäytteissä bakteeri-OTU:jen (toiminnallinen taksonominen yksikkö, engl. *operational taxonomic unit*) määrä kasvoi poikasten vanhetessa. Poikasten OTU:jen määrä oli myös suurempi kuin aikuisilla, mutta aikuisilla bakteerien kokonaismäärä oli suurempi. Yllättäen aikuiset ja poikaset jakoivat vain seitsemän OTU:a 71:stä, vaikka aikuiset oksentavat ruokaa poikasten suuhun ja viettävät aikaa pesässä. Poikasten suolistomikrobisto luultavasti kehittyy myöhemmin enemmän aikuisten mikrobistojen kaltaisiksi. (van Dongen ym., 2013)

### 1.4.3. Suolistomikrobit ja ruokavalio

Suolistomikrobien ymmärretään yleisesti osallistuvan eläinten ruoansulatukseen ja immuunipuolustukseen, ja niiden tiedetään olevan tärkeitä varsinkin vaikeasti sulavan kasviraivon hajottamisessa nisäkkäillä (Flint ym., 2012). Yksittäisten bakteeriryhmien tehtävien tutkiminen on kuitenkin ollut vähäistä linnuilla, eikä monen ryhmän merkitystä tiedetä tarkkaan. Koska bakteerit nimetään usein vain pääjaksotasolla, ryhmien sisään mahtuu myös hyvin paljon vaihtelua. Toisaalta eri bakteeripääjaksojen tehtävät ovat osin päällekkäiset, eikä bakteeridiversiteetti välttämättä kerro toiminnallisesta diversiteetistä (Li ym., 2021). Esimerkiksi Bacteroidetes-bakteerit osallistuvat polysakkaridien hajottamiseen ja fermentoimiseen nisäkkäillä ja mahdollisesti myös linnuilla (Bennett ym., 2013; Grond ym., 2018; Matsui ym., 2010). Ne ovatkin yleisimpiä bakteereita emujen, kalkkunoiden ja kanojen umpisuolessa. Sen sijaan strutsien ja metsojen umpisuolessa yleisin bakteeriryhmä on Firmicutes, jotka myös osallistuvat polysakkaridien fermentoimiseen. (Bennett ym., 2013; Matsui ym., 2010)

Vaikka bakteerien tehtävästä ruoansulatuksessa ei vielä tiedetä paljon, on huomattu, että lintujen suolistomikrobisto muuttuu ruokavalion muuttuessa tai linnun paastotessa (Kohl ym., 2014; Lewis ym., 2016; Li ym., 2021). Varpuslinnuista moni laji, Suomessa esimerkiksi talitiainen, syö kesällä pääosin hyönteisravintoa ja talvisin siemeniä. Tällöin on todennäköistä, että niiden suolistomikrobien runsaussuhteet muuttuvat vuodenaikojen välillä. Davidson ym:n (2020) tutkimuksessa talvella pyydystettyjen talitiaisten suolistomikrobiston koostumus muuttuikin merkitsevästi, kun niitä alettiin ruokkia hyönteisravinnolla. Näillä linnuilla Proteobacteria- ja Bacteroidetes-pääjaksojen bakteerit lisääntyivät. Sukutasolla myös siemenravinnolla ruokittujen lintujen suolistomikrobisto muuttui. Kiinassa havaittiin, että kahdella kurkilinnulla, isotrapilla (*Otis tarda*) ja kurjella (*Grus grus*) on talvehtimisalueille saapuessaan eriävät suolistomikrobistot, mutta yhtenevä ruokavalio muokkasi niiden suolistomikrobistoa hieman samankaltaisemmaksi (Li ym., 2021). Myös varpuslintujen suolistomikrobistot muuttuvat samankaltaisemmiksi niiden pysähtyessä muuttomatallaan samalle levähtämisalueelle (Lewis ym., 2016).

Lintujen ravinnonhakutapa määrää suurilta osin mille ympäristön bakteereille ne altistuvat, ja siten oletettavasti vaikuttavat myös lintujen suolistomikrobistojen kehittymiseen. Esimerkiksi maasta harvasukasmatoja (Oligochaeta) kaivavat rastaat altistuvat ravintoa etsiessään eri bakteereille kuin puissa ja pensaissa saalistavat kertut. Maassa vietetyn ajan on esitetty vaikuttavan ainakin höyhenpuvun mikrobiyhteisön monimuotoisuuteen (Grond ym., 2018).

## **1.5. Molekyyliomenetelmät ravinto- ja mikrobiomianalyseissä**

### **1.5.1. Molekyyliomenetelmät ravintoanalyseissä**

Linnunpoikasten ruokavaliotutkimuksia on tehty aiemmin esimerkiksi seuraamalla emojen pesälle tuomaa ravintoa kameroilla tai kiikareilla, pukemalla poikasille nielemisen estäviä kaulapantoja, jolloin niiden saama ravinto voidaan tarkistaa manuaalisesti, lopettamalla poikaset ja tutkimalla niiden suolen sisältöä, sekä ottamalla niiltä ulostenäytteitä ja määrittämällä niistä ravintolajit sulamattomien osien perusteella. Kaulapantojen käyttö ja suoliston avaaminen ovat erittäin invasiivisia tutkimustapoja, mutta pesän kuvaaminen ja ulostenäytteiden otto ovat melko lintuystävällisiä, vaikkakin aikaa vieviä menetelmiä. Ulostenäytteiden manuaalisessa seulomisessa on kuitenkin riskinä, että osa ravintolajeista jää tunnistamatta niiden tehokkaan sulattamisen vuoksi (esim. Moreby & Storate, 2001).

Vuonna 2005 kehitettiin uusi sekvensointitapa, ns. massasekvensointi ("uuden sukupolven sekvensointi", engl. *next-generation sequencing*, NGS), mikä mahdollisti ravintoanalyysien tekemisen ulostenäytteissä olevan DNA:n perusteella. Ensimmäinen NGS-ruokavalioanalyysi julkaistiin vuonna 2009. Siinä testattiin menetelmän toimivuutta pitkähäntämurmelilla, karhulla, metsolla, teerellä, heinäsiirkoilla ja kotiloilla hyvin tuloksin (Valentini ym., 2009). Tämän pioneeritutkimuksen jälkeen NGS-ravintoanalyysien määrä on kasvanut nopeasti.

NGS-pohjaisten ravintoanalyysien hyötyihin kuuluu se, että se ei ole riippuvainen kokonaisten ravintolajien osien säilymisestä suolistossa, vaan sen toimimiseen tarvitaan vain lyhyitä DNA-juosteita. Näitä DNA-juosteita voidaan sitten verrata verrokkikirjastoon, jonka perusteella voidaan tunnistaa ravintolajit tai ylempät taksonit. Tällöin määrittäjältä ei myöskään tarvita laajaa tuntemusta eri ravintoryhmistä, ja lajien määrittäminen voi olla nopeampaa. Säästyneiden työtuntien ja pienemmän tarvittavan asiantuntijajoukon ansiosta molekyyliperusteinen määrittäminen on usein myös halvempaa, kuin morfologinen tunnistus.

DNA:han perustuvassa tunnistuksessa on myös haasteensa. Käytettävien alukkeiden valinta on erityisen tärkeää, jotta vältetään aineiston vääristymiltä. Alukkeet määräävät, minkä lajiryhmän DNA:ta monistetaan. Niiden tulisi olla sekä spesifit halutulle lajiryhmälle, että mahdollisimman kattavat ryhmän sisällä. Joskus parhaimman tuloksen saamiseksi olisi hyvä käyttää useampaa kuin yhtä aluketta saman eliöryhmänkin tutkimuksessa (Forsman ym., 2022). Tutkimuksen tarkoituksen mukaan alukkeiden olisi hyvä kattaa koko lajikirjo. Esimerkiksi keltasirkun poikasten ruokavaliota tutkiessa olisi hyvä käyttää sekä hyönteis- että kasvialukkeita, koska poikasten ravintoon kuuluu niitä molempia (Orłowski ym., 2017). Koska ulostenäytteissä oleva DNA on yleensä hyvin hajonnutta, massaviivakoodin on oltava myös lyhyt (ihanteellisesti alle 100–150 emäsparia), mutta ei niin lyhyt, että lajintunnistuksen tarkkuus kärsii (Taberlet ym., 2018).

### **1.5.2. Molekyyliomenetelmät suolistomikrobistotutkimuksissa**

Mikrobitutkimuksissa DNA-menetelmiä on käytetty kauemmin kuin ravintoverkkotutkimuksissa, ja se on vakiinnuttanut paikkansa tärkeänä työkaluna (Taberlet ym., 2018). Koska mikrobikannat vaihtelevat suoliston eri osissa, ulostenäytteiden käyttö ei kuitenkaan ole täysin ongelmaton, eikä anna kattavaa kokonaiskuvaa koko suoliston mikrobistosta. Varpuslinnuilla se kertoo todennäköisesti eniten paksusuolen mikrobistosta (Berlow ym., 2020). Toinen yleisesti käytetty, ei-tappava näytteenottotapa on kloaakin pyyhkäisyäytteet. Kloaakki on kuitenkin

aerobinen, joten sen mikrobikoostumus voi poiketa sisemmästä suolistosta (Berlow ym., 2020; Grond ym., 2018). Se on myös altis ympäristön bakteereille, jotka voivat tunkeutua sisään kloaakin aukon kautta (Grond ym., 2018). Berlowin ym. (2020) mukaan sen mikrobisto kuitenkin muistuttaa paksusuolen mikrobistoa, kuten ulostenäytteetkin. Ylempää suolistosta otetut näytteet vaativat linnun lopettamisen, joka on harvoin tarkoituksenmukaista, sillä useimmat linnut ovat rauhoitettuja ja suolistomikrobitutkimukseen tarvitaan usein toistonäytteitä (Berlow ym., 2020; Grond ym., 2018).

## **1.6. Tutkimuksen tavoitteet**

Tässä tutkimuksessa selvitetään eri varpuslintu- ja tikkalintulajien poikasten ravinnokseen käyttämiä selkärangattomia sekä poikasten suolistomikrobiston koostumusta. Käytän poikasten ulosteesta eristettyä DNA:ta ravintolajien ja suolistomikrobien määrittämiseen ja selvitän, (1) vaikuttaako linnunpoikasten ikä, laji tai aikuisiän ruokavalio niiden suolistomikrobistoon tai poikasajan ruokavalioon. (2) Poikasten ravinnon ja suolistomikrobiston perusteella lasketaan myös niiden alfadiversiteetti-indeksit, ja etsitään niille selittäviä tekijöitä edellä mainituista muuttujista. (3) Lisäksi selvitän, selittääkö ravinnon diversiteetti mikrobiomin diversiteettiä.

Oletuksena on, että linnunpoikasten ikä ja laji vaikuttavat niiden ruokavalioon, koska vaihtelua on havaittu aiemmassakin kirjallisuudessa. Aikuisiän ruokavalio ei välttämättä vaikuta poikasajan ruokavalioon selkärangattomien osalta, jos lajien erilaiset ravinnonhankintatavat vaikuttavat siihen enemmän. Poikasten iän oletetaan vaikuttavan myös niiden suolistomikrobiston koostumukseen, koska aiempien tutkimusten mukaan suolistomikrobisto kehittyy poikasten kasvaessa. Lajien välillä ei välttämättä havaita merkittäviä eroja, jos poikasten ruokavaliot ja elinympäristöt ovat samankaltaisia, ja lähes kaikki tutkimuslinnut ovat varpuslintuja, eli kohtalaisen läheistä sukua keskenään. Suolistomikrobistoissa voidaan kuitenkin havaita eroja aikuisiän ruokavalion perusteella, sillä esimerkiksi siemensyöjät tarvitsevat aikuisena enemmän tärkkelystä hajottavia bakteereja kuin hyönteissyöjät, ja nämä erot voivat olla näkyvissä jo poikasilla. Poikasten iän oletetaan vaikuttavan myös ruokavalion ja suolistomikrobiston alfadiversiteetteihin, koska poikasten kasvaessa niiden suolistomikrobilajisto voi runsastua ja ruoansulatuskyky kehittyä, jolloin emot voivat tuoda niille monimuotoisempaa ravintoa. Alfadiversiteeteissä ei välttämättä ole eroa lajin tai aikuisiän ruokavalion perusteella. Ravinnon ja suolistomikrobiston alfadiversiteetit mahdollisesti korreloivat myös keskenään siten, että monipuolisempaa suolistomikrobistoa esiintyy niillä poikasilla, joilla on monipuolinen ruokavalio.

Vaikka tutkimus villien lintujen suolistomikrobistoista on nostanut suosiotaan viime vuosina, linnunpoikasten ruokavalion ja suolistomikrobien suhdetta on tutkittu vähän, keskittyen yleensä yhteen tai muutamaani lajiin kerrallaan. Tässä opinnäytetyössä on kerätty ulostenäytteitä 30:n eri lajin poikasilta, joten se on toistaiseksi ainutlaatuinen kohdelajistoltaan. Myös poikasten ruokavalion selvittäminen molekyylianalysointimenetelmillä on ollut hidasta näytteidenkeruun työläyden vuoksi, eikä sitä ole kaikille lajeille tehty vielä ollenkaan. Tähän opinnäytetyöhön kerätty aineisto siis täydentää aiempia, suoriin havaintoihin ja ravinnon sulamattomien osien määrittämiin perustuvia tutkimuksia.

## **2. Aineisto ja menetelmät**

### **2.1. Näytteiden keräys**

Tutkimuksen aineisto kerättiin varpus- ja tikkalintujen pesäpoikasilta. Tutkimukseen sisällytettiin sekä avopesijöiden että kolopesijöiden pesiä. Kaikki näytteet kerättiin Lounais-Suomen alueelta. Valtaosa näytteistä kerättiin Turusta Ruissalon saarelta, jossa lintujen pesimätiheys ja lajirunsaus on suuri monipuolisten elinympäristöjen vuoksi, ja linnunpönttöjä on runsaasti tiaisille, kirjosiepoille sekä kottaraisille. Ruissalossa on paljon erityyppisiä lehtoja ja se onkin Suomen lehtojensuojeluohjelman tärkein yksittäinen kohde (Varsinais-Suomen ELY-keskus, 2020). Ruissalon länsiosassa on myös havumetsää, jossa tammi kasvaa sekapuuna. Näytteitä kerättiin myös asuinalueiden ympäristöstä esimerkiksi Turun Hirvensalosta ja Halisista, Harjavallan ja Nakkilan kuivista mäntymetsistä, Mynämäen ja Paraisten sekametsistä sekä Laitilasta maatalousympäristöstä.

Pesiä etsittiin maastoa ja emojen liikkeitä tarkkailemalla pääasiassa kahden ihmisen toimesta Ruissalossa, mutta maastossa kävi satunnaisesti myös muita pesienetsijöitä. Näytteitä kerättiin opportunistisesti myös Ruissalon ulkopuolelta löytyneiltä pesiltä. Osa näytteistä kerättiin tutkimuksen ulkopuolisten rengastajien ylläpitämistä pöntöistä rengastuksen yhteydessä. Pesähavaintoja saatiin myös ihmisiltä, jotka löysivät linnunpesiä esimerkiksi kotipihaltaan tai töiden ohessa. Yhteensä näytteitä analysoitiin 140 kappaletta 30 eri lajilta (Liite 1).

Löydetyt pesät merkittiin Maastokartat-karttasovellukseen, ja niistä kirjattiin ylös laji, päivämäärä ja pesinnän vaihe. Löydetyille pesille tehtiin tarkastuskäyntejä, joiden tiheys vaihteli yhdestä päivästä neljään viikkoon tarpeen mukaan pesinnän etenemisen seuraamiseksi ja kuoriutumispäivän sekä sopivan näytteenottopäivän selvittämiseksi.

Tarkastuskäyntien yhteydessä sovellukseen kirjattiin uusi päivämäärä ja pesinnän vaihe. Mitä tarkemmin pesinnän vaihe voitiin arvioida, sitä harvemmin pesällä oli tarpeen käydä. Keskimäärin pesillä pyrittiin käymään noin viikon välein.

Kun poikaset olivat tarpeeksi vanhoja näytteenottoon (2–15 vrk, mediaani 7 vrk), ne otettiin pesältä ja laitettiin pahvikuppiin, jonka pohjalle oli asetettu verkko estämään poikasia koskemasta purkin pohjaan. Kun vähintään puolet poikueesta oli ulostanut, tai aikaa oli kulunut 10–15 minuuttia, poikaset palautettiin varovasti pesään. Poikaset rengastettiin näytteenoton yhteydessä, jos ne olivat tarpeeksi vanhoja siihen. Tämän jälkeen ulosteet siirrettiin spaattelilla näyteputkeen. Joiltain yksilöiltä näytteet kerättiin myös suoraan näyteputkeen. Yhdeltä pesältä samana päivänä kerätyt näytteet laitettiin samaan putkeen, jolloin yksi näyte edustaa koko pesää kyseisenä ajanhetkenä. Joiltakin pesiltä kerättiin myös toistonäytteitä, jos poikaset olivat ensimmäisellä keräyskerralla liian nuoria rengastettaviksi ja pesälle jouduttiin sen vuoksi palaamaan.

Kerätyt näytteet laitettiin maastossa kylmälaukkuun mahdollisimman nopeasti. Maastopäivän päätteeksi ne siirrettiin pakastimeen (-20 °C) ja pidettiin pakastettuna 3–5 kuukautta DNA:n eristykseen asti.

## **2.2. DNA:n eristys**

DNA:n eristystä varten näytteistä eroteltiin laminaarivirtauskaapissa puhtaan, kertakäyttöisen talouspaperin päällä mahdollisimman tarkasti tummaa ulostemateriaalia 3–250 mg eristyspakkauksesta saatuun PowerBead-putkeen. Varpuslinnut nimittäin ulostavat ja ”virtsaavat” samaan aikaan, ja niiden jätöksissä oleva tumma osa on varsinaista ulostetta, ja valkoinen ureahappoa, joka voi haitata DNA:n eristystä ja lisätä DNA:n hajoamista. Mikäli ulosteita oli useita yhdessä näyteputkessa, ainakin kahdesta pyrittiin ottamaan osia DNA:n eristykseen. Jokaisen eristyserän viimeinen putki oli negatiivinen kontrolli, johon ei laitettu ulostetta mutta sitä käsiteltiin muuten samoin kuin näyteputkia, ml. pinsettien käyttö putken sisällä. Alkuperäiset näyteputket pidettiin jäillä käsittelyn ajan ja laitettiin sen jälkeen takaisin pakastimeen, jotta niitä voitaisiin tarvittaessa käyttää uudestaan. Pinsetit steriloitiin jokaisen näytteen jälkeen pyyhkimällä ulostejänteet talouspaperiin, sen jälkeen huuhtelemalla 70 % etanolissa ja lopuksi kuumentamalla etanolilampun liekissä.

DNA:n eristykseen käytettiin QIAmp PowerFecal Pro DNA kittiä (nr 51804, Hilden, Saksa). Eristys suoritettiin valmistajan protokollan mukaan (01/2018). Protokollasta poiketen näytteet homogenisoitiin TissueLyser II:ssa 30 Hz nopeudella 2 \* 2,5 minuuttia.

Kahden ensimmäisen erän DNA-konsentraatiot tarkastettiin NanoDrop-laitteella ja PCR:llä protokollan onnistumisen varmistamiseksi. Eristetty DNA säilytettiin pakastimessa (-20 °C) 2–5 kk jatkokäsittelyyn asti.

### 2.3. Kohdegeenien monistaminen

Näytteistä monistettiin sekä saalislajien että bakteerien DNA:ta. Saalislajien selvittämiseksi käytettiin erityisesti niveljalkaisille (Zeale: ZBJ-ArtF1c + ZBJ-ArtR2c) ja laajemmin kaikille selkärangattomille (fwh: fwhF2 + fwhR2n) suunniteltuja alukkeita (Taulukko 1). Molemmat alukkeet monistavat mitokondriaalisen *sytokromi c oxidaasigeenin* alayksikkö 1:sen osia (COI). Kumpikin valituista alukepareista (Zeale ja fwh) monistavat erilaisia selkärangattomia kohdeorganismeja, ja käyttämällä molempia on mahdollista saada hieman laajempi kuva lintujen ruokavaliosta. Koska Zeale on suunniteltu erityisesti niveljalkaisia varten, se ei monista lintujen DNA:ta, mutta toisaalta sillä ei saada esiin esimerkiksi nivelmatoja (Annelida), vaikka linnut olisivat niitä syöneet. Fwh-alukkeet sen sijaan monistavat laajasti eri selkärangattomia (Vamos ym., 2017), ja mahdollisesti myös vähän lintujen DNA:ta. Bakteerilajiston selvittämiseksi käytettiin bakteerien 16S rRNA-geeniä monistavia alukkeita 515FB ja 806RB (Taulukko 1).

Näytteille valmistettiin reaktioliuokset, joihin alukkeet sekoitettiin. Jokaisesta näytteestä valmistettiin ravintoalukkeilla (Zeale ja fwh) vähintään kaksi toistoa eli replikaattia, jotta menetelmän toistettavuutta ja luotettavuutta voitiin myöhemmässä analyysivaiheessa mitata. Yhtä reaktiota kohden liuokseen tuli 2,6 µl vettä, 5 µl MyTaq Red Mix-entsyymiä (Bioline), 0,4 µM alukkeita (forward ja reverse, kutakin 0,2 µM). Kuhunkin reaktioon käytettiin lisäksi 2 µl eristettyä DNA:ta, jolloin reaktion kokonaistilavuus oli 10 µl. Kullekin alukeparille valmistettiin oma reaktioliuoksensa, koska ne vaativat erilaiset olosuhteet toimiakseen. PCR:n ajo-ohjelmat on kuvattu taulukossa 2.

Taulukko 1. Käytetyt alukkeet

<b>Aluke</b>	<b>Sekvenssi (5' – 3')</b>	<b>Luku- pituus (bp)</b>	<b>Lähde</b>
<b>Niveljalkaiset</b>			
ZBJ-ArtF1c	AGATATTGGAACWTTATATTTTATTT TTGG	157	(Zeale ym., 2011)
ZBJ-ArtR2c	WACTAATCAATTWCCAAATCCTCC		
<b>Selkärangattomat</b>			
fwhF2	GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCC HCC	206	(Vamos ym., 2017)
fwhR2n	GTRATWGCHCCDGCTARWACWGG		
<b>Bakteerit</b>			
515FB	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	254	(Parada ym., 2016)
806RB	GGACTACNVGGGTWTCTAAT		(Aprill ym., 2015)

Taulukko 2. PCR:n ajo-ohjelmat

**A. Zeale -alukkeet**

<b>Vaihe</b>	<b>Lämpötila (°C)</b>	<b>Aika (min)</b>
Alkudenaturaatio	95 °C	3:00
16 sykliä:		
Denaturaatio	95 °C	00:30
Alukkeiden kiinnitys	61 °C*	00:30
Ekstensio	72 °C	00:30
24 sykliä:		
Denaturaatio	95 °C	00:30
Alukkeiden kiinnitys	53 °C	00:30
Ekstensio	72 °C	00:30

\*Lämpötila laskee 0,5 °C/sykli.



## B. Fwh-alukkeet

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (min)
Alkudenaturaatio	95	5:00
34 sykliä:		
Denaturaatio	95	0:30
Alukkeiden kiinnitys	58	0:30
Ekstensio	72	2:00
Loppuekstensio	72	10:00

## C. 515FB-806RB -bakteerialukkeet

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (min)
Alkudenaturaatio	95	3:00
20 sykliä:		
Denaturaatio	95	0:45
Alukkeiden kiinnitys	50	1:00
Ekstensio	72	1:30
Loppuekstensio	72	10:00

PCR:n onnistuminen tarkistettiin elektroforeesilla. Elektroforeesissa käytettiin 1,5 % agarosigeeliä, johon lisättiin 5 µl DNA:han sitoutuvaa ja UV-valossa näkyvää Midori Green (Nippon Genetics) -väriainetta. PCR-tuotetta laitettiin geelille 2 µl/näyte, ja lisäksi 50 ja 100 emäsparin kokomarkkeria. Geeliä ajettiin 20 minuuttia 90 voltin jännitteellä, jonka jälkeen tuloksia tutkittiin UV-kuvauslaitteistolla.

## 2.4. DNA-kirjastojen teko

Ensimmäisen vaiheen PCR-tuotteisiin lisättiin toisessa PCR-vaiheessa uniikit indeksit, joiden avulla yksittäiset näytteet ja reaktiot voitiin myöhemmin erotella. Samalla näytteisiin lisättiin adapterit Illumina-massasekvensointia varten, eli valmistettiin niin sanottu NGS-kirjasto. Näin näytteet voitiin lopulta yhdistää DNA-kokoomanäytekirjastoiksi: toisessa ravintolajeista saatu DNA ja toisessa bakteereista saatu DNA.

Toisen vaiheen PCR:n reaktiilavuus oli 10 µl, joka koostui 5 µl MyTaq HS Red Mix -polymeraasiseosta, 0,5 µM i7-reverse-aluketta, 0,5 µM i5-forward-aluketta, ja 3 µl DNA:ta ensimmäisestä PCR-vaiheesta. PCR aloitettiin 3 minuutin alkudenaturaatiolla 95

asteessa, jota seurasi 15 sykliä seuraavaa: 20 sekunnin denaturaatio 98 asteessa, 15 sekunnin alukkeiden kiinnitys 60 asteessa, ja 30 sekunnin ekstensio 72 asteessa. Tämän jälkeen suoritettiin 3 minuutin pituinen loppuekstensio 72 asteessa. PCR-reaktion onnistuminen tarkistettiin ajamalla 2 µl tuotetta 1,5 % agarosigeelillä 20 minuuttia 90 voltin jännitteellä. Sen jälkeen PCR-tuotteet yhdistettiin alukkeittain ja toistojen mukaan pipetoimalla 3 µl per näyte 1,5 ml Eppendorf-putkeen. Näytteet yhdistettiin siis viideksi kokoomanäytteeksi: Zeale1, Zeale2, FWH1, FWH2 ja BAC.

## 2.5. DNA-kirjastojen puhdistus ja laaduntarkistus

Kokoomanäytteistä eli DNA-kirjastopooleista puhdistettiin epäspesifit DNA-fragmentit ja ylijäämäreagenssit itse valmistetulla SPRI-magneettiliuoksella kaksisuuntaisella menetelmällä (Vesterinen ym., 2016; engl. *solid-phase reversible immobilization*). DNA-kirjastot laimennettiin sekoittamalla 150 µl DNA:ta ja 150 µl ultrapuhdasta vettä. Laimennokseen sekoitettiin 240 µl 0,8x SPRI-seosta. Seosta inkuboitiin huoneenlämpötilassa 5 minuuttia ja asetettiin magneetille, kunnes seos oli kirkasta. Kirkas supernatantti siirrettiin magneetille muodostunutta pellettiä varoen uuteen putkeen, jossa oli 45 µl 0,95x SPRI-kuulaseosta. Seos sekoitettiin vorteksoimalla ja annettiin jälleen inkuboitua huoneenlämmössä 5 minuuttia. Tämän jälkeen seos asetettiin taas magneetille, ja nesteen kirkastuttua supernatantti poistettiin ja magneetille jäänyt pelletti puhdistettiin kaksi kertaa 500 µl:lla tuoretta 80 % etanolia. Kohde-DNA oli tässä vaiheessa magneetilla putken seinustalla. Putken annettiin seistä magneetilla 1 minuutti, jonka jälkeen etanoli poistettiin ja etanolipesu toistettiin toisen kerran. Tämän jälkeen etanoli poistettiin ja putken annettiin kuivua. Putkeen lisättiin 150 µl MQ-vettä, se poistettiin magneetilta ja vorteksoitiin yhtenäiseksi seokseksi. Seoksen annettiin taas inkuboitua huoneenlämpötilassa 5 minuuttia, jonka jälkeen se asetettiin takaisin magneetille, kunnes neste oli kirkasta. Tässä vaiheessa DNA oli supernatantissa, joka pipetoitiin mahdollisimman SPRI-helmiä vältellen tarkasti uuteen, nimikoituun putkeen.

Puhdistuksen onnistuminen varmistettiin ajamalla puhdistamattomat ja puhdistetut kirjastot rinnakkain 2 % agarosigeelillä 30 minuuttia 90 voltin jännitteellä. DNA-osakirjastojen konsentraatiot mitattiin Qubit Fluorometer -laitteella ennen osakirjastojen yhdistämistä lopullisiksi DNA-kokoomanäytteiksi. Konsentraation mittaamiseen käytettiin Qubit dsDNA HS Assay-kittiä (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Yhdysvallat) ja se suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaan. Zeale-kirjastojen konsentraatiot olivat 4,06 ng/µl ja 4,48 ng/µl, fwh-kirjastojen 3,54 ng/µl ja 3,66 ng/µl, ja bakteerikirjaston 0,262 ng/µl. Lopulliseen ZealeFWH-DNA -kokoelmanäytteeseen pipetoitiin molempia Zeale-osakirjastoja 22,5 µl ja fwh-osakirjastoja 27,5 µl niin, että

kirjaston kokonaistilavuudeksi tuli 100 µl. Bakteerikirjastoa käytettiin sellaisenaan, koska siitä ei ollut toistoja.

## 2.6. Sekvensointi

Sekvensointi toteutettiin Turun Biotekniikan Keskuksessa (FFGC: Finnish Functional Genomics Centre, Turku Bioscience Centre) Illumina MiSeq v2-alustalla. Fwh- ja Zeale -DNA:t sekvensoitiin yhdessä 2 x 150 bp lukupituudella. Bakteeri-DNA sekvensoitiin omassa ajossaan 2 x 250 bp lukupituudella.

## 2.7. Bioinformatiikka

Illumina MiSeq -ajojen tuottamat näytekohtaiset sekvenssit ladattiin CSC:n (Tieteen Tietotekniikan keskus, [www.csc.fi](http://www.csc.fi)) Taito-palvelimelle trimmausta sekä laadun tarkistusta varten. Sekvenssidatan käsittely tehtiin kokonaisuudessaan yhdessä ohjaajien kanssa. Sekvenssit yhdistettiin (*merging*), alukkeet trimmattiin pois (*trim for primers*) ja dereplikoitiin (*dereplicate to unique haplotypes*) käyttäen VSEARCH-ohjelman (versio 2, Rognes ym., 2016) komentoja (Kaunisto ym., 2017). Alukkeet poistettiin python-kielisellä cutadapt -ohjelmalla (Martin, 2011). Tämän jälkeen määritettiin uniikit sekvenssit, ja niiden määrät, jolloin myös singletonit, eli yksittäiset kaikista muista sekvensseistä eroavat sekvenssit poistettiin. Kimeerit, eli kahden eri molekyylin yhdistelmäsekvenssit poistettiin käyttäen USEARCH UNOISE3 -komentoa, jolla myös poistettiin todennäköisesti väärät, mahdollisesti sekvensointivirheistä seuranneet harvinaiset sekvenssit, ja lisäksi määritettiin varsinaiset sekvenssivariantit (ZOTU, *zero-radius operational taxonomical units*; Edgar, 2016). Lajit määritettiin käyttäen VSEARCH-ohjelman SINTAX-algoritmia vertaamalla saalislajien COI-geenin ZOTU-sekvenssejä avoimen BOLD-tietokannan referenssisekvensseihin (katso esim. Vesterinen ym., 2018) ja bakteerien 16S-geenin ZOTU-sekvenssejä SINTAX-ohjelmalle valmistellulla bakteerien referenssi-tietokannalla (saatavilla osoitteessa [https://www.drive5.com/usearch/manual/sintax\\_downloads.html](https://www.drive5.com/usearch/manual/sintax_downloads.html)).

## 2.8. Tilastolliset analyysit

Tilastoanalyysit tehtiin R-kielellä RStudio-ohjelmointiympäristössä (R Core Team, 2022; RStudio Team, 2022). Dataa käsiteltiin tidyverse-paketilla (Wickham ym., 2019) ja siistittiin janitor-paketilla (Firke, 2021). Siitä tehtiin myös phyloseq-tiedostoja datan käsittelyä varten (McMurdie & Holmes, 2013). Dataan lisättiin Elton Traits 1.0 -

tietokannasta tieto lajien aikuisiän ruokavaliosta (siemenet/kasvit, sekasyöjä, selkärangattomat) (Wilman ym., 2014). Näytteille laskettiin alukekohtaiset Shannonin diversiteetti-indeksit microbiome-paketilla (Lahti & Shetty, 2012). Normaalijakaumat tarkastettiin Shapiro-Wilkin normaalijakaumatestillä, jonka jälkeen lintujen lajin ja aikuisiän ruokavalioiden merkitystä diversiteetti-indekseille selvitettiin Kruskal-Wallis-testillä, koska vastemuuttujan jakauma ei ollut normaali. Linnunpoikasten iän ja diversiteetti-indeksien korrelaatiota tutkittiin Spearmanin korrelaatiokertoimella. Alfadiversiteettien välistä korrelaatiota tutkittiin myös Spearmanin korrelaatiokertoimella, koska näytteiden ravinnon ja bakteerilajien perusteella lasketut Shannonin diversiteetti-indeksit eivät olleet normaalijakautuneita ( $p < 0,001$ , Shapiro-Wilkin testi).

Ravintodata summattiin heimotasolle phyloseq-paketin `tax_glom`-funktiolla, koska aineisto oli niin pieni, että ravinnon koostumusta ei kannattanut tarkkailla lajitasolla. Samoin bakteeridata summattiin pääjaksotasolle. Analyysissa vertailtiin ravintoheimojen ja bakteeripääjaksojen sekvenssien suhteellista määrää. Vegan-paketin `adonis2`-funktiolla tehtiin PERMANOVA-testejä, joilla etsittiin tilastollisia eroja ruokavalioiden ja suolistomikrobiston komposiatioissa a) eri lintulajien, iän ja c) aikuisten lintujen ruokavalioiden välillä.

Koska monilta lintulajeilta saatiin näyte vain yhdestä pesästä, analyysit tehtiin kahdesti: sekä kaikkien lintulajien kanssa että pelkästään niiden lajien kanssa, joista saatiin vähintään kolme onnistunutta näytettä. Näin saatiin sekä laajempi otos eri lajien välillä, jossa sattumalla on kuitenkin suuri vaikutus tuloksiin, että rajatumpi otos, jossa sattumalla on vähemmän vaikutusta löydettyyn ravinto- ja suolistomikrobikoostumukseen.

### **3. Tulokset**

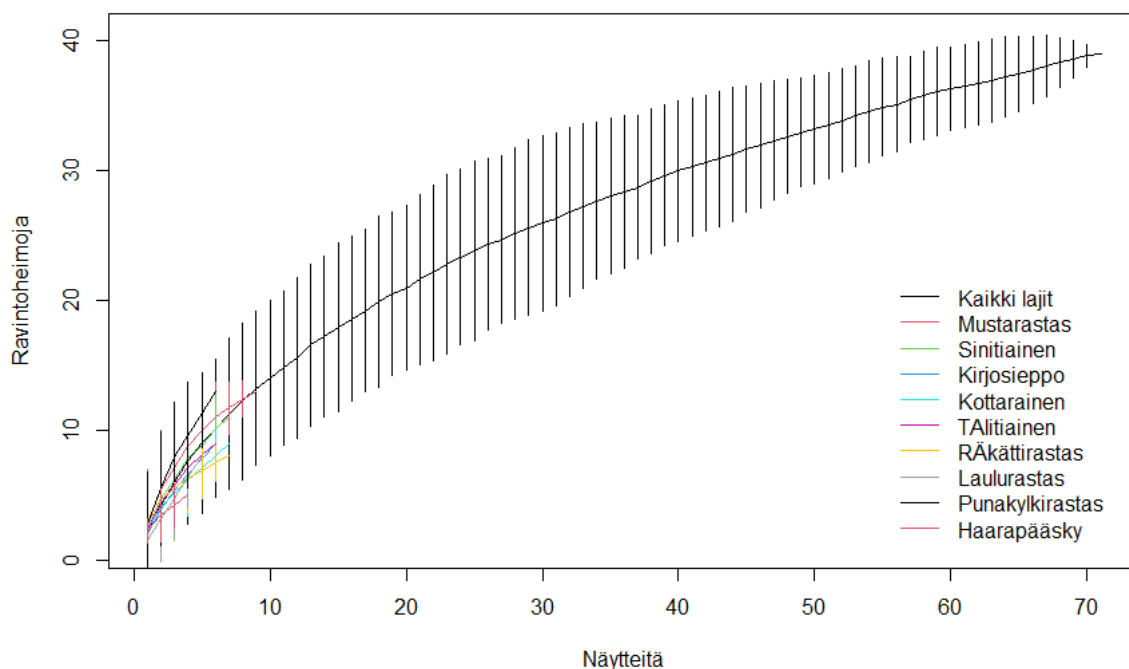
#### **3.1. Sekvenssidata ja aineiston peruskuvaajat**

Saalislajien DNA-kirjaston sekvensointi tuotti 6 419 304 (Zeale), 4 881 920 (FWH), ja bakteerien DNA-kirjasto 10 145 979 raakasekvenssiä. Trimmausten jälkeen lopullinen data sisälsi 2 214 877 (Zeale), 3 055 159 (FWH) saalislajien ja 8 513 648 bakteerien sekvenssiä.

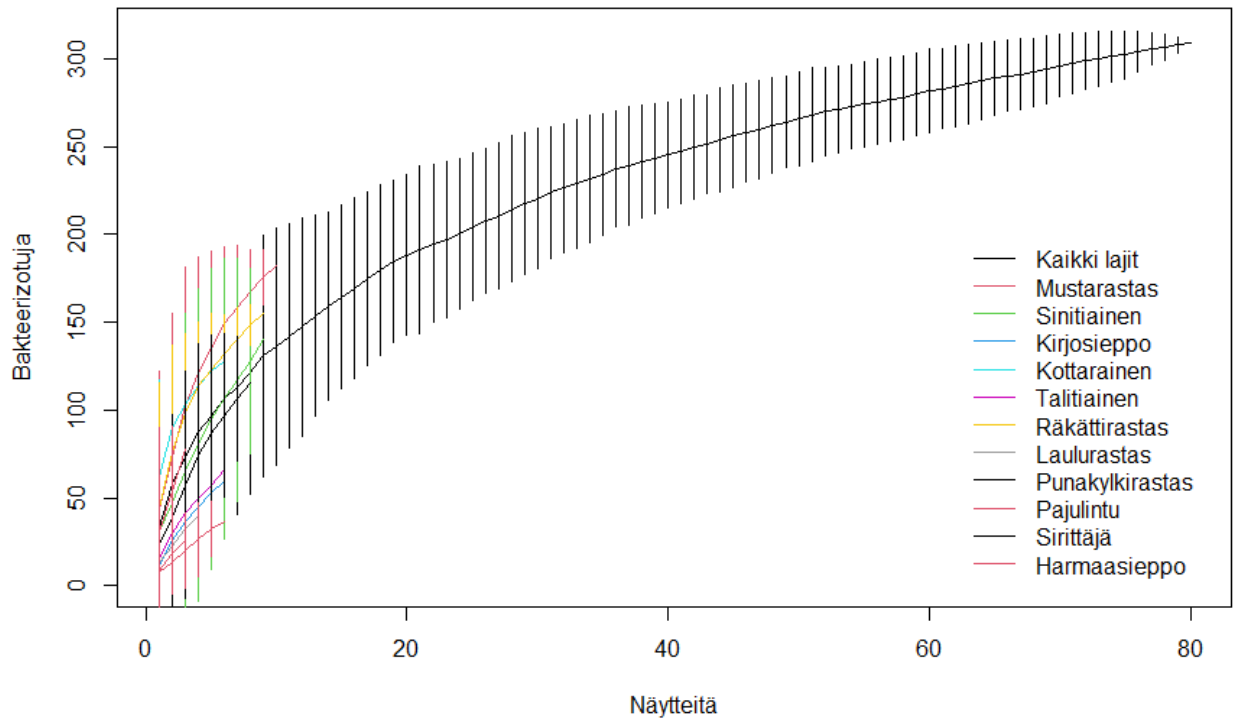
Näytteitä analysoitiin 140 yhteensä 30:lta eri lintulajilta. Kaikilta lajeilta, yhteensä 121:stä näytteestä saatiin tuotettua joko ravinto- tai mikrobidataa tai molempia. Bakteeridataa

saatiin 26:lta lajilta, ja ravinto-dataa 27:lta lajilta. Lintulajia kohti näytteitä analysoitiin 1–13. Ravintolajeja löytyi 1–26 ja bakteeri-ZOTU:ja 2–182 lintulajia kohti. Filteröinnin jälkeen yhtä bakteeri-ZOTU:a oli näytteissä keskimäärin noin 500–9 000 sekvenssiä (vaihteluväli 20–104 396 sekvenssiä). Ravintolajien sekvenssejä löytyi keskimäärin noin 11–26 000 per näyte (vaihteluväli 2–125 395 kpl). Lajikohtaisesti aineistoa on kuvattu liitteessä 1.

Ravintoheimojen ja bakteerilajien määrä kasvoi nopeasti näytteiden lukumäärän kasvaessa (kuvat 1–2). Kuvan 1 perusteella uusien ravintoheimojen löytyminen kaikkien lajien näytteistä väheni noin 15 näytteen kohdalla, mutta jatkui kuitenkin melko tasaisena senkin jälkeen. Mistään lajista ei saatu niin paljoa näytteitä, että lajikohtainen käyrä olisi tasoittunut, mutta esimerkiksi mustarastaan ja räkättirastaan kertymäkäyrät alkoivat selvästi taittua saavutetulla otoskoolla (9 ja 7 näytettä, tässä järjestyksessä). Kuvan 2 perusteella bakteerilajien löytyminen kaikilla lajeilla alkoi hidastua noin 20 näytteen kohdalla. Myöskään bakteerilajien kertymäkäyrä ei tasoittunut millään lajilla saavutetulla otoskoolla, mutta esimerkiksi mustarastaan käyrä alkoi taittua saavutetulla otoskoolla (10 näytettä).



Kuva 1. Ravintoheimojen löytyminen otoskoon kasvaessa ravintoalukkeilla. Kuvaajassa ovat mukana vain lintulajit, joista saatiin vähintään kolme näytettä.

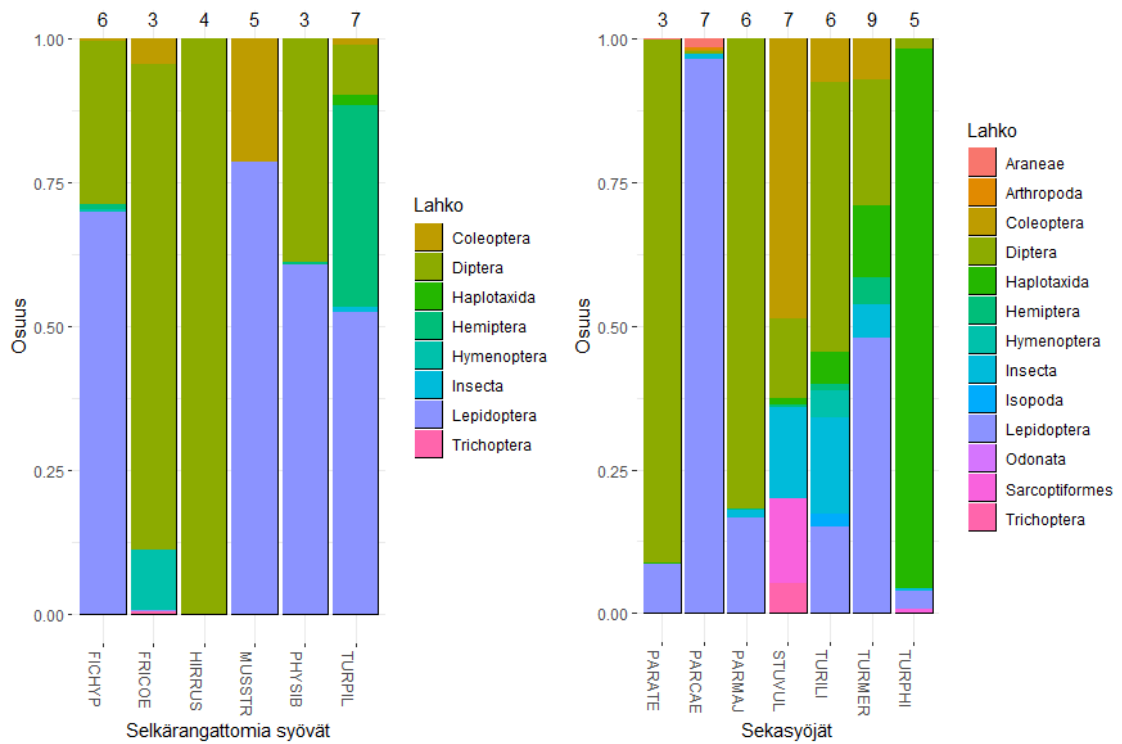


Kuva 2. Bakteeri-ZOTU:jen kertyminen otoskoon kasvaessa. Kuvaajassa ovat mukana vain lintulajit, joista saatiin vähintään kolme näytettä.

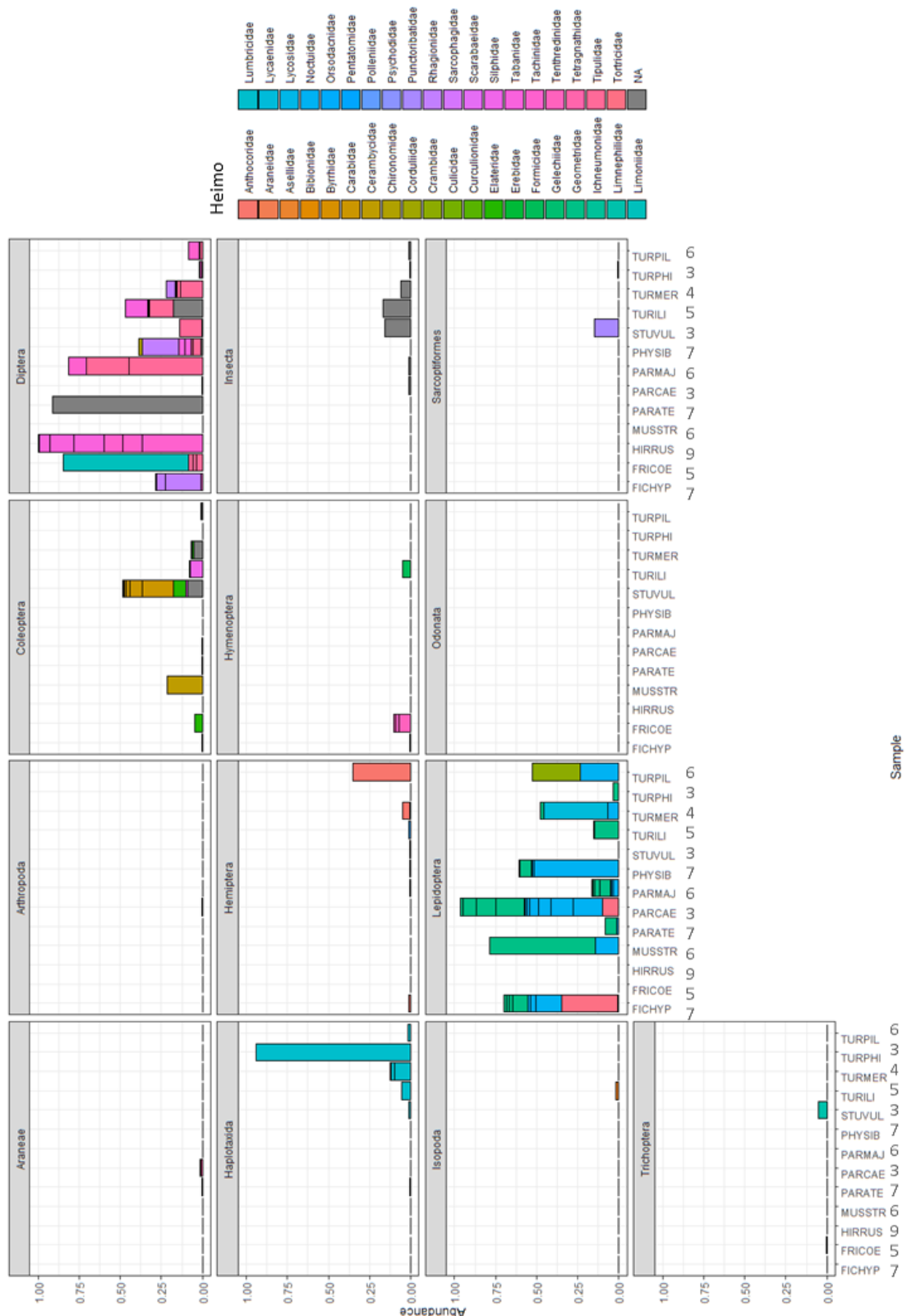
### 3.2. Ravinnon koostumus

Lintujen ravinnon koostumusta heimotasolla tarkasteltiin permanova-testillä lintujen lajin, aikuisiän ruokavalion ja iän suhteen. Lintulajien eroja tutkittiin niillä lajeilla, joista saatiin vähintään kolme näytettä ( $n = 13$  lajia). Lintulajien välillä oli merkitsevä ero ravinnossa heimotasolla ( $F(12, 58) = 1,4895$ ,  $p = 0,01$ ). Dispersion homogeenisuudesta ei ollut merkitsevä ( $F = 1,4212$ ,  $p = 0,18$ ), eli permanova-testin merkitsevä  $p$ -arvo ei johdu hajonnan epätasaisuudesta.

Lintujen ulostenäytteistä määritetty ravinto on esitetty lahkotasolla kuvassa 3 ja heimotasolla kuvassa 4. Suurimmalla osalla lajeista, varsinkin pienillä varpuslinnuilla, tärkein lahko oli joko kaksisiipiset tai perhoset (Kuva 3). Suuremmat linnut, kuten kottaraiset ja rastaat olivat syöneet huomattavissa määrin myös esimerkiksi kovakuoriaisia (kottaraiset), Haplotaxida-lahkon nivelmatoja (laulurastas ja muut rastaat) ja nivelkärsäisiä (räkättirastaat). Tärkeimpiä perhosheimoja linnuille olivat mittarit (Geometridae), yökköset (Noctuidae) ja kääriäiset (Tortricidae), ja kaksisiipisheimoista pikkuvaaksiaiset (Limoniidae), sieppokärpäset (Rhagionidae), paarmat (Tabanidae), loiskärpäset (Tachinidae) ja vaaksiaiset (Tipulidae) (Kuva 4).



Kuva 3. Eri lintulajien ulostenäytteistä määritetty ravinto lahkotasolla. Mukana ovat ne lajit, joista saatiin vähintään kolme näytettä. Palkkien päällä olevat luvut ovat lajikohtaisia näytteiden määriä. Lajit: FICHYP = kirjosieppo, FRICOE = peippo, HIRRUS = haarapääsky, MUSSTR = harmaasieppo, PHYSIB = sirittäjä, TURPIL = räkättirastas, PARATE = kuusitiainen, PARCAE = sinitiainen, PARMAJ = talitiainen, STUVUL = kottarainen, TURILI = punakylkirastas, TURMER = mustarastas, TURPHI = laulurastas.

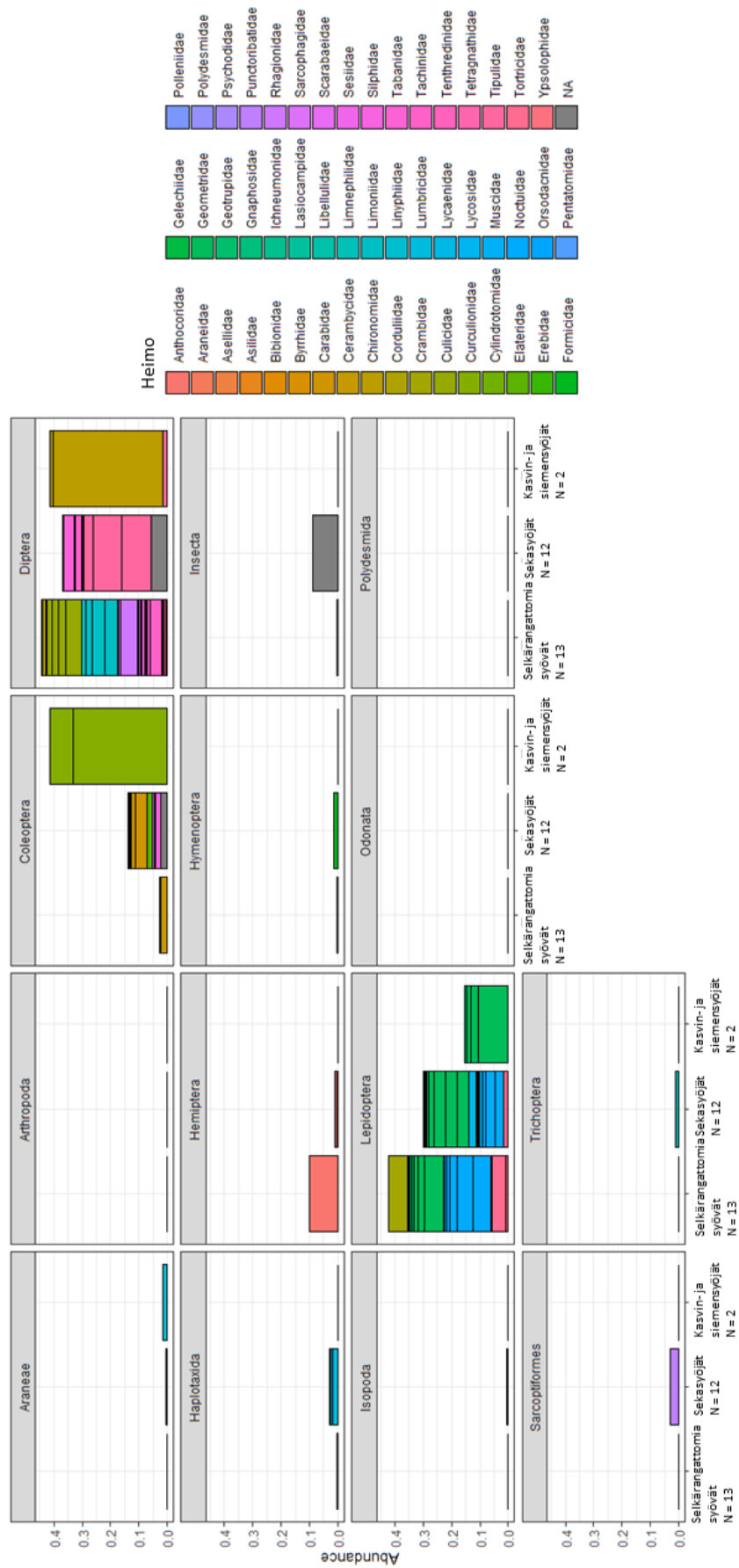


Kuva 4. Eri lintulajien ravinto heimotasolla. Mukana lajit, joista saatiin vähintään 3 näytettä. Lajit: FICHYP = kirjosieppo, FRICOE = peippo, HIRRUS = haarapääsky, MUSSTR = harmaasieppo, PARATE = kuusitiainen, PARCAE = sinitäinen, PARMAJ = talitiainen, PHYSIB = sirittäjä, STUVUL = kottarainen, TURILI = punakylkirastas, TURMER = mustarastas, TURPHI = laulurastas, TURPIL = räkättirastas.

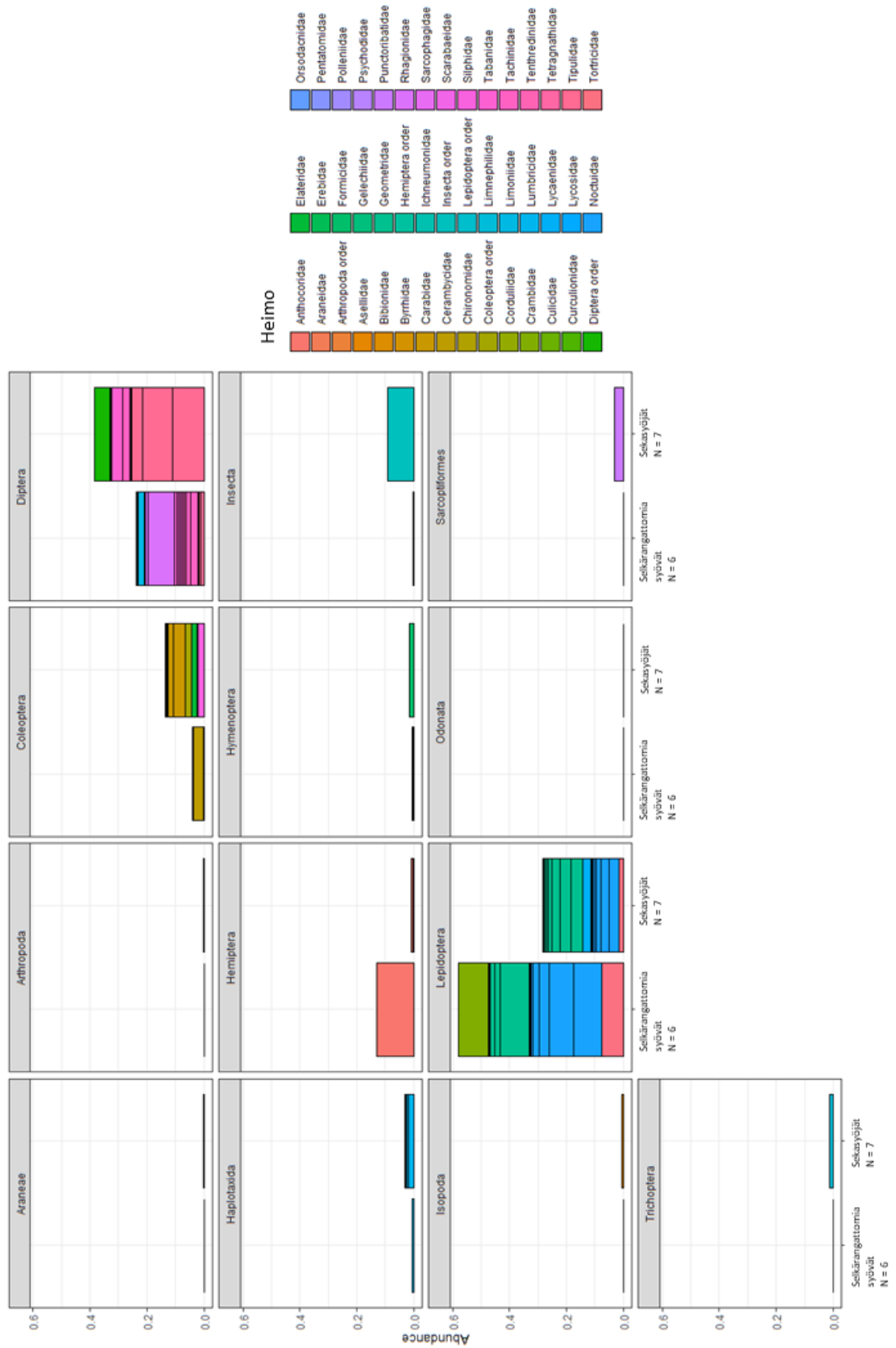


Lintujen aikuisiän ravinto oli merkitsevä selittäjä lajeilla, joista saatiin vähintään kolme näytettä ( $F(1, 69) = 1,59, p = 0,02, n = 13$  lajia, kuva 6). Homogeenisyydesti ei ollut merkitsevä ( $F = 0,03, p = 0,86$ ). Käyttämällä kaikkia tutkimuslajeja aikuisiän ravinto oli lähes merkitsevä ( $F(2, 86) = 1,46, p = 0,07, n = 27$  lajia, Kuva 5) ja homogeenisyydesti ei ollut merkitsevä ( $F = 2,18, p = 0,12$ ). Kaikkien ryhmien linnuilla kaksisiipisten osuus oli noin 40 % selkärangattomasta ravinnosta. Suurimmat erot löytyivät perhosten ja kovakuoriaisten määrissä. Kovakuoriaisravinto lisääntyi sen mukaan, miten paljon lintu syö aikuisena kasvi- tai siemenravintoa – kasvi- ja siemensyöjillä kovakuoriaiset muodostivat noin 40 % ruokavaliosta, ja määrä väheni hyönteisravinnon merkityksen kasvaessa niin, että puhtaasti selkärankaisia syövät söivät niitä vain alle 5 %. Perhosia taas käyttivät eniten hyönteissyöjät (n. 40 %), ja niiden määrä väheni kasvinsyönnin lisääntyessä niin, että kasvin- ja siemensyöjien ravinnosta vain n. 15 % koostui perhosista (Kuva 5). Kun katsottiin vain lajeja, joista saatiin vähintään kolme näytettä, kasvin- ja siemensyöjät jäivät analyysistä pois, mutta tulokset olivat muuten samankaltaisia (Kuva 6).

Linnunpoikasten iän merkitystä ruokavalion koostumukselle ei voitu luotettavasti selvittää, koska permanova-testin oletus ei täyttynyt, vaan hajonnan homogeenisyydestin tulos oli merkitsevä sekä kaikkia lajeja käyttämällä että vain niillä lajeilla, joista saatiin vähintään kolme näytettä ( $p < 0,05$ ). Hajontaa oli siis paljon ryhmien sisällä. Permanova-testien p-arvot eivät olleet merkitseviä ( $p > 0,10$ ).



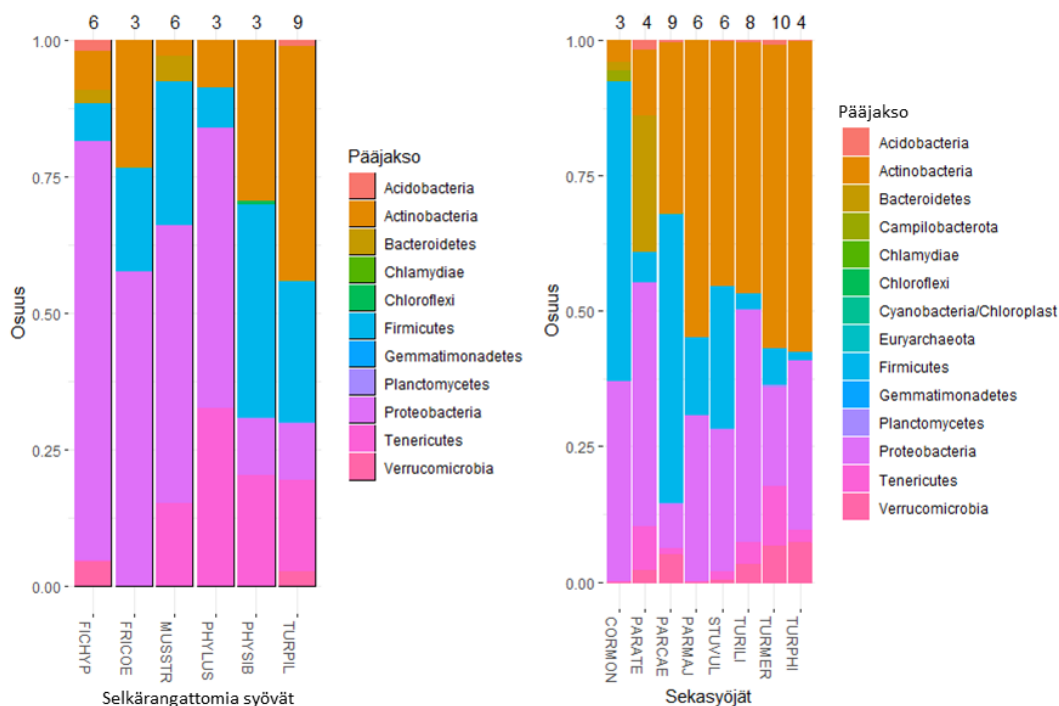
Kuva 5: Ravintoheimojen suhteellinen määrä linnun aikuisiän ravinnon mukaan. Kuvaajassa ovat mukana kaikki lajit.



Kuva 6: Ravintoheimojen suhteellinen määrä linnun aikuisiän ravinnon mukaan lajeilla, joista saatiin vähintään kolme näytettä.

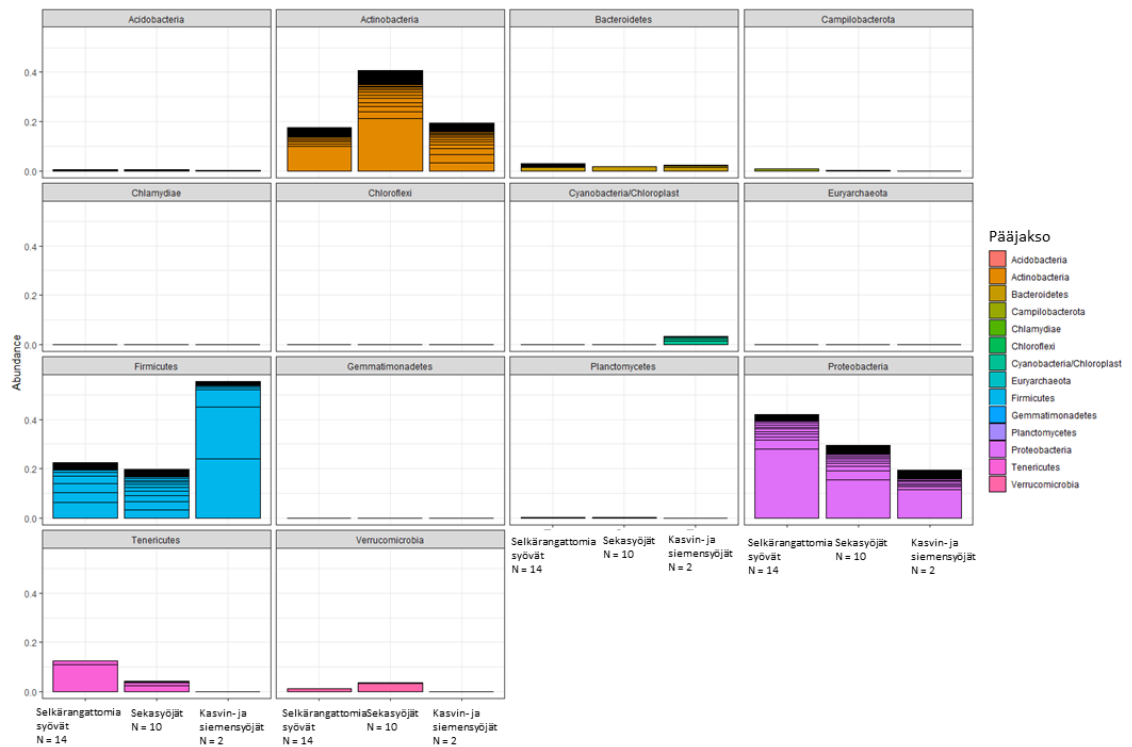
### 3.3. Suolistomikrobiston koostumus

Linnun laji oli merkitsevä selittäjä sen suolistomikrobiston koostumukselle ( $F(13, 66) = 1,6282, p = 0,01$ , Kuva 8). Varianssin homogeenisyydesti ei ollut merkitsevä ( $F = 1,2466, p = 0,268$ ). Yleisimmät bakteeriryhmät olivat Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria ja Tenericutes (kuva 7).



Kuva 7. Suolistomikrobien suhteellinen määrä lajeilla, joista saatiin vähintään kolme näytettä. Palkin päällä oleva numero on lajikohtainen näytteiden määrä. Lajit: FICHYP = kirjosiippo, FRICOE = peippo, HIRRUS = haarapääsky, MUSSTR = harmaasiippo, PHYLUS = pajulintu, PHYSIB = sirittäjä, TURPIL = räkättirastas, CORMON = naakka, PARATE = kuusitiainen, PARCAE = sinitäinen, PARMAJ = talitiainen, STUVUL = kottarainen, TURILI = punakylkirastas, TURMER = mustarastas, TURPHI = laulurastas.

Myös linnun aikuisiän ruokavalio oli merkitsevä selittäjä suolistomikrobiston koostumukselle tarkasteltaessa kaikkia lajeja ( $F(2, 93) = 2,6332, p = 0,02$ ), sekä lajeja, joista saatiin vähintään kolme näytettä ( $F(1, 78) = 3,6388, p = 0,01$ ). Varianssin homogeenisyydestit eivät olleet merkitseviä, joten permanova-testien tulokset ovat luotettavia ( $F = 1,676, p = 0,19$  ja  $F = 0,2976, p = 0,59$ ). Kasvin- ja siemensyöjillä yleisin bakteeripääajakso oli Firmicutes, sekasyöjillä Actinobacteria ja selkärangattomia syöville Proteobacteria (kuva 8).

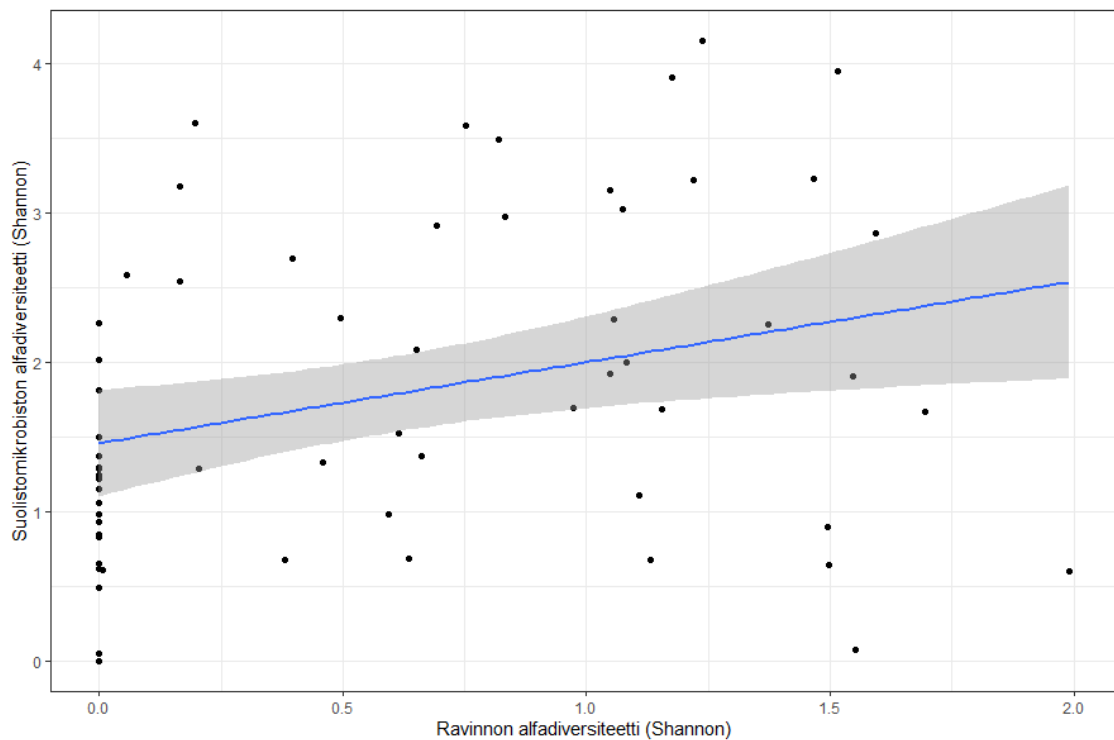


Kuva 8. Suolistomikrobien suhteellinen määrä lintujen aikuisiän ruokavalion mukaan.

Linnun ikä ei ollut merkitsevä selittäjä suolistomikrobiston koostumukselle ( $F(12, 83) = 0,9925$ ,  $p = 0,5$ ). Varianssin homogeenisyys-testin tulos ei ollut merkitsevä ( $F = 1,6794$ ,  $p = 0,09$ ).

### 3.4. Ravinnon ja suolistomikrobiston alfa-diversiteetti

Linnun lajilla ei ollut merkitystä ravinnon ( $p = 0,29$ ,  $\chi^2 = 29,48$ , Kruskal-Wallis -testi) tai suolistomikrobiston ( $p = 0,48$ ,  $\chi^2 = 24,66$ , Kruskal-Wallis -testi) alfa-diversiteetti-indekseihin. Linnun aikuisiän ruokavaliolla ei havaittu olevan merkitystä alfa-diversiteetti-indekseille (ravinto  $p = 0,88$ ,  $\chi^2 = 0,25$ , suolistomikrobit  $p = 0,29$ ,  $\chi^2 = 2,45$ , Kruskal-Wallis -testi). Myöskään poikasten ikä ei selittänyt eroja alfa-diversiteeteissä (ravinto  $p = 0,13$ ,  $\rho = 0,17$ , suolistomikrobit  $p = 0,53$ ,  $\rho = 0,07$ , Spearmanin korrelaatiokerroin). Suolistomikrobiston ja ravinnon alfa-diversiteettien välillä sen sijaan havaittiin kohtalainen positiivinen korrelaatio ( $p = 0,005$ ,  $\rho = 0,346$ , Spearmanin korrelaatiokerroin) (kuva 9).



Kuva 9. Regressiokuvaaja ravinnon ja suolistomikrobiston alfadiversiteettien suhteesta.

#### 4. Tulosten tulkinta

##### 4.1. Ravinnon koostumus

Suurimmalle osalle lintulajeista tärkeimmät ravintolahkot olivat kaksisiipiset ja perhoset (kuva 3). Poikkeuksina voidaan mainita, laulurastaiden (*Turdus philomelos*) ruokavalio koostui yli 87,5 % lieoista (Lumbricidae), ja kottaraisen ruokavalio koostui lähes 50 % kovakuoriaisista. Harvasukasmatoja löytyi myös muiden rastaiden ja kottaraisen ruokavaliosta, mutta ei juurikaan muilta lajeilta (kuva 4).

Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu, että talitiainen ruokkii poikasiaan suurilta osin perhosentoukilla (73–75 %, (Cramp, 1993; Rytönen & Orell, 2001). Tässä tutkimuksessa tärkein ravintoryhmä oli kuitenkin kaksisiipiset: pelkästään isovaaksiiset (*Tipula vernalis* ja *Tipula sp.*) muodostivat 70 % talitiaisten ravinnosta. Seuraavaksi yleisin ravintolaji oli *Phorocera*-suvun loiskärpänen, ja vasta sen jälkeen tuli ensimmäinen perhonen: sulkamittari (*Phigalia pilosaria*), jonka osuus talitiaisten ravinnosta oli n. 6,6 %. Tulokset olivat samansuuntaiset molemmilla käytetyillä ravintoalukkeilla yhdessä ja erikseen myös yksittäisten näytteiden tasolla, joka vähentää monistusvirheen todennäköisyyttä. Tulos on mielenkiintoinen ja voisi oikeuttaa lisätutkimuksiin talitiaisten ravinnosta ja sen mahdollisesta muutoksesta. Sinitiaisten (*Parus caeruleus*) ravinto sen sijaan koostui yli 90 % perhosista. Tärkeimmät lahkot olivat

mittarit (Geometridae), yökköset (Noctuidae) ja kääriäiset (Tortricidae) (Kuva 4). Lajikohtaiset ravintotaulukot kaikille linnuille löytyy liitteestä 2.

Lintujen aikuisiän ruokavalio oli merkitsevä selittäjä poikasajan ruokavalion koostumukselle, kun sitä tarkasteltiin lajeilla, joilta saatiin vähintään kolme näytettä (Kuva 5). Kaikilla lajeilla se oli lähes merkitsevä ( $p = 0,07$ , Kuva 6). Kasvi- ja siemenravinnon hyödyntäjien ravinnosta löytyi suurempia määriä kovakuoriaisia (n. 40 % ravinnosta), kuin sekasyöjiltä (n. 15 %) tai pääasiassa selkärangattomia syöviltiltä (alle 5 %). Kaksisiipiset muodostivat kaikkien ryhmien ravinnosta n. 35 – 50 %. Perhosia löytyi eniten selkärangattomia syövien ravinnosta – noin 40 %. Sekasyöjiltä niitä löytyi noin 30 % ja kasvin- ja siemensyöjiltä n. 15 %. Myös nivelkärsäisiä löytyi eniten selkärangattomia syöviltiltä (noin 10 %). Huomattava on, että kasvi- ja siemensyöjien otoskoko on pienempi kuin muilla ryhmillä: vain kaksi lajia (pikkuvarpunen (*Passer montanus*) ja punatulkku (*Pyrrhula pyrrhula*)), joista saatiin yhteensä vain kolme näytettä. Niiden suuri kovakuoriaismäärä onkin peräisin yhdestä pikkuvarpusnäytteestä, eikä kahdessa muussa kasvin- ja siemensyöjänäytteessä ole lainkaan kovakuoriaisia. Analyyseistä myös puuttuu kokonaan kasviravinto, jota etenkin siemensyöjät syövät myös poikasaikana, joten aineisto on hyvin vajavainen eikä kokonaiskuvaa poikasten ruokavaliosta voida saada. Voidaan kuitenkin olettaa, että osa poikasista on syönyt kasviravintoa niin aiemman kirjallisuuden (esim. Holland ym., 2006; Moreby & Stoate, 2001; Orłowski ym., 2017), kuin myös suolistomikrobiaineiston perusteella: analyyseissä löytyi pieniä määriä syanobakteeria sinitiaisen, pikkuvarpusen, kottaraisen ja laulurastaan ulosteesta, joka kaikki ovat joko sekasyöjiä tai kasvin- ja siemensyöjiä. Tämä voi tarkoittaa, että poikaset olivat syöneet kasviravintoa, jonka viherhiukkasista jäänyt DNA joka tunnistettiin virheellisesti syanobakteeriksi.

Linnunpoikasten iän ei voitu todeta selittävän niiden ruokavalion koostumusta, koska permanova-testin oletus homogeenisesta varianssista ei täyttynyt. Tämä on harmillista, sillä ainakin siemensyöjien on todettu ruokkivan eri ikäisiä poikasia erilaisella ravinnolla (Holland ym., 2006; Moreby & Stoate, 2001). Mahdolliset erot voisi saada esiin keräämällä näytteitä ja toistonäytteitä monen ikäisiltä poikasilta kuoriutumisen loppuun lähtemiseen asti useammasta eri pesästä, ja analysoimalla sekä eläin- että kasvipöytäistä ravintoa.

#### **4.2. Suolistomikrobiston koostumus**

Linnunpoikasen laji vaikutti sen suolistomikrobiston koostumukseen. Yleisimmät bakteeripääjaksot olivat Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria ja Tenericutes, mutta

niiden suhteet vaihtelivat (Kuva 7). Kuusitiaisella (*Parus ater*) oli huomattava määrä myös Bacteroidetes-bakteereja. Hird ym. (2015) vertailivat 59 eri neotrooppisen lintulajin suolistomikrobistoja ja löysivät niiltä yhtenevän ”ydinmikrobiomin”, joka koostui Actinobacteria-, Bacteroidetes-, Firmicutes- ja Proteobacteria-pääjaksoista. Kyseiset pääjaksot löydettiin kaikista heidän käyttämistään näytteistä. Kerttuleilla yleisimmät bakteeriryhmät ovat Proteobacteria ja Firmicutes, ja niiden jälkeen Actinobacteria (Baiz ym., 2023). Bacteroidetes-bakteereja kerttuleilla oli melko vähän, mutta niin sitä kuin Acidobacteriaakin löytyi johdonmukaisesti kaikilta lajeilta. Tämän tutkielman lintujen suolistomikrobistojen koostumus oli siis pääpiirteittäin samankaltainen, kuin Hird ym. (2015) ja Baiz ym. (2023) aineistoissa. Suurimmat poikkeavuudet ovat tämän aineiston huomattavan suuri määrä Actinobacteriaa, joka varsinkin rastaila muodosti jopa 50 % mikrobistosta. Samoin Tenericutes-bakteerien suuri määrä rastaila, mutta myös harmaasiepoilla (*Muscicapa striata*) ja kuusitiaisella poikkeaa aiemmasta kirjallisuudesta. Bacteroidetes-bakteereja löytyi vain 15:ltä lajilta 26:sta, joka asettaa niiden aseman osana ydinmikrobiomia kyseenalaiseksi suomalaisilla varpuslinnuilla.

Lintujen aikuisiän ruokavalio oli merkittävä selittäjä suolistomikrobiston koostumukselle. Kun linnut jaetaan selkärangattomia syöviin, sekasyöjiin ja kasvin- tai siemensyöjiin, nähdään, että Actinobacteria-, Firmicutes-, Proteobacteria- ja Tenericutes-bakteerien määrät vaihtelevat ryhmien välillä (Kuva 8). Actinobacteria-pääjakson bakteereja löytyi eniten sekasyöjiltä. Niillä sen osuus oli noin 40 % mikrobistosta, kun muilla lajeilla sitä oli noin 20 %. Firmicutes-bakteereja taas löytyi eniten kasvin- ja siemensyöjiltä, joiden mikrobistosta se koosti lähes 50 %. Selkärangattomia ja sekaravintoa syöville Firmicutes-bakteerien osuus oli noin 20 %. Proteobacteria- ja Tenericutes-bakteereja taas oli eniten hyönteissyöjillä. Proteobacteria koosti niiden mikrobistoista noin 40 %, sekasyöjien mikrobistoista noin 30 % ja kasvin- ja siemensyöjien mikrobistoista noin 20 %. Myös Tenericutes-bakteerien määrä väheni aikuisiän ruokavalion kasvipitoisuuden lisääntyessä, mutta sen osuus oli selkärangattomia syövillekin vain 10 % tippuen lähelle 0 % kasvin- ja siemensyöjillä. Mainittavaa on, että kasvin- ja siemensyöjien ulosteesta löytyi myös pieniä määriä syanobakteereja. Nämä voivat olla peräisin niiden syömästä kasviravinnosta, kun sulamattomien viherhiukkasten sisältämä DNA on monistunut bakteerialukkeella niiden evoluutiohistorian takia. Syanobakteereja on kuitenkin löydetty aiemmin esimerkiksi ihmisen, naudan, hevosen ja hiiren suolistoista tai ulosteesta, joten kyseessä voi olla myös aito bakteerihavainto (Ley ym., 2005).

Firmicutes-pääjakson bakteerien määrän on todettu aiemmissa tutkimuksissa korreloivan ravinnon tärkkelyspitoisuuden kanssa. Tämän tutkielman tulos on siis linjassa aiempien tutkimusten kanssa, koska kasvin- ja siemensyöjillä oli tutkielman



suurimmat Firmicutes-osuudet. Esimerkiksi Xiaon ym. (2021) tutkimuksessa sen osuus oli jopa yli 75 % viljaruokituilla linnuilla, ja oli suuri (noin 60 %) myös maissi-soija-sekoitusta ja lehtiä syöville linnuilla. Sekasyöjillä ja hedelmiä syöville linnuilla sen osuus oli 50 % molemmin puolin, kalansyöjillä noin 40 % ja lihansyöjillä alle 20 %. Xiao ym. (2021) toteavatkin, että Firmicutes-pääjaksoon kuuluvat *Lactobacillus*-suvun bakteerit ovat linnuille välttämättömiä tärkkelyksen hajottamiseen, ja *Clostridium*-suvun bakteerit ovat tärkeitä kuidun sulattamiseen. Firmicutes-bakteerien on todettu olevan tärkeitä myös lintujen immuunipuolustukselle ja painon kasvattamiselle tuotantokanoja tutkittaessa, ja syötynä niiden on todettu toimivan probiootteina lisäten ravinnon sulavuutta (Grond ym., 2018).

Myös Proteobacteria-pääjakson osuus selkärangattomia syövien lintujen suolistomikrobistoista on linjassa aiempien tutkimusten kanssa, sillä sen on aiemminkin todettu olevan yleinen eläinperäistä ravintoa syöville linnuilla. Esimerkiksi Baizin ym. (2023) aineistossa se oli selvästi yleisin pääjakso kaikilla heidän tutkimillaan kerttulilajeilla, jotka Elton Traits 1.0 -luokittelun mukaan syövät pääosin selkärangattomia. Kokeellisessa tutkimuksessa Proteobacterian osuus villien talitiaisten suolistomikrobistossa kasvoi, kun niitä ruokittiin hyönteisravinnolla (Davidson ym., 2020). Myös Xiaon ym. (2021) aineistossa lihansyöjälintujen ulostenäytteissä oli eniten Proteobacteria-pääjakson bakteereja, ja muilla ryhmillä sen määrä oli pienempi. Xiao ym. (2021) huomauttavat, että suuri osa Proteobacteria-pääjakson bakteereista on patogeenejä, ja niiden runsaus oli heidän aineistossaan kääntäen verrannollinen *Clostridium*- ja *Bacteroides*-sukujen bakteerien kanssa. *Clostridium*- ja *Bacteroides*-bakteerit kuuluvat Firmicutes- ja Bacteroidetes-pääjaksoihin (tässä järjestyksessä), ja niiden tiedetään myös muodostavan ns. haihtuvia rasvahappoja, jotka voivat rajoittaa patogeenien esiintymistä (van der Wielen ym., 2000). On siis mahdollista, että selkärangattomia syöville linnuilla kasviraivannon vähyyys altistaa niiden suoliston suuremmalle määrälle patogeenejä. Tästä ei kuitenkaan välttämättä ole haittaa linnuille, jos ne ovat sopeutuneet siihen muuten.

Sekasyöjillä Actinobacteria-pääjakson bakteerit olivat yleisimpiä siinä, missä kasvin- ja siemensyöjillä Firmicutes- ja selkärangattomia syöville Proteobacteria-pääjaksot. Sen on todettu monissa tutkimuksissa olevan yleinen linnuilla ja dominoivan joidenkin näytteiden mikrobistoa, mutta sitä ei ilmeisesti ole pidetty yhtä tärkeänä tai helposti tutkittavana kuin Firmicutes- ja Proteobacteria-pääjaksoja, sillä sen toimintaa linnuilla ei ole tutkittu (Bodawatta ym., 2022; Grond ym., 2018). Tämän tutkielman aineiston perusteella se kuitenkin on oleellinen pääjakso varsinkin sekasyöjälinnuille, ja sen toiminta ansaitsisi lisähuomiota tutkijoilta.

### 4.3 Ravinnon ja suolistomikrobiston alfadiversiteetti

Linnunpoikasten ruokavalion ja suolistomikrobiston alfadiversiteetit korreloivat keskenään kohtalaisesti positiivisesti, eli näytteissä joiden saalisdiversiteetti oli suuri, bakteeridiversiteetti oli myös suuri. Korrelaatio ei kuitenkaan ole suuri, ja näyttää aiheutuvan enimmäkseen niistä näytteistä, joiden ravinnon diversiteetti-indeksi on 0, eli niistä on löytynyt vain yhtä saalislajia. Näissä näytteissä, yhtä lukuunottamatta, toinen ravintoaluke oli epäonnistunut, ja toinen aluke oli monistanut vain yhden lajin DNA:ta. Poikkeuksena oli yksi kirjosiepon (*Ficedula hypoleuca*) pesä, josta molemmat ravintoalukkeet löysivät vain yhden, saman lajin, jolloin alfadiversiteetti-indeksiksi tulee 0. Tämän näytteen suolistomikrobiston alfadiversiteetti oli myös alhainen (ad-indeksi 0.04564403), joka vahvistaa hypoteesia. On kuitenkin mahdollista, että havaittu korrelaatio johtuu ainakin osittain siitä, että joidenkin näytteiden DNA:n eristyksessä tai monistamisessa on ollut ongelmia. Mikäli korrelaatio on todellinen, se voisi tarkoittaa, että monipuolinen ruokavalio johtaa linnuilla myös monipuolisempaan suolistomikrobistoon, jolla puolestaan voisi olla merkitystä linnunpoikasten terveydelle (Heiman & Greenway, 2016). Aiemmin Baiz ym. (2023) löysivät heikon korrelaation kerttuleiden (*Parulidae* spp.) ravinnon ja suolistomikrobiston alfadiversiteettien välillä, mutta totesivat, ettei korrelaatio heidän aineistossaan ole järin mainittava, vaikka usealla testillä tuli samankaltainen, ei-merkittävä tulos. Bolnick ym., (2014) taas tutkivat ravinnon ja suolistomikrobiston diversiteettien välistä suhdetta kahdella kalalajilla. Heidän mukaansa generalistikaloilla olikin yksipuolisempi suolistomikrobisto, kuin spesialistikaloilla. Aihe vaatiikin lisää tutkimuksia, joissa aineisto on tätä tutkielmaa parempilaatuista ja sekvenssit myös filteröidään tarkemmin väärin positiivisten torjumiseksi.

Linnunpoikasten lajin, aikuisiän ruokavalion tai iän ei havaittu selittävän ruokavalion tai suolistomikrobiston alfadiversiteettien vaihtelua. On mahdollista, että niihin vaikuttaa enemmän esimerkiksi poikueen vanhempien ominaisuudet, kuten niiden oman suolistomikrobiston monipuolisuus, yleinen terveys, ikä, kelpoisuus (engl. *fitness*) tai opittu ravinnonhankintataito. Varsinkin ravinnon diversiteettiin voivat vaikuttaa myös ympäristön ominaisuudet, kuten ilmansaasteet ja saatavilla olevat saalislajit, jotka tunnetusti vaikuttavat pesälle tuotavien hyönteisten lajikoostumukseen (esim. Eeva ym., 2005).

#### 4.4 Virhelähteet

Näytteitä saatiin jokaista lintulajia kohti 1-13 eri pesältä. Otokoot ovat pieniä, ja kertymäkäyrien (Kuvat 1 ja 2) mukaan sopiva otoskoko kattavan aineiston saamiseksi voisi olla n. 15-20 pesää lajia kohti. Tarkan arvion saamiseksi kertymäkäyrien perusteella tarvittaisiin kuitenkin suurempi otoskoko. Lisäksi on huomioitavaa, että kuvassa 1 ei ole tarkasteltu ravintolajien, vaan ravintoheimojen kertymistä. Luotettavan lajikoostumuksen saamiseksi näytteitä tarvitaan siis vielä enemmän. Näytteiden keräämistä rajoitti pesien löytämisen vaikeus ja pesien tuhoutumisriski. Eniten näytteitä saatiinkin rastailta (*Turdus* spp.), joiden pesät ovat suuria ja helppo löytää, sekä pöntöissä pesiviltä linnuilta (tiaiset (*Parus* spp.) ja kottarainen (*Sturnus vulgaris*)) ja yhdyskunnissa pesiviltä haarapääskyiltä (*Hirundo rustica*). Vähiten näytteitä saatiin pieniltä, avopesiviltä varpuslinnuilta, kuten kiuru (*Alauda arvensis*), punatulku (*Pyrrhula pyrrhula*), metsäkirvinen (*Anthus trivialis*) ja kerttulinnut (*Sylvia* spp.) (ks. liite 1). Näytteiden keruun helpottamiseksi vastaavissa tutkimuksissa kannattaakin keskittyä lajeihin joiden poikaspesiä on helppo löytää, tai varata pesien etsimiseen runsaasti miestunteja palkkaamalla useampia kokeneita etsijöitä, tai keräämällä näytteitä useamman pesimäkauden ajan.

Näytteiden keruun lisäksi haasteita aiheutti myös DNA:n monistaminen. Linnun ulosteesta DNA:n monistaminen osoittautui hankalaksi, oletettavasti siitä löytyvien luonnollisten inhibiittorien vuoksi. Tämän vuoksi 11 lajilta saatiin monistettua DNA:ta vain yhdellä tai kahdella alukkeella kolmesta, jolloin tyyppin II virheet ovat väistämättömiä. Analyysiin jouduttiin samasta syystä hyväksymään hyvin alhaisia sekvenssimääriä, jolloin myös virheellisten määritysten ja kontaminaation mahdollisuus kasvaa (tyypin I virhe). Löydettyjen sekvenssien vähimmäis- ja enimmäismäärät löytyy liitteestä 1. DNA:n käsittelyn tuloksia voisi parantaa kehittämällä käytettäviä protokollia erillisessä tutkimuksessa linnun ulosteelle sopivammaksi.

#### 4.5 Yhteenveto

Tutkielman aineistossa linnunpoikasten laji ja aikuisiän ruokavalio selitti niiden ruokavalion ja suolistomikrobistojen eroavaisuuksia, vaikkakin aikuisiän ravinto selitti poikasajan ruokavaliota vain heikosti. Mikäli tutkimuksessa olisi selvitetty myös poikasten syömää kasviraivintoa, ero voisi olla selvempi. Tulevaisuudessa vastaavissa tutkimuksissa käytettävät alukkeet kannattaakin valita niin, että kaikki poikasten mahdollisesti nauttima ravinto saadaan selville. Tällöin voitaisiin verrata myös poikasajan ruokavaliota suolistomikrobiston koostumukseen jotta saataisiin selville, miten poikasten nauttima ravinto vaikuttaa niiden suolistomikrobiston kehittymiseen.

Tämä tutkielma ja edempänä mainitut muut tutkimukset kuitenkin osoittavat, että ruokavalio vaikuttaa lintujen ja muiden eläinten suolistomikrobistoon, joten poikasten tarkempi tutkimus on todennäköisesti hedelmällistä.

Selvästi tärkeimmät selkärangattomien lahkot linnunpoikasille olivat perhoset ja kaksisiipiset. Joillekin lajeille tärkeää ravintoa olivat myös kovakuoriaiset ja nivelmadot, mutta esimerkiksi hämähäkkejä, pistiäisiä ja sudenkorentoja syötiin vain pieniä määriä. Valitettavasti tutkimuksen otoskoko lajia kohti on liian pieni luotettavien ravintoverkkojen rakentamiseksi. Kaikki lajit, joista kerättiin useampia kuin yksi näyte, olivat käyttäneet ravinnokseen useampaa kuin yhtä selkärangattomien lahkkoa, joka on hyvä uutinen nykyisenä hyönteiskadon aikana. On kuitenkin huomattava, että mikäli perhosten ja kaksisiipisten määrä pienenee huomattavasti, monen lintulajin voi olla vaikea kasvattaa poikasiaan. Lintujen suojelemiseksi perhosten ja kaksisiipisten kantojen ylläpitäminen on siis tärkeää.

Yleisimmät bakteeripääjaksot linnunpoikasilla olivat Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria ja Tenericutes. 15:ltä lajilta löytyi myös Bacteroidetes-pääjakson bakteereja, joita pidetään monilla lintulajeilla yhtenä ”ydinmikrobiomin” ryhmänä (Hird ym., 2015). Tässä aineistossa ne olivat kuitenkin melko marginaalinen ryhmä lukuunottamatta kuusitiaista, jolla ne olivat kolmanneksi yleisin ryhmä. Tulevaisuudessa sen lisäksi, että tutkittaisiin poikasten oman ruokavalion vaikutusta suolistomikrobiston koostumukseen, tulisi tutkia lisää eri bakteerien toimintaa ja merkitystä linnuille. Esimerkiksi Actinobacteria-pääjakson toiminnasta ei ole löydettävissä vielä juurikaan tietoa, vaikka ne olivat todella yleisiä poikasten ulostenäytteissä.

Vaikuttaa siltä, että monipuolinen ruokavalio voi vaikuttaa positiivisesti myös suolistomikrobiston monipuolisuuteen linnunpoikasilla. Päätelmää tukee se, että myös aiemmassa tutkimuksessa on löydetty heikko korrelaatio näiden välillä (Baiz ym., 2023). Ongelmana on kuitenkin se, että aineistossa on mukana heikkolaatuisia näytteitä, jotka ovat voineet vaikuttaa tulokseen. Tutkimuksessa ei ole myöskään käytetty toistonäytteitä ravinnon pitkän aikavälin monipuolisuuden selvittämiseksi. Tulokseen tulee siis suhteutua varauksella, mutta se rohkaisee tutkimaan aihetta lisää.

Tämän tutkielman suurimmat heikkoudet ovat suuresta maastotyöpanostuksesta huolimatta pieneksi jääneet otoskoot, kasvialukkeiden puuttuminen, ja kohdatut ongelmat DNA:n käsittelyssä. Tämän vuoksi aineistosta ei voida tehdä hyviä yleistyksiä lajikohtaisen ravinnon, suolistomikrobiston tai näiden välisten vaikutusten osalta ainakaan alemmilla taksoneilla bakteerien tai ravinnon osalta. Ylemmillä taksoneilla,

kuten bakteerien pääjaksot ja selkärangattomien heimot ja lahkot, tulokset ovat kuitenkin uskottavia. Tulokset ovat myös suurelta osin yhteneväisiä aiemman, myös aivan hiljattain julkaistun tutkimuksen kanssa, joten ne vahvistavat aiempia tietoja ja rohkaisevat jatkamaan tutkimusta suuremmalla aineistolla.

## 5. Eettisyys

Kaikilla poikasista käsiteltyillä ihmisillä oli alueella voimassa oleva rengastuslupa. Ruissalon luonnonsuojelualueilla (Ruissalon lehdot (YSA 203051) ja Ruissalon lintulahdet ja rannat (YSA 203050)) liikkumiseen ja pesien häiritsemiseen oli erityislupa Varsinais-Suomen ELY-keskukselta (päättös VARELY/913/2020). Poikasille ei aiheutettu näytteiden keruussa merkittävästi rengastusta suurempaa haittaa. Poikaset käsiteltiin ja rengastettiin noudattaen Luonnontieteellisen Keskumuseon ja Varsinais-Suomen ELY-keskuksen ohjeita ja määräyksiä (VARELY/1134/2020).

## 6. Kiitokset

Haluan kiittää ohjaajiani Suvi Ruuskasta, Eero Vesteristä ja Toni Laaksosta heidän avustaan ja tuestaan tutkielman teon kaikissa vaiheissa. Suuret kiitokset myös Jorma Nurmelle ja muille maastotöissä auttaneille. Lisäksi haluan kiittää Kuopion Luonnon Ystävien Yhdistys ry:tä ja Suomen Biologian Seura Vanamoja apurahoista, jotka mahdollistivat tutkielman toteutuksen.

## 7. Kirjallisuus

- Allen, L. R., & Hume, I. D. (1997). The importance of green seed in the nitrogen nutrition of the Zebra Finch *Taeniopygia guttata*. *Australian Journal of Ecology*, 22(4), 412–418. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1997.tb00691.x>
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129–137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>
- Baiz, M. D., Benavides C., A., Miller, E. T., Wood, A. W., & Toews, D. P. L. (2023). Gut microbiome composition better reflects host phylogeny than diet diversity in

breeding wood-warblers. *Molecular Ecology*, 32(2), 518–536.

<https://doi.org/10.1111/mec.16762>

Bennett, D. C., Tun, H. M., Kim, J. E., Leung, F. C., & Cheng, K. M. (2013).

Characterization of cecal microbiota of the emu (*Dromaius novaehollandiae*).

*Veterinary Microbiology*, 166(1), 304–310.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.05.018>

Berlow, M., Kohl, K. D., & Derryberry, E. P. (2020). Evaluation of non-lethal gut microbiome sampling methods in a passerine bird. *Ibis*, 162(3), 911–923.

<https://doi.org/10.1111/ibi.12807>

Bodawatta, K. H., Hird, S. M., Grond, K., Poulsen, M., & Jønsson, K. A. (2022a). Avian gut microbiomes taking flight. *Trends in Microbiology*, 30(3), 268–280.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.07.003>

Bodawatta, K. H., Hird, S. M., Grond, K., Poulsen, M., & Jønsson, K. A. (2022b). Avian gut microbiomes taking flight. *Trends in Microbiology*, 30(3), Art. 3.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.07.003>

Bolnick, D. I., Snowberg, L. K., Hirsch, P. E., Lauber, C. L., Knight, R., Caporaso, J. G., & Svanbäck, R. (2014). Individuals' diet diversity influences gut microbial diversity in two freshwater fish (threespine stickleback and Eurasian perch).

*Ecology Letters*, 17(8), 979–987. <https://doi.org/10.1111/ele.12301>

Bonjour, J.-P., Ammann, P., Chevalley, T., & Rizzoli, R. (2001). Protein Intake and Bone Growth. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 26(S1), S153–S166.

<https://doi.org/10.1139/h2001-050>

Capinera, J. L. (2010). *Insects and wildlife: Arthropods and their relationships with wild vertebrate animals*.

<http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=819386>

Cramp, S. (1993). *The Birds of the Western Palearctic* (S. Cramp, Toim.). Oxford Univ. Press.

Davidson, G. L., Wiley, N., Cooke, A. C., Johnson, C. N., Fouhy, F., Reichert, M. S., de la Hera, I., Crane, J. M. S., Kulahci, I. G., Ross, R. P., Stanton, C., & Quinn, J.

- L. (2020a). Diet induces parallel changes to the gut microbiota and problem solving performance in a wild bird. *Scientific Reports*, *10*(1), Art. 1.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77256-y>
- Davidson, G. L., Wiley, N., Cooke, A. C., Johnson, C. N., Fouhy, F., Reichert, M. S., de la Hera, I., Crane, J. M. S., Kulahci, I. G., Ross, R. P., Stanton, C., & Quinn, J. L. (2020b). Diet induces parallel changes to the gut microbiota and problem solving performance in a wild bird. *Scientific Reports*, *10*(1), Art. 1.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77256-y>
- De Graaf, R. M., Tilghman, N. G., & Anderson, S. H. (1985). Foraging guilds of North American birds. *Environmental Management*, *9*(6), 493–536.  
<https://doi.org/10.1007/BF01867324>
- Douglas, D. J. T., Moreby, S. J., & Benton, T. G. (2012). Provisioning with cereal grain depresses the body condition of insectivorous Yellowhammer *Emberiza citrinella* nestlings. *Bird Study*, *59*(1), 105–109.  
<https://doi.org/10.1080/00063657.2011.636797>
- Edgar, R. C. (2016). *UNOISE2: Improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing* [Preprint]. Bioinformatics. <https://doi.org/10.1101/081257>
- Eeva, T., Ryömä, M., & Riihimäki, J. (2005a). Pollution-related changes in diets of two insectivorous passerines. *Oecologia*, *145*(4), 629–639.  
<https://doi.org/10.1007/s00442-005-0145-x>
- Eeva, T., Ryömä, M., & Riihimäki, J. (2005b). Pollution-related changes in diets of two insectivorous passerines. *Oecologia*, *145*(4), Art. 4.  
<https://doi.org/10.1007/s00442-005-0145-x>
- Firke, S. (2021). *janitor: Simple Tools for Examining and Cleaning Dirty Data*.  
<https://CRAN.R-project.org/package=janitor>
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, *3*(4), 289–306.  
<https://doi.org/10.4161/gmic.19897>

- Forsman, A. M., Hoenig, B. D., Gaspar, S. A., Fischer, J. D., Siegrist, J., & Fraser, K. (2022). Evaluating the impacts of metabarcoding primer selection on DNA characterization of diet in an aerial insectivore, the Purple Martin. *Ornithology*, *139*(1), ukab075. <https://doi.org/10.1093/ornithology/ukab075>
- Grond, K., Sandercock, B. K., Jumpponen, A., & Zeglin, L. H. (2018a). The avian gut microbiota: Community, physiology and function in wild birds. *Journal of Avian Biology*, *49*(11), e01788. <https://doi.org/10.1111/jav.01788>
- Grond, K., Sandercock, B. K., Jumpponen, A., & Zeglin, L. H. (2018b). The avian gut microbiota: Community, physiology and function in wild birds. *Journal of Avian Biology*, *49*(11), Art. 11. <https://doi.org/10.1111/jav.01788>
- Heiman, M. L., & Greenway, F. L. (2016). A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. *Molecular Metabolism*, *5*(5), 317–320. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.02.005>
- Hird, S. M., Sánchez, C., Carstens, B. C., & Brumfield, R. T. (2015a). Comparative Gut Microbiota of 59 Neotropical Bird Species. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01403>
- Hird, S. M., Sánchez, C., Carstens, B. C., & Brumfield, R. T. (2015b). Comparative Gut Microbiota of 59 Neotropical Bird Species. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01403>
- Holland, J. M., Hutchison, M. A. S., Smith, B., & Aebischer, N. J. (2006a). A review of invertebrates and seed-bearing plants as food for farmland birds in Europe. *Annals of Applied Biology*, *148*(1), 49–71. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00039.x>
- Holland, J. M., Hutchison, M. A. S., Smith, B., & Aebischer, N. J. (2006b). A review of invertebrates and seed-bearing plants as food for farmland birds in Europe. *Annals of Applied Biology*, *148*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00039.x>
- Kaunisto, K. M., Roslin, T., Sääksjärvi, I. E., & Vesterinen, E. J. (2017). Pellets of proof: First glimpse of the dietary composition of adult odonates as revealed by



metabarcoding of feces. *Ecology and Evolution*, 7(20), 8588–8598.

<https://doi.org/10.1002/ece3.3404>

Kohl, K. D., Amaya, J., Passemment, C. A., Dearing, M. D., & McCue, M. D. (2014).

Unique and shared responses of the gut microbiota to prolonged fasting: A comparative study across five classes of vertebrate hosts. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(3), 883–894. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12442>

Lahti, L., & Shetty, S. (2012). *Microbiome R package*.

Lee, C. Y., Peralta-Sánchez, J. M., Martínez-Bueno, M., Møller, A. P., Rabelo-Ruiz, M.,

Zamora-Muñoz, C., & Soler, J. J. (2020). The gut microbiota of brood parasite and host nestlings reared within the same environment: Disentangling genetic and environmental effects. *The ISME Journal*, 14(11), 2691–2702.

<https://doi.org/10.1038/s41396-020-0719-y>

Lewis, W. B., Moore, F. R., & Wang, S. (2016). Changes in gut microbiota of migratory

passerines during stopover after crossing an ecological barrier. *The Auk*, 134(1), 137–145. <https://doi.org/10.1642/AUK-16-120.1>

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I.

(2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31), 11070–11075.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>

Li, C., Liu, Y., Gong, M., Zheng, C., Zhang, C., Li, H., Wen, W., Wang, Y., & Liu, G.

(2021). Diet-induced microbiome shifts of sympatric overwintering birds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(14–15), 5993–6005.

<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11448-y>

Lopes, L. E., Fernandes, A. M., Medeiros, M. C. I., & Marini, M. Â. (2016). A

classification scheme for avian diet types. *Journal of Field Ornithology*, 87(3), 309–322. <https://doi.org/10.1111/jfo.12158>

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput

sequencing reads. *EMBnet journal*, 17(1), 10.

<https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

- Matsui, H., Kato, Y., Chikaraishi, T., Moritani, M., Ban-Tokuda, T., & Wakita, M. (2010). Microbial diversity in ostrich ceca as revealed by 16S ribosomal RNA gene clone library and detection of novel *Fibrobacter* species. *Anaerobe*, *16*(2), 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.07.005>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61217.
- Moreby, S. J., & Stoate, C. (2001a). Relative abundance of invertebrate taxa in the nestling diet of three farmland passerine species, Dunnock *Prunella modularis*, Whitethroat *Sylvia communis* and Yellowhammer *Emberzia citrinella* in Leicestershire, England. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *86*(2), 125–134. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00279-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00279-6)
- Moreby, S. J., & Stoate, C. (2001b). Relative abundance of invertebrate taxa in the nestling diet of three farmland passerine species, Dunnock *Prunella modularis*, Whitethroat *Sylvia communis* and Yellowhammer *Emberzia citrinella* in Leicestershire, England. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *86*(2), Art. 2. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00279-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00279-6)
- Morris, A. J., Whittingham, M. J., Bradbury, R. B., Wilson, J. D., Kyrkos, A., Buckingham, D. L., & Evans, A. D. (2001). Foraging habitat selection by yellowhammers (*Emberiza citrinella*) nesting in agriculturally contrasting regions in lowland England. *Biological Conservation*, *101*(2), 197–210. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(01\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(01)00067-2)
- Orłowski, G., Wuczyński, A., Karg, J., & Grzesiak, W. (2017a). The significance of seed food in chick development re-evaluated by tracking day-to-day dietary variation in the nestlings of a granivorous passerine. *Ibis*, *159*(1), 124–138. <https://doi.org/10.1111/ibi.12410>
- Orłowski, G., Wuczyński, A., Karg, J., & Grzesiak, W. (2017b). The significance of seed food in chick development re-evaluated by tracking day-to-day dietary variation

in the nestlings of a granivorous passerine. *Ibis*, 159(1), Art. 1.

<https://doi.org/10.1111/ibi.12410>

Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples: Primers for marine microbiome studies. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403–1414.

<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>

R Core Team. (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.

<https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

Root, R. B. (1967). The Niche Exploitation Pattern of the Blue-Gray Gnatcatcher.

*Ecological Monographs*, 37(4), 317–350. <https://doi.org/10.2307/1942327>

RStudio Team. (2022). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio, PBC. <http://www.rstudio.com/>

Rytönen, S., & Orell, M. (2001). Great tits, *Parus major*, lay too many eggs:

Experimental evidence in mid-boreal habitats. *Oikos*, 93(3), 439–450.

<https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.930309.x>

Rytönen, S., Vesterinen, E. J., Westerduin, C., Leviäkangas, T., Vatka, E., Mutanen, M., Välimäki, P., Hukkanen, M., Suokas, M., & Orell, M. (2019). From feces to data: A metabarcoding method for analyzing consumed and available prey in a bird-insect food web. *Ecology and Evolution*, 9(1), 631–639.

<https://doi.org/10.1002/ece3.4787>

Stiles, F. G. (1978). Ecological and Evolutionary Implications of Bird Pollination.

*American Zoologist*, 18(4), 715–727. <https://doi.org/10.1093/icb/18.4.715>

Taberlet, Pierre, Bonin, Aurélie, Zinger, Lucie, & Coissac, Eric. (2018). *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. OUP Oxford.

<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=1701932&site=ehost-live>

- Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M. A., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., Wincker, P., Swenson, J. E., & Taberlet, P. (2009). New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: The trnL approach. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 51–60. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02352.x>
- Vamos, E., Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, 1, e14625. <https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625>
- van der Wielen, P. W. J. J., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B. A. P., & van Knapen, F. (2000). Role of Volatile Fatty Acids in Development of the Cecal Microflora in Broiler Chickens during Growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2536–2540. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2536-2540.2000>
- van Dongen, W. F., White, J., Brandl, H. B., Moodley, Y., Merklings, T., Leclaire, S., Blanchard, P., Danchin, É., Hatch, S. A., & Wagner, R. H. (2013). Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. *BMC Ecology*, 13(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-13-11>
- van Veelen, H. P. J., Falcao Salles, J., & Tieleman, B. I. (2017). Multi-level comparisons of cloacal, skin, feather and nest-associated microbiota suggest considerable influence of horizontal acquisition on the microbiota assembly of sympatric woodlarks and skylarks. *Microbiome*, 5(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0371-6>
- Varsinais-Suomen ELY-keskus. (2020, toukokuuta 27). *Ruissalon lehdot*. Ympäristö.fi. [https://www.ymparisto.fi/fi-FI/Luonto/Suojelualueet/Natura\\_2000\\_alueet/Ruissalon\\_lehdot\(5494\)](https://www.ymparisto.fi/fi-FI/Luonto/Suojelualueet/Natura_2000_alueet/Ruissalon_lehdot(5494))

- Vesterinen, E. J., Puisto, A. I. E., Blomberg, A. S., & Lilley, T. M. (2018). Table for five, please: Dietary partitioning in boreal bats. *Ecology and Evolution*, *8*(22), 10914–10937. <https://doi.org/10.1002/ece3.4559>
- Vesterinen, E. J., Ruokolainen, L., Wahlberg, N., Peña, C., Roslin, T., Laine, V. N., Vasko, V., Sääksjärvi, I. E., Norrdahl, K., & Lilley, T. M. (2016). What you need is what you eat? Prey selection by the bat *Myotis daubentonii*. *Molecular Ecology*, *25*(7), 1581–1594. <https://doi.org/10.1111/mec.13564>
- White, T. C. R. (2011). The significance of unripe seeds and animal tissues in the protein nutrition of herbivores. *Biological Reviews*, *86*(1), 217–224. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00143.x>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T. L., Miller, E., Bache, S. M., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D. P., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, *4*(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wilman, H., Belmaker, J., Simpson, J., de la Rosa, C., Rivadeneira, M. M., & Jetz, W. (2014a). EltonTraits 1.0: Species-level foraging attributes of the world's birds and mammals. *Ecology*, *95*(7), 2027–2027. <https://doi.org/10.1890/13-1917.1>
- Wilman, H., Belmaker, J., Simpson, J., de la Rosa, C., Rivadeneira, M. M., & Jetz, W. (2014b). EltonTraits 1.0: Species-level foraging attributes of the world's birds and mammals. *Ecology*, *95*(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1890/13-1917.1>
- Xiao, K., Fan, Y., Zhang, Z., Shen, X., Li, X., Liang, X., Bi, R., Wu, Y., Zhai, J., Dai, J., Irwin, D. M., Chen, W., & Shen, Y. (2021). Covariation of the Fecal Microbiome with Diet in Nonpasserine Birds. *MSphere*, *6*(3), e00308-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00308-21>
- Zeale, M. R. K., Butlin, R. K., Barker, G. L. A., Lees, D. C., & Jones, G. (2011). Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces: DNA BARCODING. *Molecular Ecology Resources*, *11*(2), 236–244. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02920.x>



## 8. Liitteet

Liite 1. Tutkimuksessa käytetty aineisto. Sarake ”Ravinto” kertoo linnun aikuisiän ravinnon Elton Traits 1.0 -tietokannan mukaan. ”Näytteitä” kertoo analysoitujen näytteiden lukumäärän lajia kohti. ”Lajeja yht” kertoo löydettyjen ravinto- ja bakteerilajien yhteenlasketun määrän. Sekvenssisarakkeet kertovat, miten monta sekvenssiä ravinto- ja bakteerilajeja kohti löydettiin (minimi, maksimi ja keskiarvo). Sarakkeet ”Bakteerit”, ”Zeale” ja ”fwh” kertovat, onnistuiko kukin aluke monistamaan lajin näytteistä DNA:ta.

Laji	Tieteellinen nimi	Heimo	Ravinto	Näytteitä Lajeja yhtikää (min)lää (max)lää (ka)	Sekvenssejä/laji	Sekvenssejä/laji	Sekvenssejä/laji	Bakteerit	Zeale
Kiuru	<i>Alauda arvensis</i>	Alaudidae	Kasvit tai siemenet	1 3 5 5 5	1238	10792	4925	Kyllä	Ei
Puukipijä	<i>Certhia familiaris</i>	Certhiidae	Selkärangattomat	2 63 8 8 8	30	40105	3101	Kyllä	Kyllä
Naaikka	<i>Corvus monedula</i>	Corvidae	Sekasyöjä	3 86 NA NA NA	23	63709	2691	Kyllä	Kyllä
Peippo	<i>Fringilla coelebs</i>	Fringillidae	Selkärangattomat	4 23 7 12 8	6	34310	3594	Kyllä	Kyllä
Punatulkku	<i>Pyrrhula pyrrhula</i>	Fringillidae	Kasvit tai siemenet	1 1 7 7 7	5462	5462	5462	Ei	Kyllä
Hääräpääsky	<i>Hirundo rustica</i>	Hirundinidae	Selkärangattomat	6 27 5 12 8	4	64319	2988	Kyllä	Kyllä
Metsäkirvinen	<i>Anthus trivialis</i>	Motacillidae	Selkärangattomat	1 12 7 7 7	197	18346	2547	Kyllä	Kyllä
Västaräkki	<i>Motacilla alba</i>	Motacillidae	Selkärangattomat	2 38 8 15 15	29	22295	1839	Kyllä	Kyllä
Punarinna	<i>Erithacus rubecula</i>	Muscicapidae	Sekasyöjä	2 20 5 7 6	2	25002	3411	Kyllä	Kyllä
Kirjosteppo	<i>Ficedula hypoleuca</i>	Muscicapidae	Selkärangattomat	7 80 7 9 8	2	104396	3446	Kyllä	Kyllä
Satakieli	<i>Luscinia luscinia</i>	Muscicapidae	Selkärangattomat	1 11 5 5 5	758	59236	8922	Kyllä	Kyllä
Harmaasieppo	<i>Muscicapa striata</i>	Muscicapidae	Selkärangattomat	6 43 4 9 5	7	69287	5315	Kyllä	Kyllä
Kuusitäinen	<i>Parus ater</i>	Paridae	Sekasyöjä	4 39 3 15 10	2	31528	3056	Kyllä	Kyllä
Sintiaainen	<i>Parus caeruleus</i>	Paridae	Sekasyöjä	11 164 7 11 8	7	49433	1656	Kyllä	Kyllä
Talitiaainen	<i>Parus major</i>	Paridae	Sekasyöjä	8 83 2 7 5	2	109274	4451	Kyllä	Kyllä
Pikkuvarpunen	<i>Passer montanus</i>	Passeridae	Kasvit tai siemenet	2 123 7 7 7	25	125395	2461	Kyllä	Kyllä
Käpyrikka	<i>Dendrocopos major</i>	Picidae	Sekasyöjä	2 19 10 14 12	5	2059	277	Ei	Kyllä
Kottarainen	<i>Sturnus vulgaris</i>	Sturnidae	Sekasyöjä	8 148 7 12 9	25	87182	1775	Kyllä	Kyllä
Ruokokerttunen	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	Sylviidae	Selkärangattomat	1 2 12 12 12	72	1571	822	Kyllä	Ei
Sirttijä	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	Sylviidae	Selkärangattomat	4 93 5 15 7	2	51516	1968	Kyllä	Kyllä
Pajulintu	<i>Phylloscopus trochilus</i>	Sylviidae	Selkärangattomat	3 26 3 12 5	59	91025	9379	Kyllä	Ei
Mustapäikkerttu	<i>Sylvia atricapilla</i>	Sylviidae	Sekasyöjä	1 1 4 4 4	7083	7083	7083	Ei	Kyllä
Lehtokerttu	<i>Sylvia borin</i>	Sylviidae	Sekasyöjä	1 7 6 6 6	12	4235	867	Kyllä	Ei
Pensas kerttu	<i>Sylvia communis</i>	Sylviidae	Selkärangattomat	1 25 4 4 4	55	10464	2827	Kyllä	Kyllä
Hemekerttu	<i>Sylvia curruca</i>	Sylviidae	Selkärangattomat	1 1 9 9 9	11	11	11	Ei	Kyllä
Peukaloinen	<i>Troglodytes troglodytes</i>	Troglodytidae	Selkärangattomat	1 50 4 4 4	33	54776	2935	Kyllä	Kyllä
Punakylkirastas	<i>Turdus iliacus</i>	Turdidae	Sekasyöjä	9 136 3 8 6	6	96859	4031	Kyllä	Kyllä
Mustarastas	<i>Turdus merula</i>	Turdidae	Sekasyöjä	13 208 5 12 8	2	57533	1176	Kyllä	Kyllä
Laururastas	<i>Turdus philomelos</i>	Turdidae	Sekasyöjä	6 50 2 6 4	2	66645	3475	Kyllä	Ei
Räkättirastas	<i>Turdus pilaris</i>	Turdidae	Selkärangattomat	9 169 4 10 7	21	63090	1291	Kyllä	Kyllä

Liite 2. Tutkimuksessa löydetty selkärangattomat lintulajin mukaan. 0 = ravintolajia ei löytynyt lintulajin näytteistä, 1 = ravintolaji löytyi lintulajin näytteistä. Lajit: TURPIL = räkättirastas, TURPHI = laulurastas, TURMER = mustarastas, TURILI = punakylkirastas, TROTRO = peukaloinen, SYLCUR = hernekerttu, SYLBOR = lehtokerttu, SYLATR = mustapääkerttu, STUVUL = kottarainen, PYRPYR = punatulkku, PHYSIB = sirittäjä, PASMOM = pikkuvarpunen, PARMAJ = talitiainen, PARCAE = sinitiainen, PARATE = kuusitiainen, MUSSTR = harmaasieppo, MOTALB = västäräkki, LUSLUS = satakieli, HIRBUS = haarapääsky, FRICOE = peippo, FICHYP = kirjosiippo, ERIRUB = punarinta, DENMAJ = käpytikka, CORMON = naakka, CERFAM = puukiipijä, ANTTRI = metsäkirvinen.

Lahko	Heimo	Laji	TURPIL	TURPHI	TURMER	TURILI	TROTRO	SYLCUR	SYLCOM	SYLBOR	SYLATR	STUVUL	PYRPYR	PHYSIB	PASMOM	PARMAJ	PARCAE	PARATE	MUSSTR	MOTALB	LUSLUS	HIRBUS	FRICOE	FICHYP	ERIRUB	DENMAJ	CORMON	CERFAM	ANTTRI
Haplotaxida	Lumbrici dae	Aporrectodea caliginosa	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haplotaxida	Lumbrici dae	Aporrectodea caliginosa L2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Haplotaxida	Lumbrici dae	Aporrectodea trapezoides	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haplotaxida	Lumbrici dae	NA	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haplotaxida	Lumbrici dae	Lumbricus rubellus L2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haplotaxida	Lumbrici dae	Lumbricus terrestris	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haplotaxida	Lumbrici dae	NA	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Araneae	Araneida e	Gibbaranea gibbosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Araneae	Gnaphosida e	Drassodes pubescens	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Araneae	Linyphiida e	Neriene peltata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Araneae	Lycosida e	Pardosa palustris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Araneae	Tetragnathida e	Tetragnatha dearmata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sarcoptiformes	Punctoribatida e	Punctoribatates punctum	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Polydesmida	Polydesmida e	Brachydesmus superus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Coleoptera	Byrrhida e	Cytilus auricomus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Coleoptera	Carabida e	Amara eurynota	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Carabida e	Amara lunicollis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Carabida e	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Carabida e	Blethisa multipunctata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Carabida e	Carabus granulatus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Carabida e	Carabus nemoralis	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Carabida e	Harpalus latus	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Carabida e	Pterostichus melanarius	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Coleoptera	Carabida e	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Cerambycidae	Leptura quadrifasciata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Curculionida e	Barypeithes pellucidus	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Curculionida e	Phyllobius pyri	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Curculionida e	Sciaphilus asperatus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Curculionida e	Strophosoma fulvicorne	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Elaterida e	Actenicerus sjelandicus	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Elaterida e	Selatosomus impressus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Coleoptera	Geotruperida e	Geotrupes stercorosus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Coleoptera	Orsodacnida e	Orsodacne cerasi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Coleoptera	Scarabaeida e	Chilothorax distinctus	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Coleoptera	Silphida e	Aclypea opaca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0







Lepidoptera	Noctuidae	Tiliacea citrago	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
Lepidoptera	Noctuidae	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0			
Lepidoptera	Sesiidae	Synanthedon scoliaeformis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
Lepidoptera	Tortricidae	Tortrix viridana	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
Lepidoptera	Tortricidae	Zeiraphera isertana	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
Lepidoptera	Ypsolophidae	Ypsolopha ustella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Lepidoptera	NA	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0		
Odonata	Corduliidae	Cordulia aenea	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
Odonata	Libellulidae	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
Odonata	Libellulidae	Leucorrhinia rubicunda	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
Trichoptera	Limnephilidae	Glyphotaenius pellucidus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Trichoptera	Limnephilidae	Limnephilus griseus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Trichoptera	Limnephilidae	Rhadicoleptus alpestris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Isopoda	Asellidae	Asellus aquaticus	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Arthropoda	NA	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	

















