

**META-ANALYYSI MUURAHAIHAPON VAIKUTUKSISTA SÄILÖREHUN
KÄYMISLAATUUN**

Laura Blomqvist

Maisterin tutkielma

Kotieläintieteen laitos

Helmikuu 2010

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty		Laitos — Institution — Department	
Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Kotieläintieteen laitos	
Tekijä — Författare — Author			
Laura Blomqvist			
Työn nimi — Arbetets titel — Title			
Meta-analyysi muurahaishapon vaikutuksista säilörehun käymislaatuun			
Oppiaine — Läroämne — Subject			
Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji — Arbetets art — Level		Aika — Datum — Month and year	
Maisterin tutkielma		Helmikuu 2010	
		Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages	
		56 + liitteet	
Tiivistelmä — Referat — Abstract			
<p>Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää muurahaishapon vaikutuksia säilörehun käymislaatuun käyttäen hyödyksi aikaisemmin tehtyjä ja julkaistuja tutkimuksia. Kun aineistoa kerätään monesta eri lähteestä ja analysoidaan käyttäen tilastollisia ohjelmia, kutsutaan tapaa meta-analyysiksi. Jos monesta lähteestä kerätyn aineiston analyysissä ei huomioida kokeen vaikutusta, tulee ennusteista harhaisia. Mixed model proseduurissa otetaan huomioon sekä kiinteät että satunnaiset tekijät ja aineisto analysoidaan käyttäen tehokkaita tietokoneohjelmia. Aineistona käytettiin tieteellisten sarjojen julkaisuja, joita oli 42 sekä Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen (MTT) tutkimusraportteja, joita oli 20. Aineisto jaettiin kolmeen osa-aineistoon. Luokittelevana tekijänä käytettiin raaka-aineen vesiliukoisten hiilihydraattien (sokerit) pitoisuutta tuoreessa kasvimateriaalissa. Ensimmäisessä luokassa (SOK1) säilörehun raaka-aine sisälsi sokeria alle 15 g/kg (tuoreessa materiaalissa), jolloin sen katsotaan olevan vaikeasti säilöttävä. Toisen luokan (SOK2) raaka-aine sisälsi sokeria 15–30 g/kg ja tällöin se on kohtalaisen vaikeasti säilöttävä. Kolmas luokka (SOK3) sisälsi sokeria yli 30 g/kg ja tällöin se on helppo säilöä. Aineisto luokiteltiin lisäksi neljään luokkaan säilöntäaineen perusteella, jotka olivat muurahaishappo, muurahaishappo ja lisäaine, maitohappobakteerit sekä maitohappobakteerit ja lisäaine. Lisäksi mukana oli ilman säilöntäainetta tehty säilörehu eli painorehu. Ensin analysoitiin pelkän muurahaishapon vaikutus säilörehun käymislaatuun verrattuna painorehuun. Tästä aineistosta analysoitiin myös muurahaishapon annostustason vaikutus viiteen käymisparametriin. Lisäksi koko aineistosta analysoitiin kaikkien happopohjaisten ja biologisten säilöntäaineiden vaikutus säilörehun käymislaatuun.</p> <p>Muurahaishapolla käsitellyt rehut olivat laadultaan hyviä jokaisessa sokeriluokassa. Muurahaishapposäilötyisissä rehuissa pH-arvo oli kaikissa sokeriluokissa riittävän pieni, sokeripitoisuus oli kohtalainen ja samoin maitohapon pitoisuus. Lisäksi proteiinien liiallinen hajoaminen oli estynyt, mihin viittaa pienet ammoniumtyypen pitoisuudet kaikissa rehuissa (alle 60 g/kg N). Muurahaishapon annostustaso vaikutti myös selvästi säilöntätuloksiin. Annostustason nostaminen alensi pH:ta muissa paitsi kohtalaisesti sokeria sisältävässä luokassa. Annostustason nosto myös pienensi maito- ja etikkahapon ja ammoniumtyypen pitoisuutta, kun taas jäännössokerin pitoisuus lisääntyi. Maitohappobakteereja sisältävät säilöntäaineet eivät saaneet aikaan laadultaan yhtä hyvää säilörehua kuin happopohjaiset säilöntäaineet, kun raaka-aineen sokeripitoisuus oli pieni. Myös painorehu oli huonoa pH:n ollessa korkea ja etenkin korkeat ammoniumtyypen ja voiannon pitoisuudet viittaavat siihen, että osassa painorehuista oli tapahtunut virheikäymistä. Kun sokeripitoisuus raaka-aineessa oli kohtalainen tai suuri, saivat myös biologiset säilöntäaineet aikaan laadultaan hyvää säilörehua. Tutkimuksessa kävi hyvin ilmi ero happosäilöntäaineella säilötyen, -rajoittuneesti käyneen ja maitohappokäyneen säilörehun välillä. Paljon sokeria sisältävässä raaka-aineessa pH ja jäännössokerin pitoisuus säilörehussa olivat suurempia ja vastaavasti maitohappopitoisuus pienempi muurahaishappoa käytettäessä verrattuna pelkkään maitohappobakteeriin.</p> <p>Tuloksista käy ilmi, että raaka-aineen sokeripitoisuus vaikutti eri säilöntäaineiden säilöntätuloksiin. Sokeripitoisuuden lisäksi ero kuiva-ainepitoisuudessa vaikutti osaltaan sokeriluokkien käymislaatuun. Muurahaishapon positiivinen vaikutus rehun laatuun oli selvin, kun raaka-aineen sokeripitoisuus oli pieni, mutta se sai myös suuremmissa sokeripitoisuuksissa aikaan tasaisen laadukasta säilörehua. Myös muurahaishapon annostustason kasvattaminen vaikutti positiivisesti rehun laatuun.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords			
Muurahaishappo, annostustaso, meta-analyysi, säilörehu, käymislaatu			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited			
Kotieläintieteen laitos, Kotieläinten ravitsemustieteen kirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information			
Tutkimus on tehty Helsingin Yliopiston Kotieläintieteen laitoksella			
Työn ohjaaja: Yliopistolehtori Seija Jaakkola			

SISÄLLYS

1. Johdanto.....	1
1.1 Säilönnän biokemia	1
1.2 Muurahaishapon käytön historiaa	4
1.3 Muurahaishapon vaikutukset säilöntäaineena	6
2. Aineisto ja menetelmät.....	9
2.1 Aineiston kerääminen.....	9
2.2 Aineiston luokittelu	11
2.3 Tilastolliset analyysit.....	12
3. Tulokset.....	15
3.1 Puhtaan muurahaishapon ja painorehun vaikutukset rehun laatuun	15
3.1.1 Raaka-aineen tiedot	15
3.1.2 Säilörehujen käymislaatu	17
3.2 Muurahaishapon annostustason vaikutus	19
3.3 Muurahaishapon ja muiden säilöntäaineiden vaikutukset rehun laatuun	25
3.3.1 Raaka-aineen tiedot	25
3.3.2 Säilörehujen käymislaatu	27
4 Tulosten tarkastelu	33
4.1 Raaka-aine ja säilöntä.....	33
4.1.1 Vesiliukoiset hiilihydraatit.....	34
4.1.2 Kuiva-ainepitoisuus	35
4.2 Säilörehujen käymislaatu.....	36
4.2.1 Happamuus.....	36
4.2.2 Jäännössokerin pitoisuus.....	38
4.2.3 Maitohappopitoisuus	39
4.2.4 Ammoniumtypen pitoisuus	41
4.2.5 Haihtuvat rasvahapot ja etanoli	43
5. Yhteenveto ja johtopäätökset.....	46
Kirjallisuus	48

Liite 1. Lista tutkimuksessa käytetyistä julkaisuista ja tutkimusraporteista.

Liite 2. Taulukko tutkimuksessa mukana olleiden säilörehujen korjuutavoista.

Liite 3. Taulukko tutkimuksessa mukana olleista säilöntäaineista.

Taulukko 1. Tutkimuksessa mukana olleiden kasvilajien havaintomäärät yhteensä sekä luokiteltuina sokeripitoisuuden mukaan.....	10
Taulukko 2. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet sokeriluokassa 1. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on alle 15 g/kg tuoreessa raaka-aineessa.....	15
Taulukko 3. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet sokeriluokassa 2. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on välillä 15–30 g/kg tuoreessa raaka-aineessa.....	16
Taulukko 4. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet sokeriluokassa 3. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on yli 30 g/kg tuoreessa materiaalissa.....	16
Taulukko 5. Muurahaishapon vaikutukset säilörehun laatuun verrattuna painorehuun, kun raaka-aineen sokeripitoisuus on alle 15 g/kg tuoreessa rehussa.....	17
Taulukko 6. Muurahaishapon vaikutus säilörehun laatuun verrattuna painorehuun, kun raaka-aineen sokeripitoisuus on 15–30 g/kg tuoreessa rehussa.....	18
Taulukko 7. Muurahaishapon vaikutus säilörehun laatuun verrattuna painorehuun, kun raaka-aineen sokeripitoisuus on yli 30 g/kg tuoreessa rehussa.....	18
Taulukko 8. Sekamallin mukaisen regressioanalyysin osoittama riippuvuussuhde muurahaishapon annostustason ja säilörehun laatuparametrien välillä.....	20
Taulukko 9. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet sokeriluokassa 1. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on alle 15 g/kg tuoreessa raaka-aineessa.....	26
Taulukko 10. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet sokeriluokassa 2. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on välillä 15–30 g/kg tuoreessa raaka-aineessa.....	26
Taulukko 11. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet sokeriluokassa 3. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on yli 30 g/kg tuoreessa raaka-aineessa.....	27
Taulukko 12. Muurahaishapon ja muiden säilöntäaineiden vaikutukset säilörehun laatuun verrattuna painorehuun, kun raaka-aineen sokeripitoisuus on alle 15 g/kg tuoreessa rehussa.....	28
Taulukko 13. Muurahaishapon ja muiden säilöntäaineiden vaikutukset säilörehun laatuun verrattuna painorehuun, kun raaka-aineen sokeripitoisuus on 15–30 g/kg tuoreessa rehussa.....	29
Taulukko 14. Muurahaishapon ja muiden säilöntäaineiden vaikutukset säilörehun laatuun verrattuna painorehuun, kun raaka-aineen sokeripitoisuus on yli 30 g/kg tuoreessa rehussa.....	30

Kuviot

Kuvio 1. Muurahaishapon annostustason vaikutus pH:hon sokeriluokissa yksi, kaksi ja kolme.....	21
Kuvio 2. Muurahaishapon annostustason vaikutus jäännössokerin pitoisuuteen sokeriluokissa yksi, kaksi ja kolme.....	21
Kuvio 3. Muurahaishapon annostustason vaikutus maitohapon pitoisuuteen sokeriluokissa yksi, kaksi ja kolme.....	22
Kuvio 4. Muurahaishapon annostustason vaikutus etikkahapon pitoisuuteen sokeriluokissa yksi, kaksi ja kolme.....	22
Kuvio 5. Muurahaishapon annostustason vaikutus ammoniumtypen pitoisuuteen sokeriluokissa yksi, kaksi ja kolme.....	23

1. Johdanto

1.1 Säilönnän biokemia

Suomessa nurmialasta valtaosa korjataan säilörehuksi (70 %) ja enää noin 16 % korjataan kuivaksi heinäksi loppualan ollessa tuorehvia, laidunta ja siemenheinää (MMMtike 2008). Nurmen teko säilörehuksi on paras keino maksimoida ja säilöä kasvin ravitsemuksellinen arvo korjuusta ruokintaan märehtijöille (Pahlow ym. 2003). Nurmen korjuumenetelmällä todettiin olevan vaikutusta lehmien syöntikäyttäytymiseen, märehtimisaikaan ja maitotuotokseen verrattaessa säilörehua ja viikkoa myöhemmin korjattua kuivaa heinää (Shingfield ym. 2002). Säilörehun käymislaadulla taas on suuri vaikutus lypsylehmien kuiva-aineen syöntiin, maitotuotokseen sekä imeytyviin ravintoaineisiin (Huhtanen ym. 2003).

Tuoreen kasvin säilöntä perustuu happamuuteen ja hapettomuuteen. Happi tuhoaa tuoretta kasvimateriaalia tehokkaasti yhtymällä kasvin orgaaniseen ainekseen, jolloin kasviaines hapestuu ja samalla lämpenee (Moisio ja Heikonen 1992). Hapettomuus myös estää aerobisten bakteerien kasvua rehussa. Happamuus saavutetaan joko lisäämällä rehuun happoa tai maitohappobakteerien tuottaman maitohapon avulla. Jos happamuutta ei saavuteta riittävän nopeasti, pystyvät muut anaerobit mikrobit, kuten enterobakteerit, klostridit ja hiivat, kilpailemaan ravintoaineista ja tuottamaan rehuun ei-toivottuja aineita kuten etikka- ja voihappoa, ammoniakkia ja etanolia. (McDonald ym. 1991).

Toivottuja mikro-organismeja säilörehussa ovat anaerobeissa oloissa kasvavat maitohappobakteerit, jotka hapattavat ympäristön niin, että muut anaerobit mikrobit eivät enää voi kasvaa (McDonald ym. 1991). Maitohappokannat jaetaan yleensä kahdeksi eri tyyppiä niiden heksosien fermentoinnin perusteella. Homofermentatiivinen käyminen tuottaa lähinnä maitohappoa, kun taas heterofermentatiivisessä käymisessä heksosista muodostuu myös joko etanolia tai etikkahappoa sekä hiilidioksidia (CO₂). Ensin mainittu reitti on tehokkaampi tuottamaan happoa ja se on myös energieettisesti tehokkaampi (Pahlow ym. 2003). Luontaisia maitohappobakteereja esiintyy rehussa vaihteleva määrä. Mo ja Saue (1988) totesivat, että maitohappobakteerien määrä tuoreessa ruohossa voi vaihdella ollen alhaisimmillaan 2×10^2 pesäkeitä muodostava yksikkö (pmy)/g raaka-ainetta ja runsaimmillaan jopa 2×10^5 pmy/g raaka-ainetta.

Myös Petterssonin (1988) tutkimuksessa maitohappobakteerien määrä vaihteli välillä $10 - 10^6$ pmy/ g tuoretta materiaalia. Epifyyttisten bakteerien aikaansaama luontainen fermentaatio voi johtaa myös muiden orgaanisten happojen kuin maitohapon lisääntymiseen fermentaation aikana (Saarisalo ym. 2006).

Enterobakteerit ovat gram-negatiivisia ja fakultatiivisesti anaerobeja bakteereja. Ne kilpailevat maitohappobakteerien kanssa ravinteista ja tuottavat etikkahappoa ja alkoholia rehuun. Enterobakteerit myös tuottavat suuren osan ammoniakista rehuun hajottamalla proteiineja. Klostridit ovat gram-positiivisia obligatiivisesti anaerobeja bakteereja. Klostridit fermentoivat sokeria ja maitohappoa voihapoksi sekä proteiinia ammoniakiksi alentaen näin rehuarvoa ja rehun syöntiä. Klostridia-itiöt ovat myös meijeriteollisuuden kannalta hankalia ja etenkin *C. tyrobutyricum* aiheuttaa maidon mukana tullessaan ongelmia puolikovia ja kovia juustoja tehdessä. Myös *C. botulinum* kuuluu tähän ryhmään, mutta sitä harvoin löytyy säilörehusta. Klostridit ja bacillit tulevat rehuun lähinnä maa-aineksen tai karjanlannan mukana. Molemmilla bakteeriryhmillä on korkea pH optimi, joten etenkin käymisprosessin epäonnistuminen edesauttaa ryhmien nopeaa kasvua (Pahlow ym. 2003.)

Säilörehun käymisen aikana tapahtuu muutoksia hiilihydraateissa, tyellisissä yhdisteissä sekä orgaanisissa hapoissa ja niiden suoloissa. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on oleellinen säilörehun fermentaation kannalta, sillä nämä sokerit toimivat substraatteina mikrobeille ja näin edesauttavat mikrobiaktiivisuutta (Pettersson 1988). Rehun pääasialliset vesiliukoiset hiilihydraatit ovat fruktoosi, glukoosi, sakkaroosi sekä fruktaanit (Woolford 1984). Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus kasveissa vaihtelee paljon (McDonald ym. 1991), ja pitoisuuden vaikuttavat kasvilaji, kasvuaste, sää, typpilannoitus ja kasvutiheys (Woolford 1984). Joissakin trooppisissa kasveissa vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus voi olla vain 25 g/kg kuiva-ainetta (KA), kun taas jossain raiheinälajikkeessa jopa 300 g/kg KA (McDonald ym. 1991).

Wieringa (1961) totesi, että kasvimateriaalin kuiva-ainepitoisuuden ollessa pieni säilörehun stabiilisuus voidaan saavuttaa, jos sokereita on raaka-aineessa vähintään 80 g/kg KA. Palkokasveissa taas vaaditaan vähintään 120 g/kg KA sokereita, sillä puskurointikapasiteetti on suurempi näillä kasveilla (Zelter 1960). Toisaalta, rehun laadun kannalta riittävään substraatin määrään vaikuttaa myös hiilihydraattien hävikki ennen fermentaatiota, kasvin puskurointikapasiteetti, kuiva-ainepitoisuus sekä fermentaation laajuus ja tehokkuus (Pettersson 1988).

Tuoreessa ruohossa 75–90 % tpestä on proteiinin muodossa loppujen ollessa peptidejä, vapaita aminohappoja, amideja, nukleotidejä ja nitraattia (McDonald ym. 1991). Niiton jälkeen alkaa proteolyysi ja esikuivatus etenkin kosteissa olosuhteissa kiihdyttää proteiinin hajoamista (Woolford 1984). Proteolyysi jatkuu myös säilönnän aikana. Esikuivatuksen aikana ja maitohappovaltaisessa käymisessä proteolyysistä on pääasiassa vastuussa kasvientsyymit (Rooke ja Hatfield 2003). Proteolyysin yhtenä vähentävänä tekijänä on happamuus ja sen nopea saavuttaminen (Woolford 1984), kun taas lämpötilan nousu siilossa kiihdyttää kasviproteaasien toimintaa. Lämpötilan nousu estetään siilon nopealla ja tiiviillä täytöllä ja hapen pääsyn estämisellä. Kosteuden väheneminen inhiboi aminohappojen deaminaatiota, sillä tällöin klostridien ja enterobakteerien aktiivisuus alenee. Pääasialliset proteolyysin lopputuotteet säilörehussa ovat aminohapot ja ammoniakki (McDonald ym. 1991).

Orgaaniset hapot ovat pääsyy säilöttävien kasvien puskurointikapasiteettiin, sillä ne toimivat biologisina puskureina estäen happamoitumista säilöttävässä kasvimassassa. Orgaaniset hapot ovat heikkoja happoja ja yleisimmät hapot ovat omena-, sitruuna- ja meripihkahappo (Rooke ja Hatfield 2003). Yleisesti maissin ja raiheinän puskurointikapasiteetti on pieni, kun taas suuren puskurointikapasiteetin omaavia kasveja ovat esimerkiksi sinimailanen ja puna-apila (Woolford 1984).

Säilöntään vaikuttaa myös säilöttävän kasvimateriaalin kuiva-ainepitoisuus. Kuiva-ainepitoisuuden lisääntyminen vähentää puristenesteen muodostumista, helpottaa säilörehun siirtelyä sekä vähentää mikrobien aktiivisuutta säilörehussa. Kun kuiva-ainepitoisuus on 250 g/kg, enää hyvin vähän puristenestettä muodostuu (McDonald ym. 1991). Tuoreena korjatun rehun kuiva-ainepitoisuus voi olla 150–200 g/kg (Gordon 1989, Keady ja Murphy 1996). Esikuivatun rehun kuiva-ainetavoite riippuu säilöntätavasta. Laakasiiloissa ja aumoissa kuiva-ainepitoisuus voi olla välillä 250–350 g/kg, kun taas pyöröpaaleissa rehun tulisi olla kuivempaa, noin 350–450 g/kg (Sipilä 2006).

Esikuivatus vaikuttaa myös käymiseen vähentävästi. Tällöin pH nousee ja vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus lisääntyy, kun taas maito-, etikka- ja voihapon pitoisuudet vähenevät (McDonald ym. 1991). Toisaalta, lisääntynyt kuiva-ainepitoisuus rehussa lisää hiivojen ja homeiden aiheuttamia ongelmia (Buxton ja O'kiely 2003). Säilörehun kriittistä pH-arvoa on vaikea määrittää, sillä siihen vaikuttaa sekä kuiva-ainepitoisuus että lämpötila.

Mitä kosteampaa rehu on, sitä alhaisempi tulee pH:n olla. Tuoreen rehun kuiva-ainepitoisuuden ollessa noin 200 g/kg, on yleisesti hyväksytty, että pH 4,0 riittää säilömään rehun, jos lisäksi siilo on ilmatiivis (McDonald ym. 1991).

1.2 Muurahaishapon käytön historiaa

Säilöntäaineet luokitellaan yleensä käymisen kontrolloinnin perusteella kahteen luokkaan, joko maitohappokäymistä edistäviin tai sitä inhiboiviin. Maitohappokäymistä edistävät lisätyt maitohappobakteerikannat (ympit) sekä rehuun lisätyt erilaiset sokerin lähteet, kuten melassi. Käymistä inhiboivia säilöntäaineita ovat erilaiset hapot sekä muut lisäaineet kuten formaldehydi ja erilaiset suolat. Näiden lisäksi säilöntäaineilla voidaan myös pyrkiä estämään rehun lämpenemistä (McDonald ym. 1991).

Säilöntäaineiden käytön alkuperäisenä tarkoituksena oli varmistaa maitohappovaltainen käyminen, jolloin saatiin hyvin säilynyttä säilörehua. Tähän tarkoitukseen käytettiin laajasti 1900-luvun alkupuolella melassia, joka toimi nopeasti fermentoituvan hiilihydraatin lähteenä. A. I. Virtanen otti erilaisen näkökulman asiaan 1920-luvun lopussa ja suositti rehun happamoittamista mineraalihapoilla pH 3,5:een, jolloin mikrobien sekä kasvientsyymien toiminta estyisi (McDonald ym. 1991).

Ensimmäisen kerran vahvoja happoja käytettiin vuonna 1885 (McDonald ym. 1991), mutta A. I. Virtasen työn tuloksena rehunsäilönnän biokemia ja peruseriaatteet selvisivät 1920-luvulla ja haposäilöntä sai yleisen hyväksynnän maailmalla. Patentin Virtanen sai rehunsäilöntämenetelmälleen vuonna 1933. Menetelmässä rehuun lisätään sopivia happoja tai niiden suoloja tai seoksia niin paljon, että rehumassan pH laskee heti välille 3–4. Nobelin kemian palkinnon Virtanen sai vuonna 1945 (Moisio ja Heikonen 1992). AIV-menetelmässä käytettiin alun perin vahvoja epäorgaanisia- eli mineraalihappoja, kuten suolahappoa ja rikkihappoa ja myöhemmin 1930-luvulla kokeiltiin myös muita happoja, kuten ortofosforihappoa rikkihapon tilalla (McDonald ym. 1991). Vahvojen happojen käyttöön liittyvät käsittely- ja terveysongelmat vähensivät kiinnostusta mineraalihappoon säilöntäaineena ja orgaanisten happojen sekä biologisten säilöntäaineiden käyttöä alettiin tutkia (Woolford 1984).

Muurahaishapon käytön historia säilöntäaineena alkoi vuonna 1926, jolloin Dirks tutki ainetta ja pari vuotta myöhemmin VonKapff tutki muurahaishapon ja suolahapon seosta. Muurahaishappo ei tosin osoittautunut riittävän hyväksi säilöntäaineeksi näissä aikaisissa kokeissa. Ongelmia aiheutti aineen levittäminen ja sen tehottomuus käytettynä silppuamattomaan raaka-aineeseen (McDonald ym. 1991). Käyttömäärä oli myös alkuaikoina liian pieni ja näin ollen se ei suojannut kasviproteiineja yhtä tehokkaasti kuin AIV-happo (Woolford 1984). Muurahaishapon käyttö säilöntäaineena yleistyi vasta, kun korjuumenetelmät kehittyivät ja muurahaishappo saatiin suihkutettua tasaisesti ja heti niiton jälkeen säilöttävään rehuun (McDonald ym. 1991). Hintakehitys mahdollisti muurahaishapon käytön AIV-liuoksessa vasta 1960-luvulla, vaikka Virtanen oli sitä maitohapon ohella aiemmin jo kokeillut (Moisio ja Heikonen 1992).

Muurahaishappoa käytetään monissa nykyisissä säilöntäaineissa joko ainoana ainesosana tai seoksena muiden aineiden kanssa. Yksinään käytettäessä liuoksen vahvuus on 800–850 g/kg (Woolford 1984) ja seoksissa sen pitoisuus voi vaihdella. Kotimaiset säilöntäaineet sisältävät muurahaishappoa 430–800 g/kg. Lisäksi osa muurahaishaposta on suolamuodossa joko ammoniumformiaatin muodossa tai natriumformiaattina (Evira 2009, Kemira 2008). Suomessa muurahaishapon yleinen annostustaso on noin 4 l/tn rehua (=4,8 kg/tn) puhtaana (100%) haponä ilmaistuna.

Myös muurahaishapon käsittelyyn liittyy terveysriskejä sekä korjuukoneiden altistumista korroosiolle. Muurahaishapon osittaista neutralointia on kokeiltu esimerkiksi muurahaishapon suolojen avulla ja kompleksi happosuola ammoniumtetraformiaatti on kehitetty kaupalliseen käyttöön (McDonald ym. 1991). Happosuola muodostuu, kun ammoniakkia lisätään muurahaishappoon (Randby 2000). Suomessa on ammoniumformiaatin käyttöä tutkittu muurahaishapon neutralointiasteen lisäämiseksi (Jaakkola ja Saarisalo 2004). Kotimaisissa muurahaishappopohjaisissa säilöntäaineissa ammoniumformiaattia on lisättyä 40–310 g/kg (Evira 2009).

Happosäilöntäaineiden lisäksi myös biologisten säilöntäaineiden eli lähinnä maitohappobakteerien ja entsyymien käyttö on lisääntynyt ja tutkimusta tehdään paljon. Maitohappobakteerien käyttöön ei liity riskiä käsittelyssä ja myöskään koneet eivät kulu aineen annostelussa. Nämä tekijät yhdessä kaupallisten valmisteiden kehittymisen kanssa ovat lisänneet maitohappobakteerien käyttöä säilöntäaineena (Patterson ym. 1997). Maitohappobakteerisäilönnässä

tavoitteena on saavuttaa nopea homofermentatiivisten bakteerien kasvu. Tällöin enterobakteerien kasvu estyy ja maitohappotuotanto maksimoituu vesiliukoisista hiilihydraateista, jolloin pH laskee nopeasti (Winters ym. 2001). Entsyymien käytön tavoitteena on lisätä sokerin pitoisuutta säilöttävässä raaka-aineessa, joka sitten edesauttaa käymisprosessia, sekä myös tehostaa orgaanisen aineen sulavuutta (McDonald ym. 1991). Myös suomessa on kehitetty ja myynnissä useampia eri maitohappobakteerikantoja ja entsyymejä sisältäviä säilöntäaineita.

1.3 Muurahaishapon vaikutukset säilöntäaineena

Säilörehun laatua voidaan arvioida monella eri tavalla, esimerkiksi visuaalisesti, analysoimalla rehua kemiallisesti, käyttäen lähi-infrapunatekniikkaa (NIRS) tai ruokintakokeiden kautta. Visuaaliset havainnot kuten rehun väri, tuoksu ja homeettomuus eivät ole niin objektiivisia kuin laboratorioanalyysit (Krizsan 2006.) Säilöntäkokeita tehtäessä sekä myös käytännön säilörehun laatua analysoitaessa laatumäärittäisiin kuuluvatkin aina pH:n mittaus, ammoniakkitypen osuus kokonaistypestä, maitohappopitoisuus, haihtuvien rasvahappojen eli etikka-, propioni- ja voihiappopitoisuuden määrittäminen sekä sokeripitoisuus (Rehuanalyysi- säilönnällinen laatu 2009). Säilörehututkimuksissa tutkittavaa säilöntäainetta verrataan ilman säilöntäainetta tehtyyn erään eli painorehuun. Yleisesti ottaen muurahaishappo alentaa säilörehun pH:ta, vähentää maitohapon, etikkahapon, voihiapon sekä ammoniumtypen pitoisuutta, mutta lisää sokereiden sekä etanolin pitoisuutta säilörehussa verrattuna painorehuun (Kung ym. 2003).

Muurahaishapon vaikutuksia säilöntäaineena on tutkittu lukuisissa tieteellisissä tutkimuksissa vuosikymmenien aikana (mm. Wilson ja Wilkins 1973, Jaakkola ym. 1991, Mayne 1993, Jaakkola ym. 2006a ja 2006b) ja aiheesta on kirjoitettu myös kirjoissa (Woolford 1984, McDonald ym. 1991, Moisio ja Heikonen 1992, Buxton ym. 2003). Muurahaishappo on todettu tehokkaaksi säilöntäaineeksi sekä tieteellisissä tutkimuksissa että käytännön olosuhteissa. Biologisten säilöntäaineiden kehittelyssä ja myös muiden säilöntäaineiden tehokkuuden tutkimisessa muurahaishappoa on yleisesti käytetty positiivisen kontrollikäsittelynä (Patterson ym. 1997, Adesogan ja Salawu 2004, Saarisalo ym. 2006, Saarisalo ym. 2007).

Orgaaniset hapot vaikuttavat sekä pH:n alenemisen että antimikrobiaalisten ominaisuuksien kautta rehuun (Woolford 1975). Muurahaishappo kontrolloi fermentaatiota laskemalla rehun pH:ta. Muurahaishappo eli metaanihappo on heikko happo. Kaupallisessa käytössä sillä ei suoran happovaikutuksen avulla pyritä saamaan rehun pH:ta välittömästi alle neljään (McDo-

nald ym. 1991). Muurahaishapon kemiallinen kaava on HCOOH ja sen pK_a -arvo on 3,8, kun vastaavasti maitohapon pK_a on 3,86 (Horton ym. 2006). Muurahaishapon vaikutus pH:n alenemiseen riippuu annostustasosta, säilöttävän raaka-aineen vesipitoisuudesta sekä raaka-aineen puskurointikapasiteetista. Muurahaishappo inhiboi pH:n nopealla alenemisella happamuudelle herkkien epifyyttisten bakteerien (esim. enterobakteerit) kasvua ja edesauttaa näin maitohappobakteerien nopeaa lisääntymistä (Kung ym. 2003). Muurahaishappo myös nopeuttaa kasvien solunesteen vapautumista tunkeutumalla soluseinämän läpi ja edesauttaa näin maitohappovaltaista fermentaatiota, sillä soluneste toimii erinomaisena substraattina mikrobeille (Pettersson 1988).

Muurahaishapolla on myös valikoivia antimikrobiaalisia ominaisuuksia. Suoraketjuisen rasvahapon hiiliketjun pituuden kasvaessa myös mikrobisidiset ominaisuudet lisääntyvät, mutta vastaavasti rasvahapon happamoittava vaikutus hiiliketjun kasvaessa taas alenee (Woolford 1975). Jo vuonna 1941 Craseman liitti muurahaishapon bakterisiidiset vaikutukset hapon aldehydyhmään. Myös Richard (1946) havaitsi, että muurahaishappo inhiboi *C. butyricuimin* kasvua ja itiöiden muodostumista korkeammassa pH:ssa verrattuna suola-, rikki-, fosfori- tai maitohappoon. Nämä vaikutukset perustuvat vetyioniin sekä dissosioitumattoman hapon pitoisuuteen (Kung ym. 2003). Yksi muurahaishapon ominaisuuksista on sen inhiboiva vaikutus proteolyttisiin ja respiratoorisiin entsyymeihin, jolloin rehun liiallinen proteiinien hajoaminen estyy sekä sokereita säästyy, jolloin rehu ei lämpene säilönnän ensimmäisten päivien aikana (Pettersson 1988).

Muurahaishapon vaikutuksia säilöntäaineena on tutkittu monilla eri kasvilajeilla, niin heinäkuin palkokasveilla sekä myös viljoilla. Kun säilörehun raaka-aineena on käytetty raiheinää, on muurahaishapporehussa sokeripitoisuus ollut suurempi verrattuna painorehuun (Gordon 1989, Mayne 1993, Keady ja Murphy 1996) ja maitohapon, etikkahapon ja ammoniumtyypen pitoisuudet ovat olleet pienemmät (Keady ym. 1995, Keady ja Murphy 1996). Myös timoteinurmessa muurahaishapon on todettu rajoittavan käymistä, jolloin sokeripitoisuus rehussa on suuri ja kokonaishappojen sekä ammoniumtyypen pitoisuus rehussa on pieni (Jaakkola ym. 1991). Adesogan ja Salawu (2004) tutkivat eri säilöntäaineiden, muun muassa muurahaishapon, vaikutuksia herne-, vehnä- sekä herne-vehnäseossäilörehuun. Muurahaishappo osoittautui tehokkaimmaksi nopeasti happamoittamaan säilörehu, säilömään vesiliukoisia hiilihydraatteja sekä ylläpitämään aerobista stabiiliutta.

Myös Pursiainen ja Tuori (2008) tutkivat muurahaishapon sekä maitohappobakteerin vaikutuksia säilöittäessä herneen, härkäpavun tai rehuvirnan seoksia vehnän kanssa eri suhteissa. Molemmat säilöntäaineet saivat härkäpavu-vehnäsäilörehussa aikaan hyvää tai melko hyvää säilörehua, mutta painorehun laatu oli huono pH-arvon ja voihappo- sekä ammoniumtyppipitoisuuksien ollessa suuria. Parhaiten rehun proteiineja säilöi tässä tutkimuksessa muurahaishappo. Hernesäilörehussa muurahaishappo myös rajoitti käymistä painorehuun ja maitohappobakteeriin verrattuna, mutta vähemmän kuin muissa palkokasvirehuissa. Rehuvirnan kohdalla ainoastaan muurahaishappo vähensi ammoniakkitypen pitoisuutta alle 80 g/kg KA.

Muurahaishapon vaikutuksia on tutkittu myös eri kuiva-ainepitoisuuksissa. Muurahaishapon on todettu olevan tehokas säilöntäaine kasvimateriaalin ollessa vaikeasti säilöttävää eli kun kuiva-aine- ja sokeripitoisuus ovat pieniä ja typpipitoisuus suuri (Henderson ja McDonald 1971). Jaakkola ym. (1998a) tutkivat kuivatusajan ja säilöntäaineen vaikutuksia pyöröpaalattun timotei-nurminatanurmen säilöntätappioihin ja laatuun. Muurahaishapolla säilötyn rehun laatu oli paras kaikissa kuiva-ainepitoisuuksissa eli pH oli alhainen ja etikkahapon, etanolin ja ammoniumtypen pitoisuudet olivat pieniä. Maitohappobakteerilla säilötyn ja myös painorehun käymislaatu parani kuiva-ainepitoisuuden lisääntyessä.

Myös muurahaishapon eri annostasoja on tutkittu. Henderson ym. (1989) tutkivat suuren annostason vaikutusta raiheinän käymiseen sekä kuiva-aineen syöntiin lehmillä ja lampailla. Suuri annostaso (5 l/tn) säilöi vesiliukoisia hiilihydraatteja erittäin hyvin, esti ammoniumtypen muodostumista ja myös kuiva-aineen syönti lisääntyi verrattuna painorehuun. Jaakkola ym. (2006a) tutkivat timotei-nurminatarehun säilöntäparametreja muurahaishappoannostason ollessa 0, 2, 4 ja 6 l/tn (100 % w/w). Annostason nosto laski pH:ta sekä maitohapon pitoisuutta säilörehussa, kun taas vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus lisääntyi annostason noustessa. Myös proteolyysin määrä väheni annostason kasvun myötä. Yksittäisissä kokeissa muurahaishapon vaikutus verrattuna painorehuun ja maitohappobakteerilla säilöttyyn rehuun, on riippunut hapon annostelusta.

2. Aineisto ja menetelmät

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää muurahaishapon vaikutuksia säilörehun käymislaatuun käyttäen hyödyksi aikaisemmin tehtyjä ja julkaistuja tutkimuksia. Tutkimuksen päätarkoitus oli verrata puhdasta muurahaishappoa painorehuun ja tarkastella muurahaishapon annostustason vaikutusta rehun säilönnälliseen laatuun. Kerätty aineisto hyödynnettiin myös muiden säilöntäainekäsittelyjen osalta ja puhdasta muurahaishappoa verrattiin muurahaishappopohjaisiin säilöntäaineisiin ja erilaisiin biologisiin säilöntäaineisiin. Aineiston luokittelevana tekijänä käytettiin tuoreen kasvimateriaalin vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuutta, sillä sokeripitoisuudella on oleellinen merkitys säilönnän onnistumiseen. Luokitusta käytettiin, koska se vastaa EU:n rehun lisäaineiden hyväksymismenettelyä varten asettamaa luokitusta, jolla rehun lisäaineet (ml. säilöntäaineet) osoitetaan käytöltään toimiviksi ja turvallisiksi (Komission asetus (EY) N:o 429/2008).

2.1 Aineiston kerääminen

Tutkimuksen aineisto kerättiin keväällä 2008 maaliskuussa ja tallennettiin taulukkolaskentaohjelmaan (Microsoft Office Excel). Tutkimuksen aineistona käytettiin tieteellisten sarjojen julkaisuja, joita oli 42 sekä Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen (MTT) tutkimusraportteja, joita oli 20. Yhteensä aineistona oli 62 eri tutkimusta, joista kotimaisia oli 29 ja loput ulkomaisia tutkimuksia. Julkaisut on lueteltu liitteessä 1.

Aineistoon otettiin mukaan julkaisuja ja raportteja vain, jos niistä löytyi seuraavat tiedot.

- 1) Samassa kokeessa oli sekä muurahaishapolla säilötty että ilman säilöntäainetta tehty säilörehu
- 2) Muurahaishappokäsittelynä oli joko puhdas tai melkein puhdas muurahaishappo (sisälsi muuta happoa 20 g/kg)
- 3) Säilötyn rehun raaka-ainetiedot oli ilmoitettu ja niistä löytyi vähintään sokeripitoisuus sekä kuiva-ainepitoisuus
- 4) Tärkeimmät säilörehun fermentaatioparametrit oli ilmoitettu

Aineisto jaoteltiin numeroinnilla kokeiksi ja alakokeiksi. Jokainen koe sai oman juoksevan numeron ja se oli sama jokaisella kyseisen kokeen havainnolla. Alakokeella erotettiin yhden tutkimuksen sisällä tapahtunut raaka-aineen muutos, kuten kasvilajin, kuiva-aineen tai typpi-

pitoisuuden muutos. Yhteensä yksittäisiä säilöntähavaintoja oli tässä aineistossa 451 kappaletta ja kokeita alakokeiksi jaoteltuna 111 kappaletta.

Tutkimuksista kerättiin tiedostoon tärkeimmät säilörehun tekoon liittyvät tiedot. Numeeriset tiedot syötettiin puhtaina lukuina ja muut tiedot saivat koodiksi numeroarvon. Tallennettuja tietoja olivat muun muassa kasvilaji, niittotapa, esikuivausaika, silppuamistapa ja siilotyyppi. Kasvilajit on esitetty taulukossa 1 ja säilörehun tekoon liittyvät tiedot on esitetty liitteessä 2. Tiedostoon tallennettiin myös tiedot kokeessa käytetyistä säilöntäaineista, jotka on esitetty liitteessä 3. Lisäksi tallennettiin säilöntäaineen käyttömäärä sekä raaka-aineen tiedot (kuiva-aine, tuhka, raakavalkuainen, vesiliukoiset hiilihydraatit, neutraalidetergenttikuitu (NDF), liukoinen tyyppi ja orgaanisen aineen sulavuus) sekä säilörehun fermentaatioparametrit (kuiva-aine, pH, vesiliukoisen hiilihydraatit, maitohappo, etikkahappo, propionihappo ja voi-happo, etanoli sekä ammoniakityppi). Säilörehujen korjuuvuodet vaihtelivat välillä 1968 – 2004.

Taulukko 1. Tutkimuksessa mukana olleiden kasvilajien havaintomäärät yhteensä sekä luokiteltuina sokeripitoisuuden mukaan. SOK1- luokassa vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on alle 15 g/kg (tuoreessa materiaalissa), SOK2- luokassa 15–30 g/kg ja SOK3- luokassa yli 30 g/kg.

KASVILAJIT	Yhteensä n	SOK1 n	SOK2 n	SOK3 n
Timotei-nurminata	154	4	46	104
Englanninraiheinä	84	16	34	34
Koiranheinä	34	14	20	
Kokovilja- hernesäilörehut	34	31		3
Sinimailanen	32	6	26	
Timotei	29	8	21	
Timotei-nurminata-puna-apila	24		24	
Englanninraiheinä- nurmikka	22	6	14	2
Timotei-puna-apila	13	5	8	
Timotei-nurminata-raiheinä	8	8		
Italianraiheinä	8		3	5
Englanninraiheinä-valkoapila	5	3		2
Timotei-koiranheinä	4		4	
YHTEENSÄ	451	101	200	150

n= havaintojen lukumäärä

2.2 Aineiston luokittelu

Luokittelevana tekijänä käytettiin raaka-aineen vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuutta tuoreessa kasvimateriaalissa ja aineisto jaoteltiin sen mukaan kolmeen eri luokkaan. Luokkajakoon liittyen vesiliukoisista hiilihydraateista käytetään tästä eteenpäin yksinkertaistamisen vuoksi nimitystä sokerit. Ensimmäinen luokka sisälsi sokeria alle 15 g/kg (tuoreessa materiaalissa), jolloin sen katsotaan olevan vaikeasti säilöttävä. Toisen luokan raaka-aine sisälsi sokeria 15–30 g/kg ja tällöin se on kohtalaisen vaikeasti säilöttävä. Kolmas luokka sisälsi sokeria yli 30 g/kg ja tällöin se on helppo säilöä (Komission asetus (EY) N:o 429/2008).

Lisäksi aineisto luokiteltiin viiteen luokkaan sen mukaan, mitä säilöntäainetta oli käytetty. Painorehuluokassa (PR) ei ollut käytetty mitään säilöntäainetta. Käymistä rajoittavat säilöntäaineet luokiteltiin kahteen eri luokkaan. Ensimmäinen näistä oli muurahaishappoluokka (MH), jossa käytetty säilöntäaine sisälsi joko kokonaan tai 800–900 g/kg liuksesta muurahaishappoa. Näistä neljässä kokeessa säilöntäaine sisälsi lisäksi pieniä määriä (20 g/kg) ortofosforihappoa. Toinen käymistä rajoittava säilöntäaineluokka oli muurahaishapon ja/tai jonkin muun hapon/lisäaineen seos (MH_{seos}). Muurahaishapon lisäaineena oli muun muassa ammoniumformiaattia, propionihappoa, etyylibentsoaattia, bentsoehappoa tai formaliinia. Mukana oli viisi havaintoa, jossa käytettiin jonkin muun hapon seosta.

Käymistä edistävät säilöntäaineet luokiteltiin myös kahteen luokkaan. Ensimmäinen näistä sisälsi pelkästään maitohappobakteeria tai maitohappobakteeriseosta (LAB). Käytetyt maitohappobakteerikannat olivat enimmäkseen *Lactobacillus plantarum*, (homofermentatiivinen) *Lactobacillus rhamnosus* ja *Lactobacillus buchneri* (heterofermentatiivinen). Toinen käymistä edistävien säilöntäaineiden luokka sisälsi biologisia säilöntäaineita ja niiden kanssa käytettyjä muita aineita (Bio_{seos}). Tähän luokkaan kuuluivat esimerkiksi maitohappobakteerit, joiden kanssa oli käytetty entsyymejä tai happoja. Mukana oli myös pelkkiä entsyymikäsittelyjä sekä käsittelyjä, missä entsyymin lisäaineena pieni määrä happoa.

Säilöntäaineluokkiin jaettaessa jäi viidestä käytetystä tutkimuksesta yhteensä 15 havaintoa pois luokitukselta, sillä käytetty säilöntäaine ei vastannut mitään säilöntäaineryhmää. Havainnot ovat mukana raaka-ainetiedoissa, sillä käytetty raaka-aine ei muuttunut kyseisissä tutkimuksissa säilöntäaineen vaihtuessa.

2.3 Tilastolliset analyysit

Tutkimuksen edistyessä on ajoittain tarve koota yhteen aikaisemmin tehtyjen tutkimusten tuloksia. Usein kokoaminen tehdään laadullisesti review – artikkelin tapaan. Nykyään myös yhä useammin tilastollisia menetelmiä pystytään hyödyntämään. Kun aineistoa kerätään monesta eri lähteestä ja analysoidaan käyttäen tilastollisia ohjelmia, kutsutaan tapaa meta-analyysiksi (Glass 1976).

Tutkimusten välillä on usein eroja muun muassa koeasetelmassa sekä mittaus- ja analyysimenetelmissä. Tilastollisesti eri kokeet ovat blokkeja ja niiden vaikutukset pitää olettaa satunnaisiksi. Jos monesta lähteestä kerätyn aineiston analyysissä ei huomioida kokeen vaikutusta, tulee ennusteista harhaisia. Myös havainnoilla kokeen sisällä on enemmän yhteistä kuin havainnoilla kokeiden välillä, joten havaintojen analysointi huomioimatta kokeen vaikutusta esimerkiksi regressiolla johtaa väärin tulkintoihin. Aikaisemmin kokeen vaikutus katsottiin kiinteäksi, mutta tilastotieteen ja tietokoneohjelmien kehittyminen ovat luoneet uusia menetelmiä, joilla voi paremmin analysoida kerättyä tietoa. Sekamallissa (mixed model) otetaan huomioon sekä kiinteät että satunnaiset tekijät ja ne voidaan analysoida käyttäen tehokkaita tietokoneohjelmia (St-Pierre 2001).

Tämän tutkimuksen aineisto analysoitiin sekamallimenetelmällä (Littell ym. 1996) St-Pierren (2001) kuvaamalla tavalla käyttäen SAS:in PROC MIXED-ohjelmaa (SAS Institute inc. versio 9.1). Samaa menetelmää käyttivät meta-analyysissä Kleinschmit ja Kung (2006) tutkiesaan heterofermentatiivisen maitohappobakteerin vaikutuksia säilörehun jälkilämpenemisen estämiseen. Analyysissä ei painotettu riippuvan muuttujan havaintoja. Jokaisessa kolmessa eri sokeriluokassa tutkittiin seuraavia säilörehun laatuparametreja: kuiva-aine, pH, ammoniakki-typpi, vesiliukoiset hiilihydraatit, maitohappo, etikkahappo, propionihappo, voi- ja etanoli.

Tilastollinen malli oli $Y = \text{käsittely} + \text{alakoe (koe)} + \text{jäännösvirhe}$,

jossa Y on säilörehun laatuparametri, käsittely (säilöntäaine) kiinteä tekijä ja alakoe (koe) satunnaistekijä. Tulokset esitetään LS-keskiarvoina ja lisäksi keskiarvon keskivirheet (SEM) on taulukoitu. Käsittelyn neliösumma jaettiin edelleen yhden vapausasteen vertailuihin käyttäen ortogonaalisia kontrasteja.

Aineistosta tehtiin kaksi erillistä tilastollista analyysiä edellä kuvatun mallin mukaan. Ensin analysoitiin muurahaishapon vaikutus säilönnälliseen laatuun painorehuun verrattuna. Aineisto sisälsi ainoastaan painorehun ja puhtaan muurahaishappoluokan (MH). Toinen analyysi sisälsi koko käytössä olevan datan ja kaikki neljä luokiteltua säilöntäaineluokkaa sekä painorehun. Tilastolliset vertailut tehtiin jakamalla säilöntäaineen vaikutus ortogonaalisiin kontrasteihin, joita oli neljä: $K_1 = \text{PR vs. säilöntäaineluokat (MH, MH}_{\text{seos}}, \text{LAB sekä Biol}_{\text{seos}})$, $K_2 = \text{MH ja MH}_{\text{seos}} \text{ vs. LAB ja Biol}_{\text{seos}}$, $K_3 = \text{MH vs. MH}_{\text{seos}}$, $K_4 = \text{LAB vs. Biol}_{\text{seos}}$. Analyyseissa haluttiin selvittää kaikkien säilöntäaineiden vaikutusta verrattuna painorehuun (K_1) sekä vertailla käymistä rajoittavien säilöntäaineiden vaikutusta käymistä edistäviin (K_2). Lisäksi verrattiin puhtaiden valmisteiden vaikutuksia seoksiin (K_3 ja K_4).

Ainoastaan painorehun ja muurahaishappokäsittelyn sisältäneestä aineistosta analysoitiin myös muurahaishapon annostustason vaikutus käymisparametreihin, joita olivat pH, vesiliukoiset hiilihydraatit, maitohappo, etikkahappo sekä ammoniumtyypen pitoisuus. Myös annostustason vaikutus analysoitiin St-Pierren (2001) kuvaamalla tavalla käyttäen SAS:n PROC MIXED- ohjelmaa ja COVTEST analyysiä. Muurahaishapon (MH) annostustason (kg/tn rehua) ja käymisparametrien välistä yhteyttä testattiin lineaarisen, toisen (MH^2) ja kolmannen (MH^3) asteen regressioanalyysin avulla. Mallissa vakio ja kulmakertoimet olivat sekä kiinteinä tekijöinä että satunnaistekijöinä ja koe satunnaistekijänä. Muutamassa tapauksessa mallille ei löytynyt ratkaisua, joten RANDOM määritelmän TYPE =UN muutettiin TYPE = VC muotoon. Malleja vertailtiin RMS-virheen (RMSE, Root Mean Squared Error) ja selitysasteen perustella. Regressiokäyrinä esitetään selitettävän muuttujan (käymisparametri) ennustetun arvon ja selittävän muuttujan (muurahaishappoannos) välinen riippuvuussuhde. Kuvaajat on esitetty käyttäen korjattuja (adjusted) selitettävän muuttujan arvoja.

Säilörehun laatuparametrien jakaumien normalisuus sekä varianssien homogeenisuus tarkastettiin mallin tuottamien residuaalien jakaumasta. Suuri osa parametreista ei ollut normaalisti jakautuneita, joten niiden arvot muutettiin luonnolliseksi logaritmiksi ennen tilastollista analyysiä. Suppeammassa datassa normaalisti jakautuneita olivat kuiva-aine, pH, ammoniakki, maitohappo ja etikkahappo. Logaritminuunnos tehtiin parametreille, jotka eivät olleet normaalisti jakautuneet eli vesiliukoiset hiilihydraatit, propionihappo sekä etanoli. Ei-parametrisellä testillä (Kruskall-Wallis) analysoitiin voi-happo sekä etanolin kolmas sokeri-luokka eli helposti säilöittävä.

Laajemmassa datassa logaritimuunnos tehtiin pH:lle, vesiliukoisille hiilihydraateille, etikkahapolle, propionihapolle ja etanolille. Ammoniakkitypen osalta vain yksi sokeriluokka (sokeria 15–30 g/kg tuoreessa raaka-aineessa) oli normaalisti jakautunut, joten siinä käytettiin alkuperäisiä arvoja analyysiin ja kahdessa muussa sokeriluokassa arvot muunnettiin luonnolliseksi logaritmiksi. Voihapolle käytettiin ei-parametristä testiä (Kruskall-Wallis).

Tulostaulukoissa keskiarvot muunnettiin takaisin luonnollisesta logaritmista, mutta keskiarvon keskivirheitä ei. Kruskall-Wallis -testin tulokset on esitetty keskiarvoina ja SEM:nä. Taulukoissa on esitetty tilastollisen testauksen tarkat p-arvot. Tekstissä tilastolliset merkitsevyydet on esitetty seuraavasti:

$P < 0,05$ = merkitsevä

$P < 0,01$ = hyvin merkitsevä

$P < 0,001$ = erittäin merkitsevä

Raaka-aineista on esitetty taulukoissa koostumustietojen keskiarvon lisäksi keskihajonta, mediaani sekä minimi- ja maksimi-arvot. Raaka-aine- ja tulostaulukoissa havaintojen lukumäärät vaihtelevat tutkittavien laatuparametrien välillä, koska kaikissa julkaisuissa ei esitetty kaikkia tässä tutkimuksessa kerättyjä tietoja.

3.Tulokset

3.1 Puhtaan muurahaishapon ja painorehun vaikutukset rehun laatuun

Aineisto sisälsi raaka-aineet, jotka oli säilötty joko käyttäen puhdasta muurahaishappoa (MH) tai ilman säilöntäainetta (painorehu). Sokeriluokassa 1 (SOK1) oli 54 säilörehua, sokeriluokassa 2 (SOK2) 95 ja sokeriluokassa 3 (SOK3) 48. Aineisto sisälsi sekä tuoreita että esikuivattuja rehuja. Sokeriluokittain raaka-aineen esikuivatusajat olivat keskimäärin 5, 12 ja 12 tuntia ja säilöntäajat keskimäärin 105, 111 ja 127 vuorokautta.

3.1.1 Raaka-aineen tiedot

Taulukoissa 2–4 on esitetty sekä raaka-ainetiedot että säilörehun keskimääräiset koostumukset sokeriluokittain. Taulukot sisältävät sekä muurahaishapolla säilötyt rehut että painorehun. Raaka-aineen kuiva-ainepitoisuuksien keskiarvot olivat lähellä toisiaan SOK1 ja SOK2- luokissa, kun taas SOK3- luokassa raaka-aine oli kuivempaa (297 vs. 207 ja 212 g/kg). Raaka-alkuainepitoisuus oli selvästi suurempi SOK1- luokassa kuin SOK2 ja SOK3- luokissa (192 vs. 158 ja 144 g/kg). Vesiliukoisten hiilihydraattien keskimääräiset pitoisuudet olivat sokeriluokittain 66, 106 ja 152 g/kg KA. Vesiliukoisten hiilihydraattien minimipitoisuus oli SOK1- luokassa (22 g/kg KA) maksimiarvon ollessa 273 g/kg KA (SOK3).

Taulukko 2. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet (g/kg kuiva-ainetta, ellei toisin mainita) sokeriluokassa 1. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on alle 15 g/kg tuoreessa raaka-aineessa.

	n	Keskiarvo	Mediaani	Keski-hajonta	Minimi	Maksimi
RAAKA-AINE						
Kuiva-aine, g/kg	54	207	169	69,8	118	356
Tuhka	46	98,3	79,0	48,32	67,0	285,0
Raakavalkuainen	54	192	185	37,7	127	261
Vesiliuk.hiilihydraatit	54	66	66	24,0	22	120
SÄILÖREHU						
Kuiva-aine, g/kg	50	202	188	53,2	130	318
pH	54	4,32	4,17	0,495	3,63	6,10
Ammonium N, g/kg N	40	91	87	64,3	21	344
Vesiliuk.hiilihydraatit	54	20	15	18,8	1	92
Maitohappo	50	55	50	33,3	3	176
Etikkahappo	54	29,4	22,5	21,79	4,0	92,0
Propionihappo	46	3,4	1,7	4,28	0,0	20,0
Voihappo	36	3,2	0,1	7,15	0,0	28,3
Etanoli	44	10,0	8,7	7,05	1,4	35,0

Taulukko 3. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet (g/kg kuiva-ainetta, ellei toisin mainita) sokeriluokassa 2. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on välillä 15–30 g/kg tuoreessa raaka-aineessa.

	n	Keskiarvo	Mediaani	Keski- hajonta	Minimi	Maksimi
RAAKA-AINE						
Kuiva-aine, g/kg	95	212	199	57,5	134	400
Tuhka	74	93	87	26,0	65	205
Raakavalkuainen	91	158	142	52,9	93	354
Vesiliuk.hiilihydraatit	95	106	100	29,7	55	178
SÄILÖREHU						
Kuiva-aine, g/kg	87	229	222	51,3	138	418
pH	95	4,10	4,00	0,367	3,62	5,53
Ammonium N, g/kg N	95	69	62	38,9	12	209
Vesiliuk.hiilihydraatit	79	27	17	29,6	2	152
Maitohappo	95	67	70	37,9	2	166
Etikkahappo	95	24	19	19,9	1	115
Propionihappo	61	1,2	0,3	2,11	0,0	10,9
Voihappo	83	1,5	0,6	2,56	0,0	14,0
Etanoli	51	10,2	8,1	9,31	0,1	51,0

Taulukko 4. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet (g/kg kuiva-ainetta, ellei toisin mainita) sokeriluokassa 3. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on yli 30 g/kg tuoreessa materiaalissa.

	n	Keskiarvo	Mediaani	Keski- hajonta	Minimi	Maksimi
RAAKA-AINE						
Kuiva-aine, g/kg	48	297	260	106,0	163	526
Tuhka	30	80	82	16,0	47	104
Raakavalkuainen	48	144	140	36,7	98	287
Vesiliuk.hiilihydraatit	48	152	146	44,6	74	273
SÄILÖREHU						
Kuiva-aine, g/kg	44	305	263	107	161	551
pH	48	4,22	4,15	0,439	3,70	5,74
Ammonium N, g/kg N	46	54	50	29,1	14	114
Vesiliuk.hiilihydraatit	42	47	31	45,4	2	161
Maitohappo	48	61	63	31,7	6	154
Etikkahappo	48	19	17	11,8	2,8	57,0
Propionihappo	34	0,9	0,2	1,46	0,0	7,0
Voihappo	48	1,6	0,2	3,56	0,0	21,0
Etanoli	32	11,7	9,2	8,24	2,0	48,0

3.1.2 Säilörehujen käymislaatu

Taulukoissa 5–7 on esitetty tulokset muurahaishapon vaikutuksista säilörehun käymislaatuun verrattuna painorehuun. Havaintojen lukumäärä (n) vaihteli niin muurahaishapporehuissa kuin painorehuissa eri sokeriluokkien välillä. Muurahaishapon käyttö paransi lähes kaikkien testattavien parametrien perusteella säilörehun laatua jokaisessa sokeriluokassa.

Kuiva-ainepitoisuus oli merkitsevästi suurempi muurahaishapporehussa verrattuna painorehuihin kahdessa ensimmäisessä sokeriluokassa ($p < 0,001$), kun taas SOK3- luokassa ero oli suuntaa-antava ($p = 0,059$). Keskimäärin SOK1- luokan säilörehut olivat kosteampia ja kuiva-ainepitoisuus lisääntyi tästä luokkaan kolme mentäessä noin 100 g/kg. Jokaisessa sokeriluokassa oli tilastollisesti merkitseviä eroja myös pH:ssa käsittelyiden välillä. SOK1- luokassa muurahaishappokäsittely laski pH:n huomattavasti alhaisemmaksi verrattuna painorehuun (4,10 vs. 4,59 $p < 0,001$). SOK2- luokassa tulos oli vastaava kuin SOK1- luokassa, mutta eroa pH:ssa ei ollut yhtä paljon (4,02 vs 4,19 $p < 0,01$). Myös SOK3- luokassa muurahaishappo sai aikaan alhaisemman pH:n kuin ilman säilöntäainetta tehty säilörehu (4,15 vs. 4,29 $p < 0,05$).

Taulukko 5. Muurahaishapon vaikutukset säilörehun laatuun (g/kg kuiva-ainetta, ellei toisin mainita) verrattuna painorehuun, kun raaka-aineen sokeripitoisuus on alle 15 g/kg tuoreessa rehussa.

	Painorehu			Muurahaishappo			P-arvo
	Keskiarvo	SEM	n	Keskiarvo	SEM	n	
Kuiva-aine, g/kg	195	11,8	24	211	11,7	30	<0,001
pH	4,59	0,090	24	4,10	0,084	30	<0,001
Ammonium N, g/kg N	130,6	13,14	17	65,2	12,11	23	<0,001
Vesiliukoiset hiilihydraatit	7,8	1,17	24	21,9	1,16	30	<0,001
Maitohappo	55,7	7,39	22	54,6	6,87	28	0,903
Etikkahappo	42,5	3,61	24	18,6	3,49	30	<0,001
Propionihappo	4,19	1,192	19	1,52	1,166	27	<0,001
Voihappo	6,01	2,632	15	1,18	0,561	21	0,162
Etanoli	7,90	1,181	20	8,07	1,170	24	0,916

Taulukko 6. Muurahaishapon vaikutus säilörehun laatuun (g/kg kuiva-ainetta, ellei toisin mainita) verrattuna painorehuun, kun raaka-aineen sokeripitoisuus on 15–30 g/kg tuoreessa rehussa.

	Painorehu			Muurahaishappo			P-arvo
	Keskiarvo	SEM	n	Keskiarvo	SEM	n	
Kuiva-aine, g/kg	218	9,0	40	228	8,9	55	<0,001
pH	4,19	0,058	40	4,02	0,056	55	0,002
Ammonium N, g/kg N	92,6	5,17	40	53,4	5,03	55	<0,001
Vesiliukoiset hiilihydraatit	9,0	1,14	32	27,1	1,12	47	<0,001
Maitohappo	84,2	5,66	40	55,8	5,32	55	<0,001
Etikkahappo	32,9	2,96	40	16,5	2,83	55	<0,001
Propionihappo	1,71	1,125	24	1,14	1,114	37	0,002
Voihappo	1,80	0,520	34	1,32	0,311	49	0,409
Etanoli	8,63	1,243	21	6,82	1,225	30	0,311

Taulukko 7. Muurahaishapon vaikutus säilörehun laatuun (g/kg kuiva-ainetta, ellei toisin mainita) verrattuna painorehuun, kun raaka-aineen sokeripitoisuus on yli 30 g/kg tuoreessa rehussa.

	Painorehu			Muurahaishappo			P-arvo
	Keskiarvo	SEM	n	Keskiarvo	SEM	n	
Kuiva-aine, g/kg	297	22,9	23	301	22,9	25	0,059
pH	4,29	0,093	23	4,15	0,092	25	0,014
Ammonium N, g/kg N	69,5	5,50	22	39,5	5,47	24	<0,001
Vesiliukoiset hiilihydraatit	20,4	1,27	20	36,5	1,27	22	0,004
Maitohappo	76,5	6,00	23	47,7	5,95	25	<0,001
Etikkahappo	22,2	2,42	23	16,5	2,40	25	0,013
Propionihappo	1,46	1,122	16	1,12	1,120	18	0,053
Voihappo	2,33	1,026	23	0,84	0,248	25	0,806
Etanoli	14,44	2,744	15	9,29	1,072	17	0,079

Jäännössokeria oli muurahaishapporehuissa jäljellä huomattavasti enemmän verrattuna painorehuun kaikissa sokeriluokissa. SOK1- luokassa ($p<0,001$) käsittelyjen välinen ero oli 14,1 g/kg KA ja SOK2 ja SOK3- luokissa (vähintään $p<0,01$) vastaavasti 18,1 ja 16,1 g/kg KA. Mitä enemmän raaka-aineessa oli ollut vesiliukoisia hiilihydraatteja, sitä enemmän niitä myös jäi jäljelle säilörehuun, kuitenkin huomattavasti enemmän muurahaishapolla säilöttyyn rehuun kuin painorehuun. Maitohappoa muodostui vähemmän muurahaishapporehussa kuin painorehussa SOK2 ja SOK3- luokissa ($p<0,001$). SOK1- luokassa muodostunut maitohapon pitoisuus oli muurahaishapolla säilötyssä sekä painorehussa lähes sama (55,7 ja 54,6 g/kg KA). pH jäi kuitenkin painorehussa selvästi korkeammaksi SOK1- luokassa, mikä osoittaa, että muodostunut maitohappomäärä ei ollut riittävä tyydyttävän pH:n saavuttamiseksi määrässä rehussa. Ammoniumtyypen pitoisuus oli pienempi kaikissa sokeriluokissa muurahaishapporehussa verrattuna painorehuun ($p<0,001$). SOK1- luokassa muurahaishappokäsitellyssä rehussa oli

huomattavasti vähemmän ammoniumtyyppiä (130,6 vs. 65,2 g/kg N) kuin painorehussa. Myös SOK2 ja SOK3- luokassa ammoniumtyypen pitoisuudessa olivat 39,2 ja 30,0 g/kg N pienemmät muurahaishapporehussa verrattuna painorehuun.

Haihtuvien rasvahappojen eli etikka-, propioni- ja voihiapon pitoisuuksissa oli numeerisia eroja jokaisessa sokeriluokassa muurahaishapporehun ja painorehun välillä, mutta kaikki erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Etikkahappopitoisuus oli pienempi muurahaishapporehussa kuin painorehussa jokaisessa sokeriluokassa (vähintään $p < 0,05$). Myös propionihappopitoisuus oli pienempi muurahaishapporehuissa verrattuna painorehuun SOK1 ja SOK2- luokissa (vähintään $p < 0,01$), mutta ei SOK3- luokassa. Voihiappopitoisuuksissa ei missään kolmesta sokeriluokasta ollut tilastollisesti merkitseviä eroja rehujen välillä, vaikka numeerisesti eroa oli etenkin SOK1- luokassa (erotus 4,83 g/kg KA). Etanolipitoisuuksissa ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja säilörehujen välillä. Muurahaishapporehussa oli pienemmät etanolipitoisuudet SOK2 ja SOK3- luokissa, kun taas SOK1- luokassa painorehussa oli hieman pienempi etanolipitoisuus kuin muurahaishapporehussa.

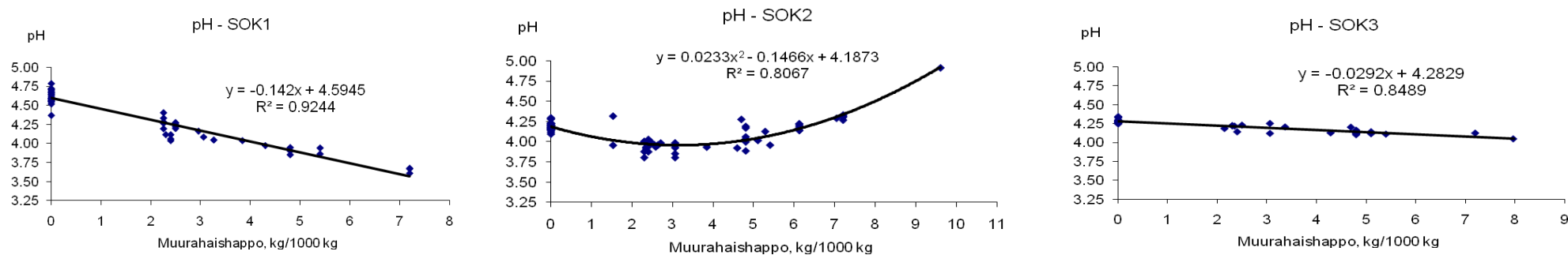
3.2 Muurahaishapon annostustason vaikutus

Suppeammasta aineistosta tehtiin regressioanalyysi viidestä laatuparametrin suhteessa käytetyn muurahaishapon määrään (kg/tn). Muurahaishapon keskimääräiset annostasot olivat 3,5, 4,2 ja 4,3 kg/1000 kg sokeriluokissa 1, 2 ja 3. Annostasot vaihtelivat paljon minimimäärien ollessa 2,3, 1,5, ja 2,1 kg/1000 kg ja suurimmat lisätyt määrät olivat 7,2, 9,6 ja 8,0 kg/1000 kg raaka-ainetta sokeriluokissa 1, 2 ja 3. Joissakin parametreissa lineaarinen malli selitti parhaiten muutoksia (kahdeksan muuttujaa) ja joissakin toisen asteen yhtälö selitti mallia paremmin (kuusi muuttujaa). Yhdessä muuttujassa kolmannen asteen yhtälö kuvasi muutoksia muuttujan pitoisuuksissa parhaiten. Taulukossa 8 on esitetty estimoidut mallit sokeriluokittain jokaisen käymisparametrin kohdalla. Parhaimman mallin mukaan piirretyt regressiokuvaajat sekä matemaattiset yhtälöt on esitetty kuvioissa 1–5.

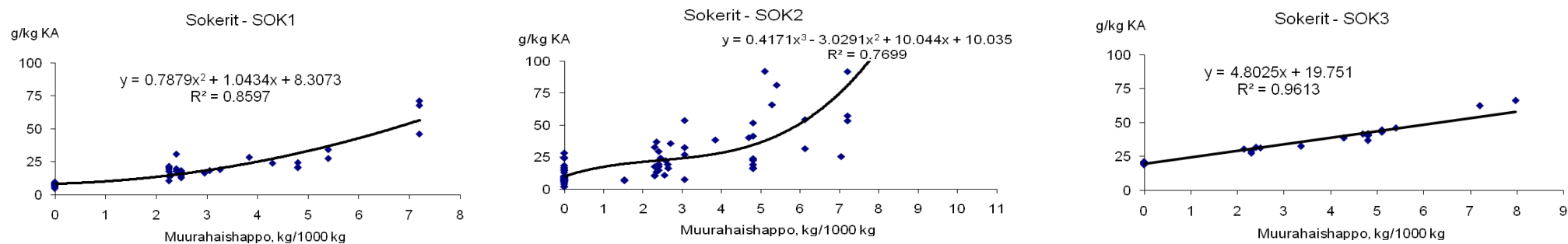
Taulukko 8. Sekamallin mukaisen regressioanalyysin osoittama riippuvuussuhde muurahaishapon (MH) annostustason (selittävä muuttuja, kg/t) ja säilörehun laatuparametrien (selitettävä muuttuja) välillä. Lineaarisen mallin lisäksi on esitetty toisen (MH²) tai kolmannen (MH³) asteen malli, mikäli ne paransivat mallia. Tulokset on esitetty säilörehun raaka-aineen sokeripitoisuuden mukaan luokiteltuna. Sokeriluokka (srk) 1 = alle 15 g/ kg sokeria, 2 = 15 – 30 g/kg, 3 = yli 30 g/kg.

	Srk	N	Leikkauspiste	SE	Lineaarinen			Toisen asteen (+ 3. aste sokeri)			RMSE	R ²	AdjR ²
					Kulma-kerroin	SE	P-arvo	Kulma-kerroin	SE	P-arvo			
pH	1	54	4,59	0,121	-0,142	0,3587	<0,001				0,087	0,9244	0,9229
	2	95	4,15	0,070	-0,023	0,0127	0,085				0,120	0,1825	0,1737
	2	95	4,19	0,073	-0,147	0,0293	<0,001	0,023	0,0047	0,002	0,070	0,8067	0,8025
	3	48	4,28	0,104	-0,029	0,0121	0,025				0,030	0,8489	0,8457
Sokeri (ln-muunnettu) (g/kg KA)	1	50	2,07	0,190	0,280	0,0584	<0,001				0,277	0,8242	0,8208
	1	50	2,05	0,196	0,319	0,0992	0,005	-0,008	0,0120	0,577	0,212	0,8885	0,8841
	2	79	2,20	0,103	0,277	0,0294	<0,001				0,564	0,6051	0,5999
	2	79	3,03	0,237	0,109	0,1335	0,424	0,003	0,0232	0,914	0,462	0,3272	0,3104
	2	79	2,18	0,111	0,364	0,1560	0,027	-0,033	0,0525	0,549			
								0,003	0,0044	0,517	0,544	0,6432	0,6289
	3	48	3,02	0,249	0,148	0,0488	0,007				0,037	0,9903	0,9901
Maitohappo (g/kg KA)	1	50	60,9	8,10	-3,59	1,714	0,051				29,35	0,0669	0,0237
	1	50	54,8	8,72	10,29	6,484	0,131	-2,47	1,0885	0,108	10,52	0,6857	0,6724
	2	95	86,6	6,10	-8,02	1,275	<0,001				9,73	0,8127	0,8107
	3	48	76,5	6,42	-6,82	0,827	<0,001				13,44	0,6045	0,5959
Etikkahappo (g/kg KA)	1	54	39,3	4,54	-4,98	0,719	<0,001				30,51	0,1088	0,0917
	1	54	42,4	4,77	-11,18	1,693	<0,001	1,04	0,1691	0,009	8,37	0,6901	0,6779
	2	95	31,5	3,58	-3,81	0,756	<0,001				6,12	0,7130	0,7099
	3	48	21,6	2,97	-1,09	0,434	0,019				5,26	0,2039	0,1866
Amm. N (g/kg N)	1	40	131,5	17,35	-20,3	3,676	<0,001				36,66	0,6249	0,6150
	1	40	131,4	18,07	-22,7	6,956	0,005	1,25	0,6000	0,128	6,34	0,9709	0,9693
	2	95	89,4	5,81	-8,4	0,747	<0,001				13,55	0,7105	0,7074
	2	95	92,9	5,74	-15,5	2,1602	0,001	1,11	0,3469	0,015	6,15	0,9280	0,9264
	3	46	67,9	5,93	-6,4	0,7389	<0,001				7,56	0,8113	0,8070

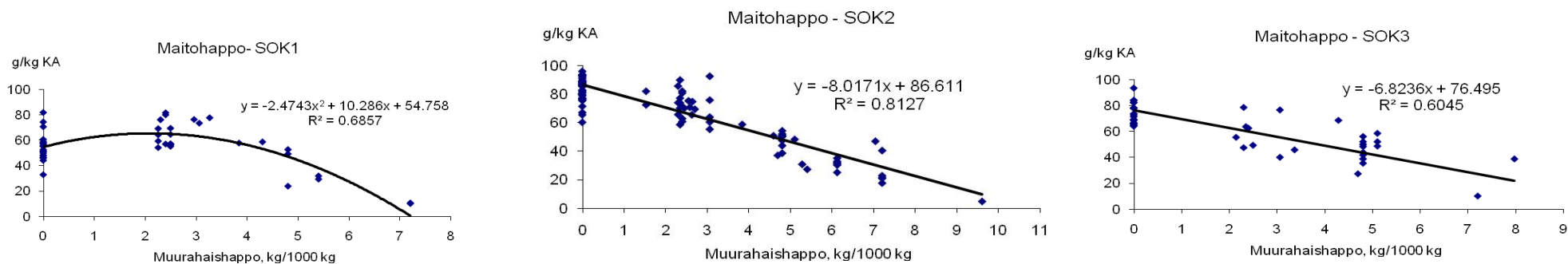
RMSE = keskineliövirheen neliöjuuri, R² = selitysaste, Adj R² = korjattu selitysaste



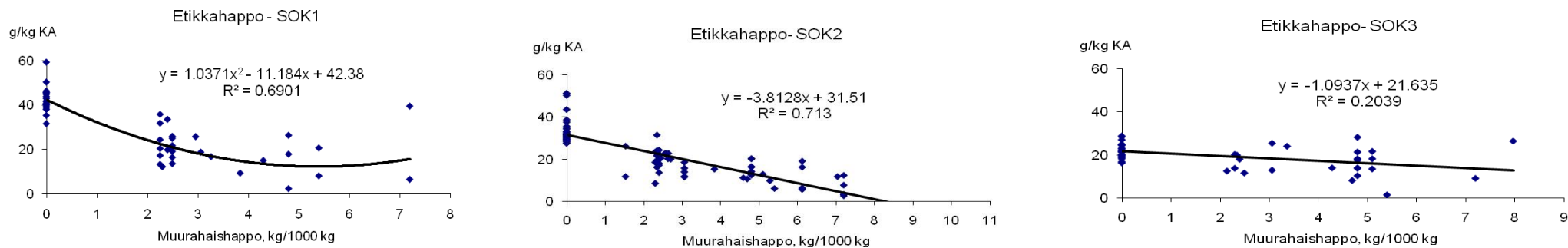
Kuvio 1. Muurahaishapon annostustason vaikutus pH:hon sokeriluokissa yksi, kaksi ja kolme. SOK1- luokassa vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on alle 15 g/kg (tuoreessa materiaalissa), SOK2- luokassa 15–30 g/kg ja SOK3-luokassa yli 30 g/kg.



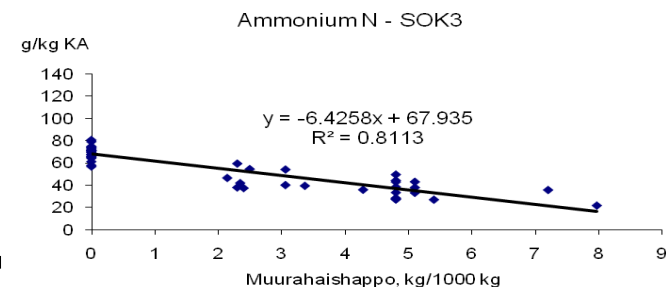
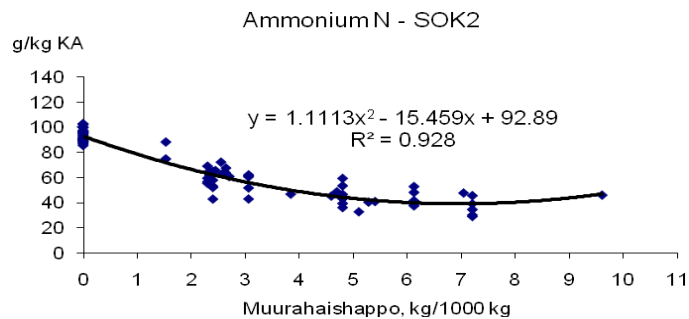
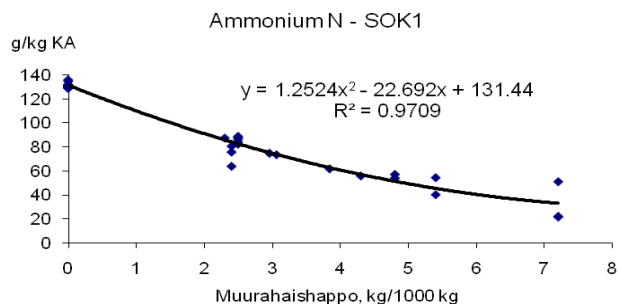
Kuvio 2. Muurahaishapon annostustason vaikutus jäännössokerin pitoisuuteen sokeriluokissa yksi, kaksi ja kolme. SOK1- luokassa vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on alle 15 g/kg (tuoreessa materiaalissa), SOK2- luokassa 15–30 g/kg ja SOK3-luokassa yli 30 g/kg



Kuvio 3. Muurahaishapon annostustason vaikutus maitohapon pitoisuuteen sokeriluokissa yksi, kaksi ja kolme. SOK1- luokassa vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on alle 15 g/kg (tuoreessa materiaalissa), SOK2- luokassa 15–30 g/kg ja SOK3-luokassa yli 30 g/kg



Kuvio 4. Muurahaishapon annostustason vaikutus etikkahapon pitoisuuteen sokeriluokissa yksi, kaksi ja kolme. SOK1- luokassa vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on alle 15 g/kg (tuoreessa materiaalissa), SOK2- luokassa 15–30 g/kg ja SOK3-luokassa yli 30 g/kg



Kuvio 5. Muurahaishapon annostustason vaikutus ammoniumtyypen pitoisuuteen sokeriluokissa yksi, kaksi ja kolme. SOK1- luokassa vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on alle 15 g/kg (tuoreessa materiaalissa), SOK2- luokassa 15–30 g/kg ja SOK3-luokassa yli 30 g/kg

Selitysasteet (R^2) olivat suuret (yli 0,5) kaikissa tutkittavissa parametreissa paitsi etikkahappopitoisuudessa SOK3- luokassa, jossa selitysaste jäi pieneksi (0,20). Muurahaishapon määrä ei tässä sokeriluokassa selittänyt muodostuvan etikkahapon pitoisuutta. Muuten muurahaishapon annostustasolla pystyttiin hyvin selittämään tutkittavia parametreja.

SOK1 ja SOK3- luokissa lineaarinen malli selitti parhaiten muutoksia rehun pH:ssa ($R^2= 0,92$ ja $R^2= 0,85$), kun taas SOK2- luokassa toisen asteen yhtälö kuvasi muutoksia parhaiten ($R^2= 0,81$) (Kuvio 1). SOK1 ja SOK3- luokissa muurahaishapon annostustason lisääminen alensi lineaarisesti pH:ta (kulmakerroin vähintään $p<0,05$), vaikutuksen ollessa suurempi sokeriluokassa yksi (-0,14 /kg muurahaishappoa) verrattuna sokeriluokkaan kolme (-0,03/kg). SOK2- luokassa annostasolla 3–4 kg/tn pH oli alhaisempi verrattuna painorehuun, mutta suuremmilla annostasoilla (6–7 kg/tn) pH alkoi nousta.

Jäännössokerin pitoisuus suhteessa annosteltuun muurahaishappoon on esitetty kuviossa 2. Selitysasteet tässäkin muuttujassa olivat korkeat ($R^2= 0,86, 0,77$ ja $0,96$). Jokaisessa sokeriluokassa parhaiten muutoksia kuvasi eri matemaattinen malli. SOK1- luokassa toisen asteen yhtälö oli paras selittäjä, SOK2- luokassa taas kolmannen asteen yhtälö ja SOK3- luokassa vastaavasti lineaarinen malli kuvasi parhaiten muutoksia pitoisuuksissa. Ensimmäisen asteen kulmakertoimet olivat jokaisessa luokassa merkitseviä (vähintään $p<0,05$), mutta muut eivät olleet. Jokaisessa luokassa säilörehun jäännössokerin pitoisuus kuitenkin lisääntyi muurahaishapon annostustasoa lisättäessä verrattuna painorehuun. SOK2- luokassa havaintoarvoissa oli enemmän hajontaa verrattuna SOK1 ja SOK3- luokkiin.

Maitohappopitoisuutta kuvaavien regressioyhtälöiden selitysasteet (Kuvio 3) olivat pienempiä verrattuna edellisiin muuttujiin ($R^2= 0,69, 0,81$ ja $0,61$,). Lineaarinen malli kuvasi muutoksia pitoisuuksissa parhaiten SOK2 ja SOK3- luokissa, kun taas SOK1- luokassa muutoksia kuvasi parhaiten toisen asteen yhtälö. SOK2 ja SOK3- luokissa muurahaishapon annostason lisääminen kilolla vähensi muodostuneen maitohapon pitoisuutta 8,0 (SOK2) ja 6,8 (SOK3) g/kg KA (kulmakerroin $p<0,001$). Vastaavasti SOK1- luokassa maitohappopitoisuus ensin hieman lisääntyi alhaisemmillä annostasoilla, mutta annostasoa lisättäessä muodostuneen maitohapon pitoisuus väheni.

Etikkahappopitoisuuden selitysasteet (Kuvio 4) jäivät alhaisimmiksi verrattuna muihin muuttujiin ja SOK3- luokassa malli ei selittänyt hyvin muodostuvan etikkahapon pitoisuutta ($R^2=$

0,2). SOK1 ja SOK2- luokissa selitysasteet olivat korkeammat ($R^2 = 0,69$ ja $0,71$). Sokeriluokassa yksi toisen asteen yhtälö selitti muutoksia parhaiten, kun taas sokeriluokassa kaksi lineaarinen yhtälö antoi parhaan selitysasteen. SOK1- luokassa mallin mukaan annostustason lisääminen pääasiassa vähensi etikkahapon pitoisuutta, mutta 5–6 kg/tn jälkeen pitoisuus hie-man lisääntyi (kulmakertoimet $p < 0,01$). SOK2- luokassa yhden muurahaishappoannostuskilon lisääminen säilörehutonna kohden vähensi muodostuvan etikkahapon pitoisuutta 3,8 g/kg KA verran (kulmakerroin $p < 0,001$). Painorehun pitoisuutta kuvaava leikkauspiste oli sitä pienempi mitä enemmän raaka-aineessa oli sokeria.

Ammoniumtypen osalta (kuvio 5) kaikissa sokeriluokissa selitysasteet olivat korkeat ($R^2 = 0,97$, $0,93$ ja $0,81$). Toisen asteen yhtälö kuvasi muutoksia parhaiten SOK1 ja SOK2- luokissa, kun taas SOK3- luokassa lineaarinen malli (kulmakerroin $p < 0,001$) kuvasi parhaiten muutoksia ammoniumtypen pitoisuudessa suhteessa annosteltuun muurahaishapon määrään. Muurahaishapon annostustason lisäys alensi selvästi ammoniumtypen pitoisuutta ja SOK3- luokassa yhden muurahaishappoannostuskilon lisääminen vähensi muodostuvan ammoniumtypen pitoisuutta 6,4 g/kg KA verran. Myös ammoniumtypen osalta painorehun pitoisuutta kuvaava leikkauspiste oli sitä pienempi mitä enemmän raaka-aineessa oli sokeria.

3.3 Muurahaishapon ja muiden säilöntäaineiden vaikutukset rehun laatuun

Koko aineiston SOK1 -luokassa oli raaka-aineiden lukumäärä 101, SOK2 -luokassa 200 ja SOK3 -luokassa 150. Aineisto sisälsi sekä tuoreita että esikuivattuja rehuja kuivatusajan ollessa pisimmillään 72 h koko aineistossa. Sokeriluokittain raaka-aineen esikuivatusajat olivat keskimäärin 5, 12 ja 12 tuntia. Säilöntäajat olivat keskimäärin 104, 111 ja 127 vuorokautta sokeriluokissa yksi, kaksi ja kolme.

3.3.1 Raaka-aine tiedot

Raaka-aineiden sekä säilörehujen tiedot on esitetty sokeriluokittain taulukoissa 9–11. Säilörehun tuloksiin on yhdistetty kaikki analyysissä mukana olleet säilörehut. Raaka-aineen kuiva-ainepitoisuuksissa oli eroja niin sokeriluokkien välillä kuin myös luokkien sisällä. Kuiva-ainepitoisuuden keskiarvo oli suurempi SOK3-luokassa verrattuna SOK1- ja SOK2-luokkiin (320 vs. 231 ja 249 g/kg). Kuiva-ainepitoisuuksien minimi- ja maksimiarvojen erotus oli suurin SOK3 (363 g/kg) ja pienin SOK1-luokassa (238 g/kg). SOK2-luokan minimi- ja maksimiarvojen erotus oli 267 g/kg. Suurin keskimääräinen raakavalkuaispitoisuus oli SOK1-

luokassa, kun taas kahdessa muussa sokeriluokassa keskimääräinen raakavalkuaispitoisuus oli lähellä toisiaan (200 vs. 158 ja 142 g/kg KA). Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuuksien keskiarvot olivat 58, 93 ja 141 g/kg KA sokeriluokissa 1-3. Suurin vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus todettiin ryhmässä 3 (273 g/kg KA) ja pienin ryhmässä 1 (22 g/kg KA).

Taulukko 9. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet (g/kg kuiva-ainetta, ellei toisin mainita) sokeriluokassa 1. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on alle 15 g/kg tuoreessa raaka-aineessa.

	n	Keskiarvo	Mediaani	Keski-hajonta	Minimi	Maksimi
RAAKA-AINE						
Kuiva-aine, g/kg	101	231	226	77,2	118	356
Tuhka	67	92	76	41,9	67	285
Raakavalkuainen	101	200	187	39,3	127	261
Vesiliukoiset hiilihydraatit	101	58	61	22,0	22	120
SÄILÖREHU						
Kuiva-aine, g/kg	89	209	198	58,2	122	320
pH	101	4,34	4,19	0,456	3,63	6,10
Ammonium N, g/kg N	86	92	87	56,2	21	344
Vesiliukoiset hiilihydraatit	98	27	18	29,8	1,0	154
Maitohappo	97	58	55	32,3	2,0	176
Etikkahappo	101	28	19	20,9	3,0	92
Propionihappo	81	3,6	2,2	3,84	0,0	20,0
Voihappo	60	2,8	0,07	6,60	0,0	28,3
Etanoli	72	8,7	7,1	5,94	0,27	35,0

Taulukko 10. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet (g/kg kuiva-ainetta, ellei toisin mainita) sokeriluokassa 2. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on välillä 15–30 g/kg tuoreessa raaka-aineessa.

	n	Keskiarvo	Mediaani	Keski-hajonta	Minimi	Maksimi
RAAKA-AINE						
Kuiva-aine, g/kg	200	249	245	72,4	134	401
Tuhka	125	88	82	22,0	65	205
Raakavalkuainen	196	158	145	43,4	93	354
Vesiliukoiset hiilihydraatit	200	93	94	30,6	45	178
SÄILÖREHU						
Kuiva-aine, g/kg	176	249	234	64,1	134	418
pH	200	4,14	4,04	0,338	3,60	5,53
Ammonium N, g/kg N	200	69	65	35,4	0,0	209
Vesiliukoiset hiilihydraatit	168	36	20	36,4	0,0	156
Maitohappo	200	69	72	34,4	2,0	166
Etikkahappo	200	18	15	15,8	1,0	115
Propionihappo	110	0,99	0,09	2,12	0,0	14,3
Voihappo	133	1,00	0,10	2,13	0,0	14,0
Etanoli	104	9,43	8,20	7,52	0,1	51,0

Taulukko 11. Raaka-aineen ja säilörehun keskimääräiset pitoisuudet (g/kg kuiva-ainetta, ellei toisin mainita) sokeriluokassa 3. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on yli 30 g/kg tuoreessa raaka-aineessa.

	n	Keskiarvo	Mediaani	Keski- hajonta	Minimi	Maksimi
RAAKA-AINE						
Kuiva-aine, g/kg	150	320	315	102	163	526
Tuhka	112	75	74	13,2	47	104
Raakavalkuainen	150	142	139	26,9	98	287
Vesiliukoiset hiilihydraatit	150	141	136	41,2	69	273
SÄILÖREHU						
Kuiva-aine, g/kg	150	319	310	108	161	573
pH	150	4,21	4,09	0,44	3,43	5,82
Ammonium N, g/kg N	148	52	48	30,0	12	117
Vesiliukoiset hiilihydraatit	139	55	41	43,5	1,5	207
Maitohappo	150	68	71	33,0	3,8	168
Etikkahappo	144	14	11	10,5	0,0	57
Propionihappo	110	0,78	0,045	1,72	0,0	13,5
Voihappo	129	0,93	0,17	2,47	0,0	21,0
Etanoli	122	12,3	8,55	13,4	1,1	104

3.3.2 Säilörehujen käymislaatu

Taulukoissa 12–14 on esitetty laajemman analyysin tulokset muurahaishapon ja muiden säilöntäaineiden vaikutuksista säilörehun laatuun verrattuna painorehuun. Havaintojen määrät (n) vaihtelivat eri säilöntäluokkien ja painorehun välillä eri sokeripitoisuusluokissa.

Säilöntäaineen käyttö (K_1) vaikutti jokaisessa sokeriluokassa tilastollisesti merkitsevästi säilörehun laatuparametreihin verrattuna painorehuun. Säilöntäaineen käyttö alensi pH:ta jokaisessa sokeriluokassa (K_1 $p < 0,001$). SOK1-luokassa keskimäärin alhaisimman pH:n sai aikaan MH_{seos} -säilöntäaine (3,89), SOK2-luokassa LAB- säilöntäaine (3,98) ja SOK3- luokassa $Biol_{seos}$ - säilöntäaine (3,89). Kun happopohjaista säilöntäainetta verrattiin biologiseen säilöntäaineeseen (K_2), alensi happopohjainen säilöntäaine pH:ta enemmän SOK1- luokassa ($p < 0,001$), kun taas SOK2 ja SOK3- luokissa biologiset säilöntäaineet alensivat pH:ta ($p < 0,01$ ja $p < 0,001$) enemmän. Muissa säilöntäainevertailuissa (K_3 ja K_4) ei pH:ssa ollut tilastollisesti merkitseviä eroja paitsi SOK3- luokassa (K_4 $p < 0,01$), jossa $Biol_{seos}$ rehujen pH oli alhaisempi kuin LAB- rehujen.

Taulukko 12. Muurahaishapon ja muiden säilöntäaineiden vaikutukset säilörehun laatuun (g/kg kuiva-ainetta ellei toisin mainita) verrattuna painorehuun (ei säilöntäainetta), kun raaka-aineen sokeripitoisuus on alle 15 g/kg tuoreessa rehussa.

	PR			MH			MH+			LAB			Biol+			Kontrastit P-arvo			
	x	SEM	n	x	SEM	n	x	SEM	n	x	SEM	n	x	SEM	n	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄
Kuiva-aine, g/kg	194	11,9	25	209	11,9	30	216	12,9	6	198	12,2	14	208	12,4	11	<0,0001	0,0222	0,2432	0,0444
pH	4,58	0,018	27	4,11	0,018	30	3,89	0,032	6	4,48	0,022	14	4,27	0,022	21	<0,0001	<0,0001	0,0716	0,0530
Ammonium N, g/kg N	119,7	0,11	20	59,8	0,11	23	42,2	0,18	5	94,6	0,12	14	89,2	0,13	21	<0,0001	<0,0001	0,0480	0,6393
Vesiliuk. hiilihydraatit	7,8	0,16	26	23,2	0,16	30	39,7	0,35	5	10,6	0,22	13	24,5	0,21	21	<0,0001	0,0076	0,1395	0,0023
Maitohappo	55,7	6,69	25	54,6	6,71	28	71,2	12,43	6	59,9	8,37	14	69,9	8,49	21	0,1787	0,8087	0,1920	0,3266
Etikkahappo	35,2	0,13	27	15,3	0,13	30	11,7	0,22	6	33,1	0,15	14	20,5	0,16	21	<0,0001	<0,0001	0,1957	0,0047
Propionihappo	3,82	0,160	22	1,57	0,152	27	1,59	0,314	6	4,37	0,201	14	2,38	0,242	11	0,0040	0,0025	0,9787	0,0415
Voihappo	7,24	2,749	16	1,18	0,561	21	0,95	0,340	6	0,58	0,392	10	2,63	1,994	7	*			
Etanoli	7,88	0,153	20	8,12	0,145	24	4,92	0,315	5	6,16	0,189	13	6,21	0,262	7	0,1852	0,9254	0,1378	0,9788

x= keskiarvo, SEM= keskihajonta, n= havaintojen määrä, PR= painorehu, MH= Muurahaishappo, MH+= Muurahaishappo + muita happoja, LAB= Maitohappobakteerillisä, Biol+= Maitohappobakteeri + lisäaineet. Kontrastit: K₁=PR vs MH, MH+, LAB ja Biol+. K₂= MH ja MH+ vs. LAB ja Biol+. K₃= MH vs. MH+. K₄= LAB vs. Biol+. * Voihapon P-arvo 0,2951 (Kruskal-Wallis)

Taulukko 13. Muurahaishapon ja muiden säilöntäaineiden vaikutukset säilörehun laatuun (g/kg kuiva-ainetta ellei toisin mainita) verrattuna painorehuun (ei säilöntäainetta), kun raaka-aineen sokeripitoisuus on 15 - 30 g/kg tuoreessa rehussa.

	PR			MH			MH+			LAB			Biol+			Kontrastit P-arvo			
	x	SEM	n	x	SEM	n	x	SEM	n	x	SEM	n	x	SEM	n	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄
Kuiva-aine, g/kg	229	8,96	47	239	8,96	56	243	9,31	18	236	9,19	33	236	9,65	16	<0,0001	0,1136	0,2518	0,8808
pH	4,23	0,011	51	4,05	0,011	56	4,15	0,014	18	3,98	0,013	33	4,00	0,014	36	<0,0001	0,0068	0,0632	0,7222
Ammonium N, g/kg N	93,5	4,45	51	55,3	4,53	56	57,4	5,65	18	66,5	5,26	33	78,5	5,64	36	<0,0001	<0,0001	0,6526	0,0382
Vesiliuk. hiilihydraatit	9,8	0,13	43	28,8	0,13	48	46,4	0,22	14	17,9	0,19	25	32,1	0,17	36	<0,0001	0,0124	0,0403	0,0197
Maitohappo	79,3	4,56	51	52,9	4,68	56	44,3	6,88	18	92,9	6,08	33	83,8	6,52	36	0,0082	<0,0001	0,2266	0,2653
Etikkahappo	23,9	0,10	51	12,1	0,10	56	9,3	0,13	18	14,3	0,12	33	15,6	0,13	36	<0,0001	0,0005	0,0390	0,5505
Propionihappo	1,55	0,103	29	1,11	0,100	38	1,40	0,153	12	1,35	0,136	21	1,18	0,176	10	0,0398	0,9221	0,1542	0,5216
Voihappo	1,58	0,462	39	1,29	0,306	50	0,22	0,114	13	0,19	0,088	21	0,02	0,013	10	*			
Etanoli	9,20	0,170	26	7,41	0,171	31	4,97	0,216	13	6,26	0,194	25	8,32	0,298	7	0,0253	0,3666	0,0684	0,3673

x= keskiarvo, SEM= keskihajonta, n= havaintojen määrä, PR= painorehu, MH= Muurahaishappo, MH+= Muurahaishappo + muita happoja, LAB= Maitohappobakteerilisiä, Biol+= Maitohappobakteeri + lisäaineet. Kontrastit: K₁=PR vs MH, MH+, LAB ja Biol+. K₂= MH ja MH+ vs. LAB ja Biol+. K₃= MH vs. MH+. K₄= LAB vs. Biol+.* Voihapon P-arvo 0,0047 (Kruskal-Wallis)

Taulukko 14. Muurahaishapon ja muiden säilöntäaineiden vaikutukset säilörehun laatuun (g/kg kuiva-ainetta ellei toisin mainita) verrattuna painorehuun (ei säilöntäainetta), kun raaka-aineen sokeripitoisuus on yli 30 g/kg tuoreessa rehussa.

	PR			MH			MH+			LAB			Biol+			Kontrastit P-arvo			
	x	SEM	n	x	SEM	n	x	SEM	n	x	SEM	n	x	SEM	n	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄
Kuiva-aine, g/kg	301	17,5	38	308	17,6	25	308	17,6	33	307	17,6	34	310	17,9	14	0,0070	0,8840	0,9851	0,5582
pH	4,29	0,017	38	4,17	0,018	25	4,24	0,018	33	4,07	0,018	34	3,89	0,021	14	<0,0001	<0,0001	0,2488	0,0083
Ammonium N, g/kg N	66,5	0,09	37	34,7	0,10	24	46,2	0,10	33	40,4	0,10	34	32,7	0,13	14	<0,0001	0,2014	0,0040	0,0642
Vesiliuk.hiilihydraatit	24,1	0,18	34	41,0	0,19	22	45,7	0,19	32	29,7	0,19	33	29,5	0,23	12	<0,0001	0,0025	0,4825	0,9769
Maitohappo	76,0	5,39	38	47,7	5,88	25	47,4	5,84	33	89,5	5,80	34	100,9	7,03	14	0,1489	<0,0001	0,9653	0,0627
Etikkahappo	15,5	0,11	35	12,1	0,13	25	10,7	0,13	30	10,3	0,12	34	10,4	0,16	14	0,0001	0,4057	0,3790	0,9425
Propionihappo	1,29	0,081	24	1,06	0,093	18	1,16	0,090	26	1,28	0,085	29	1,13	0,144	7	0,1441	0,3861	0,4045	0,3997
Voihappo	2,26	0,797	32	0,76	0,246	25	0,20	0,054	27	0,64	0,183	30	0,35	0,148	9	*			
Etanoli	11,13	0,115	26	7,74	0,135	17	6,65	0,122	29	7,97	0,118	32	6,34	0,163	12	<0,0001	0,9327	0,2898	0,1574

x= keskiarvo, SEM= keskihajonta, n= havaintojen määrä, PR= painorehu, MH= Muurahaishappo, MH+= Muurahaishappo + muita happoja, LAB= Maitohappobakteerilisiä, Biol+= Maitohappobakteeri + lisäaineet. Kontrastit: K₁=PR vs MH, MH+, LAB ja Biol+. K₂= MH ja MH+ vs. LAB ja Biol+. K₃= MH vs. MH+. K₄= LAB vs. Biol+.* Voihapon P-arvo 0,5274 (Kruskal-Wallis)

Jäännössokerin pitoisuus oli suurempi säilöntäaineilla käsitellyissä rehuissa verrattuna painorehuun kaikissa sokeriluokissa (K_1 $p < 0,001$). Jäännössokerin pitoisuus oli painorehussa 8, 10 ja 24 g/kg KA sokeriluokittain, kun numeerisesti eniten vesiliukoisia hiilihydraatteja oli jäljellä kaikissa sokeriluokissa MH_{seos} rehuissa (40, 46 ja 46 g/kg KA). Happopohjaisten ja biologisten säilöntäaineiden välillä (K_2) oli tilastollisesti merkitseviä eroja kaikissa sokeriluokissa (vähintään $p < 0,05$) ja sokeripitoisuus oli selvästi suurempi happopohjaisia säilöntäaineita käytettäessä verrattuna biologisiin säilöntäaineisiin. SOK1- luokassa happopohjaisia säilöntäaineita käytettäessä jäännössokerin pitoisuus oli melkein kaksi kertaa suurempi (31,5 vs. 17,5 g/kg KA) ja SOK2- luokassakin oli eroa pitoisuuksissa (37,6 vs. 25,0 g/kg KA). SOK3- luokassa happorehujen sokeripitoisuus oli 10 g/kg KA suurempi kuin biologisilla valmisteilla tehdyissä rehuissa (43,3 g/kg KA vs. 30 g/kg KA). Happopohjaisten säilöntäaineiden välillä (K_3 $p < 0,05$) oli eroja vain SOK2- luokassa, jossa MH_{seos} rehuissa jäännössokerin pitoisuus oli suurempi. Biologisten säilöntäaineiden välillä eroja oli SOK1 ja SOK2- luokissa (K_4 $p < 0,01$ ja $p < 0,05$), $Biol_{seos}$ rehujen pitoisuuksien ollessa 13,9 ja 14,2 g/kg KA suuremmat kuin LAB rehujen.

Maitohappopitoisuuksissa oli tilastollisesti merkitseviä eroja painorehu- ja säilöntäaineryhmien välillä vain SOK2- luokassa (K_1 $p < 0,01$), johtuen eri säilöntäaineiden erilaisesta vaikutuksesta maitohappokäymiseen. SOK2- luokassa MH ja MH_{seos} rehuissa oli 26,4 ja 35 g/kg KA vähemmän maitohappoa verrattuna painorehuun ja LAB ja $Biol_{seos}$ -rehuissa oli 13,6 ja 4,5 g/kg KA enemmän maitohappoa verrattuna painorehuun. Numeerisesti painorehun ja säilöntäaineella tehtyjen rehujen maitohappopitoisuudet olivat lähempänä toisiaan SOK1 kuin SOK3- luokassa. SOK2 ja SOK3- luokissa biologiset säilöntäaineet lisäsivät maitohappopitoisuutta verrattuna happopohjaisiin säilöntäaineisiin (K_2 $p < 0,001$).

Säilöntäaineen käyttö vähensi ammoniumtypen pitoisuutta kaikissa sokeriluokissa verrattuna painorehuun (K_1 $p < 0,001$). Keskimäärin valkuaisen hajoamista esti parhaiten SOK1-luokassa MH_{seos} -säilöntäaine, SOK2- luokassa puhdas muurahaishappo (MH) ja SOK3- luokassa $Biol_{seos}$ -säilöntäaine. SOK1- ja SOK2-luokissa happopohjainen säilöntäaine esti valkuaisen hajoamista enemmän verrattuna biologisiin säilöntäaineisiin (K_2 $p < 0,001$), kun SOK3- luokassa ei säilöntäaineiden välillä ollut tilastollisesti merkitseviä eroja. Happopohjaisten säilöntäaineiden välillä oli merkitseviä eroja SOK1- ja SOK3-luokissa (K_3 vähintään $p < 0,05$). MH_{seos} -rehuissa ammoniumtypen pitoisuus oli 17,6 g/kg N pienempi verrattuna MH - rehuihin SOK1-luokassa, kun SOK3- luokassa MH - rehuissa oli 11,5 g/kg N vähemmän ammoniumtyppeä

kuin MH_{seos} -rehuissa. Biologisten säilöntäaineiden välillä tilastollisesti merkitseviä eroja oli SOK2- luokassa LAB -säilöntäaineen vähentäessä ammoniumtyypen pitoisuutta 12 g/kg N enemmän verrattuna $Biol_{seos}$ rehuihin ($K_4 p < 0,05$).

Säilöntäaineen käyttö vähensi etikkahapon pitoisuutta suhteessa painorehuun kaikissa sokeriluokissa ($K_1 p < 0,001$). Myös happopohjaisten ja biologisten säilöntäaineiden välillä oli merkitsevä ero SOK1 ja SOK2- luokissa ($K_2 p < 0,001$) etikkahappopitoisuuden ollessa pienempi happolla säilötyissä rehuissa. MH_{seos} vähensi etikkahapon pitoisuutta 2,8 g/kg KA verrattuna MH säilöntäaineeseen SOK2- luokassa ($K_3 p < 0,05$) ja $Biol_{seos}$ vähensi 12,6 g/kg KA verrattuna LAB- säilöntäaineeseen SOK1- luokassa ($K_4 p < 0,01$).

Propionihappopitoisuuksissa oli merkitseviä eroja säilöntäaineella käsiteltyjen ja painorehun välillä SOK1 ja SOK2- luokissa ($K_1 p < 0,01$ ja $p < 0,05$). Säilöntäaineet vähensivät propionihapon pitoisuutta verrattuna painorehuun SOK1 ja SOK2- luokissa lukuun ottamatta LAB säilöntäainetta SOK1- luokassa. Happopohjaisten ja biologisten säilöntäaineiden välillä oli eroja ($K_2 p < 0,05$) vain SOK1- luokassa, jossa happopohjaisilla säilöntäaineilla säilötyn rehun propionihappopitoisuudet olivat pienemmät. SOK1- luokassa $Biol_{seos}$ rehuissa oli 1,99 g/kg KA pienempi propionihappopitoisuus verrattuna LAB rehuihin ($K_4 p < 0,05$).

Voihappopitoisuuksissa vain SOK2- luokassa oli merkitseviä eroja painorehun ja säilöntäainekäsiteltyjen rehujen välillä (Kruskal-Wallis $p < 0,01$), mutta kaikissa sokeriluokissa säilöntäaineen käyttö vähensi voihappopitoisuutta numeerisesti verrattuna painorehuun. Etanolipitoisuus oli suurempi SOK2 ja SOK3- luokkien painorehussa verrattuna säilöntäaineella käsiteltyihin rehuihin ($K_1 p < 0,05$ ja $p < 0,001$). Muissa vertailuissa ei todettu merkitseviä eroja.

4. Tulosten tarkastelu

4.1 Raaka-aine ja säilöntä

Aineiston kasvimateriaali vaihteli paljon riippuen tutkimuksissa käytetyistä kasvilajeista, tehdyn kokeen alkuperämaasta sekä ajankohdasta, milloin rehu oli tehty. Kotimaisissa tutkimuksissa kasvimateriaalina oli timotei, nurminata, koiranheinä ja puna-apila joko seoksina tai puhtaina kasvustoina. Mukana oli sekä ensimmäisen että toisen sadon rehuja. Ulkomaisissa julkaisuissa kasvimateriaalina oli esimerkiksi englannin- tai italianraiheinä, koiranheinä, sinimailanen, kokoviljavehänä ja -herne joko seoskasvustoina tai puhtaina. Kasvilajien erilaiseen säilöttävyyteen vaikuttaa erityisesti kuiva-ainepitoisuus, puskurikapasiteetti ja vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus. Kun kuiva-ainepitoisuus lisääntyy, vähenee puristenesteen muodostuminen sekä mikrobien aktiivisuus säilörehussa (McDonald ym. 1991). Kasvin puskurikapasiteetilla tarkoitetaan sen kykyä vastustaa happamoitumista eli pH:n laskua pH -välillä 6,0–4,0. Puskurikapasiteettiin vaikuttaa kasvin sisältävät orgaaniset hapot. Palkokasvien puskurikapasiteetti on suhteellisen korkea, kun taas maissin matala (Buxton ja O’Kiely 2003). Palkokasvien hankalampaan säilöttävyyteen vaikuttaa myös alhaisempi sokeri- ja kuiva-ainepitoisuus. Heinäkasveista yleisesti raiheinän sokeripitoisuus on suurin ja taas koiranheinin pienin (McDonald ym. 1991)

Osa säilörehuista oli tehty pieniin, laboratoriokokoluokan siiloihin, joihin raaka-ainetta mahtui minimissään 0,065 kg. Mukana oli myös maatilaolosuhteita vastaavia torni-, auma- tai laakasiiloja, joiden vetoisuus oli maksimissaan 200 000 kg rehua. Osa rehusta oli myös tehty paaleihin. Korjuukoneina oli käytetty esimerkiksi niittomurskaimen ja tarkkuussilppurin yhdistelmää, kaksoissilppuria tai paalainta ja käsin niitettynä raaka-aine oli silputtu käyttäen näytesilppuria. Säilöntäaika oli minimissään 55 ja maksimissaan 282 vuorokautta. Keskiarvo oli 115 vuorokautta, jota voidaan pitää riittävänä osoittamaan säilöntäaineen teho. Säilörehun fermentaatiovaihe kestää nopeimmillaan noin viikon, mutta voi kestää myös yli kuukauden riippuen kasvin ominaisuuksista ja säilöntäolosuhteista (Pahlow ym. 2003). Petterssonin (1988) mukaan sokereiden fermentoituminen maitohapoksi voi tapahtua neljän päivän sisällä, jota seuraa pH:n nopea lasku. Tämä vähentää riskiä klostridien ja muiden kilpailevien mikrobien kasvuun sekä ehkäisee proteolyttisten entsyymien kasvua. Fermentaatiovaiheen merkeinä ovat fermentaatiossa syntyvät kaasut sekä puristenesteen muodostuminen.

Fermentaatiovaiheen jälkeen siirrytään vaiheeseen, jolloin hyvin vähän enää tapahtuu. Tällöin puhutaan säilörehun stabiilista vaiheesta. Tämä edellyttää, että siilo on tiivis ja ilman pääsy on estetty (Pahlow ym. 2003).

4.1.1 Vesiliukoiset hiilihydraatit

Luokittelevana tekijänä käytettiin vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuutta tuoreessa materiaalissa, joka tässä aineistoissa vaihteli paljon. Sokereita oli minimissään raaka-aineessa 22 g/kg KA ja maksimissaan 273 g/kg KA. Myös kotimaisissa tutkimuksissa ja julkaisuissa raaka-aineen sokeripitoisuus vaihteli, mutta vähemmän kuin koko aineistoon. Sokerin minimipitoisuus kotimaisissa julkaisuissa oli 65 g/kg KA ja maksimipitoisuus 158 /kg KA. Pienen sokeripitoisuuden luokassa keskimääräinen sokeripitoisuus kotimaisissa julkaisuissa oli 67 g/kg KA, kohtalaisesti sokeria sisältävän luokan 91 g/kg KA ja sokeripitoisuudeltaan suuren luokan 123 g/kg KA.

Sokeriluokkaan, jossa oli vähiten sokeria, sijoittui kasvilajeista lukumääräisesti eniten kokoviljavehna-hernesäilörehuseosta ja toiseksi eniten englanninraiheinää. Kahdessa muussa sokeriluokassa oli eniten timotei-nurminataa ja sekä englanninraiheinää. Englanninraiheinän sijoittuminen jokaiseen sokeriluokkaan osoittaa, että sokeripitoisuus voi vaihdella paljon myös kasvilajin sisällä. Kasvilajien sijoittuminen sokeriluokkiin vastaa hyvin tietoa siitä, että etenkin palko- ja viljakasvit sisältävät vähän vesiliukoisia hiilihydraatteja, kun taas raiheinässä niiden pitoisuus voi olla hyvinkin suuri (McDonald ym. 1991, Davies ym. 1998, Adesogan ja Salawu 2004). Mitä vähemmän kasvi sisältää vesiliukoisia hiilihydraatteja, sitä vaikeammin sen katsotaan olevan säilöttävissä. Vaikeasti säilöttävään luokkaan EU:n Komission asetuksen N:o 429/2008 mukaan kuuluvat kasvit, joissa liukoisten hiilihydraattien pitoisuus on alle 15 g/kg tuoreesta kasvimateriaalista ilmaistuna. Näistä kasveista on asetuksessa mainittu muun muassa koiranheinä ja palkokasvit. Kohtalaisen vaikeasti säilöttäviä kasveja ovat ne, joissa liukoisten hiilihydraattien pitoisuus on 15–30 g/kg, muun muassa niittynurmikka, nata tai sinimailanen. Helpposti säilöttäviä ovat ne, joissa vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus on yli 30 g/kg, esimerkiksi maissi, raiheinä tai sokerijuurikasleike. Petterssonin ja Lindgrenin (1988) tutkimuksessa tuoreena korjatussa, ilman säilöntäainetta tehdyssä säilörehussa tuli olla sokereita vähintään 25 g/kg tuoretta materiaalia, jotta säilörehun laadusta tuli hyväksyttävä.

Henderson (1973) analysoi 373 heinäkasvinäytettä Skotlannissa ja totesi italian raiheinän keskimääräiseksi vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuudeksi 181 g/kg KA, timotein 110 g/kg KA, nurminadan 96 g/kg KA ja koiranheinän 79 g/kg KA. Myös Petterson (1988) havaitsi suurta vaihtelua heinäkasvien sokeripitoisuudessa, mutta valtaosa heinäkasveista sisälsi sokeita välillä 70–150 g/kg KA. Apilan sokeripitoisuudet vaihtelivat 50–80 g/kg KA välillä ja sinimailasen 30–50 g/kg KA. Sokeripitoisuutta tutkivat myös Wilkinson ja Phipps (1979) kokeessa, jossa maissi korjattiin kolmena eri ajankohtana Englannissa elo-, syys-, ja loka-kuussa. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus vaihteli suuresti korjuuajankohdan mukaan sen ollessa 307, 136 ja 80,1 g/kg KA. Sokeripitoisuuteen vaikuttavat kasvilajin ja korjuuajankohdan lisäksi myös vuorokaudenaika niin, että iltapäivällä pitoisuudet ovat korkeammat. Muita vaikuttavia tekijöitä ovat myös kasvilajike, valointensiteetti sekä lannoitustaso. Typpi-lannoituksen lisääminen esimerkiksi vähentää vesiliukoisten hiilihydraattien, etenkin fruktaanien, pitoisuutta heinäkasveissa (McDonald ym. 1991). Myös nyt analysoidussa aineistossa raakavalkuaispitoisuus oli suurin luokassa, jossa sokeripitoisuus oli pienin.

4.1.2 Kuiva-ainepitoisuus

Aineiston säilörehu oli tehty joko esikuivattuna tai tuoreena. Esikuivattuna oli tehty suurin osa eli noin 70 % havainnoista. Aineiston jako raaka-aineen sokeripitoisuuden perusteella aiheutti myös selviä eroja tutkittujen luokkien kuiva-ainepitoisuuteen. Esikuivatus on tehokas tapa lisätä raaka-aineen sokeripitoisuutta tuoremassassa. Molemmissa analyyseissä näkyy hyvin se, että mitä suurempi oli raaka-aineen sokeripitoisuus, sitä suurempi oli myös kuiva-ainepitoisuus. Pienen sokeripitoisuuden rehussa kuiva-ainepitoisuus oli 100 g/kg pienempi verrattuna korkean sokeripitoisuuden rehuun. Kuiva-ainepitoisuuden lisääntyminen vähentää käymistä, jolloin pH ja vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus lisääntyy, kun taas maito-, etikka- ja voihappopitoisuudet vähenevät (Pettersson 1988, McDonald ym 1991). Kasvin kuiva-ainepitoisuus vaikuttaa myös mikrobien toimintakykyyn heikentävästi (Pettersson 1988). Kuiva-ainepitoisuus tai tarkemmin vesiaktiivisuus (a_w) vaikuttaa mikrobien kasvukykyyn sekä myös minimi pH:n, missä kyseiset mikrobit voivat kasvaa. Käymiseen vaikuttavista bakteereista maitohappobakteerit kestävät parhaiten alhaisempaa vesiaktiivisuutta, kun taas clostridit eivät (Muck ym. 2003). Myös Pettersson (1988) havaitsi, että maitohappobakteerit kestävät alhaisempaa a_w :ta, joten esikuivatus ei viivästyttänyt niiden kasvua.

Muurahaishapposäilötyissä rehuissa oli suurempi kuiva-ainepitoisuus verrattuna painorehuun, kun sokeria oli vähän tai keskinäisesti. Vanhatalon ym. (1992) tutkimuksessa muurahaishapposäilötyn (MH 850 g/kg) rehun kuiva-ainepitoisuus oli suurempi verrattuna painorehuun, entsyymikäsiteltyyn tai happoseokseen (MH 250 g/kg) johtuen todennäköisesti suuremmasta puristenesteen muodostumisesta. Toisaalta, Jaakkolan ym. (2006a) tutkimuksessa ei havaittu eroa puristenesteen muodostumisessa muurahaishapposäilötyn ja painorehun välillä. Nyt tehdyssä tutkimuksessa etenkin säilörehun jäännössokerin pitoisuus lisääntyi ja etikka- ja voi-happopitoisuudet vähentyivät siirryttäessä asteittain kuivempaan rehuun. Huhtasen ym. (2007) tutkimuksessa lisääntynyt säilörehun kuiva-ainepitoisuus lisäsi säilörehun syöntiä ja syöntihuipun katsottiin olevan kuiva-aineessa 419 g/kg.

4.2 Säilörehujen käymislaatu

4.2.1 Happamuus

Muurahaishapolla käsitellyssä rehussa pH oli alhaisempi verrattuna painorehuun, kun raaka-aineessa oli vähän sokeria. Sama on todettu myös aikaisemmin (Mayne 1990, Moloney ja O'Kiely 1994, Jaakkola 2006a). Muurahaishappo laskee säilörehun pH:n alemmaksi myös silloin, kun raaka-aineessa sisälsi kohtalaisesti tai paljon sokeria, kuten myös Wilsonin ja Wilkinsin (1973), Jaakkolan ym. (1991) sekä Smithin ym. (1993) tutkimuksissa. Painorehun pH oli erityisen korkea raaka-aineen sokeripitoisuuden ollessa pieni. Muurahaishapon annostason lisääminen laskee rehun pH:ta, kun raaka-aineessa oli vähän tai paljon sokeria. Kun rehun raaka-aineessa oli kohtalaisesti sokereita, vaikutti muurahaishapon annostaso aina kolmeen litraan asti rehun pH:n alentavasti, mutta tästä annostusta lisättäessä pH alkoi nousta. Samanlaisen vaikutuksen havaitsi myös Jaakkola ym. (2006b), joiden tutkimuksessa muurahaishapon annostuksen lisääminen kahdesta litrasta kuuteen litraan nosti pH:ta. Suurimman annostason (6 l/tn) rehussa pH oli lähes sama kuin painorehussa, kun raaka-aineen sokeripitoisuus oli noin 129 g/kg KA. Vastaavasti Shingfieldin ym. (2002) tutkimuksessa muurahaishapon annostustason ollessa 8,3 l/tn, laskee pH muurahaishapolla säilöittäessä alemmaksi verrattuna painorehuun, kun raaka-aineen sokeripitoisuus oli noin 130 g/kg KA. Jaakkolan ym. (2006b) mukaan pH:n käyräviivainen muutos osoittaa, että rehun pH voi joko nousta tai laskea muurahaishappoa lisättäessä riippuen annostasosta, rehun kuiva-ainepitoisuudesta sekä muista ominaisuuksista.

Muurahaishappo vaikuttaa rehuun sekä suoraan happamoittavasti että mikrobisidisesti, joten muurahaishapon vaikutus hyödyllisten maitohappobakteerien ja haitallisten bakteerien suhteeseen voi muuttaa fermentaation kulkua ja käymishappojen pitoisuutta monellakin tavalla suhteessa painorehuun.

Koko aineistossa vain happopohjaiset säilöntäaineet laskivat pH:n alle laatuvaatimusrajan, kun raaka-aineen sokeripitoisuus oli pieni ja kuiva-ainepitoisuus keskimäärin 200 g/kg. Säilörehun laatuvaatimukset asettavat pH-rajaksi 4,20 kuiva-ainepitoisuuden ollessa alle 275 g/kg. pH voi olla hieman korkeampi, jos säilöntäaineena on käytetty formaldehydiä tai vastaavaa käymistä estävää ainetta tai jos sokeripitoisuus on yli 7,0 g/kg (Säilörehun käymislaatu 2009). Kun sokeripitoisuus oli kohtalainen ja kuiva-ainepitoisuus 240 g/kg alensivat käytetyt säilöntäaineet pH:n alle 4,2:n, kun taas painorehun pH jäi hieman korkeammaksi. Eniten sokeria ja kuiva-ainetta sisältäneiden rehujen pH oli alle 4,3 säilöntäainekäsitellyissä rehuissa sekä painorehussa. Tässä sokeriluokassa keskimääräinen kuiva-ainepitoisuus oli jo 300 g/kg ja kuiva-ainepitoisuuden kasvaessa myös sallittu pH lisääntyy niin, että kyseisessä kuiva-ainepitoisuudessa se on 4,3. Kuiva-ainepitoisuuden ollessa yli 450 g/kg pH vaatimuksia ei enää ole (Säilörehun käymislaatu 2009).

Happopohjaiset säilöntäaineet laskivat pH:n alemmaksi verrattuna biologisiin säilöntäaineisiin, kun raaka-aine sisälsi vain vähän sokeria. Suuremmissa sokeripitoisuuksissa vastaavasti biologiset säilöntäaineet laskivat pH:n alemmaksi. Samansuuntaisia vaikutuksia havaitsivat myös Saarisalo ym. (2002) sekä Davies ym. (1998), joiden tutkimuksessa muurahaishapporehussa pH laski alemmaksi kuin ymppirehussa tai painorehussa sokeripitoisuuden ollessa pieni. Kun sokeripitoisuutta lisättiin, laski maitohappobakteeri pH:n alemmaksi kuin muurahaishappo ja säilöntä ilman säilöntäainetta.

Davies ym. (2005) havaitsivat myös, että säilöittäessä märkää raiheinää (200 g/kg) homo- ja heterofermentatiivisella maitohappobakteerilla (10^5 pmy/g), jäi pH korkeammaksi verrattuna painorehuun. Sen sijaan puhdasta homofermentatiivista maitohappobakteeria (10^6 pmy/g) käytettäessä laski pH alemmaksi painorehuun verrattuna. Myös kuivemmissa rehuissa viimeksi mainittu sai aikaan laadullisesti parhaita säilörehua. Kun säilöittävä kasvimateriaali sisältää liian vähän sokereita, lisätty maitohappobakteerikanta ei pysty tuottamaan riittävästi maitohappoa, jotta rehun pH laskisi vaadittavalle tasolle. Tämä koskee etenkin kasveja, joissa on pieni sokeripitoisuus ja suuri puskurikapasiteetti (Seale ym. 1986).

4.2.2 Jäännössokerin pitoisuus

Muurahaishapolla säilötyssä rehussa oli jäännössokerin pitoisuus suurempi verrattuna painorehuun. Tämä on todettu useissa tutkimuksissa säilöittäessä sokeripitoisuudeltaan vaihtelevia kasvimateriaaleja (Wilson ja Wilkins 1973, Smith 1993, Keady ym. 1995, Adesogan ja Salawu 2004). Myös muurahaishapon annostusmäärän lisäämisellä oli jäännössokerin pitoisuutta lisäävä vaikutus. Tämä todettiin esimerkiksi Jaakkolan ym. (2006a, 2006b) tutkimuksissa nostamalla muurahaishapon annostasoa asteittain aina kuuteen litraan saakka. Myös Shingfieldin ym. (2002) tutkimuksessa korkea annostustaso (8,3 l) säästi sokereita enemmän verrattuna painorehuun. Nyt analysoidussa aineistossa raaka-aineen sokeripitoisuuden ollessa pieni tai suuri kasvoi säilörehun jäännössokerin pitoisuus annostusta lisättäessä, mutta sokeripitoisuuden ollessa raaka-aineessa kohtalainen, hapon annostason nosto sai aikaan käyräviivaisen muutoksen rehussa ja hajonta oli myös suurempaa.

Myös koko aineistossa säilöntäaineella käsitellyissä säilörehuissa jäännössokerin pitoisuus oli suurempi verrattuna painorehuun riippumatta raaka-aineen sokeripitoisuudesta. Tosin vaikeasti säilöittävässä kasvimateriaalissa maitohappobakteeriluokassa jäännössokerin pitoisuus oli vain hieman suurempi verrattuna painorehuun. Yleisesti ottaen hyvin säilyneessä tuoreena korjatussa rehussa, jossa maitohappobakteerit ovat fermentoineet sokereita maitohapoksi, on loppuvaiheessa enää vähän sokereita jäljellä, yleensä alle 20 g/kg KA. Tällöin maitohappopitoisuus rehussa on välillä 80–120 g/kg KA (McDonald ym. 1991). Muurahaishappopohjaiset säilöntäaineet säästivät sokereita keskimäärin paremmin verrattuna biologisiin säilöntäaineisiin. Tämä johtuu siitä, että muurahaishappokäsittely alentaa fermentaatiotuotteiden pitoisuutta, etenkin maitohapon pitoisuutta ja näin ollen sokereita on yleensä enemmän jäljellä (McDonald ym. 1991). Suuri sokeripitoisuus rehuissa osoittaa myös sen, että käymispotentiaalia on vielä jäljellä (Jaakkola ym. 1998b).

Muurahaishapon seoksia käytettäessä rehun jäännössokerin pitoisuus oli kohtalaisesti sokeria sisältävässä raaka-aineessa suurempi verrattuna puhtaan muurahaishapon käyttöön. Tulos oli epälooginen ja saattaa liittyä seosluokan pieneen havaintomäärään, sillä ero käymistuotteissa ei vastannut eroa sokeripitoisuudessa. Seoksissa oli mukana myös muita happoja sekä ammoniumformiaattia. Kun ammonikkia lisätään muurahaishapon sekaan, syntyy eri määriä ammoniumformiaattia. Tällöin vastaavasti vapaan muurahaishapon määrä vähenee ja samalla välitön happamoittava vaikutus (Jaakkola ja Saarisalo 2004). Jaakkolan ym. (1998b) tuloksis-

sa puna-apila-timoteisäilörehun jäännössokerin pitoisuus oli hieman suurempi, kun säilöntäaine sisälsi muurahaishapon lisäksi ammoniumformiaattia, propionihappoa sekä etyylibentsoaattia verrattuna pelkkään muurahaishappoon. Vanhatalon ym. (1992) tutkimuksessa muurahaishapolla, joka sisälsi pieniä määriä orofosforihappoa, säilötyn rehu jäännössokerin pitoisuus oli lähellä raaka-aineen sokeripitoisuutta. Vastaavasti käytettäessä muurahaishapon, etikkahapon sekä lignosulfinaatin seosta jäännössokerin pitoisuus oli alhaisempi kuin muurahaishapolla säilötyn rehun ja samalla tasolla kuin painorehun.

Käytettäessä pelkästään maitohappobakteeria jäännössokerin pitoisuudet säilörehussa olivat pienemmät verrattuna $Bio1_{seos}$ luokkaan raaka-aineen sisältäessä vähän tai kohtalaisesti sokeria. $Bio1_{seos}$ luokassa oli mukana myös ymppien ja säilöntähappojen seoksia, kuten muurahaishappoa, joten erot voivat johtua siitä. Tätä tukee myös Jaakkolan ym. (1998c) tulokset, jossa ymppirehuun lisätty muurahaishappo pienimmällä annostasolla (0,17 l/tn) säästi vesiliukoisia hiilihydraatteja parhaiten ja oli myös useiden muiden laatuparametrien perusteella laadultaan paras. Yhdistelmän positiiviset vaikutukset näkyivät rehuissa aina happotasoon 0,67 l/tn asti.

Säilörehun lopulliseen jäännössokerin pitoisuuteen vaikuttavat monet tekijät. Hävikkiä substraatista voi tulla jo raaka-aineen esikuivatuksen aikana ja myös säilönnän ns. stabiilin vaiheen aikana. Varsinaisessa fermentaatiovaiheessa sokereita muutetaan maitohappobakteerien toimesta maitohapoksi. Tätä seuraa stabiili vaihe, jossa vain happoa kestävät entsyymit voivat toimia. Ne hajottavat hiljalleen varasto- ja rakennehiilihydraatteja sokereiksi, jotka taas pitkityneen varastoinnin aikana korvaavat jo kulutettuja sokerivarastoja (Pahlow ym. 2003).

4.2.3 Maitohappopitoisuus

Maitohappoa muodostui vähemmän muurahaishapporehussa kuin painorehussa, kun raaka-aineessa oli keskinkertaisesti tai paljon sokeria. Tämän ovat todenneet esimerkiksi Vanhatalo ym. (1992), Smith ym. (1993), Keady ym. (1995) sekä Keady ja Murphy (1996). Nyt tehdyssä tutkimuksessa raaka-aineen sisältäessä sokeria vain vähän, muodostui muurahaishapporehussa ja painorehussa yhtä paljon maitohappoa. Painorehun pH jäi kuitenkin korkeaksi, koska maitohappoa ei muodostunut riittävästi. Muurahaishapon happamoittama vaikutus yhdistettynä siihen, että myös maitohappoa muodostui luontaisten maitohappobakteerien toimesta, sai aikaan pH:n riittävän laskun vaikeasti säilöttävässä kasvimateriaalissa. Hyväksi maito- ja muu-

rahaishapon yhteispitoisuudeksi katsotaan 35–80 g/kg KA. Jos näiden happojen pitoisuus ylittää 100 g/kg KA, rehun valkuaisarvo ja syöntipotentiaali on heikentynyt (Rehuanalyysi- Säilönnällinen laatu 2009). Maitohappopitoisuus väheni kaikissa sokeriluokissa, kun muurahaishapon annostustasoa nostettiin. Tosin, kun raaka-aine sisälsi vain vähän sokeria, maitohappopitoisuus ensin hieman lisääntyi, kunnes pitoisuus väheni neljän litran annostason jälkeen. Jaakkolan ym. (2006a, 2006b) tutkimuksissa maitohapon pitoisuus väheni, kun muurahaishapon annostasoa lisättiin kahdesta litrasta kuuteen litraan. Vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus säilörehussa taas vastaavasti lisääntyi.

Koko aineistossa raaka-aineen sisältäessä vähän sokeria olivat painorehun ja puhtaalla muurahaishapolla sekä puhtaalla maitohappobakteerilla säilöttyjen rehujen maitohappopitoisuudet lähes samat. Vastaavasti biologiset säilöntäaineet tuottivat rehuun huomattavasti enemmän maitohappoa verrattuna happosäilöntäaineisiin, kun raaka-aine sisälsi sokeria keskimääräisesti tai paljon. Biologisissa säilöntämenetelmissä riittävän maitohappopitoisuuden muodostuminen on välttämätöntä pH:n laskua varten. Saarisalon ym. (2002, 2006) tutkimuksessa rajoituneesti käyneet hapolla säilöttyt rehut erottuivat selvästi maitohappobakteereilla säilötyistä rehuista suuremman sokeripitoisuuden ja korkeamman pH:n sekä pienemmän maitohappopitoisuuden suhteen. Raaka-aineen kuiva-ainepitoisuus oli 245 g/kg ja sokeripitoisuus 104 g/kg KA. Lukuun ottamatta yhtä maitohappobakteerikantaa kaikki biologiset säilöntäaineet tuottivat kyseisessä tutkimuksessa rehuun maitohappoa 98–100 g/kg KA. Nyt tehdyssä analyysissä maitohapon pitoisuudet olivat hyvin samanlaisia kuin edellä mainitussa tutkimuksessa lukuun ottamatta vähän sokeria sisältävää säilörehussa, jossa pitoisuus oli noin 65 g/kg KA. Vähän sokeria sisältävässä kasvimateriaalissa maitohappoa muodostui ainakin osassa maitohappobakteereilla säilötyistä säilörehuista liian vähän, jotta pH olisi laskenut tyydyttävälle tasolle.

Wilkins ym. (1971) havaitsivat positiivisen korrelaation lampaiden vapaaehtoisen rehun syönnin ja säilörehun maitohappopitoisuuden (osuus kokonaishapoista) välillä. Huhtasen ym. (2002) tutkimuksessa maitohappopitoisuudella oli negatiivinen lineaarinen vaikutus säilörehun kuiva-aineen syöntiin lypsylehmillä, kun taas Huhtasen ym. (2007) tutkimuksessa fermentaatioparametreista kokonaishappopitoisuus ennusti parhaiten kuiva-aineen syöntiä. Yksi syy maitohappopitoisuuden syöntiä alentavaan vaikutukseen voi olla sen vaikutus rehun maitavuuteen (Weiss ym. 2003). Yksittäisten käymistuotteiden suoraa vaikutusta maitavuuteen on tutkittu lisäämällä niitä rehuun tai suoraan pötsiin. Hajulla tai maulla voi olla vaikutus rehun syöntiin alussa, mutta mekanismit, jotka vaikuttavat määrällisiin eroihin eri säilörehujen

välillä, ovat monimutkaisempia ja liittyvät metabolisiin mekanismeihin (Huhtanen ym. 2002). Säilörehun kasvavalla maitohappopitoisuudella on todettu olevan negatiivinen vaikutus myös maidon rasva- ja proteiinipitoisuuteen lypsylehmillä (Huhtanen ym. 2003). Säilörehun erilaiset käymistavat vaikuttavat myös pötsifermentaatiossa muodostuvien haihtuvien rasvahappojen osuuksiin. Runsaasti käyneet säilörehut, joissa on muodostunut paljon maitohappoa, yleensä nostavat propionihapon molaarista osuutta pötsissä. Rajoittuneesti käyneet säilörehut, joissa maitohappoa on muodostunut vähemmän ja sokereita on enemmän jäljellä, lisäävät etikka- ja voihiapon osuutta (lipogeenisten haihtuvien rasvahappojen) ja vastaavasti propionihapon osuus vähenee (Weiss ym. 2003, Jaakkola ym. 2006a). Jaakkolan ym.(2006a) tutkimuksessa säilörehun käymisen rajoittuminen muurahaishappoa käytettäessä lisäsi myös muodostuneen mikrobimassan määrää pötsissä.

4.2.4 Ammoniumtypen pitoisuus

Ammoniumtypen pitoisuus oli muurahaishapporehussa kaikissa sokeriluokissa pienempi verrattuna painorehuun. Etenkin raaka-aineen sisältäessä vähän sokeria oli painorehussa kaksi kertaa enemmän ammoniumtyppeä kuin muurahaishapporehussa ja pitoisuus oli paljon suurempi kuin laaturajana pidetty 70 g/kg N. Myös Maynen (1990) sekä Moloneyn ja O'Kielyn (1994) tutkimuksissa muurahaishapporehussa oli huomattavasti pienempi ammoniumtypen pitoisuus verrattuna painorehuun. Muurahaishapon annostustason nostaminen vähensi ammoniumtypen pitoisuutta säilörehussa, paitsi annostustason 7 kg/tn jälkeen, kun raaka-aine sisälsi vähän tai kohtalaisesti sokeria. Jaakkolan ym. (2006a) tutkimuksessa muurahaishappoannostuksen lisääminen pienensi rehuun muodostuneen ammoniumtypen pitoisuutta lineaarisesti, kun raaka-aineen sokeripitoisuus oli pieni (72 g/kg KA) ja vastaavasti raakavalkuaispitoisuus suuri (186 g/kg KA). Jaakkola ym. (2006b) havaitsivat, että ammoniumtypen pitoisuus hie-man lisääntyi, kun muurahaishapon annostasoa lisättiin kahdesta litrasta kuuteen litraan rehuun, jonka raaka-aineen sokeripitoisuus oli suuri (129 g/kg KA) ja raakavalkuaispitoisuus kohtalainen (145 g/kg KA). Toisaalta, Shingfieldin ym. (2002) tutkimuksessa muurahaishapon suuri annostustaso pienensi noin 50 g/kg KA verran ammoniumtypen pitoisuutta säilörehussa verrattuna painorehuun.

Koko aineistossa painorehussa oli jokaisessa sokeriluokassa suuremmat ammoniumtypen pitoisuudet verrattuna säilöntäaineella käsiteltyihin rehuihin. Lisäksi happopohjaiset säilöntäaineet vähensivät ammoniumtypen pitoisuutta verrattuna biologisiin säilöntäaineisiin, kun raa-

ka-aine sisälsi vähän tai kohtalaisesti sokeria. Tämän on todennut myös Davies ym. (1998). Kun sokeria oli raaka-aineessa paljon, ei säilöntäaineilla käsiteltyjen rehujen välillä ollut eroja. Myös Saarisalon ym. (2006) sekä Wintersin ym. (2001) tutkimuksessa muurahaishappo ja maitohappobakteeri tuottivat ammoniumtyppipitoisuuden perustella keskenään yhtä hyvää säilörehua raaka-aineen sokeripitoisuuden ollessa suuri. Painorehussa taas ammoniumtyppeä muodostui kaksi kertaa enemmän. Ensimmäisessä sokeriluokassa biologisilla säilöntäaineilla käsiteltyjen rehujen ammoniumtyypin pitoisuudet olivat noin 90 g/kg N. Jos säilörehussa on ammoniumtyppeä yli 100 g/kg N, on rehussa tapahtunut virheikäymistä (Rehuanalyysi- säilönnällinen laatu 2009). Suuri ammoniakkipitoisuus rehussa vaikuttaa myös tarvittavan maitohapon tai lisätyn hapon määrään, jotta pH laskee riittävästi (Lindgren ym. 1988). Muurahaishapolla säilötyissä rehuissa ammoniumtyypin osuus kokonaistypestä oli jokaisessa sokeriluokassa pienempi kuin laaturaja. Korkeat ammoniumtyypin keskiarvot painorehussa sekä biologisilla säilöntäaineilla käsitellyissä rehuissa osoittavat, että osassa rehuista oli tapahtunut virheikäymistä kasvimateriaalin sisältäessä vähän sokeria.

Ammoniumtyppipitoisuuden mittaamista on perinteisesti pidetty proteolyysin mittarina säilörehussa (Davies ym.1998). Kasviproteiinien hajoaminen esikuivatuksen sekä säilönnän aikana on väistämätöntä ja johtaa muutoksiin typpiyhdisteissä, joka osaltaan alentaa raaka-alkuaineen ruokinnallista arvoa säilötyssä kasvissa verrattuna tuoreeseen ruohoon. Esikuivatuksen aikana proteiinin hajoamisen lopputuotteita ovat peptidit, aminohapot sekä amidit. Säilönnän aikana proteolyysi jatkuu ja ammoniakki sekä aminit ovat suurimmaksi osaksi mikrobiaktiivisuuden lopputuotteita (Rooke ja Hatfield 2003). Proteolyysiin käymisen aikana vaikuttaa kuiva-ainepitoisuus, pH sekä lämpötila. Kuiva-ainepitoisuuden lisääntyminen yleensä vähentää proteolyysiä. On myös esitetty, että vähäinen esikuivatus lisää proteolyysiä, sillä tällöin myös happamoituminen vähenee. pH:n aleneminen vaikuttaa proteolyysin määrään niin, että pH:n liian hidaskas aleneminen aiheuttaa proteiineja hajoamisen lisääntymisen. Lämpötilan nousu siilossa taas aktivoi kasviproteaasien toimintaa ja tämän vuoksi hapen pääsy siiloon tulisi estää (McDonald ym. 1991).

Monet säilörehun laatuarvot perustuvat ammoniakkin ja voihapon pitoisuuksiin, sillä klostridien aiheuttama sekundäärinen fermentaatio vaikuttaa energia- ja kuiva-ainetappioiden lisäksi myös eläimen syöntiin ja tuotokseen. Molemmat parametrit liittyvät suoraan klostridien aktiivisuuteen, mutta myös kasvientsyymit ja enterobakteerit voivat tuottaa osan ammoniakista. Tyypillisessä klostridisäilörehussa on korkea pH, vähän maitohappoa, paljon voihappoa (yli 5

g/kg KA) ja paljon ammoniumtyyppiä (yli 120 g/kg N) (Pahlow ym. 2003). Rehun voihapokäymiselle luo edellytykset etenkin raaka-aineen alhainen kuiva-aine ja sokeripitoisuus sekä riittämätön happamuus (McDonald ym. 1991). Klostridit aiheuttavat ongelmia säilörehussa kahdella eri tavalla. Sokereiden ja maitohapon muuttuminen voihapoksi sekä proteiinien deaminoituminen ammoniakiksi ja orgaanisiksi hapoiksi alentaa rehuarvoa ja huonontaa maittavuutta. Toisaalta, voi happobakteerien itiöt rehussa voivat kulkeutua maitoon asti ja aiheuttavat ongelmia etenkin kovia ja puolikovia juustoja tehdessä (Pahlow ym. 2003). Maidon pastörointi ei tuhoa itiömuodossa olevia bakteereja, jotka sitten kypsyvissä juustoissa muuttuvat kasvullisiksi bakteereiksi. Voi happobakteereita on muun muassa mullassa, sänkikasvustossa sekä pellon pintaan levitetyssä lannassa (McDonald ym. 1991). Heikkilä ym. (2004) tutkivat lietelannan pintalevityksen vaikutusta säilörehun käymis- ja mikrobiologiseen laatuun sekä syöntiin lampailta kolmena vuotena. Vaikka säilörehuissa todettiinkin hyvin vähän voi happoa ja käymislaadut olivat hyvät, niin tästä huolimatta säilörehuissa oli korkeat voi happobakteeri-itiöiden määrät.

4.2.5 Haihtuvat rasvahapot ja etanoli

Etikkahappopitoisuudet olivat muurahaishapporehuissa pienemmät verrattuna painorehuun kaikissa sokeriluokissa. Tutkimuksissa muurahaishapon on todettu vähentävän säilörehun etikkahappopitoisuutta verrattuna painorehuun raaka-aineen sokeripitoisuuden ollessa pieni (esim. Adesogan ja Salawu 2004) tai suuri (esim. Smith ym. 1993). Smithin ym. (1993) tutkimuksessa muurahaishapposäilötyssä rehussa oli kaksi kertaa vähemmän etikkahappoa verrattuna painorehuun. Muurahaishapon annostustason lisääminen vähensi muodostuneen etikkahapon pitoisuutta etenkin kohtalaisesti sokeria sisältävässä kasvimateriaalissa. Kun raaka-aineen sokeripitoisuus oli pieni, happoannoksen lisääminen neljään litraan asti vähensi muodostuneen etikkahapon pitoisuutta, mutta annostason nosto tästä suuremmaksi hieman lisäsi pitoisuutta. Paljon sokeria sisältävässä kasvimateriaalissa selitysaste jäi alhaiseksi ja myös hajonta oli suuri. Tässäkin luokassa annostason nosto kuitenkin vähensi etikkahappopitoisuutta. Jaakkolan ym. (2006a) tutkimuksessa muurahaishapon annostason nosto vähensi etikkahapon pitoisuutta. Jo kahden litran muurahaishapon annostustaso vähensi muodostuneen etikkahapon pitoisuutta 39 g/kg KA verrattuna painorehuun.

Etikkahapon pitoisuudet olivat pienemmät säilöntäainetta käytettäessä verrattuna ilman säilöntäainetta tehtyyn rehuun kaikissa sokeriluokissa. Etikkahappoa oli runsaasti painorehussa, kun raaka-aine sisälsi vähän sokeria. Ensimmäisen sokeriluokan painorehussa oli etikkahappoa 35 g/kg KA ja voihamppoakin 7,24 g/kg KA. Etikkahappoa muodostuu säilörehuun muun muassa heterofermentatiivisten maitohappobakteerien toimesta ja myös enterobakteerit tuottavat sitä rehuun (McDonald ym. 1991). Kun kasvimateriaali sisälsi vähän sokeria, myös biologisia säilöntäaineita käytettäessä etikkahappopitoisuudet olivat selvästi suuremmat kuin hapoilla säilötyissä rehuissa. Erot pitoisuuksissa olivat merkitseviä vielä kohtalaisesti sokeria sisältävässä raaka-aineessa, mutta eivät enää paljon sokeria sisältävässä raaka-aineessa. Puhdaassa maitohappobakteeriluokassa oli mukana sekä homo- että heterofermentatiivisia bakteerikantoja, joten tämä voi osittain selittää korkeaa etikkahappopitoisuutta osassa rehuja.

Etikkahapon ei katsota olevan pelkästään haitallista säilörehussa. Esimerkiksi heterofermentatiivisista maitohappobakteereista *Lactobacillus buchneri* muuttaa anaerobeissa oloissa maitohappoa etikkahapoksi. Tämän ominaisuuden ansioista sen on todettu parantavan säilörehun aerobista stabiiliutta inhiboimalla hiivojen kasvua. Aerobinen pilaantuminen alkaa, kun fakultatiivisesti aerobit mikro-organismit, yleensä hiivat, hapettavat säilöviä orgaanisia happoja (Driehuis ym. 1999). Aiheesta on tehty myös meta-analyysi, jossa *L. buchneri* – käsittely selvästi nosti säilörehun etikkahappopitoisuutta sekä laski hiivojen määrää. Hiivojen väheneminen oli runsaampaa, kun lisätty *L. buchnerin* määrä oli yli 1×10^5 pmy/g tuoretta rehua (Kleinschmit ja Kung, Jr. 2006). Nyt tehdyssä tutkimuksessa ei ollut mukana analyysiä aerobisesta stabiiliudesta eikä homeiden ja hiivojen lukumääristä.

Wilkins ym. (1971) havaitsivat negatiivisen korrelaation säilörehun etikkahappopitoisuuden ja vapaaehtoisen rehun syönnin välillä lampailla. Huhtasen ym. (2007) tutkimuksessa siilossa runsaasti käyneen säilörehun käymistuotteiden todettiin alentavan kuiva-aineen syöntiä lypsy-lehmillä. Krizsan ja Ranbyn (2005) tutkimuksessa paras monimuuttujamalli säilörehun syönnin ennustamiseksi kasvavilla härillä sisälsi yksittäisiä orgaanisia happoja (propioni-, voi- ja maitohappo). Säilörehun käymisparametreista haihtuvien rasvahappojen on todettu olevan parhain yksittäinen parametri myös ennustamaan maidon tuotostuloksia lehmillä (Huhtanen ym. 2003).

Muurahaishappo käytettynä sekä puhtaana että seoksena esti hyvin propionihapon muodostumisen sokeripitoisuuksiltaan erilaisissa raaka-aineissa. Tämä on todettu myös aikaisemmissa tutkimuksissa (Gordon 1989, Mayne 1990). Myös Keadyn ym. (1995) tutkimuksessa propionihappoa muodostui kaksi kertaa vähemmän muurahaishapposäilörehussa kuin painorehussa. Muurahaishapporehussa propionihappopitoisuudet olivat pienemmät verrattuna painorehuun, tosin paljon sokeria sisältävässä kasvimateriaalissa ero ei ollut merkitsevä. Propionihappoa oli runsaasti koko aineiston painorehuissa sekä ymppirehuissa, kun raaka-aineessa oli vähän sokeria. Erot eri säilöntäaineiden sekä painorehun välillä tasoittuivat, kun kasvimateriaali sisälsi sokeria kohtalaisesti tai paljon.

Painorehussa muodostui enemmän voihappoa verrattuna muurahaishapolla säilöttyyn rehuun etenkin raaka-aineen sisältäessä sokeria vähän, mutta erot eivät olleet merkitseviä. Sen sijaan Mayne (1990), Moloney ja O'Kiely (1994) sekä Keady ym. (1995) totesivat tutkimuksissaan merkitseviä eroja muurahaishapporehun ja painorehun voihappopitoisuuksissa. Voihappopitoisuudet painorehuissa näissä tutkimuksissa olivat kaksi kertaa suuremmat kuin muurahaishapposäilötyssä rehuissa. Nyt tehdyssä analyysissä voihappopitoisuudessa oli koko aineistossa merkitseviä eroja painorehun ja säilöntäaineilla säilöttyjen rehujen välillä vain, kun raaka-aineessa oli kohtalaisesti sokeria. Voihappopitoisuus oli kuitenkin numeerisesti selvästi suurempi painorehussa verrattuna säilöntäaineella tehtyihin rehuihin, kun raaka-aineessa oli vähän sokeria. Sokeriluokassa yksi painorehussa oli voihappoa yli 7 g/kg KA ja ammoniumtyppeäkin 120 g/kg KA. Nämä viittaavat klostridien toimintaan ainakin osassa painorehuista. Voihappoa muodostuu rehuun, kun klostridit fermentoivat maitohappoa voihapoksi. Samalla kuiva-ainetappiot ja aminohappojen deaminaatio lisääntyvät. Tätä prosessia kutsutaan sekundääriseksi fermentaatioksi (Wilkinson ym. 2003).

Muurahaishapporehun ja painorehun välillä ei ollut eroja etanolipitoisuuksissa, kun raaka-aineen sokeripitoisuus vaihteli. Aikaisemmin on todettu, että muurahaishappokäsittely on lisännyt etanolipitoisuutta säilörehussa (Gordon 1989, Mayne 1990, Keady ym. 1995, Keady ja Murphy 1996), mutta vastaavasti myös alentanut pitoisuutta vaihtelevissa kasvimateriaaleissa (Moloney ja O'Kiely 1994) verrattuna painorehuun. Sen sijaan koko aineistossa säilöntäaineen käyttö alensi etanolipitoisuutta, kun raaka-aine sisälsi sokeria kohtalaisesti tai paljon. Etanolia tuottavat säilörehuun heterofermentatiiviset maitohappobakteerit, enterobakteeri ja hiivat, mutta myös proteolyttiset klostridit (Pahlow ym. 2003).

5. Yhteenveto ja johtopäätökset

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää muurahaishapon vaikutusta säilörehun käymislaatuun käyttäen hyödyksi aiemmin tehtyjä tutkimuksia. Tutkimuksessa koottiin yhteen tehtyjä säilörehututkimuksia neljän vuosikymmenen ajalta. Numeerinen tieto analysoitiin uudestaan tilastollisesti, jolloin tapaa kutsutaan meta-analyysiksi. Tilasto-ohjelmien kehittyminen mahdollistaa sen, että kiinteät ja satunnaiset tekijät pystytään ottamaan huomioon ja näin eri aikoina tehtyjä tutkimuksia voidaan analysoida yhdessä ilman, että ennusteista tulee harhaisia.

Aineistona käytettiin 42 julkaistua artikkelia ja lisäksi mukana oli 20 MTT:lla tehtyä säilöntäainetutkimusta. Aineisto luokiteltiin raaka-aineen sisältämän sokeripitoisuuden mukaan kolmeen eri luokkaan, joissa raaka-aine sisälsi vähän (alle 15 g/kg tuoretta materiaalia), kohtalaisesti (15–30 g/kg) tai paljon sokeria (yli 30 g/kg). Lisäksi säilöntäainekäsittelyt jaettiin neljään eri ryhmään, joita olivat puhdas muurahaishappo, muurahaishapon ja jonkun lisäaineen seos, maitohappobakteerit sekä maitohappobakteerien ja lisäaineen seos. Lisäksi oli ilman säilöntäainetta tehty ryhmä eli ns. painorehu. Säilörehun laatua tutkittiin käymisparametrien avulla, joita olivat kuiva-aine, pH, vesiliukoiset hiilihydraatit (sokerit), maito-, etikka-, propioni- ja voihapo, etanoli sekä ammoniumtyppi. Aineistosta analysoitiin ensin puhtaan muurahaishapon vaikutus verrattuna painorehuun sekä muurahaishapon annostustason vaikutus. Lisäksi tehtiin vertailut koko aineistosta kaikkien säilöntäainekäsitteltyjen rehujen ja painorehun välillä.

Muurahaishapolla säilötyt rehut olivat laadultaan hyviä raaka-aineen sokeripitoisuudesta riippumatta. Muurahaishapposäilötyissä rehuissa pH oli kaikissa sokeriluokissa alle laaturajan, jäännössokerin pitoisuus oli kohtalainen ja samoin maitohapon pitoisuus. Etanolia oli vain pieniä pitoisuuksia ja lisäksi proteiinien liiallinen hajoaminen oli estynyt, mihin viittaa pienet ammoniumtyypen pitoisuudet kaikissa rehuissa (alle 60 g/kg N). Muurahaishapon annostustaso vaikutti myös selvästi säilöntätuloksiin. Muurahaishapon annostustason nostaminen alensi pH:ta muissa paitsi kohtalaisesti sokeria sisältävässä luokassa. Myös aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu, että muurahaishapon annostustason nosto voi vaikuttaa joko pH:ta laskevasti tai nostavasti riippuen säilöttävästä materiaalista ja käytetystä annostustasosta. Annostason nosto myös vähensi maito- ja etikkahapon ja ammoniumtyypen pitoisuutta, kun taas jäännössokerin pitoisuus suureni.

Maitohappobakteeria sisältävät säilöntäaineet eivät saaneet laadultaan aikaan yhtä hyvää säilörehua kuin happopohjaiset säilöntäaineet, kun raaka-aineen sokeripitoisuus oli pieni. pH jäi korkeaksi molemmissa biologisten säilöntäaineiden luokissa ja jäännössokerin pitoisuus oli pieni etenkin puhtaan maitohappobakteerin rehuissa. Maitohappoa muodostui saman verran kuin happorehuissa, mutta se ei ollut riittävä määrä pH:n alenemiseksi toivotulle tasolle. Haihtuvia rasvahappoja oli rehuissa enemmän kuin muurahaishapporehuissa. Tutkimuksessa oli mukana sekä homo- että heterofermentatiivisia maitohappobakteereja, joten etenkin suuret etikkahappopitoisuudet voivat osittain johtua tästä. Sokeripitoisuuden ollessa raaka-aineessa pieni, oli myös painorehu huonoa pH:n ollessa korkea ja etenkin suuret ammoniumtyypen ja voihamon pitoisuudet viittaavat siihen, että osassa painorehuista oli tapahtunut virhekäymistä.

Kun sokeripitoisuus raaka-aineessa oli kohtalainen tai suuri, saivat myös biologiset säilöntäaineet aikaan laadultaan hyvää säilörehua. Raaka-aineen sisältäessä paljon sokeria olivat rehun pH-arvo ja jäännössokerin pitoisuus suurempia ja vastaavasti maitohappopitoisuus pienempi muurahaishappoa tai sen seoksia käytettäessä verrattuna puhtaaseen maitohappobakteeriin ja sen seoksiin. Tämä kuvastaa hyvin eroa rajoittuneesti käyneen säilörehun ja maitohappokäyneen rehun välillä.

Tuloksista käy ilmi, että raaka-aineen sokeripitoisuus vaikutti eri säilöntäaineiden säilöntätuloksiin. Sokeripitoisuus vaikuttaa kasvin säilöttävyyteen, sillä sokerit toimivat fermentaation substraattina sekä luontaisille maitohappobakteereille että lisätyille kannoille. Sokeripitoisuuden lisäksi ero raaka-aineen kuiva-ainepitoisuudessa vaikutti osaltaan käymislaatuun, sillä sokeripitoisuuden ollessa suuri myös kuiva-ainepitoisuus oli melko suuri. Muurahaishapon positiivinen vaikutus rehun laatuun oli selvin, kun raaka-aineen sokeripitoisuus oli pieni, mutta se sai myös suuremmissa sokeripitoisuuksissa aikaan tasaisen laadukasta säilörehua. Tulokset osoittavat, että kun happoannostus on riittävä, ei sokeripitoisuudella ole merkitystä, sillä lisätty happo itsessään alentaa pH:ta, jota sitten luontaiset maitohappobakteerit osaltaan alentavat. Tämän lisäksi myös muurahaishapon bakteriosidinen vaikutus osaltaan vaikuttaa haitallisia bakteereja vähentävästi.

Kirjallisuus

Adesogan, A. T. & Salawu, M. B. 2004. Effect of applying formic acid, heterolactic bacteria or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation of bi-crops of peas and wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 983-992.

Buxton, D. R. & O'Kiely, P. 2003. Preharvest plant factors affecting ensiling. Kirjassa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.) *Silage Science and Technology*. Agronomy Monograph no. 42. Wisconsin USA: Inc. Madison. s. 199-250.

Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H.(toim.) 2003. *Silage Science and Technology*. Agronomy Monograph no. 42. Wisconsin USA: Inc. Madison. s. 927.

Craseman, E. 1941. Latest investigations and experiences in the area of silage-making. Schweiz. Landwirtsch. Zeitsch 69: 143-157. (Ref. Kung, L. Jr., Stokes, M. R. & Lin, C. J. 2003)

Davies, D. R., Leemans, D. K., Bakewell, E. L. & Merry R. J. 2005. The effect of dry matter content and inoculation with lactic acid bacteria on the residual water soluble carbohydrate content of silages prepared from a high sugar grass cultivar. Kirjassa: Park, R. S. & Stronge, M. D. (toim.) *Silage production and utilisation*. Proceedings of the XIVth International Silage Conference. Belfast .Wageningen Academic Publishers. s. 211.

Davies, D. R., Merry, R. J., Williams, A. P., Bakewell, E. L., Leemans, D. K. & Tweed, J. K. S. 1998. Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content. *Journal of Dairy Science* 81: 444-453.

Driehuis, F., Oude Elferink, S. J.W. H. & Spoelstra, S. F. 1999. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology* 87: 583-594.

Evira. 2009. Vuonna 2005 ja sitä edellisinä kasvukausina hyväksytyt tuoreen rehukasvin säilöntäaineet.

URL=http://www.evira.fi/attachments/kasvintuotanto_ja_rehut/rehut/rehun_lisaaineet/hyvakset_ytyt_sailontaaineet.pdf. Viitattu 19.11.2009.

Glass, G. V. 1976. Primary, secondary, and meta-analysis of research. Ed. Res. 5:3-8. (Ref. St-Pierre, N.R. 2001)

Gordon, F. J. 1989. An evaluation through lactating cattle of a bacterial inoculant as an additive for grass silage. *Grass and Forage Science* 44: 169-179.

Heikkilä, T., Kemppainen, E., Karppinen, A. & Sivelä, S. 2004. Lietelannan vaikutus nurmen ja säilörehun laatuun sekä syöntiin. Maataloustieteen päivät 2004.

URL=<http://www.smts.fi/MTP%20julkaisu%202004/posterit04/kr18.pdf>. Viitattu 8.1.2010.

Henderson, A. R. 1973. Ph.D. Thesis. University of Edinburgh. (Ref. McDonald, P., Henderson, A.R. & Heron, S.J.E. 1991)

Henderson, A. R., Anderson, D. H. & Neilson, D. 1989. The effect of a high rate of application of formic acid during ensilage of ryegrass on silage dry matter intake of sheep and cattle. Edinburgh School of Agriculture. Paper No. 155. BSAP.

Henderson A. R. & McDonald, P. 1971. Effect of formic acid on the fermentation of grass of low dry matter content. *Journal of Science of Food and Agriculture* 22: 157-163.

Horton, R. H., Moran, L. A., Scrimgeour, G. K., Perry, M. D. & Rawn, D. J. 2006. *Principles of Biochemistry*. 4th Edition. Pearson International Edition. s. 852.

Huhtanen, P., Khahili, H., Nousiainen, J. I., Rinne, M., Jaakkola, S., Heikkilä, T. & Nousiainen, J. 2002. Prediction of the relative intake potential of grass silage by dairy cows. *Livestock Production Science* 73: 111-130.

Huhtanen, P., Nousiainen, J. I., Khahili, H., Jaakkola, S. & Heikkilä, T. 2003. Relationship between silage fermentation characteristics and milk production parameters: analyses of literature data. *Livestock Production Science* 81: 57-73.

Huhtanen, P., Rinne, M. & Nousiainen, J. 2007. Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: a revision of the relative silage dry-matter intake index. *Animal* 1:758-770.

Jaakkola, S., Heikkilä, T. & Suokannas, A. 1998a. Kuivatusajan ja säilöntäaineen vaikutus pyöröpaalattun säilörehun korjuu- ja säilöntätappioihin sekä laatuun. Loppuraportti. 1996-1998. Yhteistyötutkimus. *Rehujen säilönnällisen laadun ja ravintoarvon kehittäminen happopohjaisten säilöntäaineiden avulla*. MTT/Eläinravitseminen.

Jaakkola, S., Huhtanen, P. & Hissa, K. 1991. The effect of cell wall degrading enzymes or formic acid on fermentation quality and on digestion of grass silage by cattle. *Grass and Forage Science* 46: 75-87.

Jaakkola, S., Jalava, T., Saarisalo, E., Huhtanen, P., Skyttä, E., von Wright, A. & Haikara, A. 1998c. Yhdistetyn maitohappobakteeri- ja muurahaishappokäsittelyn vaikutus säilörehun laatuun. Loppuraportti. *Nurmirehujen biologisen säilönnän optimointi*. MTT Eläinravitseminen, VTT, Bio- ja elintarviketekniikka.

Jaakkola, S., Kaunisto, V. & Huhtanen, P. 2006a. Volatile fatty acid proportions and microbial protein synthesis in the rumen of cattle receiving grass silage ensiled with different rates of formic acid. *Grass and Forage Science* 61: 282-292.

Jaakkola, S., Rinne, M., Heikkilä, T., Toivonen, V. & Huhtanen, P. 2006b. Effects of restriction of silage fermentation with formic acid on milk production. *Agricultural and Food Science* 15: 200-218.

Jaakkola, S. ja Saarisalo, E. 2004. Säilöntäaineen neutraloinnin, annostason ja lisäaineiden vaikutus rehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen. Tutkimusraportti. MTT Eläinravitseminen.

Jaakkola, S., Toivonen, V. & Huhtanen, P. 1998b. Säilöntäaineen vaikutus esikuivatun puna-apilavaltaisen rehun säilyvyyteen ja aerobiseen stabiilisuuteen. Loppuraportti. 1996-1998. Yhteistyötutkimus. *Rehujen säilönnällisen laadun ja ravintoarvon kehittäminen happopohjaisten säilöntäaineiden avulla*. MTT/Eläinravitseminen.

Keady, T. W. J. & Murphy, J. J. 1996. Effects of inoculant treatment on ryegrass silage fermentation, digestibility, rumen fermentation, intake and performance of lactating dairy cattle. *Grass and Forage Science* 51: 232-241.

Keady, T. W. J., Murphy, J. J. & Harrington, D. 1995. The effects of ensiling on dry-matter intake and milk production by lactating dairy cattle given forage as the sole feed. *Grass and Forage Science* 51: 131-141.

Kemira AIV® - Suomalaisien ratkaisut rehunsäilöntään. 2008.

URL=http://www.kemira.com/SiteCollectionDocuments/Media/Brochures/Kemira_AIV_esite.pdf. Viitattu 16.12.2009.

Kennedy, S. J. 1990. An evaluation of three bacterial inoculants and formic acid as additives for first harvest grass. *Grass and Forage Science* 45: 281-288.

Kleinschmit, D. H. & Kung, L. Jr. 2006. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *Journal of Dairy Science* 89: 4005-4013.

Komission asetus (EY) N:o 429/2008. Euroopan unionin virallinen lehti. 22.5.2008. s.65

URL=http://www.evira.fi/attachments/kasvintuotanto_ja_rehut/rehut/rehun_lisaaineet/429_2008_fi.pdf. Viitattu 2.1.2010.

Krizsan, S. 2006. Silage Quality: Effect of fermentation on intake and nutrient utilisation by cattle. Doctor Scientiarum Thesis. Department of Animal and Aquacultural Sciences. Norwegian University of Life Science.

Krizsan, S. J. & Randby, Å. T. 2005. The effect of fermentation quality on voluntary intake of grass silage by growing steers. Kirjassa: Park, R. S & Stronge, M. D. (toim.) *Silage production and utilisation*. Proceedings of the XIVth International Silage Conference. Belfast .Wageningen Academic Publishers s. 269.

Kung, L, Jr., Stokes, M. R. & Lin, C. J. 2003. Silage additives. Kirjassa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.) *Silage Science and Technology*. Agronomy Monograph no. 42. Wisconsin USA: Inc. Madison. s. 305-360.

Lindgren, S., Bromander, A. & Pettersson, K. 1988. Evaluation of silage additives using scale-model silos. Teoksessa: Pettersson, K. 1988. Ensiling of forages. Factors affecting silage fermentation and quality. Dissertation. Sveriges Lantbruksuniversitet.

Littell, R. C., Milliken, G. A., Straub, W. W. & Wolfinger, R. D. 1996. SAS System for Mixed Models. SAS Inst., Cary, NC. (Ref. St-Pierre, N.R. 2001)

Mayne, C. S. 1990. An evaluation of an inoculant of *Lactobacillus Plantarum* as an additive for grass silage for dairy cattle. *Animal Production* 51: 1-13.

Mayne, C. S. 1993. The effect of formic acid, sulphuric acid and a bacterial inoculant on silage fermentation and the food intake and milk production of lactating dairy cows. *Animal Production* 56: 29-42.

McDonald, P., Henderson, A. R. & Heron, S. J. E. 1991. *The Biochemistry of silage*. Second edition. Lincoln, UK: Chalcombe Publications. 340 p.

MMMtike. Käytössä oleva maatalousmaa 2008. TIKE. Maa- ja metsätalousministeriön tietopalvelukeskus.

URL=http://www.matilda.fi/servlet/page?_pageid=549,193&_dad=portal30&_schema=PORTAL30&908_MATILDA_JULKAISUT_4484043.lk=242&952_MATILDA_JULKAISUT_4484043.cls=257. Viitattu 16.12.2009.

Mo, M. & Saue, O. 1988. Recent developments in feed conservation. Proceedings of the 12th General Meeting of the European Grassland Federation, Dublin 4-7 July, 127-143. (ref. Kennedy, S. J. 1990)

Moloney, A. P. & O'Kiely, P. 1994. Rumen fermentation and degradability in steers offered grass silage made without an additive, with formic acid or with a partially neutralised blend of aliphatic organic acids. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 33: 11- 24.

Moisio, T. & Heikonen, M. 1992. *AIV-rehun perusteet*. Kirjayhtymä Oy. Helsinki. s. 170.

Muck, R. E., Moser, L. E. & Pitt, R. E. 2003. Postharvest plant factors affecting ensiling. Kirjassa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.) *Silage Science and Technology*. Agronomy Monograph no. 42. Wisconsin USA: Inc. Madison. s. 251- 304.

Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H & Spoelstra S. F. 2003. Microbiology of ensiling. Kirjassa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.) *Silage Science and Technology*. Agronomy Monograph no. 42. Wisconsin USA: Inc. Madison. s. 31-93.

Patterson, D. C., Mayne, C. S., Gordon, F. J. & Kilpatric, D. J. 1997. An evaluation of an inoculant/enzyme preparation as an additive for grass silage for dairy cattle. *Grass and Forage Science* 52: 325- 335.

Pettersson, K. 1988. Ensiling of forages. Factors affecting silage fermentation and quality. *Dissertation*. Sveriges Lantbruksuniversitet.

Pettersson, K. & Lindgren, S. 1988. Influence of carbohydrate fraction and additives on silage quality. Teoksessa: Pettersson, K. 1988. Ensiling of forages. Factors affecting silage fermentation and quality. *Dissertation*. Sveriges Lantbruksuniversitet.

Pursiainen, P. & Tuori, M. 2008. Effect of ensiling field bean, field pea and common vetch in different proportions with whole-crop wheat using formic acid of an inoculant on fermentation characteristics. *Grass and Forage Science* 63: 60-78.

Randby, Å. T. 2000. The effect of some acid-based additives applied to wet grass crops under various ensiling conditions. *Grass and Forage Science* 55: 289-299.

Rehuanalyysi- säilönnällinen laatu. 2009.

URL=https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Artturi/Rehuanalyysi/Rehuanalyysin_tulkinta_ma_rehtijat/Sailonnallinen_laatu#pH. Viitattu 16.12.2009.

Richard, O. 1946. The changes in acid sensitivity of butyric acid bacteria (*Clostridium butyricum*) and their significance to the conservation of green fodder. Schweiz. Landwirtsch. Monatsh 24:195-211 (Ref. Kung, L. Jr., Stokes, M. R. & Lin, C. J. 2003)

Rooke, J. A. & Hatfield, R. D. 2003. Biochemistry of ensiling. Kirjassa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.) *Silage Science and Technology*. Agronomy Monograph no. 42. Wisconsin USA: Inc. Madison. s. 95-139.

Saarisalo, E., Jaakkola, S., Jalava, T., Skyttä, E. & Haikara, A. 2002. Kolmen erityyppisen maitohappobakteerin sekä niiden yhdistelmien vaikutus säilörehujen käymistyyppiin ja aerobiseen stabiilisuuteen. Loppuraportti. *Biologinen säilöntä - tuotantoprosessin tehostaminen ja kehittäminen laboratoriomittakaavasta maatilan olosuhteisiin*. Tutkimusyhteistyöhanke 1999-2002. MTT Eläinravitseminen, VTT Biotekniikka.

Saarisalo, E., Jalava, T., Skyttä, E., Haikara, A. & Jaakkola, S. 2006. Effect of lactic acid bacteria inoculants, formic acid, potassium sorbate and sodium benzoate on fermentation quality and aerobic stability of wilted grass silage. *Agricultural and Food Science* 15: 185-199.

Saarisalo, E., Skyttä, E., Haikara, A., Jalava, T. & Jaakkola, S. 2007. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *Journal of Applied Microbiology* 102: 327- 336.

SAS Statistical analyses systems Institute inc. version 9.1

Seale, D.R., Henderson, A.R., Pettersson, K.O. & Lowe, J.F. 1986. The effect of addition of sugar and inoculant with two commercial inoculants on the fermentation of lucerne silage in laboratory silos. *Grass and Forage Science* 41: 61-70.

Shingfield, K. J., Jaakkola, S. & Huhtanen, P. 2002. Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on intake, feeding behaviour and milk production of dairy cows. *Animal Science* 74: 383-397.

Sipilä, A. 2006. Rehuarvo ja laatukäsitteet. Nurmitieto 4.1.1 [verkkójulkaisu]. Suomen Nurmiyhdistys ja MTT. Julkaistu 31.5.2006. Saatavissa

URL=<http://www.agronet.fi/nurmiyhdistys>. ISSN 1795.6390. Viitattu 16.12.2009.

Smith, E. J., Henderson, A. R., Oldham, J. D., Whitaker, D. A., Aitchison, K., Anderson, D. H. & Kelly, J. M. 1993. The influence of an inoculant/enzyme preparation as an additive for grass silage offered in combination with three levels of concentrate supplementation on performance of lactating dairy cattle. *Animal Production*. 56: 301-310.

St-Pierre, N. R. 2001. Invited review: Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. *Journal of Dairy Science* 84: 741-755.

Säilörehun käymislaatu. 2009.

URL=http://www.evira.fi/portal/fi/kasvintuotanto_ja_rehut/rehut/rehun_lisaaineet/sailorehun_sailontaaineet/sailorehun_kaymislaatu/ Viitattu 16.12.2009.

Vanhatalo, A., Varvikko, T. & Aronen, I. 1992. The effect of type of additive on rumen fermentation and digestion of grass silage in cattle. *Agricultural Science in Finland* 1: 163- 175.

Weiss, W. P., Chamberlain, D. G. & Hunt, C. W. 2003. Feeding silages. Kirjassa: Buxton D. R, Muck, R .E & Harrison J. H. (toim.) *Silage Science and Technology*. Agronomy Monograph no. 42. Wisconsin USA: Inc. Madison. s. 469-504.

Wieringa, G.W. 1961. Über den Einfluss de Grünfutters auf die Gärung. *Futterkonservierung* 7: 27-35. (Ref. Pettersson, K. 1988)

Wilkins, R. J., Hutchinson, K. J., Wilson, R. F. & Harris, C. E. 1971. The voluntary intake of silage by sheep. 1. Interrelationships between silage composition and intake. *Journal of Agricultural Science (Camp.)* 77: 531-537.

Wilkinson, J. M., Bolsen, K. K. & Lin, L. J. 2003. History of Silage. Kirjassa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.) *Silage Science and Technology*. Agronomy Monograph no. 42. Wisconsin USA: Inc. Madison. s. 1-30

Wilkinson, J. M. & Phipps, R. H. 1979. *Journal of Agricultural Science*. 92: 485-491. (Ref. McDonald, P., Henderson, A. R. & Heron, S. J. E. 1991)

Wilson, R. F. & Wilkins, R. J. 1973. Formic acid as a silage additive I. Effects of formic acid on fermentation on laboratory silos. *Journal of Agricultural Sciences, Cambridge* 81: 117-124.

Winters, A. L., Fychan, R. & Jones, R. 2001. Effect of formic acid and a bacterial inoculant on the amino acid composition of grass silage and on animal performance. *Grass and Forage Science* 56: 181-192.

Woolford, M. K. 1984. *The Silage Fermentation*. Marcel Dekker INC. New York. s. 350.

Zelter, S. 1960. Fermentation behaviour of lucerne ensiled by different methods. *Proc. 8th Intern. Grassl. Congr.* Reading. 505-510. (Ref. Pettersson, K. 1988)

Meta-analyysi muurahaishapon ja muiden säilöntäaineiden vaikutuksista rehun säilönnälliseen laatuun

Lista tutkimuksessa käytetyistä julkaisuista ja tutkimusraporteista

1. Adesogan, A. T. & Salawu, M. B. 2002. The effect of different additives on the fermentation quality, aerobic stability and *in vitro* digestibility of pea/wheat bi-crop silages containing contrasting pea to wheat ratios. *Grass and Forage Scienc.* 57: 25-32.
2. Adesogan, A.T. & Salawu, M.B. 2004. Effect of applying formic acid, heterolactic bacteria or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation of bi-crops of peas and wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 983-992.
3. Barry, T. N., Cook, J. E., Wilkins, R. J. 1978. The influence of formic acid and formaldehyde additives and type of harvesting machine on the utilization of nitrogen in lucerne silages. *Journal of Agriculture Science, Camp.* 91: 701-715.
4. Chamberlain, D. G., Thomas, P. C. & Wait, M. K. 1982. The rate of addition of formic acid to grass at ensilage and the subsequent digestion of the silage in the rumen and intestines of sheep. *Grass and Forage Science* 37: 159- 164.
5. Davies, D. R., Merry, R. J., Williams, A. P., Bakewell, E. L, Leemans, D. K. & Tweed, J. K. S. 1998. Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content. *Journal of Dairy Science* 81: 444-453.
6. Gordon, F. J. 1989. An evaluation through lactating cattle of a bacterial inoculant as an additive for grass silage. *Grass and Forage Science* 44: 169-179.
7. Haigh, P. M. & Davies, O. D. 1998. Effect of formic acid with formalin or barley incorporation into grass silage on silage fermentation and the performance of dairy cows. *Journal of Agricultural Engineering Research* 69: 261-265
8. Haigh, P. M. & Mansbridge, R. J. 1998. The effect of formic acid with formalin on grass silage fermentation and the performance of dairy cows. *Journal of Agricultural Engineering Research* 69: 255-259
9. Heikkilä, T., Toivonen, V. & Tupasela, T. 1996. Säilöntäaineiden vaikutus pyöröpaalauksessa. Kirjassa Hannuksela, M. (toim) *Kotieläintieteen päivät 1996*. Maaseutukeskusten Liiton julkaisu no 905. Helsinki. Yliopistopaino. s. 231-234.
10. Henderson, A. R., Anderson, D. H. & Neilson. D. 1989. The effect of a high rate of application of formic acid during ensilage of ryegrass on silage dry matter intake of sheep and cattle. Edinburgh School of Agriculture. Paper No. 155. BSAP
11. Henderson, A. R. & McDonald, P. 1971. Effect of formic acid on the fermentation of grass of low dry matter content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 22: 157-163.

12. Hinks, C. E. & Henderson, A. R. 1977. Beef production from additive-treated silages. *Animal Production* 25: 53- 60.
13. Jaakkola, S. 1990. The effect of cell wall degrading enzymes on the preservation of grass and on the silage intake and digestibility in sheep. *Journal of Agricultural Science in Finland* 62: 51-62.
14. Jaakkola, S., Heikkilä, T. ja Suokannas, A. 1998. Kuivatusajan ja säilöntäaineen vaikutus pyöröpaalattun säilörehun korjuu- ja säilöntätappioihin sekä laatuun. Loppuraportti. Rehujen säilönnällisen laadun ja ravintoarvon kehittäminen happopohjaisten säilöntäaineiden avulla. Tutkimusyhteistyö MTT/Eläinravitseminen, Kemira Chemicals Oy.
15. Jaakkola, S., Huhtanen, P. & Hissa, K. 1991. The effect of cell wall degrading enzymes or formic acid on fermentation quality and on digestion of grass silage by cattle. *Grass and Forage Science* 46: 75-87.
16. Jaakkola, S., Kaunisto, V. & Huhtanen, P. 2006a. Volatile fatty acid proportions and microbial protein synthesis in the rumen of cattle receiving grass silage ensiled with different rates of formic acid. *Grass and Forage Science* 61: 282-292.
17. Jaakkola, S., Rinne, M., Heikkilä, T., Toivonen, V. & Huhtanen, P. 2006. Effects of restriction of silage fermentation with formic acid on milk production. *Agricultural and Food Science* 15: 200-218.
18. Jaakkola, S. ja Saarisalo, E. 2004. Ammoniumformiaatin vaikutus säilörehun laatuun. Tutkimusraportti. Säilöntäaineen neutraloinnin, annostason ja lisäaineiden vaikutus rehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen. MTT Eläinravitseminen.
19. Jaakkola, S. ja Saarisalo, E. 2004. Säilöntäaineen (AIVPro) annostustason vaikutus säilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen. Tutkimusraportti. Säilöntäaineen neutraloinnin, annostason ja lisäaineiden vaikutus rehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen. MTT Eläinravitseminen.
20. Jaakkola, S. ja Saarisalo, E. 2005. Biologisen säilöntäaineen koostumuksen ja annostustason vaikutus säilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen. Tutkimusraportti. MTT Eläinravitseminen.
21. Jaakkola, S., Toivonen, V. ja Huhtanen, P. 1998. Muurahaishapon annostustason vaikutus esikuivatun nurmirehun säilyvyyteen ja aerobiseen stabiilisuuteen raaka-aineen valkuaispitoisuuden vaihdella. Loppuraportti. Rehujen säilönnällisen laadun ja ravintoarvon kehittäminen happopohjaisten säilöntäaineiden avulla. Tutkimusyhteistyö MTT/Eläinravitseminen, Kemira Chemicals Oy.
22. Jaakkola, S., Toivonen, V. ja Huhtanen, P. 1998. Muurahaishapon vaikutus nurmisäilörehun koostumukseen, sulavuuteen ja aerobiseen stabiilisuuteen. Loppuraportti. Rehujen säilönnällisen laadun ja ravintoarvon kehittäminen happopohjaisten säilöntäaineiden avulla. Tutkimusyhteistyö MTT/Eläinravitseminen, Kemira Chemicals Oy.

23. Jaakkola, S., Toivonen, V. ja Huhtanen, P. 1998. Säilöntäaineen ja olosuhteiden vaikutus esikuivatun nurmirehun säilyvyyteen ja aerobiseen stabiilisuuteen. Loppuraportti. Rehujen säilönnällisen laadun ja ravintoarvon kehittäminen happopohjaisten säilöntäaineiden avulla. Tutkimusyhteistyö MTT/Eläinravitseminen, Kemira Chemicals Oy.
24. Jaakkola, S., Toivonen, V. ja Huhtanen, P. 1998. Säilöntäaineen vaikutus esikuivatun puna-apilavaltaisen rehun säilyvyyteen ja aerobiseen stabiilisuuteen. Loppuraportti. Rehujen säilönnällisen laadun ja ravintoarvon kehittäminen happopohjaisten säilöntäaineiden avulla. Tutkimusyhteistyö MTT/Eläinravitseminen, Kemira Chemicals Oy.
25. Keady, T. W. J., Murphy, J. J. & Harrington, D. 1995. The effects of ensiling on dry-matter intake and milk production by lactating dairy cattle given forage as the sole feed. *Grass and Forage Science* 51: 131-141.
26. Keady, T. W. J. & Murphy, J. J. 1996. Effects of inoculant treatment on ryegrass silage fermentation, digestibility, rumen fermentation, intake and performance of lactating dairy cattle. *Grass and Forage Science* 51: 232-241.
27. Kennedy, S. J. 1990. An evaluation of three bacterial inoculants and formic acid as additives for first harvest grass. *Grass and Forage Science* 45. 281-288.
28. Kennedy, S. J. 1990. Comparison of the fermentation quality and nutritive value of sulphuric and formic acid-treated silages fed to beef cattle. *Grass and Forage Science* 45: 17- 28.
29. Mayne, C. S. 1990. An evaluation of an inoculant of *Lactobacillus Plantarum* as an additive for grass silage for dairy cattle. *Animal Production* 51: 1-13.
30. Mayne, C. S. 1993. The effect of formic acid, sulphuric acid and a bacterial inoculant on silage fermentation and the food intake and milk production of lactating dairy cows. *Animal Production* 56: 29-42.
31. Moloney, A. P. & O'Kiely, P. 1994. Rumen fermentation and degradability in steers offered grass silage made without an additive, with formic acid or with a partially neutralised blend of aliphatic organic acids. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 33: 11- 24.
32. Nadeau, E. M. G., Buxton, D. R, Russel, J. R., Allison, M. J. & Young, J. W. 2000. Enzyme, bacterial inoculant and formic acid effects on silage composition on orchardgrass and alfalfa. *Journal of Dairy Science* 83: 1487-1502
33. Nadeau, E. M., Russel, J. R. & Buxton, D.R. 2000. Intake, digestibility and composition of orchardgrass, and alfalfa silages treated with cellulase, inoculant and formic acid fed to lambs. *Journal of Animal Science* 78: 2980-2989.
34. Nsereko, V.L. & Rooke, J.A. 1999. Effects of peptidase inhibitors and other additives on fermentation and nitrogen distribution in perennial ryegrass silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 679-686.
35. Nsereko, V. L. & Rooke, J. A. 2000. Characterisation of peptides in silages made from perennial ryegrass with different silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 725-731.

36. Nsereko, V. L., Rooke, J. A., Newbold, C. J. & Wallace, R. J. 1998. Influence of protease inhibitors on nitrogen distribution in ensiled perennial ryegrass and the utilisation of silage nitrogen for growth by rumen bacteria in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 76: 51-63.
37. O'Kiely, P. & Moloney, A. P. 1994. Silage characteristics and performance of cattle offered grass silage made without an additive, with formic acid or with partially neutralized blend of aliphatic organic acids. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 33: 25-39.
38. Patterson, D. C., Mayne, C. S., Gordon, F. J. & Kilpatrick, D. J. 1997. An evaluation of an inoculant/enzyme preparation as an additive for grass silage for dairy cows. *Grass and Forage Science* 52: 325-335
39. Payly, T. M & Tham, W. A. 2003. Survival of *Listeria monocytogenes* in wilted and additive-treated grass silage. *Acta vet. Scand.* 44: 73-86.
40. Rooke, J. A., Greife, H. A. & Armstrong, D. G. 1983. The digestion by cattle of grass silages made with no additive or with the application of formic acid or formic acid and formaldehyde. *Grass and Forage Science* 38: 301-310.
41. Saarisalo, E., Jaakkola, S. ja Jalava, T. 2003. E76-preparaatin ja kuivausmenetelmän ja säilytysajan vaikutus säilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen. Osa 2. Loppuraportti. Säilörehun biologisen tuotantoprosessin kehittäminen. Käyttöpreparaatin toimintavarmuuden testaaminen. Tutkimusyhteistyöhanke 2000-2003. MTT Eläinravitseminen.
42. Saarisalo, E., Jaakkola, S. ja Jalava, T. 2003. Kasvatusalustan ja kuivausmenetelmän vaikutus E76-ympin toimintavarmuuteen. Osa 1. Loppuraportti. Säilörehun biologisen tuotantoprosessin kehittäminen. Käyttöpreparaatin toimintavarmuuden testaaminen. Tutkimusyhteistyöhanke 2000-2003. MTT Eläinravitseminen.
43. Saarisalo, E., Jaakkola, S. ja Jalava, T. 2003. Kasvatusalustan ja kuivausmenetelmän vaikutus E-76-ympin toimintavarmuuteen. Osa 2. Loppuraportti. Säilörehun biologisen tuotantoprosessin kehittäminen. Käyttöpreparaatin toimintavarmuuden testaaminen. Tutkimusyhteistyöhanke 2000-2003. MTT Eläinravitseminen.
44. Saarisalo, E., Jaakkola, S. ja Jalava, T. 2003. Ympin vaikutus rehun säilönnälliseen laatuun ja maidontuotantoon. Loppuraportti. Säilörehun biologisen tuotantoprosessin kehittäminen. Käyttöpreparaatin toimintavarmuuden testaaminen. Tutkimusyhteistyöhanke 2000-2003. MTT Eläinravitseminen.
45. Saarisalo, E., Jaakkola, S. ja Jalava, T. 2003. Ympin ja kaliumsorbaatin vaikutus säilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen. Loppuraportti. Säilörehun biologisen tuotantoprosessin kehittäminen. Käyttöpreparaatin toimintavarmuuden testaaminen. Tutkimusyhteistyöhanke 2000-2003. MTT Eläinravitseminen.
46. Saarisalo, E., Jaakkola, S., Jalava, T., Skyttä, E. ja Haikara, A. 2002. Kolmen erityyppisen maitohappobakteerin sekä niiden yhdistelmien vaikutus säilörehujen käymistyyppiin ja aerobiseen stabiilisuuteen. Loppuraportti. Biologinen säilöntä - tuotantoprosessin tehostaminen ja kehittäminen laboratoriomittakaavasta maatalon olosuhteisiin. Tutkimusyhteistyöhanke 1999-2002. MTT Eläinravitseminen, VTT Biotekniikka.

47. Saarisalo, E., Jaakkola, S., Jalava, T., Skyttä, E. ja Haikara, A. 2002. Maitohappobakteerien ja kemiallisten säilöntäaineiden vaikutus säilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen 1. Loppuraportti. Biologinen säilöntä - tuotantoprosessin tehostaminen ja kehittäminen laboratoriomittakaavasta maatalan olosuhteisiin. Tutkimusyhteistyöhanke 1999-2002. MTT Eläinravitseminen, VTT Biotekniikka.
48. Saarisalo, E., Jaakkola, S., Jalava, T., Skyttä, E. ja Haikara, A. 2002. Maitohappobakteerien ja kemiallisten säilöntäaineiden vaikutus säilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen 2. Loppuraportti. Biologinen säilöntä - tuotantoprosessin tehostaminen ja kehittäminen laboratoriomittakaavasta maatalan olosuhteisiin. Tutkimusyhteistyöhanke 1999-2002. MTT Eläinravitseminen, VTT Biotekniikka.
49. Saarisalo, E., Jaakkola, S., Jalava, T., Skyttä, E. ja Haikara, A. 2002. Maitohappobakteerien vaikutus rehun säilönnälliseen laatuun ja maidontuotantoon. Loppuraportti. Biologinen säilöntä - tuotantoprosessin tehostaminen ja kehittäminen laboratoriomittakaavasta maatalan olosuhteisiin. Tutkimusyhteistyöhanke 1999-2002. MTT Eläinravitseminen, VTT Biotekniikka.
50. Saarisalo, E., Jaakkola, S., Jalava, T., Skyttä, E. ja Haikara, A. 2002. Säilönnän kinetiikan ja mahdollisten tappioiden arvioiminen säilönnällisen laadun ja kaasuntuotannon perusteella. Loppuraportti. Biologinen säilöntä - tuotantoprosessin tehostaminen ja kehittäminen laboratoriomittakaavasta maatalan olosuhteisiin. Tutkimusyhteistyöhanke 1999-2002. MTT Eläinravitseminen, VTT Biotekniikka.
51. Saarisalo, E., Jaakkola, S., Jalava, T., Skyttä, E. ja Haikara, A. 2002. Säilöntään käytettävien maitohappobakteerien kilpailukyky sekä mikrobiflooran aiheuttamien kemiallisten muutosten kinetiikka rehussa säilönnän alussa ja siilon avaamisen jälkeen. Loppuraportti. Biologinen säilöntä - tuotantoprosessin tehostaminen ja kehittäminen laboratoriomittakaavasta maatalan olosuhteisiin. Tutkimusyhteistyöhanke 1999-2002. MTT Eläinravitseminen, VTT Biotekniikka.
52. Saarisalo, E., Jaakkola, S., Jalava, T., Skyttä, E. ja Haikara, A. 2002. Säilöntään käytettävien maitohappobakteereiden vaikutus rehun laatuun eri olosuhteissa. Loppuraportti. Biologinen säilöntä - tuotantoprosessin tehostaminen ja kehittäminen laboratoriomittakaavasta maatalan olosuhteisiin. Tutkimusyhteistyöhanke 1999-2002. MTT Eläinravitseminen, VTT Biotekniikka.
53. Saarisalo, E., Jalava, T., Skyttä, E., Haikara, A. & Jaakkola, S. 2006. Effect of lactic acid bacteria inoculants, formic acid, potassium sorbate and sodium benzoate on fermentation quality and aerobic stability of wilted grass silage. *Agricultural and Food Science* 15: 185- 199.
54. Saarisalo, E., Skyttä, E., Haikara, A., Jalava, T. and Jaakkola, S. 2007. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *Journal of Applied Microbiology* 102: 327-336.
55. Salawu, M. B, Warren, E. H. & Adesogan, A. T. 2001. Fermentation characteristic, aerobic stability and ruminal degradation of ensiled pea/wheat bi-crops forages treated with two microbial inoculants, formic acid or quebracho tannins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:1263- 1268.

56. Shingfield, K. J., Jaakkola, S. & Huhtanen, P. 2002. Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on intake, feeding behavior and milk production of dairy cows. *Animal Science* 74: 383-397.
57. Slottner, D. & Bertilsson, J. 2006. Effect of ensiling technology on protein degradation during ensilage. *Animal Feed Science and Technology* 127: 101-111.
58. Smith, E. J., Henderson, A. R., Oldham, J. D., Whitaker, D. A., Aitchison, K., Anderson, D. H. & Kelly, J. M. 1993. The influence of an inoculant/enzyme preparation as an additive for grass silage offered in combination with three levels of concentrate supplementation on performance of lactating dairy cattle. *Animal Production* 56: 301-310
59. Vanhatalo, A., Varvikko, T. & Aronen, I. 1992. The effect of type of additive on rumen fermentation and digestion of grass silage in cattle. *Agricultural Science in Finland* 1: 163-175
60. Waldo, D. R., Keys, J. E. Jr. & Gordon, C. H. 1973. Preservation efficiency and dairy heifer response from unwilted formic and wilted untreated silages. *Journal of Dairy Science* 56: 129-136.
61. Wilson, R. F. & Wilkins, R. J. 1973. Formic acid as a silage additive 1. Effects of formic acid on fermentation in laboratory silos. *Journal of Agriculture Science, Camb.* 81: 117-124.
62. Winters, A. L., Fychan, R. & Jones, R. 2001. Effect of formic acid and a bacterial inoculant on the amino acid composition of grass silage and on animal performance. *Grass and Forage Science* 56: 181- 192.

Liite 2

Tutkimuksessa mukana olleiden raaka-aineiden korjuutapa (esikuivatus, niitto- ja silppuamistapa, siilotyyppi sekä säilöntäaika). Taulukoissa esitetty havaintomäärät yhteensä sekä luokiteltuina sokeripitoisuuden mukaan. SOK1- luokassa vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus alle 15 g/kg (tuoreessa materiaalissa), SOK2-luokassa 15–30 g/kg ja SOK3-luokassa yli 30 g/kg.

	Yhteensä n	SOK1 n	SOK2 n	SOK3 n
TUORE REHU	100	41	43	16
ESIKUIVATTU	284	45	114	125
Kuivatusaika				
0–12 h	184	45	59	80
13–24 h	74		40	34
25–48 h	20		12	8
yli 48 h	6		3	3
KAIKKI YHT.	384	86	157	141
NIITTOTAPA				
Käsin, esim. sähkösakset	35	8	23	4
Ruutupuimuri	8		8	
Kelasilppuri	4			4
Kaksoissilppuri	24	4	14	6
Niittomurskain	63		16	47
YHTEENSÄ	134	12	61	61
SILPPURI				
Näytesilppuri	87	8	36	43
Rehusilppuri	6		6	
Kelasilppuri	8		4	4
Kaksoissilppuri	34	4	26	4
Tarkkuussilppuri	169	44	63	62
Paalain	27		18	9
YHTEENSÄ	331	56	153	122
SIILOTYYPPI				
Minisiilo (n.0,09 kg)	111	10	54	47
Laboratoriosiilo (0,5–5,0 kg)	109	46	43	20
Pilotsiilo (300–400 kg)	45		20	25
Pilotsiilo (1000–2000 kg)	18	5	13	
Laakasiilo (30 000–200 000 kg)	66	8	28	30
Torni (n. 1200 kg)	17	17		
Paali (n. 600 kg)	27		18	9
Auma (n. 100 000 kg)	3			3
YHTEENSÄ	396	86	176	134
SÄILÖNTÄAIKA				
50–100 vrk	210	52	93	65
101–200 vrk	193	45	80	68
201–282 vrk	25	4	10	11
YHTEENSÄ	428	101	183	144

Aineistossa mukana olleet säilöntäaineet esitettyinä säilöntäaineluokittain. Sulkeissa lisäksi julkaisun numero, missä säilöntäainetta käytetty.

Säilöntäaineluokka	Käytetty säilöntäaine
<u>MH</u>	MH 100 % [1, 2, 15, 16, 17, 21, 22, 23, 24, 34, 35, 36, 51, 54, 55] MH 90 % [60] MH 850 g/kg (85 % w/w) [3, 4, 6, 10, 11, 12, 18, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 46, 50, 52, 57, 58, 61, 62] MH 800 g/kg (80 % w/w), ortofosforihappo 20 g/kg (2 % w/w) [9, 13, 56, 59]
<u>MH_{seos}</u>	MH 80 % ja ammoniumformiaatti 5 % [18] MH 77,5 %, ortofosforihappo 2 % ja etyylibentsoaatti 2,5 %, w/w [23] MH 75 % ja ammoniumformiaatti 10 % [18] MH 76 % ja ammoniumformiaatti 5,5 % [45, 47, 48, 53] MH 67 %, propionihappo 5 %, etyylibentsoaatti 1,25 % ja bentsoehappo 1,25 %, w/w [23] MH 66,5 % ja propionihappo 33,5 % [57] MH 65 % ja ammoniumformiaatti 20 % [18] MH 55 % ja ammoniumformiaatti 30 % [18] MH 55 %, ammoniumformiaatti 24 %, propionihappo 5 %, etyylibentsoaatti 1 % ja bentsoehappo 1 %, w/w [14, 41, 42, 43, 44, 46, 48, 49] MH 52,3 %, ammoniumformiaatti 26,1 %, propionihappo 5,4 %, etyylibentsoaatti 1,1 % ja bentsoehappo 1,1 % [24] MH 50 % , rikkihappo 20 % ja formaliini 20 % [40] MH 45 % ja ammoniumformiaatti 40 % [18] MH 42,5 %, ammoniumformiaatti 30,3 %, propionihappo 10,0 % ja bentsoehappo 2,2 % w/w [19, 20] MH 36 % ja 64 % formaliini [7, 8] MH 25 %, lingnosulfinaatti 50 % ja etikkahappo 25 % [59] MH ja formaldehydi (0,51 - 1,5 %) [34, 35] Ammoniikkiheksametanaatti (ammoniumformiaatti) 68 %, heksapropaatti 10 % ja oktaanihappo 2 % [31, 37] MH ja ammoniumformiaatti [5]
<u>LAB</u>	<i>Lactobacillus plantarum</i> [1, 5, 6, 20, 29, 30, 34, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 62] <i>Lactobacillus buchneri</i> [2, 46, 50, 55] <i>Lactobacillus rhamnosus</i> [20, 46] <i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Lactobacillus buchneri</i> [46, 50] <i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Lactobacillus rhamnosus</i> [46] <i>Lactobacillus rhamnosus</i> + <i>Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii</i> [9, 14, 20, 21, 49, 50, 51, 52] <i>Lactobacillus rhamnosus</i> + <i>Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii</i> + <i>Lactobacillus buchneri</i> [50] <i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Streptococcus faecium</i> + <i>Pediococcus acidilactici</i> [58] <i>Lactobacillus buchneri</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Pediococcus pentosaceus</i> [2] <i>Pediococcus parvulus</i> [54] <i>Pediococcus pentosaceus</i> [54]

Lactobacillus plantarum, kaliumsorbaatti 0,3 kg/tn [44]
Lactobacillus plantarum, natriumbentsoaatti [47, 48, 53]
Lactobacillus plantarum, MH [47, 51, 53]
Lactobacillus plantarum, MH, natriumbentsoaatti [47, 53]
Lactobacillus plantarum, peptidaasi-inhibiittori [34]
Lactobacillus plantarum, ammonium polyakryyliamidi [29]
Lactobacillus plantarum, sellulolyttisiä entsyymejä [39]
Lactobacillus plantarum, *Streptococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*,
sellulaasi, hemisellulaasi, pentosanaasi ja amylaasi [38]
Lactobacillus plantarum, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis lac-*
tis, sellulaasi, hemisellulaasi, amiloglukosidaasi [26]
Lactobacillus plantarum, *Pediococcus cereviciae* ja sellulaasi- entsyymi
[32, 33]
Lactobacillus rhamnosus, *Propinibacterium freudenreichae ssp. Sher-*
manii, MH [51]
Lactobacillus buhneri, polysakkariidientsyymi [1]
Pediococcus acidilacti, *Lactobacillus plantarum*, sulfiittisuoloja [1]
Pediococcus acidilactici + *Lactobacillus plantarum* ja sellulaasi [15]
Sellulaasi- entsyymi [32, 33]
Sellulaasi- ja hemisellulaasientsyymi [15, 56]
Sellulaasi- ja hemisellulaasientsyymi ja lingniiniä modifoiva entsyymi [15]
Sellulaasientsyymi, MH (88 %) [32, 33]
Sellulaasi ja glukoosioksidaasientsyymi [59]

MH= muurahaishappo