

ERI MAITOHAPPOBAKTEERIEN JA NIIDEN
ANNOSTUSTASON VAIKUTUS SÄILÖREHUN
KÄYMISLAATUUN JA AEROBISEEN STABIILISUUTEEN

Laura Puhakka
Maisterin tutkielma
Kotieläinten ravitsemustiede
Maataloustieteiden laitos
Helsingin Yliopisto
Syyskuu 2011

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Maataloustieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Laura Puhakka			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Eri maitohappobakteerien ja niiden annostustason vaikutus säilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterin tutkielma		Aika — Datum — Month and year Syyskuu 2011	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 55 s.
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Tämän maisterin tutkielman tarkoituksena oli testata eri maitohappobakteerien ja niiden annostustason vaikutusta säilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen. Biologisilla säilöntäaineilla eli ympärillä säilöttyjen rehujen laatua verrattiin kontrolleina toimiviin painorehuun ja muurahaishapolla tehtyyn rehuun.</p> <p>Koerhut tehtiin Helsingin yliopiston Maataloustieteiden laitoksella 7.6.2010. Timotei (<i>Phleum pratense</i>) -nurminata (<i>Festuca pratensis</i>) kasvusto korjattiin tähkimisen alkuvaiheessa D-arvon ollessa 711 g/kg ka. Nurmikasvuston kuiva-ainepitoisuus oli 170 g/kg heti niiton jälkeen määritettäessä ja neljän tunnin esikuivaamisen jälkeen 208 g/kg. Rehuraaka-aine jaettiin kuuteen erään, joihin lisättiin säilöntäaine. Säilöntäainekäsittelyt olivat: 1) ei säilöntäainetta (painorehu), 2) muurahaishappo (100 %:na 4 l/t), 3) <i>Lactobacillus plantarum</i> ja <i>Pediococcus acidilactici</i> 1×10^6 pmy/g sekä pektinaasi-, ksylanaasi- ja sellulaasientsyymi, 4) <i>L. plantarum</i> 1×10^6 pmy/g, 5) <i>L. plantarum</i> 1×10^5 pmy/g ja 6) <i>L. plantarum</i> ja <i>L. buchneri</i> 2×10^5 pmy/g. Rehut säilöttiin laboratoriosiiloissa kolmena rinnakkaisena. Laboratoriosiilojen lisäksi rehua säilöttiin jokaisesta säilöntäainekäsittelystä kuuteen rinnakkaiseen minisiiloon säilönnän alkuaan fermentaation ja rehujen pH:n muutoksen seuraamiseksi. Minisiiloista seurattiin kaasuntuotantoa 21 päivän ajan. Raaka-aineen koostumus ja rehujen säilönnällinen laatu sekä aerobinen stabiilisuus määritettiin.</p> <p>Säilörehujen kuiva-ainepitoisuus oli suhteellisen pieni (n. 210 g/kg), jotta voitiin testata biologisten säilöntäaineiden tehoa määrässä rehussa. Kosteassa rehussa biologisten säilöntäaineiden toiminnan onnistuminen on haastavaa. Koska raaka-aineen sokeripitoisuus oli kuitenkin erittäin suuri (196 g/kg ka), onnistui ymppirehujen säilöntä hyvin. Kaikkien koerhujen pH oli alle 4:n. Painorehu ei täyttänyt hyvän rehun kriteerejä ammoniumtypen osalta. Muurahaishapporehu oli laadultaan tyydyttävää etikkahapon pitoisuuden osalta. Rehussa tapahtui epätyypillistä etanolikäymistä hiivojen toimesta, jonka johdosta rehussa muodostui suuri määrä kaasua säilönnän aikana. Muurahaishapporehu ei kuitenkaan lämmennyt aerobisen stabiilisuuden mittauksen aikana, johtuen todennäköisesti suuresta etikkahapon määrästä ja toisaalta pienestä sokerin määrästä.</p> <p>Maitohappobakteerisäilöntäaineilla saatiin käymislaadultaan parempaa säilörehua verrattuna painorehuun, lukuun ottamatta maitohappobakteeri-entsyymirehua. Entsyymilisäyksestä ei todennäköisesti ollut hyötyä rehun säilöntälaadun kannalta. Raaka-aineen suuren sokeripitoisuuden johdosta säilörehussa oli koko säilönnän ajan tarpeeksi sokeria maitohappobakteerien käytettäväksi ja sokeri toimi siten substraattina haitallisille mikrobeille tuottaen suuren etikkahappopitoisuuden. Maitohappobakteeri-entsyymiseoksella tehty rehu oli etikkahappopitoisuuden perusteella heikkolaatuista.</p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i>in molemmilla annostustasoilla (1×10^5 ja 1×10^6 pmy/g rehua) saatiin laadultaan hyvää rehua. Suuri sokeripitoisuus molemmissa rehuissa johtui todennäköisesti raaka-aineen tavallista suuremmasta sokerin määrästä. Molempien rehujen maitohappo-etikkahappo-suhde oli melko korkea, viitaten homofermentatiiviseen maitohappokäymiseen. <i>Lactobacillus buchneri</i> -lisäyksellä rehu oli säilönnälliseltä laadultaan hyvää. Heterofermentatiivisen ympin lisäys nosti tyypillisesti rehun pH:ta sekä pienensi maitohappo-etikkahappo-suhdelukua verrattuna homofermentatiiviseen ympiin. <i>L. buchneri</i> -lisäys paransi hieman säilörehun aerobista stabiilisuutta verrattuna homofermentatiivisella maitohappobakteerilla säilöttyyn rehuun, mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevää.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords maitohappobakteeri, säilörehu, säilöntäaine, käymislaatu, aerobinen stabiilisuus			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Viikin kampuskirjasto, Maataloustieteiden laitos, kotieläinten ravitsemustieteen kirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työn ohjaaja: Seija Jaakkola			

Sisällys

Lyhenteet.....	4
1. Johdanto	5
1.1 Säilönnän historia ja merkitys	5
1.2 Säilörehun käymiseen vaikuttavat tekijät.....	6
1.3 Maitohappobakteerit	9
1.4 Biologisten säilöntäaineiden valitseminen ja annostus.....	11
2. Aineisto ja menetelmät	16
2.1 Koerehujen valmistus ja säilöntäainekäsittelyt	16
2.2 Kaasuntuotannon mittaus	18
2.3 Näytteiden otto ja analysointi.....	18
2.4 Aerobisen stabiilisuuden määrittäminen	20
2.5 Tilastolliset analyysit	20
3. Tulokset	22
3.1 Kaasuntuotanto ja tuorepaino- sekä kuiva-ainetappiot.....	22
3.2 Kemiallinen koostumus.....	25
3.1.1 Raaka-aine	25
3.1.2 Säilörehu	25
3.3 Aerobinen stabiilisuus.....	29
4. Tulosten tarkastelu	31
4.1 Raaka-aine	31
4.2 Säilörehut	32
4.2.1 Säilörehujen yleinen laatu	32
4.2.2 Painorehu.....	34
4.2.3 Muurahaishapporehu.....	35
4.2.4 Entsyymilisen vaikutus säilöntälaatuun.....	37
4.2.5 Maitohappobakteerien annostustason vaikutus	38
5. Yhteenveto ja johtopäätökset	42
LÄHTEET	45

Lyhenteet

Säilöntäainekäsittelyt:

PR = painorehu

MH = muurahaishapolla säilötty rehu

LABE = *Lactobacillus plantarum* ja *Pediococcus acidilactici* -maitohappobakteerien sekä pektinaasi-, ksylanaasi- ja sellulaasientsyymien seos

LP6 = *L. plantarum* 1×10^6 pmy/g

LP5 = *L. plantarum* 1×10^5 pmy/g

LB = *L. plantarum* ja *L. buchneri* 2×10^5 pmy/g

pmy = pesäkkeitä muodostava yksikkö

1. Johdanto

1.1 Säilönnän historia ja merkitys

Säilörehun teon juuret ovat antiikin Kreikassa ja Egyptissä, joissa viljan jyviä ja rehuviljelykasveja on säilötty siiloissa jo 3000 vuotta sitten (Wilkinson ym. 2003). Yhden ensimmäisistä tieteellisistä rehun säilömismenetelmää käsittelevistä julkaisuista on kirjoittanut Grieswald vuonna 1842 (Woolford 1984). 1900-luvun alussa olivat säilömismenetelmät levinneet jo ympäri Eurooppaa ja Yhdysvaltoja, ja Suomessakin säilörehu toi ratkaisuja lypsykarjan talviseen vajaanruokintaan. Säilörehu oli kuitenkin laadultaan huonoa, minkä johdosta suomalaisen maidontuotannon ja meijeriteollisuuden laatuongelmat olivat yleisiä huolenaiheita. Ratkaisun toi 1920-luvun loppupuolella A. I. Virtasen kehittämä AIV-rehu ja myöhemmin 1950-luvulla uudistuneen rehun korjuutekniikan ja säilöntämenetelmien myötä erilaisten rehusäilöntäaineiden suosio ja käyttö yleistyivät huomattavasti niin Suomessa kuin muualla maailmassakin (Moisio ja Heikonen 1992).

Nykyään säilörehu on yksi tärkeimmistä lypsylehmille syötettävistä rehuista. Esimerkiksi 1990-luvun puolivälissä säilörehua tehtiin Euroopassa noin 550 miljoonaa tonnia ja Amerikassa noin 130 miljoonaa tonnia tuorepainona ilmaistuna (Wilkinson ym. 2003). Vuonna 2010 Suomessa tuotettiin nurmisäilörehua keskimäärin noin 18 000 kg/ha yhteensä noin 450 000 hehtaarin alalla (Tike 2010). Säilörehun teon onnistuminen riippuu sadosta, korjuu- ja varastointimenetelmästä sekä käytettävästä säilöntäaineesta. Suomessa hyvälaatuisella säilörehulla voidaan yhdessä eläinten hyvien elinolosuhteiden kanssa turvata maidontuotannon korkea tuotostaso ja taloudellisuus. Säilörehun laadulla on suuri vaikutus eläinten terveyteen ja hedelmällisyyteen. Hygieniatasoltaan heikko säilörehu voi sisältää homeita ja haitallisia bakteereja, jotka lehmän elimistöön kulkeutuessaan voivat aiheuttaa tulehduksia ja näkyä esimerkiksi maidon solupitoisuuden nousuna.

Huonolaatuisen rehun maittavuus on heikko, joka saattaa johtaa suurempaan väkirehun osuuteen dieetissä aiheuttaen pötsi- ja sorkkaongelmia. Säilörehun laatuominaisuudet vaikuttavat siis siihen, kuinka paljon lehmät sitä syövät. Syönti-indeksi kuvaa säilörehun suhteellista syöntipotentiaalia indeksipistearvon ollessa tyypillisesti 95 – 110 (Huh-
tanen ym. 2007, Rinne ym. 2008). Syönti-indeksiin vaikuttavat säilörehun kuiva-aineen,

sulavan orgaanisen aineen (D-arvo), kokonaishappojen ja kuidun (NDF) pitoisuudet, onko rehu ensimmäisestä sadosta vai jälkikasvusta tehty sekä palkokasvien ja kokoviljasäilörehun osuus. Säilörehun syönti-indeksi suurenee, kun D-arvo suurenee ja käymislaatu paranee.

1.2 Säilörehun käymiseen vaikuttavat tekijät

Säilörehun käymislaatuun eniten vaikuttavat tekijät ovat rehun kuiva-ainepitoisuus, vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus sekä rehun puskurikapasiteetti (Muck ja Kung 2007). Kasvien hiilihydraatit voidaan jakaa solunsisällyshiilihydraatteihin ja solunseinähiilihydraatteihin. NDF-menetelmän perusteella kasvien soluseinistä erotellaan pektiini, rakenteelliset polysakkaridit kuten hemiselluloosa ja selluloosa sekä ligniini (Soest ja Wine 1967). Solunsisällyshiilihydraatit koostuvat veteen liukenevista hiilihydraateista, kuten glukoosista, fruktoosista ja sakkaroosista, sekä varastohiilihydraateista, kuten tärkkelyksestä ja fruktaaneista. Vesiliukoisia hiilihydraatteja kutsutaan yleisesti sokereiksi. Säilönnän kannalta tärkeät maitohappobakteerit pystyvät käyttämään energianlähteenään ainoastaan kasvin sokereita. Glukoosi ja fruktoosi ovat tärkeimmät kasvien monosakkaridit, mutta lauhkean ilmaston nurmissa fruktaanit ovat yleisimpiä vesiliukoisia hiilihydraatteja (Beever ym. 2000). Kasvien sokeripitoisuus riippuu ympäristötekijöistä, erityisesti valosta ja lämpötilasta, ja voi siksi vaihdella suuresti kasvin kasvun aikana.

Välittömästi nurmikasvuston niittämisen jälkeen, esikuivauksen sekä fermentaation alussa, kasvimateriaalin koostumuksessa tapahtuu muutoksia kasvien entsyymien ja epifyyttisten mikrobien vaikutuksesta. Säilönnän tarkoitus on minimoida nämä muutokset kehittämällä nopeasti anaerobiset olosuhteet, jotka edistävät luonnollisesti kasveissa esiintyvien tai siihen lisättyjen maitohappobakteerien toimintaa. Anaerobiset olosuhteet sekä sokereiden ja muiden ravinteiden saatavuus edistävät maitohappobakteerien kasvua ja maitohapon tuottoa, jolloin rehun pH tyypillisesti laskee. Samalla kasvien entsyymien toiminta vähenee ja epätoivottujen, happamille olosuhteille ei-toleranttien mikrobien määrä laskee. (McDonald ym. 1991). Säilönnän periaatteita sovelletaan kaikissa säilöntätavoissa, kuten aumoissa, siiloissa ja paaleissa, mutta tyypillisiä säilönnällisiä eroja esiintyy. Esimerkiksi paaleihin säilötyssä rehussa on yleisesti suurempi kuiva-ainepitoisuus ja pidemmän silpun pituuden aiheuttama rajoitetumpi rehun fermentaatio verrattuna aumassa säilöttyyn rehuun (Merry ym. 2000).

Rehun pH ei ole riippuvainen ainoastaan mikrobien kyvystä tuottaa maitohappoa, vaan myös kasvimateriaalin puskurikapasiteetista eli kyvystä vastustaa pH:n muutosta. Organiset hapot, kuten sitruuna- ja omenahappo, niiden suolat ja fosforihappo muodostavat rehuun puskurikapasiteetin, jolla voi olla vaikutusta useiden mikrobien kasvuun. Säilönnän aikana puskurikapasiteetti voi vaihdella mikrobien toiminnan johdosta. Organisten happojen suolojen hajoaminen vapauttaa kationeja johtaen puskurikapasiteetin kasvuun, koska kationit sitoutuvat fermentaatiossa muodostuviin happoihin. Puskurikapasiteetti vaihtelee suuresti eri kasvilajikkeiden välillä. Esimerkiksi palkokasveilla on yleisesti suurempi puskurikapasiteetti verrattuna ruohokasveihin. Yleensä nurmisäilörehun pH:n laskemiseksi 4:ään tarvitaan maitohappoa 100 g/kg ka. (Woolford 1984).

Rehun käymisprosessi voidaan jakaa neljään vaiheeseen, joihin vaikuttavat säilönnän aikana rehun koostumuksessa tapahtuvat muutokset ja ympäristön olosuhteet (Weinberg ja Muck 1996). Aerobisessa vaiheessa pH:n ollessa 6,0 – 6,5, kasvipartikkeleiden väliin jäänyt happi mahdollistaa kasvien soluhengityksen, proteaasiaktiivisuuden ja aerobisten sekä fakultatiivisesti aerobisten mikrobien, kuten hiivojen, homeiden ja enterobakteerien, toiminnan jatkumisen. Jos siilon tiivistäminen on hidasta, voi edelleen jatkuvan soluhengityksen seurauksena kasvin solunsisällyshiilihydraattien määrä vähentyä, kun niitä muutetaan vedeksi, hiilidioksidiksi ja lämmöksi (McDonald ym. 1991). Tämä prosessi on epätoivottu, koska se vähentää ravitsemuksellisesti hyödyllisten sokereiden saatavuutta eläinten tarpeisiin. Toisaalta se on edullinen, koska se käyttää loppuun rehumassaan jäljelle jääneen hapen ja tarjoaa suotuisat anaerobiset olot maitohappobakteerien toiminnalle.

Käymisvaiheessa rehun luonnolliset tai siihen lisätyt maitohappobakteerit lisääntyvät ja muodostavat rehussa hallitsevan mikrobipopulaation. Aluksi muodostuu kaksi bakteeripopulaatiota, gram-positiiviset, fakultatiivisesti anaerobiset homo- ja heterofermentatiiviset maitohappobakteerit ja gram-negatiiviset, fakultatiivisesti anaerobiset enterobakteerit (Merry ym. 2000). Tämä vaihe voi kestää päivistä viikkoihin, joskus jopa kuukauden tai pidempään riippuen rehun koostumuksesta ja ympäristön olosuhteista. Rehussa muodostuu maitohappoa ja muita happoja laskien pH:n 3,8 – 5,0:n välille. Yleensä maitohappobakteerit hallitsevat fermentaatiota, koska enterobakteerit eivät siedä nopeasti laskevaa pH:ta (Merry ym. 1995).

Käymisvaiheen jälkeen seuraa vakaa tila, jolloin rehussa tapahtuu väin vähän muutoksia, jos ilman pääsy on estetty rehuun. Happamia oloja sietävät mikro-organismit, kuten klostridit ja basillit, voivat selvitä inaktiivisessa tilassa tai itiöinä. Myös happotolerantit entsyymit säilyvät aktiivisina aiheuttaen rakenteellisten sokereiden ja varastohiilihydraattien hidasta happohydrolyysiä (Pahlow ym. 2003). Rehun syöttövaiheessa rehu altistuu ilmalle uudelleen, jolloin aerobiset mikrobit, lähinnä hiivat, homeet, basillit ja etikkahappobakteerit, voivat aktivoitua uudelleen ja aiheuttaa rehun pilaantumisen (Weinberg ja Muck 1996).

Rehun pilaantuminen voidaan puolestaan jakaa kahteen vaiheeseen (Elferink ja Driehuis 2000). Primaarisessa pilaantumisvaiheessa hapen päästessä rehuun, pääasiassa hiivat ja joskus myös anaerobiset etikkahappobakteerit alkavat hajottaa rehua säilöviä orgaanisia happoja, joka saa aikaan rehun pH:n kohoamisen. Hiivat ovat useimmiten ensimmäisiä haitallisia mikrobeja rehussa, koska monet niistä pystyvät kasvamaan alhaisessa pH:ssa. Myös etikkahappobakteerit ja homeet pystyvät kasvamaan happamissa oloissa, mutta etikkahappobakteereita ei ole tavattu nurmisäilörehuissa ja homeet kasvavat hitaammin kuin hiivat (Muck 2010). Hiivat tuottavat pääasiassa etanolia ja hiilidioksidia fermentaation lopputuotteena (McDonald ym. 1991).

Pilaantumisen sekundaarisessa vaiheessa rehu lämpenee haitallisten mikrobien, kuten basillien, homeiden ja enterobakteerien, aktiivisuuden lisääntymisen myötä. Enterobakteerit voivat käyttää hapen tilalla nitraattia elektronin vastaanottajana, pelkistäen nitraattia nitriitiksi tai typpioksidiksi. Nitriitti ja typpioksidi inhiboivat klostridien kasvua (Pahlow ym. 2003). Enterobakteerit kilpailevat maitohappobakteerien kanssa rehun sokereista. Niiden pääsääntöinen fermentaatiotuote on etikkahappo, mutta ne tuottavat myös meripihkahappoa sekä 2,3-butaanidiolia (Muck 2010).

Clostridium-suvun bakteerit ovat pääsääntöisesti obligaatisti anaerobeja, joiden vaikutus näkyy vasta maitohappobakteerien kasvun pysähtymisen jälkeen, jos rehun kosteuspitoisuus ja lämpötila ovat kohonneet (Beever ym. 2000). Sakkarolyyttiset klostridit fermentoivat hiilihydraatteja, kun taas monet muut klostridit fermentoivat sekä hiilihydraatteja että proteiineja. Kolme yleisimmin säilörehuissa esiintyvää klostridiryhmää ovat proteolyyttiset klostridit, jotka fermentoivat aminohappoja ammoniakiksi, amiineiksi ja hiilidioksidiksi, *Clostridium butyricum* -ryhmä joka fermentoi hiilihydraatteja sekä *C. tyrobutyricum* -ryhmä, joka fermentoi joidenkin sokereiden lisäksi pääasiassa maito-

happoa (Pahlow ym. 2003). *C. butyricum*- ja *C. tyrobutyricum* -ryhmät tuottavat voi-happoa, etikkahappoa, vetyä ja hiilidioksidia (Muck 2010).

Listeria-sukuun kuuluvia bakteereja esiintyy suuria määriä erilaisissa säilörehuissa. Eri-tyisesti paalisäilörehu on altis *Listeria monocytogenes* -patogeenin leviämislle (Merry ym. 2000). Leviäminen tapahtuu yleensä joko maa-aineksen mukana, eläinten jätösten mukana tai eläinten levittämänä. Donald ym. (1995) havaitsivat listeriaa aiheuttavan *Listeria monocytogenes*in inhiboituvan alhaisessa pH:ssa, jos samanaikaisesti rehussa vallitsivat täydellisesti anaerobiset olosuhteet.

Homeet, kuten esimerkiksi *Aspergillus*- ja *Fusarium*-sukuihin kuuluvat homesienet, lisääntyvät säilörehussa yleensä vasta viimeisenä tuottaen hometoksiineja, joilla voi olla vakavia vaikutuksia niin eläinten kuin ihmistenkin terveyteen. Hometoksiinien vaikutuksia ovat mm. heikentynyt syönti, lisääntynyt luomisten määrä, hormonaaliset häiriöt ja heikentynyt immuunivaste. (Scudamore ja Livesey 1998). Yleisesti kaikki haitalliset säilörehuissa esiintyvät mikrobit alentavat rehun ravitsemuksellista arvoa ja lisäksi niillä on haitallisia vaikutuksia eläinten terveyteen ja esimerkiksi maidon laatuun.

1.3 Maitohappobakteerit

Kasveissa esiintyy luonnollisesti epifyyttisiä maitohappobakteereita, jotka fermentoivat solunsisällyshiilihydraatteja pääasiassa maitohapoksi ja muiksi orgaanisiksi hapoiksi anaerobisen käymisen kautta. Kasvimateriaalissa esiintyvät epifyyttiset maitohappobakteerit, joilla on merkitystä säilörehussa, kuuluvat *Lactobacillus*-, *Pediococcus*-, *Leuconostoc*-, *Enterococcus*-, *Lactococcus*- ja *Streptococcus*-sukuihin (Pahlow ym. 2003). Homofermentatiiviset pediokokit ja enterokokit aloittavat usein rehun käymisprosessin, happotolerantimpien laktobasillien vahvistaessa pH:n laskun (Merry ym. 2000). Suurin osa maitohappobakteereista on mesofiilisiä, eli ne voivat kasvaa 5 - 50 °C:een välillä, optimilämpötilan ollessa yleensä 25 - 40 °C (Pahlow ym. 2003). Maitohappobakteerien kyky syntetisoida kasvutekijöitä on rajoittunut, joten ne tarvitsevat kasvaakseen useita ravinteita, kuten mangaania (McDonald ym. 1991). Maitohappobakteereilla on todettu olevan antimikrobiaalisia vaikutuksia (Gollop ym. 2005).

Maitohappobakteerit hajottavat heksooseja joko glykolyysin (Embden–Meyerhof -reitti) tai 6-fosfoglykonaatti/fosfoketolaasitien (6-PG/PK-reitti) kautta (Axelsson 1998). Gly-

kolyysin lopputuotteena syntyy lähes yksinomaan maitohappoa, jonka johdosta metaboliaa kutsutaan homolaktiseksi fermentaatioksi. Glykolyysissä ei tapahdu rehun kuiva-aine- ja energiatappioita (McDonald ym. 1991). Heterolaktisessa fermentaatiossa 6-PG/PK-reitin tuloksena syntyy merkittäviä määriä muita lopputuotteita kuten etanolia, etikkahappoa ja hiilidioksidia maitohapon lisäksi (Axelsson 1998) ja kuiva-ainetappiot vaihtelevat 5 - 24 %:n välillä (McDonald ym. 1991). Edellä mainittujen sokerimetaboliareittien perusteella maitohappobakteerit voidaan jakaa obligaatteisesti homofermentatiivisiin, fakultatiivisesti heterofermentatiivisiin tai obligaatteisesti heterofermentatiivisiin maitohappobakteereihin.

Obligaattisesti homofermentatiiviset maitohappobakteerit, kuten *Pediococcus acidilactici*, tuottavat lähes ainoastaan maitohappoa heksooseista glykolyysin kautta, mutta eivät pysty hajottamaan pentooseja ja glukonaattia. Pentoosien hajotus ei onnistu siksi, että obligaatteisesti homofermentatiivisilta maitohappobakteereilta puuttuu fosfoketolaasi-entsyymi (Kandler 1983, Pahlow ym. 2003). Obligaattisesti heterofermentatiiviset maitohappobakteerit hajottavat puolestaan 6-PG/PK-reitin kautta sekä heksooseja että pentooseja, mutta toisin kuin homofermentatiiviset, ne hajottavat heksooseista yhtä monta moolia maitohappoa, hiilidioksidia ja etikkahappoa tai etanolia. (Hammes ym. 1992, Schleifer ja Ludwig 1995). Yleensä homofermentatiiviset maitohappobakteerit tuottavat kaksi moolia maitohappoa yhdestä moolista glukoosia, kun taas heterofermentatiiviset tuottavat glukoosista yhden moolin maitohappoa, yhden moolin hiilidioksidia ja joko yhden moolin etanolia tai yhden moolin etikkahappoa (Muck 2010). Obligaattisesti heterofermentatiivisilta maitohappobakteereilta puuttuu glykolyysiin tarvittava fruktoosidifosfaattialdolaasi, jonka avulla fruktoosi-1,6-difosfaatista muodostuu glyseraldehydi-3-fosfaatti ja dihydroksiasetonifosfaatti (Kandler 1983, Pahlow ym. 2003). On kuitenkin mahdollista, että käymistyyppi voi muuttua tietyissä olosuhteissa. Esimerkiksi glykolyysistä käymistyyppi voi muuttua heterolaktiseksi fermentaatioksi ja eräät homofermentatiivisina pidetyt maitohappobakteerit pystyvät käyttämään 6-PG/PK-reittiä fermentoidessaan tiettyjä substraatteja (Axelsson 1998).

Fakultatiivisesti heterofermentatiiviset maitohappobakteerit tuottavat myös pääsääntöisesti maitohappoa heksooseista glykolyysin avulla homofermentatiivisesti, mutta lisäksi ne hajottavat tiettyjä pentooseja heterofermentatiivisesti tuottaen maitohappoa, etikkahappoa sekä etanolia (Kandler 1983, Axelsson 1998). Näillä lajeilla pentoosien läsnäolo saa aikaan fosfoketolaasin induktion (Kandler 1983). Bakteerisolun sisällä pentoosit

fosforyloidaan ja muutetaan joko ribuloosi-5-fosfaatiksi tai ksyluloosi-5-fosfaatiksi, jotka voidaan liittää hajotettavaksi 6-PG/PK-reittiin. Hiilidioksidia ei muodostu ja koska dehydrogenaatiota ei tarvita välituotteen ksyluloosi-5-fosfaatin tuottamiseen, tulee asetyylifosfaatin pelkistymisestä etanoliksi tarpeetonta. Sen sijaan asetyylifosfaatti käytetään substraattitason fosforylaatioissa tuottaen etikkahappoa ja ATP:tä. Pentoosien fermentaatio tuottaa siis yhtä monta moolia maitohappoa ja etikkahappoa. (McDonald ym. 1991).

Maitohappobakteerien luokittelu ei ole kuitenkaan niin absoluuttista kuin on aikaisemmin luultu ja suurin osa maitohappobakteereista voi olla fakultatiivisesti heterofermentatiivisia (Axelsson 1998). Maitohappobakteerien erilaiset kasvuolosuhteet, kuten pH:n muutos tai substraatin rajallinen saanti, voivat vaikuttaa fermentaatioreitteihin ja siten lopputuotteiden muodostumiseen. Nämä muutokset voivat johtua muuntuneesta pyruvaattimetaboliasta, ulkoisen elektronin vastaanottajan käytöstä, kuten hapestä tai orgaanisista yhdisteistä, tai molemmista (Axelsson 1998). Pyruvaatti on avainasemassa monissa fermentaatioissa, jossa se toimii elektronin tai vedyn vastaanottajana ja se voi maitohapoksi pelkistymisen sijaan muuttua useiksi muiksi tuotteiksi, kuten asetoiniksi, diasetyyliksi, etikkahapoksi, muurahaishapoksi, hiilidioksidiksi, etanoliksi ja 2,3-butaanidioliksi (Kandler 1983).

1.4 Biologisten säilöntäaineiden valitseminen ja annostus

Säilörehuissa käytettävät säilöntäaineet voidaan jakaa useaan ryhmään, joista tärkeimmät ja eniten käytetyimmät perustuvat fermentaation kontrollointiin, joissa joko stimuloidaan tai estetään käymistä, sekä estetään ilmalle altistuneen säilörehun laadun heikkenemistä (McDonald ym. 1991). Happosäilöntäaineilla pyritään laskemaan pH nopeasti alas, jolloin fermentaatio estyy osittain. Biologiset säilöntäaineet puolestaan stimuloivat haluttua fermentaatiota, jolloin tuotettu maitohappo laskee rehun pH:n.

Erityisesti 1980- ja 1990-luvuilla on kiinnostus ja tutkimus kohdistunut biologisten säilöntäaineiden kehittelyyn ja käyttöön. Biologiset säilöntäaineet sisältävät yleensä maitohappobakteereja, jotka edesauttavat suotuisan maitohappokäymisen käynnistymistä säilörehussa. Säilöittäessä märkiä rehuja biologisilla säilöntäaineilla ei pH-lukua välttämättä saada laskemaan yhtä alas kuin käytettäessä happopohjaisia säilöntäaineita. Sen sijaan esikuivatussa rehussa voidaan saada pH putoamaan jopa alemmas kuin happo-

pohjaisella säilöntäaineella (Saarisalo ym. 2006a, Saarisalo ym. 2006b). Biologiset säilöntäaineet ovat turvallisia ja helppoja käsitellä, eivät aiheuta korroosiota maatalouskohteissa, eivät saastuta ympäristöä ja niitä pidetään luonnonmukaisina tuotteina. Useissa tutkimuksissa on todettu homofermentatiivisten maitohappobakteerisäilöntäaineiden parantavan esikuivatun nurmisäilölrehun säilönnällistä laatua verrattuna kontrollina toimivaan käsittelemättömään rehuun (Rooke ym. 1990, Driehuis ym. 1997, Saarisalo ym. 2006a, Saarisalo ym. 2006b).

Eräät eniten käytetyistä homofermentatiivisista maitohappobakteereista ovat *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentacaceus* ja *Enterococcus faecium* (Kung 2001). Mikrobisäilöntäaineet sisältävät yleensä yhtä tai useampaa bakteerikantaa, jotka on valittu joko niiden fermentaation dominointikyvyn tai synergisten vaikutusten perusteella. Esimerkiksi Fitzsimons ym. (1992) havaitsivat erään *P. acidilactici* -kannan stimuloivan *L. plantarumin* kasvua. On myös todettu, että *Enterococcus*-suku kasvaa nopeammin kuin *Pediococcus*, joka puolestaan on nopeampi kasvamaan kuin *Lactobacillus* (Kung 2001). Jotkin *Pediococcus*-kannat ovat tolerantimpia korkeille kuiva-ainepitoisuuksille kuin *Lactobacillus* ja niillä on myös laajempi optimaalinen lämpötila- ja pH-vaihtelualue (Kung 2001).

Säilölrehun käymisen myöhemmässä vaiheessa heterofermentatiiviset maitohappobakteerit muodostavat usein dominoivan bakteeripopulaation (Seale 1986). Heterofermentatiivisilla maitohappobakteereilla, kuten *L. plantarumin* heterolaktisilla kannoilla ja *L. buchnerilla*, on kyky parantaa säilölrehun aerobista stabiilisuutta. Mitä nopeammin rehu lämpenee säilytyksen jälkeen, kun ilma pääsee rehuun, sitä heikompi sen aerobinen stabiilisuus on. Heterofermentatiivisten maitohappobakteerikantojen lisäyksen vaikutuksia on tutkittu paljon erityisesti maissisäilölrehussa (Ranjit ja Kung 2000, Kristensen ym. 2010, Reich ja Kung 2010). Parantunut aerobinen stabiilisuus voi johtua *L. buchnerin* kyvystä fermentoida maitohappoa hapettomissa oloissa etikkahapoksi ja 1,2-propaanidioliksi (Oude Elferink ym. 2001). Etikka- ja propionihappojen määrän nousu *L. buchnerin* lisäyksen jälkeen paransi myös ohrasäilölrehun aerobista stabiilisuutta (Kung ja Ranjit 2001). Toisaalta lisääntynyt etikkahapon määrä voi vähentää syöntiä ja kuiva-ainehävikki voi olla suuri johtuen *L. buchnerin* metaboliasta (Kung 2001).

Myös *Propionibacterium*-suvun bakteereilla on kyky estää homeiden kasvua säilölrehuissa (Beck 1978). Ne pystyvät muuttamaan maitohappoa ja glukoosia etikka- ja pro-

pionihapoksi, jotka ovat ominaisuuksiltaan enemmän antifungaalisia kuin maitohappo. Pääasialliset syyt näiden organismien tehottomuuteen ovat niiden ehdoton anaerobisuus, hidas kasvu ja suhteellisen huono happamien olojen kestävyys (Kung ym. 2003a). Propionihappoa käytetään joissakin kemiallisissa säilöntäaineissa ja sen käytön on havaittu parantavan korkean kuiva-aineen nurmisäilörehun aerobista stabiilisuutta (Jaakkola ym. 2010).

Maitohappobakteerisäilöntäaineiden riittävä annostustaso on tärkeää, jotta lisätyt homofermentatiiviset maitohappobakteerit pystyvät dominoimaan kasvimateriaalissa usein luonnollisesti esiintyvien heterofermentatiivisten maitohappobakteerien toimintaa (Seale 1986). Homofermentaatio on toivotumpaa kuin heterofermentaatio, koska homolaktisessa fermentaatioissa maitohapon tuotto on tehokkaampaa. Pitt ja Leibensperger (1987) havaitsivat erilaisia mallintamistekniikoita käyttämällä, että lisätyllä maitohappobakteerisäilöntäaineella on vaikutusta säilörehun laatuun vain, jos rehuun lisätään 10-kertainen määrä maitohappobakteereita suhteessa rehun luonnolliseen maitohappobakteeriflooraan. Yleensä epifyyttinen maitohappobakteerifloora ei ylitä 1×10^5 pmy/g (pesäkkeitä muodostavaa yksikköä/g) tuoretta rehua. Pohjois-Amerikassa ja Euroopassa yleisimmin käytetty annostustaso homofermentatiivisille maitohappobakteerisäilöntäaineille on 1×10^5 pmy/g tuoretta rehua (Kung ym. 2003a). Myös suurempia annostustasoja käytetään tyypillisesti pienen kuiva-ainepitoisuuden nurmisäilörehuissa monissa osissa Eurooppaa (Kung 2001) ja Merryn ym. (2000) mukaan useimmat Euroopassa käytettävistä maitohappobakteerisäilöntäaineista annostellaan 1×10^6 -tasolla.

Säilöntäaineisiin lisätyillä entsyymeillä voidaan hajottaa säilörehun solunseinähiilihydraatteja veteen liukeneviksi hiilihydraateiksi, joita maitohappobakteerit voivat hyödyntää (Jaakkola 1990, Kung ym. 1991, Selmer-Olsen ym. 1993a, Sheperd ym. 1995). Mikrobisäilöntäaineisiin yhdistetyt sellulaasi ja hemisellulaasi ovat yleisimmin käytettyjä entsyymikomplekseja (Kung ym. 2003a). Monet tekijät, kuten rehun pinnassa ja entsyymien kiinnittymiskohdissa vallitsevat olosuhteet, kosteuspitoisuus ja kasvien proteaasit voivat inhiboida entsyymien toimintaa (Kung ym. 2003a). Selluloosan ja hemiselluloosan hajottaminen vaatii useita entsyymejä, joiden suhteellinen osuus ja aktiivisuus säilöntäaineessa vaikuttavat soluseinien hajottamisen tehokkuuteen (McAllister ym. 2001). Esimerkiksi sellulaasientsyymit ovat komplekseja, jotka koostuvat erilaisista endo- ja ekso- β -glukanaaseista, sellobiohydrolaaseista ja sellobiaaseista (Bhat ja Haz-

lewood 2001). Täydellinen sulamattoman selluloosan hajoaminen glukoosiksi vaatii useamman entsyymin synergististä toimintaa (Kung ym. 1991).

Entsyymeistä on eniten hyötyä rehuissa, joiden sokeripitoisuus on alhainen. Entsyymilisäyksellä on todettu olevan suurempi vaikutus nurmikasveissa kuin palkokasveissa (Henderson ym. 1982). Vaikutus on suurempi myös nuorissa kuin enemmän ligniiniä sisältävissä vanhoissa kasveissa (Buxton ja Russell 1988, Nadeau ym. 2000). Van Vuuren ym. (1989) havaitsivat myös, että mitä vanhempaa kasvimateriaali on ja mitä suurempi kuiva-ainepitoisuus siinä on, sitä vähemmän on rehuun lisätyillä entsyymeillä vaikutusta solunseinäkomponenttien hajoitukseen. Ligniini yhdessä hemiselluloosan kanssa suojelee selluloosaa entsyymaattiselta hydrolyysiltä (Hatfield 1993) ja selluloosan hajoamisvauhti riippuu sellulolyttisille entsyymeille tarjolla olevasta kasvimateriaalin pinta-alasta (Weimer ym. 1990). Pekiini on puolestaan kiinnittyneenä ligniini-hemiselluloosakompleksiin (Hatfield 1993).

Nadeau ym. (2000) havaitsivat NDF- ja selluloosapitoisuuksien pienenevän, kun koiranheinä- ja sinimaillassäilörehuun lisättiin sellulaasi tai sellulaasi-hemisellulaasisekoitus. Samanlaisia tuloksia on saatu nurmisäilörehussa myös Jaakkolan (1990) ja Selmer-Olsen ym. (1993a) tutkimuksissa. Toisaalta on myös saatu päinvastaisia tuloksia, joissa entsyymilisällä oli pieni tai ei ollenkaan vaikutusta NDF- ja selluloosapitoisuuksiin sinimaillassäilörehussa (Kung ym. 1991, Tengerdy ym. 1991). Entsyymit yhdessä säilöntäaineen kanssa voivat parantaa fermentaatiota ja vähentää proteolyysiä (Sheperd ym. 1995), kun taas entsyymeillä yksin käytettynä voi olla vaihtelevia vaikutuksia (Jaakkola 1990, Selmer-Olsen ym. 1993a). Selmer-Olsen ym. (1993b) havaitsivat entsyymilisäyksen parantavan italian raiheinäsäilörehun aerobista stabiilisuutta, mutta esimerkiksi Spoelstra ym. (1992) tutkimuksessa maissisäilörehun aerobinen stabiilisuus oli huomattavasti parempi entsyymilisäyksellä verrattuna painorehuun. Entsyymien lisäyksen muita ongelmia ovat mm. puristenesteen muodostuminen ja kuiva-ainehävikki (Jaakkola ym. 1991).

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää eri maitohappobakteerien ja homofermenttiivisten maitohappobakteerien annostustason vaikutusta erittäin vähän esikuivatun nurmisäilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen säilönnän jälkeen. Biologisilla säilöntäaineilla säilöttyjen säilörehujen laatua verrattiin painorehuun ja muurahais-*hapolla* tehtyyn säilörehuun. Tutkimuksen tärkeimmät hypoteesit olivat: 1) biologisilla säilöntäaineilla säilöttyjen rehujen eli ymppirehujen säilönnällinen laatu on parempi

verrattuna painorehuun, 2) *Lactobacillus plantarum*in suuremmalla annostustasolla (1×10^6 pmy/g) saadaan parempilaatuista säilörehua verrattuna pienempään annostustasoon (1×10^5 pmy/g) ja 3) *Lactobacillus buchneri*in lisäys muuttaa rehun käymistuotteiden määriä ja parantaa säilörehun aerobista stabiilisuutta.

2. Aineisto ja menetelmät

2.1 Koerehujen valmistus ja säilöntäainekäsittelyt

Tutkimus tehtiin Helsingin Yliopiston Maataloustieteiden laitoksella. Koerehut tehtiin Viikin opetus- ja tutkimustilan Pertunpelto-lohkolta 7.6.2010. Lohko lannoitettiin 3.5.2011 Pellon Y1-lannoitteella (N-P-K, 26-2-3) 375 kg/ha. Lohko toimi myös tarkennetun typpilannoituksen näytelohkona. Kolmannen vuoden timotei (*Phleum pratense*) -nurminata (*Festuca pratensis*) kasvusto korjattiin tähkimisen alkuvaiheessa Darvotavoitteen ollessa 690 – 720 g/kg ka. Kasvusto niitettiin niittomurskaimella (Krone Easycut 3210) klo 7.00 ja 8.00 välisenä aikana ja esikuivattiin pellolla noin neljän tunnin ajan. Sää oli niittohetkellä ja esikuivauksen ajan puolipilvinen ja lämpötila kohosi aamupäivän aikana noin 4 °C (klo 6.50 +12 °C ja klo 11.40 +16 °C). Ilman kosteus oli 76 % klo 6.50 ja laski 54 %:iin klo 11.40:een mennessä. Tuulen nopeus oli koko aamupäivän ajan n. 2 m/s. Nurmikasvuston kuiva-ainepitoisuus oli 170 g/kg heti niiton jälkeen määritettäessä. Rehujen kuiva-ainetavoite oli 200 – 250 g/kg. Kuivumista seurattiin mikroaaltouunissa tehtävien pikamääritysten avulla (teho 800 W, kuivausaika 5 - 8 min.).

Säilöttävä ruohoerä silputtiin näytesilppurilla (Wintersteigner[®], Ried im Innkreis, Itävalta), jonka jälkeen silputusta ja sekoitetusta rehuraaka-aineesta punnittiin kuusi 5 kg:n erää. Rehuerät levitettiin muovin päälle, jonka jälkeen suihkupullosta suihkutettiin säilöntäaine kolmessa erässä rehuun. Rehumassaa sekoitettiin huolellisesti säilöntäaineen lisäyksen aikana ja sen jälkeen. Kaikki säilöntäaineet laimennettiin vesijohtovedellä niin, että niiden annostus oli 10 ml/kg. Painorehuun lisättiin pelkästään vettä. Säilöntäainekäsittelyt olivat (Taulukko 1):

- 1) ei säilöntäainetta (painorehu) (PR),
- 2) muurahaishappo (100 %:na 4 l/t) (MH),
- 3) *L. plantarum* (DSM 11672) ja *Pediococcus acidilactici* (DSM 11673) 1×10^6 pmy/g sekä pektinaasi-, ksylanaasi- ja sellulaasientsyymi (LABE),
- 4) *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) 1×10^6 pmy/g (LP6),
- 5) *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) 1×10^5 pmy/g (LP5) ja
- 6) *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) (LP5) ja *L. buchneri* (DSM 13573) (LB) 2×10^5 pmy/g.

Taulukko 1. Säilöntäainekäsittelyt.

Käsittely/Rehu	Lyhenne	Säilöntäaine/ DSM No	Kauppanimi	Annostustaso
Painorehu (kontrolli)	PR			
Muurahaishapporehu	MH	98 % HCOOH		4l/tn ¹
Homofermentatiiviset maitohappobakteerit ja entsyymit	LABE	<i>Lactobacillus plantarum</i> /11672 <i>Pediococcus acidilactici</i> /11673 sellulaasi/IUB-no 3.2.1.4 pektinaasi/IUB-no 3.2.1.15 ksylanaasi/IUB-no 3.2.1.8	Josilac	1x10 ⁶ pmy ² /g
Homofermentatiiviset maitohappobakteerit	LP6	<i>Lactobacillus plantarum</i> /3676 <i>Lactobacillus plantarum</i> /3677	Agrosil Premium	1x10 ⁶ pmy/g
Homofermentatiiviset maitohappobakteerit	LP5	<i>Lactobacillus plantarum</i> /3676 <i>Lactobacillus plantarum</i> /3677	Agrosil	1x10 ⁵ pmy/g
Homofermentatiiviset maitohappobakteerit ja heterofermentatiivinen maitohappobakteeri	LB	<i>Lactobacillus plantarum</i> /3676 <i>Lactobacillus plantarum</i> /3677 <i>Lactobacillus buchneri</i> /13573 (<i>L. plantarum</i> : <i>L. buchneri</i> =1:1)	Agrosil Pro	2x10 ⁵ pmy/g

¹100 % hapoksi ilmaistuna²pmy=pesäkkeitä muodostavaa yksikköä

Rehujen valmistuksessa käytettiin kertakäyttöhansikkaita ja rehun kanssa kosketuksissa olevat välineet ja astiat puhdistettiin käsittelyiden välillä 70 %:lla etanolilla. Rehut säilöttiin lasisiin 1,5 litran laboratoriosiiloihin (Weck[®], Wher-Oflingen, Saksa) ja jokaista säilöntäainekäsittelyä tehtiin kolme rinnakkaista siiloa eli yhteensä 18 siiloa. Siilot täytettiin puisten täyttösauvojen avulla mahdollisimman täyteen niin, että jokaiseen siiloon tuli 900 g rehua, jolloin siilon sisältämän rehun tiheydeksi tuli 600 kg/m³. Siilot suljettiin lasikansilla, jotka tiivistettiin ilmatiiviksi kumitiivisteillä ja metallijousilla. Siilot säilytettiin valolta suojattuna koneellisesti säädettyssä vakiolämpötilassa (20 °C:ssa) 119 vuorokautta (7.6.2010 – 4.10.2010). Siilot punnittiin ilman kansia ja tiivisteitä tyhjänä, täytettynä ja säilönnän jälkeen juuri ennen tyhjennystä painohävikin laskemista varten.

2.2 Kaasuntuotannon mittaus

Laboratoriosiilojen lisäksi rehua säilöttiin jokaisesta säilöntäainekäsittelystä 95 g kuu-teen rinnakkaiseen 120 ml:n minisiiloon säilönnän alkuajan fermentaation ja rehujen pH:n muutoksen seuraamiseksi. Minisiilot suljettiin kumi- ja kierrekorkeilla. Jokaisen säilöntäainekäsittelyn rinnakkaisista minisiiloista avattiin kaksi 1, 3 ja 21 päivän kuluttua säilönnästä, jolloin määritettiin välittömästi rehun pH (Knick 716, Saksa). Kaikista säilöntäainekäsittelyiden minisiiloista seurattiin kaasuntuotantoa yhteensä 21 päivän ajan. Kaasu mitattiin aluksi päivittäin ja viidennen päivän jälkeen joka 3. – 4. päivä. Muodostunut kaasu poistettiin minisiilosta neulan avulla kumikorkin läpi ilmapalloon ja johdettiin kolmitiehanan kautta vedessä olevaan mittapipettiin, josta kaasun määrä pystyttiin mittaamaan pipetin vedenpinnan muutoksen perusteella.

Kaasuntuotannon lisäksi minisiiloista laskettiin niiden tuorepainotappiot. Tappiot laskettiin jokaisesta siilosta vähentämällä siiloon säilötyn rehun lopullinen paino rehun alkuperäisestä painosta ja jakamalla tulos alkuperäisellä painolla.

2.3 Näytteiden otto ja analysointi

Silputusta ruohoerästä otettiin raaka-ainenäyte juuri ennen laboratoriosiilojen täyttöä. Primäärinen kuiva-aine määritettiin kuivaamalla raaka-ainenäytettä lämpökaapissa noin 100 °C:ssa 24 tunnin ajan. Lisäksi raaka-ainenäytteestä tehtiin analyysinäyte kuivaamalla sitä lämpökaapissa n. 100 °C:ssa tunnin ajan, jonka jälkeen loppukuivaus suoritettiin 50 °C:ssa kaksi vuorokautta. Kuivatusta analyysinäytteestä määritettiin sekundäärinen

kuiva-aine, tuhka, neutraalidetergenttikuitu (NDF) ja *in vitro* -sulavuus. Tuhka määritettiin standardianalyysin (AOAC 1990, No 942.05) mukaan, jossa näyte tuhkattiin muhveliuunissa 600 °C:ssa noin 18 tunnin ajan. NDF määritettiin Van Soestin ym. (1991) mukaan ja *in vitro* -sulavuus sellulaasi-menetelmällä (Friedel 1990) käyttäen laskennassa kotimaisiin tutkimuksiin perustuvia korjauskaavoja (Nousiainen ym. 2003, Huhtanen ym. 2006).

Lisäksi raaka-aineesta pakastettiin näytteet typen, liukoisen typen ja sokerin määrittämistä varten. Typpi ja liukoinen typpi määritettiin Kjeldahlin menetelmällä (Ogg 1960) sekä sokeripitoisuus Somogyin (1945) ja Salon (1965) menetelmien mukaan. Raaka-alkuainepitoisuus saatiin kertomalla määritetty kokonaistyyppi luvulla 6,25. Puskurikapasiteetin (Weissbach 1992) määrittämistä varten näyte kylmäkuivattiin (Christ gamma 2-20). Lisäksi rehuraaka-aineen fermentaatiokerroin laskettiin kaavalla

$FC = DM + 8 * \frac{WSC}{BC}$, jossa FC = fermentaatiokerroin, DM = kuiva-ainepitoisuus (%), WSC = sokeripitoisuus (g/kg ka) ja BC = puskurikapasiteetti (Schmidt ym. 1971).

Laboratoriosiilojen avauksen yhteydessä jokaisesta siilosta pakastettiin 420 g erikoisanalyysinäytteeksi ja 460 g käytettiin aerobisen stabiilisuuden määrittämiseen. Lopusta rehumassasta määritettiin pH (Knick 716, Saksa). Avauksen yhteydessä pakastetuista erikoisanalyysinäytteistä määritettiin primäärinen kuiva-aine, tuhka, kokonaistyyppi ja sokeri kuten raaka-aineen analyysin yhteydessä. Säilörehun kuiva-aineen haihtuvien ainesosien vaikutus korjattiin Huidan ym. (1986) mukaan. Kuiva-ainetappiot säilönnän jälkeen laskettiin käyttäen edellä mainittua korjausta ja ilman sitä.

Lisäksi säilörehusta määritettiin ammoniumtyppi McCulloughin (1967) mukaan ja maitohappo kolorimetrisesti (Barker ja Summerson 1941). Haihtuvat rasvahapot eli VFA määritettiin nestekromatografisesti UPLC-menetelmällä. Etanoli määritettiin entsymaattisesti (Cat. No 10 176 290 035, Boehringer Mannheim, Saksa). Säilörehujen pH mitattiin erikoisanalyysinäytteen suodoksesta pH-mittarilla (Knick 716, Saksa).

2.4 Aerobisen stabiilisuuden määrittäminen

Aerobinen stabiilisuus määritettiin seuraamalla rehun lämpötilan muutosta sen joutuessa ilman vaikutuksen alaiseksi. Laboratoriosiilojen avauksen yhteydessä otettu näyte sijoitettiin välittömästi muovipussissa styroxlaatikkoon. Styroxlaatikon pohjassa ja kannessa olevien reikien kautta ilma pääsi lämpötilaan rehun lämpötilaan, jonka keskikohtaan oli sijoitettu data logger-laite (MicroLite, Fourier Systems/Dostmann electronic GmbH). Data loggerin anturin mittauskohta asetettiin osoittamaan alaspäin keskelle rehunäytettä. Data loggereita oli yhteensä 15 kappaletta, joten yhdestä PR-, MH- ja LP6-rehunäytteestä jäi saamatta lämpötilan nousun tulokset. Styrox-laatikot sijoitettiin kyljelleen kasvatuskaappiin (WEISS Umwelttechnik GmbH), jonka vakio- $\text{+20 }^{\circ}\text{C}$. Yhdellä data-loggerilla seurattiin kasvatuskaapin lämpötilaa. Rehujen lämpötilan kehitystä seurattiin 14 vuorokauden ajan. Lämpötilat kirjautuivat data loggeriin viiden minuutin välein. Lämpötiladata purettiin tietokoneelle suoraan data loggerin USB-portin kautta. Aineistosta selvitetään jokaiselle rehunäytteelle ajankohta, jolloin rehun lämpötilan ja kaapin lämpötilan välinen ero saavutti $2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lisäksi laskettiin lämpötilan kumulatiivinen summa, jossa rehun lämpötilasta vähennettiin huoneen lämpötila. Summa laskettiin päivän lämpötilamittausten keskiarvona.

2.5 Tilastolliset analyysit

Tulosten tilastollinen testaus toteutettiin SAS 9.2:n GLM-proseduurilla käyttäen varianssianalyysia. Testissä selvitetään säilöntäainekäsittelyn vaikutus säilörehun käymislaatuun, aerobiseen stabiilisuuteen, tuore- sekä kuiva-ainetappioihin ja kaasun muodostukseen. Tilastollisena mallina käytettiin yhtälöä $Y = \mu_i + a_j + e_{ijk}$, jossa Y on havainto, μ on yleiskeskisarvo, a on käsittelyn vaikutus ja e on virhetermi. Hajonnan kuvaajana käytettiin keskiarvon keskivirhettä (SEM). Säilöntäainekäsittelyn neliosuma jaettiin ortogonaalisiin kontrasteihin seuraavasti:

- 1) Muurahaishapporehua verrattiin muihin rehuihin (MH vs muut)
- 2) Painorehua verrattiin biologisella säilöntäaineella käsiteltyihin rehuihin (=ymppirehut) (PR vs ympit)
- 3) *Lactobacillus plantarum* ja *Pediococcus acidilactici* –maitohappobakteerien ja entsyymien seoksella säilöttyä rehua verrattiin muihin ymppirehuihin (LBE vs muut ympit)

- 4) *Lactobacillus plantarum* – annostustason vaikutus (LP6 vs LP5)
- 5) *Lactobacillus buchneri* lisäyksen vaikutus (LP5 vs LB)

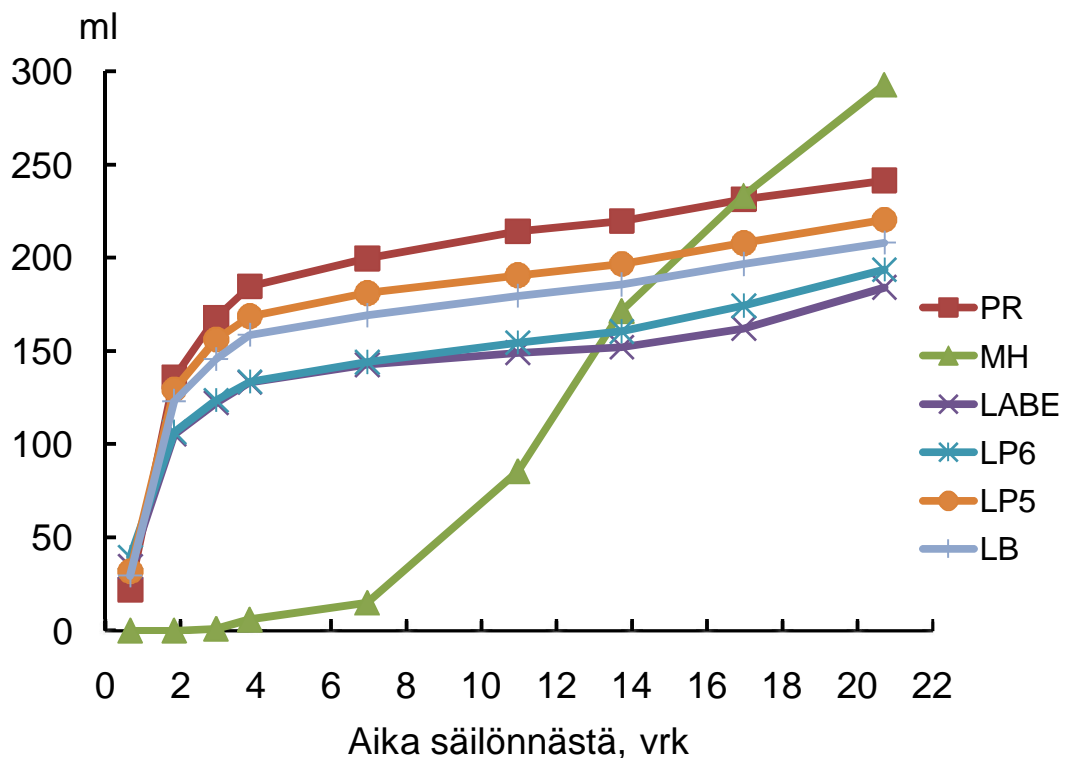
Merkitsevyydet ilmaistaan P-arvoina, joissa $P < 0,001$ = erittäin merkitsevä, $P < 0,01$ = hyvin merkitsevä, $P < 0,05$ = merkitsevä ja $P < 0,10$ = suuntaa-antava.

3. Tulokset

3.1 Kaasuntuotanto ja tuorepaino- sekä kuiva-ainetappiot

Muiden kuin MH-rehun kaasunmuodostus oli melko voimakasta ensimmäisten neljän päivän ajan (Kuvio 1). MH-rehun kaasuntuotanto oli vähäistä säilönnän alussa, mutta lisääntyi voimakkaasti ensimmäisen säilöntäviikon jälkeen tuottaen lopulta suurimman kaasun määrän verrattuna muihin rehuihin ($P < 0,001$) (Taulukko 2). Kaasua muodostui MH-rehussa 21 vrk:n aikana lähes 300 ml, kun muissa rehuissa kaasun määrä oli 150 – 250 ml. PR-rehussa muodostui kaasua hieman enemmän verrattuna ymppirehuihin ($P < 0,10$).

MH-rehussa tuorepainotappio oli hieman suurempi kuin muissa rehuissa kuten myös LP5-rehussa verrattuna LP6-rehuun ($P < 0,05$) (Taulukko 2). Numeerisesti tuorepainotappio oli kaikissa rehuissa pieni.



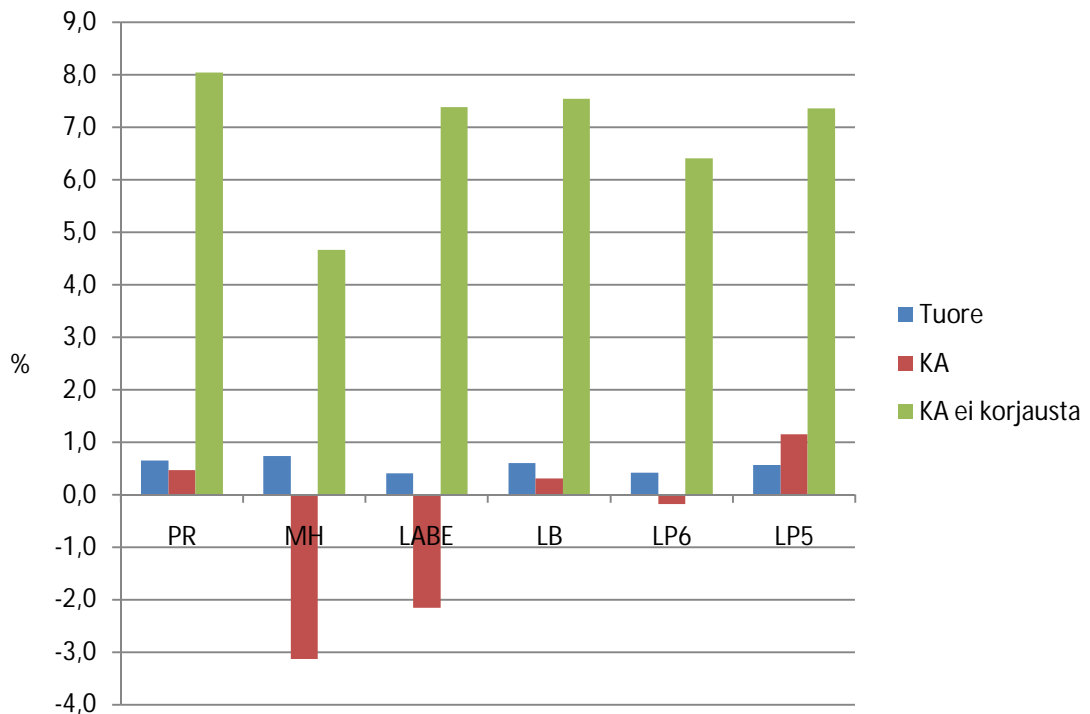
Kuvio 1. Kaasunmuodostus säilönnän alussa (21 vrk) minisiiloissa.

Taulukko 2. Kaasunmuodostus ja tuorepainotappio säilöntäajan alussa (21 vrk) minisiiloissa ja aerobinen stabiilisuus isojen siilojen rehuissa.

	Säilöntäaineet						SEM	Tilastollinen merkitsevyys				
	PR	MH	LABE	LP6	LP5	LB		MH vs. muut	PR vs. ympit	LABE vs. muut ympit	LP6 vs. LP5	LB vs. LP5
Kaasu, ml	233	293	183	195	221	211	12,0	***	o			
Kaasu, ml/g ka	11,8	14,8	9,2	9,9	11,2	10,7	0,61	***	o			
Tuoretappio, %	0,53	0,67	0,44	0,34	0,52	0,49	0,052	*			*	
Aerobinen stabiilisuus												
Lämpötilaero 2 °C, vrk	3,45	- ¹	3,39	2,33	4,36	7,04	1,890	***				
Lämpötilasumma, °C	39,7	3,3	18,0	54,3	44,3	30,4	8,70	**		*		

¹MH-rehu ei lämmennyt mittausaikana. PR= painorehu, MH= muurahaishappo (100 %:na 4 l/t), LABE= *L. plantarum* (DSM 11672) ja *Pediococcus acidilactici* (DSM 11673) 1x10⁶ pmy/g sekä pektinaasi-, ksylanaasi- ja sellulaasientsyymi, LP6= *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) 1x10⁶ pmy/g, LP5= *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) 1x10⁵ pmy/g ja LB= *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) ja *L. buchneri* (DSM 13573) 2x10⁵ pmy/g. SEM= keskiarvon keskivirhe. MH vs muut= muurahaishapporehua verrattiin muihin rehuihin, PR vs ympit= painorehua verrattiin biologisilla säilöntäaineilla käsiteltyihin rehuihin (=ymppirehut), LABE vs muut ympit= maitohappobakteeri-entsyymiseos verrattuna muihin ymppirehuihin, LP6 vs LP5= *Lactobacillus plantarum* – annostustason vaikutus, LP5 vs LB= *Lactobacillus buchneri* lisäyksen vaikutus. ***= P < 0,001, **= P < 0,01, *= P < 0,05, o= P < 0,10.

Laboratoriosiilojen avauksen yhteydessä havaittiin yhdessä PR-siilossa ja yhdessä LB-siilossa pieni homekasvusto. Muut laboratoriosiilot olivat ulkonäöltään moitteettomia. Kuviossa 2 on esitetty säilöntäainekäsittelyn vaikutus tuorepainotappioihin ja kuiva-ainetappioihin laboratoriosiiloissa. Kuiva-ainetappio laskettiin käyttäen säilörehun kuiva-ainepitoisuudessa haihtuvien aineiden korjausta (Huida ym. 1986) tai ilman sitä. Kuiva-ainetappiot Huidan ym. (1986) mukaan tehdyn korjauksen tuloksena olivat MH-, LABE- ja LP6-rehujen osalta negatiiviset, joten kuiva-ainetappiot laskettiin lisäksi ilman korjausta. Tällöin kuiva-ainetappiot vaihtelivat noin 4,5 – 8 %:n välillä ollen suurin PR-rehussa ja pienin MH-rehussa.



Kuvio 2. Säilöntäainekäsittelyn vaikutus tuorepaino- ja kuiva-ainetappioihin laboratoriosiiloissa, joko laskettuna säilörehun kuiva-pitoisuudessa haihtuvien aineiden korjauksen kanssa (Huida ym. 1986) tai ilman sitä.

3.2 Kemiallinen koostumus

3.1.1 Raaka-aine

Raaka-aineen kuiva-aine oli 208 g/kg ja D-arvo 711 g/kg ka, jotka vastasivat tavoitearvoja hyvin (Taulukko 3). Sokeripitoisuus oli hyvin suuri, 196 g/kg ka. Raaka-aineen puskurikapasiteetti oli melko korkea, 559 mekv/kg (milliekvivalenttia/kg) ka ja fermentaatiokerroin 52.

Taulukko 3. Raaka-aineen koostumus (g/kg ka ellei toisin mainittu).

Kuiva-aine, g/kg	208
Tuhka	64,4
Raakavalkuainen	133
NDF	543
Sokeri	196
D-arvo	711
Puskurikapasiteetti, mekv/kg ka	559
Fermentaatiokerroin	52

NDF = neutraalidetergenttikuitu

D-arvo = sulavan orgaanisen aineen osuus kuiva-aineesta

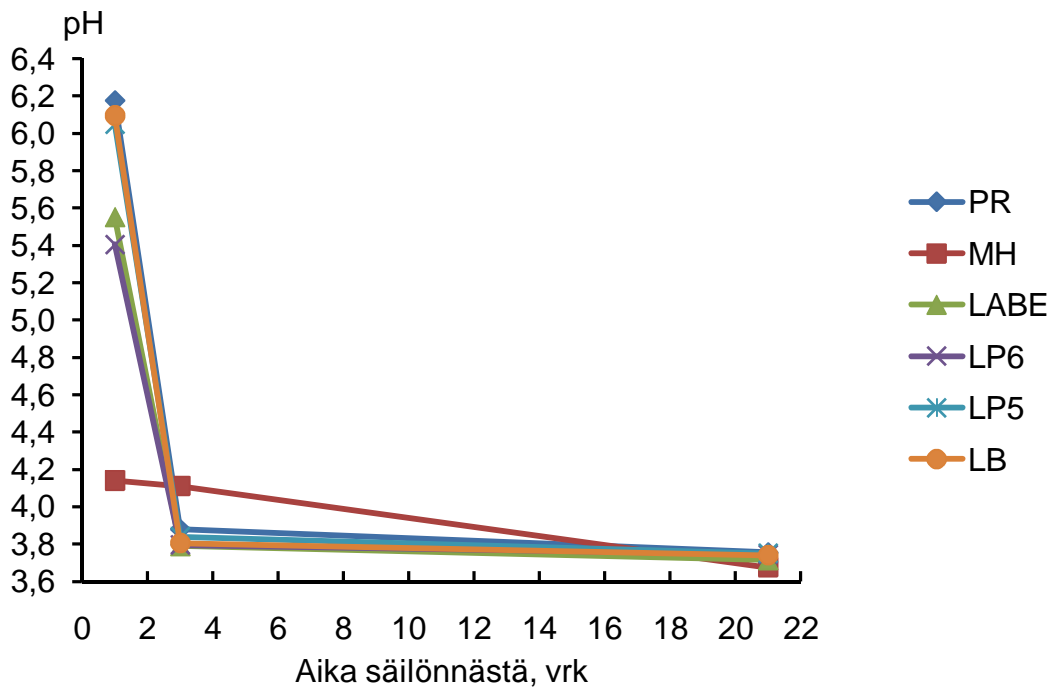
mekv = milliekvivalentti

3.1.2 Säilörehu

Rehujen kuiva-ainepitoisuus vaihteli välillä 207 - 216 g/kg (Taulukko 4). MH-rehun kuiva-ainepitoisuus oli muita rehuja suurempi ($P < 0,001$). Myös LABE-rehun kuiva-ainepitoisuus oli suurempi ($P < 0,001$) verrattaessa sitä muihin ymppirehuihin. Numeeriset erot olivat kuitenkin melko pienet. Raakavalkuaispitoisuus oli hieman pienempi PR-rehussa verrattuna ymppirehuihin, MH-rehussa verrattuina kaikkiin muihin rehuihin ja LABE-rehussa verrattuna muihin ymppirehuihin ($P < 0,05$).

Minisiiloissa säilöttyjen nurmirehujen fermentaatiota seurattiin mittaamalla pH 1, 3 ja 21 vuorokautta säilönnän jälkeen (Kuvio 3). MH-rehun pH laski yhden päivän jälkeen noin 4,1:een kun taas kontrollina toimivan PR-rehun ja ymppirehujen pH oli yhden päivän säilönnän jälkeen 5,4 – 6,2. Säilönnän kolmantena päivänä PR-rehun ja ymppirehu-

jen pH laski voimakkaasti alle pH 4:n, kun taas muurahaishapporehun jo valmiiksi alhaisessa pH:ssa ei tapahtunut suurta laskua. Kaikkien rehujen pH oli noin 3,7 kolmen viikon säilönnän jälkeen. Laboratoriosiilojen MH-rehun pH oli alhaisempi verrattuna muiden rehujen keskimääräiseen pH-lukemaan säilöntäajan lopussa ($P < 0,001$). PR-rehun pH oli puolestaan korkeampi kuin ymppirehuissa, kuten myös LP5-rehussa verrattuna LP6-rehuun sekä LB-rehussa verrattuna LP-rehuihin ($P < 0,001$).



Kuvio 3. Rehun happamuus (pH) minisiiloissa 1, 3 ja 21 vuorokautta säilönnän jälkeen.

Säilörehujen kemiallinen koostumus on esitetty taulukossa 4. Sokerin pitoisuus vaihteli suuresti säilöntäainekäsittelyiden välillä (3,8 - 57,8 g/kg ka). MH-rehun sokeripitoisuus oli pienempi verrattuna muihin rehuihin ($P < 0,001$), kuten myös PR-rehun sokeripitoisuus oli pienempi kuin ymppirehujen keskimäärin ($P < 0,001$). LABE-rehun sokeripitoisuus oli suurempi verrattuna muihin ymppirehuihin ($P < 0,001$). *L. plantarumin* eri annostustasolla oli vaikutusta rehujen sokeripitoisuuteen. Suuremmalla annostustasolla (LP6) oli sokeripitoisuus suurempi verrattuna pienempään annostustasoon (LP5) ($P < 0,001$). LB-rehussa oli sokeripitoisuus pienempi kuin LP5-rehussa ($P < 0,001$).

Taulukko 4. Säilörehun koostumus, g/kg ka ellei toisin mainittu

	Säilöntäaineet						SEM	Tilastollinen merkitsevyys					
	PR	MH	LABE	LP6	LP5	LB		MH vs. muut	PR vs. ympit	LABE vs. muut ympit	LP6 vs. LP5	LP5 vs. LB	
Kuiva-aine, g/kg	208	216	213	209	207	208	0,9	***		***			
Tuhka	67,7	65,9	69,8	70,0	69,8	70,7	0,68	***	**				
Raakavalkuainen	126	125	129	136	138	140	2,3	**	**	**			
pH	3,77	3,69	3,70	3,69	3,71	3,78	0,006	***	***	***	***	***	***
NH ₄ -N, g/kg N	89,3	25,4	44,7	30,1	46,0	65,9	1,50	***	***		***	***	***
Sokeri	18,8	3,8	57,8	34,0	26,5	11,7	0,79	***	***	***	***	***	***
Maitohappo	139	75	136	138	137	131	1,9	***	o		o		*
Etikkahappo	26,7	41,8	47,8	17,0	14,6	27,4	0,95	***		***	**		***
Propionihappo	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,02	0,009	***					
Voihappo	0,22	0,28	1,55	0,30	0,16	0,26	0,053	**	***	***			
Isovoihappo	0,48	0,82	0,94	0,67	0,34	0,56	0,056	**	*	***	**		*
Etanoli	7,3	14,2	6,3	6,8	6,1	5,9	0,23	***	**		*		
VFA yhteensä	27,4	43,0	50,3	18,0	15,1	28,3	1,02	***		***	*		***
Maitohappo, % hapoista	83,6	63,6	73,0	88,5	90,0	82,3	0,66	***		***	*		***
Maitohappo/Etikkahappo	5,24	1,80	2,85	8,13	9,39	4,83	0,207	***	***	***	**		***

Sokeri= vesiliukoiset hiilihydraatit, VFA= haihtuvat rasvahapot, PR= painorehu, MH= muurahaishappo (100 %:na 4 l/t), LABE= *L. plantarum* (DSM 11672) ja *Pediococcus acidilactici* (DSM 11673) 1×10^6 pmy/g sekä pektinaasi-, ksylanaasi- ja sellulaasientsyymi, LP6= *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) 1×10^6 pmy/g, LP5= *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) 1×10^5 pmy/g ja LB= *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) ja *L. buchneri* (DSM 13573) 2×10^5 pmy/g. SEM= keskiarvon keskivirhe. MH vs muut= muurahaishapporehua verrattiin muihin rehuihin, PR vs ympit= painorehua verrattiin biologisilla säilöntäaineilla käsiteltyihin rehuihin (=ymppirehut), LABE vs muut ympit= maitohappobakteeri-entsyymiseos verrattuna muihin ymppirehuihin, LP6 vs LP5= *Lactobacillus plantarum* – anostustason vaikutus, LP5 vs LB= *Lactobacillus buchneri* lisäyksen vaikutus. ***= P < 0,001, **= P < 0,01, *= P < 0,05, o= P < 0,10.

MH-rehun maitohappopitoisuus oli pienempi ja etikkahappopitoisuus suurempi verrattuna muihin rehuihin ($P < 0,001$). LB-rehussa maitohappopitoisuus oli pienempi kuin LP5-rehussa ($P < 0,05$). PR-rehun maitohappopitoisuus oli hieman suurempi kuin ymppirehujen, samoin kuin LP6-rehussa verrattuna LP5-rehuun, mutta tulokset olivat suuntaa-antavat ($P < 0,10$).

MH-rehun etikkahappopitoisuus oli suurempi kuin keskimäärin muissa rehuissa ($P < 0,001$) ja myös LABE-rehun etikkahappopitoisuus oli suurempi kuin muissa ymppirehuissa ($P < 0,001$). LP6-rehussa oli hieman enemmän etikkahappoa kuin LP5-rehussa ($P < 0,01$). LB-rehussa oli puolestaan etikkahappoa lähes kaksinkertainen määrä verrattuna LP5-rehuun ($P < 0,001$).

Muiden haihtuvien rasvahappojen pitoisuudet olivat numeerisesti pienet, mutta säilöntäainekäsittelyiden välillä oli merkitseviä eroja. MH-rehun propionihappopitoisuus oli suurempi (0,11 g/kg) kuin muissa rehuissa ($P < 0,001$). Muissa rehuissa propionihappoa ei ollut ollenkaan, lukuun ottamatta LB-rehua (0,02 g/kg ka). MH-rehussa oli voihappoa vähemmän kuin muissa rehuissa keskimäärin ($P < 0,01$), samoin kuin PR-rehussa oli voihappoa vähemmän kuin ymppirehuissa keskimäärin ($P < 0,001$). LABE-rehun voihapon määrä oli suurempi kuin muiden ymppirehujen ($P < 0,001$). Isovoihappoa oli MH-rehussa enemmän kuin muissa rehuissa keskimäärin ($P < 0,01$), kuten myös LABE-rehussa verrattuna muihin ymppirehuihin ($P < 0,001$). PR-rehussa isovoihapon pitoisuus oli puolestaan hieman pienempi kuin muissa ymppirehuissa keskimäärin, samoin kuin LP5-rehussa verrattuna LB-rehuun ($P < 0,05$). LP6-rehussa oli isovoihappoa enemmän kuin LP5-rehussa ($P < 0,01$).

MH-rehun maitohappo-etikkahapposuhdeluku oli pienempi kuin muissa rehuissa keskimäärin ($P < 0,001$), samoin kuin PR-rehun maitohappo-etikkahapposuhdeluku oli pienempi kuin ymppirehuissa keskimäärin ($P < 0,001$). LABE-rehun maitohappo-etikkahapposuhdeluku oli pienempi kuin muissa ymppirehuissa ($P < 0,001$). Suurimmat suhdeluvut olivat LP-rehuissa eri annostustasoilla, siten että LP6-rehussa maitohappo-etikkahapposuhte oli hieman pienempi kuin LP5-rehussa ($P < 0,01$). Heterofermentatiivinen ympppi (LB-rehu) laski maitohappo-etikkahapposuhdetta verrattuna homofermentatiiviseen ympppiin (LP5-rehuun) ($P < 0,001$).

VFA:n kokonaismäärä oli suurempi MH-rehussa kuin keskimäärin muissa rehuissa, kuten myös LABE-rehussa verrattuna muihin ymppirehuihin ($P < 0,001$). Suuremmalla *L. plantarumin* annostustasolla (LP6-rehu) oli myös VFA-pitoisuus suurempi kuin pienemmällä annostustasolla (LP5-rehu) ($P < 0,05$). Myös *L. buchneri*-lisäys nosti rehun VFA-pitoisuutta verrattuna LP5-rehuun ($P < 0,001$).

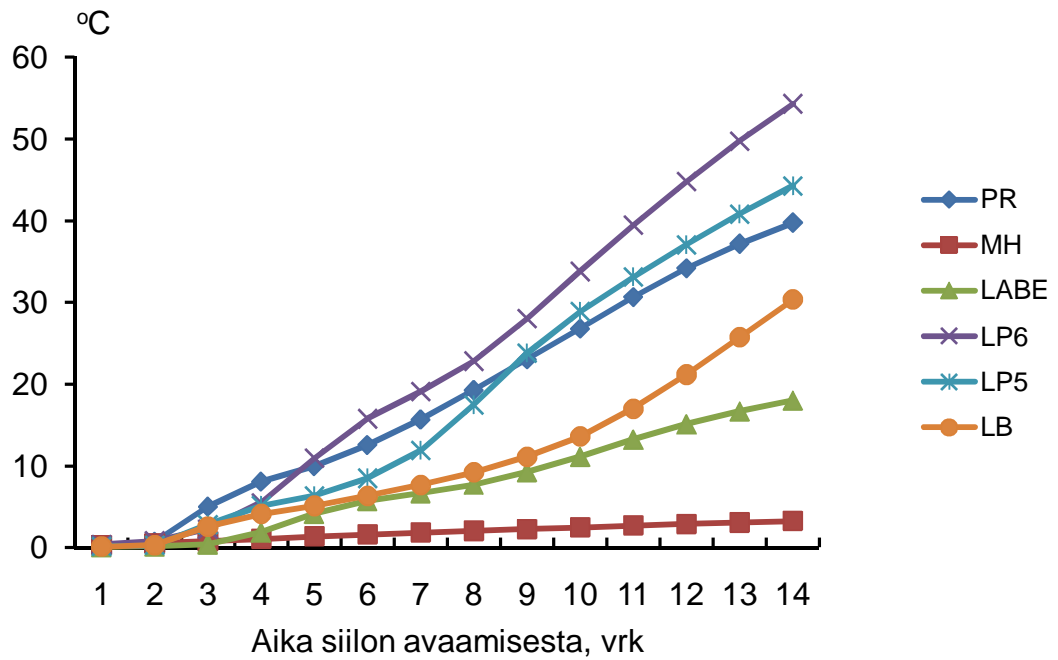
Rehujen ammoniumtyypen osuus kokonaistypestä vaihteli 25,4 ja 89,3 g/kg N välillä. PR-rehussa oli ammoniumtyypen määrä huomattavasti suurempi kuin ymppirehuissa, kun taas MH-rehussa oli vähemmän ammoniumtyypeä verrattuna kaikkiin muihin rehuihin ($P < 0,001$). *L. plantarumin* annostustasolla oli vaikutusta ammoniumtyypen määrään. Suuremmalla annostustasolla (LP6-rehu) oli ammoniumtyypeä vähemmän kuin pienemmällä annostustasolla (LP5-rehu) ($P < 0,001$). LB-rehun ammoniumtyypen pitoisuus oli puolestaan suurempi kuin LP5-rehussa ($P < 0,001$).

3.3 Aerobinen stabiilisuus

Lämpötilamittauksen lopetuksen jälkeen styroxlaatikot avattiin, jolloin havaittiin aistinvaraisesti MH-rehujen olevan edelleen hyvin säilyneitä. Niissä ei havaittu hometta ja korret olivat erotettavissa. Kaikki muut rehut olivat täysin pilaantuneita. Niissä oli erotettavissa harmaata homekasvustoa, rehumassa oli kauttaaltaan mustaa ja märkää ja korsien rakenne oli hajoamassa. Rehujen aerobinen stabiilisuus mitattiin laskemalla rehun ja kasvatuskaapin lämpötilan (20 °C) erotus ajan suhteen siten, että kun rehun lämpötila nousi yli 2 °C verrattuna kasvatuskaapin lämpötilaan, todettiin rehu aerobisesti epästabiiliksi.

Taulukossa 2 on esitetty jokaiselle rehulle ajankohta, jolloin rehun lämpötilan ja kaapin lämpötilan välinen ero saavutti 2 °C. Siilojen avauksen jälkeen kaikki rehut pysyivät vähintään kaksi vuorokautta stabiileina. Muurahaishapporehu pysyi aerobisesti stabiilina koko lämpötilan mittauksen ajan ($P < 0,001$). PR- ja LABE-rehut olivat aerobisesti stabiileita noin kolme vuorokautta, LP5-rehu hieman yli neljä vuorokautta ja LB-rehu seitsemän vuorokauden ajan. LP6-rehu oli aerobiselta stabiilisuudeltaan heikoin. Rehumassa lämpesi jo kaksi vuorokautta siilojen avauksen jälkeen. Muiden kuin MH-rehun osalta aerobisen stabiilisuuden tulokset eivät kuitenkaan olleet tilastollisesti merkitseviä. Rehujen aerobinen stabiilisuus siilojen avaamisen jälkeen on esitetty kuviossa 5 kumulatiivisena summana ajan (vrk) suhteen. MH-rehun lämpötilasumma oli huomattavasti

pienempi, vain 3,3 °C ($P < 0,01$) verrattuna kaikkien muiden rehujen lämpötilasummiin, jotka vaihtelivat 18,0 – 54,3 °C:een välillä. LABE-rehun lämpötilasumma (18 °C) oli pienempi verrattuna muiden ymppirehujen lämpötilasummiin (30,4 – 54,3 °C) ($P < 0,05$).



Kuvio 4. Rehujen aerobinen stabiilisuus laboratoriosiilojen avaamisen jälkeen. Lämpe-
neminen on esitetty kumulatiivisena summana ajan suhteen, jossa rehun lämpötilasta on
vähennetty kasvatuskaapin lämpötila (+20 °C). Summa laskettiin päivän lämpötilamit-
tausten keskiarvona.

4. Tulosten tarkastelu

4.1 Raaka-aine

Säilörehun säilönnän onnistumisen kannalta raaka-aineen tärkeimmät ominaisuudet ovat sokeripitoisuus, kuiva-ainepitoisuus ja puskurikapasiteetti. Tässä tutkimuksessa timotei-nurminatakasvuston sokeripitoisuus oli suuri, 196 g/kg ka, vaikka tyypillisesti Suomen oloissa viljeltävät nurmikasvit sisältävät melko vähän sokeria verrattuna esimerkiksi muualla yleisesti viljeltyyn raiheinään. Nurmisadon sokeripitoisuutta on erittäin vaikeaa ennustaa ja se voi vaihdella suuresti riippuen esimerkiksi kasvukauden vaiheesta, olosuhteista ja lannoituksesta. Hyvin suuria sokeripitoisuuksia voi esiintyä aurinkoisella ja kuivalla säällä, jolloin kuivuus rajoittaa kasvin sokerien käyttöä. Sokeripitoisuus voi vaihdella lajikkeittain myös päivän aikana, jolloin illalla sokeripitoisuus on yleensä korkeampi koko päivän yhteyttämisen jälkeen kuin aamulla (Fisher ym. 1999, Huntington ja Burns 2007, Downing ym. 2008).

Tämän kokeen koerehujen raaka-aineen niiton ja korjuun aikana sääolosuhteet olivat normaalit ja lohko, jolta koerehut saatiin, toimi tarkennetun tyypilannoituksen näytelohkona. Tarkennettu lannoitus mahdollistaa peruslannoitustasoja suuremmat lannoitusmäärät, jolla voidaan maksimoida korjattavan sadon määrä (Sipilä 2006). Tyypilannoituksen lisääminen yleensä laskee kasvuston sokeripitoisuutta (Keady ym. 2000). Koska tässä kokeessa koerehut korjattiin aamupäivän aikana ja lohkon tyypilannoitus oli tarkennetulla tasolla (98 kg N), ovat raaka-aineen suuren sokeripitoisuuden syyt epäselviä.

Timotei-nurminatakasvuston sokeripitoisuus on vaihdellut kotimaisissa säilöntäkokeissa välillä 65 – 158 g/kg ka (Blomqvist 2010). Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen (EFSA 2006) mukaan sokeripitoisuuden ollessa alle 15 g/kg tuoreesta kasvimateriaalista kuuluu se vaikeasti säilöttävään luokkaan. Kun sokeripitoisuus on 15 - 30 g/kg, kuuluu kasvi kohtalaisen vaikeasti säilöttäviin ja kun sokeripitoisuus on yli 30 g/kg, on kasvi helposti säilöttävä. Tässä tutkimuksessa suuren sokeripitoisuuden (41 g/kg) ansiosta kuului kasvimateriaali helposti säilöttävään luokkaan. Säilönnän perustuessa maitohappobakteerien fermentaatioon on kasvimateriaalin riittävä sokeripitoisuus tärkeää säilönnän onnistumisen kannalta. Kasvimateriaalin kuiva-ainepitoisuuden ollessa noin 200 g/kg, on sokeripitoisuuden oltava välillä 125 – 150 g/kg ka riittävän maitohappopitoisuuden tuottamiseksi ja siten tarpeeksi alhaisen pH:n saavuttamiseksi (Pettersson ja

Lindgren 1990, Jaakkola 1992). Todennäköisesti raaka-aineen suuren sokeripitoisuuden ansiosta tässä tutkimuksessa painorehun epifyyttisen maitohappobakteeriflooran sekä biologisten säilöntäaineiden teho oli hyvä ja sai aikaan suuren maitohappopitoisuuden muodostumisen, jolloin pH laski kaikissa rehuissa hyvin alas, noin 3,7:ään. Suomessa yleisesti ongelmana on ollut raaka-aineen pieni sokeripitoisuus, jolloin biologisten säilöntäaineiden toimintavarmuus ei ole ollut hyvä. Säilörehun esikuivauksella saadaan kuiva-ainepitoisuutta nostettua ja tätä kautta myös biologisten säilöntäaineiden tehoa parannettua (McDonald ym. 1991).

Säilörehun raakavalkuaispitoisuuteen vaikuttavat nurmen korjuuaste, kasvilaji ja typpilannoitus. Tyypillisesti aikaisen korjuun nurmiheinäkavuston raakavalkuaispitoisuus on noin 170 g/kg ka (Artturi-verkkopalvelu). Tässä tutkimuksessa raakavalkuaispitoisuus oli kuitenkin vain 133 g/kg ka, vaikka typpilannoituksen taso oli noin 100 kg/ha. Raaka-aineen D-arvo oli korjuuhetkellä 711 g/kg ka, joka vastasi tavoitearvoa hyvin. D-arvoon vaikuttavat nurmen korjuuaste, kasvilaji ja sääolot (Artturi-verkkopalvelu). Raaka-aineen puskurikapasiteetti oli melko suuri, 559 mekv/kg ka. Yleisesti nurmiheinäkasvien puskurikapasiteetti on 300 – 500 mekv/kg ka ja nurmipalkokasvien jopa yli 600 mekv/kg ka (McDonald ym. 1991). Puskurikapasiteettiin vaikuttaa kasvin kasvuaste, eli mitä nuorempana kasvi korjataan, sen suurempi on sen puskurikapasiteetti. Fermentaatiokerroin oli myös suuri (52), johon osaltaan vaikutti raaka-aineen suuri sokeripitoisuus. Kuiva-aine- ja sokeripitoisuuden sekä puskurikapasiteetin vaikutus rehun säilöttävyyteen voidaan arvioida fermentaatiokertoimen avulla. Pahlwin (2002) mukaan alle 45 fermentaatiokertoimella klostridien aiheuttaman virheikäymisen mahdollisuus lisääntyy säilönnän aikana.

4.2 Säilörehut

4.2.1 Säilörehujen yleinen laatu

Tuorepainotappiot olivat kaikissa rehuissa pienet, alle 1 %. Muurahaishapporehussa oli hieman suurempi tuorepainotappio kuin muissa rehuissa keskimäärin, joka todennäköisesti johtui suuresta kaasunmuodostuksesta säilönnän aikana. Myös LP5-rehussa oli hieman suurempi tuorepainotappio kuin LP6-rehussa. Mahdollinen selittävä tekijä voi olla LP5-rehun suurempi kaasunmuodostus säilönnän aikana tai epifyyttisten heterofermentatiivisten maitohappobakteerien toiminta, josta aiheutuu suurempaa painohävikkiä

esimerkiksi hiilidioksidin muodostumisen johdosta. Laboratoriosiilojen kuiva-ainetappioiden osalta saadut tulokset (laskennallisesti negatiiviset tappiot) osoittavat tappiomäärittysten ongelmallisuuden pienissä siiloissa. Ongelma liittyy ilmeisesti kuiva-ainemäärittelyyn ja erityisesti kuiva-ainekorjaukseen.

Rehujen kuiva-ainepitoisuus oli suhteellisen pieni, 207 – 216 g/kg. Muurahaishapolla säilötyn rehun kuiva-ainepitoisuus oli hieman suurempi kuin muiden rehujen, samoin kuin maitohappobakteerientsyymiseosrehun verrattaessa sitä muihin ymppirehuihin. Myös Vanhatalon ym. (1992) tutkimuksessa muurahaishapporehussa oli suurempi kuiva-ainepitoisuus verrattuna painorehuun, entsyymikäsiteltyyn ja happoseosrehuun.

Rehun kuiva-ainepitoisuuden perusteella on saavutettava tietty happamuus, jotta voidaan ehkäistä haitallisten mikrobien kasvu. Esimerkiksi hyvälaatuisen säilörehun pH voi vaihdella 3,8:sta kuiva-aineen ollessa 150 g/kg, aina 5,0 – 5,5:een, kun kuiva-aine on 300 – 400 g/kg (Thomas ja Fisher 1991, ref. Merry ym. 2000). Toisaalta suomalaisten säilönnän laatuksien mukaan kuiva-aineen ollessa korkeintaan 275 g/kg, tulisi pH:n olla alle 4,2 (MTT 2008). Mikäli kuiva-ainepitoisuus on 450 g/kg, on pH:n oltava alle 4,9. Kaikkien rehujen pH laski säilönnän aikana hyvin alas, joka todennäköisesti johtui raaka-aineen suuren sokeripitoisuuden tarjoamasta energianlähteestä maitohappobakteerien toiminnalle.

Yleensä muurahaishappo laskee säilötyn rehun pH:n alemmaksi verrattuna biologisiin säilöntäaineisiin, kun raaka-aineessa on pieni sokeripitoisuus. Jos sokeripitoisuus on suuri, saadaan biologisilla säilöntäaineilla rehun pH laskemaan yleensä alemmas kuin muurahaishapolla säilöittäessä (Davies ym. 1998). Myös muurahaishapon annostustaso vaikuttaa rehun pH-lukuun (Kung ym. 2003). Tässä tutkimuksessa kuitenkin suuresta sokeripitoisuudesta huolimatta saatiin muurahaishapolla alin pH verrattuna muihin rehuihin. Ymppirehujen pH oli keskimäärin alhaisempi kuin painorehussa. Kuitenkin verrattaessa numeerisia eroja, voidaan havaita, että homofermentatiivisilla maitohappobakteerilla säilöttyjen rehujen pH laski alemmas kuin painorehussa, kun taas homo- ja heterofermentatiivisten maitohappobakteerien seoksella säilötyn rehun pH jäi hieman korkeammaksi kuin painorehussa. Vastaavia tuloksia ovat mm. Davies ym. (2005) saaneet tutkiessaan pienen kuiva-aine- (200 g/kg) ja suuren sokeripitoisuuden (267 - 287 g/kg ka) omaavan raiheinän säilömistä vastaavanlaisilla maitohappobakteerikäsitelyillä.

Voimakas maitohappokäyminen on tyypillistä märissä rehuissa, joissa on suuri sokeripitoisuus. Tällöin maitohappobakteerit ovat erittäin aktiivisia tuottaen paljon maitohappoa ja erittäin alhaisen pH:n (McDonald ym. 1991). Maitohappoa muodostui vähemmän muurahaishapolla säilötyssä rehussa kuin painorehussa, joka johtui hapon käymistä rajoittavasta vaikutuksesta. Saman ovat havainneet mm. Vanhatalo ym. (1992). Märissä rehuissa on myös tavallisesti enemmän etikkahappoa ja voi-happoa kuin esikuivatuissa rehuissa (McDonald ym. 1991).

Pitkälle maitohappokäyneet rehut voivat olla alttiita pilaantumiselle siilojen avaamisen jälkeen, koska maito- ja etikkahappo sekä sokerit ovat säilörehun pilaantumisen aiheuttavien mikro-organismien pääasiallisia energianlähteitä (McDonald ym. 1991). Pilaantuminen näkyy rehun lämpenemisenä, jota havaittiinkin kaikissa muissa rehuissa lukuun ottamatta muurahaishapporehua. Aerobisen stabiilisuuden heikkeneminen biologisilla säilöntäaineilla käsitellyissä rehuissa voi johtua siitä, että jotkut maitohappobakteerit pystyvät heksoosien puutteessa tuottamaan maitohaposta energiaa anaerobisissa olosuhteissa, kun sitruunahappo toimii elektronin vastaanottajana (Lindgren ym. 1990). Tuloksena syntyy etikka- ja muurahaishappoa, jolloin pH nousee mahdollistaen haitallisten mikrobien aktivaation. Toisaalta on myös todettu, että rehun suuri sokeri- ja maitohappopitoisuus voivat toimia energianlähteinä hiivojen ja homeiden kasvuille johtaen aerobisen stabiilisuuden heikkenemiseen (Yan ym. 1996, Yan ym. 1998).

4.2.2 Painorehu

Hyvälaatuisessa painorehussa luonnollista fermentaatiota dominoivat maitohappobakteerit, kun taas huonolaatuisessa painorehussa ovat enterobakteerit tai klostridit enemmistönä. Yleensä hyvälaatuisen painorehun raaka-aine sisältää paljon sokeria ja lisäksi kasvimateriaalissa on suotuisa epifyyttinen maitohappobakteerikanta. Painorehun koostumukseen ja siten ravitsemukselliseen arvoon vaikuttaa kuiva-ainepitoisuus. Tässä tutkimuksessa rehun kuiva-ainepitoisuus oli noin 210 g/kg, joka on esikuivattua rehua märempää.

Raaka-aineen sokeripitoisuus oli hyvin suuri, jolloin tyypillisesti tällaisessa rehussa on pH alhainen ja maitohappoa paljon. Sokeria oli käymisen jälkeen vähän rehussa jäljellä (18,8 g/kg ka). Vaikka maitohappo on pääsääntöinen fermentaation lopputuote painore-

hussa, voi huomattavia määriä etikkahappoa muodostua. Etikkahappoa ei kuitenkaan esiintynyt painorehussa niin paljon, että se olisi heikentänyt laatuarviota.

Heti niiton jälkeen ja erityisesti esikuivauksen aikana rehussa voi proteolyysin määrä lisääntyä (Woolford 1984, Muck 1987), jota on mahdollisesti tapahtunut painorehussa sen suuren ammoniumtyypen pitoisuuden (89,3 g/kg N) perusteella. Ammoniumtyypen suuren pitoisuuden osalta ei painorehu täyttänyt laatuvaatimuksia raja-arvon ollessa 80 g/kg N (MTT 2008). Proteolyttinen aktiivisuus jatkuu säilönnän aikana kasvin omien proteaasi-entsyymien vapautumisen johdosta niin kauan, kunnes pH on saavuttanut tason (yleensä pH 4), jossa suurin osa kasvien proteaaseista inhiboituu (Reid 1994). Yleisesti proteiinien hajoaminen on kiihkeintä säilönnän ensimmäisenä päivänä, jonka jälkeen se vähenee nopeasti pH:n laskun mukana (Muck ja Pitt 1993 ref. Marita ym. 2010). Tässä tutkimuksessa painorehun happamuus saavutti pH 4:n kolmessa päivässä, joten proteolyysiä todennäköisesti ehti tapahtua.

Toisaalta on esitetty, että rehun ammoniumtyypen pitoisuuden perusteella ei suoraan voida selittää rehun todellista proteiinien hajoamisen astetta, vaan ammoniumtyypen pitoisuus kertoo edelleen jatkuneesta aminohappojen deaminaatiosta (Heron ym. 1986). Rooken ja Hatfieldin (2003) mukaan kasvin entsyymien aiheuttaman proteolyysin lopputuotteena muodostuu vapaita aminohappoja ja peptidejä, ja ammoniakki ja amiinit muodostuvat mikrobisen toiminnan tuloksena. Kasvin niiton jälkeen proteiinit hajoavat sekä kasvin proteaasien että mikrobien toimesta, ja suurin osa muodostuneesta ei-proteiinityyppistä (NPN) on aminohappoina ja ammoniumtyyppinä. Kummankin osuus on riippuvainen edelleen tapahtuvasta aminohappojen hajotuksesta. On havaittu, että jotkin aminohapot hajoavat eriasteisesti kun taas eräiden aminohappojen määrä voi lisääntyä (McDonald ym. 1991). Intensiivistä proteolyysiä voi tapahtua ilman merkittävää ammoniumtyypen konsentraation lisääntymistä (McDonald ym. 1991). Proteolyysin aste riippuu kasvilajista, kuiva-ainepitoisuudesta, pH:sta ja lämpötilasta (McDonald ym. 1991, Rooke ja Hatfield 2003).

4.2.3 Muurahaishapporehu

Muurahaishapporehun säilönnällinen laatu oli hyvä alhaisen pH:n, vähäisen ammoniumtyyppi pitoisuuden sekä pienen voihapon määrän perusteella. Kuitenkin etikkahappopitoisuuden perusteella rehun laatu oli tyydyttävä MTT:n (2008) laatuksiterien mu-

kaan. Etanolipitoisuus oli myös suuri (14,2 g/kg ka). Rehuun lisätty muurahaishappo todennäköisesti inhiboi aluksi maitohappobakteereita ja rajoitti siten maitohappokäymistä, mutta ei mikrobeja, jotka tuottavat etikkahappoa ja etanolia. Maitohapon pitoisuus oli kuitenkin haposäilötylle säilörehulle asetettujen tavoitearvojen (35 – 60 g/kg ka, Artturi-verkkopalvelu) yläpuolella (75 g/kg ka). Tämä voi johtua raaka-aineen suuresta sokeripitoisuudesta, jolloin epifyyttiset maitohappobakteerit olivat aktiivisia tuottaen maitohappoa säilönnän aikana.

Jäännössokerin pitoisuus oli MH-rehussa erittäin pieni ja etikkahapon sekä etanolin pitoisuus puolestaan suuri, joten rehussa voidaan olettaa tapahtuneen etanolikäymistä todennäköisesti hiivojen toimesta. Tämä on mahdollista, koska säilönnän aikana saavutettu rehun alhainen pH ei välttämättä estä hiivojen kasvua (McDonald ym. 1991). Anaerobiset ja happamat olosuhteet ovat hiivojen kannalta yleensä epäsuotuisat. Lyhytketjuiset orgaaniset hapot, kuten propioni- ja etikkahappo, inhiboivat hiivojen kasvua alhaisessa pH:ssa (Moon 1983). Dissosioitumattomat happomolekyylit kulkeutuvat hiivasoluun passiivisen diffuusion kautta ja niiden dissosioituminen vapauttaa vetyioneja. Tämä alentaa hiivasolun sisäistä pH:ta tasolle, jossa solu kuolee, ellei ioneja työnnetä ulos solusta aktiivisen kuljetuksen kautta, joka vaatii energiaa. Anaerobisissa oloissa tämä energia saadaan rehussa olevien sokereiden hajotuksesta (McDonald ym. 1991) ja siten rehun runsas sokerin määrä mahdollisti hiivojen aktiivisen toiminnan säilönnän aikana.

Edellistä johtopäätöstä tukee myös se, että muurahaishapporehussa käymisen jälkeen oli sokeria erittäin vähän jäljellä, joka johtunee niin maitohappobakteerien kuin epätoivotujen mikrobienkin aktiivisesta toiminnasta. Muurahaishapon on myös todettu joissain tapauksissa stimuloivan hiivojen kasvua, joka voi näkyä vähentyneenä maito- ja etikkahapon määrinä (Henderson ym. 1972) sekä suurena etanolipitoisuutena (Kung ym. 2003a). Muurahaishapporehun suuri etikkahappopitoisuus saattoi johtua aktiivisesta epifyyttisten heterofermentatiivisten maitohappobakteerien toiminnasta. Etikkahappo on peräisin pääsääntöisesti heterofermentatiivisten maitohappobakteerien sekä enterobakteerien sokereiden hajotuksesta, vaikka jonkun verran voi myös muodostua sitraatista, malaatista ja aminohappojen hajotuksesta (McDonald ym. 1991). Säilönnän aikana MH-rehuun muodostui myös runsaasti hiilidioksidia, joka saattoi johtua heterofermentatiivisten maitohappobakteerien sekä hiivojen aktiivisesta toiminnasta. Käytännössä hiivat käyttivät sokerin lähes kokonaan hyväkseen, jolloin siilojen avaamisen jälkeen ei muille

haitallisille mikrobeille ollut energianlähde käytettävissä. Siksi muurahaishapporehu pysyi aerobisesti stabiilina pisimpään verrattuna muihin rehuihin. Myös säilönnän aikana muodostunut etikkahappo saattoi omalta osaltaan inhiboida haitallisten mikrobien toimintaa ehkäisten rehun pilaantumista.

4.2.4 Entsyymilisän vaikutus säilöntälaatuun

Entsyymilisällä pyritään yleensä varmistamaan pienen sokeripitoisuuden rehuissa riittävä substraatin saanti maitohappobakteereille. Monissa tutkimuksissa on havaittu entsyymilisällä olevan suurempi hyöty säilörehuissa, joiden sokeripitoisuus on pieni, kuin rehuissa, joissa on suuri sokeripitoisuus (Rauramaa ym. 1987, Jaakkola 1990, Jaakkola ym. 1991). Tämä johtuu siitä, että suuren sokeripitoisuuden rehuissa on tarpeeksi sokeria tehokkaaseen fermentaatioon, eikä entsyymien hajottamista sokereista ole hyötyä käymisen kannalta. Jotta maitohappobakteerit käyttäisivät selluloosan hydrolyysistä vapautuneen sokerin hyödykseen, on sokerien saatavuus oltava maitohappobakteerien kasvuvauhdin kanssa yhdenmukainen (Kung ym. 1991).

Tässä tutkimuksessa raaka-aineen suuren sokeripitoisuuden takia ei entsyymeistä ollut lähtökohtaisesti suurta hyötyä rehussa, vaan niiden johdosta rehuun kertyi runsaasti jäännössokeria. Jäännössokeria voi muodostua myös entsyymiaktiivisuuden jatkuessa alhaisessa pH:ssa (Rauramaa ym. 1987, Selmer-Olsen 1994). Joissakin tilanteissa jäännössokeria voi muodostua rehuun, jos rehun epifyytiset maitohappobakteerit ovat rajoittava tekijä fermentaatioissa, kun entsyymit on lisätty rehuun yksinään (Selmer-Olsen 1994). Tästä ei kuitenkaan todennäköisesti ollut kyse, koska rehuun lisättiin entsyymien kanssa samanaikaisesti *L. plantarum*- ja *Pediococcus acidilactici* -maitohappobakteerit.

Säilöntäaineeseen lisättyjen entsyymien keskinäisen suhteen perusteella lopputuotteena syntyy erilaisia määriä heksooseja ja pentooseja. Jos entsyymien avulla hajotettujen solunseinähiilihydraattien pääasiallinen lopputuote on pentoosi, kuten ksyloosi, hyödyttää se eniten bakteereita, jotka pystyvät fermentoimaan pentooseja. Obligaattisesti homofermentatiiviset maitohappobakteerit, kuten *L. plantarum*, eivät siihen pysty, mutta esimerkiksi *Enterococcus*- ja *Pediococcus*-suvut pystyvät hajottamaan pentooseja (McDonald ym. 1991). Jos pentoosien fermentaatio jää vajaaksi bakteerien toimesta, näkyy se säilörehun suurempana jäännössokerin määränä.

Jäännössokerilla voi olla sekä positiivisia että negatiivisia vaikutuksia rehun laatuun. Se voi stimuloida pötsin mikrobistoa ja lisätä siten kuiva-aineen syöntiä (Bolsen ym. 1995). Rehussa oleva ylimääräinen sokeri voi kuitenkin toimia myös substraattina haitallisille mikrobeille, kuten hiivoille, enterobakteereille ja klostrideille (Selmer-Olsen 1994).

Haitalliset mikrobit tuottavat rehuun etikkahappoa, voihippaa ja isovoihippaa, jotka heikentävät rehun laatua. Edellä mainittuja happoja oli LABE-rehussa enemmän kuin muissa ymppirehuissa keskimäärin. Etikkahapon määrä oli 10,2 g/kg tuoreessa rehussa, joka ei täytä tyydyttävän rehun laadun kriteerejä (MTT 2008). Maitohappobakteerien ja entsyymien seoksella käsitelty rehu oli siis etikkahapon pitoisuuden perusteella laadultaan heikkoa. Etikkahappoa voi syntyä rehuun myös maitohappobakteerien pentoosien heterofermentatiivisen hajotuksen lopputuotteena, jos entsyymiseoksessa ksylanaasin aktiivisuus on voimakkaampaa kuin sellulaasin (Selmer-Olsen 1994). Vaikka LABE-rehun voihipon pitoisuus (0,33 g/kg) oli suurempi kuin muiden ymppirehujen, ei se ylittänyt MTT (2008) laatuksien mukaista voihipon maksimiraja-arvoa (1,0 g/kg).

4.2.5 Maitohappobakteerien annostustason vaikutus

Kasveissa esiintyy runsaasti erilaisia epifyyttisiä mikrobeja. Vaikka kasveissa epifyytisten maitohappobakteerien määrät ovat melko pieniä, voi bakteeripopulaatio kasvaa 1×10^5 pmy/g säilönnän aikana. Tämän takia suositellaan käyttämään homofermentatiivisia maitohappobakteereita vähintään 1×10^5 pmy/g annostustasolla, mutta mieluummin 1×10^6 pmy/g tuoretta rehua (McDonald ym. 1991). Useissa tutkimuksissa on laboratoriomittakaavan kokeissa käytetty eri materiaaleista tehdyissä säilörehuissa *L. plantarumia* 1×10^6 pmy/g annostustasolla, jolla on saatu pääsääntöisesti hyviä säilöntätuloksia (Rooke ja Kafilzadeh 1994, Saarisalo ym. 2006a, Lorenzo ja O'Kiely 2008, Zhang ym. 2009, Filya ja Sucu 2010), mutta myös 1×10^5 pmy/g tasolla on päästy hyviin säilöntätuloksiin (Cai ym. 1999, Filya ym. 2006). Heron ym. (1988) tutkivat raiheinän (kuiva-aine 153 g/kg ja sokeripitoisuus 180 g/kg ka) säilönnällistä laatua kolmella eri kaupallisen säilöntäaineen (*L. plantarum* ja *Pediococcus acidilactici*) annostustasolla, 1×10^4 , 1×10^6 ja 1×10^8 pmy/g. He havaitsivat, että rehun säilönnällisen laadun kannalta ei ollut hyötyä ylittää 1×10^6 -annostustasoa, mutta toisaalta 1×10^4 pmy/g ei riittänyt dominoimaan käymisprosessia.

Tässä tutkimuksessa *Lactobacillus plantarum* molemmilla annostustasoilla (1×10^5 pmy/g ja 1×10^6 pmy/g) saatiin laadultaan hyvää rehua. Voimakkaasta maitohappokäymisestä huolimatta molempien rehujen jäännössokerin määrä oli tavallista suurempi. Tämä johtui todennäköisesti raaka-aineen runsaasta sokeripitoisuudesta ja lisäksi rehuissa on saattanut tapahtua runsaan maitohappopitoisuuden johdosta hemiselluloosan happohydrolyysiä tuottaen lisää sokeria rehuun (Rooke ja Hatfield 2003). Molempien rehujen maitohappo-etikkahappo-suhdeluku oli melko suuri, viitaten homofermentatiiviseen maitohappokäymiseen.

Yleisesti on todettu, että homofermentatiivisilla maitohappobakteereilla, kuten *L. plantarum*illa, ei ole aerobista stabiilisuutta parantavia vaikutuksia (Cai ym. 1999, Conaghan ym. 2010). Tämä voi johtua homofermentatiivisten maitohappobakteerien tuottamasta maitohaposta, joka on aerobisissa oloissa eräiden hiivojen käyttämä substraatti (Wohlt 1989). Kummallakaan annostustasolla ei ollut parantavaa vaikutusta rehun aerobiseen stabiilisuuteen painorehuun verrattuna. Aerobinen stabiilisuus oli kuitenkin vielä heikompi *L. plantarum*in suuremmalla annostustasolla kuin pienemmällä annostustasolla. LP5-rehussa saattoi olla jonkin verran epifyyttisten heterofermentatiivisten maitohappobakteerien toimintaa, joka piti rehun aerobisesti stabiilina hieman pidempään kuin LP6-rehun. Rehut lämpenivät eniten verrattuna kaikkiin muihin koerehuihin, joka saattoi johtua rehuissa dominoivista homofermentatiivisista maitohappobakteereista ja pienestä etikkahappopitoisuudesta, joka mahdollisti haitallisten mikrobien toiminnan hapelle altistuneessa rehussa. Mahdollisten epifyyttisten heterofermentatiivisten maitohappobakteerien toiminnasta LP5-rehussa saattoi johtua myös rehun hieman suurempi pH ja ammoniumtyypen pitoisuus verrattuna LP6-rehuun.

4.2.6 *Lactobacillus buchneri*in lisäys

LB-rehu oli säilönnälliseltä laadultaan hyvää. Kun säilörehuun lisätään säilöntäaine, joka sisältää sekä homofermentatiivisia että heterofermentatiivisia maitohappobakteereita, on tarkoituksena aluksi laskea rehun pH nopeasti homofermentatiivisten maitohappobakteerien avulla ja rehun avauksen yhteydessä parantaa aerobista stabiilisuutta heterofermentatiivisella maitohappobakteerilla. Heterofermentatiivisen ympin lisäys nosti hiukan rehun pH:ta sekä pienensi maitohappo-etikkahappo-suhdelukua verrattuna homofermentatiiviseen ympiin (LP5-rehuun). Tämä on tyypillistä heterofermentatiivisia

maitohappobakteereita käytettäessä, jonka on havainnut myös Kleinschmit ja Kung (2006) tekemässään meta-analyysissä 43 säilöntäkokeesta. Maitohapon määrä oli siis pienempi ja etikkahapon määrä suurempi verrattuna LP5-rehuun, joka kertoo rehussa tapahtuneesta heterofermentatiivisesta käymisestä. Maissi- ja nurmisäilörehussa voi tapahtua myös spontaania anaerobista maitohapon hajoamista epifyyttisten *L. buchneri*-maitohappobakteerien toimesta (Driehuis ym. 1999, Driehuis ym. 2001).

Muck (1996) esitteli ensimmäisenä *L. buchnerin* lisäyksellä olevan aerobista stabiiliisuutta parantavia vaikutuksia. Tässä tutkimuksessa vertailtaessa numeerisia eroja, heterofermentatiivinen *L. buchneri* paransi säilörehun aerobista stabiiliisuutta verrattaessa LP5-rehuun, joka oli säilötty homofermentatiivisella maitohappobakteerilla (ero ei merkitsevä). Samanlaisia tuloksia on saatu useista muista tutkimuksista (Kung ja Ranjit 2001, Kung ym. 2003b, Wróbel 2008, Tabacco ym. 2011). Aerobisen stabiiliisuuden parantuminen johtui todennäköisesti *L. buchnerin* kyvystä muuttaa osa maitohaposta etikkahapoksi ja 1,2-propaanidioliksi (Driehuis ym. 1999, Oude Elferink ym. 2001). 1,2-propaanidioli on joko itsessään lopputuote tai se muutetaan propionihapoksi ja 1-propanoliksi (Driehuis ym. 1999, Driehuis ym. 2001), joilla on antimykoottinen vaikutus (Moon 1983). Nyt tehdyssä tutkimuksessa *L. buchneri*-lisäyksellä havaittiin rehussa muodostuneen erittäin vähän propionihappoa (0,02 g/kg ka).

Sokereiden heterofermentatiivisen hajotuksen yhteydessä saattaa esiintyä 5 - 24 %:n kuiva-ainehävikkiä (Holzer ym. 2003). Tässä tutkimuksessa LB-rehun kuiva-ainehävikki oli noin 7,5 % (ilman haihtuvien aineiden korjausta). Kuiva-aineen hävikki johtuu etikkahapon ja 1,2-propaanidiolin muodostumisen yhteydessä syntyneestä hiilidioksidista. Kuiva-ainehävikki lisääntyy *L. buchnerin* annostustason noustessa yli 1×10^5 pmy/g ja säilöntäjakson pidentyessä (Driehuis ym. 1999). Mahdollisia kuiva-ainehävikkejä voidaan kuitenkin ehkäistä alentamalla *L. buchnerin* annostustasoa vaikuttamatta sen aerobista stabiiliisuutta parantavaan vaikutukseen (Driehuis ym. 1999, Driehuis ym. 2001). Fermentaatioprosesseista, esimerkiksi *L. buchnerin* metaboliasta, johtuva kuiva-ainehävikki on kuitenkin yleensä vähemmän merkittävä suhteessa rehun aerobisen pilaantumisen johdosta aiheutuneeseen hävikkiin (McDonald ym. 1991, Driehuis ym. 1999, Kleinschmit ja Kung 2006).

Joissakin tutkimuksissa etikkahappopitoisuus on korreloinut negatiivisesti säilörehun syönnin kanssa (Wilkins ym. 1971, Rook ja Gill 1990), mutta monissa tutkimuksissa *L.*

buchnerin tuottamalla etikkahapolla ei ole todettu olevan vaikutusta syöntiin (Ranjit ym. 2002, Kung ym. 2003b) tai *L. buchneri*-lisäys on vaikuttanut jopa lisäävästi syöntiin (Keles ja Demirci 2011) verrattuna painorehuun. Kuten maitohapon, myös etikka- ja propionihapon merkitykseen vähentyneen rehun syönnin yhteydessä vaikuttaa Weissin ym. (2003) mukaan rehun pH, joka määrää vapaiden happojen suhteellisen määrän rehussa.

5. Yhteenveto ja johtopäätökset

Tutkimuksen tarkoituksena oli testata eri maitohappobakteerien ja homofermentatiivisten maitohappobakteerien annostustason vaikutusta säilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen. Biologisilla säilöntäaineilla säilöttyjen rehujen laatua verrattiin kontroleina toimiviin painorehuun ja muurahaishapolla tehtyyn rehuun.

Tutkimuksen koerehut tehtiin Helsingin Yliopiston Maataloustieteiden laitoksella 7.6.2010. Kolmannen vuoden timotei (*Phleum pratense*) - nurminata (*Festuca pratensis*) kasvusto korjattiin tähkimisen alkuvaiheessa D-arvon ollessa 711 g/kg ka. Nurmi-kasvuston kuiva-ainepitoisuus oli 170 g/kg heti niiton jälkeen määritettäessä. Niiton jälkeen raaka-ainetta esikuivattiin neljä tuntia ja rehu korjattiin kuiva-ainepitoisuuden ollessa 208 g/kg.

Silputusta ja sekoitetusta rehuraaka-aineesta punnittiin kuusi 5 kg:n erää, joihin lisättiin säilöntäaine. Säilöntäainekäsittelyt olivat: 1) ei säilöntäainetta (painorehu) (PR), 2) muurahaishappo (100 %:na 4 l/t) (MH), 3) *L. plantarum* (DSM 11672) ja *Pediococcus acidilactici* (DSM 11673) 1×10^6 pmy/g sekä pektinaasi-, ksylanaasi- ja sellulaasientsyymi (LABE), 4) *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) 1×10^6 pmy/g (LP6), 5) *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) 1×10^5 pmy/g (LP5) ja 6) *L. plantarum* (DSM 3676 ja 3677) ja *L. buchneri* (DSM 13573) 2×10^5 pmy/g (LB). Rehut säilöttiin lasisiin 1,5 litran laboratoriosiiloihin, joita oli yhteensä 18. Laboratoriosiilojen lisäksi rehua säilöttiin jokaisesta säilöntäainekäsittelystä kuuteen rinnakkaiseen 120 ml:n minisiiloon säilönnän alkuaajan fermentaation ja rehujen pH:n muutoksen seuraamiseksi. Minisiiloista seurattiin kaasuntuotantoa 21 päivän ajan. Raaka-aineen koostumus ja rehujen säilönnällinen laatu sekä aerobinen stabiilisuus määritettiin.

Säilörehujen kuiva-ainepitoisuus oli suhteellisen pieni, jotta voitiin testata biologisten säilöntäaineiden tehoa määrässä rehussa. Kosteassa rehussa biologisten säilöntäaineiden toiminnan onnistuminen on haastavaa. Raaka-aineen sokeripitoisuus oli kuitenkin erittäin suuri, joten ymppirehujen säilöntä onnistui hyvin. Painorehu ei täyttänyt hyvän rehun kriteerejä ammoniumtypen osalta. Suuri ammoniumtypen pitoisuus saattoi johtua säilönnän alkuaajan hitaan pH:n laskun mahdollistamasta mikrobitoiminnasta, jonka johdosta rehussa tapahtui proteolyysiä. Muurahaishapporehu oli laadultaan tyydyttävää etikkahapon pitoisuuden osalta, mutta muilta osin täytti hyvän rehun laatukriteerit. Re-

hussa oli tapahtunut epätyypillistä etanolikäymistä hiivojen toimesta, jonka johdosta rehussa muodostui suuri määrä hiilidioksidia säilönnän aikana. Muurahaishapporehu ei kuitenkaan lämmennyt aerobisen stabiilisuuden mittauksen aikana, joka johtui todennäköisesti suuresta etikkahapon määrästä ja toisaalta pienestä sokerin määrästä.

Maitohappobakteerisäilöntäaineilla saatiin käymislaadultaan parempaa säilörehua verrattuna painorehuun, lukuun ottamatta maitohappobakteeri-entsyymirehua. Entsyymilisäyksellä ei todennäköisesti ollut hyötyä rehun säilöntälaadun kannalta. Raaka-aineen suuren sokeripitoisuuden johdosta säilörehussa oli koko säilönnän ajan tarpeeksi sokeria maitohappobakteerien käytettäväksi ja entsyymien toiminnan johdosta muodostunut ylimääräinen sokeri toimi substraattina haitallisille mikrobeille tuottaen suuren etikkahappopitoisuuden. Maitohappobakteeri-entsyymiseoksella tehty rehu oli etikkahappopitoisuuden perusteella heikkolaatuista.

*Lactobacillus plantarum*in molemmilla annostustasoilla 1×10^5 ja 1×10^6 pmy/g saatiin laadultaan hyvää rehua. Suuri jäännössokerin pitoisuus molemmissa rehuissa johtui todennäköisesti raaka-aineen tavallista suuremmasta sokerin määrästä. Molempien rehujen maitohappo-etikkahappo-suhde oli melko korkea, viitaten homofermentatiiviseen maitohappokäymiseen. Aerobinen stabiilisuus oli heikompi suuremmalla annostustasolla verrattuna pienempään annostustasoon, joka saattoi johtua esimerkiksi LP5-rehun epifyyttisten heterofermentatiivisten maitohappobakteerien toiminnasta. Tulos ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä.

LB-rehu oli säilönnälliseltä laadultaan hyvää. Heterofermentatiivisen ympin lisäys nosti tyypillisesti rehun pH:ta sekä pienensi maitohappo-etikkahappo-suhdelukua verrattuna homofermentatiiviseen ympiin. *L. buchneri* –lisäys paransi hieman säilörehun aerobista stabiilisuutta verrattuna homofermentatiivisella maitohappobakteerilla säilöttyyn rehuun (ei tilastollisesti merkitsevä). *L. buchnerin* johdosta rehussa tapahtui enemmän heterolaktista fermentaatiota.

Säilörehun raaka-aineen koostumus voi vaihdella suuresti satojen, peltolohkojen, ja vuoden mukaan, joten biologisten säilöntäaineiden tehon vertaaminen maatilamittakaavassa voi olla huomattavan vaikeaa. Pienessä mittakaavassa, kuten laboratoriosiiloissa, voidaan vertailla suuria määriä säilöntäaineita hyvin sekoitetussa erässä rehua samanaikaisesti ja samanlaisissa olosuhteissa. On otettava huomioon, että laboratoriosiilot voi-

daan täyttää nopeasti ja sulkea tehokkaasti, kun taas maatilamittakaavan siilojen täyttö voi kestää päiviä, jolloin voi esiintyä eri ainesosien hävikkiä. Ensisijaiset erot maatilasiilojen ja laboratoriosiilojen välillä ovat rehun säilömiseen kuluva ajassa, hapen pääsyssä rehuun ja lämpötilan nousussa. Laboratoriomittakaavassa tehokkaaksi osoittautuva biologinen säilöntäaine ei siis aina ole tehokas maatilamittakaavassa.

Tässä säilöntäkokeessa oli tarkoitus tutkia biologisten säilöntäaineiden tehoa usein esiintyvässä tilanteessa, jossa rehun raaka-aine on melko märkää ja sokeripitoisuus pieni. Raaka-aineen suuren sokeripitoisuuden takia biologisilla säilöntäaineilla onnistuttiin saamaan laadultaan hyvää ja pääosin parempaa rehua verrattuna painorehuun ja hyvälaatuisen rehun saamiseksi riitti homofermentatiivisen *L. plantarum*in pienempi annostus. Käytettäessä heterofermentatiivista *L. buchneria* yhdessä *L. plantarum*in kanssa pysyi rehu aerobisesti stabiilina noin kolme päivää pidempään kuin *L. plantarum*-rehu, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Tämän laboratoriomittakaavan kokeen perusteella biologisia säilöntäaineita käytettäessä voidaan saada käymislaadultaan hyvää ja painorehua parempaa säilörehua, kun raaka-aineen sokeripitoisuus on erittäin suuri.

LÄHTEET

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis (15th Ed.) Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

Artturi-verkkopalvelu. Rehuanalyysin tulkinta – märehitjät. MTT ja Valio Oy. URL: https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Artturi/Rehuanalyysi/Rehuanalyysin_tulkinta_marehtijat [Viitattu 5.5.2011].

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Salminen, S. & von Wright, A. (Eds.). *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects*. 2nd Edition. Marcel Dekker Inc., New York, USA. pp. 1-72.

Barker, S. B. & Summerson, W. H. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological materials. *Journal of Biological Chemistry* 138:537-554.

Beck, T. 1978. The micro-biology of silage fermentation. In: McCullough, M. E. (Ed.) *Fermentation of Silage – a Review*. National Feed Ingredients Association. Iowa, USA. pp. 61-115.

Beever, D. E., Offer, N. & Gill, M. 2000. The feeding value of grass and grass products. In: Hopkins, A. (Ed.). *Grass. It's Production and Utilization*. 3rd Edition. The Blackwell Science pp. 140-190.

Bhat, M. K. & Hazlewood, G. P. 2001. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: Bedford, M. R. & Partridge, G. G. (Eds.). *Enzymes in animal nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 11-60.

Blomqvist, L. 2010. Meta-analyysi muurahaishapon vaikutuksista säilörehun käymislaatuun. *Pro Gradu -tutkielma*. Maataloustieteiden laitos, Helsingin Yliopisto.

Bolsen, K. K., Ashbell, G. & Wilkinson, J. M. 1995. Silage additives. In: Wallace, R. J. & Chesson, A. (Eds.). *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany. pp. 33-54

Buxton, D. R. & Russell, J. R. 1988. Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. *Crop science* 28:553-558.

Cai, Y., Benno, Y., Ogawa, M. & Kumai, S. 1999. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *Journal of Dairy Science* 82:520-526.

Conaghan, P., O'Kiely, P. & O'Mara, F. P. 2010. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. *Journal of Dairy Science* 93:628-643.

- 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.
- 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. In: Park, R. S. & Stronge, M. D. (Eds.). *Silage production and utilisation. Proceedings of the XIVth International Silage Conference, a satellite workshop of the XXth International Grassland Congress*. Wageningen Academic Publishers, Belfast, Ireland. p. 211.
- Donald, A. S., Fenlon, D. R. & Seddon, B. 1995. The relationship between ecophysiology, indigenous microflora and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage. *Journal of Applied Bacteriology* 79:141-148.
- Downing, T. W., Buyserie, A., Gamroth, M. & French, P. 2008. Effect of water soluble carbohydrates on fermentation characteristics of ensiled perennial ryegrass. *The Professional Animal Scientist* 24:35-39.
- 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.
- Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H. & Van Wikselaar, P. G. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science* 56:330-343.
- Driehuis, F., van Wikselaar, P. G., van Vuuren, A. M. & Spoelstra, S. F. 1997. Effect of a bacterial inoculant on rate of fermentation and chemical composition of high dry matter grass silages. *Journal of Agricultural Science* 128:323-329.
- EFSA. The European Food Safety Authority. 2006. Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed for the establishment of guidelines on the assessment of safety and efficacy of silage additives, on a request from the Commission under Article 7(5) of Regulation (EC) No 1831/2003. *The EFSA Journal* 349:1-10.
- Filya, I. & Sucu, E. 2010. The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. *Grass and Forage Science* 65:446-455.
- Filya, I., Sucu, E. & Karabulut, A. 2006. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. *Journal of Applied Microbiology* 101:1216-1223.

- Fisher, D. S., Mayland, H. F. & Burns, J. C. 1999. Variation in ruminant's preference for tall fescue hays cut either at sundown or at sunup. *Journal of Animal Science* 77:762.
- Fitzsimons, A., Duffner, F., Curtin, D., Brophy, G., O'Kiely, P. & O'Connell, M. 1992. Assessment of *Pediococcus acidilactici* as a potential silage inoculants. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3047-3052.
- Friedel, K. 1990. Die Schätzung des energetischen Futterwertes von Grobfutter mit Hilfe einer Cellulasemethode. [The estimation of the energetic feeding value of roughages by means of a cellulase method]. *Wissenschaftliche Zeitung Universität Rostock, N-Reihe* 39:78-86.
- Gollop, N., Zakin, V. & Weinberg, Z. G. 2005. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of Applied Microbiology* 98:662-666.
- Hammes W. P., Weiss N. & Holzapfel W. 1992. The Genera of *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Barows, A. (Ed.). *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. 2nd Edition. Springer, New York, USA. pp. 1535-1594.
- Hatfield, R. D. 1993. Cell wall polysaccharide interactions and degradability. In: Jung, H. D., Buxton, D. R., Hatfield, R. D. & Ralph, J. (Eds.) *Forage cell wall structure and digestibility*. ASA, CSSA & SSSA, Madison, USA. pp. 285-313.
- Henderson, A. R., McDonald, P., Woolford, M. K. 1972. Chemical changes and losses during the ensilage of wilted grass treated with formic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 23:1079-1087.
- Henderson, A. R., McDonald, P. & Anderson, D. 1982. The effect of a cellulase preparation derived from *Trichoderma viride* on the chemical changes during the ensilage of grass, lucerne and clover. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 33:16-20.
- Heron, S. J. E., Edwards, R. A. & McDonald, P. 1986. Changes in the nitrogenous components of gamma-irradiated and inoculated ensiled ryegrass. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37:979-985.
- Heron, S. J. E., Edwards, R. A. & McDonald, P. 1988. The effects of inoculation, addition of glucose and mincing on fermentation and proteolysis in ryegrass ensiled in laboratory silos. *Animal Feed Science and Technology* 19:85-96.
- Holzer, M., Mayrhuber, E., Danner, H. & Braun, R. 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *TRENDS in Biotechnology* 21:282-287.

- Huhtanen, P., Nousiainen, J. & Rinne, M. 2006. Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. *Agricultural and Food Science* 15:293-323.
- 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.
- Huida, L., Väättäinen, H. & Lampila, M. 1986. Comparison of dry matter contents in grass silages as determined by oven drying and grass chromatographic water analysis. *Annales Agriculturae Fennicae* 25:215-230.
- Huntington, G. B. & Burns, J. C. 2007. Afternoon harvest increases readily fermentable carbohydrate concentration and voluntary intake of gamagrass and switchgrass baleage by beef steers. *Journal of Animal Science* 85:276-284.
- 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 the Scientific Agricultural Society of Finland* 62:51-62.
- Jaakkola, S. 1992. Silage fermentation in relation to the feeding value with special reference to enzyme-treated grass silage. *Academic Dissertation. Väitöskirja*. Helsingin Yliopisto, kotieläintieteen laitos, Helsinki.
- 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., Saarisalo, E. & Heikkilä, T. 2010. Aerobic stability and fermentation quality of round bale silage treated with inoculants or propionic acid. Conference Paper. *Proceedings of the 23rd General Meeting of the European Grassland Federation*. Kiel, Germany. pp. 503-505.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:209-224.
- Keady, T. W. J., Mayne, C. S. & Fitzpatrick, D. A. 2000. Prediction of silage feeding value from the analysis of the herbage at ensiling and effects of nitrogen fertilizer, date of harvest and additive treatment on grass silage composition. *Journal of Agricultural Science* 134:353-368.
- Keles, G. & Demirci, U. 2011. The effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale–Hungarian vetch silage and lamb performance. *Animal Feed Science and Technology* 164:21-28.
- Kleinschmit, D. H. & Kung, Jr., L. 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.

- Korhonen, M., Rinne, M. & Huhtanen, P. 2006. Lannoitusvasteet nurmirehun tuotannossa. Maataloustieteen päivät 2006. URL: <http://www.smts.fi/esit06/1201.pdf> [Viitattu 15.6.2011].
- Kristensen, N. B., Sloth, K. H., Højberg, O., Spliid, N. H., Jenssen, C. & Thøgersen, R. 2010. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *Journal of Dairy Science* 93:3764-3774.
- Kung, Jr., L. 2001. Silage fermentation and additives. In: Lyons, T. P. & Jacques, K. A. (Eds.) *Science and Technology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's Seventeenth Annual Symposium*. University Press, Nottingham, UK. pp. 145-159.
- Kung, Jr., L. & Ranjit, N. K. 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of Dairy Science* 84:1149-1155.
- Kung, Jr., L., Stokes, M. R. & Lin, C. J. 2003a. Silage additives. In: Buxton, D. R. (Ed.) *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy Inc., Madison, USA. pp. 305-360.
- Kung, Jr., L., Taylor, Jr., C. C., Lynch, M. P. & Neylon, J. M. 2003b. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86:336-343.
- Kung, Jr., L., Tung, R. S., Maciorowski, K. G., Buffum, K. & Knutsen, K. 1991. Effects of plant cell-wall-degrading enzymes and lactic acid bacteria on silage fermentation and composition. *Journal of Dairy Science* 74:4284-4296.
- Lindgren, S. E., Axelsson, L. T. & McFeeters, R. F. 1990. Anaerobic L-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters* 66:209-214.
- Lorenzo, B. F. & O'Kiely, P. 2008. Alternatives to formic acid as a grass silage additive under two contrasting ensilability conditions. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 47:135-149.
- Marita, J. M., Hatfield, R. D. & Brink, G. 2010. *In vitro* proteolytic inhibition, polyphenol oxidase activity, and soluble *o*-diphenols in grasses and cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:959-966.
- McAllister, T. A., Hristov, A. N., Beauchemin, K. A., Rode, L. M. & Cheng, K.-J. 2001. Enzymes in ruminant diets. In: Bedford, M. R. & Partridge, G. G. (Eds.). *Enzymes in animal nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 273-298.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clinical Chemistry Acta* 17:297-304.

- McDonald, P., Henderson, A. R. & Heron, S. J. E. 1991. *The biochemistry of silage*. 2nd edition. Chalcombe Publications, Marlow, UK. p. 340.
- Merry, R. J., Dhanoa, M. S. & Theodorou, M. K. 1995. Use of freshly cultured lactic acid bacteria as silage inoculants. *Grass and Forage Science* 50:112-123.
- Merry, R., J., Jones, R. & Theodorou, M. K. 2000. The conservation of grass. In: Hopkins, A. (Ed.). *Grass. Its Production and Utilization*. 3rd Edition. The Blackwell Science, Devon, UK. pp. 196-224.
- Moisio, T. & Heikonen, M. 1992. *AIV-rehun perusteet*. Kirjayhtymä Oy, Helsinki. 170 s.
- Moon, N. 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology* 55:453-460.
- MTT. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. 2008. Vapaaehtoinen nurmisäilörehun säilöntäaineen maatilatestaus.
URL:<https://portal.mtt.fi/pls/mttdocspub/docs/F1247703116/VAPAAEHTOINEN%20NURMISAILOREHUN%20SAILONTAAINEEN%20MAATILATESTAUS%202008.PDF>. [Viitattu 15.5.2011].
- Muck, R. E. 1987. Dry matter level effects on alfalfa silage quality. I. Nitrogen transformations. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 30:7-14.
- Muck, R. E. 1996. A lactic acid bacteria strain to improve aerobic stability of silages. In: *Research Summaries*. U. S. Dairy Forage Res. Center, Madison, WI, USA. pp. 42-43.
- Muck, R. E. & Kung Jr., L. 2007. Silage production. In: Barnes, R. F., Miller, D. A. & Nelson, C. J. (Eds.). *Forages: The Science of Grassland Agriculture*. pp. 617-633. URL: <http://hdl.handle.net/10113/9224> [Viitattu 28.6.2011].
- Muck, R. E. & Pitt, R. E. 1993. Ensiling and its effect on crop quality. *Proceedings of the National Silage Production Conference*. NRAES Cooperative Extension. Ithaca, NY, and Syracuse, NY. p. 57.
- Muck, R. E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39:183-191.
- Nadeau, E. M. G, Buxton, D. R. Russell, J. R., Allison, M. J. & Young, J. W. 2000. Enzyme, bacterial inoculants, and formic acid effects on silage composition of orchardgrass and alfalfa. *Journal of Dairy Science* 83:1487-1502.
- Nousiainen, J., Rinne, M., Hellämäki, M. & Huhtanen P. 2003. Prediction of digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stage of maturity from chemical composition and pepsin cellulase solubility. *Animal Food Science and Technology* 103:97-111.

Ogg, C. L. 1960. Determination of nitrogen by the micro-Kjeldahl method. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* 43:689-693.

Oude Elferink, S. J. W. H., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F. & Driehuis, F. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:125-132.

Pahlow, G. 2002. Application of a new concept for the estimation of the ensiling potential of forages for a range of crops. In: Gechie, L. M. & Thomas, C. (Eds.). *Proceedings of the 13th International Silage Conference*. Scottish Agricultural College, Auchincruive, Scotland.

Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H. & Spoelstra, S. F. 2003 Microbiology of ensiling. In: Buxton, D. R. (Ed.). *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy Inc. Madison, USA. pp. 31-94.

Pettersson, K. L. & Lindgren S. 1990. The influence of the carbohydrate fraction and additives on silage quality. *Grass and Forage Science* 45:223-233.

Pitt, R. E. & Leibensperger, R. Y. 1987. The effectiveness of silage inoculants: a systems approach. *Agricultural Systems* 25:27-49.

Ranjit, N. K. & Kung Jr, L. 2000. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science* 83:526-535.

Ranjit, N. K., Taylor, C. C. & Kung Jr, L. 2002. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. *Grass and Forage Science* 57:73-81.

Rauramaa, A., Setälä, J., Moisio, T., Heikkilä, T. & Lampila, M. 1987. The effect of inoculants and cellulase on the fermentation and microbiological composition of grass silage. 1. Biochemical changes in the silages. *Journal of Agricultural Science in Finland* 59:361-370.

Reich, L. J. & Kung Jr., L. 2010. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Animal Feed Science and Technology* 159:105-109.

Reid, R. L. 1994. Nitrogen components of forages and feedstuffs. In: Asplund, J. M. (Ed). *Principles of Protein Nutrition of Ruminants*. CRC Press Inc., Florida, USA. pp. 43-70.

Rinne, M., Huhtanen, P. & Nousiainen, J. 2008. Säilörehun ja koko rehuannoksen syönti-indeksit auttavat lypsylehmien ruokinnan suunnittelussa. *Maataloustieteen Päivät 2008*.
URL:http://www.smts.fi/mpol2008/index_tiedostot/Esitelmat/es086.pdf [Viitattu 15.5.2011].

- Rook, A. J. & Gill, M. 1990. Prediction of the voluntary intake of grass silages by beef cattle. 1. Linear regression analyses. *Animal Production* 50:425-438.
- Rooke, J. A. & Hatfield, R. D. 2003. Biochemistry of ensiling. In: Buxton, D. R. (Ed.). *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy Inc. Madison, USA. pp. 95-140.
- Rooke, J. A. & Kafilzadeh, F. 1994. The effect upon fermentation and nutritive value of silages produced after treatment by three different inoculants of lactic acid bacteria applied alone or in combination. *Grass and Forage Science* 49:324-333.
- Rooke, J. A., Borman, A. J. & Armstrong, D. G. 1990. The effect of inoculation with *Lactobacillus plantarum* on fermentation in laboratory silos of herbage low in water-soluble carbohydrate. *Grass and Forage Science* 45:143-152.
- Saarisalo, E., Jalava, T., Skyttä, E., Haikara, A. & Jaakkola, S. 2006a. 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* 15:1-15.
- Saarisalo, E., Skyttä, E., Haikara, A., Jalava, T. & Jaakkola, S. 2006b. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *Journal of Applied Microbiology* 102:327-336.
- Salo, M-L. 1965. Determination of carbohydrate fractions in animal food and faeces. *Acta Agralia Fennica* 105:1-102.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS® Qualification Tools User's Guide, Version 9.2 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schmidt, L., Weissbach, F., Wernecke, K.-D. & Hein, E. 1971. Erarbeitung von Parametern für die Vorhersage und Steuerung des Gärverlaufes bei der Grünfuttersilierung. *Forschungsbericht*. Oskar-Kellner-Institut für Tierernährung, Rostock, Deutschland.
- Schleifer, K. H. & Ludwig, W. 1995. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: Wood, B. J. B. & Holzappel, W. H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Vol 2. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK. pp. 7-18.
- Scudamore, K. A. & Livesey, C. T. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77:1-17.
- Seale, D. R. 1986. Bacterial inoculants as silage additives. *Journal of Applied Bacteriology* (Symposium Supplement) 61:9-26.

- Selmer-Olsen, I. 1994. Enzymes as silage additives for grass-clover mixtures. *Grass and Forage Science* 49:305-315.
- Selmer-Olsen, I., Henderson, A. R., Robertson, S. & McGinn, R. 1993a. Cell wall degrading enzymes for silage. 1. The fermentation of enzyme-treated ryegrass in laboratory silos. *Grass and Forage Science* 48:45-54.
- Selmer-Olsen, I., Henderson, A. R., Robertson, S. & McGinn, R. 1993b. Cell wall degrading enzymes for silage. 2. Aerobic stability of enzyme-treated laboratory silages. *Grass and Forage Science* 48:55-63.
- Sheperd, A. C., Maslanka, M., Quinn, D. & Kung Jr, L. 1995. Additives containing bacteria and enzymes for alfalfa silage. *Journal of Dairy Science* 78:565-572.
- Sipilä, A. 2006. Nurmen lannoitus. Nurmitieto 2.2.1. [Verkkojulkaisu]. *Suomen Nurmihdistyksen ja MTT:n julkaisusarja*. Julkaisupäivä: 31.5.2006. URL: www.agronet.fi/nurmihdistys [Viitattu 16.6.2011].
- Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160:61-68.
- Spoelstra, S. F., Van Wikselaar, P. G. & Harder, B. 1992. The effects of ensiling whole crop maize with a multi-enzyme preparation on the chemical composition of the resulting silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60:223-228.
- Tabacco, E., Righi, F., Quarantelli, A & Borreani, G. 2011. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. *Journal of Dairy Science* 94:1409-1419.
- Tengerdy, R. P., Weinberg, Z. G., Szakacs, G., Wu, M., Linden, J. C., Henk, L. L. & Johnson, D. E. 1991. Ensiling alfalfa with additives of lactic acid bacteria and enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 55:215-228.
- Tike. 2010. Maa- ja metsätalousministeriön tietopalvelukeskus 2010. Viljelykasvien sato 2010. URL:<http://www.maataloustilastot.fi/satotilasto> [Viitattu 15.4.2011].
- 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.
- Van Soest, P. J. & Wine, R. H. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 50:50-56.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74:3583-3597.

- Van Vuuren, A. M., Bergsma, K., Frol-Kramer, F. & Van Beers J. A. C. 1989. Effects of addition of cell wall degrading enzymes on the chemical composition and the *in sacco* degradation of grass silage. *Grass and Forage Science* 44:223-230.
- Weiss, W. P., Chamberlain, D. G. & Hunt, C. W. 2003. Feeding silages. In: Buxton, D. R. (Ed.). *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy Inc. Madison, USA. pp. 469-504.
- Weissbach, F. 1992. Determination of the buffering capacity. *Internal Report*. Institute of Grassland and Forage Research, Braunschweig. 3 p.
- Weimer, P. J., Lopez-Guisa, J. M. & French, A. D. 1990. Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by ruminal microorganisms *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology* 56:2421-2429.
- Weinberg, Z. G. & Muck, R. E. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews* 19:53-68.
- 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* 77:531-537.
- Wilkinson, J. M., Bolsen, K. K. & Lin, C. J. 2003. History of Silage. In: Buxton, D. R. (Ed.). *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy Inc. Madison, USA. pp. 1-30.
- Wohlt, J. E. 1989. Use of a silage inoculant to improve feeding stability and intake of a corn silage-grain diet. *Journal of Dairy Science* 72:545-551.
- Woolford, M. K. 1984. *The silage fermentation*. Marcel Dekker Inc., New York, USA. pp. 350.
- Wróbel, B. 2008. Quality and aerobic stability of big-bale silage treated with bacterial inoculants containing *Lactobacillus buchneri*. 22nd EGF General Meeting on “Biodiversity and animal feed – future challenges for grassland production”. Sweden. *Grassland Science in Europe* 13:651-653.
- Yan, T., Patterson, D. C., Gordon, F. J. & Porter, M. G. 1996. The effects of wilting of grass prior to ensiling on the response to bacterial inoculation. 1. Silage fermentation and nutrient utilization over three harvests. *Animal Science* 62:405-417.
- Yan, T., Patterson, D. C., Gordon, F. J. & Kilpatrick, D. J. 1998. Effects of bacterial inoculation of unwilted and wilted grass silages. 1. Rumen microbial activity, silage nutrient degradability and digestibility. *Journal of Agricultural Science* 131:103-112.

Zhang, T., Li, L., Wang, X., Zeng, Z., Hu, Y. & Cui, Z. 2009. Effects of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:965-971.