

SIANLANNASTA VAPAUTUVIEN HAJUPÄÄSTÖJEN
VÄHENTÄMINEN *Lactobacillus plantarum*- JA
HIILIHYDRAATTILISÄYKSILLÄ

LAHDEN AMMATTIKORKEAKOULU
Ympäristötekniikan koulutusohjelma
Ympäristöbiotekniikan suuntautumisvaihtoehto
Opinnäytetyö
Kevät 2006
Noora Hämäläinen

ESIPUHE

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Helsingin yliopiston Ympäristöekologian laitoksella. Kiitän Polttimo Yhtiöt Oy:tä tutkimuksen rahoituksesta ja työn aiheesta. Haluan kiittää myös työni ohjaajia Helsingin yliopiston Ympäristöekologian laitoksen professori Martin Romantschukia ja Lahden ammattikorkeakoulun yliopettaja Silja Kostiaa kaikista saamistani neuvoista ja ohjeista. Lisäksi kiitokseni Lahden tiede- ja yrityspuiston Tutkimuslaboratoriolle, joka tarjosi tilojaan tutkimuksiani varten.

LP-Tutkimuskeskus Oy:n Petri Peltolalle kiitokset saamistani neuvoista. Lisäksi haluan esittää kiitokset avusta ja ohjeistuksesta kannettavan kaasukromatografän käytössä VTT:n tutkimusinsinööri Tuula Kajolinnalle ja Lahden ammattikorkeakoulun lehtori Mervi Pulkkiselle. Kiitokset myös siiankasvattaja Ari Meroselle yhteistyöstä ja ennakkoluulottomasta asennoitumisesta tutkimusta kohtaan. Haluan osoittaa kiitokseni myös kaikille muille työssäni avustaneille henkilöille.

Lahdessa, huhtikuussa 2006

Noora Hämäläinen

Lahden ammattikorkeakoulu
Tekniikan laitos
Ympäristötekniikan koulutusohjelma

HÄMÄLÄINEN, NOORA: Sianlannasta vapautuvien hajupäästöjen vähentäminen *Lactobacillus plantarum*- ja hiilihydraattilisäyksillä

Ympäristöbiotekniikan opinnäytetyö, 65 sivua, 47 liitesivua

Kevät 2006

TIIVISTELMÄ

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, voidaanko sianlannan hajuun vaikuttaa bakteeri- ja hiilihydraattilisäysten avulla. Tavoitteena oli laskea lannan pH:ta ja vähentää lannasta haihtuvan ammoniakkin ja hajuyhdisteiden määrää. Bakterilisäyksellä pyrittiin muuttamaan lannan mikrobistoa.

Kokeet toteutettiin laboratoriomittakaavassa tuoreella sianlannalla. Tutkimukseen kuului neljä koejärjestelyä, joissa testattiin eri hiilihydraatteja ja eri hiilihydraattipitoisuuksia. Koejärjestelyissä tutkittiin pelkän hiilihydraatin sekä bakteerin ja hiilihydraatin yhteisvaikutusta. Lantaan lisätty bakteeri oli kaikissa koejärjestelyissä *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076. Lisäksi toteutettiin pienimuotoinen kenttäkoe, jossa testattiin, vaikuttaako hiilihydraattiliuoksen ja *L. plantarum*-nesteviljelmän ruiskuttaminen karsinoihin sikalan sisäilman hajuun.

Käsittelyjen vaikutusta sianlannan hajuun seurattiin sekä aistinvaraisesti että kaasukromatografisesti. Lannassa tapahtuvan prosessin etenemistä seurattiin pH-mittauksin. Lisäksi tutkittiin lantanäytteiden mikrobistoa maljauksin ja 16S rRNA-geenien sekvenssianalyseilla.

Laboratoriokokeiden perusteella käsittely pienentää sianlannasta aiheutuvia hajupäästöjä, jos käytetään riittävän suurta hiilihydraattipitoisuutta. Paras tulos saavutettiin, kun sianlantaan lisättiin sekä bakteeria että hiilihydraattia. Sekvenssianalyysien tulosten perusteella lantaan lisätty *L. plantarum* pystyi kilpailemaan lannan luonnollisen mikrobiston kanssa. Tulosten perusteella enemmistö tunnistetuista bakteereista kuului *Lactobacillus*-, *Clostridium*-, *Bacteroides*- ja *Escherichia*-sukuihin. Kenttäkokeesta ei saatu toivottuja tuloksia.

Ennen kuin tiedetään, voidaanko lannan hajuun vaikuttaa käytännössä, on tässä tutkimuksessa saatuja tuloksia tarpeen testata todellisissa olosuhteissa ja suuremmissa mittakaavassa. Seuraava tutkimuskohde voisi olla lietesäiliön lannan käsittely, jolloin voitaisiin selvittää käsittelyn tehoa varastoituun lantaan. Suurimmiksi haasteiksi menetelmän tuotteistamiselle muodostuvat luultavasti taloudellisuus ja toimintavarmuus vaihtelevissa olosuhteissa.

Asiasanat: sianlanta, hajupäästöt, pH, mikrobisto

Lahti University of Applied Sciences
Faculty of Technology
Degree Program of Environmental Technology

HÄMÄLÄINEN, NOORA: Reduction of Odour Emissions from Swine Manure
by *Lactobacillus plantarum* and Carbohydrate
Additions

Bachelor's Thesis in Environmental Biotechnology, 65 pages, 47 appendices

Spring 2006

ABSTRACT

The objective of this thesis was to find out if the odour of swine manure can be affected by bacterial and carbohydrate additions. The aim was to reduce the pH of manure and reduce the amount of ammonia and odour compounds. The bacterial additions were made to change the microbial community of manure.

The tests were done in a laboratory scale with fresh swine manure. The research included four test arrangements including testing with different types and amounts of carbohydrates and both the effect of the carbohydrate alone and the effect of both the bacterium and the carbohydrate together. The bacterium that was added to the manure was *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076 in all of the test arrangements. In addition, a small-scale field test was performed, which aimed at finding out whether spraying a combination of carbohydrate fluid and *L. plantarum* -liquid culture to a swine pen would affect the smell of the inside air in the piggery.

The effects of the treatments were inspected by smelling and by a gas chromatography. The ongoing process in the manure was monitored by pH measurements. The microbial community of the manure samples was researched by plating and by DNA sequence analyses of 16S rRNA.

The laboratory experiments showed that the treatment reduces swine manure odour emissions, if a sufficiently high carbohydrate level is used. The best results were obtained using both the bacterium and the carbohydrate. The sequence analyses indicated that the added *Lactobacillus plantarum* was able to survive and compete with the indigenous microbes. Most of the identified bacteria belonged to the genus *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* and *Escherichia*. Field testing did not produce desired results.

Further testing in real conditions and in a larger scale is required before any conclusions can be drawn about the possibilities to affect the odour of manure. New research could focus on the treatment of manure in manure storage pits. This could give valuable information about the effect of the treatment when applied to stored manure. Eventually, the greatest challenges for the method are likely to be the cost and reliability in changing circumstances.

Key words: swine manure, odour emissions, pH, microbial community

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 SIANLANNAN HAJUYHDISTEET JA MIKROBISTO	2
2.1 Sianlannasta vapautuvia hajuyhdisteitä	2
2.2 Sianlannan mikrobisto	3
3 KEINOJA HAJUONGELMIEN PIENENTÄMISEKSI	7
3.1 Lannan hajuominaisuuksia parantavat aineet	8
3.2 Sioille annettava ravinto	9
4 KOEJÄRJESTELYT JA MITATUT PARAMETRIT	10
4.1 Ensimmäinen koejärjestely	10
4.1.1 Tavoitteet ja toteutus	10
4.1.2 Seuratut parametrit	11
4.2 Toinen koejärjestely	12
4.2.1 Tavoitteet ja toteutus	12
4.2.2 Seuratut parametrit	13
4.2.3 Hajuyhdisteiden analysointi kaasukromatografisesti	13
4.3 Kolmas koejärjestely	15
4.3.1 Tavoitteet ja toteutus	15
4.3.2 Seuratut parametrit	16
4.4 Neljäs koejärjestely	16
4.4.1 Tavoitteet ja toteutus	16
4.4.2 Seuratut parametrit	17
4.5 Molekyylibiologiset tutkimukset	17
4.6 Kenttäkoe	22
5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	25
5.1 <i>L. plantarum</i> -bakteerin kasvu eri kasvatusalustoilla	25
5.2 Ensimmäinen koejärjestely	26
5.2.1 pH-arvo	26
5.2.2 Mikrobimäärät	28
5.2.3 Haju	29
5.3 Toinen koejärjestely	30
5.3.1 pH-arvo	30
5.3.2 Haju	31
5.4 Kolmas koejärjestely	36
5.4.1 pH-arvo	36
5.4.2 Mikrobimäärät	37
5.4.3 Haju	39
5.5 Neljäs koejärjestely	46
5.6 Molekyylibiologiset tutkimukset	52
5.6.1 DNA-sekvenssien editointi	55
5.6.2 DNA-sekvenssien identifiointi	57
5.7 Kenttäkoe	60
6 POHDINTA	60
LÄHTEET	64
LIITTEET	66

1 JOHDANTO

Sianlihan tuotantorakenteissa on tapahtunut selviä muutoksia viimeisen vuosikymmenen aikana. Tilojen kokonaismäärä on pienentynyt, koska eläintuotanto tapahtuu yhä suuremmissa yksiköissä. Vuonna 2003 Suomessa oli sianlihan tuotantoon erikoistuneita tiloja 3637, kun vastaava luku oli vuonna 1990 vielä 7080 (Hirvijoki, Knuutila & Heikinmaa 2003; Kansallinen rehustrategia ja toimintasuunnitelma 2004-2010 2004). Lisäksi sikalat ovat nykyään yhä useammin erikoistuneet tiettyihin kasvatusvaiheisiin.

Suurien sikaloiden ympäristövaikutukset voivat levitä laajoillekin alueille. Konkreettisin lähialueille aiheutuva haitta on haju, josta onkin tullut tärkeä tekijä sikaloiden ympäristölupia myönnettäessä. Hajuhaitan merkitys vielä korostuu, kun asutus laajenee sikaloiden läheisyyteen ja loma-asutus maaseudulla yleistyy. (Arnold 2002.)

Sikojen lanta aiheuttaa valtaosan sikaloiden hajupäästöistä. Sikaloiden ilmasta on tunnistettu yli 168 kemiallista yhdistettä. Merkittävimmiksi hajuyhdisteiksi on esitetty ammoniakkia, amiineja, rikkiä sisältäviä yhdisteitä, haihtuvia rasvahappoja, indoleita, skatolia, fenolisia yhdisteitä, alkoholeja ja karbonyyliyhdisteitä. (Mackie, Stroot & Varel 1998.) Sikaloiden hajukaasupäästöissä on kuitenkin yhä lukemattomia tunnistamattomia yhdisteitä. Monille sikaloista vapautuville hajuyhdisteille ovat tyypillisiä matalat hajukynnykset, jolloin hyvinkin pienet pitoisuudet voivat olla hajun kannalta merkittäviä. (Arnold 2002.)

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, voidaanko bakteeri- ja hiilihydraattilisäyksen vaikuttaa sianlannan hajuun. Tutkimuksessa testattiin *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076 -bakteeria ja useita eri hiilihydraatteja ja hiilihydraattipitoisuuksia. Koejärjestelyitä toteutettiin yhteensä neljä ja lisäksi suoritettiin pienimuotoinen kenttäkoe. Tavoitteena oli laskea lannan pH-arvoa ja samalla vähentää lannasta haihtuvan ammoniakkin ja muiden hajuyhdisteiden määrää. Bakteerilisäyksellä pyrittiin tekemään *Lactobacillus plantarum* -bakteerista vallitseva laji lannassa. *L. plantarum* -bakteerin avulla voitaisiin syrjäyttää lannassa luonnostaan olevia bakteereja, jotka tuottavat aineenvaihdunnassaan haisevia yhdisteitä.

Sianlannan hajussa tapahtuvia muutoksia seurattiin koejärjestelyiden aikana sekä aistinvaraisesti että kaasukromatografisesti. Lisäksi seurattiin lannan pH-arvoa ja selvitettiin bakteeripitoisuuksia maljauksilla. Lantanäytteiden mikrobistoa tutkittiin myös 16S rRNA -geenien sekvenssianalyseilla.

2 SIANLANNAN HAJUYHDISTEET JA MIKROBISTO

2.1 Sianlannasta vapautuvia hajuyhdisteitä

Lanta koostuu pääasiassa sulamattomista rehujäämistä, virtsa-aineista, bakteerisoluiista ja bakteerien aineenvaihduntatuotteista (Mackie ym 1998). Hajuyhdisteet ovat pääosin anaerobisten prosessien hajoamistuotteita. Hajupäästöt johtuvat lannan sisältämien proteiinien, hiilihydraattien ja rasvojen epätäydellisestä hajoamisesta. Hajuyhdisteitä syntyy jo sikojen suolistossa, mutta prosessi jatkuu vielä lannan varastoinnin aikana. Enemmistö haisevista yhdisteistä on peräisin lannan proteiinien hajotuksesta, kun taas ammoniakkia vapautuu lähinnä urean hydrolyysissä. (Zhu 2000.) Lannasta voi vapautua hyvin nopeasti haihtuvia haisevia orgaanisia yhdisteitä, lyhytketjuisia haihtuvia rasvahappoja sekä muita haihtuvia hiiltä, typpeä tai rikkiä sisältäviä yhdisteitä (Sutton, Kephart, Verstegen, Canh & Hobbs 1999). Lisäksi lannasta haihtuu yhdisteitä keräyksen, käsittelyn ja varastoinnin aikana.

Haihtuvat rasvahapot muodostavat yhden merkittävimmistä sianlannan hajuyhdisteryhmistä. Haihtuviin rasvahappoihin kuuluvat lyhytketjuiset rasvahapot, kuten asetaatti-, propionaatti-, butyraatti-, isobutyraatti-, valeriaatti-, isovaleriaatti- ja kapronihappo. Haihtuvia rasvahappoja muodostuu aminohappojen ja hiilihydraattien hajotessa sian suolistossa ja lannan säilytyksen aikana. (Zhu 2000.)

Haihtuvia rasvahappoja tuottavista lajeista *Clostridium*-suvun bakteerit ovat lannassa merkittävimpiä. Lisäksi *Eubacterium*-sukuun kuuluvat lajit voivat tuottaa suuria määriä haihtuvia rasvahappoja. Lannan säilytyksen aikana *Clostridium*- ja *Eubacterium*-bakteerit tuottavat luultavasti pääosan haisevista rasvahapoista.

Haihtuvia rasvahappoja aineenvaihdunnassa tuottavat lisäksi *Peptostreptococcus*-, *Bacteroides*-, *Streptococcus*-, *Escherichia*-, *Megasphaera*-, *Propionibacterium*- ja *Lactobacillus*-sukujen bakteerit. (Zhu 2000.)

Sianlannasta haihtuvia rikkiyhdisteitä ovat lähinnä rikkivety, metyylimerkaptani, dimetyylisulfidi ja dimetyylidisulfidi. Lietealtaasta vapautuvan rikkivedyn konsentraation on todettu olevan suoraan verrannollinen hajun kokonaispitoisuuteen ja voimakkuuteen (Lim, Heber, Ni, Sutton & Shao 2003). Bakteerit tuottavat haihtuvia rikkiyhdisteitä sulfaattien pelkistymisen ja rikkiä sisältävien aminohappojen metabolisaation yhteydessä. *Megasphaera*-suvun bakteerit tuottavat aineenvaihdunnallaan rikkiä sisältäviä yhdisteitä. (Zhu 2000.)

Ammoniakki on pistävänhajuinen kaasu, jota vapautuu lähinnä urean hydrolyysissä. Lisäksi ammoniakkia muodostuu dekarboksylaatioissa ja deaminaatioissa. Sianlannasta vapautuviin amiineihin kuuluvat metyyli- ja etyyliamiinit sekä putreskiini ja kadaveriini. Alifaattisia amiineja vapautuu sianlannasta yleensä vain pieniä pitoisuuksia. Putreskiinia ja kadaveriinia muodostuu aminohappojen dekarboksylaatioissa. Lannassa ammoniakkia ja amiineja tuottaviin bakteereihin kuuluvat *Streptococcus*-, *Peptostreptococcus*- ja *Bacteroides*-sukujen edustajat. (Zhu 2000.)

Lannasta tunnistettuihin yhdisteisiin lukeutuvat myös indoli, skatoli, kresoli ja 4-etyylifenoli. Fenoleja syntyy tyrosiinin ja fenyylialaniinin biologisessa hajoamisessa (Ishaque, Bisailon, Beaudet & Sylvestre 1985). Tryptofaanin hajotuksessa voi muodostua indoliasetaattia, jonka bakteerit muuttavat skatoliksi ja indoliksi (Mackie 1994). Indoleja ja fenoleja tuottavat lähinnä *Propionibacterium*-, *Escherichia*-, *Eubacteria*- ja *Clostridia*-sukujen bakteerit (Zhu 2000).

2.2 Sianlannan mikrobisto

Sianlannassa tapahtuva hajuyhdisteiden muodostuminen on monimutkainen prosessi, jossa mukana ovat useat bakteerilajit. Jotta hajuyhdisteiden muodostumista voitaisiin estää ja hallita, on lannan mikrobiston tunteminen tärkeää. (Zhu 2000.)

Sianlannan mikrobistoa tunnetaan kuitenkin vielä suhteellisen vähän (Zhu 2000; Whitehead & Cotta 2001).

Sianlannan tyypillisiksi bakteereiksi on esitetty *Streptococcus*-, *Peptostreptococcus*-, *Eubacterium*-, *Lactobacillus*-, *Escherichia*-, *Clostridium*-, *Propionibacterium*-, *Bacteroides*- ja *Megasphaera*-sukuja. Tietoja näistä bakteerisuvuista on koottu taulukkoihin 1 ja 2.

TAULUKKO 1. Tietoja lannan tyypillisten bakteerisukujen hajuyhdisteistä (Zhu 2000; Madigan, Martinko & Parker 2003)

Bakteerisuku	Substraatti	Hajuyhdisteet
<i>Streptococcus</i>	Hiilihydraatit	Muurahaishappo, etikkahappo, propionihappo, voihappo, ammoniakki ja haihtuvat amiinit
<i>Peptostreptococcus</i>	Peptonit, aminohapot	Muurahaishappo, etikkahappo, propionihappo, voihappo, isobutaanahappo, valerianahappo, kapronihappo, isopentaanahappo, ammoniakki ja haihtuvat amiinit, isoheksaanahappo
<i>Eubacterium</i>	Hiilihydraatit, peptonit	Muurahaishappo, etikkahappo, propionihappo, voihappo, isobutaanahappo, valerianahappo, kapronihappo, isopentaanahappo, isoheksaanahappo, indolit ja fenolit
<i>Lactobacillus</i>	Hiilihydraatit	Muurahaishappo, etikkahappo, propionihappo, voihappo
<i>Escherichia</i>	Esim. hiilihydraatit, aminohapot, orgaaniset hapot	Muurahaishappo, etikkahappo, propionihappo, voihappo
<i>Clostridium</i>	Hiilihydraatit, aminohapot	Muurahaishappo, etikkahappo, propionihappo, voihappo, isobutaanahappo, valerianahappo, kapronihappo, isopentaanahappo, isoheksaanahappo, indolit ja fenolit
<i>Propionibacterium</i>	Laktaatti, hiilihydraatit ja polyhydroksialkoholit	Muurahaishappo, etikkahappo, propionihappo, voihappo, isobutaanahappo, valerianahappo, kapronihappo, isopentaanahappo, isoheksaanahappo, indolit ja fenolit
<i>Bacteroides</i>	Hiilihydraatit, peptonit	Muurahaishappo, etikkahappo, propionihappo, voihappo, isobutaanahappo, valerianahappo, kapronihappo, isopentaanahappo, isoheksaanahappo, ammoniakki ja haihtuvat amiinit
<i>Megasphaera</i>	Laktaatti	Muurahaishappo, etikkahappo, propionihappo, voihappo, isobutaanahappo, valerianahappo, kapronihappo, isopentaanahappo, isoheksaanahappo, haihtuvat rikkiyhdisteet

TAULUKKO 2. Tietoja lannan tyypillisten bakteerisukujen ympäristövaatimuksista ja gramvärjäytymisestä (Zhu 2000; Madigan ym. 2003)

Bakteerisuku	Suhtautuminen hapen läsnäoloon	pH	Lämpötila	Gramvärjäys
<i>Streptococcus</i>	Fakultatiiveja tai ehdottomia anaerobeja	Lähellä neutraalia	Optimi 37 °C, ylä- ja alaraja vaihtelevat	Positiivisia
<i>Peptostreptococcus</i>	Obligaatteja anaerobeja	6,0-8,0 (optimi 7,0-7,5)	25 – 45 °C (optimi 35-37 °C)	Positiivisia
<i>Eubacterium</i>	Obligaatteja anaerobeja	Lähellä neutraalia	Optimi 37 °C	Positiivisia
<i>Lactobacillus</i>	Aerotolerantteja anaerobeja	Optimi 5,5-6,2	2-53 °C (optimi 30-40 °C)	Positiivisia
<i>Escherichia</i>	Aerobisia, fakultatiivisesti anaerobisia	–	2-53 °C (optimi 30-40 °C)	Negatiivisia
<i>Clostridium</i>	Obligaatteja anaerobeja	Optimi 6,5-7	Optimi 30-37 °C, kestävät vaihteleviakin	Positiivisia
<i>Propionibacterium</i>	Obligaatteja anaerobeja, aerotolerantteja	Lähellä neutraalia	Optimi 30-37 °C	Positiivisia
<i>Bacteroides</i>	Obligaatteja anaerobeja	Lähellä neutraalia	Optimi 37 °C	Negatiivisia
<i>Megasphaera</i>	Anaerobeja	Optimi hie-man neutraalin yläpuolella	Optimi 25-40 °C	Positiivisia

Whitehead ja Cotta selvittivät tutkimuksessaan sian ulosteen ja lietesäiliössä säilytetyn lannan mikrobistoa 16S rRNA -geenien sekvenssianalyysillä (2001). Vain 56 prosentille sekvensseistä löytyi geenipankista vähintään 95 prosentin vastaavuus. Näille 56 prosentille löydettyistä vastaavuuksista yli 98 prosenttia oli grampositiivisia bakteereja. Tutkimuksen mukaan enemmistö sian ulosteen ja lietesäiliössä säilytetyn lannan bakteereista onkin grampositiivisia bakteereja, joiden sekvenssien GC-pitoisuudet ovat matalia. *Clostridium*-suvun lajit olivat vallitsevia lietesäiliössä otetuissa lantanäytteissä. Sian ulosteesta tunnistetut bakteerit kuuluivat lähinnä *Lactobacillus*-, *Streptococcus*- ja *Clostridium*-sukuihin. Lietesäiliön lannasta ei tunnistettu *Lactobacillus*-suvun bakteereja ainuttakaan. Eroihin mikrobistoissa vaikutti osaltaan lämpötila- ja pH-erot. Sekvensseistä tehdyn

fylogeneettisen puun mukaan monet tunnistamattomista bakteereista olivat lähellä *Streptococcus*-, *Ruminococcus*-, *Peptostreptococcus*-, *Lactococcus*- ja *Clostridium*-sukuja. Tutkimus osoitti, että sekä sian ulosteen että lietesäiliössä säilytetyn lannan mikrobistoa tunnetaan vielä melko huonosti.

Myöhemmässä tutkimuksessa lietesäiliössä säilytetystä lannasta tunnistettiin suuri määrä *Enterococcus*-suvun bakteereja, kun taas sian tuoreessa ulosteessa niitä ei havaittu juuri ollenkaan. Lantanäytteistä eristetyt, tunnistamattomat bakteerit olivat pääasiassa hiilihydraatteja fermentoivia ja vain suhteellisen pieni osa pystyi fermentoimaan aminohappoja. Lantanäytteistä eristettyjen bakteerien käymisen lopputuotteet olivat pääosin haihtuvia rasvahappoja. (Cotta, Whitehead & Zeltwanger 2003.) Koska Cotta tutkimusryhmineen oli havainnut ammoniakkia tuottavia bakteereja vain hyvin vähän, työtä proteiineja, peptidejä tai aminohappoja fermentoivien bakteerien löytämiseksi jatkettiin. Tutkimuksessa löytyi bakteereja, jotka tuottivat ammoniakkia vastaavia määriä kuin pötsissä elävät HAP-bakteerit (hyper-ammonia producing). Ammoniakkia suuria määriä tuottavien bakteerien osuus lannassa on arvion mukaan 0,1-1 prosenttia kaikista viljeltävistä bakteereista. (Whitehead & Cotta 2004.)

3 KEINOJA HAJUONGELMIEN PIENENTÄMISEKSI

Kehitystyötä kotieläintuotannon hajun vähentämiseksi on tehty melko vähän. Kun ilmapäästöjä on pyritty vähentämään, enemmistö teknisistä ratkaisuksista on kehitetty ammoniakkipäästöille. Useimmat ammoniakkipäästöjä vähentävät menetelmät vähentävät myös hajua. Teknisiä ratkaisuja sikaloiden hajuhaittojen vähentämiseen on tutkittu lähinnä Keski-Euroopassa ja Yhdysvalloissa. (Arnold 2002.)

Sikaloista aiheutuviin hajupäästöihin voidaan vaikuttaa tuotantoketjun eri vaiheissa. Kaikkein kustannustehokkaimpia ratkaisuja hajupäästöjen vähentämisessä ovat yleensä tuotantojärjestelmiin tehtävät muutokset (Puumala & Grönroos 2004). Sikaloiden poistoilman käsittelystä on melko vähän käyttökokemusta ja lisäksi menetelmien käyttöönotto vaatii melko suuria investointeja (Mikkola, Puumala, Kallioniemi, Grönroos, Nikander & Holma 2002).

Sianlannasta vapautuvia hajupäästöjä on yritetty vähentää monilla menetelmillä: mädättämällä, ilmastamalla, kiintoaineen erotuksella, alhaisella lämpötilalla, entsyymilisäyksillä, bakteerilisäyksillä, kemikaaleilla, poistoilman suodatuksella hajua peittäville aineille ja muuttamalla sioille annettavan ravinnon koostumusta (Sutton ym. 1999). Sianlannasta vapautuvien hajuyhdisteiden määrään voidaan vaikuttaa myös esimerkiksi rakennusteknisin ratkaisuin. Lisäksi sikalan ilmanvaihto ja -poistojärjestelmillä pystytään vaikuttamaan sekä sikalan sisäilman hajuun että poistettavan ilman leviämiseen lähiympäristössä. (Arnold 2002.)

3.1 Lannan hajuominaisuuksia parantavat aineet

Lantaan lisättävien lisäaineiden käyttö on ollut lähinnä kokeiluasteella, eikä vakuuttavaa näyttöä lannan ominaisuuksia parantavien aineiden toimivuudesta ole. Laboratoriokokeissa on kuitenkin saavutettu hyviä tuloksia. Markkinoilla olevat lisäaineet voidaan jakaa viiteen ryhmään: voimakkaasti tuoksuvat aineet, hajua neutraloivat aineet, biologisesti hajuyhdisteitä hajottavat biologiset ja biokemialliset aineet, adsorbentit ja voimakkaat hapetusaineet. (Arnold 2002.)

Lisäksi on tutkittu lantaan lisättävien bakteerien vaikutusta hajunmuodostukseen. Vaikka laboratoriossa on saatu hyviä tuloksia, samoihin tuloksiin ei välttämättä olla päästy suuren mittakaavan kokeissa. Syynä tähän on ollut esimerkiksi erot olosuhteissa laboratorio- ja kenttäkokeiden välillä. Optimiolosuhteiden saavuttaminen suuremmassa mittakaavassa voi olla vaikeaa. Lisäksi ongelmaksi saattaa muodostua lisätyn bakteerin selviäminen lannassa. (Zhu 2000.)

Lannan ominaisuuksia voidaan parantaa myös vaikuttamalla lannassa vallitseviin olosuhteisiin lisäaineiden avulla. Lisäaineilla voidaan vaikuttaa esimerkiksi lannan mikrobistoon. Aineet, jotka vaikuttavat pH-arvoon, voivat epäsuorasti vähentää lannassa olevien patogeeneiden määrää. Näin lisäaineilla voitaisiin vähentää sekä lannasta vapautuvien hajuyhdisteiden että lannassa olevien patogeeneiden määrää. (McCrary & Hobbs 2001.)

Bodenrader patentoi vuonna 1980 menetelmän lietteen käsittelemiseksi. Bodenraderin mukaan lisäämällä *L. plantarum* -bakteeria ja laktoosia, saadaan lannan pH laskemaan alle neljään, jolloin patogeenit häviävät ja lantaa voidaan lisätä ilman jatkokäsittelyä pelloille. Patentissa ei oteta kantaa lietteen hajuun. (Bodenrader 1980.)

3.2 Sioille annettava ravinto

Lannasta vapautuvien hajuyhdisteiden on todettu korreloivan syötetyn rehun typipitoisuuden kanssa. Hajupäästöjä voidaan hallita optimoimalla ravinnon sisältämän proteiinin määrää. Proteiinien määrän vähentäminen on kuitenkin tarkkaa, sillä eläinten on saatava ravinnosta tarvitsemansa aminohapot. (Arnold 2002.) Proteiinien vähentämisen lisäksi hyviä tuloksia on saatu lisäämällä sikojen ravintoon ei-tärkkelyspitoisia polysakkarideja (Sutton ym. 1999). Proteiinien vähentämisen vaikutuksesta lannasta vapautuviin hajupäästöihin on kuitenkin olemassa keskenään ristiriitaisia tutkimustuloksia. Esimerkiksi Clark tutkimusryhmineen ei saanut tutkimuksessaan vastaavia tuloksia. Tutkimuksessa ei havaittu proteiinien vähentämisen vaikuttavan kokonaistyyppi- tai ammoniakkipäästöihin. Myös vaikutus hajutasoon oli merkityksetön. (Clark, Moehn, Edeogu, Price & Leonard 2005).

Rehuun lisättäviä lisäaineita on käytetty koeluonteisesti hajupäästöjen vähentämiseksi. Lisäaineet voivat vaikuttaa esimerkiksi alentavasti lannan pH-arvoon, jolloin myös ammoniakki- ja mahdollisesti myös hajupäästöt vähenevät. Vaikutus voi perustua myös esimerkiksi rehun sulavuuden parantamiseen. Koska hajuyhdisteiden syntyyn vaikuttaa rehun sisältämien ravinteiden hyödyntämistehokkuus, voidaan hajupäästöjä hillitä myös tehostamalla ruuansulatusta ruokintakertojen lisäyksellä. (Arnold 2002.) Vaiheruokinnan onkin katsottu olevan helpoin tapa vähentää typen ja fosforin eritystä (Puumala & Grönroos 2004).

4 KOEJÄRJESTELYT JA MITATUT PARAMETRIT

Koejärjestelyissä käytettiin samana tai edellisenä päivänä sikalan karsinoista kerättyä lantaa. Kokeet toteutettiin noin 250 millilitran lasipulloissa, joissa oli kumiset korkit (kuvio 1). Kuhunkin pulloon laitettiin 70 ml sianlantaa.



KUVIO 1. Koejärjestely

4.1 Ensimmäinen koejärjestely

4.1.1 Tavoitteet ja toteutus

Ensimmäisessä koejärjestelyssä haluttiin selvittää eri hiilihydraattien, eri hiilihydraattipitoisuuksien ja *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076 -bakteerilisäyksen vaikutusta sianlannan hajuun. Kokeissa testattiin kolmen eri hiilihydraatin, sakkaroosin, laktoosin ja maltoosin, tehoa hajunpoistossa. Kokeissa lantaan lisättiin hiilihydraattiliuoksia siten, että loppupitoisuuksiksi lannassa tuli yksi ja viisi prosenttia (til-%). Eri kokeet on koottu taulukkoon 3.

TAULUKKO 3. Ensimmäinen koejärjestely

Koe 1	raakalanta
Koe 2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Koe 3	sakkaroosipitoisuus 1 %
Koe 4	sakkaroosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i>
Koe 5	sakkaroosipitoisuus 5 %
Koe 6	sakkaroosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i>
Koe 7	laktoosipitoisuus 1 %
Koe 8	laktoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i>
Koe 9	laktoosipitoisuus 5 %
Koe 10	laktoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i>
Koe 11	maltoosipitoisuus 1 %
Koe 12	maltoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i>
Koe 13	maltoosipitoisuus 5 %
Koe 14	maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i>

Hiilihydraateista valmistettiin 20-prosenttiset vesiliuokset, jotka steriloitiin suodattamalla 0,45 µm suodattimen läpi. Pulloihin lisättiin hiilihydraattiliuoksia niin, että saatiin halutut loppupitoisuudet. Koejärjestelyä varten *L. plantarum* -bakteeria kasvatettiin MRS (Man, Rogosa, Sharpe) Broth -kasvatusliuoksessa. Liuoksen koostumus on esitetty liitteessä 1. Bakteeria inkuboitiin ravistelussa 21 °C:n lämpötilassa. *L. plantarum* -nesteviljelmää lisättiin haluttuihin pulloihin 700 µl. Pullot suljettiin löyhästi kumikorkeilla, jotta pullon sisään ei olisi muodostunut painetta. Pulloja säilytettiin huoneenlämmössä. Jokaista koetta oli kaksi rinnakkaista. Rinnakkaiset kokeet on eroteltu numeroin 1 ja 2.

4.1.2 Seuratut parametrit

Koejärjestelyn alussa lannasta tehtiin maljauksia eri *Lactobacillus*-suvun lajien viljelyyn tarkoitetuille MRS-maljoille sekä TGY-yleismaljoille. Maljojen koostumukset on esitetty liitteissä 2 ja 3. MRS-maljoja inkuboitiin aerobisesti 22 °C:ssa viisi vuorokautta ja TGY-maljoja anaerobisesti seitsemän vuorokautta

samassa lämpötilassa. Maljauksilla oli tarkoitus selvittää, kuinka paljon lannassa oli ennen käsittelyä maitohappobakteereja ja anaerobisia bakteereja. Lisäksi koejärjestelyn kahdeksantena päivänä tehtiin maljaukset MRS- ja TGY-maljoille seuraavista kokeista: raakalanta, *L. plantarum*, sakkaroosipitoisuus 5 %, sakkaroosipitoisuus 5 % + *L. plantarum*, laktoosipitoisuus 5 %, laktoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum*, maltoosipitoisuus 5 % ja maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum*. Maljaukset tehtiin ainoastaan toisen rinnakkaisen koesarjan pulloista. Ennen maljausten tekoa pullojen sisältö sekoitettiin.

Lannan kuiva-ainepitoisuus alussa määritettiin punnitsemalla punnittuun vuokaan noin 10 g lantaa. Lantaa esikuivatettiin vetokaapissa viikon ajan, minkä jälkeen näytettä kuivatettiin yön yli 105 °C:ssa. Eksikaattorissa jäädytyksen jälkeen näyte punnittiin uudestaan. Kun punnitustuloksesta vähennettiin vuoan massa, saatiin kyseisen näytteen kuivapaino ja kuivapainon kautta kuiva-ainepitoisuus. Lannan pH mitattiin IQ Scientific Instrumentsin kannettavalla pH-mittarilla (IQ150) koejärjestelyn kokoamisen yhteydessä ja pH:ta pulloissa seurattiin päivittäin yhdeksän vuorokauden ajan. Lisäksi seurattiin sianlannan hajunmuodostusta aistinvaraisesti.

4.2 Toinen koejärjestely

4.2.1 Tavoitteet ja toteutus

Toisessa koejärjestelyssä oli tarkoituksena selvittää, vaikuttaako olosuhteiden muuttuminen nesteviljelmän aerobisista lannan lähes anaerobiseksi *L. plantarum*-bakteerien sopeutumiseen. Lisäksi tarkoituksena oli testata kannettavaa Photovac Voyager™ -kaasukromatografia hajukaasujen mittauksessa. Näytepulloista imetty kaasu ajettiin kaasukromatografian kolmen kolonnin läpi. Photovac Voyager™ -kaasukromatografissa on PID-detektori.

Toinen koejärjestely koottiin kuten ensimmäinenkin koejärjestely. Erona ensimmäiseen koejärjestelyyn *L. plantarum*-bakteeria kasvatettiin kuitenkin lähes

anaerobisesti. Nestekasvatus toteutettiin erlenmeyerpullossa, johon jätettiin mahdollisimman pieni ilmatilavuus. Nestekasvatusta sekoitettiin rauhallisesti magneettisekoittajalla ja astia suljettiin mahdollisimman tiiviisti folion ja parafilmillä avulla. Inkubointi suoritettiin huoneenlämmössä. Kokeita tehtiin kaksi rinnakkaisista sarjaa.

4.2.2 Seuratut parametrit

Koejärjestelyn kokoamisen yhteydessä lannasta tehtiin maljaukset, pH-mittaus ja kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen kuten ensimmäisessä koejärjestelyssä. Lannan pH:ta pulloissa seurattiin 11 vuorokauden ajan. 12 vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta lannan hajuyhdisteitä analysoitiin kaasukromatografilla. Analysointi tehtiin ainoastaan toisista rinnakkaisista pulloista.

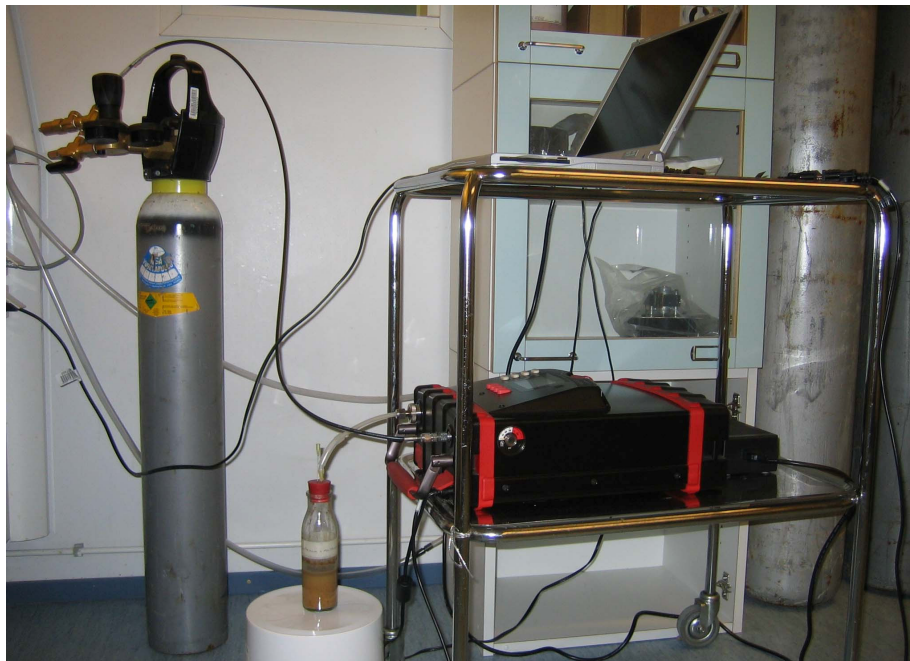
4.2.3 Hajuyhdisteiden analysointi kaasukromatografisesti

Photovac Voyager™ -kaasukromatografilla pystytään analysoimaan ainoastaan kaasumaisia yhdisteitä. Kaasunäytteenottoa varten kumikorkkien läpi työnnettiin kaksi injektioneulaa (0,90 · 70 mm). Toinen injektioneula työnnettiin mahdollisimman syväälle ja toinen niin, että se juuri läpäisi korkin. Syvemmälle työnnettyyn injektioneulaan kiinnitettiin noin kolmen senttimetrin pituinen silikoniletku, jonka avulla pullo voitiin liittää kaasukromatografiin. Ylempänä olevan injektioneulan tarkoituksena oli ottaa korvausilmaa näytteenoton ajan. Mittausta edeltäneenä päivänä korkit painettiin mahdollisimman syväälle ja tiivistettiin parafilmillä. Lisäksi korvausilmainjektioruiskujen päät suljettiin parafilmillä. Kuviossa 2 on esitetty näytteenottoa varten valmistellut pullo.



KUVIO 2. Pullot valmiina analysoitaviksi kaasukromatografilla

Kannettava kaasukromatografi yhdistettiin tietokoneeseen ja kaasupulloon. Kantokaasuna käytettiin synteettistä ilmaa ja mittaus suoritettiin SiteChart-tietokoneohjelman avulla. Mittausjärjestely on esitetty kuviossa 3.



KUVIO 3. Hajukaasujen mittaus kaasukromatografilla

4.3 Kolmas koejärjestely

4.3.1 Tavoitteet ja toteutus

Kolmanteen koejärjestelyyn valittiin ainoaksi hiilihydraatiksi maltoosi aiemmista koejärjestelyistä saatujen tulosten perusteella. Tässä koejärjestelyssä käytettiin kolmea maltoosipitoisuutta: 1, 2,5 ja 5 prosenttia. Toteutetut kokeet on esitetty taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Kolmas koejärjestely

Koe 1	raakalanta
Koe 2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Koe 3	maltoosipitoisuus 1 %
Koe 4	maltoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i>
Koe 5	maltoosipitoisuus 2,5 %
Koe 6	maltoosipitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i>
Koe 7	maltoosipitoisuus 5 %
Koe 8	maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i>

Kolmas koejärjestely koottiin kuten aikaisemmatkin koejärjestelyt. Aiemmista koejärjestelyistä poiketen osaan pulloista lisättiin steriiliä vettä. Veden lisäyksellä pyrittiin saamaan kaikkiin pulloihin sama tilavuus kuin niissä pulloissa, joissa lannan maltoosipitoisuus oli viisi prosenttia. Koejärjestelyä varten *L. plantarum* -bakteeria pyrittiin kasvattamaan anaerobisesti huoneenlämmössä. Aikaisemmista koejärjestelyistä poiketen *L. plantarum* -nesteviljelmää lisättiin 4,9 ml, jolloin bakteerilisäyksen osuus koko tilavuudesta oli noin viisi prosenttia. Kutakin koetta tehtiin kaksi rinnakkaista.

4.3.2 Seuratut parametrit

Kokeiden aloituksen yhteydessä lannasta tehtiin maljaukset, pH-mittaus ja kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen kuten aiemmissakin koejärjestelyissä. Lisäksi maljaustulosten tulkinnan helpottamiseksi haluttiin selvittää, kuinka hyvin *L. plantarum* pystyy kasvamaan TGY-maljalla. *L. plantarum* -nesteviljelmästä tehtiin maljaukset MRS-maljojen lisäksi myös TGY-maljoille, joista osaa inkuboitettiin aerobisesti ja osaa anaerobisesti.

Lannan pH:ta pulloissa seurattiin 30 vuorokauden ajan. Yhden ja kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta kaikista koepulloista analysoitiin hajuyhdisteitä kaasukromatografilla. Lisäksi pulloista tehtiin maljaukset MRS- ja TGY-maljoille. Maljausten yhteydessä pulloista otettiin näytteitä pakkaseen mahdollisia jatkotutkimuksia varten.

4.4 Neljäs koejärjestely

4.4.1 Tavoitteet ja toteutus

Neljännessä koejärjestelyssä haluttiin testata, voitaisiinko maltoosin sijaan käyttää jotakin muuta hiilihydraattipitoista ainesta. Yksi mahdollinen ja taloudellisessakin mielessä järkevä vaihtoehto voisi olla huonolaatuinen vilja. Tällä koejärjestelyllä testattiin, miten vehnä jauho ja maissitärkkelys toimivat sianlannan hajunpoistossa maltoosiin verrattuna. Neljännessä koejärjestelyssä toteutetut kokeet on esitetty taulukossa 5.

TAULUKKO 5. Neljäs koejärjestely

Koe 1	raakalanta
Koe 2	vehnä jauhopitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i>
Koe 3	maissitärkkelyspitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i>
Koe 4	maltoosipitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i>

Kokeet suoritettiin lasipulloissa aivan kuten aiemmissakin koejärjestelyissä. Tällä kertaa pulloihin ei lisätty vettä. Vehnäjauhosta (hiilihydraattipitoisuus 71 %), maissitärkkelyksestä (hiilihydraattipitoisuus 86 %) ja maltoosista tehtiin 20-prosenttiset liuokset. Kun pulloihin lisättiin liuoksia 10 ml, saatiin loppupitoisuudeksi 2,5 prosenttia. Fermentorissa kasvatettua *L. plantarum* -nesteviljelmää lisättiin 4 ml. Koejärjestely toteutettiin kahtena rinnakkaisena sarjana.

4.4.2 Seuratut parametrit

Koejärjestelyn kokoamisen yhteydessä määritettiin lannan kuiva-ainepitoisuus. Pulloihin lisätyn *L. plantarum* -nesteviljelmän bakteeripitoisuus määritettiin maljaamalla, mutta tässä koejärjestelyssä ei tehty muita maljauksia. Pulloista analysoitiin hajuyhdisteitä kaasukromatografisesti yhden ja kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta. pH-seurantaa jatkettiin 29 vuorokauden ajan.

4.5 Molekyylibiologiset tutkimukset

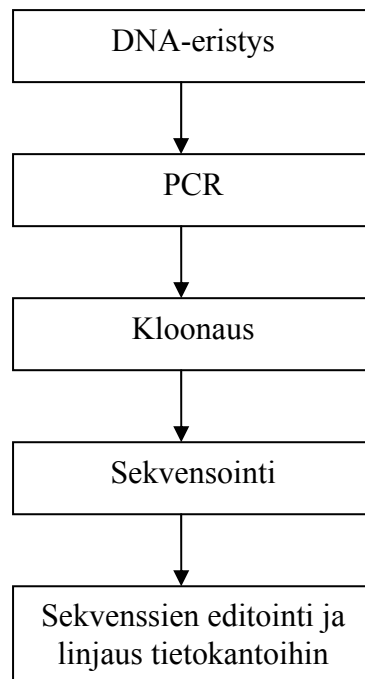
Käsittelyillä saatujen hajuvaikutusten lisäksi kiinnostuksen kohteena oli lannan mikrobipopulaatioissa mahdollisesti tapahtuneet muutokset käsittelyjen aikana. Bakteerien identifioimiseksi osasta kolmannessa koejärjestelyssä otetuista näytteistä tehtiin molekyylibiologisia tutkimuksia. Tutkimuksiin valitut näytteet on esitetty kuviossa 4.

Raakalanta (1)	+	+	+
Raakalanta (2)	+	+	+
Maltoosi 5 % (1)	+	+	+
Maltoosi 5 % (2)	+	+	+
Malt 5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	+	+	+
Malt 5 % + <i>L. plantarum</i> (2)	+	+	+



KUVIO 4. Molekyylibiologisiin tutkimuksiin valitut näytteet

Työn vaiheet on esitetty kuviossa 5. Lantanäytteistä tehtiin ensin kokonais-DNA-eristys. Kokonais-DNA:sta monistettiin polymeraasiketjureaktiolla (PCR) noin 500 emäsparin pituisia jaksoja bakteerien 16S rRNA -geneistä. Monistetut DNA-jaksot siirrettiin kaupallisiin plasmidivektoreihin, jotka transformoitiin *Escherichia coli* -bakteereihin. Kloonit poimittiin maljoilta ja solut rikottiin keittämällä. Plasmidivektoreihin liitettyjä DNA-jaksoja monistettiin samoilla alukkeilla, joita käytettiin alussa haluttujen DNA-jaksojen monistukseen kokonais-DNA:sta. PCR-tuotteet sekvenssoitiin ja saadut sekvenssit editoitiin erillisillä ohjelmilla. Lopuksi sekvenssit linjattiin tietokantoihin.



KUVIO 5. Molekyylibiologisten tutkimusten vaiheet

Kokonais-DNA-eristys tehtiin FastDNA® SPIN Kit for Soil -reagenssi-pakkauksella. DNA-eristys tehtiin valmistajan ohjeen mukaan. Kustakin lantanäytteestä punnittiin 250 mg eristystä varten. Työohjeesta poiketen putkia prosessoitiin FastPrep® -laitteessa 30 sekuntia nopeudella 5,0. Lysing Matrix E -putkia sentrifugoitiin minuutti kierrosnopeudella 13 000 kierrosta/minuutti (RPM). Samaa kierrosnopeutta käytettiin muissakin työvaiheissa 14 000 RPM:n sijaan. Lopuksi DNA liuotettiin 80 µl:aan DNAasi- ja pyrogeenivapaata vettä.

Kokonais-DNA-eristyksen onnistuminen varmistettiin ajamalla DNA-eristyksiä kaksi prosenttisessa agarosigeelissä. Ennen geelille latausta valmistettiin näytteet lisäämällä 5 µl:aan DNA-eristystä 1 µl latausväriä (6 x loading dye, MBI Fermentas). Generuler™ 1 kb DNA Ladder –molekyylikomarkkeria (MBI Fermentas) ladattiin geelille 1 µl. Työssä käytettiin Pharmacia Biotech GNA 200 -ajolaitetta. Ajo tehtiin 1x TAE-puskurissa 80 V:n jännitteellä. Näytteitä ajettiin geelissä 45 minuuttia.

DNA-eristyksistä monistettiin PCR-menetelmällä osaa 16S rRNA -geenistä. Monistuksessa käytettiin 16S rRNA -yleisbakteriaalukkeita MF341 5'-CTA CGG

GAG GCA GCA-3' ja MR907 5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'.

Lyhenne M alukkeen MR907 sekvenssissä vastaa adensiinia tai sytosiinia. PCR-reaktioissa käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 6.

TAULUKKO 6. PCR-reaktiot

Kantaliuos	Pitoisuus reaktioseoksessa	Yhteen reaktioon
10 x Dynazyme -puskuri	1 x	5 µl
10 mM dNTP-seos	0,2 mM	1 µl
10 µM MF341	0,2 µM	1 µl
10 µM MR907	0,2 µM	1 µl
BSA 20 (mg/ml)	0,2 mg/ml	0,5 µl
DNA-templaatti		1 µl
Dynazyme II (2 U/µl)	1 U	0,5 µl
Ster. vesi		40 µl

Monistus tehtiin taulukossa 7 kuvatun PCR-ohjelman mukaisesti.

TAULUKKO 7. PCR-ohjelma

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (min)
1 alkudenaturaatio	94	5
2 denaturaatio	94	0:20
3 alukkeiden kiinnittyminen	55	0:20
4 pidennysreaktio	72	0:30
5 sykli 2-4, 25 x		
6 loppusynteesi	72	5
7 jäähdytys	4	∞

PCR-reaktioiden onnistuminen tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla, minkä jälkeen DNA-jaksoja kloonattiin kompetentteihin *Escherichia coli* -bakteereihin. Kloonaus suoritettiin QIAGEN PCR Cloning plus Kit -kitillä. Puhdistamattomien

PCR-tuotteiden ligaatio kloonausvektoreihin tehtiin valmistajan ohjeen mukaan. Kuuden ensimmäisen lantanäytteen kohdalla ligaatioreaktioon käytettiin 2 µl PCR-tuotetta. Loppujen näytteiden ligaatioreaktioihin lisättiin PCR-tuotteita 1 µl. Työohjeesta poiketen ligaatioreaktioita inkuboitii 4 °C:ssa kolme tuntia.

Transformaatioissa käytettiin QIAGEN EZ -kompetentteja soluja. Transformaatio suoritettiin työohjeen mukaan. Työohjeesta poiketen kompetentteja soluja sisältäviin putkiin lisättiin ligaatioreaktioseosta 3 µl ja inkubointia jäähauteessa jatkettiin 30 minuutin ajan. Transformaation jälkeen tehtiin maljaukset Luria Bertani -maljoille, jotka sisälsivät antibiootti- ja sinivalkoselektiota varten ampicilliinia (100 µg/ml), X-gal:ia (80 µg/ml) ja IPTG:tä (0,05 mM). Luria Bertani -maljojen koostumus on esitetty liitteessä 4. Maljoja inkuboitii 37 °C:ssa yön yli.

Sinivalkoselektion avulla saatiin erotettua, minkä pesäkkeiden soluissa oli yhdistelmä-DNA -plasmidi ja missä pelkkä plasmidivektori. Valkoisia pesäkkeitä pyrittiin poimimaan jokaista lantanäytettä kohden 20 kappaletta. Poimitut pesäkkeet siirrostettiin 25 µl steriiliä vettä sisältäviin Eppendorf-putkiin. Solut rikottiin pitämällä putkia 100 °C:n lämpöhauteessa viisi minuuttia, minkä jälkeen putkia sentrifugoitiin minuutin ajan kierrosnopeudella 12 000 RPM. Sentrifugoinnin jälkeen putkia pidettiin jäähauteessa.

Kloonauksen onnistuminen tarkistettiin tekemällä PCR-reaktiot poimittujen pesäkkeiden DNA:sta. Reaktioissa käytettiin samoja alukkeita, joilla monistettiin kloonattavia DNA-jaksoja. PCR-reaktioiden onnistuminen varmistettiin agarosegeelielektroforeesilla. PCR-tuotteet ladattiin geelille kuten DNA-eristyksetkin. Näytteitä ajettiin 100 V:n jännitteellä tunti. Onnistuneet tuotteet sekvensoitiin molempiin suuntiin Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutin sekvensointilaboratoriossa.

Lantanäytteistä monistettujen 16S rRNA -geenien lisäksi sekvensoitiin myös koikeissa käytetystä *L. plantarum* -bakteerista monistettuja 16S rRNA -geenejä. Sekvensointia varten *L. plantarum* -erillispesäke siirrostettiin 25 µl:aan steriiliä vettä. Solut rikottiin keittämällä soluja 100 °C:ssa viisi minuuttia. Sentrifugoinnin jälkeen toistettiin samat työvaiheet, jotka tehtiin lantanäytteiden DNA-eristyksille.

Muista näytteistä poiketen valkoisia pesäkkeitä poimittiin kuitenkin vain kymmenen.

Sekvensointiin lähetetyt PCR-tuotteet ajettiin vielä uudestaan agarosigeelissä. Kaivoihin ladattiin PCR-tuotteita 3 µl ja 1 kb:n kokostandardin lisäksi käytettiin 100 bp molekyylipainomarkkeria. Näytteitä ajettiin 100 V:n jännitteellä tunti.

4.6 Kenttäkoe

Pienen mittakaavan pullokokeiden lisäksi *L. plantarum* -bakteerin ja maltoosin soveltuvuutta sianlannan käsittelyyn haluttiin testata käytännössä. Kenttäkoe toteutettiin Virenojalla sijaitsevassa yhteistyösikalassa. Tarkoituksena oli ruiskuttaa *L. plantarum* -nesteviljelmää ja maltoosiliuosta osaan sikalan karsinoista.

Kenttäkokeessa käytettiin puhtaan maltoosin sijaan Oy Maltax Ab:n Maltax 10 MP -uutetta. Uutteen tietoja on kuvattu taulukossa 8.

TAULUKKO 8. Tietoja Maltax 10 MP -uutteesta (Oy Maltax Ab)

Kuiva-aine (°Brix)	80,3
pH (10 % w/v liuos)	5,90
Liukoinen typpi (mg/l)	708
Proteiini (N x 6,25) (% k.a.)	5,5
Pelkistävät sokerit (maltoosi) (% k.a.)	79,7

L. plantarum -nestekasvatus tehtiin Labfors[®] -fermentorissa (Infors HT). Pullokokeita varten *L. plantarum* -bakteeria kasvatettiin kaupallisessa MRS broth -liuoksessa. Kenttäkoetta varten nesteviljelmää tarvittiin kuitenkin niin suuri määrä, että kasvatusalusta päätettiin valmistaa itse. Ennen suuremman mittakaavan nestekasvatusta tehtiin kokeita sopivan kasvatusalustan löytämiseksi. Aluksi testattiin kasvatusalustoja, jotka sisälsivät ainoastaan uutetta, vettä ja puskurina natriumasetatitrihydraatti-liuosta. Koska esikokeissa ei saatu aikaan haluttua kas-

vu nopeutta, ryhdyttiin jäljittämään MRS broth -liuosta. Taulukossa 9 on esitetty fermentorikasvatusta varten valmistetun kasvatusalustan koostumus.

TAULUKKO 9. Fermentorikasvatuksessa käytetty kasvatusalusta

Reagenssi	Määrä
Natriumasetaatti • 3H ₂ O (50 g/l)	100 ml
Maltax 10 MP -uute	78 ml
Peptoni	10,0 g
Hiiuvuute	4,0 g
Lihavuute	8,0 g
Tislattu vesi	Ad 1000 ml

Fermentoriin lisättävää siirrosta varten kasvatusalustaa valmistettiin ensin pienempi määrä. Alustaa tehtäessä kaikki reagenssit uutetta lukuun ottamatta yhdistettiin ja autoklavoitiin 121 °C:ssa 20 minuutin ajan. Maltax 10 MP -uutetta steriloitiin erikseen autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuuttia, minkä jälkeen uute lisättiin steriloituun kasvatusalustaan. *L. plantarum* -siirrostetta valmistettiin 105 millilitraa, josta otettiin viisi millilitraa maljauksia varten juuri ennen siirrostusta fermentoriin. *L. plantarum* -nesteviljelmää inkuboitiin lähes anaerobisesti erlenmeyerpulloissa.

Kasvatusalustaa valmistettiin fermentorikasvatusta varten viisi litraa. Fermentoriin lisättiin kaikki alustaan tulevat reagenssit Maltax 10 MP -uutetta lukuun ottamatta. Kasvatuksen aikana tapahtuvaa pH:n säätöä varten valmistettiin 1,4 M suolahappoliuosta ja 1 M natriumhydroksidiliuosta. Happo- ja emäsluokset kaadettiin lasipulloihin, joille oli teline fermentorin kyljessä. Kun mitta-anturit oli kalibroitu ja asetettu paikalleen sekä kaikki aukot suljettu pumpulilla ja foliolla, koko fermentori autoklavoitiin 121 °C:ssa tunnin ajan. Ennen autoklavointia fermentoriin merkittiin nestepinnan korkeus. Autoklavoinnin aikana haihtuneen veden korvaamiseksi jäähtyneeseen kasvatusalustaan lisättiin steriloitua vettä merkkiin asti. Tämän jälkeen moottori asetettiin paikalleen ja letkut kiinnitettiin niin, että kaikki oli valmista kasvatuksen aloitusta varten. Kun Maltax 10 MP -uute oli

kaadettu fermentoriin, käynnistettiin sekoitus uutteen liuottamiseksi. Lopuksi fermentoriin lisättiin *L. plantarum* -siirrostetta.

Kun kaikki tarvittavat lisäykset oli tehty, asetettiin fermentoriin säädöt kasvatusta varten. pH säädettiin 5,5:een niin, että säätörajoiksi asetettiin pH-arvot 5,3 ja 5,7. Lämpötila säädettiin 22 °C:seen ja sekoitusnopeus aluksi 1000 RPM:ään. Myöhemmin kierrosnopeus laskettiin 500 RPM:ään. Nesteviljelmää ei ilmastettu kasvatuksen aikana. Fermentorikasvatusta jatkettiin kolme vuorokautta. Kasvatuksessa käytetty laitteisto on esitetty kuviossa 6.



KUVIO 6. Fermentorikasvatukseen käytetty laitteisto

L. plantarum -siirrosteen bakteeripitoisuuden selvittämiseksi juuri ennen fermentoriin siirrosta otetusta näytteestä tehtiin maljaukset MRS-maljoille. Ensimmäisen viikon ruiskutuskäsittelyä varten fermentorista otettiin litra nestekasvatusta jo vuorokauden kasvatuksen jälkeen. Samassa yhteydessä otettiin näyte ja tehtiin

maljaukset. Nesteviljelmästä tehtiin maljaukset myös kasvatuksen lopussa, jotta saatiin selvitettyä kasvatuksessa saavutettu *L. plantarum* -pitoisuus.

Sikalaan ruiskutusta varten Maltax 10 MP -uutteesta valmistettiin liuos, jonka maltoosipitoisuus oli 10 prosenttia. Fermentorikasvatusta ja maltoosiliuosta sekoitettiin suhteessa 1:9. Liuosta ruiskutettiin käsiteltäviin karsinoidiin viisi litraa jokaisella käsittelykerralla. Kokeissa käytettyä kahden ja puolen tai viiden prosentin maltoosipitoisuutta oli vaikea saavuttaa ruiskuttamalla. Lisäksi käsiteltävän lannan tilavuutta oli vaikea arvioida, joten saavutettua pitoisuutta ei pystytty selvittämään.

Ruiskutus toistettiin noin kaksi kertaa viikossa samoihin karsinoidiin. Käsiteltävä alue koostui kuudesta karsinasta. Liuosta ruiskutettiin tasaisesti joka puolelle karsinoita. Käsiteltävien karsinoiden lisäksi valittiin kontrolleina toimivat tilat. Ensimmäisen ruiskutuksen yhteydessä otettiin näytteitä pH-mittauksia varten. Käsitelyn vaikutusta sianlannan hajuun seurattiin aistinvaraisesti.

5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

5.1 *L. plantarum* -bakteerin kasvu eri kasvatusalustoilla

Taulukossa 10 on esitetty *L. plantarum* -nesteviljelmän bakteeripitoisuudet, kun maljauksissa on käytetty eri maljoja ja kasvatusolosuhteita. Maljaustulosten perusteella näyttää siltä, että *L. plantarum* pystyy kasvamaan lähes yhtä hyvin TGY-maljalla kuin MRS-maljallakin.

TAULUKKO 10. *L. plantarum* -nesteviljelmän bakteeripitoisuus

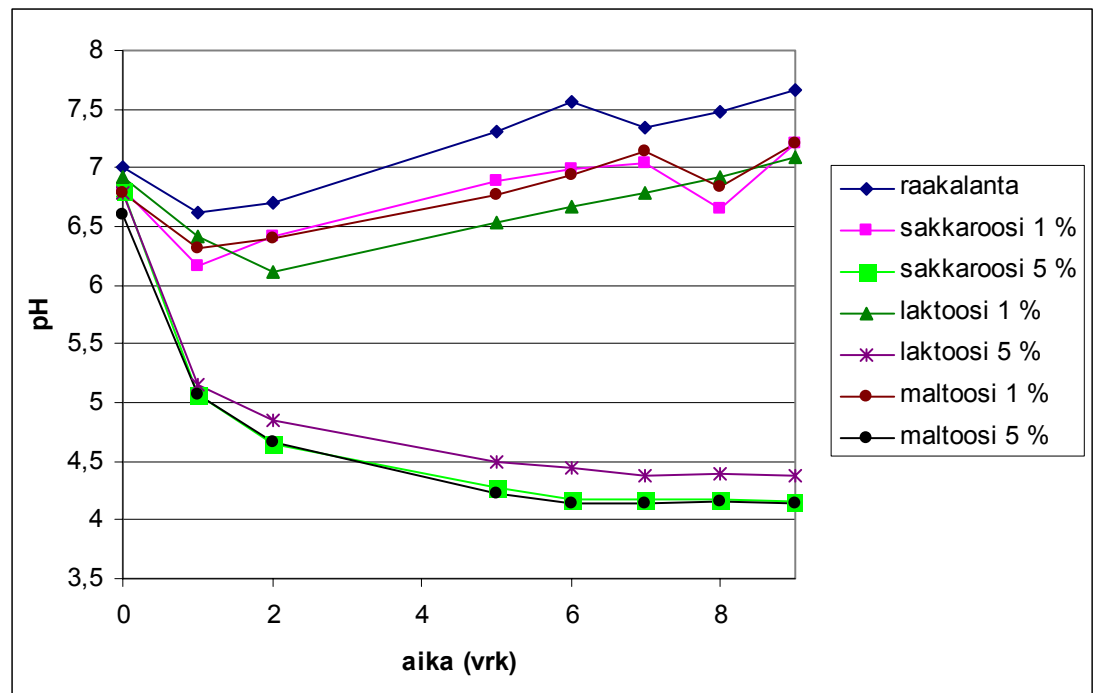
Malja	Kasvatusolosuhteet	Bakteeripitoisuus (cfu/ml)
MRS	Aerobisesti 22 °C:ssa 5 vrk	$3,2 \cdot 10^9$
TGY	Aerobisesti 22 °C:ssa 7 vrk	$3,1 \cdot 10^9$
TGY	Anaerobisesti 22 °C:ssa 7 vrk	$3,0 \cdot 10^9$

5.2 Ensimmäinen koejärjestely

Ensimmäisen koejärjestelyn kokoamisen yhteydessä tehtyjen maljausten avulla saatu lannan maitohappobakteeripitoisuus oli $7,4 \cdot 10^6$ cfu/ml (colony forming units/ml) ja anaerobisten bakteerien määrä $1,9 \cdot 10^8$ cfu/ml. Pulloihin lisätyn *L. plantarum* -nesteviljelmän bakteeripitoisuus oli $1,5 \cdot 10^9$ cfu/ml. Koejärjestelyssä käytetyn lannan kuiva-ainepitoisuus oli alussa 13,6 prosenttia.

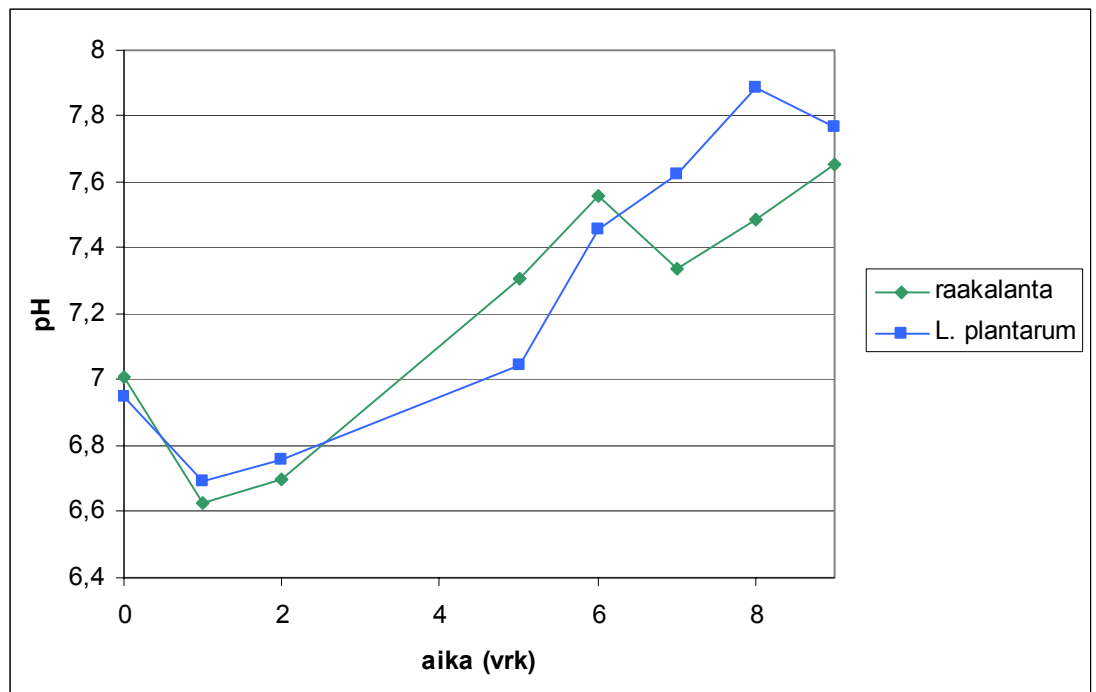
5.2.1 pH-arvo

Ensimmäisen koejärjestelyn mittaustulokset on koottu liitteeseen 5. Kuviossa 7 on esitetty eri hiilihydraattien ja hiilihydraattipitoisuuksien vaikutus sianlannan pH-arvoon. Lannan pH laski muutamassa päivässä alle 4,5:een niissä kokeissa, joissa lannan hiilihydraattipitoisuus oli viisi prosenttia. Vaikutus oli sama kaikilla käytetyillä hiilihydraateilla. 1-prosenttisellä hiilihydraattipitoisuudella ei saavutettu samanlaista pH:n alenemista.



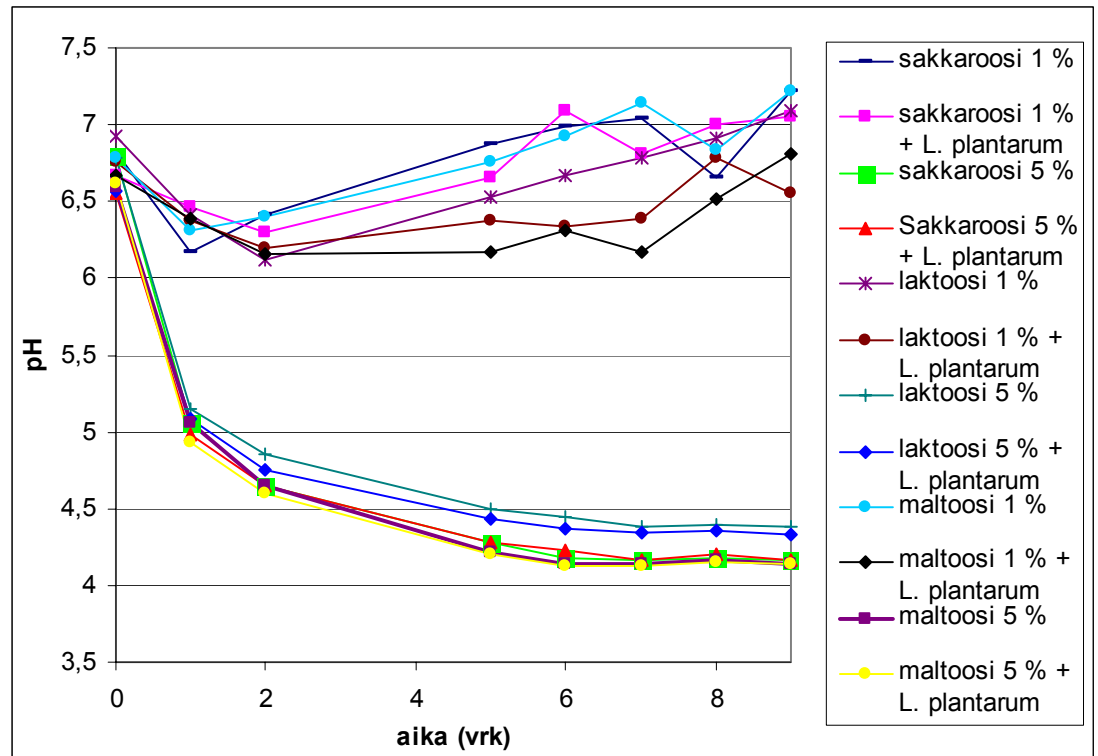
KUVIO 7. Hiilihydraattien ja niiden pitoisuuksien vaikutus sianlannan pH-arvoon

Sillä, mitä hiilihydraattia käytettiin, ei juuri ollut vaikutusta pH-arvon alenemiseen. Suurin pH-arvon lasku saavutettiin 5-prosenttisilla sakkaroosi- ja maltoosipitoisuuksilla. 5-prosenttisilla hiilihydraattipitoisuuksilla pH-arvo laski nopeasti. Suurin alenema tapahtui jo ensimmäisen vuorokauden aikana. Kokeissa, joissa lannan hiilihydraattipitoisuus oli prosenttin, pH laski alussa vain hieman. Pienen laskun jälkeen pH-arvo kuitenkin nousi melko tasaisesti koko pH-seurannan ajan. Raakalannan pH-arvo pysyi koko seurannan ajan kaikkein korkeimpana. Pelkän *Lactobacillus plantarum* -bakteerin lisäyksellä ei juuri ollut vaikutusta pH-arvoon (kuvio 8).



KUVIO 8. *Lactobacillus plantarum* -bakteerilisäyksen vaikutus sianlannan pH-arvoon

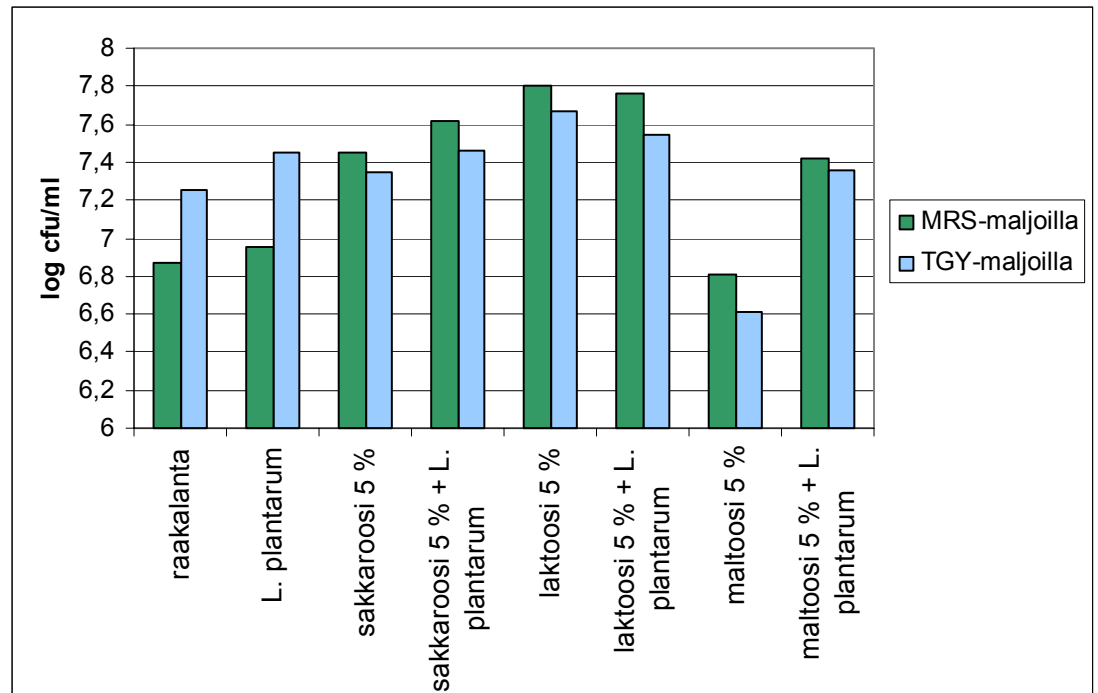
Kun lantaan lisättiin hiilihydraattia, pH laski melko samalla tavalla riippumatta siitä, lisättiinkö *Lactobacillus plantarum* -bakteeria vai ei (kuvio 9).



KUVIO 9. *Lactobacillus plantarum* -lisäyksen vaikutus sianlannan pH-arvoon

5.2.2 Mikrobimäärät

Kahdeksan vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta tehtyjen maljausten mikrobimäärät on esitetty liitteessä 6. Kuviossa 10 on esitetty mikrobimäärät MRS- ja TGY-maljoilla.



KUVIO 10. Mikrobimäärät (log cfu/ml) MRS- ja TGY-maljoilla

Maljauksilla saadut mikrobimäärät olivat hieman epäloogisia, sillä TGY-maljoilla pitäisi kasvaa myös *L. plantarum* -bakteerien. Näin ollen mikrobimäärien tulisi olla TGY-maljoilla suurempia kuin MRS-maljoilla saatujen. Maljausten perusteella näytti kuitenkin siltä, että *L. plantarum* oli selvinnyt hengissä, sillä molemmilla maljoilla oli hyvin tyypillisiä *L. plantarum* -pesäkkeitä. Epäloogisiin tuloksiin oli saattanut osaltaan vaikuttaa se, että MRS-malja on rikkaampi kasvualusta kuin TGY-malja. Näin ollen eri maljoilla saatuja mikrobimääriä ei voida pitää kovin vertailukelpoisina. Samoilla maljoilla saatuja bakteeripitoisuuksia voidaan kuitenkin käyttää vertailuun eri kokeiden välillä. Maljaustulosten perusteella lannan, jonka maltoosipitoisuus oli viisi prosenttia, kokonaisbakteeripitoisuus oli muita kokeita selvästi alhaisempi. Lisäksi alhainen pH näytti suosivan *Lactobacillus*-suvun bakteerien kasvua.

5.2.3 Haju

Lannan haju oli miellyttävämpi niissä pulloissa, joihin oli lisätty *L. plantarum* -nestekasvatusta. Myös matalan pH:n ja miedomman hajun välillä oli selkeä

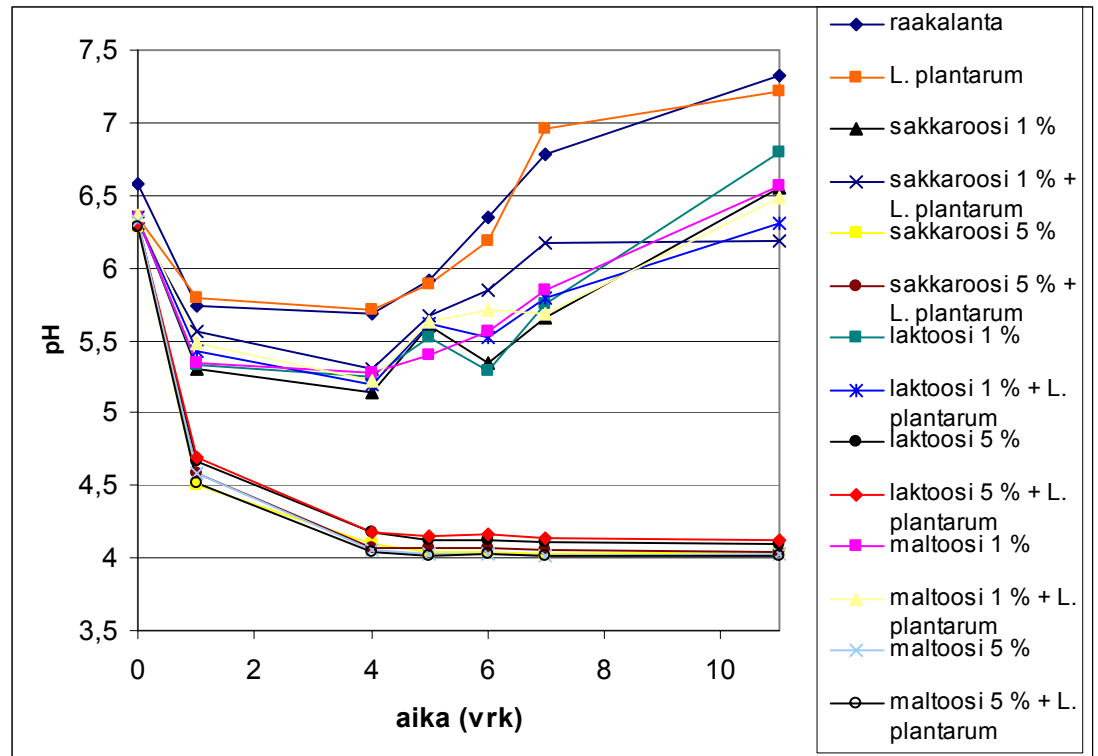
yhteys. 5-prosenttinen maltoosipitoisuus yhdessä *L. plantarum* -bakteerilisäyksen kanssa antoi hajun suhteen parhaimman tuloksen. 1-prosenttisilla hiilihydraattipitoisuuksilla ei saavutettu hajun vähenemistä.

5.3 Toinen koejärjestely

Koejärjestelyssä käytetyn *L. plantarum* -nestekasvatuksen bakteeripitoisuus oli $2,0 \cdot 10^{10}$ cfu/ml. Sianlannan kuiva-ainepitoisuus oli 14,3 %. pH ja haju muuttuivat melko samalla tavalla kuin edellisessä koejärjestelyssä.

5.3.1 pH-arvo

pH-mittausten tulokset on koottu liitteeseen 7. pH-arvon kehitys kokeiden aikana on esitetty kuviossa 11. Lannan pH-arvot pulloissa olivat koko seurannan ajan hieman matalampia kuin ensimmäisessä koejärjestelyssä. Myös käsittelemättömän lannan pH oli toisessa koejärjestelyssä alusta alkaen alhaisempi. pH-mittaus-tulosten perusteella ei voida sanoa, että ensimmäisessä koejärjestelyssä olosuhteiden muuttuminen nesteviljelmän aerobisista lannan lähes anaerobiseksi olisi vaikuttanut *L. plantarum* -bakteerien sopeutumiseen.



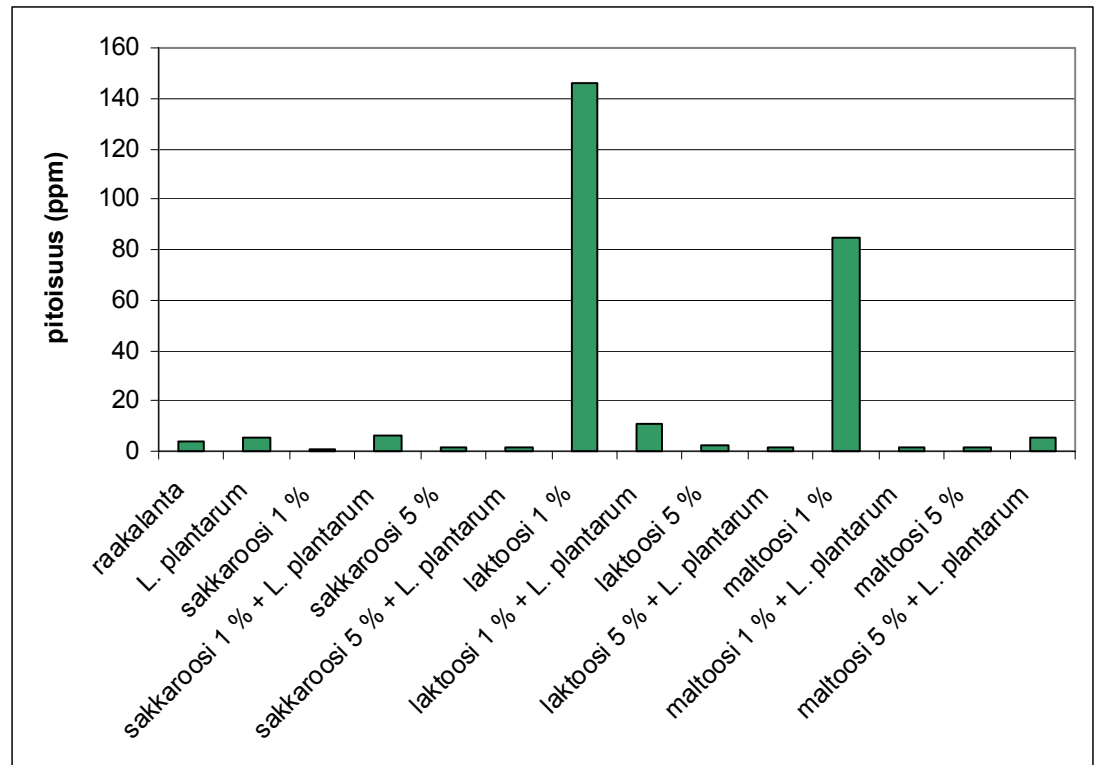
KUVIO 11. pH-mittausten tulokset sianlannasta

5.3.2 Haju

Toisen koejärjestelyn koepulloista testattiin hajuyhdisteiden mittausta kannettavalla kaasukromatografilla. Mittaustulokset on koottu liitteeseen 8. Mittausmenetely näytti toimivan hyvin, ja enemmistö kaasukromatogrammien piikeistä pystyttiin tunnistamaan. Aistinvaraisten havaintojen mukaan 5-prosenttisilla hiilihydraattipitoisuuksilla saavutettiin positiivinen vaikutus sianlannan hajuun.

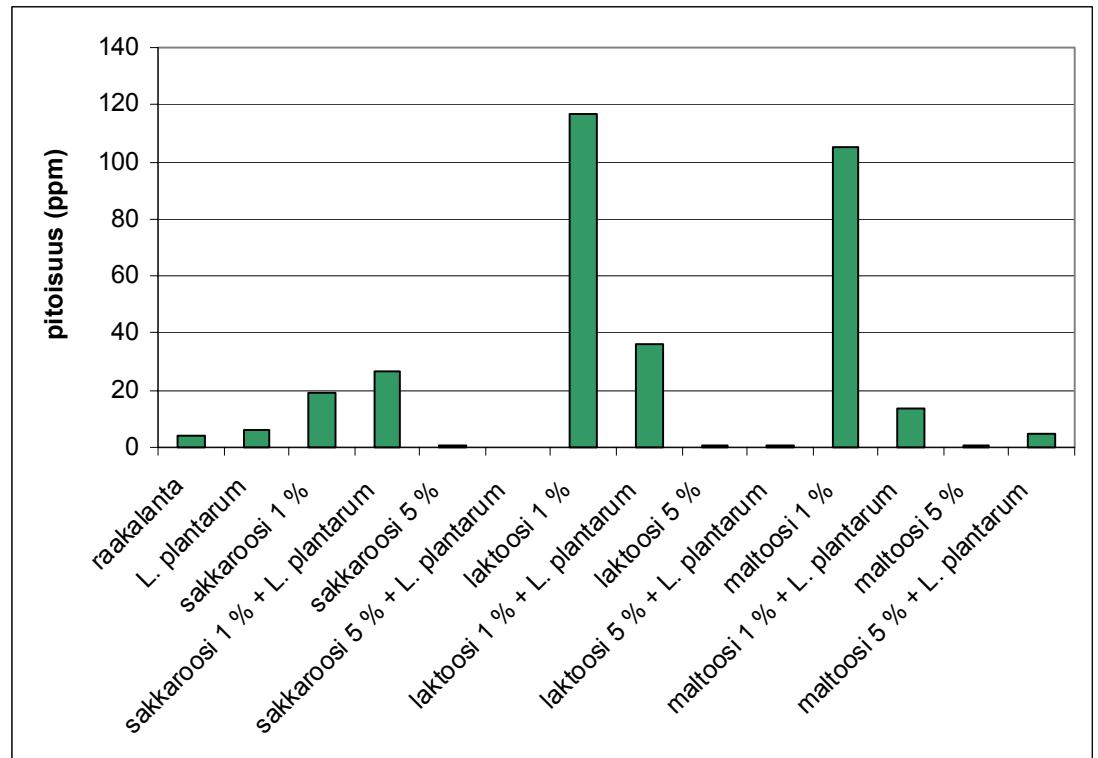
1-prosenttisilla pitoisuuksilla ei saavutettu vastaavaa tulosta. Kaasukromatografilla tehtyjen mittausten tulokset tukivat osittain aistinvaraisia havaintoja. Toisaalta esimerkiksi raakalannasta ja kokeista, joissa lannan hiilihydraattipitoisuus oli viisi prosenttia, vapautuvien rikkiyhdisteiden pitoisuuksissa ei havaittu selviä eroja.

Kaasukromatografilla lannasta mitattuja hajuyhdisteitä on tarkasteltu tarkemmin kolmannen koejärjestelyjen tulosten yhteydessä.



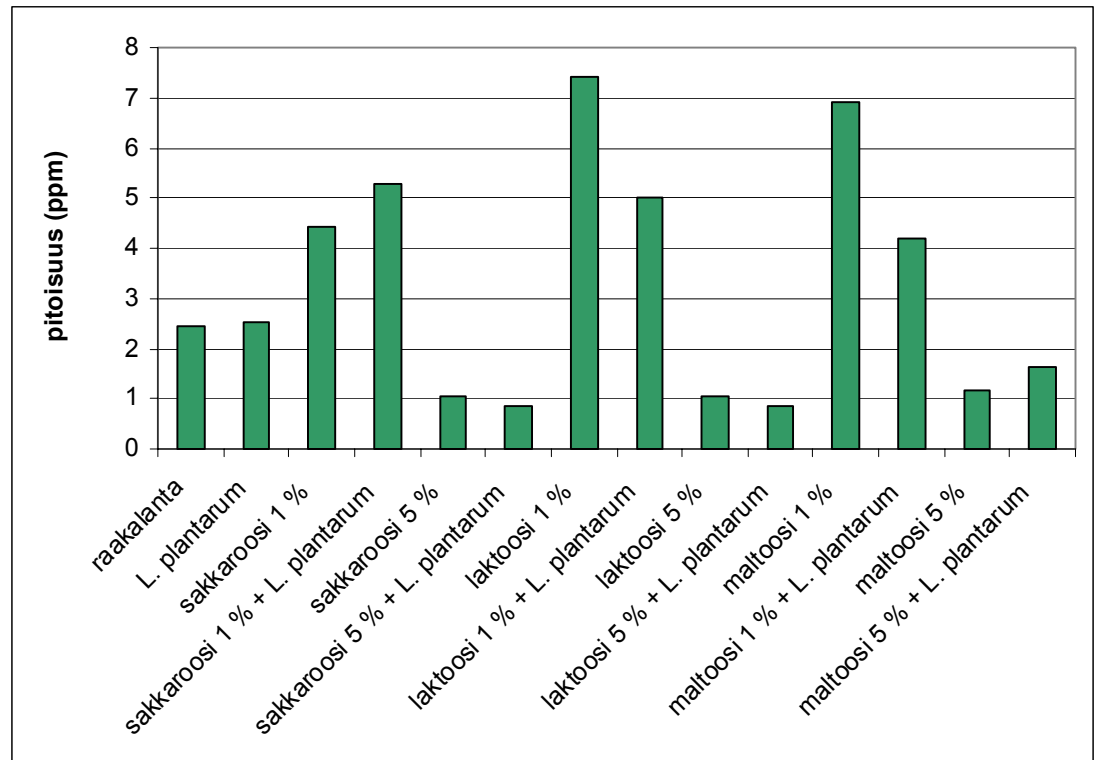
KUVIO 12. Sianlannasta vapautuvat rikkivetypitoisuudet 12 vuorokauden kuluttua koejärjestelyn aloituksesta

Kuviossa 12 on esitetty koepulloista mitattuja rikkivetypitoisuuksia, kun kokeen aloituksesta on kulunut 12 vuorokautta. Laktoosipitoisuus 1 % ja maltoosipitoisuus 1 % -pulloista mitattiin selvästi muita korkeammat pitoisuudet. *L. plantarum* -lisäyksellä näyttää olevan vaikutusta tuloksiin. Millään käsittelyllä ei saavutettu käsittelemättömään lantaan verrattuna kovin merkittävää vaikutusta.



KUVIO 13. Sianlannasta vapautuvat metyylimerkaptaanipitoisuudet 12 vuorokauden kuluttua koejärjestelyn aloituksesta

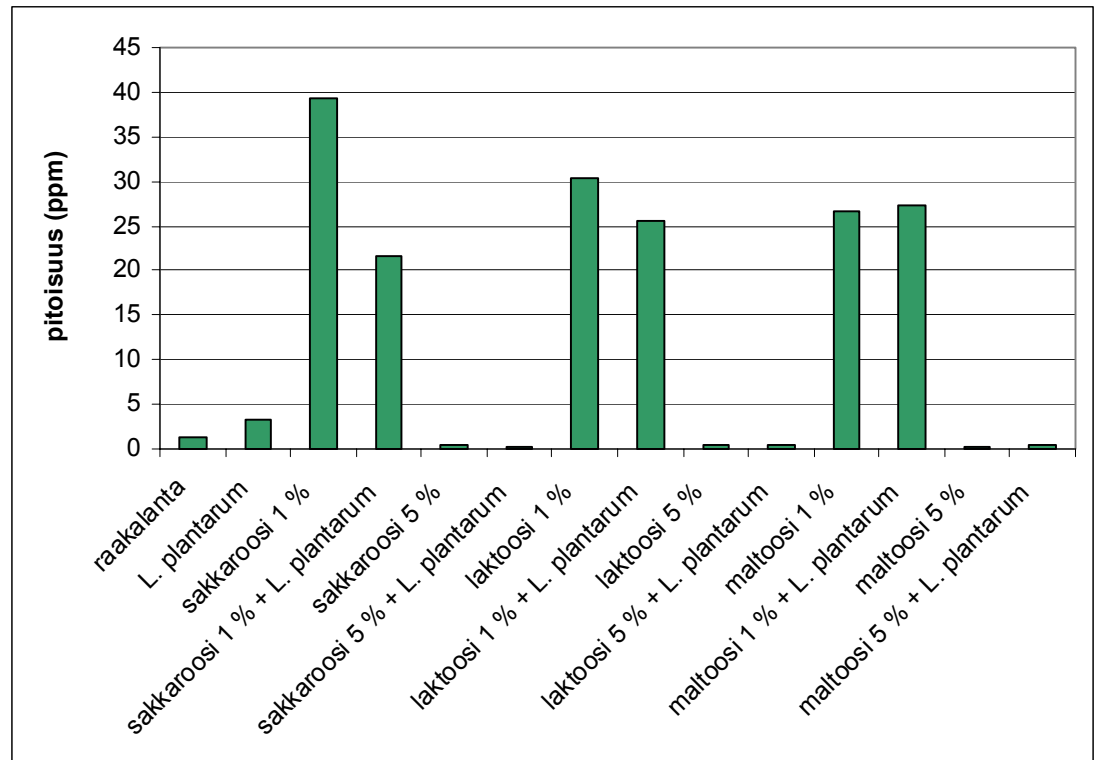
Koepulloista mitatut metyylimerkaptaanipitoisuudet olivat rikkivetypitoisuuksien tapaan hieman ristiriitaisia (kuvio 13). Selvästi suurimmat pitoisuudet mitattiin jälleen laktoosipitoisuus 1 %- ja maltoosipitoisuus 1 % -pulloista. Muistakin kokeista, joissa lannan hiilihydraattipitoisuus oli prosentoinen, vapautui enemmän metyylimerkaptaanin kuin käsittelemättömästä lannasta. *L. plantarum* -bakteerilisäyksen vaikutus vapautuvan metyylimerkaptaanin määrään vaihtelee eri kokeiden välillä.



KUVIO 14. Sianlannasta vapautuvat dimeetyylisulfidipitoisuudet 12 vuorokauden kuluttua koejärjestelyn aloituksesta

Kuviossa 14 on esitetty dimeetyylisulfidipitoisuudet, kun kokeen aloituksesta oli kulunut 12 vuorokautta. Suurimmat pitoisuudet mitattiin niistä kokeista, joissa lannan hiilihydraattipitoisuus oli prosentti. Dimeetyylisulfidin osalta ero viiden prosentti hiilihydraattipitoisuuksiin oli selvä. 5-prosenttisilla hiilihydraattipitoisuuksilla saavutettiin hyvä tulos käsittelemättömään lantaan verrattuna.

L. plantarum -lisäyksellä näyttää olevan enimmäkseen dimeetyylisulfidipitoisuutta alentava vaikutus.



KUVIO 15. Sianlannasta vapautuvat dimeetyylidisulfidipitoisuudet 12 vuorokauden kuluttua koejärjestelyn aloituksesta

Kuviossa 15 on esitetty mitatut dimeetyylidisulfidipitoisuudet 12 vuorokauden jälkeen kokeiden aloituksesta. Mittausten mukaan myös dimeetyylidisulfidia vapautui eniten niistä pulloista, joissa oli yhden prosentin hiilihydraattipitoisuus. Ero muihin koepulloihin oli hyvin selvä. Kokeista, joissa hiilihydraattipitoisuus oli viisi prosenttia, vapautui vähemmän dimeetyylidisulfidia kuin käsittelemättömästä lannasta. *L. plantarum* -bakteerilisäys on vaikuttanut lannasta vapautuvan dimeetyylidisulfidin määrään ainakin niissä kokeissa, joissa oli prosentin hiilihydraattipitoisuus.

Tehtyjen kaasukromatografisten mittausten mukaan vaikuttaa siltä, että yhden prosentin hiilihydraattipitoisuus päinvastoin lisäsi lannasta vapautuvien hajukausujen määrää. Kokeista, joiden hiilihydraattipitoisuus oli viisi prosenttia, mitattiin pääsääntöisesti raakalantaa pienempiä hajuyhdistepitoisuuksia.

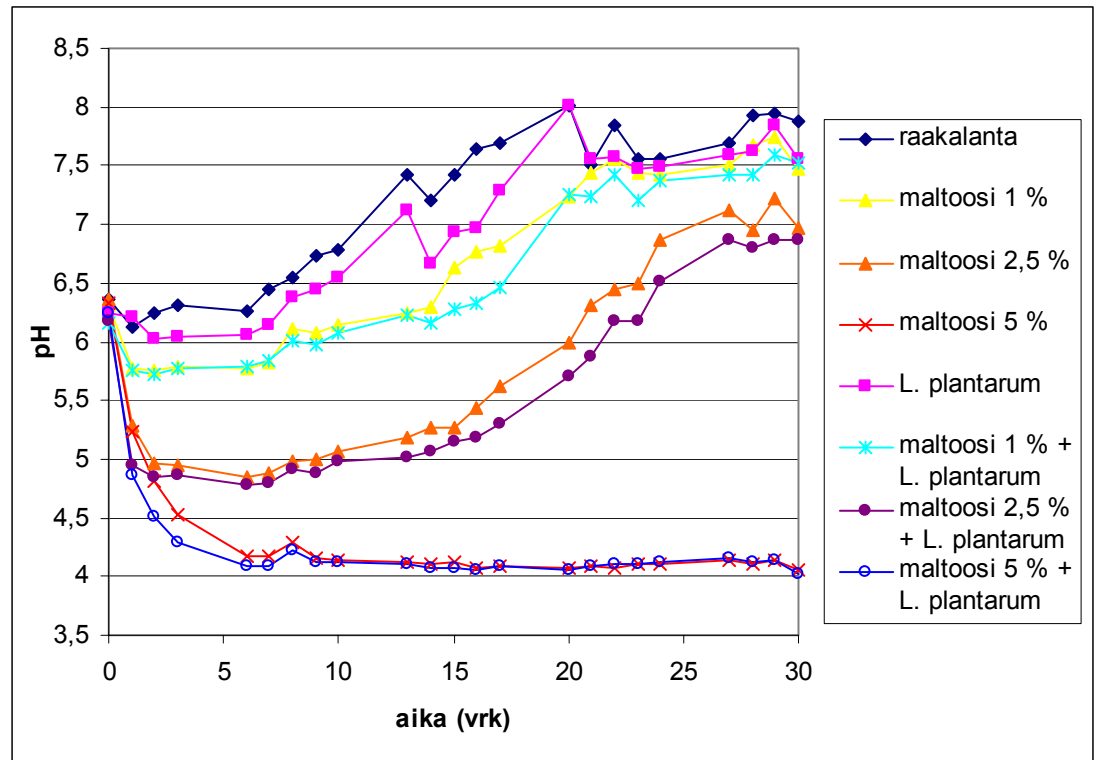
5.4 Kolmas koejärjestely

Lannan maitohappobakteeripitoisuus oli koejärjestelyn alussa $1,0 \cdot 10^9$ cfu/ml. TGY-maljoilla saatu anaerobisten bakteerien määrä oli $5,6 \cdot 10^8$ cfu/ml.

5.4.1 pH-arvo

Kolmannen koejärjestelyn pH-mittaustulokset on esitetty liitteessä 9. pH-arvo oli jo koejärjestelyn alussa alhaisempi niissä kokeissa, joihin oli lisätty *L. plantarum*-nesteviljelmää. Nesteviljelmän pH-arvo oli 4,0. Koska nesteviljelmää lisättiin pulloihin aikaisempiin koejärjestelyihin verrattuna enemmän, oli myös vaikutus pH-arvoon suurempi.

Kuviossa 16 on esitetty pH-arvon muutokset 30 vuorokauden aikana. Maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*- ja maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* -pulloissa sianlannan pH laski alle viiteen ensimmäisen vuorokauden aikana. Maltoosipitoisuus 2,5 %- ja maltoosipitoisuus 5 % -pulloissa lannan pH laski vastaavasti alle viiteen toisen vuorokauden aikana. Kokeissa, joissa sianlannan maltoosipitoisuus oli viisi prosenttia mutta ei bakteerilisäystä, oli aluksi hieman korkeampi pH kuin kokeissa, joissa lannan maltoosipitoisuus oli sama ja lisäksi bakteerilisäys. Ero kuitenkin tasoittui, ja yhdeksän vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta pH vakiintui noin 4,1:een.



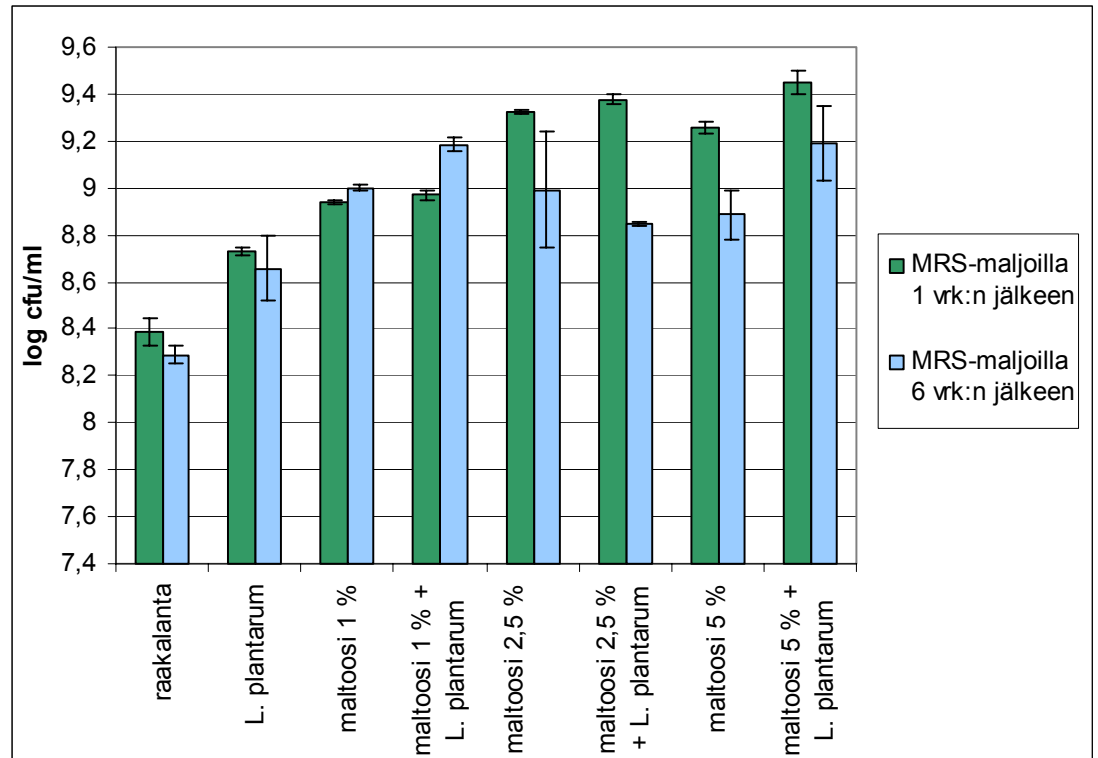
KUVIO 16. pH-arvon kehittyminen sianlannassa koejärjestelyn aikana

Kokeissa, joissa lannan maltoosipitoisuus oli 2,5 prosenttia, pH pysyi alle viidessä noin seitsemän vuorokauden ajan. Noin yhdeksän vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta pH-arvo lähti nousuun, jota jatkui koko pH-seurannan ajan. Kokeissa, joissa oli maltoosipitoisuus 2,5 prosenttia ja bakteerilisäys, pH pysyi koko ajan hieman matalampana kuin vastaavissa kokeissa, joissa ei ollut bakteerilisäystä. pH-seurannan lopulla ero raakalannan pH-arvoon kaventui kokeissa, joissa lannan maltoosipitoisuus oli 2,5 prosenttia. 2,5 prosenttisella maltoosipitoisuudella saavutettiin melko hyvä pH-arvon alenema, mutta vaikutus ei ollut pitkäkestoinen.

5.4.2 Mikrobimäärät

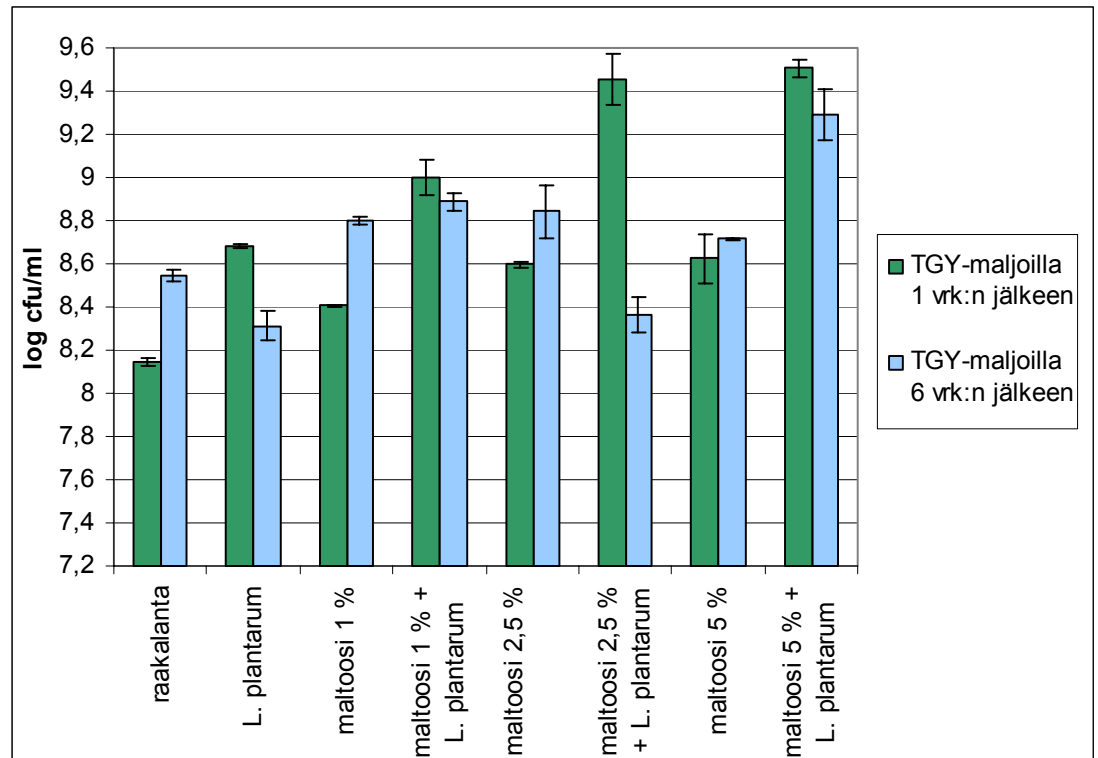
Yhden ja kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta tehdyillä maljauksilla saadut bakteeripitoisuudet on esitetty liitteessä 10. Maljaustulokset on esitetty kuvioissa 17 ja 18. TGY-maljoilla saadut mikrobimäärät olivat lähes kaikissa kokeissa alhaisemmat MRS-maljoihin verrattuna. *L. plantarum* -bakteerilisäysten

vaikutus koko *Lactobacillus*-suvun bakteerien määrään näyttää olevan suhteellisen pieni. Kokeissa, joissa oli kahden ja puolen ja viiden prosentin maltoosipitoisuus, *Lactobacillus*-suvun bakteerien kokonaismäärä laski maljauskertojen välillä.



KUVIO 17. Mikrobimäärät (log cfu/ml) MRS-maljoilla yhden ja kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta

TGY-maljoilla kasvaneet pesäkkeet olivat ensimmäisen vuorokauden jälkeen kaikki ja kuuden vuorokauden jälkeenkin enemmistö tyypillisten *L. plantarum*-pesäkkeiden näköisiä niissä kokeissa, joihin oli lisätty bakteeria. Kuuden vuorokauden jälkeen kokeen aloituksesta saadut bakteeripitoisuudet olivat pienempiä ensimmäisen vuorokauden jälkeisiin pitoisuuksiin verrattuna. Vastaavasti kokeissa, joihin ei ollut lisätty *L. plantarum*-bakteeria, TGY-maljoilla saadut bakteeripitoisuudet nousivat ensimmäisen vuorokauden jälkeen.



KUVIO 18. Mikrobimäärät (log cfu/ml) TGY-maljoilla yhden ja kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta

5.4.3 Haju

Aikaisemmissa koejärjestelyissä oli todettu, että 5-prosenttisella maltoosipitoisuudella oli positiivinen vaikutus sianlannan hajuongelmaan. Koska 1-prosenttisella maltoosipitoisuudella ei ollut saatu haluttua vaikutusta, haluttiin kolmannella koejärjestelyllä selvittää, riittäisikö sianlannan käsittelyyn viittä prosenttia pienempikin maltoosipitoisuus.

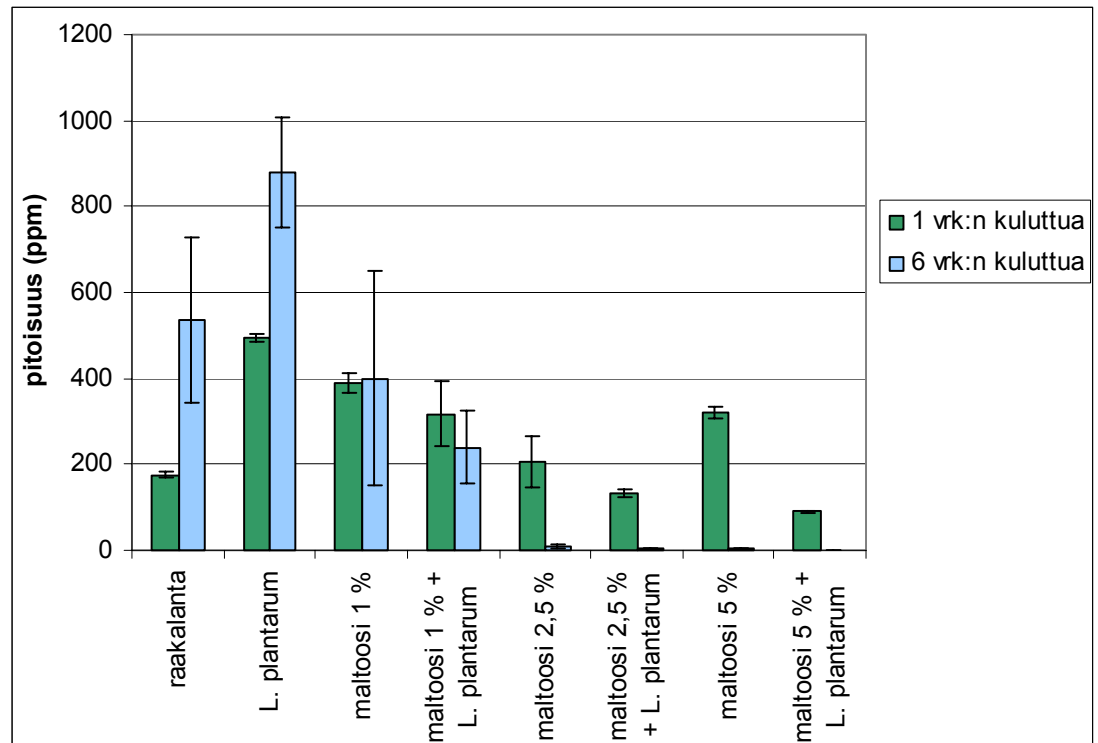
Kaasukromatografilla tehtyjen mittausten tulokset on koottu liitteeseen 11. Hajun suhteen 2,5 prosentin maltoosipitoisuudella saavutettiin melko samanlainen vaikutus kuin 5-prosenttisellä pitoisuudella. Lisäksi *L. plantarum* -nesteviljelmän lisäyksellä oli myönteinen vaikutus lannan hajuun kokeissa, joissa lannan maltoosipitoisuus oli kaksi ja puoli ja viisi prosenttia. Kaasukromatografilla tehtyjen mittausten tulokset tukivat aistinvaraisia havaintoja.

Kaasukromatografilla lannasta tunnistettujen yhdisteiden hajunkuvaukset ja hajukynnykset on esitetty taulukossa 11. Hajukynnyksellä tarkoitetaan pienintä pitoisuutta, joka voidaan haistaa. Eri lähteissä aineille annetut hajukynnykset voivat vaihdella paljonkin. Taulukossa olevat hajukynnysten ylä- ja alarajat on otettu MTT:n Turve kestokuivikkeena sikaloissa -julkaisusta.

TAULUKKO 11. Kaasukromatografian lannasta tunnistamien yhdisteiden hajunkuvaukset ja hajukynnykset (Mäittälä, Heinonen-Tanski, Herve, Kangas, Louhelainen, Nikkola, Paasonen, Puumala, Rautiala, Seuri & Veijanen 2001; Työterveyslaitos 2005)

Yhdisteryhmä	Yhdiste	Hajunkuvaus	Hajukynnys (mg/m ³)	Hajukynnys (ppm)
Ketonit	asetoni	makea, liuottimainen	0,94-1550	0,36-600
	metyylietyyliketoni	makea, asetonimainen	0,74-250	0,23-78
	diasetyyli	voimainen, toffee	$7 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$ - $1,3 \cdot 10^{-3}$
Aldehydit	asetaldehydi	pistävä, vihreä, makea, hedelmäinen	$2 \cdot 10^{-4}$ -1	$1,0 \cdot 10^{-4}$ -0,5
	butanaali	pistävä, härski, makea	$8,4 \cdot 10^{-4}$ -0,2	$2,6 \cdot 10^{-4}$ -0,062
	2-metyyli-butanaali	paahdettu kaakao	–	
	3-metyyli-butanaali	maltainen	$1,6 \cdot 10^{-3}$ - $8,1 \cdot 10^{-3}$	$4,2 \cdot 10^{-4}$ - 0,021
Alkoholit	metanoli	miedohko alkoholi	130	100
	etanoli	makea, alkoholi	0,64-1350	0,31-660
	1-propanoli	makea, alkoholi	0,075-140	0,028-52
	2-butanoli	viinirypälemäinen, vahva, miellyttävä	0,4-131,2	0,12-40
Esterit	etyyli-asettaatti	miellyttävä, hedelmäinen, ananas	0,0196-180	$5,0 \cdot 10^{-3}$ -46
Rikkiyhdisteet	rikkivety	mätä kananmuna	$1 \cdot 10^{-4}$ -0,27	$6,6 \cdot 10^{-5}$ -0,18
	metyyli-merkaptani	rikkimäinen, mätä kaali	$3 \cdot 10^{-7}$ -0,038	$1,4 \cdot 10^{-7}$ -0,018
	dimetyyli-sulfidi	mädäntynyt kaali, paha, sipuli	$3 \cdot 10^{-4}$ -0,16	$1,1 \cdot 10^{-4}$ -0,058
	dimetyyli-disulfidi	paha, mätä, tunkkainen	$1 \cdot 10^{-4}$ -0,048	$2,4 \cdot 10^{-5}$ -0,011
Aromaattiset hiilivedyt	tolueeni	maali, kumiainen, liima, koipallo, liuotin	0,08-600,8	0,019-150

Kuviossa 19 on esitetty rikkivetyypitoisuudet, kun kokeiden aloituksesta oli kulunut yksi ja kuusi vuorokautta. Kuvaajien pylväät esittävät rinnakkaisista kokeista saatujen tulosten keskiarvoja. Rikkivedyn hajukynnys on hyvin matala. Rikkivedyn hajukynnyksen alaraja on $6,6 \cdot 10^{-5}$ ppm:ää ja yläraja 0,18 ppm:ää. Koepul-loista mitattiin hyvin suuriakin rikkivetyypitoisuuksia.

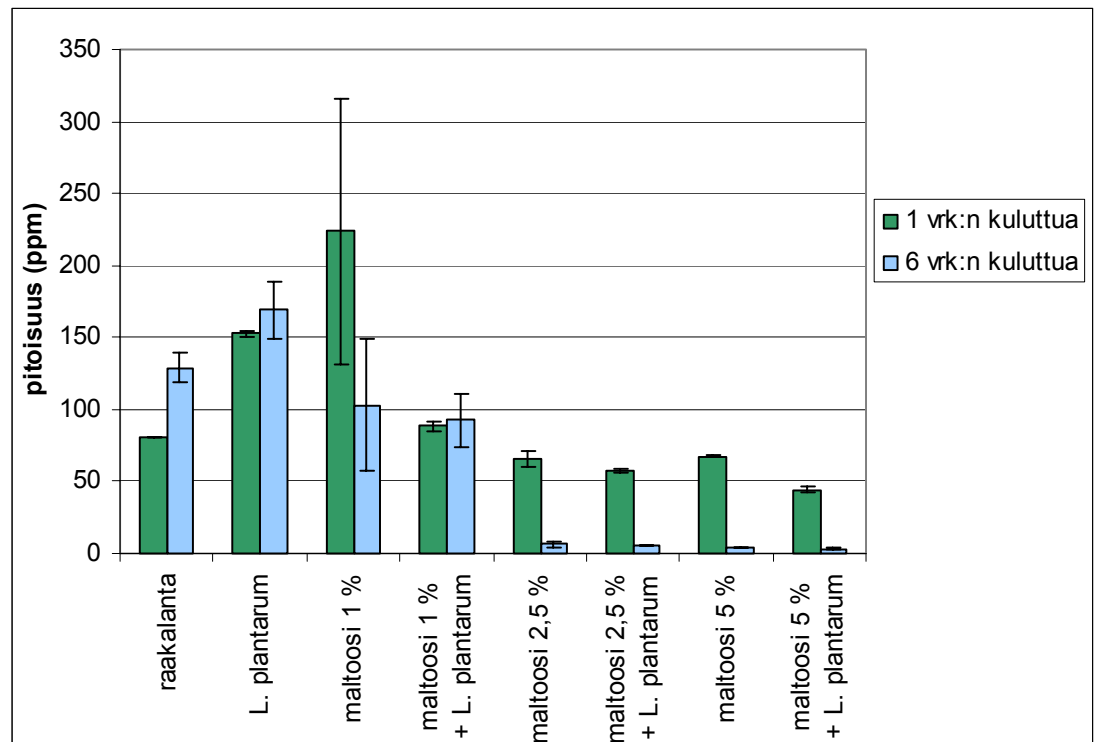


KUVIO 19. Sianlannasta vapautuvat rikkivetyypitoisuudet yhden ja kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta

Kaasukromatografianalyysien perusteella lannan käsittelyllä oli selviä vaikutuksia lannasta vapautuvan rikkivedyn määrään. Vuorokauden kuluttua kokeen aloituksesta rikkivetyypitoisuus oli suurin *L. plantarum* -kokeessa. Raakalannasta vapautuvan rikkivedyn pitoisuus oli ensimmäisen vuorokauden jälkeen melko alhainen muihin kokeisiin verrattuna. Ainoastaan kokeista maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* ja maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* mitattiin käsittelemättömää lantaa alhaisemmat rikkivetyypitoisuudet.

Kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta käsittelemättömän lannan rikkivetyypitoisuus oli lähes kolminkertaistunut verrattuna ensimmäisen vuorokau-

den jälkeen tehtyihin mittauksiin. Maltoosipitoisuus 2,5 %-, maltoosipitoisuus 5 %-, maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*- ja maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* -kokeiden lannasta vapautuva rikkivetytitoisuus laski kuudenteen vuorokauden mennessä alle 10 ppm:ään. Pienin rikkivetytitoisuus saavutettiin kokeessa, jossa oli maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum*. Lannasta mitattu rikkivetytitoisuus oli alle 2 ppm:ää. Eniten rikkivetyä vapautui *L. plantarum* -bakteerilla käsitellystä lannasta. 1-prosenttisilla maltoosipitoisuuksilla näytteiden rikkivetytitoisuus ei pudonnut merkittävästi. Maltoosipitoisuus 1 % + *L. plantarum* -kokeiden lannasta vapautui kuitenkin vähemmän rikkivetyä verrattuna vastaaviin kokeisiin, joissa ei ollut bakteerilisäystä.

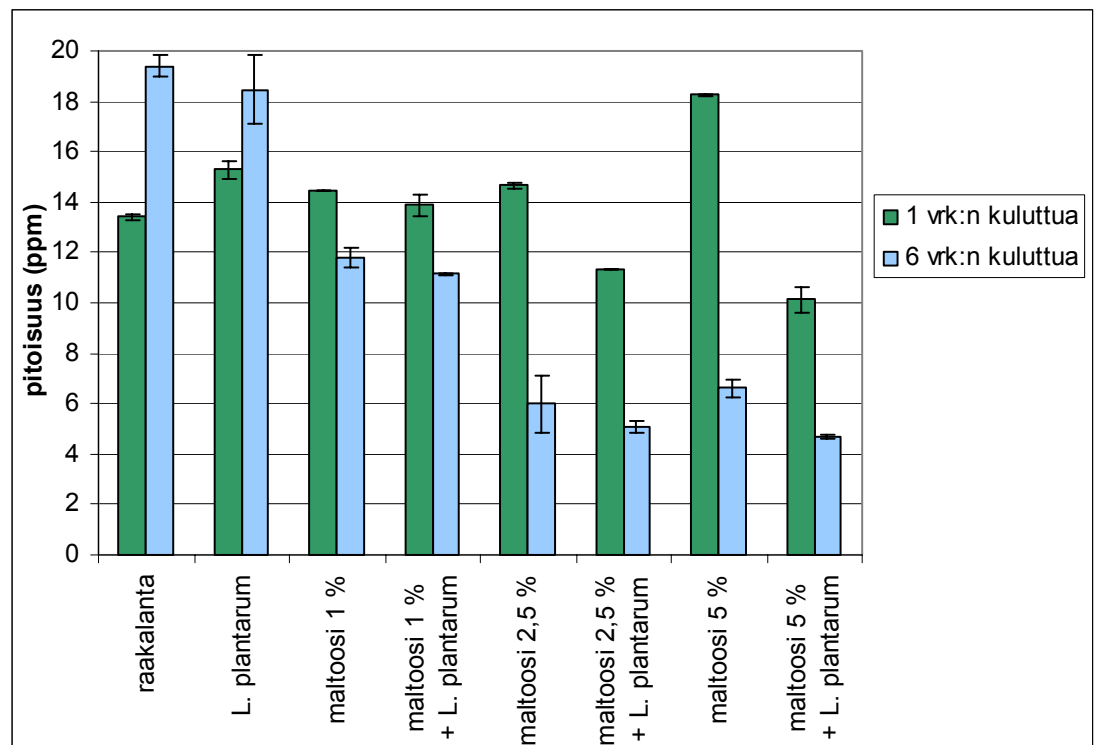


KUVIO 20. Sianlannasta vapautuvat metyylimerkaptaanipitoisuudet yhden ja kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta

Koepulloista mitatut metyylimerkaptaanipitoisuudet on esitetty kuviossa 20. Rikkivetyyhdisteisiin kuuluvan metyylimerkaptaanin hajukynnys on myös hyvin alhainen, sillä hajukynnyksen alaraja on $1,4 \cdot 10^{-7}$ ppm:ää ja yläraja 0,018 ppm:ää. Vuorokauden kuluttua kokeen aloituksesta kaikista pulloista mitattiin korkeita metyyli-

merkaptaanipitoisuuksia. Pulloista maltoosipitoisuus 2,5 %, maltoosipitoisuus 5 %, maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* ja maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* mitattiin raakalantaa alhaisemmat pitoisuudet, mutta ero ei ollut kovin suuri. Eniten metyylimerkaptaanin vapautui maltoosipitoisuus 1 % -kokeen lannasta.

Kun mittaukset uusittiin kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta, raakalannasta vapautuvan metyylimerkaptaanin pitoisuus oli noussut noin 130 ppm:ään. Maltoosipitoisuus 2,5 %-, maltoosipitoisuus 5 %-, maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*- ja maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* -pulloista mitatun metyylimerkaptaanin pitoisuus oli laskenut selvästi alle 10 ppm:ään. Pienin pitoisuus, noin 3 ppm:ää, mitattiin maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* -kokeista.

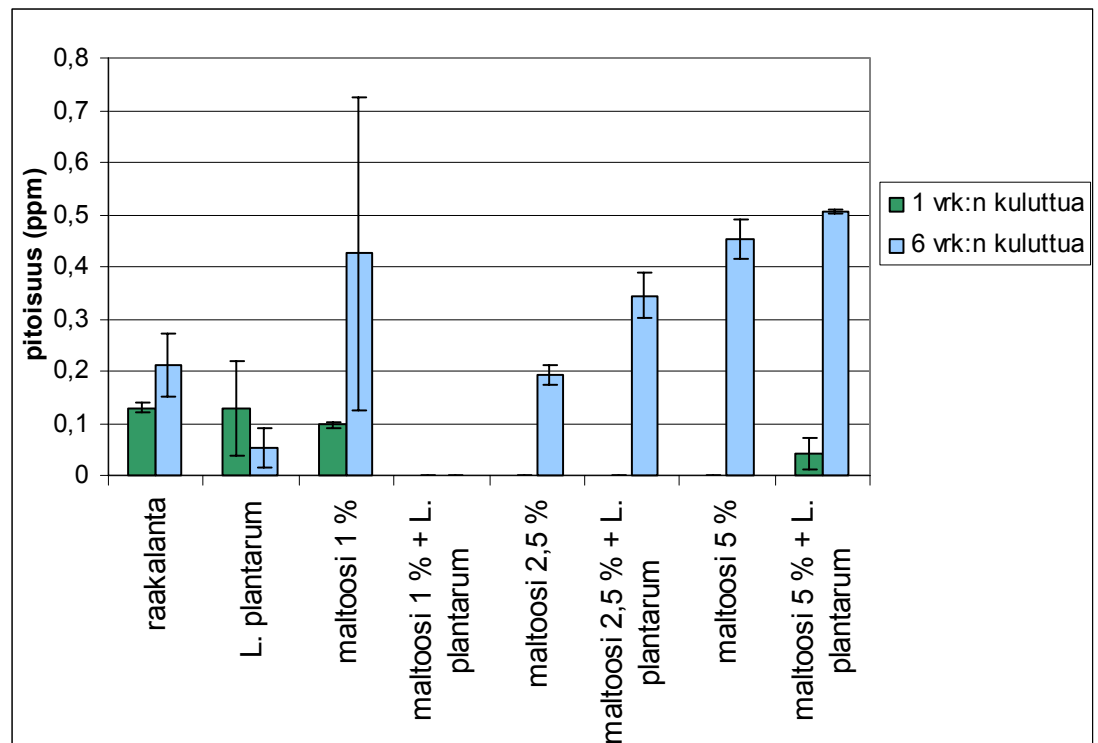


KUVIO 21. Sianlannasta vapautuvat dimetyylisulfidipitoisuudet yhden ja kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta

Kuviossa 21 on kuvattu kokeista mitatut dimetyylisulfidipitoisuudet, kun kokeen aloituksesta oli kulunut yksi ja kuusi vuorokautta. Dimetyylisulfidin hajukynnys

on hyvin matala, vain $1,1 \cdot 10^{-4}$ -0,058 ppm:ää. Ensimmäisen vuorokauden jälkeen erot eri kokeiden välillä olivat suhteellisen pieniä. Käsittelemätöntä lantaa pienimmät pitoisuudet mitattiin ainoastaan maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*- ja maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* -kokeista.

Kun kokeen aloituksesta oli kulunut kuusi vuorokautta, erot eri kokeiden välillä kasvoivat. Kaikkein suurin, lähes 20 ppm:n, dimetyylisulfidipitoisuus mitattiin raakalannasta. *L. plantarum* -kokeesta mitattiin kuitenkin lähes yhtä suuri pitoisuus. Jälleen pienimmät pitoisuudet saatiin maltoosipitoisuus 2,5 %-, maltoosipitoisuus 5 %-, maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*- ja maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* -kokeista. Kuten rikkivedyn ja metyylimerkaptaaninkin kohdalla, kaikkein vähiten dimetyylisulfidia vapautui maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* -pullokokeesta.



KUVIO 22. Sianlannasta vapautuvat dimetyylidisulfidipitoisuudet yhden ja kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta

Kokeista mitatut dimetyylidisulfidipitoisuudet on esitetty kuviossa 22. Dimetyylidisulfidin hajukynnys on hyvin alhainen alarajan ollessa $2,4 \cdot 10^{-5}$ ppm:ää ja ylärajan 0,011 ppm:ää. Muihin mitattuihin rikkiyhdisteisiin verrattuna saadut dimetyylidisulfidipitoisuudet olivat suhteellisen matalia. Hajukynnyksen ylittäviä pitoisuuksia mitattiin kuitenkin kaikista muista paitsi maltoosipitoisuus 1 % + *L. plantarum* -kokeesta. Ensimmäisen vuorokauden jälkeen dimetyylidisulfidia mitattiin raakalanta-, *L. plantarum*-, maltoosipitoisuus 1 %- ja maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* -kokeista.

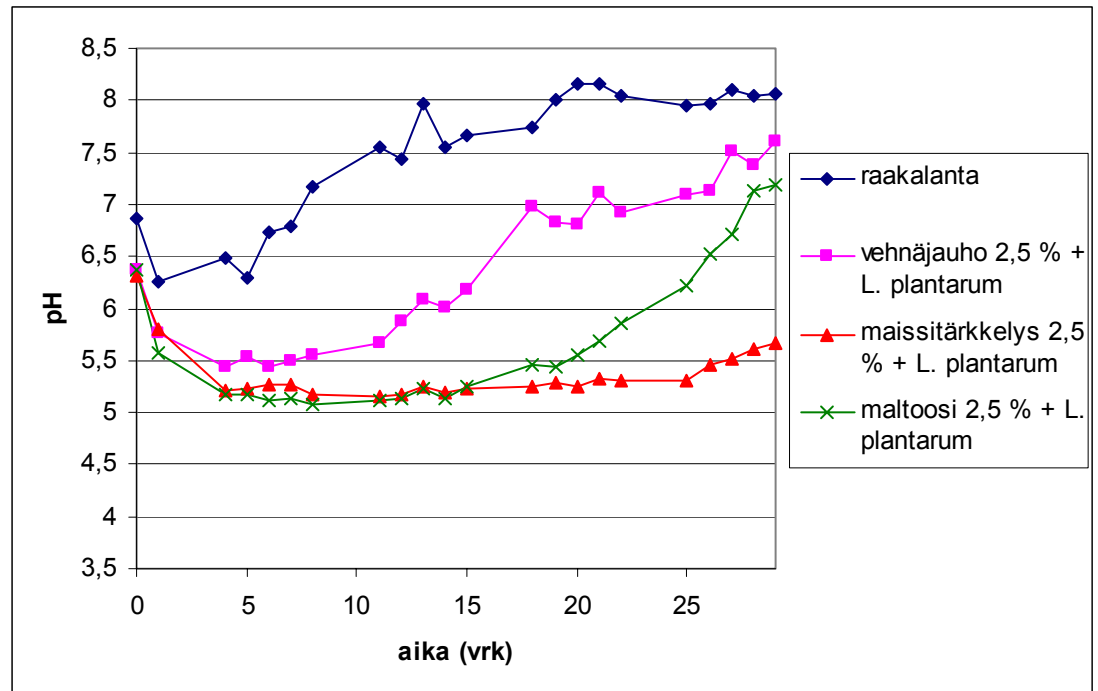
Kuuden vuorokauden jälkeen kokeen aloituksesta dimetyylidisulfidipitoisuudet olivat nousseet lähes kaikissa kokeissa. *L. plantarum* -kokeen pitoisuudet olivat kuitenkin laskeneet hieman yli 0,1 ppm:stä noin 0,05 ppm:ään. Korkein pitoisuus, noin 0,5 ppm:ää, mitattiin maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* -kokeista.

5.5 Neljäs koejärjestely

Pulloihin lisätyn *L. plantarum* -nestekasvatuksen bakteeripitoisuus oli $1,0 \cdot 10^9$ cfu/ml. Sianlannan kuiva-ainepitoisuus oli koejärjestelyn alussa 18,0 %.

5.5.1 Haju

pH-mittaustulokset on koottu liitteeseen 12. pH-arvossa tapahtuneen muutokset on esitetty kuviossa 23. pH saatiin laskemaan sekä vehnäjäuholla, maissitärkkelyksellä että maltoosilla. Aikaan saadun pH-arvon aleneman suuruus ja kesto vaihtelivat kuitenkin eri vaihtoehtojen välillä.



KUVIO 23. Muutokset sianlannan pH-arvossa 29 vuorokauden aikana

2,5-prosenttisellä vehnäjäuhoipitoisuudella pH laski neljän ensimmäisen vuorokauden aikana noin 5,5:een. pH ei kuitenkaan pysynyt tässä arvossa pitkään, sillä pH-arvo alkoi nousta jo noin kahdeksan vuorokauden kuluttua kokeen aloituksesta. pH jatkoi nousua koko loppuseurannan ajan. Seurannan lopussa pH-arvo niissä kokeissa, joissa lannan vehnäjäuhoipitoisuus oli 2,5 prosenttia, oli jo melko lähellä raakalannan pH:ta.

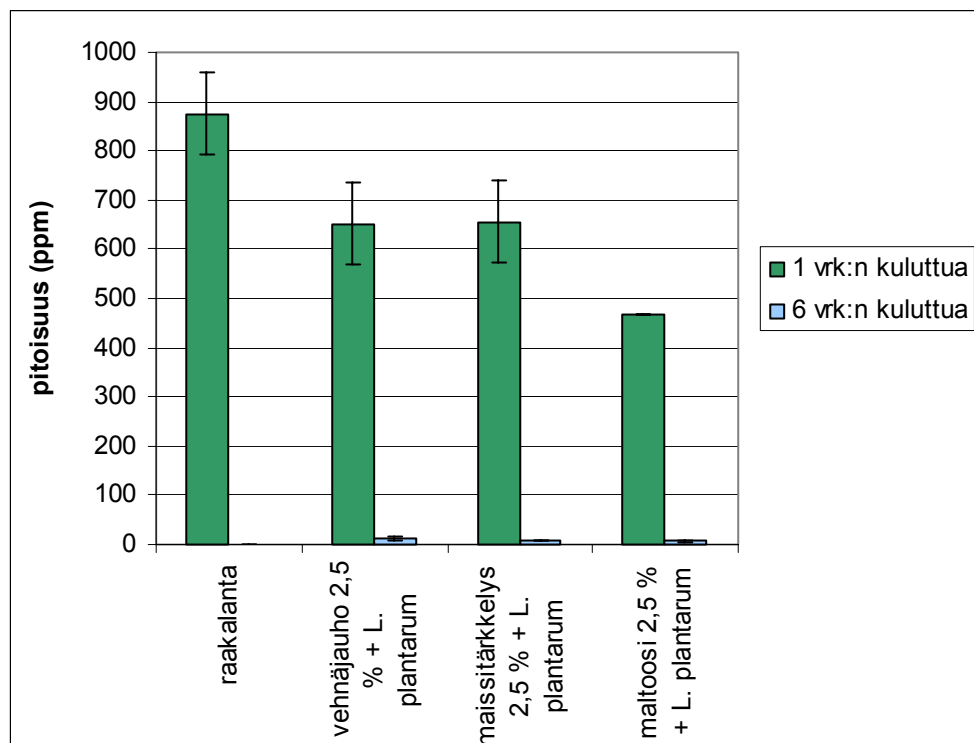
2,5-prosenttisellä maissitärkkelysipitoisuudella saavutettiin kaikkein pitkäkestoisin pH-arvon alenema. Neljän vuorokauden kuluttua kokeen aloituksesta pH oli laskenut noin arvoon 5,2. pH pysyi melko muuttumattomana noin 25. vuorokauteen saakka, minkä jälkeen pH lähti tasaiseen nousuun. Muihin kokeisiin verrattuna pH-arvo pysyi kuitenkin selvästi matalampana vielä seurannan lopussakin.

Kolmanteen koejärjestelyyn verrattuna 2,5-prosenttisellä maltoosipitoisuudella ei saavutettu aivan yhtä suurta pH-arvon alenemaa. Toisaalta pH:ta alentava vaikutus kesti hieman pidempään, noin 15. vuorokauteen saakka. 2,5-prosenttisellä maltoosipitoisuudella pH laski hieman alemmas kuin vastaavalla maissitärkkelys-

pitoisuudella. 15 vuorokauden kuluttua kokeen aloituksesta pH-arvo nousi melko nopeasti. Seurannan lopulla pH-arvo oli lähes yhtä suuri kuin niissä kokeissa, joissa lannan vehnäjäuhopitoisuus oli 2,5 prosenttia.

5.5.2 Haju

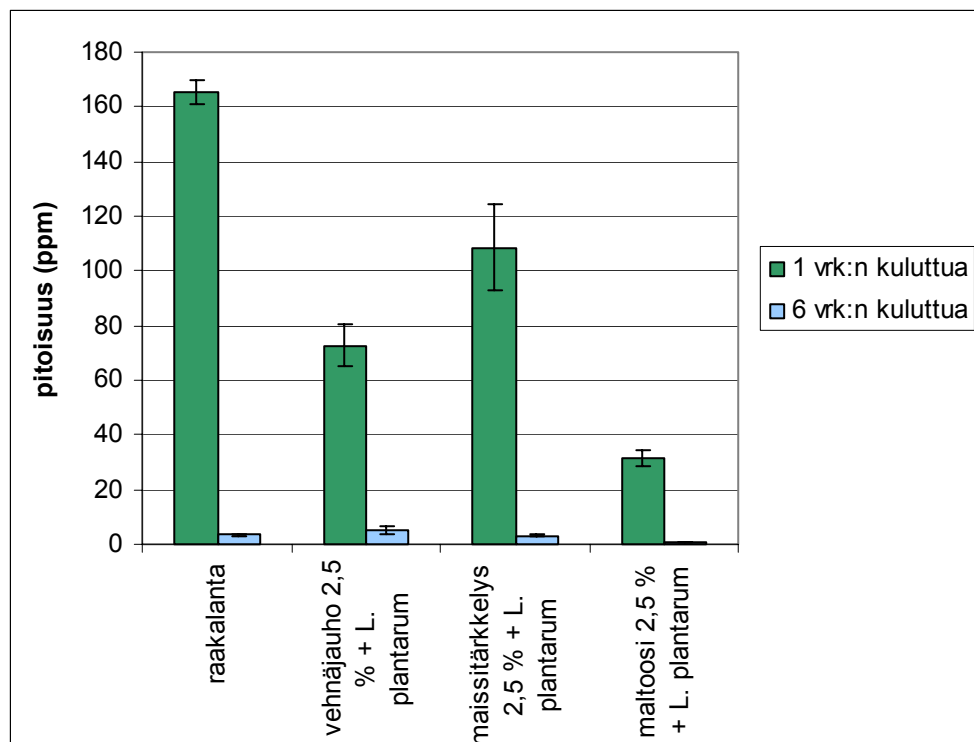
Aistinvaraisen arvioinnin perusteella sekä vehnäjäuholla, maissitärkkelyksellä että maltoosilla saavutettiin hajun suhteen selvä ero raakalantaan. Paras vaikutus saatiin maltoosilla, mutta ero vehnäjäuhoon ja maissitärkkelykseen oli hyvin pieni. Kaasukromatografilla tehtyjen mittausten tulokset on esitetty liitteessä 13. Kaasukromatografisten analyysien perusteella joidenkin hajuyhdisteiden pitoisuus laski ensimmäisen ja kuudennen vuorokauden aikana raakalannassa yhtä paljon kuin muissa kokeissa. Vastaavasti joidenkin yhdisteiden kohdalla lisäyksillä saatiin selvä ero raakalantaan verrattuna.



KUVIO 24. Sianlannasta vapautuvat rikkivetypitoisuudet yhden ja kuuden vuorokauden jälkeen kokeen aloituksesta

Kuviossa 24 on kuvattu koepulloista mitatut rikkivetyypitoisuudet, kun kokeiden aloituksesta oli kulunut yksi ja kuusi vuorokautta. Ensimmäisen vuorokauden jälkeen kaikista kokeista mitattiin suuret rikkivetyypitoisuudet. Kaikkein eniten rikkivetyä vapautui raakalannasta. Vehnäjauhopenitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*- ja maissitärkkelyspitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeista mitattiin lähes yhtä suuret rikkivetyypitoisuudet. Alhaisin pitoisuus saatiin maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeesta.

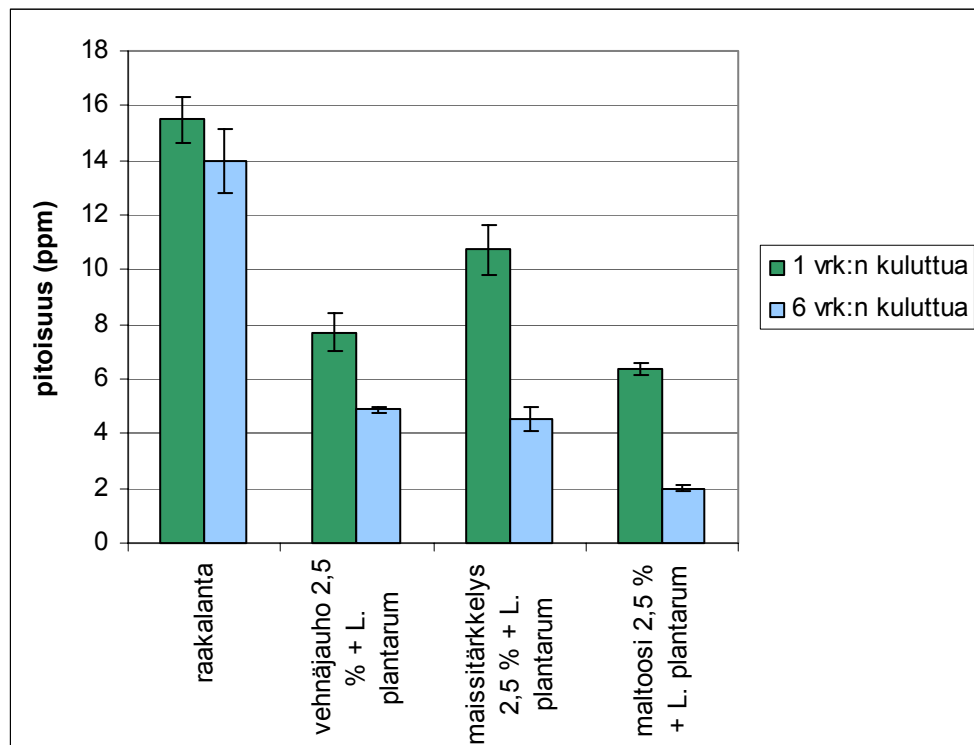
Kun mittaukset toistettiin kuuden vuorokauden kuluttua kokeen aloituksesta, kaikista koepulloista mitattiin aikaisempaan mittauskertaan verrattuna alhaisia rikkivetyypitoisuuksia. Kaikkein vähiten rikkivetyä vapautui raakalannasta. Vehnäjauhopenitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*-, maissitärkkelyspitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*- ja maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeista mitattujen rikkivetyypitoisuuksien välillä ei ollut suuria eroja.



KUVIO 25. Sianlannasta vapautuvat metyyliimerkaptaanipitoisuudet yhden ja kuuden vuorokauden jälkeen kokeen aloituksesta

Kuviossa 25 on esitetty metyylimerkaptaanipitoisuudet yhden ja kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta. Ensimmäisen vuorokauden jälkeen tehdyissä mittauksissa havaittiin suuria metyylimerkaptaanipitoisuuksia. Selvästi eniten, lähes 170 ppm:ää, metyylimerkaptaania vapautui käsittelemättömästä lannasta. Pienin, noin 30 ppm:n, pitoisuus mitattiin maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeesta.

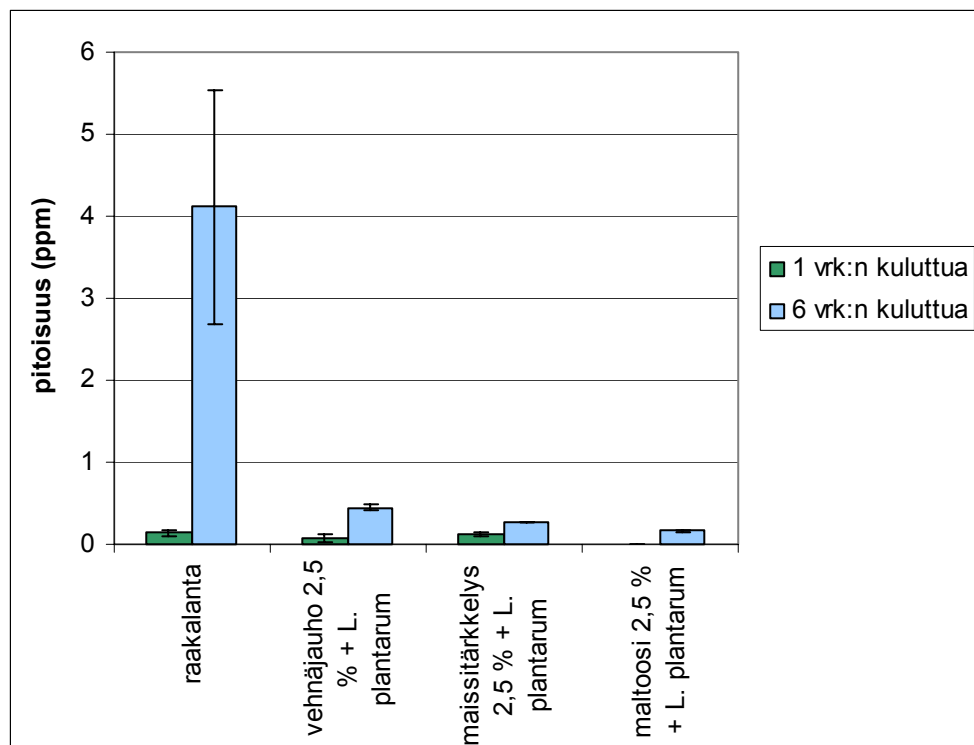
Kuuden vuorokauden kuluttua kokeen aloituksesta koepulloista mitattiin selvästi aiempaa mittausta pienemmät metyylimerkaptaanipitoisuudet. Eri kokeiden välillä ei ollut kovin suuria eroja. Raakalanta-, vehnä jauhopitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*- ja maissitärkkelyspitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeista vapautui mittausten mukaan noin 3-5 ppm:ää metyylimerkaptaania. Pienin pitoisuus, hieman alle 1 ppm, mitattiin maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeesta.



KUVIO 26. Sianlannasta vapautuvat dimetyylisulfidipitoisuudet yhden ja kuuden vuorokauden jälkeen kokeen aloituksesta

Kokeista mitatut dimetyylisulfidipitoisuudet on kuvattu kuviossa 26. Kun kokeen aloituksesta oli kulunut vuorokausi, vapautui kaikkein eniten dimetyylisulfidia raakalannasta. Muista pulloista mitattiin selvästi alhaisemmat pitoisuudet. Kuten rikkivedyn ja metyylimerkaptaaninkin kohdalla, pienin dimetyylisulfidipitoisuus saatiin maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeesta. Ero vehnäjauhopitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeeseen oli kuitenkin pieni.

Kun kokeen aloituksesta oli kulunut kuusi vuorokautta, mittaukset toistettiin. Kaikkien kokeiden kohdalla vapautuvan dimetyylisulfidin pitoisuus laski aikaisempaan mittauskertaan verrattuna. Raakalannasta mitattu pitoisuus oli kuitenkin selvästi muita kokeita suurempi. Jälleen pienin pitoisuus saavutettiin maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeilla. Käsittlemättömään lantaan verrattuna vehnäjauhopitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*- ja maissitärkkelyspitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeista vapautui kuitenkin selvästi vähemmän dimetyylisulfidia.



KUVIO 27. Sianlannasta vapautuvat dimetyylidisulfidipitoisuudet yhden ja kuuden vuorokauden jälkeen kokeen aloituksesta

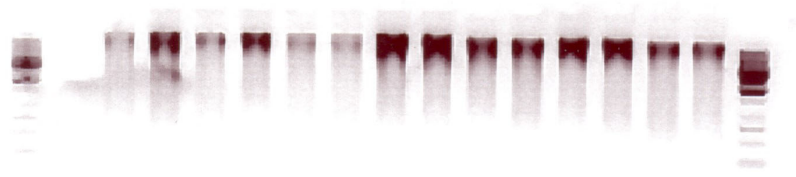
Kuviossa 27 on esitetty pulloista kaasukromatografilla mitatut dimetyylidisulfidipitoisuudet yhden ja kuuden vuorokauden kuluttua kokeiden aloituksesta. Ensimmäisen vuorokauden jälkeen kaikista koepulloista vapautui suhteellisen vähän dimetyylidisulfidia. Maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -koepulloista ei havaittu ensimmäisen vuorokauden jälkeen ollenkaan dimetyylidisulfidia. Muistakin kokeista mitatut pitoisuudet olivat alle 0,15 ppm:ää.

Kun koepulloista tehtiin uudet mittaukset, dimetyylidisulfidipitoisuudet olivat kasvaneet kaikkien kokeiden kohdalla. Selvästi eniten kasvoi raakalannasta vapautuvan dimetyylidisulfidin pitoisuus. Käsittelemättömästä lannasta vapautui kuuden vuorokauden jälkeen lähes 30-kertainen pitoisuus dimetyylidisulfidia ensimmäisen vuorokauden jälkeen tehtyyn mittaukseen verrattuna. Vehnäjauhopiitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeesta mitattu dimetyylidisulfidipitoisuus nousi lähelle 0,5 ppm:ää. Kuuden vuorokauden kuluttua kokeen aloituksesta myös maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -koepulloista mitattiin dimetyylidisulfidia.

Kun kokeiden aloituksesta oli kulunut yksi vuorokausi, mitattiin sekä rikkivedyn, metyylimerkaptaanin, dimetyylisulfidin että dimetyylidisulfidin osalta pienimmät pitoisuudet maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeesta. Tämä on saattanut johtua siitä, että veteen liuotettu maltoosi on nopeammin hyödynnettävissä kuin vehnäjauho tai maissitärkkelys. Myös kuuden vuorokauden jälkeen pienimmät pitoisuudet saatiin maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum* -kokeesta. Eroon saattaa vaikuttaa myös se, että vehnäjauho ja maissitärkkelys eivät koostu pelkästä hiilihydraatista. Lisäksi maltoosi on helpommin hyödynnettävissä kuin tärkkelys.

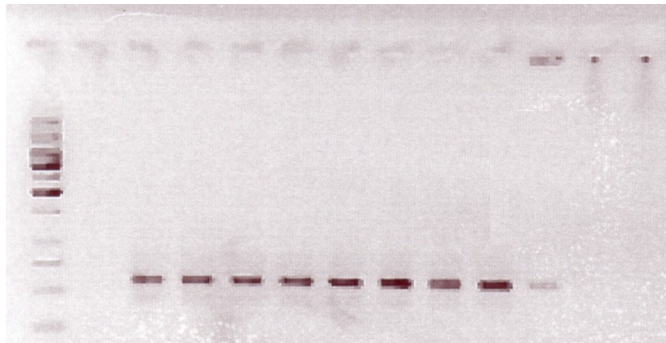
5.6 Molekyylibiologiset tutkimukset

DNA-eristys onnistui kaikista näytteistä. Lantanäytteistä eristettyjen DNA-juosteiden kulku agarosigeelissä on esitetty kuviossa 28.



KUVIO 28. Lantanäytteistä tehtyjen DNA-eristysten ajo agarosigeelissä

PCR onnistui kaikista DNA-eristyksistä. Kokonais-DNA-eristyksistä 16S rRNA -yleisbakteerialukkeilla monistettujen DNA-jaksojen ajo agarosigeelissä on esitetty kuviossa 29. Muutamista näytteistä saatiin hieman vähemmän PCR-tuotetta, mutta kaikkien kohdalla määrän katsottiin kuitenkin olevan riittävä transformaatia varten.

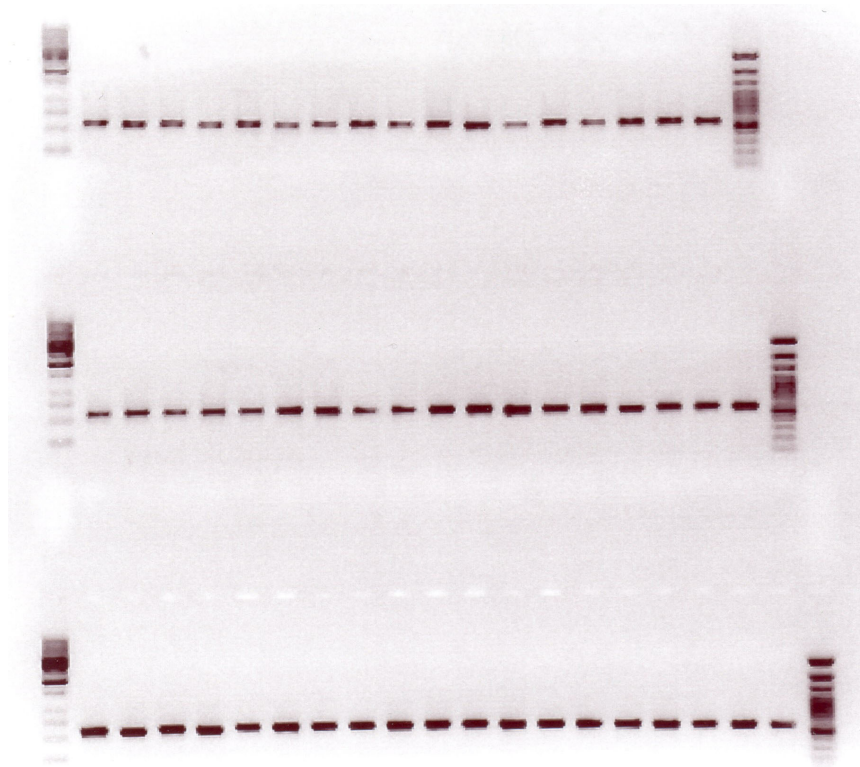


KUVIO 29. 16S rRNA -yleisbakteerialukkeilla saadut PCR-tuotteet agarosigeelillä

Transformaatiotehokkuus jäi kaikkien näytteiden kohdalla melko pieneksi. Lisäksi maljoilla oli melko paljon sinisiä pesäkkeitä valkoisten pesäkkeiden määrään verrattuna, mikä kertoo ligaation heikohkosta onnistumisesta. Kahta poikkeusta lukuun ottamatta kutakin näytettä kohden saatiin kuitenkin poimittua 20 valkoista pesäkettä. Maltoosipitoisuus 5 % 6 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (2) -näytteestä saatiin poimittua vain 18 pesäkettä. Lisäksi näytteestä lanta koejärjestelyn alussa (1) saatiin sen verran vähän valkoisia pesäkkeitä, että PCR ja trans-

formaatio tehtiin uudestaan. Uusi transformaatio onnistuikin paremmin ja valkoisia pesäkkeitä pystyttiin poimimaan 20 kappaletta.

PCR ei kuitenkaan onnistunut kaikista poimituista pesäkkeistä. Kutakin näytettä kohden oli saatava vähintään 15 onnistunutta PCR-tuotetta sekvensoitavaksi. Joidenkin näytteiden kohdalla jouduttiin poimimaan lisää valkoisia pesäkkeitä, jotta tavoitteeseen päästiin. *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076 -näytteen osalta kymmenen onnistuneen PCR-tuotteen joukosta valittiin kolme sekvensointia varten. Kuviossa 30 on esitetty osa sekvensoitavista PCR-tuotteista agarosigeelillä.



KUVIO 30. Sekvensointiin lähetettyjä PCR-tuotteita agarosigeelillä

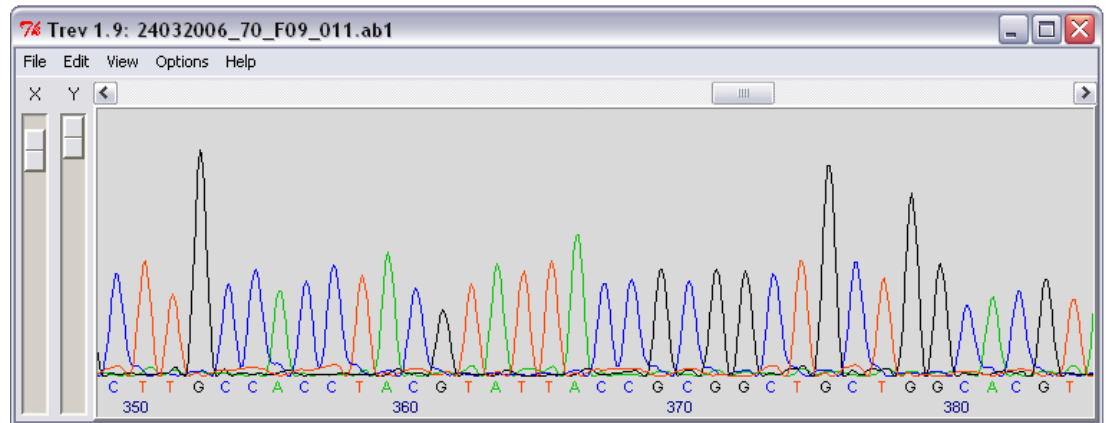
Sekvensointiin lähetettyjen onnistuneiden PCR-tuotteiden lukumäärä kutakin näytettä kohden on esitetty taulukossa 12.

TAULUKKO 12. Sekvensointiin lähetettyjen PCR-tuotteiden lukumäärä

Näyte	PCR-tuotteiden lukumäärä
Lanta koejärjestelyn alussa (1)	20
Lanta koejärjestelyn alussa (2)	19
Raakalanta 1 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (1)	16
Raakalanta 1 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (2)	20
Raakalanta 6 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (1)	16
Raakalanta 6 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (2)	17
Maltoosipitoisuus 5 % 1 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (1)	17
Maltoosipitoisuus 5 % 1 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (2)	18
Maltoosipitoisuus 5 % 6 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (1)	19
Maltoosipitoisuus 5 % 6 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (2)	16
Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> 1 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (1)	17
Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> 1 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (2)	17
Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> 6 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta (1)	19
Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> 6 rk:n kuluttua kokeen aloituksesta (2)	20
<i>Lactobacillus plantarum</i> VTT E-78076	3

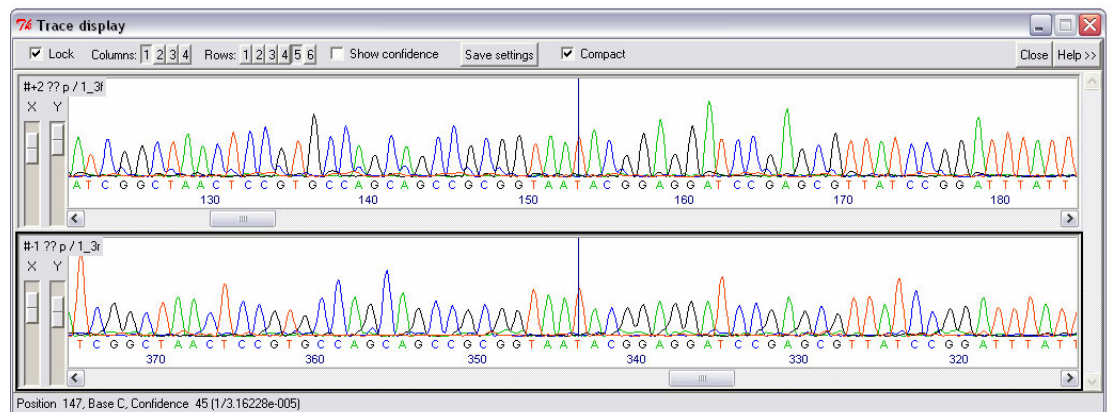
5.6.1 DNA-sekvenssien editointi

DNA-sekvenssit käsiteltiin Staden Package -ohjelmistolla. Sekvenssien kromatogrammit käytiin läpi ja alku- ja loppupään huonot sekvenssit katkaistiin Trev 1.9 -ohjelmalla. Kuviossa 31 on esitetty osa yhden näytteen kromatogrammista.



KUVIO 31. Näkymä Trev-ohjelman antamasta kromatogrammista

Vastakkaisiin suuntiin sekvensoitujen sekvenssien yhdistäminen tehtiin Gap v4.10 -ohjelman avulla. Samalla tarkastettiin, että sekvenssit vastasivat toisiaan, ja mahdolliset eroavaisuudet korjattiin. Gap4-ohjelmalla voidaan verrata eri suuntiin sekvensoitujen sekvenssien kromatogrammeja. Kuviossa 32 esitetyn Trace display -ikkunan kursorit osoittavat samaa kohtaa sekvenssissä.

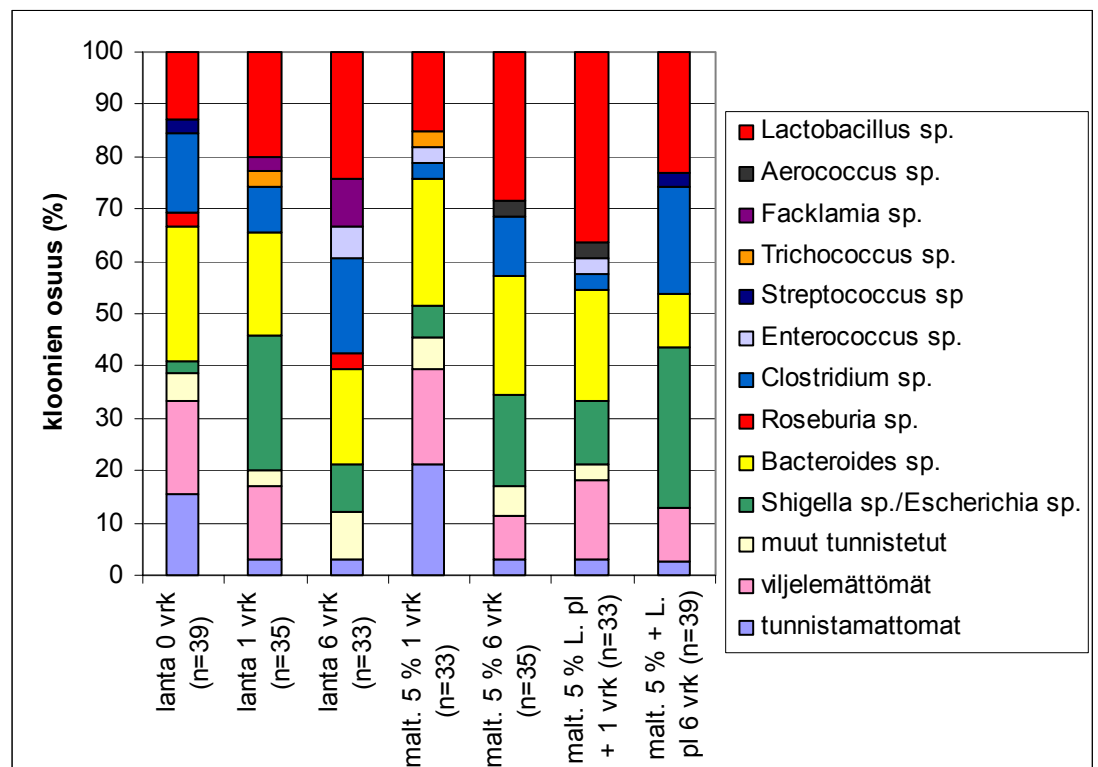


KUVIO 32. Näkymä vastakkaisiin suuntiin sekvensoitujen PCR-tuotteiden vertailusta Gap4-ohjelmalla

Sekvensointiin lähetetyistä 254 näytteestä neljän sekvensointi epäonnistui. Lisäksi 23 näytteen kohdalla sekvensointi oli onnistunut vain toiseen suuntaan. Yhdistämällä saatujen sekvenssien pituudet olivat useimmiten lähes 560 emäsparia. Vain yhteen suuntaan sekvensoitujen ja sellaisten sekvenssien, joiden alku- tai loppupäästä jouduttiin katkaisemaan pidempi osa, pituudet jäivät lyhyemmiksi.

5.6.2 DNA-sekvenssien identifiointi

Sekvenssejä vertailtiin sekvenssietokantoihin BLAST-ohjelmalla. Linjausten tulokset on esitetty koekohtaisesti liitteessä 14. Sekvenssien keskinäinen vertailu tehtiin NClustalW-sekvenssianalyysiohjelmalla. Kolmannen koejärjestelyn aikana otetuista näytteistä tunnistetut bakteerit on esitetty kuviossa 33. Rinnakkaisten kokeiden tulokset on yhdistetty ja bakteerit on jaettu ryhmiin suvuittain. Samaan sukuun kuuluviksi laskettiin myös lähisukuiset tunnistamattomat bakteerit, joiden 16S rRNA -geenin sekvenssit vastasivat jonkin sukuun kuuluvan bakteerin sekvenssiä vähintään 94 prosenttisesti. *Shigella*- ja *Escherichia*-suvut ovat samassa ryhmässä, koska kaikki tähän ryhmään luetut sekvenssit vastasivat molempia sukuja yhtä paljon. Muut tunnistetut -ryhmään laskettiin sellaiset sekvenssit, joiden edustamia bakteereja löytyi ainoastaan yhdestä näytteestä yhden kerran. Tunnistamattomiin bakteereihin luettiin sellaiset tunnistamattomat bakteerit, joiden ei katsottu olevan lähisukuisia tunnettuihin bakteerisukuihin.

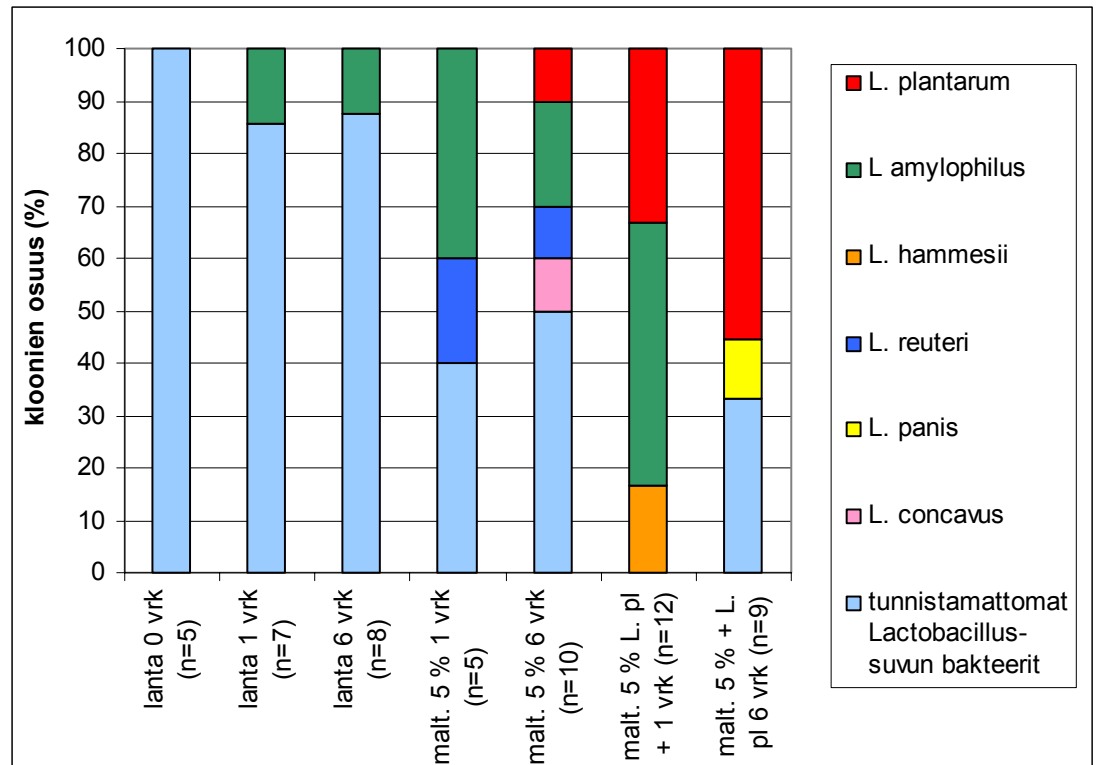


KUVIO 33. Lantanäytteistä identifioidut bakteerit suvuittain ryhmiteltynä

Bakteeriryhmiksi valittujen sukujen taksonomiaa on esitetty liitteessä 15. Ryhmästä muut tunnistetut lähes 40 prosenttia kuului *Clostridiales*-lahkoon. *Proteobacteria*-pääjaksoon ja *Lactobacillales*-heimoon kuuluvien osuus oli hie-man alle 20 prosenttia.

Sekvenssianalyysien mukaan enemmistö koejärjestelyssä käytetyn lannan tunnis-tetuista bakteereista kuului *Bacteroides*-, *Clostridium*- ja *Lactobacillus*-sukuihin. Kaikki *Clostridium*-sukuun luetut sekvenssit kuitenkin vastasivat viljelemättömiä *Clostridium*-suvulle läheisiä bakteereita, joten ryhmän bakteerit eivät luultavasti-kaan ole patogeenejä. Lisäksi ei tiedetä, tuottavatko nämä bakteerit aineenvaih-dunnassaan haisevia yhdisteitä. Tunnistamattomien bakteerien osuus jäi melko pieneksi. Koejärjestelyssä käytetyssä lannassa ja maltoosipitoisuus 5 % -näytteessä oli alussa melko paljon tunnistamattomia bakteereita, mutta seuraa-vaan näytteenottokertaan mennessä tunnistamattomien osuus oli selvästi pienem-pi. Kaikki luokkien *Bacteroides* sp. ja *Shigella* sp./*Escherichia* sp. sekvenssit oli-vat keskenään täysin tai lähes identtisiä. Käytännössä kyseessä on kuitenkin ollut *Escherichia*-suvun bakteeri, koska suurien *Shigella* -bakteerimäärien löytyminen lannasta olisi näkynyt sikojen terveydessä. 16S rRNA -geenien sekvenssianalyy-sien perusteella käsittelemättömässä lannassa ja lannassa, johon oli lisätty sekä maltoosia että *L. plantarum* -nesteviljelmää, oli kuuden vuorokauden jälkeen lähes yhtä paljon *Clostridium*-suvun bakteereja. Myös *Lactobacillus*-suvun bak-teerien määrä oli lähes sama. *Lactobacillus*-bakteerien osuus oli kaikkein suurin maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* -kokeen lannassa yhden vuorokauden jäl-keen kokeen aloituksesta.

Kuviossa 34 on esitetty eri lajien jakauma *Lactobacillus* sp. -ryhmän sisällä. 16S rRNA -geenien sekvenssit, joiden vastaavuus tunnettuihin *Lactobacillus*-suvun bakteereihin oli alle 97 prosenttia, laskettiin kuuluviksi tunnistamattomat *Lactobacillus*-suvun bakteerit -luokkaan.



KUVIO 34. Eri *Lactobacillus*-lajien osuudet kaikista *Lactobacillus*-suvun bakteereista

Kaikki lanta 0 vrk -näytteiden *Lactobacillus*-bakteerit kuuluivat luokkaan tunnistamattomat. Käsittelemättömässä lannassa tunnistamattomien osuus pysyi koko ajan suurena. Sekvenssianalyysitulosten perusteella koejärjestelyissä lisätty bakteeri pystyi kilpailemaan lannan luonnollisen mikrobiston kanssa, sillä *L. plantarum* -ryhmän sekvenssit olivat lähes identtisiä *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076 -bakteerin sekvenssien kanssa. *Lactobacillus amylophilus* -bakteerin osuus oli puolet kaikista *Lactobacillus*-suvun bakteereista maltoosi 5 % + *L. plantarum* -kokeessa ensimmäisen vuorokauden jälkeen. Kuudennen vuorokauden jälkeen otetuista näytteistä ei tehdyillä sekvenssianalyysillä kuitenkaan enää havaittu *L. amylophilus* -bakteeria.

Tehtyjen sekvenssianalyysien perusteella lisäysten vaikutus lannan mikrobistoon oli melko pieni. Analysoidut näytteet oli kuitenkin otettu melko pian kokeiden aloituksen jälkeen, joten on mahdollista, että lisäysten vaikutus mikrobistoon olisi nähtävissä myöhemmin otetuista näytteistä. Tulokset olivat osittain samankaltaisia

kuin esimerkiksi Whitehead'n ja Cottan tekemissä tutkimuksissa. Heidän tutkimustuloksiin verrattuna gramnegatiivisten *Bacteroides*- ja *Escherichia* -bakteerien osuus oli suuri. Lisäksi *Streptococcus*-suvun bakteereja löytyi vain vähän. Kun sekvenssejä verrattiin sekvenssitietokantoihin, monet viljelemättömien bakteerien sekvenssit olivat vastaavia sianlannasta ja sian suolistosta eristettyjen bakteerien 16S rRNA -geenien sekvenssien kanssa. Vain pelko pieni osa sekvensseistä edustikin tuntemattomia bakteereita.

5.7 Kenttäkoe

Fermentorikasvatuksen aikana pH pyrki laskemaan, joten käytännössä pH pysyi koko kasvatuksen ajan säädön alarajaksi asetetussa 5,3:ssa. 1 M natriumhydroksidiliuosta kului pH:n säätöön yhteensä noin 480 ml. Fermentoriin lisätyn siirrosteen *L. plantarum* -pitoisuus oli $8,7 \cdot 10^8$ cfu/ml. Vuorokauden kasvatuksen jälkeen saavutettu bakteeripitoisuus oli $1,9 \cdot 10^8$ cfu/ml.

Kasvatuksen lopussa tehdyillä maljauksilla saatiin bakteeripitoisuudeksi $4,6 \cdot 10^8$ cfu/ml. Saatu pitoisuus oli melko alhainen, mikä saattoi johtua otetun näytteen huonosta edustavuudesta. Nestekasvatus näytti silmämääräisesti sameammalta kuin ensimmäisen vuorokauden jälkeen. Toisaalta maljaamalla saatu alhainen bakteeripitoisuus saattoi aiheutua siitäkin, että osa bakteereista oli jo ehtinyt kuolla. On myös mahdollista, että jokin tekijä rajoitti bakteerien kasvua.

Ensimmäisen ruiskutuskerran yhteydessä otettujen lantanäytteiden välillä ei juuri ollut pH-eroja. Koska *L. plantarum* -nestekasvatuksen ja maltoosipitoisen liuoksen ruiskutus sikalassa ei tuottanut havaittavaa vaikutusta hajuun, käsittelyt lopetettiin kolmen viikon jälkeen.

6 POHDINTA

Sikaloiden yksikkökoon kasvaessa lisääntyvät myös niiden aiheuttamat alueelliset hajupäästöt. Hajuhaitat kasvavat, kun suuria sikaloita ja asuinrakennuksia raken-

netaan yhä lähemmäksi toisiaan. Voimakas sianlannan haju aiheuttaa muun muassa taloudellisia ja sosiaalisia haittoja, sillä se vaikuttaa asumisviihtyvyyteen ja sitä kautta kiinteistöjen arvoon ja esimerkiksi rajaa alueiden virkistyskäyttömahdollisuuksia. Hajupäästöt voivat epäsuorasti vaikuttaa myös ihmisten henkiseen hyvinvointiin.

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, voidaanko sianlannasta aiheutuvia hajupäästöjä vähentää valittujen bakteeri- ja hiilihydraattilisäysten avulla. Tavoitteena oli laskea lannan pH:ta ja samalla vähentää lannasta haihtuvien hajuyhdisteiden määrää. Lannan pH:ta alentamalla voidaan vaikuttaa esimerkiksi ammoniakkin haihtuvuuteen ja lannan mikrobiston elinoloihin. Bakteerilisäyksen avulla oli tarkoitus tehdä *L. plantarum* -bakteerista vallitseva laji lannassa. Hajupäästöt pienentyvät, jos lannassa luonnostaan olevia, aineenvaihdunnassaan haisevia yhdisteitä tuottavia bakteereja syrjäytyy.

Tutkimuksessa kävi ilmi, että käsittelyllä voidaan vaikuttaa sianlannan hajuun ainakin laboratorio-olosuhteissa. Tehdyt kokeet osoittivat, että lannan hajua voidaan vähentää tehokkaimmin, kun lantaan lisätään sekä hiilihydraattipitoista ainesta että *L. plantarum* -nesteviljelmää. Lannan hiilihydraattipitoisuuden on kuitenkin oltava vähintään 2,5 prosenttia, että hajuhaittoja voidaan vähentää merkittäväällä tavalla. Lantaan ei hyödytä lisätä pienempiä määriä hiilihydraattia, sillä tulosten perusteella prosentin hiilihydraattipitoisuus lannassa vaikuttaa hajuun vain vähän tai jopa lisää lannasta vapautuvien hajuyhdisteiden määrää. Kun pH laskee vain hieman, olosuhteet eivät muutu epäsuotuisiksi lannan luonnolliselle mikrobistolle. Ravinnon lisäys päinvastoin parantaa luonnollisen mikrobiston elinoloja ja näin ollen voi lisätä vapautuvien hajuyhdisteiden määrää.

Sianlannan pH-arvo osoittautui hyväksi indikaattoriksi hajun epämiellyttävyydelle. Lannan pH:n ja hajun välillä ei kuitenkaan ole selvää syy-seuraussuhdetta, sillä hajuun vaikuttavat pH:n lisäksi monet muut tekijät. pH-arvon mittaus on nopeaa ja vaivatonta monen muun parametrin seurantaan verrattuna, joten hiilihydraatti- ja bakteerilisäysten lannassa aiheuttamaa prosessia voitaisiin helpoiten seurata juuri pH-mittauksin.

Maljakokeissa MRS- ja TGY-maljoilla saadut bakteeripitoisuudet eivät olleet keskenään vertailukelpoisia, joten maljaukset olisi voitu toteuttaa toisellakin tavalla. Maljauksia olisi voinut tehdä suunnitellusta poiketen useille eri kasvatustalustoille, mutta toisaalta useiden eri maljojen käyttö nostaa helposti maljojen kokonaismäärän epäkäytännöllisen suureksi ja lisää kustannuksia. MRS-maljoilla pystyttiin kuitenkin seuraamaan, millaisia muutoksia *Lactobacillus*-suvun bakteerimäärissä tapahtui. Sekvenssianalyyseilla ei saatu selviä tuloksia siitä, vaikuttiko *L. plantarum* -bakteerin lisäys lannan luonnolliseen mikrobistoon. Tulosten perusteella lisätty bakteeri pystyi kuitenkin kilpailemaan muiden bakteerien kanssa. Selvitettyjen bakteerisekvenssien analysointia voitaisiin jatkaa tutkimalla, mitä bakteerisukuja lähellä tunnistamattomat ja viljelemättömät bakteerit ovat. Sekvenssejä rinnastamalla voidaan piirtää fylogeneettisiä puita, joilla voidaan kuvata sukulaisuussuhteita.

Aistinvaraisen arvioinnin lisäksi koejärjestelyistä mitattiin hajuyhdistepäästöjä kaasukromatografisesti, mutta mittauksia voidaan pitää lähinnä suuntaa antavina. Ne kuitenkin toistettiin aina samalla tavalla, joten tuloksia voidaan pitää keskenään vertailukelpoisina. Kaasukromatografilla saatiin mitattua sianlannan tärkeistä hajuyhdisteryhmistä lähinnä haihtuvia rikkiyhdisteitä. Tehtyjen mittausten perusteella vaikutti siltä, että rikkiyhdistepitoisuudet korreloivat melko hyvin hajun epämiellyttävyyden ja voimakkuuden kanssa. Toisaalta joissakin mittauksissa ei saatu selvää eroa käsitellyn ja käsittelemättömän sianlannan välille, vaikka ero oli aistinvaraisen arvioinnin perusteella selvä. Tutkimuksessa ei mitattu useiden merkittävimpiä pidettyjen hajuyhdisteiden, kuten ammoniakkin, haihtuvien rasvahappojen tai amiinien, pitoisuuksia.

Käytännössä ei olla kiinnostuneita sianlannasta vapautuvien yksittäisten hajuyhdisteiden pitoisuuksista, vaan hajupäästöjen summa ratkaisee. Aistinvarainen arviointi osoittautui tutkimuksessa hyväksi menetelmäksi seurata lannasta aiheutuvia hajuhaittoja, joten aina ei ole tarpeen käyttää kalliita ja usein hankalia mitta-laitteita. Toisaalta sianlanta voidaan kokea epämiellyttäväksi tutkimuskohteeksi aistinvaraiseen arviointiin. Jos pitoisuuksien epäillään olevan hyvin korkeita, tulee mittaukset terveyssyistä suorittaa erityisillä mittalaitteilla. Aistinvarainen arviointi soveltuu kuitenkin yleensä hyvin sianlannasta aiheutuvien hajuhaittojen tutkimi-

seen, sillä hajuyhdisteiden hajukynnykset ovat ärsytuskynnyksiin verrattuna matalia.

Tutkimukseen kuului myös kenttäkoe, jossa sikalan karsinoihin ruiskutettiin maltoosi- ja bakteeriliuosta. Kokeen tavoitteena ei ollut varsinaisesti toteuttaa koejärjestelyä käytännössä, vaan testata karsinoihin kohdistuvan ruiskutuksen vaikutusta sikalan sisäilman hajuun. Ruiskutuksella ei kuitenkaan saavutettu havaittavaa vaikutusta. Jotta tämäntyyppisellä käsittelyllä olisi mahdollista saada tuloksia aikaan, tulisi ruikutuskertojen määrää luultavasti lisätä huomattavasti.

Vaikka laboratoriokokeissa saatiin lupaavia tuloksia, ei tiedetä, miten käsittely toimii käytännössä. Menetelmää tulisikin testata todellisissa olosuhteissa ja suuremmassa mittakaavassa. Käsittelyä olisi tarpeen kokeilla tuoreen lannan lisäksi lietesäiliölantaan. Suurimmat haasteet kenttäkokeessa ovat luultavasti olosuhdeerot laboratorioon verrattuna. Merkittävimmät tekijät, jotka voivat vaikuttaa lisäyksen tehoon, ovat luultavasti lannan pH ja lämpötila. *L. plantarum* VTT E-78076 -bakteerin käytölle ei pitäisi olla muita esteitä, sillä kyseistä bakteerikantaa käytetään rehun säilöntään.

Käsittelystä aiheutuvat kustannukset ovat luultavasti menetelmän käyttöönottoa rajaava tekijä. Jotta bakteeri- ja hiilihydraattilisäyksestä saadaan kaupallinen tuote, on löydettävä jokin edullisempi vaihtoehto hiilihydraatiksi. Potentiaalisia vaihtoehtoja voisivat olla erilaisten prosessien hiilihydraattipitoiset jäteaineet tai huonolaatuinen vilja. Lisäaineen hiilihydraattipitoisuuden on oltava riittävän suuri, että aineksen lisäys ei kasvattaisi lannan kokonaismäärää liian suureksi.

Nyt tehdyllä tutkimuksella saatiin tietoa siitä, miten sianlannasta vapautuvien hajuyhdisteiden määrää voidaan vähentää. Sianlannan hajuongelmien pienentämistä on tutkittu toistaiseksi Suomessa kuitenkin vähän. Hajuongelman ratkaisemiseksi tarvittaisiin selkeästi enemmän tutkimusta ja resursseja. Tutkimustyö on vasta alussa ja parhaan sianlannan käsittelytavan löytämiseksi pitää tehdä paljon tutkimusta.

LÄHTEET

- Arnold, M. 2002. Eläinsuojien hajuhaitat – ohjeistusmallit, arviointi ja vähentäminen sekä käytäntö eri maissa. Alueelliset ympäristöjulkaisut 264. Susies - loppuraportti 15.3.2002. Länsi-Suomen ympäristökeskus, Vaasa.
- Bodenrader, B. Pat. US 4214985. (1980). Method for Sewage Treatment with Bacteria. Hak. US 963675, 27.11.1978. Julk. 29.7.1980.
- Clark, O., Moehn, S., Edeogu, I., Price, J. & Leonard, J. 2005. Manipulation of Dietary Protein and Nonstarch Polysaccharide to Control Swine Manure Emissions. *Journal of Environmental Quality*. 34:1461-1466.
- Cotta, M., Whitehead, T. & Zeltwanger, R. 2003. Isolation, Characterization and Comparison of Bacteria from Swine Faeces and Manure Storage Pits. *Environmental Microbiology* 5: 737-745.
- Hirvijoki, M., Knuutila, K. & Heikinmaa, S. 2003. Rahoitustukea saaneiden tilojen talous, suunnitelmien toteutuminen ja tulevaisuuden suunnitelmat. MTT:n selvityksiä 46. MTT Taloustutkimus, Helsinki.
- Ishaque, M., Bisailon, J. G., Beudet, R. & Sylvestre, M., 1985. Degradation of Phenolic Compounds by Microorganisms Indigenous to Swine Waste. *Agric. Wastes* 13, 229–235.
- Kansallinen rehustrategia ja toimintasuunnitelma 2004-2010. 2004. Maa- ja metsätalousministeriön työryhmämuistio 2004:10. Maa- ja metsätalousministeriö, Helsinki.
- Lim, T.-T., Heber, A., Ni, J.-Q., Sutton, A. & Shao, P. 2003. Odor and Gas Release from Anaerobic Treatment Lagoons for Swine Manure. *Journal of Environmental Quality* 32: 406-416.
- Mackie, R. 1994. Microbial production of odor components. In: Proc. of International Round Table on Swine Odor Control, 13–15 June at Ames, IA, USA, pp. 18–19.
- Mackie, R., Stroot, P. & Varel, V. 1998. Biochemical Identification and Biological Origin of Key Odor Components in Livestock Waste. *Journal of Animal Science* 76:1331-1342.
- Madigan, M., Martinko, J & Parker J. 2003. Brock Biology of Microorganisms. 10. uudistettu painos. Prentice Hall, Yhdysvallat.
- Maltax Oy Ab. 2006.
- McCrary, D. & Hobbs, P. 2001. Additives to Reduce Ammonia and Odor Emissions from Livestock Wastes: a Review. *Journal of Environmental Quality* 30: 345–355.
- Mikkola, H., Puumala, M., Kallioniemi, M., Grönroos, J., Nikander, A. & Holma, M. 2002. Paras käytettävissä oleva tekniikka kotieläintaloudessa. Suomen ympäristö 564. Suomen ympäristökeskus, Helsinki.
- Mänttälä, J., Heinonen-Tanski, H., Herve, S., Kangas, J., Louhelainen, K., Nikkola, T., Paasonen, M., Puumala, M., Rautiala, S., Seuri, M. & Veijanen, A. 2001. Turve kestokuivikkeena sikaloissa. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus, Jokioinen.
- Puumala, M. & Grönroos, J. (toim.) 2004. Kotieläintalouden ympäristökuormituksen vähentäminen. Toimenpiteiden kustannukset ja toimivuus. Suomen ympäristö 708. Suomen ympäristökeskus, Helsinki.
- Sutton, A., Kephart, K., Verstegen, M., Canh, T. & Hobbs, P. 1999. Potential for Reduction of Odorous Compounds in Swine Manure Through Diet Modification. *Journal of Animal Science* 77:430–439.

- Työterveyslaitos. OVA-ohje: metanoli [verkkodokumentti]. 2005 [viitattu 29.3.2006]. Saatavissa: <http://www.ttl.fi/internet/ova/metanoli.html>
- Whitehead, T. & Cotta, M. 2001. Characterisation and Comparison of Microbial Populations in Swine Faeces and Manure Storage Pits by 16S rDNA Gene Sequence Analyses. *Anaerobe* 7: 181-187.
- Whitehead, T. & Cotta, M. 2004. Isolation and Identification of Hyper-ammonia Producing Bacteria from Swine Manure Storage Pits. *Current Microbiology* 48: 20 – 26.
- Zhu, J. 2000. A Review of Microbiology in Swine Manure Odor Control. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 78: 93–106.

MRS BROTH

Reagenssi	Määrä
Peptoni	10,0 g
Lihauute	8,0 g
Hiivauute	4,0 g
Glukoosi	20,0 g
Sorbitan mono-oleaatti	1 ml
Dikaliumvetyfosfaatti	2,0 g
Natriumasetaatti	5,0 g
Triammoniumsitraatti	2,0 g
Magnesiumsulfaatti	0,2 g
Mangaanisulfaatti	0,05 g
Vesi	1000 ml

52 g MRS Broth -elatusainejauhetta liuotetaan litraan tislattua vettä. Alustaa autoklavoidaan 121 °C:ssa 20 minuutin ajan.

MRS-MALJAT

Reagenssi	Määrä
Peptonisekoitus	10,0 g
Hiivauute	5,0 g
Lihauute	10,0 g
Glukoosi	20,0 g
Kaliumfosfaatti	2,0 g
Natriumasetaatti	5,0 g
Ammoniumsitraatti	2,0 g
Magnesiumsulfaatti	0,2 g
Mangaanisulfaatti	0,05 g
Tween 80	1,08 g
Agar	15,0 g
Vesi	1000 ml

70 g MRS Agar -elatusainejauhetta (LAB 93) liuotetaan litraan tislattua vettä. pH säädetään lisäämällä 4,5 ml 4 M suolahappoa litraan elatusainetta. Alustaa autoklavoidaan 121 °C:ssa 20 minuuttia. Autoklavoituun ja jäähtyneeseen (45 °C) elatusaineeseen lisätään 15 ml sorbiinihappoa.

TGY-MALJAT

Reagenssi	Määrä
Tryptoni	5 g
Hiivauute	2,5 g
Glukoosi	1 g
Agar	15 g
Vesi	1000 ml

Reagenssit liuotetaan litraan tislattua vettä ja alustaa autoklavoidaan 121 °C:ssa 20 minuutin ajan.

LURIA BERTANI –MALJAT

Reagenssi	Määrä
Tryptoni	10,0 g
Hiivauute	5,0 g
Natriumkloridi	10,0 g
Agar	15,0 g
Vesi	1000 ml

Reagenssit liuotetaan litraan tislattua vettä. Alustaa autoklavoidaan 121 °C:ssa 20 minuutin ajan.

pH:N MITTAUSTULOKSET ENSIMMÄISESSÄ KOEJÄRJESTELLYSSÄ

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Raakalanta (1)	Raakalanta (2)	<i>L. plantarum</i> (1)	<i>L. plantarum</i> (2)
0	7,01	7,01	6,91	6,99
1	6,61	6,64	6,69	6,69
2	6,71	6,69	6,88	6,64
5	7,45	7,16	6,93	7,16
6	7,57	7,55	7,62	7,29
7	7,64	7,04	7,67	7,58
8	7,14	7,83	8,62	7,15
9	7,41	7,90	7,52	8,02

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Sakkaroosi- pitoisuus 1 % (1)	Sakkaroosi- pitoisuus 1 % (2)	Sakkaroosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Sakkaroosi- pitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,81	6,84	6,63	6,71
1	6,13	6,20	6,54	6,38
2	6,26	6,56	6,25	6,35
5	6,53	7,23	6,50	6,82
6	6,75	7,23	6,60	7,57
7	6,95	7,12	6,86	6,75
8	6,63	6,68	6,88	7,12
9	6,97	7,46	7,19	6,91

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Sakkaroosi- pitoisuus 5 % (1)	Sakkaroosi- pitoisuus 5 % (2)	Sakkaroosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Sakkaroosi- pitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,80	6,80	6,55	6,57
1	5,05	5,08	4,99	4,97
2	4,67	4,62	4,65	4,65
5	4,27	4,28	4,28	4,28
6	4,17	4,18	4,24	4,21
7	4,17	4,17	4,19	4,15
8	4,18	4,18	4,22	4,18
9	4,16	4,17	4,16	4,16

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Laktoosi- pitoisuus 1 % (1)	Laktoosi- pitoisuus 1 % (2)	Laktoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Laktoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,94	6,90	6,77	6,75
1	6,44	6,39	6,55	6,20
2	6,16	6,07	6,28	6,12
5	6,38	6,69	6,71	6,05
6	6,63	6,70	6,60	6,07
7	6,92	6,65	6,48	6,29
8	7,30	6,53	6,91	6,67
9	7,58	6,59	6,69	6,41

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Laktoosi- pitoisuus 5 % (1)	Laktoosi- pitoisuus 5 % (2)	Laktoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Laktoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,67	6,89	6,60	6,54
1	5,13	5,16	4,98	5,18
2	4,84	4,87	4,72	4,79
5	4,48	4,51	4,43	4,44
6	4,42	4,47	4,37	4,38
7	4,36	4,40	4,34	4,35
8	4,39	4,39	4,36	4,36
9	4,37	4,39	4,33	4,34

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Maltoosi- pitoisuus 1 % (1)	Maltoosi- pitoisuus 1 % (2)	Maltoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Maltoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,67	6,89	6,68	6,67
1	6,42	6,20	6,41	6,36
2	6,49	6,32	6,15	6,17
5	6,63	6,90	6,31	6,02
6	7,13	6,73	6,34	6,28
7	7,39	6,90	6,32	6,02
8	6,80	6,88	6,57	6,47
9	7,06	7,37	6,99	6,63

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Maltoosi- pitoisuus 5 % (1)	Maltoosi- pitoisuus 5 % (2)	Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,56	6,63	6,63	6,60
1	5,02	5,11	4,82	5,04
2	4,64	4,67	4,61	4,59
3	4,24	4,20	4,23	4,18
6	4,16	4,13	4,16	4,09
7	4,13	4,14	4,16	4,09
8	4,18	4,14	4,19	4,12
9	4,11	4,16	4,18	4,11

MIKROBIMÄÄRÄT ENSIMMÄISESSÄ KOEJÄRJESTELYSÄ

Koejärjestely	Mikrobimäärä (cfu/ml) MRS-malja	Mikrobimäärä (cfu/ml) TGY-malja
Raakalanta	$7,4 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7$
Sakkarosipitoisuus 5 %	$2,8 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$
Laktoosipitoisuus 5 %	$6,3 \cdot 10^7$	$4,7 \cdot 10^7$
Maltoosipitoisuus 5 %	$6,4 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$
<i>L. plantarum</i>	$8,9 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^7$
Sakkarosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i>	$4,1 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^7$
Laktoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i>	$5,8 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^7$
Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i>	$2,6 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^7$

pH:N MITTAUSTULOKSET TOISESSA KOEJÄRJESTELYSÄ

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Raakalanta (1)	Raakalanta (2)	<i>L. plantarum</i> (1)	<i>L. plantarum</i> (2)
0	6,41	6,74	6,34	6,35
1	5,88	5,60	5,80	5,77
4	5,72	5,65	5,71	5,72
5	5,89	5,94	5,94	5,83
6	6,36	6,33	6,38	5,98
7	7,40	6,15	7,00	6,92
11	7,46	7,20	7,26	7,17

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Sakkaroosi- pitoisuus 1 % (1)	Sakkaroosi- pitoisuus 1 % (2)	Sakkaroosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Sakkaroosi- pitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,34	6,36	6,28	6,33
1	5,29	5,32	5,59	5,52
4	5,15	5,14	5,29	5,32
5	5,80	5,40	5,71	5,64
6	5,47	5,23	5,83	5,85
7	5,78	5,53	6,60	5,73
11	6,30	6,80	6,15	6,22

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Sakkaroosi- pitoisuus 5 % (1)	Sakkaroosi- pitoisuus 5 % (2)	Sakkaroosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Sakkaroosi- pitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,26	6,30	6,32	6,33
1	4,45	4,57	4,56	4,62
4	4,08	4,10	4,05	4,10
5	4,04	4,04	4,07	4,07
6	4,03	4,05	4,06	4,08
7	4,03	4,04	4,04	4,07
11	4,04	4,05	4,03	4,05

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Laktoosi- pitoisuus 1 % (1)	Laktoosi- pitoisuus 1 % (2)	Laktoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Laktoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,32	6,34	6,34	6,35
1	5,34	5,32	5,45	5,41
4	5,22	5,27	5,20	5,20
5	5,60	5,43	5,84	5,40
6	5,13	5,44	5,61	5,44
7	5,64	5,87	6,15	5,44
11	6,96	6,64	6,50	6,11

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Laktoosi- pitoisuus 5 % (1)	Laktoosi- pitoisuus 5 % (2)	Laktoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Laktoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,29	6,30	6,29	6,33
1	4,68	4,65	4,72	4,67
4	4,19	4,16	4,18	4,18
5	4,12	4,13	4,16	4,14
6	4,12	4,13	4,18	4,15
7	4,11	4,12	4,15	4,12
11	4,10	4,10	4,12	4,13

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Maltoosi- pitoisuus 1 % (1)	Maltoosi- pitoisuus 1 % (2)	Maltoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Maltoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,34	6,33	6,35	6,36
1	5,36	5,32	5,48	5,48
4	5,29	5,25	5,25	5,20
5	5,47	5,33	5,54	5,71
6	5,39	5,74	5,74	5,68
7	5,81	5,87	5,60	5,77
11	6,60	6,52	6,55	6,41

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Maltoosi- pitoisuus 5 % (1)	Maltoosi- pitoisuus 5 % (2)	Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,31	6,32	6,31	6,26
1	4,58	4,58	4,57	4,46
4	4,05	4,07	4,05	4,04
5	4,02	4,04	4,04	4,00
6	4,01	4,04	4,06	4,01
7	4,00	4,02	4,03	3,99
11	4,02	4,04	4,03	3,99

TOISEN KOEJÄRJESTELYN KAASUKROMATOGRAFISET MITTAUKSET

Tunnistamattomien yhdisteiden kohdalla on pitoisuuden sijaan merkitty retentio-aika B-kolonnissa.

Raakalanta

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	4,2
Metyylimerkaptaani	3,9
Dimetyylisulfidi	2,4
Asetoni	0,55
Metyylietyyliketoni	0,66
Etanoli	2,1
2-metyylibutanaali	0,27
Dimetyylidisulfidi	1,4
Tuntematon	B56,2
Tuntematon	B61,1
Tuntematon	B69,5
Tuntematon	B241,3

L. plantarum

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	5,1
Metyylimerkaptaani	6,1
Dimetyylisulfidi	2,5
Asetoni	2,5
Metyylietyyliketoni	2,9
2-metyylibutanaali	0,22
Diasetyyli	0,24
Dimetyylidisulfidi	3,3
Tuntematon	B56,1
Tuntematon	B61,2
Tuntematon	B69,3
Tuntematon	B218,2
Tuntematon	B234,8
Tuntematon	B334,1

Sakkaroosipitoisuus 1 %

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	1,1
Metyylimerkaptaani	19
Dimetyylisulfidi	4,4
Asetoni	0,46
Butanaali	0,092
Etyyliasetatti	0,38
Metyylietyyliketoni	4,7
2-metyylibutanaali	0,92
1-propanoli	0,55
Dimetyylidisulfidi	39
Tuntematon	B55,9
Tuntematon	B57,9
Tuntematon	B61,2
Tuntematon	B69,5
Tuntematon	B238,8
Tuntematon	B332,3

Sakkaroosipitoisuus 1 % + *L. plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	6,1
Metyylimerkaptaani	26
Dimetyylisulfidi	5,3
Asetoni	0,33
Metyylietyyliketoni	0,50
2-metyylibutanaali	1,2
Diasetyyli	1,1
Dimetyylidisulfidi	22
Tuntematon	B56,1
Tuntematon	B61,1
Tuntematon	B69,5
Tuntematon	B334,4

Sakkarosipitoisuus 5 %

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	1,3
Metyylimerkaptaani	0,50
Asetaldehydi	1,2
Dimetyylisulfidi	1,0
Asetoni	1,3
Etyyliasetatti	2,1
Metyylietyyliketoni	1,8
Etanoli	110
2-metyylibutanaali	0,71
Diasetyyli	0,37
1-propanoli	3,9
Tolueeni	0,27
Dimetyylidisulfidi	0,36
Tuntematon	B57,9
Tuntematon	B69,5
Tuntematon	B119,5
Tuntematon	B236,8
Tuntematon	B290,9
Tuntematon	B333,1

Sakkarosipitoisuus 5 % + *L. plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	1,3
Metyylimerkaptaani	0,31
Dimetyylisulfidi	0,84
Asetoni	4,1
Metanoli	56
Metyylietyyliketoni	13
Etanoli	41
2-metyylibutanaali	0,57
Diasetyyli	0,66
1-propanoli	2,1
Dimetyylidisulfidi	0,26
Tuntematon	B57,9
Tuntematon	B69,5
Tuntematon	B118,9
Tuntematon	B234,2
Tuntematon	B334,1
Tuntematon	B380,7

Laktoosipitoisuus 1 %

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	150
Metyylimerkaptaani	120
Dimetyylisulfidi	7,4
Asetoni	0,42
Metyylietyyliketoni	1,9
Etanoli	3,8
2-metyylibutanaali	5,1
Diasetyyli	1,6
1-propanoli	0,90
Dimetyylidisulfidi	30
Tuntematon	B55,9
Tuntematon	B57,9
Tuntematon	B69,3
Tuntematon	B235,8
Tuntematon	B333,6

Laktoosipitoisuus 1 % + *L. Plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	11
Metyylimerkaptaani	36
Dimetyylisulfidi	5,0
Asetoni	0,75
Metyylietyyliketoni	1,5
Etanoli	1,9
2-metyylibutanaali	1,5
Diasetyyli	1,4
1-propanoli	0,65
Dimetyylidisulfidi	26
Tuntematon	B56,0
Tuntematon	B57,6
Tuntematon	B61,2
Tuntematon	B69,5
Tuntematon	B233,6
Tuntematon	B334,1

Laktoosipitoisuus 5 %

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	2,4
Metyylimerkaptaani	0,50
Dimetyylisulfidi	1,1
Asetoni	3,2
Metyylietyyliketoni	4,1
Etanoli	0,88
2-metyylibutanaali	0,25
1-propanoli	0,20
Dimetyylidisulfidi	0,50
Tuntematon	B55,4
Tuntematon	B57,8
Tuntematon	B69,5
Tuntematon	B80,1
Tuntematon	B235,5
Tuntematon	B333,9

Laktoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	1,7
Metyylimerkaptaani	0,93
Dimetyylisulfidi	0,85
Asetoni	0,61
Butanaali	0,086
Etyyliasetatti	4,3
Metyylietyyliketoni	0,68
Etanoli	140
2-metyylibutanaali	0,96
Diasetyyli	0,44
1-propanoli	6,0
Tolueeni	0,27
Dimetyylidisulfidi	0,41
Tuntematon	B57,8
Tuntematon	B69,2
Tuntematon	B119,7
Tuntematon	B232,8
Tuntematon	B292,8
Tuntematon	B334,1
Tuntematon	B380,3

Maltoosipitoisuus 1 %

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	85
Metyylimerkaptaani	110
Dimetyylisulfidi	6,9
Asetoni	0,41
Metyylietyyliketoni	1,6
Etanoli	5,0
2-metyylibutanaali	4,9
Diasetyyli	1,6
1-propanoli	1,1
Dimetyylidisulfidi	27
Tuntematon	B55,9
Tuntematon	B57,7
Tuntematon	B69,3
Tuntematon	B234,6
Tuntematon	B333,9
Tuntematon	B380,3

Maltoosipitoisuus 1 % + *L. plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	1,8
Metyylimerkaptaani	14
Dimetyylisulfidi	4,2
Asetoni	0,84
Metyylietyyliketoni	1,1
Etanoli	0,20
2-metyylibutanaali	0,74
Diasetyyli	1,5
Dimetyylidisulfidi	27
Tuntematon	B56,1
Tuntematon	B57,5
Tuntematon	B61,1
Tuntematon	B69,3
Tuntematon	B233,0
Tuntematon	B333,9

Maltoosipitoisuus 5 %

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	1,4
Metyylimerkaptaani	0,38
Dimetyylisulfidi	1,2
Asetoni	5,3
Metanoli	24
Metyylietyyliketoni	21
Etanoli	27
2-metyylibutanaali	0,46
1-propanoli	1,2
Dimetyylidisulfidi	0,27
Tuntematon	B57,8
Tuntematon	B69,2
Tuntematon	B235,0
Tuntematon	B334,1
Tuntematon	B379,7

Maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 12 vrk:n jälkeen (ppm)
Rikkivety	5,3
Metyylimerkaptaani	4,9
Dimetyylisulfidi	1,6
Asetoni	0,37
Butanaali	0,082
Etyyliasetatti	4,4
Metyylietyyliketoni	0,64
Etanoli	180
2-metyylibutanaali	1,1
Diasetyyli	0,35
1-propanoli	4,5
Tolueeni	0,55
Dimetyylidisulfidi	0,42
Tuntematon	B57,8
Tuntematon	B61,3
Tuntematon	B69,2
Tuntematon	B119,6
Tuntematon	B232,2
Tuntematon	B292,5
Tuntematon	B334,1
Tuntematon	B380,7

pH:N MITTAUSTULOKSET KOLMANNESSA KOEJÄRJESTELYSÄ

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Raakalanta (1)	Raakalanta (2)	<i>L. plantarum</i> (1)	<i>L. plantarum</i> (2)
0	6,38	6,34	6,24	6,26
1	6,14	6,11	6,27	6,15
2	6,37	6,12	6,03	6,03
3	6,36	6,25	6,05	6,03
6	6,26	6,27	6,10	6,01
7	6,49	6,41	6,16	6,11
8	6,67	6,42	6,31	6,46
9	6,97	6,51	6,56	6,33
10	6,64	6,91	6,56	6,55
13	7,45	7,40	7,19	7,05
14	7,27	7,15	6,54	6,79
15	7,23	7,61	7,02	6,86
16	7,51	7,78	6,87	7,05
17	7,88	7,51	7,08	7,49
20	7,96	8,08	8,02	7,99
21	7,44	7,58	7,45	7,68
22	7,64	8,05	7,56	7,58
23	7,58	7,55	7,61	7,34
24	7,39	7,73	7,43	7,55
27	7,83	7,57	7,46	7,73
28	7,87	7,97	7,66	7,59
29	7,86	8,02	7,81	7,89
30	7,82	7,92	7,56	7,57

LIITE 9 2(4)

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Maltoosi- pitoisuus 1 % (1)	Maltoosi- pitoisuus 1 % (2)	Maltoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Maltoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,30	6,33	6,18	6,15
1	5,79	5,74	5,75	5,76
2	5,76	5,76	5,73	5,72
3	5,78	5,80	5,78	5,78
6	5,76	5,79	5,77	5,80
7	5,79	5,86	5,81	5,88
8	6,11	6,10	6,02	6,00
9	5,94	6,22	5,94	6,00
10	6,12	6,18	6,00	6,14
13	6,13	6,35	6,13	6,31
14	6,27	6,33	6,13	6,20
15	6,36	6,89	6,23	6,32
16	6,63	6,91	6,35	6,30
17	6,65	6,97	6,39	6,55
20	7,32	7,17	7,31	7,19
21	7,46	7,43	7,18	7,29
22	7,29	7,84	7,38	7,46
23	7,27	7,61	7,15	7,25
24	7,34	7,49	7,19	7,54
27	7,48	7,54	7,35	7,49
28	7,72	7,63	7,44	7,42
29	7,72	7,78	7,67	7,52
30	7,44	7,49	7,60	7,44

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Maltoosi- pitoisuus 2,5 % (1)	Maltoosi- pitoisuus 2,5 % (2)	Maltoosipitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Maltoosipitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,34	6,40	6,17	6,17
1	5,29	5,27	4,93	4,96
2	5,01	4,92	4,82	4,88
3	5,00	4,91	4,85	4,88
6	4,85	4,86	4,77	4,79
7	4,91	4,86	4,78	4,80
8	5,00	4,96	4,91	4,93
9	4,98	5,01	4,85	4,90
10	5,06	5,06	4,93	5,02
13	5,06	5,3	5,04	4,98
14	5,18	5,35	5,07	5,06
15	5,22	5,33	5,18	5,12
16	5,38	5,48	5,15	5,23
17	5,60	5,63	5,41	5,18
20	5,98	6,02	5,56	5,86
21	6,16	6,46	5,98	5,78
22	6,46	6,42	6,31	6,06
23	6,53	6,47	6,19	6,16
24	6,79	6,95	6,67	6,36
27	7,03	7,21	6,78	6,94
28	6,92	6,97	6,78	6,82
29	7,19	7,26	6,74	7,00
30	6,98	6,95	6,86	6,89

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Maltoosi- pitoisuus 5 % (1)	Maltoosi- pitoisuus 5 % (2)	Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,34	6,31	6,23	6,27
1	5,25	5,23	4,85	4,88
2	4,83	4,78	4,5	4,52
3	4,53	4,52	4,28	4,29
6	4,16	4,18	4,06	4,11
7	4,16	4,17	4,08	4,10
8	4,29	4,3	4,22	4,24
9	4,15	4,15	4,09	4,17
10	4,13	4,14	4,10	4,14
13	4,11	4,12	4,09	4,12
14	4,10	4,12	4,06	4,08
15	4,11	4,12	4,07	4,09
16	4,07	4,08	4,05	4,07
17	4,09	4,10	4,08	4,09
20	4,07	4,09	4,06	4,06
21	4,08	4,09	4,08	4,11
22	4,07	4,09	4,08	4,12
23	4,10	4,12	4,09	4,11
24	4,09	4,13	4,10	4,14
27	4,12	4,16	4,14	4,18
28	4,09	4,12	4,11	4,14
29	4,13	4,15	4,14	4,15
30	4,04	4,08	4,06	4,00

MIKROBIMÄÄRÄT KOLMANNESSA KOEJÄRJESTELYSSÄ VUORO-
KAUDEN KULUTTUA KOKEEN PYSTYTYKSESTÄ

Koejärjestely	Mikrobimäärä (cfu/ml) MRS-malja	Mikrobimäärä (cfu/ml) TGY-malja
Raakalanta	$2,45 \cdot 10^8$	$1,40 \cdot 10^8$
Maltoosipitoisuus 1 %	$8,70 \cdot 10^8$	$2,55 \cdot 10^8$
Maltoosipitoisuus 2,5 %	$2,12 \cdot 10^9$	$3,95 \cdot 10^8$
Maltoosipitoisuus 5 %	$1,81 \cdot 10^9$	$4,20 \cdot 10^8$
<i>L. plantarum</i>	$5,35 \cdot 10^8$	$4,80 \cdot 10^8$
Maltoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i>	$9,30 \cdot 10^8$	$1,00 \cdot 10^9$
Maltoosipitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i>	$2,39 \cdot 10^9$	$2,85 \cdot 10^9$
Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i>	$2,82 \cdot 10^9$	$3,21 \cdot 10^9$

MIKROBIMÄÄRÄT KOLMANNESSA KOEJÄRJESTELYSSÄ VUORO-
KAUDEN KULUTTUA KOKEEN PYSTYTYKSESTÄ

Koejärjestely	Mikrobimäärä (cfu/ml) MRS-malja	Mikrobimäärä (cfu/ml) TGY-malja
Raakalanta	$1,95 \cdot 10^8$	$3,50 \cdot 10^8$
Maltoosipitoisuus 1 %	$1,00 \cdot 10^9$	$6,30 \cdot 10^8$
Maltoosipitoisuus 2,5 %	$9,80 \cdot 10^8$	$6,95 \cdot 10^8$
Maltoosipitoisuus 5 %	$7,70 \cdot 10^8$	$5,20 \cdot 10^8$
<i>L. plantarum</i>	$4,55 \cdot 10^8$	$2,05 \cdot 10^8$
Maltoosipitoisuus 1 % + <i>L. plantarum</i>	$1,53 \cdot 10^8$	$7,70 \cdot 10^8$
Maltoosipitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i>	$7,05 \cdot 10^8$	$2,30 \cdot 10^8$
Maltoosipitoisuus 5 % + <i>L. plantarum</i>	$1,55 \cdot 10^9$	$1,95 \cdot 10^8$

KOLMANNEN KOEJÄRJESTELYN KAASUKROMATOGRAFISET
MITTAUKSET

Tunnistamattomien yhdisteiden kohdalla on pitoisuuden sijaan merkitty retentio-
aika B-kolonnissa.

Raakalanta

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	180	170	810	270
Metyylimerkaptaani	80	80	140	120
Dimetyylisulfidi	13	14	19	20
Asetoni	0,27	0,32	0,12	0,028
Butanaali			0,068	0,11
Metyylietyyliketoni	0,26	0,30	0,41	0,62
Etanoli	32	31	3,9	2,9
2-metyylibutanaali		3,7	9,7	
3-metyylibutanaali	2,9			4,3
Diasetyyli	0,042	0,042		
1-propanoli	4,8	4,7		1,0
Tolueeni	0,028			
Dimetyylidisulfidi	0,14	0,12	0,13	0,30
Tuntematon	B58,1	B58,0	B55,7	B55,8
Tuntematon	B69,3	B69,5	B69,1	B69,3
Tuntematon	B332,3			B332,0

L. plantarum

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	510	480	700	1100
Metyylimerkaptaani	160	150	140	200
Dimetyylisulfidi	15	16	17	20
Asetoni	0,25	0,18	0,11	0,039
Butanaali		0,080	0,13	0,25
Etyyliasetatti		0,65	0,29	0,58
Metyylietyyliketoni	0,38	0,20	0,38	0,20
Etanoli	29	29	3,9	13
2-metyylibutanaali	7,2	7,3	9,2	14
Diasetyyli	0,035	0,014	0,015	0,032
1-propanoli	4,9	4,6	1,9	4,1
Tolueeni	0,10	0,090		0,070
Dimetyylidisulfidi	0,26		0,10	
Tuntematon	B55,7	B55,7	B55,7	B55,7
Tuntematon	B58,0	B57,7	B57,7	B150,8
Tuntematon	B69,3	B69,3	B69,1	B333,6
Tuntematon	B77,2	B333,9	B150,4	
Tuntematon	B333,3		B333,3	

Maltoosipitoisuus 1 %

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	360	420	46	750
Metyylimerkaptaani	81	92	38	170
Dimetyylisulfidi	15	14	11	12
Asetoni	0,20	0,26	5,1	3,8
Butanaali	0,056			0,72
Etyyliasetatti				2,8
Metyylietyyliketoni	0,30	0,36	1,4	1,4
Etanoli	36	36	22	17
2-metyylibutanaali	4,5	5,0	2,0	9,8
Diasetyyli	0,10	0,18	0,26	0,43
1-propanoli	5,2	5,3	5,4	4,3
Tolueeni	0,072	0,11	0,076	0,13
Dimetyylidisulfidi	0,089		0,85	
Tuntematon	B55,5	B58,1	B57,8	B57,7
Tuntematon	B58,1	B69,3	B61,1	B69,2
Tuntematon	B69,5	B292,8	B69,3	B292,8
Tuntematon	B292,3	B333,1	B294,7	B332,8
Tuntematon	B333,6		B332,8	
Tuntematon			B451,6	

Maltoosipitoisuus 1 % + *L. plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	430	210	120	360
Metyylimerkaptaani	93	84	66	120
Dimetyylisulfidi	15	13	11	11
Asetoni	0,23	0,22	7,9	4,5
Butanaali			0,072	0,12
Etyyliasettaatti			0,85	2,1
Metyylietyyliketoni	1,0	1,0	2,4	2,1
Etanoli	34	34	20	19
2-metyylibutanaali	5,7	3,9	4,4	5,9
Diasetyyli	0,13	0,11	0,66	0,34
1-propanoli	5,2	4,8	4,8	4,5
Tolueeni	0,11	0,082	0,088	0,11
Tuntematon	B58,0	B55,7	B57,7	B57,7
Tuntematon	B69,3	B57,9	B69,3	B69,2
Tuntematon	B292,3	B69,5	B242,7	B292,3
Tuntematon	B333,6	B77,5	B292,8	B333,6
Tuntematon		B292,5	B333,6	
Tuntematon		B334,1	B453,2	

Maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	120	150	4,3	4,2
Metyylimerkaptaani	56	59	5,7	5,6
Dimetyylisulfidi	11	11	5,4	4,7
Asetoni	0,31	0,29	2,8	3,7
Metanoli	98	110	240	240
Metyylietyyliketoni	2,7	3,1	1,5	3,3
Etanoli	42	42	36	17
2-metyylibutanaali	3,2	3,1	0,78	0,72
Diasetyyli	0,20	0,21	0,37	0,46
1-propanoli	5,2	5,2	5,3	3,4
Tolueeni	0,12	0,13	0,18	0,18
Dimetyylidisulfidi			0,41	0,28
Tuntematon	B57,9	B57,9	B57,8	B57,7
Tuntematon	B69,5	B69,5	B61,1	B61,1
Tuntematon	B77,6	B77,5	B69,3	B69,3
Tuntematon	B241,1	B240,5	B242,4	B242,1
Tuntematon	B293,1	B292,8	B292,3	B292,0
Tuntematon	B333,9	B333,9	B333,6	B333,3
Tuntematon			B452,8	B454,0

Maltoosipitoisuus 2,5 %

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	290	120	14	2,5
Metyylimerkaptaani	74	57	9,8	2,6
Dimetyylisulfidi	15	15	7,6	4,4
Asetoni	0,33	0,32	6,4	3,1
Butanaali			0,28	
Metanoli	120			270
Etyyliasettaatti			4,2	
Metyylietyyliketoni	0,41	0,37	2,2	2,3
Etanoli	42	42	26	32
2-metyylibutanaali	4,1	3,1	0,63	
3-metyylibutanaali				0,53
Diasetyyli	0,22	0,19	0,76	0,53
1-propanoli	5,6	5,7	4,6	5,3
Tolueeni	0,13	0,11	0,21	0,20
Dimetyylidisulfidi			0,17	0,22
Tuntematon	B55,5	B58,0	B57,8	B57,8
Tuntematon	B57,9	B69,5	B61,1	B61,1
Tuntematon	B69,3	B293,3	B69,3	B69,3
Tuntematon	B293,3	B333,9	B233,2	B245,1
Tuntematon	B333,3		B245,1	B292,5
Tuntematon			B292,5	B333,3
Tuntematon			B333,1	B452,4
Tuntematon			B452,8	

Maltoosipitoisuus 5 %

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	300	340	3,6	4,6
Metyylimerkaptaani	68	67	3,8	4,7
Dimetyylisulfidi	18	18	6,1	7,1
Asetoni	0,046	0,19	0,55	0,55
Butanaali	0,016	0,026		
Etyyliasetatti	1,5	1,5	3,9	4,1
Metyylietyyliketoni	0,061	0,042	0,12	
Etanoli	58	56	96	100
2-metyylibutanaali	5,9	5,8	1,3	1,4
Diasetyyli	0,78	0,82	0,67	0,69
1-propanoli	7,3	7,2	7,8	8,1
Tolueeni	0,14	0,19	0,34	0,36
Dimetyylidisulfidi			0,51	0,40
Tuntematon	B57,9	B57,9	B57,8	B57,7
Tuntematon	B69,5	B69,5	B61,2	B61,1
Tuntematon	B292,5	B292,8	B69,3	B69,3
Tuntematon	B334,1	B333,6	B119,3	B119,5
Tuntematon			B292,3	B292,3
Tuntematon			B333,3	B333,3
Tuntematon			B453,6	B452,4

Maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	93	88	1,1	2,3
Metyylimerkaptaani	47	42	2,8	3,6
Dimetyylisulfidi	11	9,4	4,8	4,6
Asetoni	0,30	0,30	0,67	0,32
Butanaali			0,21	
Metanoli	120	120		244
Etyyliasettaatti			2,9	
Metyylietyyliketoni	0,51	1,6	0,17	0,14
Etanoli	52	50	82	82
2-metyylibutanaali	2,8	2,6	1,2	1,2
Diasetyyli	0,32	0,29	0,55	0,52
1-propanoli	5,8	5,7	6,3	6,3
Tolueeni	0,14	0,16	0,26	0,26
Dimetyylidisulfidi	0,082		0,50	0,51
Tuntematon	B57,9	B57,9	B57,8	B57,8
Tuntematon	B69,5	B69,5	B61,2	B61,2
Tuntematon	B77,3	B78,8	B69,3	B69,3
Tuntematon	B292,8	B239,6	B119,5	B119,3
Tuntematon	B333,9	B292,5	B292,3	B292,3
Tuntematon	B454,8	B333,9	B333,6	B333,6
Tuntematon			B452,4	B452,4

pH:N MITTAUSTULOKSET NELJÄNNESSÄ KOEJÄRJESTELYSÄ

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Raaka- lanta (1)	Raaka- lanta (2)	Vehnäjauhopenitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Vehnäjauhopenitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,93	6,81	6,53	6,22
1	6,16	6,35	5,73	5,81
4	6,83	6,15	5,44	5,44
5	6,32	6,26	5,57	5,51
6	6,73	6,73	5,41	5,48
7	6,92	6,65	5,44	5,56
8	7,09	7,26	5,39	5,7
11	7,55	7,54	5,33	6
12	7,47	7,41	5,38	6,39
13	7,88	8,07	5,47	6,7
14	7,5	7,6	5,34	6,68
15	7,72	7,62	5,4	6,95
18	7,73	7,75	6,75	7,2
19	7,94	8,08	6,19	7,46
20	8,37	7,95	6,16	7,44
21	8,41	7,91	6,77	7,46
22	8,31	7,78	6,62	7,23
25	8,14	7,77	6,82	7,35
26	7,97	7,96	6,42	7,85
27	8,37	7,83	7,58	7,45
28	7,96	8,14	7,62	7,13
29	7,92	8,19	7,46	7,74

Aika (vrk)	pH-arvo			
	Maissitärkkelyspitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Maissitärkkelyspitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i> (2)	Maltoosi- pitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i> (1)	Maltoosi- pitoisuus 2,5 % + <i>L. plantarum</i> (2)
0	6,36	6,28	6,49	6,25
1	5,90	5,69	5,67	5,48
4	5,20	5,23	5,19	5,16
5	5,27	5,20	5,24	5,11
6	5,27	5,28	5,17	5,06
7	5,28	5,26	5,17	5,11
8	5,18	5,17	5,13	5,02
11	5,17	5,15	5,20	5,02
12	5,19	5,16	5,22	5,06
13	5,26	5,25	5,30	5,17
14	5,22	5,16	5,19	5,08
15	5,25	5,22	5,29	5,22
18	5,27	5,21	5,28	5,63
19	5,32	5,24	5,32	5,55
20	5,29	5,22	5,32	5,80
21	5,36	5,29	5,41	5,96
22	5,33	5,27	5,44	6,27
25	5,44	5,19	5,73	6,72
26	5,71	5,20	5,85	7,20
27	5,81	5,22	6,06	7,36
28	6,02	5,21	6,90	7,37
29	6,10	5,24	7,01	7,35

NELJÄNNEN KOEJÄRJESTELYN KAASUKROMATOGRAFISET
MITTAUKSET

Tunnistamattomien yhdisteiden kohdalla on pitoisuuden sijaan merkitty retentio-
aika B-kolonnissa.

Raakalanta

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	760	990	1,5	1,2
Metyylimerkaptaani	160	170	3,1	3,7
Dimetyylisulfidi	14	17	12	16
Asetoni	5,9	9,0	3,6	0,22
Butanaali	0,02	0,27		
Metyylietyyliketoni	1,1	1,8	0,20	
Etanoli	5,2	8,6	0,97	
2-metyylibutanaali				0,77
Tolueeni	0,39	0,36	0,16	0,16
2-butanoli	0,029			
Dimetyylidisulfidi	0,19	0,092	2,09	6,1
Tuntematon	B57,7	B55,9	B55,9	B55,9
Tuntematon	B69,2	B57,7	B61,1	B61,2
Tuntematon	B244,0	B69,1	B69,5	B69,5
Tuntematon		B241,4	B79,7	B79,7
Tuntematon			B235	

Vehnäjauhopitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	770	540	7,3	16
Metyylimerkaptaani	83	62	2,7	6,9
Dimetyylisulfidi	8,7	6,7	2,9	2,6
Asetoni	4,7	2,3	3,7	22
Butanaali	1,1			
Metanoli			130	
Metyylietyyliketoni	2,1	1,8	0,49	3,7
Etanoli	15	9,7	23	7,7
2-metyylibutanaali				1,1
3-metyylibutanaali			0,68	
Diasetyyli	0,043	0,013	0,43	0,029
1-propanoli	2,2	2,3	6,0	3,1
Tolueeni	0,32	0,21	0,42	
2-butanoli	0,032	0,043	0,35	
Dimetyylidisulfidi		0,13	0,39	0,50
Tuntematon	B55,7	B55,7	B57,8	B57,8
Tuntematon	B57,7	B57,7	B61,2	B61,1
Tuntematon	B69,2	B69,2	B69,3	B69,2
Tuntematon	B239,0	B237,4	B292,8	B242,4
Tuntematon	B256,0	B254,7	B332,8	B333,6
Tuntematon	B332,3	B282,1		
Tuntematon		B332,5		

Maissitärkkelyspitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	780	540	10	7,9
Metyylimerkaptaani	130	86	3,7	2,7
Dimetyylisulfidi	12	9,5	5,2	3,9
Asetoni	5,4	4,8	7,1	1,9
Butanaali		1,3		
Metanoli	320			270
Etyyliasettaatti			2,3	
Metyylietyyliketoni	1,5	2,5	2,4	0,37
Etanoli	14	18	20	36
2-metyylibutanaali			0,87	1,2
Diasetyyli		0,056	0,53	0,55
1-propanoli	2,0	2,57	4,9	7,5
Tolueeni	0,41	0,45	0,64	0,80
2-butanoli	0,047	0,073	0,52	0,53
Dimetyylidisulfidi	0,15	0,089	0,27	0,26
Tuntematon	B55,7	B55,8	B57,8	B57,8
Tuntematon	B57,7	B57,7	B61,1	B61,1
Tuntematon	B69,2	B69,2	B69,3	B69,3
Tuntematon	B236,6	B235,8	B243,7	B255,7
Tuntematon	B332,5	B253,3	B292,8	B292,5
Tuntematon		B292,0	B333,1	B333,6
Tuntematon		B332,5		

Maltoosipitoisuus 2,5 % + *L. plantarum*

Yhdiste	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 1 vrk:n jälkeen (2) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (1) (ppm)	Pitoisuus 6 vrk:n jälkeen (2) (ppm)
Rikkivety	470	470	2,7	11
Metyylimerkaptaani	28	35	0,71	0,94
Dimetyylisulfidi	6,1	6,7	1,9	2,1
Asetoni	0,97	0,47	6,0	29
Butanaali		0,98		0,015
Metanoli	170		140	
Etyyliasettaatti				0,54
Metyylietyyliketoni	1,7	2,6	5,4	13
Etanoli	20	22	24	18
2-metyylibutanaali			0,73	1,6
Diasetyyli	0,25	0,25	0,57	0,62
1-propanoli	3,7	3,6	7,1	4,9
Tolueeni	0,38	0,49	0,45	0,35
2-butanoli	0,086	0,089	0,34	0,27
Dimetyylidisulfidi			0,15	0,18
Tuntematon	B57,8	B57,8	B57,8	B57,8
Tuntematon	B69,2	B69,2	B61,1	B69,3
Tuntematon	B234,4	B234,2	B69,3	B241,3
Tuntematon	B252,8	B252,3	B243,5	B293,3
Tuntematon	B291,5	B291,2	B292,5	B333,6
Tuntematon	B332,8	B332,5	B333,3	
Tuntematon			B452,8	

DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET RINNAKKAISISTA KOKEISTA

Lanta koejärjestelyn alussa

PCR-tuote	Vastavuus (%)	Accession	Laji	Vastavuudet (kpl)	Kommentit
Rinnakkaissarja 1					
1	95	AF371588	Uncultured bacterium		
2	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
3	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
4	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
5	100	AF371689	Uncultured bacterium	6	
6	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
7	95	AJ970317	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	3	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
8	93	AY570612	Uncultured bacterium	7	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
9	100	AF371507	Uncultured bacterium	22	
10	94	AY570612	Uncultured bacterium	5	
11	100	DQ238608	Uncultured bacterium	20	
12	97	AY005049	Firmicutes		
13	98	AF371901	Uncultured bacterium		
14	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	
15	99	AF371872	Uncultured bacterium		
16	100	AF371689	Uncultured bacterium	6	
17	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
18	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
19	96	DQ339754	Uncultured bacterium		
20	100	AF371704	Uncultured bacterium		
Rinnakkaissarja 2					
21	98	DQ447381	Uncultured bacterium		
22	97	AY005049	Firmicutes	1	
23	99	DQ327032	Uncultured bacterium	8	
24	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
25	100	AF371472	Uncultured bacterium	9	
26	90	DQ169757	Uncultured Clostridia bacterium		
27	100	AF371897	Uncultured bacterium	2	
28	91	AY368612	Uncultured bacterium		
29	100	AF371472	Uncultured bacterium	9	
30	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
31	99	DQ238608	Uncultured bacterium	20	
32	100	AF371881	Uncultured bacterium		
33	98	DQ014825	Uncultured bacterium	2	
34	96	AF371569	Uncultured bacterium	8	
35	100	AF371472	Uncultured bacterium	9	
36	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
37	98	AY976560	Uncultured bacterium		
38	96	AJ272391	<i>Lactobacillus psittaci</i>		
39	99	AF371890	Uncultured bacterium	2	

Raakalanta 1 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta

PCR-tuote	Vastavuus (%)	Accession	Laji	Vastaavuudet (kpl)	Kommentit
Rinnakkaissarja 1					
1	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	
2	95	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	Linjattu 416 bp:tä 488 bp:stä, sekvensoitu vain yhteen suuntaan
3	98	AF371902	Uncultured bacterium	2	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
4	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
5	93	AB233996	Uncultured bacterium		Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
6	96	AF371689	Uncultured bacterium	7	
7	97	AY005049	Firmicutes		
8	93	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	Linjattu 476 bp:tä 551 bp:stä
9	95	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
10	98	DQ447381	Uncultured bacterium		Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
11	98	DQ447381	Uncultured bacterium		Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
12	95	AF371472	Uncultured bacterium	10	
13	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
14	98	DQ113763	Uncultured bacterium		
15	99	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
16	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
Rinnakkaissarja 2					
17	100	AF371472	Uncultured bacterium	9	
18	100	AF371478	Uncultured bacterium	25	
19	97	AF317367	Uncultured feedlot manure bacterium		
20	100	AF371472	Uncultured bacterium	9	
21	99	Y17820	<i>Facklamia</i> sp.	2	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
22	100	AF371472	Uncultured bacterium clone	9	
23	97	AY982206	Uncultured bacterium	2	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
24	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		
25	99	AF371472	Uncultured bacterium	9	
26	100	AF371932	Uncultured bacterium	16	
27	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
28	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
29	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
30	100	AY985135	Uncultured bacterium	30	
31	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
32	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
33	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
34	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
35	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	

Raakalanta 6 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta

PCR-tuote	Vastavuus (%)	Accession	Laji	Vastavuudet (kpl)	Kommentit
Rinnakkaissarja 1					
1	100	AY984380	Uncultured bacterium	2	
2	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	
3	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
4	99	AY985135	Uncultured bacterium	30	
5	99	Y17820	<i>Facklamia</i> sp.	2	
6	100	DQ238608	Uncultured bacterium	21	
7	100	AF371472	Uncultured bacterium	9	
8	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
9	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
10	93	AB205829	Uncultured bacterium		
11	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		
12	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	
13	94	DQ170455	Uncultured Clostridia bacterium	3	
14	100	AF371478	Uncultured bacterium	25	
15	99	Y17820	<i>Facklamia</i> sp.	2	
16	99	AF371472	Uncultured bacterium	9	
Rinnakkaissarja 2					
17	100	AF371932	Uncultured bacterium	16	
18	99	AF371478	Uncultured bacterium	25	
19	99	X70321	<i>Kurthia zopfii</i>		
20	98	AJ301836	<i>Enterococcus mundtii</i>	5	
21	100	Y17820	<i>Facklamia</i> sp.		
22	100	AY992233	Uncultured bacterium	2	
23	100	DQ238608	Uncultured bacterium	20	
24	100	AF371472	Uncultured bacterium	9	
25	93	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	Linjattu 407 bp:tä 531 bp:stä
26	100	AY349383	<i>Lactobacillus</i> sp.		
27	91	AF542227	<i>Fingoldia magna</i>	8	
28	97	DQ325996	Uncultured bacterium		
29	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
30	100	DQ238608	Uncultured bacterium	21	Linjattu 411 bp:tä 559 bp:stä
31	99	AM050564	<i>Enterococcus inusitatus</i>	4	
32	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
33	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	

Maltoosipitoisuus 5 % 1 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta

PCR-tuote	Vastavuus (%)	Accession	Laji	Vastaavuudet (kpl)	Kommentit
Rinnakkaissarja 1					
1	97	AY005049	Firmicutes		
2	99	AF371788	Uncultured bacterium		
3	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	
4	100	AF371802	Uncultured bacterium		
5	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	
6	100	AF371940	Uncultured bacterium	15	
7	100	AF371472	Uncultured bacterium	9	
8	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		
9	89	AY648566	Uncultured spirochete		
10	100	AF371689	Uncultured bacterium	6	
11	99	AF371781	Uncultured bacterium		
12	99	DQ374463	Uncultured bacterium		
13	97	AY005049	Firmicutes		
14	97	AY005049	Firmicutes		
15	100	AM050564	<i>Enterococcus inusitatus</i>	4	
16	92	AF371909	Uncultured bacterium		
Rinnakkaissarja 2					
17	98	DQ337540	Swine effluent bacterium		Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
18	100	AY735406	<i>Lactobacillus reuteri</i>	10	
19	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
20	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
21	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
22	97	AY005049	Firmicutes		
23	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
24	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
25	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		
26	100	AY992233	Uncultured bacterium	2	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
27	93	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
28	95	AB034082	Uncultured rumen bacterium		Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
29	99	AY983906	Uncultured bacterium	3	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
30	92	M59084	<i>Clostridium acidurici</i>		Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
31	99	AF371874	Uncultured bacterium		Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
32	93	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
33	93	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan

Maltoosipitoisuus 5 % 6 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta

PCR-tuote	Vastavuus (%)	Accession	Laji	Vastavuudet (kpl)	Kommentit
Rinnakkaissarja 1					
1	100	AF371472	Uncultured bacterium	10	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
2	99	AY982390	Uncultured bacterium	9	
3	100	DQ129404	Uncultured bacterium	13	
4	99	AB218344	Uncultured Lachnospiraceae bacterium		
5	95	AF371493	Uncultured bacterium		Linjattu 48 bp:tä 551 bp:stä
6	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		
7	99	AF371472	Uncultured bacterium	9	
8	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
9	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
10	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	Sekvensoitu vain yhteen suuntaan
11	100	AF371472	Uncultured bacterium	9	
12	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		
13	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
14	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
15	100	AY683322	<i>Lactobacillus concavus</i>		
16	99	AF371472	Uncultured bacterium	9	
17	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	
18	98	D87679	<i>Pediococcus dextrinicus</i>	2	
19	98	DQ056424	Uncultured <i>Lactobacillus</i> sp.	3	
Rinnakkaissarja 2					
20	100	AY735406	<i>Lactobacillus reuteri</i>	10	
21	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	
22	94	AB009176	Unidentified rumen bacterium		
23	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
24	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	
25	100	AJ609272	<i>Psychrobacter maritimus</i>	3	
26	99	AF371689	Uncultured bacterium	6	
27	99	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	
28	99	DQ238608	Uncultured bacterium	20	
29	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	
30	100	AY985135	Uncultured bacterium	30	
31	99	DQ238608	Uncultured bacterium	20	
32	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
33	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
34	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
35	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	

Maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* 1 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta

PCR-tuote	Vastavuus (%)	Accession	Laji	Vastaavuu-det (kpl)	Kommentit
Rinnakkaissarja 1					
1	97	AY005049	Firmicutes		
2	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
3	100	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	
4	99	AJ632219	<i>Lactobacillus hammesii</i>		
5	99	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i>	34	
6	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
7	99	AF371910	Uncultured bacterium		
8	98	DQ232853	Uncultured <i>Enterococcus</i> sp.	7	
9	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		
10	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		
11	99	DQ129404	Uncultured bacterium	13	
12	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
13	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		
14	99	AJ632219	<i>Lactobacillus hammesii</i>		
15	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
16	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
Rinnakkaissarja 2					
17	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		
18	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
19	99	AF371891	Uncultured bacterium		
20	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
21	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	36	
22	100	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	
23	97	AY005049	Firmicutes		
24	97	AY005049	Firmicutes		
25	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		
26	98	AY920122	Uncultured bacterium		
27	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
28	100	AF371643	Uncultured bacterium	3	
29	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
30	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
31	99	AF371689	Uncultured bacterium	6	
32	100	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i>	34	
33	97	M58806	<i>Lactobacillus amylophilus</i>		

Maltoosipitoisuus 5 % + *L. plantarum* 6 vrk:n kuluttua kokeen aloituksesta

PCR-tuote	Vastavuus (%)	Accession	Laji	Vastavuudet (kpl)	Kommentit
Rinnakkaissarja 1					
1	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
2	100	AF371507	Uncultured bacterium	22	
3	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
4	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
5	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
6	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
7	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
8	100	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	
9	99	AF371689	Uncultured bacterium	6	
10	100	AF371673	Uncultured bacterium		
11	100	DQ238608	Uncultured bacterium	22	
12	100	AF371536	Uncultured bacterium	10	
13	99	DQ238608	Uncultured bacterium	20	
14	100	AF371689	Uncultured bacterium	6	
15	98	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i>	37	Linjattu 417 bp:tä 541 bp:stä
16	100	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i>	34	
17	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
18	99	X94230	<i>Lactobacillus panis</i>		
19	100	DQ238608	Uncultured bacterium	20	
Rinnakkaissarja 2					
20	99	DQ113746	Uncultured bacterium		
21	99	AF371472	Uncultured bacterium	9	
22	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
23	97	AY920122	Uncultured bacterium		
24	100	AF371536	Uncultured bacterium	11	
25	99	DQ238608	Uncultured bacterium	20	
26	100	AF371472	Uncultured bacterium	9	
27	94	AB233996	Uncultured bacterium		
28	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	4	
29	99	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
30	99	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i>	34	
31	100	DQ337543	Swine effluent bacterium	2	
32	100	AF371472	Uncultured bacterium	9	
33	99	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i>	34	
34	94	DQ337530	<i>Bacteroides</i> sp.	3	
35	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
36	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
37	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
38	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	
39	100	AY696681	<i>Shigella boydii</i>	>50	

Lactobacillus plantarum VTT E-78076

PCR-tuote	Vastavuus (%)	Accession	Laji	Vastavuudet (kpl)
1	99	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain L5	34
2	99	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain L5	34
3	99	DQ239698	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain L5	34

BAKTEERIEN TAKSONOMIAA

