

**NATRIUMNITRIITIN JA ESIKUIVATUKSEN VAIKUTUS PUNA-
APILAPITOISEN SÄILÖREHUN KÄYMISLAATUUN**

Meri Äijö

Maisterintutkielma

Helsingin yliopisto

Maataloustieteiden osasto

Kotieläinten ravitsemustiede

2019

HELSINGIN YLIOPISTO — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Maataloustieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Meri Äijö			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Natriumnitriitin ja esikuivatuksen vaikutus puna-apilapitoisen säilörehun käymislaatuun			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma		Aika — Datum — Month and year Huhtikuu 2019	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 34 s.
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Nurmipalkokasvit kiinnostavat valkuaislähteinä ja niistä yleisin on puna-apila. Puna-apila on haastava säilöä sen korkean valkuaispitoisuuden ja puskurikapasiteetin sekä alhaisen sokeri- ja kuiva-ainepitoisuuden vuoksi. Klostridit tulevat rehuun usein maaperästä ja selviävät melko happamissa olosuhteissa. Klostridit tuottavat säilörehuun voihappoa. Kasveissa luonnollisesti oleva nitraatti hajoaa säilönnässä ammoniakiksi, nitriitiksi ja typen oksideiksi. Nitriitti ja typpioksidi vaikuttavat ehkäisevästi klostridien kasvuun.</p> <p>Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää natriumnitriitin soveltuvuutta puna-apilasäilörehun säilöntään verrattuna muurahaishappoon tai painorehuun. Koe tehtiin kahdella erilaisella rehun kuiva-ainepitoisuudella (KA1 ja KA2). Lisäksi tehtiin klostrideilla kontaminoituja rehuja, jolla pyrittiin varmistamaan riittävä klostridien määrä rehussa. Rehu korjattiin Viikin opetus- ja tutkimustilan pellolta ja se oli 66 %:sti puna-apilaa ja 31 %:sti nurmiheiniä, timoteita ja nurminataa.</p> <p>Raaka-aineesta määriteltiin kuiva-ainepitoisuus, tuhka, raakavalkuainen, liukoinen typi, NDF (kuitu), orgaanisen aineen in vitro -sulavuus ja D-arvo, vesiliukoiset hiilihydraatit, nitraatti, puskurikapasiteetti, fermentaatiokerroin ja klostridien määrä. Säilörehuista määriteltiin kuiva-ainepitoisuus, pH, ammoniumtyppi, sokeri, maitohappo, haihtuvat rasvahapot, etanoli, klostridit ja aerobinen stabiilisuus. Kuiva-ainepitoisuus oli KA1 -rehussa 200 g/kg ja KA2-rehussa 314 g/kg. Sokeripitoisuuksien ja fementaatiokertoimien perusteella KA2-rehu oli melko helppoa säilöä, KA1-rehu taas haastava.</p> <p>Klostrideja oli raaka-aineessa oletettua enemmän, joten lisätyllä klostridikontaminaatiolla ei ollut vaikutusta tuloksiin. KA2-rehuissa luontainen nitraattipitoisuus oli todennäköisesti riittävä estämään voihappokäymistä kaikissa rehuissa. KA1-rehuissa muurahais-hapon annostelu oli mahdollisesti liian alhainen suhteessa kuiva-ainepitoisuuteen, mistä seurasi voihappokäymistä ja etanolia. Natriumnitriitillä säilöittäessä etanolin määrä oli alhainen ja voihappoa ei esiintynyt. Painorehussa ei ollut voihappoa. Aerobinen stabiilisuus oli kaikissa rehuissa hyvä. Tutkimuksen mukaan natriumnitriitti soveltuu säilörehun säilöntään ehkäisten klostridien tuottaman voihapon muodostumista.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Puna-apila, Säilörehu, Natriumnitriitti, Klostridi, esikuivatus, voihappo			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Maataloustieteiden laitos ja Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työtä ohjasi yliopistonlehtori Seija Jaakkola			

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY
OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Meri Äijö			
Työn nimi — Arbetets titel — Title The effect of sodium nitrite and dry matter concentration on the quality of the red clover silage			
Oppiaine — Läroämne — Subject Animal nutrition			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis	Aika — Datum — Month and year 04/2019	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 34 p.	
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Red clover is a challenging forage legume to be ensiled because of its high protein content and high buffering capacity and low water soluble carbohydrate (WSC) and dry matter (DM) contents. Clostridia may end up in harvested grass from soil contamination and produce butyric acid in silage. Plants contain always some nitrate, which is degraded in silage to ammonia, nitrite and nitrogen oxides. Nitrite and nitrogen oxides have a preventive effect on clostridial growth.</p> <p>The aim of the study was to determine the suitability of sodium nitrite for ensiling red clover compared to formic acid treated and untreated silage. The study was conducted with two different DM contents (DM1 and DM2) of red clover based forage. Part of the forage was contaminated with clostridia. Forage was harvested from the field of research farm and it contained 66% red clover and 31% timothy and fescue in DM.</p> <p>The DM content of DM1 silage was 200 g/kg and that of DM2 silage 314 g/kg. Based on WSC and DM contents and buffering capacity, the DM2 silage was easy to ensile and DM1 silage was challenging to ensile.</p> <p>The count of clostridia was higher in raw material than expected, so the clostridia contamination had no effect on the results. In the DM2 silage, the natural nitrate concentration was probably sufficient to prevent the butyric acid fermentation in all silages. Formic acid application rate was possibly too low in the DM11 silage and therefore silages contained butyric acid and ethanol. In silages treated with sodium nitrite, the amount of ethanol was low, and no butyric acid was detected. Similarly, in untreated silage butyric acid was not detected. Aerobic stability was good in all silages. According to the results, sodium nitrite is suitable for the preservation of silage.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Red clover, Silage, Sodium nitrite, Clostridia, Butyric acid			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Supervisor: University Lecturer Seija Jaakkola			

SISÄLLYS

LYHENTEET JA SYMBOLIT.....	6
1 JOHDANTO.....	7
2 KATSAUS KIRJALLISUUTEEN	8
2.1 Säilörehu ja sen käymiseen vaikuttavat tekijät.....	8
2.2 Puna-apila	9
2.3 Klostridit.....	10
2.4 Natriumnitriitti NaNO ₂	12
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET.....	13
4 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	14
4.1 Koerehujen valmistus ja säilöntä.....	14
4.2. Näytteiden otto ja analysointi.....	15
4.3 Aerobinen stabiilisuus	16
4.4 Tulosten laskenta ja tilastolliset analyysit	17
5 TULOKSET.....	18
5.1. Raaka-aine	18
5.2 Kuiva-aine 1 säilörehu	19
5.3. Kuiva-aine 2 säilörehu	23
6 TULOSTEN TARKASTELU	24
6.1. Raaka-aine	24
6.2 Säilörehut.....	26
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	29
LÄHTEET	30

LYHENTEET JA SYMBOLIT

PR = Painorehu

MH = Muurahaishappo

SA = Säilöntäaine

NDF = Neutraalidetergentti kuitu

iNDF = Sulamaton neutraalidetergentti kuitu

PK = Puskurikapasiteetti

D-arvo = Sulavan orgaanisen aineen osuus kuiva-aineesta

mekv = Milliekvivalentti

FK = Fermentaatiokerroin

WSC = Vesiliukoiset hiilihydraatit

KA = Kuiva-aine

Pmy = Pesäkettä muodostavaa yksikköä

1 JOHDANTO

Valkuaisomavaraisuus on tällä hetkellä kovasti tutkinnan alla. Valkuaisomavaraisuus kiinnostaa, koska Suomi on pitkälti valkuaisrehujen osalta tuonnin varassa ja valkuainen on kallis komponentti. Palkokasvit sitovat typpeä ilmasta ja vähentävät sitä kautta lannoitustarvetta (Nemecek 2008). Nurmipalkokasveista puna-apila on yleisin ja todettu Suomeen tuottavuudeltaan parhaiten sopivaksi (Wilkins 2001). Puna-apilapitoisella säilörehulla on suurempi tuotospotentiaali verrattuna nurmiheiniin (Johansen 2017).

Puna-apila on nurmipalkokasvi, joka sisältää enemmän valkuaista ja joitakin kivennäisaineita sekä sulamatonta neutraalidetergenttikuitua (iNDF), mutta vähemmän neutraalidetergenttikuitua (NDF) kuin heinänummikasvit (Luke 2017). Puna-apila on haastava säilöä sen suuren valkuaispitoisuuden ja puskurikapasiteetin vuoksi sekä pienen sokeri- ja kuiva-ainepitoisuuden takia (McDonald ym. 1991). Puna-apilan sulavuus heikkenee alkukesällä kasvin vanhenemisen myötä noin puolet hitaammin kuin heinänummikasvien sulavuus (Rinne 2000), mikä tuo joustavuutta sadonkorjuuseen.

Klostridit tulevat rehuun yleensä maaperästä ja ne selviävät melko happamissa olosuhteissa (McDonald ym. 1991). Pieni rehun kuiva-ainepitoisuus parantaa klostridien olosuhteita, varsinkin kun sokeripitoisuus yleensä laskee kuiva-ainepitoisuuden laskiessa (Pahlow 2003). Klostridit tuottavat säilörehuun epätoivottua voihappoa ja etanolia, jotka heikentävät rehun säilyvyyttä (McDonald 1991). Voihappo tulee myös ongelmaksi juuston valmistuksessa (Klijn ym. 1995).

Natriumnitriittiä ja natriumnitraattia on tutkittu ja käytetty paljon elintarvikkeiden säilönnässä. Natriumnitriittiä on käytetty säilörehun säilönnässä. Luontaisesti kasveissa on nitraattia vaihtelevia määriä. Nitraatti hajoaa säilönnän aikana ammoniakiksi, nitriitiksi ja typen oksideiksi (Spoelstra 1985). Nitriitti ja typpioksidi vaikuttavat ehkäisevästi klostridien kasvuun, mikä osaltaan edistää maitohappobakteerien toimintaa.

2 KATSAUS KIRJALLISUUTEEN

2.1 Säilörehu ja sen käymiseen vaikuttavat tekijät

Säilönnän tärkein tavoite on estää epätoivottujen mikro-organismien toiminta ja kasvu. Epätoivottuja mikro-organismeja ovat muun muassa klostridit ja enterobakteerit, jotka tuottavat epäsuotuisia fermentaatiotuotteita (McDonald ym. 1991). Maitohappo ja erityisesti haihtuvat rasvahapot, kuten etikkahappo ja voihappo, heikentävät rehun syöntiä ja siten tuotosvastetta lypsylehmien ruokinnassa (Huhtanen 2003).

Rehu voidaan säilöä kuivaamalla, jolloin suuri kuiva-ainepitoisuus itsessään ehkäisee haittamikrobien toimintaa (Pahlow ym. 2003). Yleisempi tapa on kuitenkin tehdä säilörehua. Säilörehun säilönnän tavoitteena on saada rehu korjattua nopeasti hapettomaan tilaan, jotta happi ei käynnistä aerobisten mikrobien toimintaa sekä mahdollistaa maitohappobakteerien toiminta. Hapettomissa oloissa maitohappobakteerit kasvavat nopeasti. Rehussa syntyvät haihtuvat rasvahapot estävät hiivoja ja homeita kasvamasta (Muck 2010).

Maitohappobakteerien tärkein tehtävä on tuottaa maitohappoa, mutta usein ne tuottavat myös etikkahappoa, hiilidioksidia ja etanolia (Muck 2010). Maitohappobakteerit jaetaan usein homofermentatiivisiin ja heterofermentatiivisiin sen mukaan mitä ne tuottavat glukoosista. Homofermentatiiviset tuottavat yhdestä glukoosimoolista kaksi moolia maitohappoa. Heterofermentatiiviset tuottavat yhdestä moolista glukoosia yhden moolin maitohappoa, yhden moolin hiilidioksidia ja yhden moolin joko etikkahappoa tai etanolia. Etikkahappo vähentää hiivoja ja homeita enemmän kuin pH:n lasku antaa ymmärtää. Estämällä homeiden ja hiivojen kasvua etikkahappo myös parantaa avatun siilon aerobista stabiilisuutta. Harvoin kuitenkaan rehun pH on niin pieni tai etikkahapon määrä niin suuri, että hiivojen ja homeiden kasvu estyy, kun rehu pääsee ilman kanssa tekemisiin (Muck 2010). Sen takia siilon avaamisen jälkeen, rehu olisi hyvä syöttää mahdollisimman nopeassa rytmissä.

Enterobakteerit kilpailevat sokerista maitohappobakteerien kanssa ja tuottavat etikkahappoa (Muck 2010). Hiivat kasvavat aerobisissa olosuhteissa ja käyttävät kasvuunsa maitohappoa ja sokereita. Maitohapon käyttäminen nostaa säilörehun pH:ta, mikä hel-

pottaa haittamikrobien kasvua. Enterobakteerit voivat vähentää rehun nitriitin, nitraatin tai typpioksidien määrää (Muck 2010).

Perinteinen tapa estää epätoivottujen mikro-organismien kasvua on laskea pH riittävän alas. Riittävän alhaisen pH:n raja riippuu rehun kuiva-ainepitoisuudesta. Vaikeinta pH:n lasku on niillä kasveilla, joilla on suuri puskurikapasiteetti (McDonald ym. 1991). Maitohappobakteerien luontainen pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (pmy) määrä rehus- sa vaihtelee suuresti, $10\text{-}10^6$ pmy/g tuoretta rehua (Pahlow 2003). Maitohappobakteerien määrää voi varmistaa lisäämällä rehuun maitohappobakteereita (Muck 2010). Säilöre- hun pH:lla ja kuiva-ainehävikillä on positiivinen korrelaatio, joten pieni pH vähentää kuiva-ainemenetyksiä. Alhaisesta kuiva-ainepitoisuudesta tulee myös kuiva- ainehävikkiä puristenesteen kautta. Maitohapon lisäys laskee pH:ta, mikä vähentää kui- va-ainetappiota, mutta samalla maitohapon määrä kertoo kuiva-ainehävikistä (Goeser 2015). Heterofermentatiivisessa maitohapon tuotossa syntyy kuiva-ainetappiota (Mc- Donald ym. 1991).

Puskurikapasiteetti kuvaa rehun kykyä vastustaa pH:n muutosta pH-välillä 6,0-4,0 Pus- kurikapasiteetti on valkuaiskasveilla suurempi verrattuna nurmiheinäkasveihin. Pusku- rikapasiteettiin vaikuttaa myös kasvin sisältämien orgaanisten happojen suolat, fosfori- happo, sulfaatti, nitraatti ja kloridit (Buxton ja O'Kiely 2003).

2.2 Puna-apila

Puna-apila on nurmipalkokasvi, joka sisältää enemmän raakavalkuaista ja joitakin ki- vennäisaineita, kuten kalsiumia ja magnesiumia verrattuna nurmiheiniin (Luke 2017). Puna-apilassa on vähemmän NDF:ää, mutta suhteessa enemmän iNDF:ää verrattuna nurmiheiniin. Apilan ruokinnallinen arvo laskee hitaammin kasvin vanhetessa ja naudat syövät enemmän apilaa kuiva-ainekiloina ilmaistuna verrattuna nurmiheiniin. Puna- apiloilla ja muilla palkokasveilla on suurempi tuotospotentiaali verrattuna nurmiheiniin (Johansen 2017). Erot kuidun laadussa ja pötsin virtausnopeudessa voivat selittää pa- remman syönnin ja sitä kautta paremman maitotuotoksen. Palkokasveissa on enemmän ligniiniä, mikä ei sula pötsissä (McDonald ym. 1991).

Vanhatalon ja Jaakkolan (2006) tekemän kirjallisuusyhteenvedon mukaan puna-apilan osuuden ollessa 30-70 % säilörehusta rehun syönti lisääntyi keskimäärin 1,3 kg ka / pv ja maitotuotos lisääntyi 1,4 kg/pv verrattuna heinänummisäilörehuun. Maidon rasva- ja valkuaispitoisuudet laskivat hieman verrattuna heinänummisäilörehuun. Puhtaan puna-apilasäilörehun syöttö ei välttämättä lisää heidän mukaansa säilörehun syöntiä, mutta lisää kuitenkin energiakorjattua maitotuotosta ja valkuaisuutosta.

Apiloissa on suurempi puskurikapasiteetti ja alhaisempi sokeripitoisuus verrattuna heinäkasveihin, mikä hankaloittaa apiloiden säilöntää ja lisää virhekäymisen riskiä (McDonald ym. 1991). Tämän vuoksi säilöntäaineella ja esikuivatuksella on merkittävä rooli apilasäilörehun säilönnässä. Apilan esikuivatus on kuitenkin haastavaa johtuen kasvin rakenteesta, vahva korsi kuivuu hitaasti ja samalla lehdet kuivuvat nopeasti, jolloin ne varisevat helposti. Kuivumisen pitkittyessä hengitystappioiden määrä kasvaa (Vanhatalo ja Jaakkola 2006).

2.3 Klostridit

Klostridit jaetaan kahteen eri luokkaa, sakkarolyyttisiin ja proteolyyttisiin (McDonald ym. 1991). Sakkarolyttiset bakteerit fermentoivat maitohappoa ja sokereita voihapoksi, mistä johtuu pH:n nousu. Proteolyttiset klostridit fermentoivat aminohappoja etikka-hapoksi, voihapoksi, amiineiksi ja ammoniakiksi.

Klostridit tulevat rehuun yleensä maaperästä itiömuodossa ja ne pärjäävät elinkelpoisina hapettomissa oloissa (McDonald ym. 1991). Klostridien vaikutukset alkavat rehussa sen jälkeen, kun maitohappobakteerien kasvu on päättynyt (Muck 2010). Klostridit kasvavat parhaiten pH:n ollessa 7,0 - 7,4 ja vasta pH:n ollessa 4,2 katsotaan klostridien kasvun pääsääntöisesti estyneen (McDonald ym. 1991). Myös kuiva-aineen ollessa suuri (yli 400 g/kg ka) katsotaan klostridien kasvun estyneen. Alhaisessa kuiva-aineessa klostridien kasvu on helpompaa ja kuiva-aineen ollessa alle 150 g/kg ei ehkä saavuteta niin hapanta ympäristöä, että klostridien kasvu estyisi. Kosteassa rehussa sokerin määrä on niin alainen, ettei riittävän hapanta ympäristöä saada maitohappokäymisellä (Pahlow 2003).

Pahlowin (2003) mukaan klostridien kontaminaatoriski saadaan hyvin matalaksi välttämällä rehunteossa maakosketusta. Siihen vaikuttavat muun muassa niittokorkeus, kar-

hoitus, pöyhintä ja maan pinnan tasaisuus sekä sääolosuhteet. Kuiva-ainepitoisuuden voidaan myös joissain tapauksissa vaikuttaa ja suuri kuiva-ainepitoisuus estää maan tarttumista jonkin verran kasvien pinnalle. Klostridien kasvua voi hillitä varmistamalla riittävän maitohapon määrän tai käyttämällä säilöntähappoa riittävän alhaisen pH:n varmistamiseksi (Pahlow 2003).

Klostridien saastuttaman rehun energia- ja kuiva-ainetappioiden ennustaminen perustuu yleensä voihamon ja ammoniakkin määrään rehussa. Molemmat kertovat mahdollisesti klostridien läsnäolosta, mutta suuri ammoniakkipitoisuus voi johtua myös kasvien entsyymiaktiivisuudesta tai enterobakteereista. Tyypillisessä klostridien saastuttamassa rehussa on korkea pH (yli 5, vaikka kuiva-aine olisi pieni), pieni maitohapon määrä, korkea voihamon määrä (yli 5 g/kg ka) ja suuri amiinien määrä. Rehun ruokinta-arvo ja maittavuus laskee korkean voihamon ja huonon säilyvyyden vuoksi (Pahlow 2003).

Rehun kautta klostridi-itiöt siirtyvät lehmän ruuansulatuskanavaan ja edelleen ulosteeseen. Jos lehmän utareet saastuvat ulosteella, voi itiöitä päästä maitoon saakka. Yleensä tämä voidaan estää hyvällä lypsyhygienialla. Klostridi-itiöt liikkuvat huonosti ilman välityksellä, joten yleensä aina maitoon tullut klostridikontaminaatio on utareen pinnalta. Lannan mukana klostridi-itiöt päätyvät peltoon, josta taas mahdollisesti rehun kautta lehmään. Lannan levittämisen jälkeen kannattaa pitää neljän viikon varoaika, jolloin klostridi-pitoisuus on yleensä laskenut samalle tasolle kuin kasvustoissa, joihin ei ole ajettu lantaa (Pahlow 2003).

Klostridien saastuttaman säilörehun tarjoaminen lypsylehmille voi tuoda ongelmia maidon jatkojalostuksessa juustoksi. Juustoihin tulee klostridien kasvun myötä helposti voihamonkäymistä, joka aiheuttaa koviin juustoihin isoja reikiä ja repeämiä (Klijn ym. 1995, Pahlow 2003)

Klostridit itsessäänkin voivat aiheuttaa eläimille terveyshaittoja, kuten *Clostridium botulinum* aiheuttaa botulismia eläimille, joka saattaa jopa tappaa (McDonald ym. 1991). *C.botulinum* tulee säilörehuun yleensä jonkin eläimen ruhon mukana, eivätkä itiöt yleensä lisäänty hyvin säilyneessä rehussa (Pahlow 2003). Suuri voihamonpitoisuus altistaa lehmää ketoosille (Muck 2010).

2.4 Natriumnitriitti NaNO_2

Kasveissa on luontaisesti nitraattia vaihtelevia määriä. Nitraatti hajoaa säilönnän aikana ammoniakiksi, nitriitiksi ja typen oksideiksi (Spoelstra 1985). Nitriitti ja typpioksidi vaikuttavat ehkäiseväsi klostridien kasvuun. Natriumnitriitin käyttö säilöntäaineena perustuu nitriitin haittamikrobien kasvua ehkäisevään vaikutukseen, mikä osaltaan edistää maitohappobakteerien toimintaa. Natriumnitriitti ei vaikuta maitohappobakteereihin, joten ne pääsevät laskemaan rehun pH:n (Hellberg 1967).

Natriumnitriittiä ja natriumnitraattia on tutkittu ja käytetty paljon elintarvikkeiden säilönnässä. Nitraatti on lähtökohtaisesti myrkyllistä. Naudoille nitraattimyrkytys on kuitenkin harvinainen (EFSA 2009).

Natriumnitriitti vaikuttaa suoraan aerobisiin ja anaerobisiin haittamikrobeihin, kuten klostrideihin, jolloin luonnolliset maitohappobakteerit saavat paremmat mahdollisuudet toimia ja säilöä rehua (Hellberg 1967, Woods 1981, Pahlow 2003). pH ei ole hyvä laatuksiteeri säilöittäessä natriumnitriitin ja heksamiinin seoksella, koska natriumnitriitti ja heksamiini vaikuttavat suoraan haittamikrobeihin (König 2016).

Typen oksidit haihtuvat yleensä ilmaan tai reagoivat säilörehun komponenttien kanssa, eikä niitä ole enää rehussa muutaman viikon jälkeen säilönnän alusta (Spoelstra 1985). Jos nitraatista muodostuu pääasiassa ammoniakkaa, se nostaa rehun pH:ta tai ainakin hidastaa sen laskua säilönnän aikana. Natriumnitriitin klostrideja estävän vaikutuksen katsotaan tulevan, kun tuoreessa rehussa se kiihdyttää nitraatin hajoamista nitriitiksi ja typpioksidiksi (Knicky 2007). Spoelstra (1983) huomasi tutkimuksessaan, että klostridi ei kasva niin kauan kuin nitraattia on rehussa ja ilman nitraattia rehun klostridien kasvu alkaa heti säilönnän jälkeen.

Natriumnitriitti soveltuu erityisesti korkean puskurikyvyn omaavalle rehulle, jossa on pieni kuiva-ainepitoisuus. Tällöin klostrideilla on hyvät olosuhteet omalle kasvulleen, mutta maitohappobakteereilla on haasteita pH:n laskemisessa haittamikrobien kasvua estävälle tasolle. Tässä tapauksessa nitriitti vaikuttaa suoraan haittamikrobeihin estäen niiden kasvua.

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää natriumnitriitin soveltuvuutta puna-apilasäilörehun säilöntään verrattuna muurahaishappoon tai painorehuun, kun rehu tehtiin kahdessa eri kuiva-ainepitoisuudessa. Puna-apilan haasteellisten säilöntäominaisuuksien vuoksi se on herkkä voihappokäymiselle. Voihappokäymistä estämään yritetään löytää mahdollinen ratkaisu natriumnitriitistä. Säilöntä tehtiin puhtaan nurmiraaka-aineen lisäksi klostrideilla kontaminoidulla raaka-aineella. Tämän avulla oli tarkoitus varmistaa, että rehussa oli riittävästi klostrideja voihappokäymiselle.

Tutkimukset hypoteesit olivat seuraavat: 1) säilöntäaineet parantavat rehun laatua ja vähentävät klostridien toimintaa ja voihappokäymistä 2) Natriumnitriitti on tehokkaampi klostridien estäjä kuin muurahaishappo.

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Koerehujen valmistus ja säilöntä

Säilöntäkoetta tehtiin Helsingin yliopiston maataloustieteiden laitoksella. Koerehut tehtiin Viikin opetus- ja tutkimustilan peltolohkolta Isoniitty 9.-11.8.2016. Kasvusto oli timotein (*Phleus prantence*), nurminadan (*Festuca patensis*) ja puna-apilan (*Trifolium pratense*) seosta. Lohko niitettiin niittomurskaimella (Krone EasyCut 3210 CV, Maschinenfabrik Bernard Krone GmbH, Spelle, Saksa) 9.8.2016 klo 13.30 ja klo 14.00 välillä. Seuraavan yön ja aamupäivän sadekuuroissa tuli vettä noin 3 mm. Tavoitteena oli esikuivata rehu kahteen kuiva-ainepitoisuuteen 200-250 g/kg (KA1) ja yli 300 g/kg (KA2). Kuivumisen seuraamiseksi karhoista otettiin kuivauksen aikana näytteitä, joista määritettiin pikamenetelmällä mikrossa kuiva-ainepitoisuus. Ensimmäinen koe-erä haettiin pellolta 10.8.2016 klo 11.45. Kuivatusajaksi muodostui noin 21 tuntia. Toinen erä haettiin pellolta sateen uhan vuoksi klo 18.00 ja laitettiin katoksen alle kuivumaan. Toinen erä kerättiin säilöttäväksi 11.8.2016 klo 11.00. Kuivatus aikaa toiselle erälle muodostui 45 tuntia.

Koe-erät silputtiin (Walter u. Wintersteiger KG, Ried im Innkreis, Itävalta), jonka jälkeen näytteet säilöttiin 1,5 litran laboratoriosiihoihin (Weck[®], Wher-Oflingen, Germany), jotka oli punnittu etukäteen. Silputtu rehuerä sekoitettiin hyvin, jonka jälkeen siitä punnittiin erikseen jokaiseen koesiihoon tarvittava rehumäärä. Ensimmäistä erää (KA1) laitettiin 900 g per siilo, eli 600 kg/m³. Rehun kuiva-ainepitoisuus oli 199 g/kg. Toisen erän (KA2) kuiva-ainepitoisuus oli 314 g/kg ja sitä laitettiin siihoihin 750 g per siilo, eli 500 kg/m³. Säilöntäaineina oli muurahaishappo ja natriumnitriitti, joita verrattiin painorehuun. Samat käsittelyt tehtiin sekä puhtaalle raaka-aineelle että *Clostridium tyrobutyricum* –mikrobilla kontaminoidulle raaka-aineelle.

Säilöntäkäsittelyiden yksityiskohdat olivat:

- 1) Ilman säilöntäainetta (painorehu, PR)
- 2) Muurahaishappo (80 % liuos), annostelu 4 litraa/1000 kg rehua 100 %:na muurahaishappona ilmaistuna (MH)
- 3) Natriumnitriitti, annostelu 900 g / 1000 kg rehua (NaNi)
- 4) Ilman säilöntäainetta (painorehu, PR) + *C. tyrobutyricum*, 1*10⁵ pmy/g rehua

- 5) Muurahaishappo (80 % liuos), annostelu 4 litraa / 1000 kg rehua 100 %:na muurahaishappona ilmaistuna (MH) + *Clostridium tyrobutyricum*, $1 \cdot 10^5$ pmy/g rehua
- 6) Natriumnitriitti, annostelu 900 g / 1000 kg rehua + *Clostridium tyrobutyricum*, $1 \cdot 10^5$ pmy/g rehua

Kaikki säilöntäaineet laimennettiin siten, että jokaisessa käsittelyssä nestemäärä (säilöntäaine + vesi) oli 10 g/kg rehua. Painorehuun lisättiin pelkkä vesi. Vesi ja säilöntäaine lisättiin siloa varten punnittuun rehuun pipetillä annostelleen ja samalla sekoittaen rehua. Kontaminoituihin rehuihin lisättiin ennen säilöntäainetta pipetillä klostridiliuosta rehua samalla sekoittaen

Jokaista säilöntäainekäsittelyä tehtiin neljä rinnakkaista siloa, eli yhteensä 24 siloa per säilörehuerä. Kuiva-aineen mukaan jaettuja säilörehueriä oli kaksi, joten yhteensä tuli 48 siloa. Tiivistetyt siilot suljettiin kumitiivistein, lasikannen ja kiinnityspidikkeen avulla. Siilot säilytettiin tasaisessa huoneenlämmössä ja pimeässä. Siilot avattiin kahdessa erässä 18.11.2016 (KA1 rehut) ja 1.12.2016 (KA2 rehut) niin, että keskimääräinen säilöntäaika oli 106 vuorokautta.

4.2. Näytteiden otto ja analysointi

Raaka-ainenäyte otettiin ennen laboratoriosilojen täyttämistä. Kaikki näytteet analysoitiin Helsingin yliopiston maataloustieteiden laitoksen laboratoriossa. Raaka-aineesta määritettiin heti primäärinen kuiva-aine. Lisäksi kuivattiin analyysinäyte, josta määritettiin myöhemmin tuhka, NDF ja *in vitro* -sulavuus. Lisäksi raaka-aineesta pakastettiin erikoisanalyysinäyte, puskurikapasiteettinäyte ja varanäyte. Erikoisanalyysinäytteestä tutkittiin kokonaistyyppi, liukoinen tyyppi ja pelkistävät sokerit. Lisäksi raaka-aineesta otettiin näyte mikrobiologisen tutkimukseen ja botaaniseen analyysiin.

Siilojen avauksen yhteydessä siilot punnittiin ilman kantta. Rehuista tehtiin pH-määrittys siiloja avatessa pH-mittarilla (SevenCompact™ S220, Mettler-Toledo Ltd, Leicester, Iso-Britannia). Samalla arvioitiin astinvaraisesti haju. Siiloista pakastettiin näytteet erikoisanalyysijä varten ja varanäyte. Lisäksi otettiin näyte mikrobiologisiin määrittäksiin. Erikoisanalyysinäytteistä määritettiin primäärinen kuiva-aine, tuhka, kokonaistyyppi, ammoniumtyppi, pelkistävät sokerit, maitohappo, haihtuvat rasvahapot (VFA) ja etanoli.

Raaka-aine- ja säilörehunäytteet kuivattiin tuulettavassa kuivauskaapissa (Memmert, Memmert GmbH, Schwabach, Saksa), ensin 103 °C:ssa tunnin ajan, jonka jälkeen 50 °C:ssa kahden vuorokauden ajan. Kuiva-ainemäärittäykseen näytteet kuivattiin samassa kaapissa 103 °C:ssa 20-24 tunnin ajan. Säilörehujen kuiva-ainepitoisuus korjattiin Huidan ym. (1986) korjauskaavalla. Tuhka määritettiin polttamalla näyte muhveliuunissa (Heraeus Thermicon T, Heraeus, Hanau, Saksa) 600 °C:ssa 20–24 h. Raakavalkuainen määritettiin Kjeldahl-menetelmällä (AOAC 1995), Tecator-polttolaitteella (Tecator Digestion Auto ja Tecator Scubber) ja tislauksen ja titrauslaitteistolla (FOSS Kjeltec Auto 2300, Foss, Hillerød, Tanska). Neutraalidetergenttikuitu määritettiin Van Soest'in ym. (1991) menetelmällä kuuma- ja kylmäuuttolaitteella (Tecator Fibertec System 1020/1021, Foss, Hillerød, Tanska) käyttäen natriumsulfaattia.

Maitohappo, ammoniakki-typpi, vesiliukoiset hiilihydraatit ja etanoli määritettiin kolorimetrisesti (Shimadzu UV-VIS mini 1240, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany) käyttäen maitohapolla Barker ja Summerson (1941) menetelmää ja ammoniakki-tyypellä McCulloughin (1967) menetelmää. Vesiliukoisten hiilihydraattien määrittämiseen käytettiin Salon (1965) ja Somogyin (1945) menetelmiä, etanolianalyyseissä käytettiin entsyymikittiä (cat. No 176290, R-Biopharm AG, Darmstadt, Saksa). D-arvon laskentaan käytettiin *in vitro* –sulavuuden perusteella laskettua sulavan orgaanisen aineen pitoisuutta kuiva-aineesta. Orgaanisen aineen *in vitro* –sulavuus määritettiin pepsini-sellulaasi-menetelmällä (Friedel 1990) käyttäen Nousiainen ym. (2003) muunnelmaa. *In vivo* –sulavuudeksi muutettaessa käytettiin Huhtasen ym. (2006) korjausyhtälöä. Haihtuvat rasvahapot määritettiin nestegromatografilla (Waters Acquity UPLC, Waters, Milford, MA, Yhdysvallat, kolonnina oli 186004097, Waters MassTrak AAA, Waters, Milford, MA, Yhdysvallat) Puhakan ym. (2016) kuvaamalla menetelmällä. Puskurikapasiteetti määritettiin Weissbachin (1992) menetelmällä. Lisäksi määritettiin neljä *Clostridium* lajia (*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes* and *C. perfringens*) Königin ym. (2019) kuvaamalla menetelmällä Maataloustieteiden laitoksella.

4.3 Aerobinen stabiilisuus

Aerobinen stabiilisuus määritettiin seuraamalla lämpötilan muutosta rehussa, kun se joutui ilman kanssa tekemisiin. Siilojen avauksen yhteydessä otettiin näyte, joka sijoitettiin muovipussiin styroxlaatikoon. Styroxlaatikon reijän kautta ilma pääsi pussiin,

jossa rehu oli. Rehumassan keskellä oli datalogger-laite (MicroLite, Fourier System/Dostmann electronic GmbH). Laatikot sijoitettiin huoneeseen, jossa lämpötila oli noin + 20 °C. Kolmella dataloggerilla seurattiin huoneen lämpötilaa. Rehujen lämpötilaa seurattiin 10 päivää. Lämpötilat kirjautuivat viiden minuutin välein dataloggereihin, joista tieto purettiin tietokoneelle suoraan USB-portin kautta. Aineistosta selvitettiin ajankohdat, jossa rehun ja huoneen lämpötila ero oli yli 2 °C.

4.4 Tulosten laskenta ja tilastolliset analyysit

Raaka-aineiden fermentaatiokerroin (FK) laskettiin puskurikapasiteetin (PK), vesiliukoisten hiilihydraattien (WSC) pitoisuuden ja kuiva-ainepitoisuuden (KA) avulla kaavalla $FK = KA (\%) + 8 * WSC/PK$ (Schmidt 1971).

Syönti-indeksi laskettiin Huhtasen ym. (2007) kaavalla $Syönti-indeksi = 100 + 10 \times [(D-arvo - 680) \times 0.017 - ((maitohappo + haihtuvat rasvahapot) - 80) \times 0.0128 + (0.0198 \times (kuiva-aine - 250) - 0.00002364 \times (kuiva-aine^2 - 250^2)) - 0.44 \times \text{jälkisäilörehun osuus} + 4.13 \times \text{palkokasvien osuus} - 2.58 \times \text{palkokasvien osuus}^2 + 5.90 \times \text{kokoviljasäilörehun osuus} - 6.14 \times \text{kokoviljasäilörehun osuus}^2 - 0.0023 \times (NDF-kuitu - 550)]$

Säilöntäaineen sisältäessä natriumnitriittiä ammoniakkipitoisuus korjattiin säilöntäaineessa lisätyn typen osalta olettaen, että kaikki lisätty typi muuttui ammoniumtypeksi. Tämän perusteella voidaan vertailla säilörehun valkuaisen hajoamista, eikä siihen lisättyjen typiyhdisteiden hajoamista.

Säilöntätulokset analysoitiin erikseen kahdelle kuiva-aineluokalle ANOVA:lla käyttäen SAS 9.3:n Mixed proseduuria (SAS 9.3, Institute Inc., Cary, NC). Käsittelyiden vertailu tehtiin käyttämällä seuraavia ortogonaalisia kontrasteja.

- 1) Klostridilisäyksen vaikutus rehuun
- 2) Säilöntäaineilla käsitellyt rehuja verrattiin painorehuun (MH ja NaNi vs PR)
- 3) Natrium-nitriitillä säilöttyjä rehuja verrattiin muurahaishapolla säilöttyihin rehuihin (NaNi vs MH)
- 4) Klostridi lisäyksen ja säilöntäaineen käytön yhdysvaikutus (1*2 yhdysvaikutus)
- 5) Klostridi lisäyksen ja säilöntäaine valinnan yhdysvaikutus (1*3 yhdysvaikutus)

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

Ei-normaalijakautuneet muuttujat testattiin Kruskal-Wallis ei-parametrisellä testillä (SPSS, versio 21, IBM, Armonk, USA) ja merkitsevät erot käsittelyiden välillä analysoitiin parittaisella keskiarvotestillä (Dunn-Bonferroni).

5 TULOKSET

5.1. Raaka-aine

Raaka-aineiden kuiva-ainepitoisuudet olivat 199 g/kg ja 314 g/kg, jotka olivat tavoitteen mukaiset (Taulukko 1). Vesiliukoisia hiilihydraatteja oli KA1:ssä 16,4 g/kg ja KA2:ssa 30,0 g/kg ilmaistuna tuoreesta rehusta. Puskurikapasiteetti oli hieman korkeampi KA1:ssä. Fermentaatiokerroin oli KA1:ssä 28,3 ja KA2:ssa 41,9. Klostrideja oli hieman enemmän KA1-säilörehussa (13,3 log kopiota/g tuoretta) tuorerehu grammaa kohden verrattuna KA2-rehuun (9,9 log kopiota/g tuoretta)

Taulukko 1. Raaka-aineen koostumus (g/kg kuiva-ainetta ellei toisin mainittu).

	Kuiva-aine 1	Kuiva-aine 2
Kuiva-aine, g/kg	199	314
Tuhka	88,3	83,3
Raakavalkuainen	188	177
Liukoinen-N, g/kg N	367	318
Neutraalidetergenttikuitu	459	467
Orgaanisen aineen sulavuus, g/kg OA	679	673
D-arvo	619	617
Vesiliukoiset hiilihydraatit (WSC)	82,6	95,7
Vesiliukoiset hiilihydraatit (WSC), g/kg	16,4	30,0
Nitraatti	4,0	4,0
Puskurikapasiteetti (PK)		
PK, mekv/kg ka	873	806
PK, maitohappoa, g/kg ka	78,6	72,6
Fermentaatiokerroin (FK)	28,3	41,9
Klostrideja yhteensä, log kopiota/g tuore	13,3	9,9

FK = KA (%) + 8* WSC/PK (Schmidt 1971). Mitä korkeampi fermentaatiokerroin on, sitä helpompi on rehu säilöä.

Botaanisen analyysin tulokseksi saatiin puna-apilaa 65,9 % kuiva-ainepitoisuudesta, timoteita ja nurminataa oli 31,1 % kuiva-ainepitoisuudesta ja rikkaruohoja 3 % kuiva-ainepitoisuudesta.

5.2 Kuiva-aine 1 säilörehu

Kuiva-ainepitoisuus vaihteli KA1-rehuissa 203 – 216 g/kg (Taulukko 2). Säilöntäaineella tehdyissä rehuissa kuiva-ainepitoisuus oli keskimäärin sama kuin painorehussa, kun rehua ei käsitelty klostridilla, mutta klostridikäsitellyissä rehuissa painorehun kuiva-ainepitoisuus oli suurempi (yhdyksvaikutus $P < 0,05$). NaNi-rehussa oli hieman suurempi kuiva-ainepitoisuus kuin muurahaishapolla säilötyssä rehuissa ($P < 0,001$).

Ei-parametrisen testin perusteella ilman klostridikäsittelyä tehdyn MH-rehun pH oli suurempi kuin klostridikäsitellyn MH-rehun ($P < 0,05$). Ammoniumtyypen osuus kokonaistypestä ja maitohapon pitoisuus oli säilöntäaineella säilöittäessä keskimäärin pienempi verrattuna painorehuun ($P < 0,001$). Samoin ammoniumtppi ja maitohappo olivat pienempiä muurahaishapolla säilöittäessä verrattuna natriumnitriittiin ($P < 0,001$). Klostridilisäys laski ammoniumtyypen ja maitohapon määrää ($P < 0,05$). Klostridilisäys myös nosti ammoniumtyypen pitoisuutta NaNi:lla säilöittäessä, mutta MH-rehuissa pitoisuus laski. Tämän seurauksena MH- ja NaNi-rehujen ero ammoniumtyypen osuudessa suureni klostridikäsittelyn yhteydessä (yhdyksvaikutus $P < 0,1$). Klostridikäsittelyn keskimääräiset vaikutukset olivat kuitenkin numeerisesti hyvin pieniä. Korjattu ammoniumtyypen osuus ei ollut normaalisti jakautunut. Parittaisen keskiarvovertailutestin mukaan klostridikäsitellyn MH-rehun korjattu ammoniumtyypen osuus oli pienempi kuin molempien painorehujen ($P < 0,05$).

Etikkahappopitoisuudet olivat selvästi alhaisemmat säilöntäaineella tehdyissä rehuissa verrattuna painorehuun ($P < 0,001$). MH-rehussa oli vähemmän etikkahappoa kuin NaNi-rehussa, mutta rehujen välinen ero etikkahapon pitoisuudessa oli suurempi, kun rehuun oli lisätty klostrideja, verrattuna ei klostrideja sisältävään (yhdyksvaikutus $P = 0,001$).

Myöskään sokerin, voiapon, etanolin ja klostridien pitoisuudet eivät olleet normaalisti jakaantuneita. Sokeripitoisuus oli molemmissa MH-rehuissa suurempi kuin käsittelemättömässä PR-rehussa ($P < 0,05$) ja käsittelemättömässä NaNi-rehussa oli vähemmän

sokeria kuin klostrideilla käsitellyssä MH-rehussa ($P < 0,05$). NaNi-rehut sisälsivät vähemmän etanolia kuin käsitelty MH-rehu ($P < 0,05$). Käsittelemätön NaNi-rehu sisälsi vähemmän etanolia kuin molemmat MH-rehut ($P < 0,05$). Klostridien määrä oli käsittelemättömissä rehuissa pienempi NaNi-rehussa kuin MH-rehussa ($P < 0,05$). Klostridien määrä rehussa oli suunnilleen sama, riippumatta siitä oliko rehuun lisätty säilöntä vaiheessa klostrideja vai ei. Aerobisen stabiilisuuden mittauksessa kaikkien rehujen lämpötilat pysyivät vakaana koko seurantajakson ajan.

Taulukko 2 Säilöntäaine- ja klostridilisäyksen vaikutus rehujen käymislaatuun ja klostridipitoisuuteen kuiva-aineen 1 rehuissa.

Säilöntäaine	Ei klostrideja			Klostridit			SEM	Tilastollinen merkitsevyys				
	PR	MH	NaNi	PR	MH	NaNi		Klostr	PR vs SA	MH vs NaNi	1*2 yhd	1*3 yhd
Kuiva-aine, g/kg	211	205	216	214	203	209	0,18	0,189	0,009	<0,001	0,016	0,262
pH	4,08 ^{ab}	4,15 ^b	4,04 ^{ab}	4,08 ^{ab}	4,01 ^a	4,06 ^{ab}	0,026					
Ammonium-N, g/kg	86,0	50,8	73,5	76,0	41,2	75,5	2,88	0,023	<0,001	<0,001	0,225	0,058
Korj Amm-N, g/kg	86,0 ^b	50,8 ^{ab}	44,6 ^{ab}	76,0 ^b	41,2 ^a	45,2 ^{ab}	2,87					
Vesiliukoiset hiilihydraatit	3,2 ^a	86,7 ^{bc}	3,9 ^{ab}	5,4 ^{abc}	93,7 ^c	4,7 ^{abc}	3,10					
Maitohappo	136	26	139	131	21	133	2,6	0,027	<0,001	<0,001	0,794	0,861
Etikkahappo	36,3	10,6	34,8	35,8	7,4	37,9	0,77	0,740	<0,001	<0,001	0,703	0,001
Voihappo	0,0	4,7	0,0	0,0	0,7	0,0	1,75					
Etanoli	3,3 ^{abc}	5,0 ^{bc}	1,2 ^a	3,2 ^{abc}	5,8 ^c	1,5 ^{ab}	0,53					
Klostrideja yhteensä, log kopiota/g tuore	10,4 ^{ab}	11,2 ^a	10,2 ^b	10,3 ^{ab}	10,7 ^{ab}	10,4 ^{ab}	0,29					
Syönti-indeksi	89	106	89	90	107	89						

PR=Painorehu, MH=Muurahaishapporehu, NaNi=Natriumnitriitillä säilötty rehu, Korj.Amm-N=Korjattu ammoniakkipitoisuus, säilöntäaineen sisältäessä natriumnitriittiä ammoniakkipitoisuus korjattiin säilöntäaineen lisätyn osalta. Keskiarvot on merkitty eri kirjaimilla, jos merkitsevyys $P < 0,05$ ei-parametrisessä testissä. Syönti-indeksi Huhtanen ym. (2007)

Taulukko 3 Säilöntäaine- ja klostridilisäyksen vaikutus rehujen käymislaatuun ja klostridipitoisuuteen kuiva-aineen 2 rehuissa.

Säilöntäaine	Ei klostrideja			Klostridit			SEM	Tilastollinen merkitsevyys				
	PR	MH	NaNi	PR	MH	NaNi		Klostr	PR vs SA	MH vs NaNi	1*2 yhd	1*3 yhd
Kuiva-aine, g/kg	327	328	336	317	316	314	0,45	0,001	0,758	0,536	0,408	0,307
pH	4,14 ^{abc}	4,21 ^c	4,11 ^{ab}	4,11 ^{ab}	4,18 ^{bc}	4,09 ^a	0,009					
Ammonium-N, g/kg	72,1	47,7	63,4	71,4	50,4	68,1	1,02	0,014	<0,001	<0,001	0,022	0,331
Korj Amm-N, g/kg	72,1	47,7	44,8	71,4	50,4	47,2	0,94	0,073	<0,001	0,005	0,062	0,855
Vesiliukoiset hiilihydraatit	14,1 ^a	84,1 ^c	17,8 ^{abc}	14,1 ^{ab}	74,6 ^{bc}	19,7 ^{abc}	2,32					
Maitohappo	114 ^{abc}	35 ^a	109 ^{abc}	122 ^c	38 ^{ab}	111 ^{abc}	2,5					
Etikkahappo	27,1	8,2	23,2	26,0	9,7	25,0	0,70	0,222	<0,001	<0,001	0,038	0,837
Voihappo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00					
Etanoli	3,2 ^{abc}	3,1 ^{abc}	0,9 ^a	4,1 ^c	3,8 ^{bc}	1,1 ^{ab}	0,23					
Klostrideja yhteensä, log kopiota/g tuore	10,4	10,8	10,5	10,3	11,9	11,8	0,82	0,254	0,225	0,839	0,389	0,867
Syönti-indeksi	101	114	102	100	113	102						

PR=Painorehu, MH=Muurahaishapporehu, NaNi=Natriumnitriitillä säilötty rehu, Korj.Amm-N=Korjattu ammoniakkipitoisuus, säilöntäaineen sisältäessä natriumnitriittiä ammoniakkipitoisuus korjattiin säilöntäaineen lisätyn osalta. Keskiarvot on merkitty eri kirjaimilla, jos merkitsevyys $P < 0,05$ ei-parametrisessä testissä. Syönti-indeksi Huhtanen ym. (2007)

5.3. Kuiva-aine 2 säilörehu

KA 2-rehuissa kuiva-ainepitoisuus vaihteli 314-336 g/kg välillä ja klostridikäsitellyissä rehuissa kuiva-ainepitoisuus oli pienempi kuin käsittelemättömissä rehuissa ($P<0,001$). pH oli molemmissa MH-rehuissa suurempi kuin vastaavassa NaNi-rehussa ($P<0,05$). Käsittelemättömässä MH-rehussa oli suurempi pH kuin käsitellyssä PR-rehussa ja NaNi-rehussa ($P<0,05$).

Ammoniumtyypeä ja korjattua ammoniumtyypeä oli vähemmän säilöntäaineella säilötyissä rehuissa kuin painorehussa ($P<0,001$). Korjaamatonta ammoniumtyypeä oli MH-rehuissa vähemmän kuin NaNi-rehuissa ($P<0,001$), mutta korjattua ammoniumtyypeä oli enemmän MH-rehuissa kuin NaNi-rehuissa ($P<0,01$). Sekä ammoniumtypen että korjatun ammoniumtypen erotus säilöntäaineella käsiteltyjen rehujen ja PR-rehun välillä kapeni klostridilisäyksen myötä. Klostridikäsitellyissä rehuissa säilöntäaineella käsiteltyjen ammoniumtypen osuus nousi verrattuna käsittelemättömiin, painorehussa taas klostridikäsittely hieman laski ammoniumtypen määrää (yhdyksvaikutus $P = 0,062$). Keskimäärin klostridilisäys nosti suuntaa-antavasti ammoniumtypen ja korjatun ammoniumtypen määrää ($P<0,1$).

Sokeripitoisuus ei ollut normaalisti jakautunut. Molemmissa MH-rehuissa oli selvästi suurempi sokeripitoisuus kuin käsittelemättömässä PR-rehussa ($P<0,05$). Samoin käsittelemättömässä MH-rehussa oli suurempi sokeripitoisuus kuin klostrideilla käsitellyssä PR-rehussa ($P<0,05$).

Maitohapon ja etanolin pitoisuudet eivät olleet normaalisti jakautuneita. MH-rehuissa oli pienempi maitohapon määrä kuin klostrideilla käsitellyssä PR-rehussa. NaNi-rehuissa oli pienempi etanolin määrä kuin klostrideilla käsitellyssä PR-rehussa. Lisäksi käsittelemättömässä NaNi-rehussa oli alhaisempi etanolin määrä kuin klostridi käsitellyssä MH-rehussa ($P<0,05$). Etikkahapon määrä oli MH-rehuissa selvästi pienempi kuin NaNi-käsitellyissä ($P<0,001$). Etikkahapon määrä laski painorehussa, kun klostridia lisättiin, säilöntäaineella käsitellyissä rehuissa etikkahapon määrä taas nousi klostridien lisäyksen jälkeen (yhdyksvaikutus $P<0,05$).

Klostridien määrässä ei ollut merkitseviä eroja, ei edes sen mukaan oliko niitä lisätty säilönnän yhteydessä. Aerobinen stabiilisuus pysyi kaikissa rehuissa vakaana koko seurantaajan ajan.

6 TULOSTEN TARKASTELU

6.1. Raaka-aine

Botaanisen analyysin perusteella raaka-aineesta 66 % kuiva-aineesta oli puna-apilaa ja 31 % nurmiheiniä sekä loput rikkoja. Puna-apilan melko suuri osuus näkyy koostumustuloksissa. Säilönnän kannalta tärkeimmät ominaisuudet säilörehun raaka-aineessa ovat sokeripitoisuus, kuiva-ainepitoisuus ja puskurikapasiteetti, joista lasketaan fermentaatiokerroin (Schmidt 1971). Sokeripitoisuus oli raaka-aineessa 82,6 - 95,7 g/kg ka, joten ero KA1- ja KA2-rehujen välillä oli sokeripitoisuuden osalta melko pieni. Yleensä esikuivatuksessa sokeripitoisuus hieman laskee, kun se ilmaistaan pitoisuutena kuiva-aineesta. Niitosta 24 tunnin kuluttua voidaan menettää jopa 50 % kasvin sokeripitoisuudesta hengityksen mukana, jos kasvi pääsee hapen kanssa tekemisiin ja sokeripitoisuus on pieni jo lähtökohtaisesti (Pettersson ja Lindgren 1990). Sokeripitoisuus voi vaihdella kasvilajeittain ja vuorokauden ajankohdan mukaan paljonkin, yleensä sokeria on aurin-gonlaskun aikaan enemmän kuin aamulla (Fisher 1999).

Esikuivatussa rehussa on usein enemmän sokeria verrattuna tuoreeseen, jos sokeripitoisuus ilmaistaan tuorekiloa kohti, koska sokeri konsentroituu rehussa veden määrän vähentyessä. Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen (EFSA 2006) mukaan rehu on helposti säilöttävää, jos sen sokeripitoisuus on yli 30 g/kg, jos sokeripitoisuus on 15 – 30 g/kg se luokitellaan kohtalaisen vaikeaksi säilöä ja sokeripitoisuuden ollessa alle 15 g/kg on rehu vaikeasti säilöttävää. Tässä kokeessa KA1-rehussa sokeripitoisuus tuoreessa oli 16,4 g, joten se on kohtalaisen vaikea säilöä. KA2-rehussa sokeripitoisuus oli 30,0 g/kg, joten se on juuri helposti säilöttävän rajalla.

KA1-raaka-aineessa oli klostrideja enemmän kuin KA2:ssa (13,3, vs 9,9 log kopiota/g tuoretta). Kuiva-aineesta ilmaistuna KA1-rehussa oli huomattavasti enemmän klostrideja kuin KA2:ssa (67 vs 32 log kopiota/g ka). Kuiva-ainepitoisuuden ollessa 400 g/kg klostridien kasvun katsotaan estyvän ja alle 150 g/kg pitoisuudessa katsotaan klostridien

kasvun estämisen olevan erityisen vaikeaa (McDonald ym. 1991). KA1-rehuissa kuiva-ainepitoisuus oli 199 g/kg, joten se on hieman haastava klostridien kasvun ehkäisemisen kannalta. KA2-rehussa kuiva-ainepitoisuus oli 314 g/kg, joten se on helpohko säilöä ilman klostridien kasvua.

Myöhäisessä kehitysvaiheessa korjatussa rehussa kuiva-ainepitoisuus on suurempi ja puskurikapasiteetti pienempi kuin nuoremassa kasvustossa (Buxton ja O’Kiely 2003). D-arvosta päätellen kasvusto oli hieman vanhaa, mutta kuiva-ainepitoisuus oli silti pieni ja puskurikapasiteetti suuri. Pieni kuiva-ainepitoisuus saattaa johtua sateisesta säästä. Puskurikapasiteetti oli melko suuri raaka-aineessa, 806-873 mekv/kg ka. Kingin ym. (2012) kokeissa puna-apilan puskurikapasiteetti on ollut 552-639 mekv/kg ka. Suuri puskurikapasiteetti saattaa johtua suuresta raakavalkuaisen määrästä.

Fermentaatiokerroin yhdistää kuiva-ainepitoisuuden, puskurikapasiteetin ja sokerin määrien vaikutuksen säilöttävyyteen. Mitä suurempi fermentaatiokerroin on, sitä helpompi on rehua säilöä. Fermentaatiokertoimen ollessa yli 45 on rehu helposti säilöttävää. Fermentaatiokertoimen ollessa alle 27 on voi happokäyminen todennäköistä ilman säilöntäainetta (Pahlow ym. 2002). KA1-rehussa fermentaatiokerroin oli 28,3, joten sen säilöntä voi olla melko vaikeaa. KA2-rehuissa fermentaatiokerroin oli 41,9, joten sen säilyminen hyvänä on melko todennäköistä ilman säilöntäainettakin. Wieringan (1966) mukaan rehuun, joka sisältää 4-8 g/kg ka nitraattia, ei muodostu voi happea säilönnän aikana. Jos nitraattia on enemmän tai vähemmän riski voi hapon muodostukselle on. Tässä tutkimuksessa nitraattia oli 4,0 g/kg ka, mikä jo itsessään estää voi hapon muodostusta.

Raakavalkuaista oli raaka-aineessa 177-188 g/kg ka, mikä on melko tyypillinen raakavalkuaispitoisuus puna-apilasäilörehulle (Luke 2017). Myös tuhka- ja NDF-pitoisuudet olivat melko tyypilliset puna-apilasäilörehulle (Luke 2017). Säilöntäaika oli 106 vuorokautta, mitä voidaan pitää riittävänä. Pahlow ym. (2003) mukaan säilörehun fermentaatiiovaihe voi kestää yli kuukauden.

6.2 Säilörehut

Raaka-aineessa oli ilmeisesti klostrideja niin paljon, että lisäyksellä ei ollut tuloksen kannalta merkittävää vaikutusta. Tilastollisessa analyysissä klostridilisäys vaikutti merkittävästi vain muutamiin käymisparametreihin. Myös pienten numeeristen erojen perusteella voitiin olettaa, ettei klostridilisäyksellä ollut vaikutusta kokeen tuloksiin.

Molemmissa kuiva-aineluokissa rehujen kuiva-ainepitoisuuksien erot olivat niin pieniä, etteivät ne vaikuttaneet käymistuloksiin. Molemmissa kuiva-aineluokissa kaikkien säilöntäkäsittelyiden keskimääräinen pH oli yli neljän. Kuiva-aineessa 1 klostrideilla käsittelemättömässä MH-rehussa pH oli suurehko, 4,15, suhteessa kuiva-ainepitoisuuteen. MH-rehussa oli toisaalta ammoniakkia vähemmän kuin muissa rehuissa. Ammoniakki yleensä nostaa pH:ta (McDonald ym. 1991), joten se ei tässä ollut syynä numeeriseen pH-eroon MH-rehun ja muiden rehujen välillä. Kuiva-aineen 2 MH-rehuissa pH oli suurempi kuin NaNi:lla käsitellyissä. Toisaalta suurempi kuiva-ainepitoisuuden omaava säilörehu ei vaadi yhtä alhaista pH:ta kuin alhaisemman kuiva-ainepitoisuuden omaava säilörehu.

Kungin ym. (2003) mukaan muurahaishappo laskee rehun pH:ta, vähentää maitohapon, etikkahapon, voihapon ja ammoniumtyypen määrää, mutta samalla saattaa lisätä etanolin määrää verrattuna painorehuun. Muurahaishappo myös säästää rehun sokereita, jos käymistuotteiden määrä vähenee (Jaakkola ym. 2006). Muurahaishapon annostaso vaikuttaa erityisesti alhaisen kuiva-ainepitoisuuden rehussa selvästi käymisen voimakkuuteen ja sitä kautta sokereiden, ja käymistuotteiden määrään (Jaakkola ym. 2006). Tässä kokeessa pH ei laskenut klostrideilla käsittelemättömässä MH-rehussa painorehun pH:ta alemmas, mutta maitohapon, etikkahapon ja ammoniumtyypen määrä MH-rehuissa oli pienempi kuin painorehuissa. Sokereiden määrä oli myös MH-rehussa painorehua suurempi sekä kuiva-ainepitoisuudessa 1 että kuiva-ainepitoisuudessa 2. Etanolin määrä MH-rehussa oli NaNi-rehuun verrattuna numeerisesti suurempi vain kuiva-aine 1:sen rehussa. Voihappoa sen sijaan oli vain muurahaishapolla säilötyssä rehussa kuiva-ainepitoisuudessa 1. Etikkahappoa muodostui PR- ja NaNi- rehuihin todennäköisesti heterofermentatiivisten maitohappobakteerien tai enterobakteerien tuottamana (McDonald 1991).

Etanolia tuottavat säilörehuun enterobakteerit, hiivat, heterofermentatiiviset maitohappobakteerit ja proteolyttiset klostridit (Pahlow ym. 2003). Kaiserin ym. (2005) mukaan pelkkä matala pH ei riitä ehkäisemään alhaisen kuiva-ainepitoisuuden rehussa klostridien kasvua, vaan tarvitaan suoraan klostridien kasvua inhiboiva tekijää, kuten kuiva-ainepitoisuuden nostoa tai nitraattia. MH-rehuissa klostridien määrä oli numeerisesti suurin ja käsittelemättömässä MH-rehussa KA1-rehuissa klostrideja oli tilastollisesti merkitsevästi enemmän kuin NaNi-rehussa. Kuiva-ainepitoisuudessa 2 MH-rehujen klostridien kasvua on todennäköisesti hillinnyt suurempi kuiva-ainepitoisuus, jota kautta myös säilöntäaineen annostaso on ollut sopivampi.

Voihappoa esiintyi vain kuiva-ainepitoisuudessa 1 muurahaishapolla säilötyessä ja määrällisesti enemmän siinä MH-rehussa, johon ei ollut lisätty klostrideja. Mahdollisesti kuiva-ainepitoisuudessa 1 MH-rehussa pH:n lasku ei ollut riittävä säilönnän alussa, jolloin se esti maitohappobakteerien toiminnan, mutta ei laskenut pH:ta niin alas, että klostridien kasvu olisi estynyt. Luontainen nitraattipitoisuus ei ilmeisesti ollut riittävä MH-rehuissa, tai se ei ole hajonnut säilönnässä nitriitiksi. PR- ja NaNi-rehuissa oli ilmeisesti ollut käytettävissä riittävästi sokeria ja niissä muodostui nopeasti paljon maitohappoa, mikä laski pH:n alas, jolloin klostridien kasvu estyi ja voihappoa ei rehuun muodostunut. Lähtökohtaisesti olosuhteet olivat klostrideille epäsuotuisat, joten itiöt eivät muuttuneet vegetatiiviseen muotoon, joka olisi tuottanut voihappoa. NaNi-rehuissa nitriitti todennäköisesti myös esti suoranaisesti klostridien toiminnan yhdessä luontaisen nitraatin kanssa. Raaka-aineen pienestä fermentaatiokertoimesta huolimatta voihappoa ei muodostunut ollenkaan NaNi- tai PR-rehuihin. König ym. (2017 ja 2019) ovat tutkimuksissaan päässeet siihen tulokseen, että natriumnitriitti estää voihappokäymistä paremmin erityisesti pienen kuiva-ainepitoisuuden rehuissa verrattuna painorehuun tai muurahaishapolla säilöttyyn rehuun.

Muurahaishapolla säilötyissä rehussa on joskus ollut suurempi pH ja enemmän etikkahappoa ja etanolia kuin biologisella säilötyssä säilörehussa (Henderson 1982, Kung 2003). Tämä on todennäköisesti liittynyt muurahaishapon liian pieneen annostukseen, koska aina näin ei käy. Muurahaishappoa annosteltiin mahdollisesti liian vähän KA1-rehuun. Pieni annostus heikentää maitohappobakteerien toimintaa, mutta ei vastaavasti välttämättä mikro-organismeja, jotka tuottavat etikkahappoa ja etanolia (McDonald ym. 1991). Tässäkin tutkimuksessa saattoi muurahaishapon annostelu olla liian pieni suh-

teessa kuiva-ainepitoisuuteen ja puskurikapasiteettiin. Muurahaishappo oli kuitenkin estänyt maitohappobakteerien toimintaa, mutta pH ei ehkä ollut laskenut riittävän nopeasti niin alas, että klostridien toiminta olisi suoranaisesti pysähtynyt. Tutkimuksessa etikkahapon määrä oli pienin MH-rehuissa ja samaan tulokseen ovat päässeet Jaakkola ym. (2006).

PR- ja NaNi-rehuissa oli melko paljon maitohappoa. Nämä määrät saattavat heikentää rehujen vapaaehtoista syöntiä (Huhtanen ym. 2008). Huhtasen ym. (2007) kaavalla laskettujen syönti-indeksien mukaan MH-rehu on syönti-indeksipisteiltään noin 17 pistettä parempaa kuiva-ainepitoisuudessa 1 ja kuiva-ainepitoisuudessa 2 noin 14 pistettä parempaa kuin painorehu tai natriumnitriitillä säilötty. Piste-erot vastaavat karkeasti noin 1,7 kg ja 1,4 kg suurempaa MH-säilörehun kuiva-aineen syöntiä muihin verrattuna.

Maitohappoa oli määrällisesti runsaasti pienestä jäännössokeripitoisuudesta huolimatta PR- ja NaNi-rehuissa ja pH:t olivat hyvällä tasolla. Jos raaka-aineessa olisi ollut enemmän sokeria, olisi PR- ja NaNi-rehut mahdollisesti käyneet vielä enemmän. Ilman säilöntäainetta säilötyssä raaka-aineessa tulisi olla sokeria 25-30 g/kg, jotta voidaan varmistua säilönnän onnistumisesta (Wilkinson ym. 1983, Pettersson 1988, ref. Jaakkola 2006). Maitohappoa oli suhteessa etikkahappoon kuitenkin runsaasti PR- ja NaNi-rehuissa, joten käyminen on ollut pääasiassa toivottua maitohappokäymistä. Määrällisesti NaNi-rehuissa kuiva-ainepitoisuudessa 2 oli enemmän sokeria, kuin PR-rehuissa.

PR-rehuissa ammoniakkipitoisuus oli suurehko. Hitaasti laskeva pH lisää riskiä suureen ammoniakkipitoisuuteen (McDonald 1991). Todennäköisesti NaNi-rehuissa nitriitti oli estänyt sokereista kilpailevia haittamikrobeja, kuten klostrideja, toimimasta, jolloin maitohappobakteerit olivat päässeet tehokkaammin toimimaan ja tuottamaan maitohappoa nopeammin verrattuna painorehuun. MH-rehuissa muurahaishappo itsessään laskee pH:n nopeasti alas, jolloin valkuaista säästyy. MH-rehuissa korjattu ammoniakkipitoisuus oli suurempi kuin NaNi-rehuissa. NaNi-rehuissa oli laskennallisesti oletettu, että kaikki lisätty typpi oli muuttunut ammoniakiksi, mutta jos näin ei olekaan todellisuudessa käynyt, voi tuo korjattu arvo olla suurempi kuin nyt esitetty.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää natriumnitriitin soveltuvuutta puna-apilasäilörehun säilöntään verrattuna muurahaishappoon tai painorehuun. Puna-apilan altistuminen voihappokäymiselle pyrittiin varmistamaan klostridikontaminaatiolla raaka-aineeseen.

Raaka-aine oli melko tyypillistä puna-apilasäilörehua, sisältäen 66 % puna-apilaa ja 31 % nurmiheiniä kuiva-aineessa. Raakavalkuais- ja NDF-pitoisuudet vastasivat myös tyypillistä puna-apilapitoista rehua. Fermentaatiokerroin, kuiva-ainepitoisuus ja sokeripitoisuus olivat alhaiset kuiva-aine 1 raaka-aineissa, mikä teki säilönnästä haastavan ja kokeeseen sopivan. Puskurikapasiteetti oli molemmissa raaka-aineissa suuri. Kuiva-ainepitoisuuden 2 raaka-aineen säilöntä oli arvojen perusteella helpompaa, kuten oli tarkoituskin. Klostrideja löytyi raaka-aineesta enemmän kuin ennakoita oletettiin. Sen vuoksi lisätyllä klostridikontaminaatiolla ei ollut merkitystä, eikä selviä eroja kontaminoidun ja ei-kontaminoidun välille saatu.

Kuiva-ainepitoisuudessa 1 MH-rehuissa muurahaishapon annostelu oli mahdollisesti liian pieni suhteessa kuiva-ainepitoisuuteen. Siitä seurasi voihappokäymistä ja enemmän etanolia kuin natriumnitriitillä säilötyssä rehussa. Säilönnän alussa pH ei todennäköisesti laskenut riittävän alas MH-rehussa verrattuna natriumnitriitillä säilöttyyn rehuun. Natriumnitriitillä säilöittäessä etanolin määrä oli pieni ja voihappoa ei esiintynyt, josta voidaan päätellä natriumnitriitin hypoteesin mukaisesti estäneen klostridien kasvua tehokkaammin kuin muurahaishappo. Myöskään painorehusta ei löytynyt voihappoa, mikä kertoo kohtalaisen hyvistä säilöntäolosuhteista. Kuiva-ainepitoisuudessa 2 raaka-aineen luontainen nitraattipitoisuus oli todennäköisesti riittävä estämään voihappokäymistä kaikissa rehuissa. Aerobinen stabiilisuus oli kaikissa rehuissa hyvä.

Tutkimuksen perusteella natriumnitriitti soveltuu säilörehun säilöntään ja laskee klostridien aiheuttamaa voihappokäymisen riskiä pienen kuiva-ainepitoisuuden säilörehussa verrattuna muurahaishapolla säilöttyyn rehuun. Siihen viittaavat myös muut tutkimukset. Asia vaatii kuitenkin vielä lisätutkimusta.

LÄHTEET

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

Buxton, D. R. & O’Kiely, P. 2003. Preharvest plant factors affecting ensiling. Teoksessa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.). *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. s. 199-250.

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) 2009. Nitrite as undesirable substances in animal feed[1] - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain.

EFSA. The European Food Safety Authority. 2006. Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed for the establishment of guidelines on the assessment of safety and efficacy of silage additives, on a request from the Commission under Article 7(5) of Regulation (EC) No 1831/2003. *The EFSA Journal* 349:1-10.

Fisher, D. S., Mayland, H. F. & Burns, J. C. 1999. Variation in Ruminants' Preference for Tall Fescue Hays Cut Either at Sundown or at Sunup. *Journal of Animal Science* 77: 762-768.

Friedel, K. 1990. Die Schätzung des energetischen Futterwertes von Grobfutter mit Hilfe einer Cellulasemethode. [The estimation of the energetic feeding value of roughages by means of a cellulase method]. *Wissenschaftliche Zeitung Universität Rostock, N-Reihe* 39: 78–86.

Goeser, J. P., Heuer, C. R. & Crump, P. M. 2015. Forage fermentation product measures are related to dry matter loss through meta-analysis. *Professional Animal Scientist* 31: 137-145.

Hellberg, A. 1967. A combination of nitrite and hexamine as an additive in the ensiling of herbage. *Grass and Forage Science* 22: 289-297.

Henderson, A., McDonald, P. & Anderson D. 1982. *Animal Feed Science and Technology* 7: 303-14 ref. McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J., Morgan, C., Sinclair, L. & Wilkinson, R. 2011. *Animal Nutrition*. 7. painos. 714 s.

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

Huhtanen, P., Nousiainen, J. & Rinne, M. 2006. Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. *Agricultural and Food Science* 15: 293–323.

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

Huhtanen, P., Rinne, M. & Nousiainen, J. 2008. Evaluation of concentrate factors affecting silage intake of dairy cows: a development of the relative total diet intake index. *Animal* 2: 942-953.

Huida, L., Väätäinen, H., Lampila, M. 1986. Comparison of dry matter contents in grass silages as determined by oven drying and gas chromatographic water analysis. *Annales Agriculturae Fenniae* 25: 215–230.

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

Johansen, M., Lund, P. & Weisbjerg, M. R. 2018. Feed intake and milk production in dairy cows fed different grass and legume species: a meta-analysis. *Animal* 12: 66-75.

Kaiser, E., Weiss, K. & Polip, I. V. 2005. New results on inhibition of clostridia development in silages. Teoksessa: Dark, R. S. & Stronge, M. D. (toim.). *Silage Production and Utilisation. Proceedings of the XIVth International Silage conference, a satellite workshop of the XXth International Grassland Congress, July 2005, Belfast, Northern Ireland.* s. 213.

King, C., McEniry, J. & O'Kiely, P. 2012. A note on the fermentation characteristics of red clover silage in response to advancing stage of maturity in the primary growth. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 51: 79-84.

Klijn, N., Nieuwenhof, F. F. J., Hoolwerf, J. D., Van der Waals, C. B. & Weerkamp, A. H. 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2919-2924.

Knický, M. & Lingvall, P. 2004. Ensiling of high wilted grass-clover mixture by use of different additives to improve quality. *Acta Agriculturae Scandinavica - Section A: Animal Science* 54: 197-205.

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

König, W., König, E., Weiss, K., Tuomivirta, T., Fritze, H., Elo, K., Vanhatalo, S. & Jaakkola, S. 2019. Impact of hexamine addition to a nitrite-based additive on fermentation quality, Clostridia and *Saccharomyces cerevisiae* in a white lupin-wheat silage. *J. Sci Food Agric* 99: 1492-1500

König, W., Lamminen, M., Weiss, K., Tuomivirta, T. T., Sanz Muñoz, S., Fritze, H., Elo, K., Puhakka, L., Vanhatalo, A. & Jaakkola, S. 2017. The effect of additives on the quality of white lupin-wheat silage assessed by fermentation pattern and qPCR quantification of clostridia. *Grass and Forage Science* 72: 1-15

Luke 2017. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset. Luonnonvarakeskus. [viitattu 05.05.2018]. Saatavissa: <http://www.luke.fi/rehutaulukot>.

McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17: 297–304.

McDonald, P., Henderson, A. R. & Heron, S. J. E. 1991. *The biochemistry of silage*. 2nd edition. Chalcombe Publications, Marlow, UK. p. 340

McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J., Morgan, C., Sinclair, L. & Wilkinson, R. 2011. *Animal Nutrition*. 7.painos. 714s.

Muck, R. E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39: 183-191.

Nemecek, T., von Richthofen, J.-S., Dubois, G., Casta, P., Charles, R. & Pahl, H. 2008. Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *European Journal of Agronomy* 28: 380-393.

Nousiainen, J., Rinne, M., Hellämäki, M. & Huhtanen, P. 2003. Prediction of the digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stages of maturity from chemical composition and pepsin-cellulase solubility. *Animal Feed Science and Technology* 103: 97–111.

Pahlow, G., Slotter, D., Rammer, D. & Tuori, M. 2002. Ensiling of legumes. *Landbauforschung Völkenrode Sonderheft* 234: 27-31

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

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

Puhakka, L., S. Jaakkola, I. Simpura, T. Kokkonen and A. Vanhatalo. 2016. Effects of replacing rapeseed meal with fava bean at 2 concentrate crude protein levels on feed intake, nutrient digestion, and milk production in cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 99: 7993-8006.

Rinne, M. 2000. Influence of the timing of the harvest of primary grass growth on herbage quality and subsequent digestion and performance in the ruminant animal. *Helsingin yliopiston kotieläintieteen laitoksen julkaisuja* 54: 42 p. + 5 encl. Diss.: Helsinki: Helsingin yliopisto, 2000. (Väitöskirja).

Salo, M.-L. 1965. Determination of carbohydrate fractions in animal foods and faeces. *Acta Agraria Fennica* 105: 1–102.

Schmidt, L., Weissbach, F., Wernecke, K.-D. & Hein, E. 1971. Erarbeitung von Parametern für die Vorhersage und Steuerung des Gärverlaufes bei der Grünfuttersilierung. *Forschungsbericht, Oskar-Kellner-Institut für Tierernährung, Rostock.*

Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61–68.

Spoelstra, S. F. 1983. Inhibition of clostridial growth by nitrate during the early phase of silage fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34: 145-152

Spoelstra, S. F. 1985. Nitrate in Silage. *Grass and Forage Science* 40: 1-11.

Vanhatalo, A. & Jaakkola, S. 2006. Onko puna-apilassa potentiaalia? *Maataloustieteenpäivät 2006.*

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583–3597.

Weissbach, F. 1992. Determination of the buffering capacity. *Internal Report. Institute of Grassland and Forage Research, Braunschweig.* 3 s.

Wieringa GW. The influence of nitrate on silage fermentation. in Proceedings of the 10th International Grassland Congress, Valtioneuvoston Kirjapaino, Helsinki, pp.537–540 (1966).

Wilkins, R.J. 2001. Why forage legumes?. Nurmipalkokasvien tuotanto ja käyttömahdollisuudet. Professori Liisa Syrjälä-Qvistin juhlaseminaari 1.11.2001. p. 10-13.

Woods, L., Wood, J. & Gibbs, P. 1981. The Involvement of Nitric Oxide in the Inhibition of the Phosphoroclastic System in *Clostridium sporogenes* by Sodium Nitrite. Microbiology 125: 399-406.