
ЗООТЕХНИЯ, БИОЛОГИЯ И ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА

**Влияние штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis*
на микробиоту и питательность силоса из злаково-бобовой травосмеси**

**Лариса Александровна Ильина^{1,2✉}, Иван Григорьевич Малахов¹,
Василий Александрович Заикин², Георгий Юрьевич Лаптев^{1,2},
Виталий Юрьевич Морозов¹, Сергей Павлович Скларов¹**

¹Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, Санкт-Петербург, Россия

²ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург, Россия

✉ Автор, ответственный за переписку: ilina@biotrof.ru

Аннотация

Силосование является процессом консервирования кормов, качество которых во многом определяется микробиологическими процессами. При неблагоприятных условиях заготовки, высокой исходной влажности растительного сырья, несоблюдении технологии вместо молочнокислых бактерий могут развиваться энтеробактерии, клостридии и другие виды, которые снижают питательную ценность и качество готового корма. Цель исследований заключалась в изучении влияния новых штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis* в качестве биоконсервантов на микробиоту и питательность силоса из злаково-бобовой растительной массы. В эксперименте оценивали внесение в силосуемую массу штамма *Enterococcus faecium* 46 и комбинации штаммов *Enterococcus faecium* 46 и *Bacillus subtilis* 18 в сравнении с контрольным вариантом без консерванта. Показатели питательности силоса и состав микробиоты определяли на 30-е сутки ферментации растительной массы. Наилучшие результаты по количеству сухого вещества, нейтрально-детергентной клетчатке и доле молочной кислоты в сумме кислот были продемонстрированы при совместном использовании штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis*. По результатам оценки микробиоты методом количественной ПЦР в данном опытном варианте детектировано наиболее высокое количество бактерий рода *Lactobacillus* и меньшее количество представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp. Полученные результаты свидетельствуют о том, что синергетическое воздействие штаммов при консервировании корма позволило затормозить развитие гнилостных и патогенных токсинообразующих бактерий благодаря усиленному синтезу молочной кислоты. На основании полученных результатов можно заключить о высокой перспективе комплекса бактерий для улучшения ферментации, сохранности питательных веществ в консервированных кормах.

Ключевые слова

Силос, злаково-бобовая растительная масса, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, микробиота силоса, биоконсерванты, питательность кормов

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23–16–20007 и гранта Санкт-Петербургского научного фонда № 23–16–20007 «Разработка комплексного биотехнологического подхода для биологической защиты КРС и продукции животноводства от патогенных бактерий и их токсинов».

Для цитирования

Ильина Л.А., Малахов И.Г., Заикин В.А., Лаптев Г.Ю. и др. Влияние новых штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis* на микробиоту и питательность силоса из злаково-бобовой травосмеси // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2025. № 6. С. 174–191.

LIVESTOCK BREEDING, BIOLOGY AND VETERINARY MEDICINE

Effect of *Enterococcus faecium* and *Bacillus subtilis* strains on the microbiota and nutritional value of grass-legume silage

Larisa A. Ilina^{1,2}✉, Ivan G. Malakhov¹, Vasily A. Zaikin², Georgy Yu. Laptev^{1,2}, Vitaly Yu. Morozov¹, Sergey P. Sklyarov¹

¹ Saint-Petersburg State Agrarian University, Saint Petersburg, Russia

² BIOTROF, OOO, Saint Petersburg, Russia

✉ Corresponding author: ilina@biotrof.ru

Abstract

Ensiling is a feed preservation process the quality of which is largely determined by microbiological processes. Under unfavorable harvesting conditions, high initial moisture content of the plant material, or non-compliance with technology, undesirable microorganisms such as enterobacteria, clostridia, and other species may proliferate instead of lactic acid bacteria. This proliferation degrades the nutritional value and quality of the finished feed. The aim of the present study was to investigate the effect of new strains of *Enterococcus faecium* and *Bacillus subtilis*, employed as biopreservatives, on the microbiota and nutritional value of grass-legume silage. The experiment evaluated the inoculation of ensiled biomass with *Enterococcus faecium* 46 and a combination of *Enterococcus faecium* 46 and *Bacillus subtilis* 18, in comparison to a control treatment without a preservative. Silage nutritional parameters and microbiota composition were determined on the 30th day of plant mass fermentation. The most favorable results regarding dry matter content, neutral detergent fiber, and the proportion of lactic acid in total organic acids were observed with the combined application of *Enterococcus faecium* and *Bacillus subtilis* strains. Microbiota assessment via quantitative PCR in this experimental variant revealed the highest abundance of *Lactobacillus* species and a reduced count of *Enterobacteriaceae* family representatives, including *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., and *Citrobacter* sp. These findings suggest that the synergistic action of these strains during feed preservation effectively inhibited the development of putrefactive and pathogenic toxin-forming bacteria due to enhanced lactic acid synthesis. Based on these results, we conclude that this bacterial complex holds significant promise for improving fermentation and nutrient preservation in ensiled forages.

Keywords

Silage, grass-legume biomass, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, silage microbiota, biopreservatives, feed nutritional value

Acknowledgments

The research was funded by the Russian Science Foundation, grant No. 23–16–20007, and by the St. Petersburg Science Foundation, grant No. 23–16–20007 “Development of an integrated biotechnological approach for biological protection of cattle and livestock products from pathogenic bacteria and their toxins”.

For citation

Ilina L.A., Malakhov I.G., Zaikin V.A., Laptev G.Yu. et al. Effect of *Enterococcus faecium* and *Bacillus subtilis* strains on the microbiota and nutritional value of grass-legume silage. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2025. No. 6. P. 174–191.

Введение Introduction

Силосование растительного сырья является основным биологическим методом его сохранения [1]. В норме консервация достигается за счет быстрого снижения pH среды, которое обеспечивается при помощи молочнокислых бактерий. Эпифитные молочнокислые бактерии утилизируют простые углеводы, содержащиеся в силосованных растениях, и метаболизируют их до молочной кислоты, в меньшей степени – до уксусной кислоты, что предотвращает порчу силоса и позволяет ему храниться длительное время [2]. При нормальном развитии процессов силосования получается качественный и безопасный корм для животных. Однако при нарушении процессов, когда закисление среды происходит недостаточно быстро, начинают размножаться патогенные и условно-патогенные микроорганизмы [3]. Плохо приготовленный или загрязненный силос может содержать патогенные микроорганизмы, которые снижают продуктивность животных, вызывают болезни крупного рогатого скота [4] и представляют угрозу для здоровья человека [5, 6].

Корма обычно заражаются патогенами при внесении на поля навоза в качестве удобрения или вследствие переноса через почву во время сбора урожая [7]. Согласно современным представлениям, крупный рогатый скот является основным резервуаром некоторых патогенных микроорганизмов – таких, как *Escherichia coli* O157:H7 [8], которые могут попадать в навозные отстойники с навозом крупного рогатого скота и впоследствии попадать на сельскохозяйственные культуры. Сообщалось, что корма обычно заражаются патогенами при внесении на поля навоза в качестве удобрения или вследствие переноса через почву во время сбора урожая [9]. Тем не менее информация о присутствии клостридий в консервированных кормах из различных кормовых культур является преимущественно разрозненной. Следовательно, силос, как и другие корма для скота, может быть важным средством передачи возбудителей болезней на ферме [4]. Наиболее распространенными патогенными микроорганизмами, обнаруживаемыми в силосе, являются *Escherichia coli*, особенно *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. и *Clostridium* sp. [9]. Существуют отдельные исследования, подтверждающие переход бактериальных токсинов в молоко [10].

Состав и численность эпифитной бактериальной микрофлоры на силосованном растительном сырье недостаточны для инициации образования молочной кислоты присутствующими молочнокислыми бактериями. Естественные популяции молочнокислых бактерий на растительном материале часто являются гетероферментативными и малочисленными [5]. Для получения силоса хорошего качества и высокой усвояемости кормов необходима направленная коррекция процесса силосования добавлением различных препаратов. На практике рекомендуется использование консервантов, особенно для силосования зеленых кормов с низким содержанием моно-, ди- и олигосахаридов, высоким содержанием белка и буферной емкостью.

Ожидаемые изменения в процессе силосования с использованием микробных добавок, содержащих молочнокислые бактерии, включают в себя преобладание этих микроорганизмов в процессе ферментации, увеличение отношения молочной кислоты к другим продуктам ферментации (например, уксусной кислоте, этанолу), более быстрое снижение pH, снижение протеолиза и увеличение восстановления сухого вещества [11]. Сочетание *Lactobacillus buchneri* с *Lactobacillus plantarum* может способствовать повышению синтеза уксусной кислоты, что позитивно влияет на аэробную стабильность силоса [12]. Бациллы, благодаря своим высоким антимикробным свойствам и высокой выживаемости в окружающей среде, являются перспективными для регуляции микробиологических процессов в ходе консервирования кормов.

Цель исследований: изучение влияния биологических штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis* на микробиоту силоса из злаково-бобовых культур.

Методика исследований

Research method

Для оценки консервирующего действия штаммов микроорганизмов был проведен модельный лабораторный эксперимент по консервированию злаково-бобовой массы первого укоса, собранной в период бутонизации. В исследовании были использованы штаммы *Bacillus subtilis* 18 и *Enterococcus faecium* 46, выделенные на предыдущем этапе исследований из злаково-бобового силоса. Опыт проводили в 3-х повторностях: 1 вариант (без консервантов); 2 вариант (штаммы *Enterococcus faecium* 46); 3 вариант (штамм *Enterococcus faecium* 46 + *Bacillus subtilis* 18). Количество каждого штамма для консервирования кормов использовали из следующего расчета: 1 мл препарата (содержит $1 \cdot 10^8$ КОЕ/г бактериального штамма), расходуется на обработку 30 кг зеленой массы.

Консервирование кормов проводили с использованием вакуумных пакетов. Зеленую массу растений весом 1 кг закладывали в пакеты, затем из них откачивали воздух при одновременном запаивании пакета с помощью вакуумного упаковщика бескамерного Lava V.333 Premium. Полученную таким образом спрессованную в безвоздушном пространстве массу хранили при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. На 30-е сутки пакеты с кормом вскрывали и отбирали образцы для исследований показателей качества и микробиологического состава.

Биохимический состав растительной массы и кормов из нее определяли в соответствии с «Физико-химическими методами анализа кормов» [13]. В образцах корма определяли следующие показатели: массовую долю сухого вещества, сырого протеина, сырого жира, сырой клетчатки, КДК (кислотно-детергентная клетчатка), НДК (нейтрально-детергентная клетчатка). Уровень активной кислотности (pH) определяли в соответствии с ГОСТ 26180–84, массовые доли молочной, уксусной и масляной кислоты – по ГОСТ Р 55986–2022.

Для молекулярно-генетических исследований отбор проб проводили с максимально возможным при данных методах соблюдением условий асептики. Образцы были заморожены (-20°C) и переданы на сухом льду в лабораторию.

Для исследования состава микробиоты из образцов консервированных кормов выделяли тотальную ДНК с использованием набора Genomic DNA Purification Kit («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США) согласно прилагаемой инструкции. Реакции амплификации проводили с использованием специфических праймеров на амплификаторе DT-Light («ДНК-Технология», Россия) согласно следующим условиям амплификации: 3 мин при $+94^\circ\text{C}$ (предварительный прогрев); 40 с при $+94^\circ\text{C}$; 60 с при $+55^\circ\text{C}$; 90 с при $+72^\circ\text{C}$ (34 цикла); $+72^\circ\text{C}$ – 5 мин. Фрагменты ДНК визуализировали методом гель электрофореза в агарозном геле, используя трис-ацетатный буфер, после чего проводили фотофиксацию результатов.

Последовательности использованных праймеров (5'-3') для детекции бактерий и дрожжей представлены в таблице 1. Подбор праймеров осуществлялся с использованием базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Математическую и статистическую обработку результатов осуществляли в программе Microsoft Office Excel 2019. Достоверность различий устанавливали по t-критерию Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Результаты исследований в таблицах представлены в формате «Среднее значение \pm стандартная ошибка среднего» (Mean \pm SEM).

Таблица 1

Последовательности праймеров для анализа микроорганизмов

Table 1

Primer sequences for microbial analysis

Микроорганизм	Последовательности праймеров
<i>Lactobacillus</i> sp.	5'- AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'
<i>Bifidobacterium</i> sp.	5- CTCCTGGAAACGGGTGG –3 5- GGTGTTCTTCCCGATATCTACA –3
<i>Streptococcus</i> sp.	5'-ATTTCTGTAACAGCTACCAACGA-3' 5'-GAATCCCTGTCTTTCAAAGTC-3'
<i>Bacteroides</i> sp.	5'-GAGAGGAAGGTCCCCCAC-3' 5'-CGCTACTTGGCTGGTTCAG-3'
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	5- CCATGAATTGCCTTCAAACTGTT –3 5- GAGCCTCAGCGTCAGTTGGT –3
<i>Acinetobacter</i> sp.	5'-TCTTGGTGGTCACTTGAAGC-3' 5'-ACTCTTGTGGTTGTGGAGCA-3'
<i>Enterobacter</i> sp.	5'-CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC –3' 5'-CTCTACGAGACTCAAGCTTGC-3'
<i>Escherichia coli</i>	5'-TGATTGGCAAAATCTGGCCG-3' 5'-GAAATCGCCCAAATCGCCAT-3'
<i>Klebsiella</i> sp.	5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3' 5'- CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'
<i>Citrobacter</i> sp.	5'-CTC ACG CCC TGG CAA GGT TT-3' 5'-CTT TTG CCC TAG CTG CGG T-3'
<i>Proteus vulgaris/mirabilis</i>	5'-ACTACCCATCAGATTATGTCAT-3' 5'-CTGTTTGAGGAAAATGCAATTTA-3'

Результаты и их обсуждение**Results and discussion**

В наших исследованиях была поставлена цель изучения влияния бактериальных штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis* на структуру микробного сообщества готового силоса.

Результаты анализа биохимических показателей качества готового силоса из злаково-бобовой растительной массы на 30-е сутки после хранения в анаэробных условиях представлены в таблице 2. Было установлено, что использование бактериальных штаммов приводило к повышению ряда показателей качества силоса по сравнению с контрольным образцом без консервантов.

Таблица 2

**Результаты оценки показателей качества силоса из злаково-бобовой смеси
на 30-е сутки при использовании бактериальных штаммов**

Table 2

**Results of the evaluation of silage quality parameters
from grass-legume mixture on the 30th day using bacterial strains**

Показатель	Контроль	<i>Enterococcus faecium</i> 46	<i>Enterococcus faecium</i> 46 и <i>Bacillus subtilis</i> 18
pH	4,37±0,03 ^a	4,58±0,04 ^b	4,45±0,01 ^c
Обменная энергия, МДж/кг	8,98±0,04 ^a	8,92±0,51 ^a	9,00±0,20 ^a
Массовая доля сухого вещества, %	22,61±0,45 ^a	21,32±0,52 ^a	26,05±0,07 ^b
Массовая доля сырого протеина, %	16,90±0,40 ^a	16,34±0,34 ^a	16,27±0,47 ^a
Массовая доля сырого жира, %	4,11±0,04 ^a	4,08±0,06 ^a	3,92±0,13 ^a
Массовая доля сырой клетчатки, %	31,4±0,98 ^a	31,5±1,61 ^a	30,4±0,62 ^a
Кислотно-детергентная клетчатка, %	36,7±0,70 ^a	35,7±0,47 ^a	35,0±1,51 ^a
Нейтрально-детергентная клетчатка, %	59,7±0,92 ^a	60,6±1,26 ^a	56,2±0,48 ^b
Массовая доля молочной кислоты в общем количестве кислот, %	68,61±0,87 ^a	68,60±0,64 ^a	72,42±0,80 ^b
Массовая доля молочной кислоты, %	1,92±0,07 ^a	1,64±0,09 ^a	2,46±0,14 ^b
Массовая доля масляной кислоты, %	0±0,01 ^a	0,04±0,02 ^a	0,04±0,01 ^a
Массовая доля уксусной кислоты, %	0,88±0,04 ^a	0,71±0,03 ^b	0,90±0,06 ^a

Примечание. Значения а-с для показателей указывают на достоверные отличия между вариантами при $p \leq 0,05$.

Установлено, что наибольшие показатели обменной энергии и сухого вещества ($p \leq 0,05$) были достигнуты при использовании для консервирования кормов композиции штаммов бактерий *Enterococcus faecium* 46 и *Bacillus subtilis* 18. Известно, что на питательность силоса могут оказывать влияние следующие факторы: вид используемых растений, фаза уборки, период и сроки заготовки, сезонные и погодные условия, применение минеральной подкормки. В наших исследованиях применение смеси бактериальных штаммов в ходе процессов ферментации при консервировании кормов, очевидно, способствовало наилучшей сохранности сухого вещества, количество которого превышало данный показатель на 15,3–22,3% ($p \leq 0,05$) по сравнению с другими вариантами.

По содержанию сырого протеина, сырого жира, сырой клетчатки и КДК полученные корма достоверной разницы не имели. При этом применение для консервирования силоса композиции штаммов *Enterococcus faecium* 46 и *Bacillus subtilis* 18 приводило к достоверному снижению НДК (нейтрально-детергентной клетчатки) на 6,2% ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем, включающей в себя такие структурные компоненты

растительных клеток, как гемицеллюлоза, целлюлоза и лигнин. Снижение количества НДК в силосе может способствовать повышению его переваримости животными.

Известно, что процесс сохранения питательных веществ и энергии силоса основывается на быстром снижении pH в ходе ферментации. В течение 30 дней консервирования кормов при благоприятных условиях содержание молочной кислоты значительно нарастает, что свидетельствует о быстром и контролируемом процессе силосования.

В нашем эксперименте наиболее сильное подкисление корма было отмечено в варианте при использовании в качестве консервантов комплекса штаммов бактерий *Enterococcus faecium* 46 и *Bacillus subtilis* 18) и в контрольном варианте. Снижение pH силоса во время ферментации в основном связано с образованием органических кислот, прежде всего – молочной кислоты. Как показано в таблице 2, процентное отношение молочной кислоты в доле других кислоты было наиболее высоким в варианте 3 (смесь штаммов бактерий *Enterococcus faecium* 46 и *Bacillus subtilis* 18). Интересно, что в контрольном варианте и варианте с применением комплекса штаммов, где pH была наиболее низкой, количество уксусной кислоты достоверно (при $p \leq 0,05$) превышало показатели варианта с использованием штамма *Enterococcus faecium*.

Очевидно, наблюдаемое усиление синтеза молочной кислоты в силосе под влиянием композиции штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis* способствовало заметному ускорению подкисления растительной массы, на что указывает достоверно более высокое сохранение питательных веществ в силосе, о чем свидетельствует количество в нем сухого вещества и обменной энергии.

С применением метода количественной ПЦР была изучена представленность в консервированном корме некоторых групп микроорганизмов (табл. 3). Судя по результатам исследований, применение используемых штаммов оказало различное влияние на состав микробиоты готового корма.

Основной группой микроорганизмов в силосе во всех вариантах были молочнокислые бактерии. В наших исследованиях лактобактерии рода *Lactobacillus* детектировались в количестве от $4,0 \times 10^{11} \pm 1,1 \times 10^{11}$ экв.геном/г (контроль) до $1,0 \times 10^{12} \pm 7,5 \times 10^{11}$ экв.геном/г (вариант со штаммом *Enterococcus faecium*) в силосе. Достоверного изменения количества лактобактерий между группами не выявлено, однако в опытных вариантах с применением бактериальных штаммов в качестве консервантов наблюдалось повышение представленности в готовых кормах бактерий данного рода в 1,5–2,5 раза по сравнению с контролем. Доминирование молочнокислых бактерий в фазы основного брожения и покоя при соблюдении технологии закладки и хранения растительного субстрата связано с их устойчивостью к уровню pH до 3,0–3,5, что делает их крайне конкурентоспособными в условиях силосной экосистемы.

Количество бифидобактерий, также способных к биосинтезу органических кислот, составляло от $6,2 \times 10^8 \pm 3,3 \times 10^7$ до $7,3 \times 10^8 \pm 4,0 \times 10^7$ экв.геном/г растительной массы и не имело достоверных отличий между вариантами. Представленность стрептококков рода *Streptococcus* sp. варьировала в зависимости от группы. В варианте без применения консервантов их численность составляла $4,2 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^5$, тогда как в остальных вариантах их количество было ниже (предела достоверного определения методов количественной ПЦР (ниже 10^3 экв.геном/г растительной массы)).

Также в образцах готового силоса были выявлены бактерии рода *Bacteroides*, которые относятся к нежелательным микроорганизмам в консервированных кормах, поскольку они могут снижать питательную ценность корма за счет гидролиза сложных макромолекулярных органических веществ – таких, как деградация углеводов, до моносахаридов. В наших исследованиях бактероиды были выявлены в низких количествах, достоверной разницы между вариантами не обнаружено. Наименьшая

представленность бактероидов выявлена в опытном варианте с *Enterococcus faecium* ($9,2 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^6$ экв.геном/г растительной массы).

В образцах силоса всех вариантов нами были детектированы различные представители семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Proteus vulgaris/mirabilis*. По современным представлениям, данные микроорганизмы являются основными компонентами эпифитной микробиоты растений и при неблагоприятных условиях консервирования кормов могут занимать доминирующее положение в составе микробиоты готового силоса. В наших исследованиях представленность различных таксонов семейства *Enterobacteriaceae* была невысокой во всех вариантах. В частности, наиболее представленной группой данного семейства были бактерии рода *Enterobacter*, количество которых варьировало в пределах $4,3 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^6$ до $1,6 \times 10^8 \pm 2,1 \times 10^7$ экв.геном/г растительной массы, и группа *Proteus vulgaris/mirabilis*, количество которых варьировало в пределах $7,4 \times 10^7 \pm 5,1 \times 10^6$ до $2,2 \times 10^8 \pm 4,1 \times 10^7$ экв.геном/г растительной массы в зависимости от образца. Наименее представленными в образцах готового силоса были бактерии вида *Escherichia coli* и *Klebsiella* sp.

Наименьшее количество *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. и *Citrobacter* sp. детектировано в варианте, где для консервирования растительной массы использовалась смесь штаммов *Enterococcus faecium* 46 и *Bacillus subtilis* 18.

Таблица 3

Количество бактерий в силосе из злаково-бобовой смеси на 30-е сутки при использовании бактериальных штаммов, экв.геном/г растительной массы

Table 3

Bacterial count in grass-legume silage on the 30th day using bacterial strains, genome equivalents/g of plant mass

Микроорганизм	Контроль	<i>Enterococcus faecium</i> 46	<i>Enterococcus faecium</i> 46 и <i>Bacillus subtilis</i> 18
<i>Lactobacillus</i> sp.	$4,0 \times 10^{11} \pm 1,1 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^{12} \pm 7,5 \times 10^{11}$	$6,2 \times 10^{11} \pm 9,1 \times 10^{10}$
<i>Bifidobacterium</i> sp.	$7,1 \times 10^8 \pm 4,3 \times 10^7$	$6,2 \times 10^8 \pm 3,3 \times 10^7$	$7,3 \times 10^8 \pm 4,0 \times 10^7$
<i>Streptococcus</i> spp.	$4,2 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^5$	—	—
<i>Bacteroides</i> sp.	$9,4 \times 10^7 \pm 2,0 \times 10^6$	$9,2 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^8 \pm 2,2 \times 10^7$
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$4,2 \times 10^5 \pm 3,9 \times 10^4$	—	$1,1 \times 10^6 \pm 6,4 \times 10^4$
<i>Acinetobacter</i> spp.	$6,1 \times 10^9 \pm 8,7 \times 10^7$	$7,4 \times 10^9 \pm 1,4 \times 10^8$	$6,6 \times 10^9 \pm 2,0 \times 10^8$
<i>Enterobacter</i> spp.	$4,3 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^8 \pm 2,1 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^6$
<i>Escherichia coli</i>	$7,3 \times 10^6 \pm 2,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^7 \pm 4,2 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6 \pm 8,8 \times 10^4$
<i>Klebsiella</i> sp.	$3,3 \times 10^6 \pm 1,8 \times 10^5$	$7,1 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6 \pm 9,1 \times 10^4$
<i>Citrobacter</i> sp.	$2,1 \times 10^7 \pm 7,5 \times 10^5$	$7,0 \times 10^7 \pm 3,2 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7 \pm 6,8 \times 10^5$
<i>Proteus vulgaris/mirabilis</i>	$7,4 \times 10^7 \pm 5,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^8 \pm 4,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8 \pm 4,2 \times 10^7$

Силосование является сложным микробиологическим процессом, на который влияет эпифитная микрофлора, присутствующая на кормовых культурах в ходе вегетации. В составе эпифитной микробиоты и микрофлоры силоса обитает около 300–600 видов бактерий [5, 12]. Так, на надземных органах кормовых культур, выявляются, в частности, патогенные микроорганизмы, а ведущую роль играют молочнокислые бактерии, которые синтезируют молочную кислоту в качестве основного метаболита, тем самым подкисляя силос до необходимого уровня pH и предотвращая развитие нежелательной микрофлоры, которая снижает качество силоса. Состав и количественное соотношение микроорганизмов в процессе ферментации силосного субстрата значительно отличаются от микробиоты кормового травостоя в период вегетации. Это связано с тем, что резкая смена значений сукцессионных агентов (окислительно-восстановительного потенциала, температуры, влажности, уровня pH, порой достигающего экстремальных величин, и др.) определяет уникальность таксономического разнообразия микробиоценоза, крайне гетерогенного и динамичного. При этом силосная экосистема является искусственно созданной, непрерывно изменяющейся и подвергающейся антропогенному прессу, что делает ее уникальной микробиоэкологической нишей. Для нее характерны весьма сложные внутренние связи и специфические закономерности динамики.

Таким образом, выполняя анализ бактерий с использованием культуральных методов, можно узнать о присутствии основных видов микроорганизмов (бактерий, грибов, дрожжей), влияющих на процесс силосования [5].

Качество силоса является результатом деятельности микробного сообщества, участвующего на всех этапах ферментации, а также их метаболитов [14]. Процесс ферментации определяет качество и количество заготовленного корма. Сбор силосованных кормов при надлежащей влажности и стадии зрелости, быстрое заполнение, правильная упаковка и покрытие силоса напрямую влияют на процесс ферментации. Среди других важных факторов, которые оказывают влияние на качество ферментации, – влажность исходного сырья и содержание в нем растворимых углеводов [15]. При высокой исходной влажности растительного сырья при силосовании может стимулироваться рост нежелательных и патогенных микроорганизмов, что снижает качество силоса [16].

В данных исследованиях с использованием молекулярно-генетического анализа количественной ПЦР нами был изучен состав микроорганизмов при силосовании злаково-бобовой смеси под воздействием бактериальных штаммов – консервантов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis*. Интересно, что показатели pH готового силоса на 30-е сутки хранения несколько превышали показатель контрольного варианта, где не использовали бактериальных штаммов в качестве биоконсервантов. Однако применение композиции штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis* для консервирования растительной массы способствовало образованию достоверно ($p \leq 0,05$) более высокой процентной доли молочной кислоты. Полученные данные свидетельствуют об оптимизации процессов брожения при консервировании корма под действием препаратов, что обеспечивало достоверное ($p \leq 0,05$) повышение сохранности сухого вещества по сравнению с контролем. Одновременно в данном опытно-варианте нами отмечено достоверно меньшее количество НДК ($p \leq 0,05$) по сравнению с другими вариантами. Нейтрально-детергентная клетчатка состоит из фракций целлюлозы и гемицеллюлозы, связанных с лигнином, что препятствует их ферментации в рубце [17]. Сообщалось, что снижение содержания НДК в рационе может оказывать позитивное влияние на усвоение энергии коровами [18, 19].

Сохранение питательных веществ силоса при применении штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis* в наших исследованиях могло быть обусловлено оптимизацией процессов ферментации в ходе консервирования, связанных с образованием в силосе более высокого количества молочной кислоты при снижении представленности других – уксусной и масляной. Известно, что молочная кислота, доля которой достигала максимального количества при использовании для силосования корма композиции штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis*, подавляет размножение нежелательных микроорганизмов.

Основной группой микроорганизмов во всех образцах готового корма были бактерии рода *Lactobacillus*, которые являются продуцентами молочной кислоты. Доминирование молочнокислых бактерий в фазы основного брожения и покоя при соблюдении технологии закладки и хранения растительного субстрата связано с их устойчивостью к уровню pH до 3,0–3,5, что делает их крайне конкурентоспособными в условиях силосной экосистемы. Доминирование *Lactobacillus* желательны во время ферментации силоса, поскольку оно связано с увеличением концентрации молочной кислоты при снижении pH [20, 21]. Например, показано, что бактерии *Lactobacillus plantarum* играют решающую роль в улучшении ферментации на ранних стадиях силосования, поскольку они синтезируют молочную кислоту. Это приводит к снижению pH, подавлению роста нежелательных микроорганизмов и предотвращению дальнейшего разложения сахаров и белков в силосе [22]. Другой вид молочнокислых бактерий – *Lactobacillus brevis* – является облигатным гетероферментативным видом, который синтезирует высокое содержание уксусной кислоты, что может улучшить аэробную стабильность силоса и предотвратить ухудшение, вызванное нежелательными микроорганизмами [23]. Хорошо известно, что на поздних стадиях силосования *Lactobacillus* играет важную роль в увеличении содержания молочной кислоты и снижении значения pH [24].

В наших исследованиях количество лактобактерий в микробиоте силоса было высоким и достигало значений $1,0 \times 10^{12} \pm 7,5 \times 10^{11}$ экв.геном/г растительной массы. Максимальное количество данных микроорганизмов выявлено в опытных вариантах, где для консервирования использовали бактериальные штаммы. Это свидетельствует о высоком благоприятном фоне подкисления для их развития.

Высокое количество молочнокислых бактерий часто ассоциируется с высококачественной ферментацией силоса, тогда как другие микроорганизмы – такие, как кишечные бактерии, клостридии, дрожжи и плесень, нежелательны. Большинство бактерий, участвующих в молочнокислой ферментации силоса, относятся к родам *Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Weissella* и *Leuconostoc* [25].

В исследованном нами готовом силосе детектированы бактерии родов *Streptococcus* и *Bifidobacterium*. Бифидобактерии хорошо известны как важный кишечный пробиотик для людей и животных. Род *Bifidobacterium* обладает уникальным путем фруктозо-6-фосфатной фосфокетолазы, используемым для ферментации углеводов в уксусную и молочную кислоту [26].

Неблагоприятные условия для роста молочнокислых бактерий в силосе могут привести к недостаточному снижению pH в растительной матрице, и, как следствие, эффективность ингибирования патогенной микрофлоры может быть ограничена [27]. После начальной фазы подкисления растительного материала происходит интенсивный рост относительно аэробных или анаэробных бактерий, и этот процесс называется вторичной ферментацией. Основными микроорганизмами, ответственными за процессы вторичной ферментации в силосе, являются бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (энтеробактерии) и рода *Clostridium* [28].

Вторыми по количеству в микробном сообществе силоса всех исследованных нами вариантов были бактерии рода *Acinetobacter*. Ogunade et al. (2017) [27] обнаружили присутствие *Acinetobacter* в силосе после 120 дней и предположили, что повышенное относительное обилие *Acinetobacter* может быть связано с повышенной концентрацией уксусной кислоты. Было показано, что некоторые *Acinetobacter* могут выживать, когда в окружающей среде достаточно ацетата [29]. *Acinetobacter* sp. был наиболее основным видом бактерий в силосе из кукурузы [30]. В исследовании (Kesry) и др. (2018) [31] определили *Acinetobacter* как второй по количеству таксон в силосе из цельного растения кукурузы после 5-дневного аэробного воздействия после бактерий рода *Lactobacillus*. Это согласуется с выводами Liu и др. [32], которые обнаружили *Acinetobacter* в качестве доминирующих микроорганизмов в силосе из ячменя с высоким pH после 5 и 7 дней аэробного воздействия.

Представители рода *Bacteroidetes*, выявленные в образцах готового корма в наших исследованиях, как известно, отрицательно коррелируют с показателями питательности, поскольку разрушают растительные полисахариды до моносахаридов [33].

Энтеробактерии также являются важным показателем качества в силосовании. В наших исследованиях в образцах силоса всех вариантов нами были детектированы различные представители семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Proteus vulgaris/mirabilis*. Наименьшее количество *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. *Citrobacter* sp. детектировано в образце, где для консервирования растительной массы использовалась смесь штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis*. Очевидно, меньшее содержание данных микроорганизмов в силосе связано с более высоким детектированным показателями молочной кислоты и сухого вещества в данном образце.

Известно, что грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae* широко распространены в природе, в том числе на растениях. Штаммы, выделенные из травы, относились в основном к группе *Erwinia herbicola*, выделенные из силоса – к *Escherichia coli*, *Hafnia alvei* и *Klebsiella pneumoniae*. Виды *Enterobacter* составляют эндогенную флору пищеварительного тракта до 80% здоровой популяции людей. Эти условно-патогенные микроорганизмы, как правило, не способны вызывать патогенные изменения у людей, животных или у растений. Основным конечным продуктом ферментации этого рода является уксусная кислота. Исключением являются бактерии, продуцирующие эндотоксины, которые вызывают мастит [34]. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* вызывают декарбоксилирование и дезаминирование аминокислот и способны использовать соединения азота в качестве источника энергии в процессах дыхания. Оптимальный pH для их роста составляет от 6,0 до 7,0. Большинство штаммов не могут расти при pH ниже 4,5 [34]. В консервированных кормах при благоприятных условиях, обеспечивающих быстрое подкисление, энтеробактерии развиваются только в первой фазе первичной ферментации, когда концентрация ионов водорода не слишком высока.

Выводы Conclusions

Вопросы сохранения качества ферментируемых кормов вызывают широкий интерес у специалистов. Исходя из полученных результатов нами в условиях модельного лабораторного эксперимента получены позитивные доказательства использования бактериальных штаммов *Enterococcus faecium* 46 и *Bacillus subtilis* 18 при заготовке

консервируемого силоса из злаково-бобовой смеси. Наилучшие результаты были продемонстрированы для силоса при использовании комплекса штаммов, где на 30-е сутки после начала эксперимента выявлено наибольшее количество сухого вещества в доле молочной кислоты в сумме кислот, и меньшее количество НДК. При анализе бактериального сообщества доминирующими по количеству были бактерии рода *Lactobacillus*. В обоих опытных вариантах с использованием бактериальных штаммов для консервирования отмечено повышение количества лактобактерий. В варианте при использовании композиции штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis* было детектировано наименьшее количество энтеробактерий, в том числе *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. и *Citrobacter* sp.

Таким образом, использование бактериальных штаммов *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis* при консервировании злаково-бобовой смеси позволило затормозить в кормах развитие гнилостных и патогенных токсинообразующих бактерий благодаря усиленному синтезу молочной кислоты. Соответственно применение данных штаммов в качестве заквасок для силосования, вероятно, способно увеличивать срок аэробной стабильности, поскольку обладает высоким антимикробным действием против тех видов микроорганизмов, которые отвечают за порчу корма при выемке.

Список источников

1. Pakarinen P., Maijala S., Jaakkola F.L., Stoddard M. et al. Evaluation of Preservation Methods for Improving Biogas Production and Enzymatic Conversion Yields of Annual Crops. *Biotechnology for Biofuels*. 2011;4:20. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-20>
2. Dong Z.H., Li J.F., Wang S.R., Zhao J. et al. Gamma-ray Irradiation and Microbiota Transplantation to Separate the Effects of Chemical and Microbial Diurnal Variations on the Fermentation Characteristics and Bacterial Community of Napier Grass Silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2022;102:4322-4332. <https://doi.org/10.1002/JSFA.11784>
3. Xu Z.S., He H.Y., Zhang S.S., Kong J. Effects of Inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the Fermentation Characteristics and Microbial Communities of Corn Stover Silage. *Scientific Reports*. 2017;7:13614. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14052-1>
4. Pedroso A.F., Adesogan A.T., Queiroz O.C., Williams S.K. Control of *Escherichia coli* O157: H7 in Corn Silage with or Without Various Inoculants: Efficacy and Mode of Action. *Journal of Dairy Science*. 2010;93(3):1098-1104. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2433>
5. Driehuis F., Wilkinson J.M., Jiang Y. Silage review: Animal and Human Health Risks from Silage. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(5):4093-4110. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13836>
6. Ogunade M., Jiang Y., Kim D.H., Cervantes A.A.P. et al. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and Bacterial Diversity in Corn Silage Contaminated with the Pathogen and Treated with Chemical or Microbial Additives. *Journal of Dairy Science*. 2017;100:1780-1794. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11745>
7. Russell J.B., Diez-Gonzalez F., Jarvis G.N. Potential Effects of Cattle Diets on the Transmission of Pathogenic *Escherichia coli* to Humans. *Microbes and Infection*. 2000;2(10717540):45-53. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00286-0](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00286-0)
8. Chapman P.A., Siddons C.A., Cerdan Malo A.T., Harkin M.A.A. 1-year Study of *Escherichia coli* O157 in Cattle, Sheep, Pigs and Poultry. *Epidemiology and Infection*. 1997;119(9363024):245-250. <https://doi.org/10.1017/s0950268897007826>

9. Queiroz O.C.M., Ogunade I.M., Weinberg Z., Adesogan A.T. Silage Review: Foodborne Pathogens in Silage and Their Mitigation by Silage Additives. *Journal of Dairy Science*. 2018;101:4132-4142. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13901>
10. Vissers M.M., Driehuis F., Te Giffel M.C., De Jong P. et al. Short communication: Quantification of the Transmission of Microorganisms to Milk via Dirt Attached to the Exterior of Teats. *Journal of Dairy Science*. 2007;90(8):3579-82. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-633>
11. Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Elferink S.J.W.H.O. et al. Microbiology of Ensiling. In: *Silage science and technology*. Madison, USA: American Society of Agronomy, Inc., 2003.
12. Hu W., Schmidt R.J., McDonnell E.E., Klingerman C.M. The Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silages Ensiled at Two Dry Matter Contents. *Journal of Dairy Science*. 2009;92:3907-3914. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1788>
13. Косолапов В.М., Чуйков В.А., Худякова Х.К., Косолапова В.Г. *Физико-химические методы анализа кормов*. Москва: Типография Россельхозакадемии, 2014. 344 с.
14. Ávila C.L.S., Carvalho B.F. Silage Fermentation-updates Focusing on the Performance of Microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*. 2020;128(4):966-984. <https://doi.org/10.1111/jam.14450>
15. Borreani G., Tabacco E., Schmidt R.J., Holmes B.J. et al. Silage Review: Factors Affecting Dry Matter and Quality Losses in Silages. *Journal of Dairy Science*. 2018;101:3952-3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
16. Zhang Y.C., Li D.X., Wang X.K., Lin Y.L. et al. Fermentation Dynamics and Diversity of Bacterial Community in Four Typical Woody Forages. *Annals of Microbiology*. 2019;69:233-240. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1398-z>
17. Huhtanen P., Rinne M., Nousiainen J. Evaluation of the Factors Affecting Silage Intake of Dairy Cows; A Revision of the Relative Silage Dry Matter Intake Index. *Animal*. 2007;1:758-770. <https://doi.org/10.1017/S175173110773673X>
18. Fustini M., Palmonari A., Canestrari G., Bonfante E. et al. Effect of Undigested Neutral Detergent Fiber Content of Alfalfa Hay on Lactating Dairy Cows: Feeding Behavior, Fiber Digestibility, and Lactation Performance. *Journal of Dairy Science*. 2017;100:4475-4483. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12266>
19. Miller M.D., Kokko C., Ballard C.S., Dann H.M. et al. Influence of Fiber Degradability of Corn Silage in Diets with Lower and Higher Fiber Content on Lactational Performance, Nutrient Digestibility, and Ruminal Characteristics in Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*. 2021;104:1728-1743. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19088>
20. Li L., Sun Y., Yuan Z. Effect of Microalgae Supplementation on the Silage Quality and Anaerobic Digestion Performance of Manyflower Silvergrass. *Bioresource Technology*. 2015;189:334-40. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.029>
21. Li M., Zi X., Zhou H., Hou G. et al. Effects of Sucrose, Glucose, Molasses and Cellulase on Fermentation Quality and in Vitro Gas Production of King Grass Silage. *Animal Feed Science and Technology*. 2014;197:206-212. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.06.016>
22. Yan Y.H., Li X.M., Guan H., Huang L.K. Microbial Community and Fermentation Characteristic of Italian Ryegrass Silage Prepared with Corn Stover and Lactic Acid Bacteria. *Bioresource Technology*. 2019;279:166-173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.107>
23. Guo T.T., Zhang L., Xin Y.P., Xu Z.S. et al. Oxygen-inducible Conversion of Lactate to Acetate in Heterofermentative *Lactobacillus brevis* ATCC367. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017;83: e01659-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01659-17>
24. Cai Y.M., Benno Y., Ogawa M., Ohmomo S. et al. Influence of *Lactobacillus* spp. from an Inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from Forage Crops

on Silage Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64:2982-2987. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.8.2982-2987.1998>

25. Ni K.K., Zhao J.Y., Zhu B.G., Su R.N. et al. Assessing the Fermentation Quality and Microbial Community of the Mixed Silage of Forage Soybean with CROP Corn or Sorghum. *Bioresource Technology*. 2018;265:563-567. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.097>

26. Grill J.P., Crociani J., Ballongue J. Characterization of Fructose 6 phosphate Phosphoketolases Purified from *Bifidobacterium* Species. *Current Microbiology*. 1995;31:49-54. <https://doi.org/10.1007/BF00294634>

27. Ogunade M. Silage Review: Mycotoxins in silage: Occurrence, Effects, Prevention, and Mitigation. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(5):4034-4059. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13788>

28. Lindgren Ö.S. Influences of Enterobacteria on the Fermentation and Aerobic Stability of Grass Silages. *Grass and Forage Science*. 1995;50:41-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1995.tb02292.x>

29. Fuhs G.W., Chen M. Microbiological Basis of Phosphate Removal in the Activated Sludge Process for the Treatment of Wastewater. *Microbial Ecology*. 1975;2:119-138. <https://doi.org/10.1007/BF02010434>

30. Bai C., Wang L., Sun H., Xu Y. et al. Dynamics of Bacterial and Fungal Communities and Metabolites During Aerobic Exposure in Whole-plant Corn Silages with Two Different Moisture Levels. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:663895. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663895>

31. Keshri J., Chen Y., Pinto R., Kroupitski Y. et al. Microbiome Dynamics During Ensiling of Corn With and Without *Lactobacillus plantarum* Inoculant. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018;102:4025-4037. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8903-y>

32. Liu B., Huan H., Gu H., Xu N. et al. Dynamics of a Microbial Community During Ensiling and Upon Aerobic Exposure in Lactic Acid Bacteria Inoculation-treated and Untreated Barley Silages. *Bioresource Technology*. 2019;273:212-219. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.041>

33. Yue Z.B., Chen R., Yang F., James M. et al. Effects of Dairy Manure and Corn Stover Co-digestion on Anaerobic Microbes and Corresponding Digestion Performance. *Bioresource Technology*. 2013;128:65-71. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.115>

34. Li Y., Nishino N. Effects of Inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on Fermentation, Aerobic Stability and Microbial Communities in Whole Crop Corn Silage. *Grass and Forage Science*. 2011;57:184-191. <https://doi.org/10.1111/j.1744-697X.2011.00226.x>

References

1. Pakarinen P., Maijala S., Jaakkola F.L., Stoddard M. et al. Evaluation of Preservation Methods for Improving Biogas Production and Enzymatic Conversion Yields of Annual Crops. *Biotechnology for Biofuels*. 2011;4:20. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-20>

2. Dong Z.H., Li J.F., Wang S.R., Zhao J. et al. Gamma-ray Irradiation and Microbiota Transplantation to Separate the Effects of Chemical and Microbial Diurnal Variations on the Fermentation Characteristics and Bacterial Community of Napier Grass Silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2022;102:4322-4332. <https://doi.org/10.1002/JSFA.11784>

3. Xu Z.S., He H.Y., Zhang S.S., Kong J. Effects of Inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the Fermentation Characteristics and

Microbial Communities of Corn Stover Silage. *Scientific Reports*. 2017;7:13614. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14052-1>

4. Pedroso A.F., Adesogan A.T., Queiroz O.C., Williams S.K. Control of *Escherichia coli* O157: H7 in Corn Silage with or Without Various Inoculants: Efficacy and Mode of Action. *Journal of Dairy Science*. 2010;93(3):1098-1104. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2433>

5. Driehuis F., Wilkinson J.M., Jiang Y. Silage review: Animal and Human Health Risks from Silage. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(5):4093-4110. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13836>

6. Ogunade M., Jiang Y., Kim D.H., Cervantes A.A.P. et al. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and Bacterial Diversity in Corn Silage Contaminated with the Pathogen and Treated with Chemical or Microbial Additives. *Journal of Dairy Science*. 2017;100:1780-1794. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11745>

7. Russell J.B., Diez-Gonzalez F., Jarvis G.N. Potential Effects of Cattle Diets on the Transmission of Pathogenic *Escherichia coli* to Humans. *Microbes and Infection*. 2000;2(10717540):45-53. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00286-0](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00286-0)

8. Chapman P.A., Siddons C.A., Cerdan Malo A.T., Harkin M.A.A. 1-year Study of *Escherichia coli* O157 in Cattle, Sheep, Pigs and Poultry. *Epidemiology and Infection*. 1997;119(9363024):245-250. <https://doi.org/10.1017/s0950268897007826>

9. Queiroz O.C.M., Ogunade I.M., Weinberg Z., Adesogan A.T. Silage Review: Foodborne Pathogens in Silage and Their Mitigation by Silage Additives. *Journal of Dairy Science*. 2018;101:4132-4142. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13901>

10. Vissers M.M., Driehuis F., Te Giffel M.C., De Jong P. et al. Short communication: Quantification of the Transmission of Microorganisms to Milk via Dirt Attached to the Exterior of Teats. *Journal of Dairy Science*. 2007;90(8):3579-82. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-633>

11. Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Elferink S.J.W.H.O. et al. Microbiology of Ensiling. In: *Silage science and technology*. Madison, USA: American Society of Agronomy, Inc., 2003.

12. Hu W., Schmidt R.J., McDonnell E.E., Klingerman C.M. The Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silages Ensiled at Two Dry Matter Contents. *Journal of Dairy Science*. 2009;92:3907-3914. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1788>

13. Kosolapov V.M., Chuikov V.A., Khudyakova Kh.K., Kosolapova V.G. *Physicochemical methods of feed analysis*. Moscow, Russia: Tipografiya Rosselkhozakademii, 2014:344. (In Russ.)

14. Ávila C.L.S., Carvalho B.F. Silage Fermentation-updates Focusing on the Performance of Microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*. 2020;128(4):966-984. <https://doi.org/10.1111/jam.14450>

15. Borreani G., Tabacco E., Schmidt R.J., Holmes B.J. et al. Silage Review: Factors Affecting Dry Matter and Quality Losses in Silages. *Journal of Dairy Science*. 2018;101:3952-3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>

16. Zhang Y.C., Li D.X., Wang X.K., Lin Y.L. et al. Fermentation Dynamics and Diversity of Bacterial Community in Four Typical Woody Forages. *Annals of Microbiology*. 2019;69:233-240. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1398-z>

17. Huhtanen P., Rinne M., Nousiainen J. Evaluation of the Factors Affecting Silage Intake of Dairy Cows; A Revision of the Relative Silage Dry Matter Intake Index. *Animal*. 2007;1:758-770. <https://doi.org/10.1017/S175173110773673X>

18. Fustini M., Palmonari A., Canestrari G., Bonfante E. et al. Effect of Undigested Neutral Detergent Fiber Content of Alfalfa Hay on Lactating Dairy Cows: Feeding

- Behavior, Fiber Digestibility, and Lactation Performance. *Journal of Dairy Science*. 2017;100:4475-4483. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12266>
19. Miller M.D., Kokko C., Ballard C.S., Dann H.M. et al. Influence of Fiber Degradability of Corn Silage in Diets with Lower and Higher Fiber Content on Lactational Performance, Nutrient Digestibility, and Ruminant Characteristics in Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*. 2021;104:1728-1743. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19088>
 20. Li L., Sun Y., Yuan Z. Effect of Microalgae Supplementation on the Silage Quality and Anaerobic Digestion Performance of Manyflower Silvergrass. *Bioresource Technology*. 2015;189:334-40. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.029>
 21. Li M., Zi X., Zhou H., Hou G. et al. Effects of Sucrose, Glucose, Molasses and Cellulase on Fermentation Quality and in Vitro Gas Production of King Grass Silage. *Animal Feed Science and Technology*. 2014;197:206-212. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.06.016>
 22. Yan Y.H., Li X.M., Guan H., Huang L.K. Microbial Community and Fermentation Characteristic of Italian Ryegrass Silage Prepared with Corn Stover and Lactic Acid Bacteria. *Bioresource Technology*. 2019;279:166-173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.107>
 23. Guo T.T., Zhang L., Xin Y.P., Xu Z.S. et al. Oxygen-inducible Conversion of Lactate to Acetate in Heterofermentative *Lactobacillus brevis* ATCC367. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017;83: e01659-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01659-17>
 24. Cai Y.M., Benno Y., Ogawa M., Ohmomo S. et al. Influence of *Lactobacillus* spp. from an Inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from Forage Crops on Silage Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64:2982-2987. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.8.2982-2987.1998>
 25. Ni K.K., Zhao J.Y., Zhu B.G., Su R.N. et al. Assessing the Fermentation Quality and Microbial Community of the Mixed Silage of Forage Soybean with CROP Corn or Sorghum. *Bioresource Technology*. 2018;265:563-567. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.097>
 26. Grill J.P., Crociani J., Ballongue J. Characterization of Fructose 6 phosphate Phosphoketolases Purified from *Bifidobacterium* Species. *Current Microbiology*. 1995;31:49-54. <https://doi.org/10.1007/BF00294634>
 27. Ogunade M. Silage Review: Mycotoxins in silage: Occurrence, Effects, Prevention, and Mitigation. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(5):4034-4059. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13788>
 28. Lindgren Ö.S. Influences of Enterobacteria on the Fermentation and Aerobic Stability of Grass Silages. *Grass and Forage Science*. 1995;50:41-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1995.tb02292.x>
 29. Fuhs G.W., Chen M. Microbiological Basis of Phosphate Removal in the Activated Sludge Process for the Treatment of Wastewater. *Microbial Ecology*. 1975;2:119-138. <https://doi.org/10.1007/BF02010434>
 30. Bai C., Wang L., Sun H., Xu Y. et al. Dynamics of Bacterial and Fungal Communities and Metabolites During Aerobic Exposure in Whole-plant Corn Silages with Two Different Moisture Levels. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:663895. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663895>
 31. Keshri J., Chen Y., Pinto R., Kroupitski Y. et al. Microbiome Dynamics During Ensiling of Corn With and Without *Lactobacillus plantarum* Inoculant. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018;102:4025-4037. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8903-y>
 32. Liu B., Huan H., Gu H., Xu N. et al. Dynamics of a Microbial Community During Ensiling and Upon Aerobic Exposure in Lactic Acid Bacteria Inoculation-treated and Untreated Barley Silages. *Bioresource Technology*. 2019;273:212-219. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.041>

33. Yue Z.B., Chen R., Yang F., James M. et al. Effects of Dairy Manure and Corn Stover Co-digestion on Anaerobic Microbes and Corresponding Digestion Performance. *Bioresource Technology*. 2013;128:65-71. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.115>

34. Li Y., Nishino N. Effects of Inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on Fermentation, Aerobic Stability and Microbial Communities in Whole Crop Corn Silage. *Grass and Forage Science*. 2011;57:184-191. <https://doi.org/10.1111/j.1744-697X.2011.00226.x>

Сведения об авторах

Лариса Александровна Ильина, д-р биол. наук, профессор кафедры крупного животноводства, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»; 196601, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Петербургское шоссе, 2, лит. А; начальник молекулярно-генетической лаборатории, Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»; 196602, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, ул. Малиновская, 8, лит. А; e-mail: ilina@biotrof.ru; <https://orcid.org/0000-0012-3588-4877>

Иван Григорьевич Малахов, аспирант, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»; 196601, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Петербургское шоссе, 2, лит. А; e-mail: yo.vanya@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-2357-5483>

Василий Александрович Заикин, биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории, Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»; 196602, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, ул. Малиновская, 8, лит. А; e-mail: dfcx@biotrof.ru; <https://orcid.org/0009-0006-8029-9955>

Георгий Юрьевич Лаптев, д-р биол. наук, доцент, профессор кафедры крупного животноводства, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»; 196601, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Петербургское шоссе, 2, лит. А; директор, Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»; 196602, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, ул. Малиновская, 8, лит. А; e-mail: georg-laptev@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8795-6659>

Виталий Юрьевич Морозов, д-р ветеринар. наук, профессор, ректор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»; 196601, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Петербургское шоссе, 2, лит. А; e-mail: supermoroze@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3688-1546>

Сергей Павлович Скляр, канд. ветеринар. наук, доцент, директор Института животноводства и аквакультуры имени В.И. Наумова, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»; 196601, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Петербургское шоссе, 2, лит. А; e-mail: ssklyar@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0000-4184-7206>

Information about the authors

Larisa A. Ilina, DSc (Bio), Professor at the Department of Large Livestock Breeding, Saint-Petersburg State Agrarian University; 2A Peterburgskoe Highway, Pushkin, Saint

Petersburg, 196601, Russian Federation; Head of the Molecular Genetic Laboratory, BIOTROF, OOO; 8A Malinovskaya St., Pushkin, Saint Petersburg, 196602, Russian Federation; e-mail: ilina@biotrof.ru; <https://orcid.org/0000-0012-3588-4877>

Ivan G. Malakhov, postgraduate student, Saint-Petersburg State Agrarian University; 2A Peterburgskoe Highway, Pushkin, Saint Petersburg, 196601, Russian Federation; e-mail: yo.vanya@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-2357-5483>

Vasily A. Zaikin, Biotechnologist at the Molecular Genetics Laboratory, BIOTROF, OOO; 8A Malinovskaya St., Pushkin, Saint Petersburg, 196602, Russian Federation; e-mail: dfcx@biotrof.ru; <https://orcid.org/0009-0006-8029-9955>

Grigory Yu. Laptev, DSc (Bio), Associate Professor, Professor at the Department of Large Livestock Breeding, Saint-Petersburg State Agrarian University; 2A Peterburgskoe Highway, Pushkin, Saint Petersburg, 196601, Russian Federation; Director, BIOTROF, OOO; 8A Malinovskaya St., Pushkin, Saint Petersburg, 196602, Russian Federation; e-mail: georg-laptev@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8795-6659>

Vitaly Yu. Morozov, DSc (Vet), Professor, Rector, Saint-Petersburg State Agrarian University; 2A Peterburgskoe Highway, Pushkin, Saint Petersburg, 196601, Russian Federation; e-mail: supermoroz@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3688-1546>

Sergey P. Sklyarov, CSc (Vet), Associate Professor, Director of the Institute of Animal Husbandry and Aquaculture named after V.I. Naumov, Saint-Petersburg State Agrarian University; 2A Peterburgskoe Highway, Pushkin, Saint Petersburg, 196601, Russian Federation; e-mail: ssklyar@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0000-4184-7206>