

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СИЛОСОВАНИЯ ЛЮЦЕРНЫ С ПРЕПАРАТАМИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ (обзор)

Ю.А. ПОБЕДНОВ, В.М. КОСОЛАПОВ

В отличие от злаковых трав, в сухом веществе (СВ) люцерны содержится меньше сахара, больше пектинов, меньше целлюлозы и гемицеллюлозы (П. Мак-Дональд и соавт., 1970). Значительное содержание пектинов обеспечивает высокую скорость руминальной ферментации корма (Е.Ф. Эннисон с соавт., 1962). Это приводит к тому, что сухое вещество люцернового силоса потребляется крупным рогатым скотом в большем количестве, чем сухое вещество силоса из злаковых трав (М. Грабов, 2016), вследствие чего увеличивается поступление питательных веществ в организм животных и их продуктивность. В то же время заготовка высококачественного силоса и сенажа из люцерны имеет особенности. Прежде всего, для люцерны не характерно наличие на покровах большого количества бактерий кишечной группы (Р.А. Шурхо и соавт., 2008), которыми обычно изобилуют злаковые травы (Ю.А. Победнов с соавт., 2015). Преимущественным видом порчи люцернового силоса и сенажа становится маслянокислое (гнилостное) брожение. Из этого вытекает основной принцип консервирования люцерны, базирующийся на известном правиле G.W. Wieringa (1963) о том, что по мере увеличения содержания сухого вещества в растениях чувствительность клостридий к активной кислотности (рН) корма возрастает. Это позволяет обеспечить сохранность корма при значительно более высоком значении рН, нежели достигается при силосовании свежескошенных растений (Ф. Вайсбах, 2012). Однако при каждом конкретном содержании сухого вещества корм должен быстро подкислиться до строго определенного значения рН, иначе в нем не устраняется опасность возникновения маслянокислого брожения. Именно это условие труднее всего выполнить при силосовании люцерны. В отличие от злаковых трав и клевера лугового, люцерна даже при 35 % СВ содержит много слабосвязанной воды, что в условиях медленного подкисления вызывает интенсивный протеолиз (X.S. Guo с соавт., 2012), сопровождающийся накоплением большого количества аммиака и повышением буферной емкости корма, которая и без того высока. В результате рН силоса в течение продолжительного периода не снижается до предела, исключающего развитие клостридий, что обуславливает накопление в корме масляной кислоты и продуктов гнилостного распада белка. Снизить интенсивность протеолиза можно либо за счет подкисления корма, что достигается благодаря использованию жидких органических кислот или препаратов молочнокислых бактерий в сочетании с сахаром, либо при внесении препаратов молочнокислых бактерий в люцерну, обезвоженную до  $\geq 40$  % СВ. При указанном обезвоживании содержание сахара в сухом веществе люцерны возрастает в 1,6 раза (Ю.А. Победнов с соавт., 2016), что при внесении молочнокислых заквасок увеличивает степень подкисления корма, повышая его стабильность при хранении и выемке из хранилищ (Ф. Вайсбах, 2012). Перспективным способом консервирования люцерны служит и ее силосование в проявленном до  $\geq 40$  % СВ виде с внесением ферментов (А.А. Анисимов, 2006) и их композиций с молочнокислыми бактериями (М. Грабов, 2016).

**Ключевые слова:** люцерна, протеолиз, содержание сухого вещества, степень подкисления, препараты молочнокислых бактерий, ферменты, качество силоса.

При скармливании некачественного силоса животные испытывают дефицит питательных веществ, что отрицательно сказывается на их продуктивности, здоровье и рентабельности производства мяса и молока (1). Проблема получения доброкачественного корма особенно остро стоит при заготовке силоса и сенажа из люцерны. В сельскохозяйственной практике они применяются все чаще, поскольку для многих хозяйств производство корма с содержанием в сухом веществе (СВ) до 22 % сырого протеина — реальный способ повысить экономическую стабильность (2). Помимо высокой обеспеченности сырым протеином, люцерна характеризуется повышенным содержанием пектина, а также наличием особой структурированной клетчатки (3). Высокая сбраживаемость пектина приводит к ускоренной ферментации люцерны в рубце жвачных животных. Так, переваримость пектина и пектиновой кислоты овцами достигает 90 % (4). В этой связи люцерна не подчиняется известному правилу о том, что потребление

животными сухого вещества объемистого корма коррелирует с его энергетической питательностью. Энергетическая питательность сухого вещества рациона с люцерновым силосом меньше по сравнению с рационом, включающим силос из злаковых трав (по чистой энергии лактации — 6,9 против 7,1 МДж/кг), однако его потребление коровами выше — соответственно 22,1-23,2 и 20,3-21,2 кг/сут (5). В результате увеличивается поступление питательных веществ в организм животных и их продуктивность.

В то же время с высоким содержанием сырого протеина в люцерне часто связывают ее основной нежелательный технологический признак — принадлежность к несилосующимся культурам (6). Сопоставляя буферность различных видов растений с содержанием в них сырого протеина, кальция и магния, исследователи установили, что чем богаче растения указанными соединениями, тем выше их буферная емкость (7). Однако основную роль в увеличении буферной емкости играют не азотистые вещества, а минеральные соединения. Люцерна богата минеральными веществами, а выраженными основными свойствами (8, 9). Высокая буферность люцерны обуславливает необходимость накопления значительно большего количества молочной кислоты, чем требуется для подкисления злаковых трав и клевера лугового, что в условиях дефицита сахара очень трудно обеспечить при обычном силосовании даже в проявленном виде. Это вызывает интерес к использованию препаратов молочнокислых бактерий при силосовании люцерны.

Дефицит сахара и высокая буферность массы приводят к необходимости проявлять люцерну до  $\geq 45$  % СВ (10). Химический состав растений можно улучшить в результате их проявления в прокосах. Так, при 6-часовом проявлении люцерны до 35,1 % СВ количество сахара увеличилось с 4,82 до 6,24 % (11), то есть в 1,3 раза. Одновременно сахаробуферное отношение в проявленной массе возросло с 1,0 до 1,4. Следовательно, быстрое обезвоживание люцерны позволяет перевести ее из ряда несилосующихся растений в трудносилосующиеся. Однако, в отличие от клевера лугового и злаковых трав, это не оказывает заметного влияния на результат силосования (12).

Ранее существовало ошибочное мнение, что растения, проявленные до  $\geq 35$  % СВ, успешно силосуются независимо от наличия сахара (13). Оно уже давно не находит экспериментального подтверждения (14, 15). Необходимо также внести ясность в понятие силосуемости растительного сырья. В России его до сих пор связывают с химическим составом силосуемой массы и неправильным представлением о том, что проявление до 40 % СВ не влияет отрицательно на интенсивность молочнокислого брожения (16). Между тем, даже слабое проявление до 30 % СВ заметно сдерживает развитие молочнокислых бактерий, приводя к замедлению скорости подкисления корма и, как следствие, к возникновению в нем нежелательных микробиологических процессов (15). Характер последних целиком зависит от вида растений и степени их проявления. По этой причине даже высокое содержание сахара в проявленных злаковых травах отнюдь не гарантирует получения высококачественного силоса.

Результат силосования также зависит от факторов, которые способствуют реализации способности растений к быстрому и достаточно сильному подкислению. Важнейший из них — количественный и качественный состав эпифитной микрофлоры. Благоприятным он обычно бывает лишь при силосовании кукурузы, в 1 г которой в фазу восковой спелости зерна насчитывается  $\geq 10^5$  КОЕ молочнокислых бактерий (7). При указанной численности они представлены только высокоактивными го-

моферментативными палочками *Lactobacillus plantarum* (17), хорошо приспособленными к брожению на массе с относительно высоким содержанием сухого вещества. Силос из измельченной кукурузы, несмотря на значительное количество СВ, в фазу восковой спелости зерна быстро подкисляется до активной кислотности ( $\text{pH} \leq 4,2$ ), что исключает развитие всех нежелательных бактерий. У многолетних трав, прежде всего люцерны, состав эпифитных микробов чаще всего неблагоприятный (18), однако он имеет особенности, определяющие как доминирующий вид порчи корма, так и способы его консервирования. Установлено (19), что для люцерны не характерно наличие на покровах значительного количества бактерий кишечной группы, которыми обычно избобилуют злаковые травы (17). В основном люцерновый силос портится из-за маслянокислого (гнилостного) брожения (15). Отсюда вытекает основной принцип консервирования люцерны (правило G.W. Wieringa), базирующийся на том, что чувствительность клостридий к кислотности корма заметно возрастает по мере увеличения содержания сухого вещества в зеленой массе (20). Это позволяет получить из проявленной массы люцерны свободный от накопления масляной кислоты силос при значительно более высоком рН по сравнению с силосованием свежескошенных растений.

Следует учитывать, что это правило действует только при силосовании высокопротеиновых бобовых трав, но полностью утрачивает значение при использовании обеспеченных сахаром проявленных злаковых трав с другим составом эпифитной микрофлоры, что требует иных способов консервирования. В отличие от высокобелковых бобовых трав, у злаковых при силосовании в проявленном виде маслянокислое брожение чаще не только не устраняется, но даже приобретает более выраженный характер (вторичное брожение) (14, 15). Причиной его возникновения служит интенсивное развитие бактерий кишечной группы — энтеробактерий на фоне медленного подкисления корма. Энтеробактерии, неэффективно сбраживая содержащийся в травах сахар, создают его дефицит в силосуемой массе, что приводит к маслянокислому брожению. Для устранения маслянокислого брожения в силосе из проявленных злаковых трав следует подавлять не клостридии, а энтеробактерии. Независимо от степени проявления травы должны за 3 сут подкислиться до  $\text{pH} \leq 4,3$  (21), что исключает развитие энтеробактерий. С учетом ограничения молочнокислого брожения в начале силосования нужна скорость и степень подкисления достигаются только при применении препаратов на основе осмоотолерантных штаммов молочнокислых бактерий. Без них даже легкосилосуемые злаковые травы, проявленные до  $\geq 30$  % СВ, на самом деле таковыми не являются (22). Поэтому в мировой практике вместо термина «силосуемость» давно употребляется понятие «сбраживаемость» (23), которое базируется на химическом составе растений и выражает их потенциальную способность к подкислению.

Важно отметить, что в случае люцерны правило G.W. Wieringa (20) не реализуется в полной мере. Исходя из него, можно заключить (7), что при сахаро-буферном отношении в люцерне 0,5-1,0 ее следует проявлять до 37-41 % СВ. Однако при таком количестве сухого вещества получить из люцерны качественный корм при спонтанном силосовании невозможно. Богатая протеином и пектином зеленая масса люцерны содержит много слабосвязанной воды (24). На фоне задержки подкисления это приводит к продолжительному сохранению высокой активности растительных протеолитических ферментов (25). В первые 2 сут силосования протеолиз в люцерне составляет 25 ммоль аминокислот/ч на 1 кг СВ (26).

Проявляя до 35 % СВ не снижает его активности. Нужно подчеркнуть, что белок клевера лугового и злаковых трав в значительно меньшей степени гидролизуются при силосовании, нежели белок люцерны (27).

Из-за быстрого расходования сахара аминокислоты подвергаются окислительному дезаминированию с образованием большого количества аммиака (28), который способствует увеличению буферности корма в процессе силосования. Иными словами, люцерна, которая в результате предварительного проявлявания приобретает свойства труднообрабатываемых растений, в течение первых 2 сут силосования снова превращается в несилосующуюся культуру. В основном из-за этого люцерну (в отличие от труднообрабатываемых многолетних злаковых трав и клевера лугового) обычно не силосуют, а сенажируют, проявляя до  $\geq 45$  % СВ.

Считается, что сенаж, в отличие от силоса, сохраняется не за счет активной кислотности, а благодаря созданию в проявленных травах физиологической сухости, которая обуславливает недоступность для микробов влаги, содержащейся в растениях (29, 30). Между тем еще А.А. Зубрилин предупреждал (31), что учитывать только содержание сухого вещества в зеленой массе при определении предела развития на ней той или иной группы микроорганизмов — заведомая ошибка. Известно, что некоторые продукты, например студень, содержат много воды, но она недоступна для многих микробов. В настоящее время при определении предела развития микроорганизмов оценивают активность содержащейся воды ( $A_w$ ).  $A_w$  (выражается в безразмерных единицах шкалы от 0 до 1) — это количество в продукте несвязанной воды, доступной для микроорганизмов (32). Даже при 45-50 % СВ  $A_w$  в растениях не уменьшается ниже 0,95 (7), тогда как рН не нормируется только при  $A_w$  не выше 0,85 (33). Это значительно ниже, чем отмечается даже в травах, проявленных до 60 % СВ. Отсюда можно заключить, что проявление люцерны до  $\geq 45$  % СВ связано не столько с созданием в растениях физиологической сухости, сколько с необходимостью обеспечить высокую сохранность корма в условиях слабого подкисления. В пользу такого предположения свидетельствует то, что при сенажировании обеспеченных сахаром злаковых трав нормируются и степень подкисления корма, и накопление в нем кислот брожения.

По мнению G. Pahlow с соавт. (21), при консервировании обеспеченных сахаром злаковых трав с СВ  $\geq 45$  % они должны не только в течение 3 сут подкислиться до  $\text{pH} \leq 4,5$ , но и накопить в СВ не менее 3,5 % уксусной кислоты. Последнее необходимо для подавления развития дрожжей, служащих основными инициаторами аэробной порчи сенажа при выемке из хранилищ (7). Как и при силосовании проявленных злаковых трав, этого можно достигнуть только с участием молочнокислых бактерий. Однако при заготовке сенажа из злаковых трав используются препараты, созданные на основе гетероферментативных штаммов молочнокислых бактерий, продуцирующих, наряду с молочной, значительное количество уксусной кислоты (34). Следовательно, в проявленной до  $\geq 45$  % СВ зеленой массе также протекает процесс силосования.

Несмотря на принадлежность к несилосующимся культурам, в лабораторных опытах (при силосовании в небольших герметичных емкостях) люцерна сохраняется даже в свежескошенном виде, не заквашиваясь и не портясь в течение продолжительного времени. Это объясняют наличием вторичных растительных метаболитов с противомикробным действием (35). К ним относятся некоторые свободные небелковые аминокислоты (36), сапонины, многие фенольные соединения, алкалоиды (37) и ряд других соединений. Большинство вторичных метаболитов —

канцерогены, поэтому они представляют опасность для здоровья животных (38). Роль вторичных растительных метаболитов в обеспечении сохранности люцернового силоса настолько велика, что результаты лабораторных опытов нельзя переносить в производственные условия без соответствующей корректировки. С наличием вторичных метаболитов в люцерне и других бобовых культурах связана и высокая аэробная стабильность получаемых силоса и сенажа (35, 39). Однако обеспечить сохранность силоса и сенажа из люцерны в производственных условиях без должного подкисления корма они не могут. Именно неспособность люцерны в течение длительного времени подкислиться до предела, исключая развитие маслянокислых бактерий, становится основной причиной порчи корма. Так, в одном из лабораторных опытов по силосованию люцерны с 39,9 % СВ спустя 3, 7, 15, 30 и 60 сут силосования величина рН составила соответственно 5,85; 5,54; 5,17; 4,85 и 4,57 (11). То есть кислотность достигла значения, исключая маслянокислое брожение, лишь через 2 мес силосования. В лабораторных опытах высокую сохранность корма обеспечили вторичные растительные метаболиты, однако в производственных условиях за указанный срок хранения такой силос уже пришел бы в негодность.

Чтобы повысить сбраживаемость люцерны, нужно подавить протеолиз в процессе обезвоживания растений в поле и их последующего силосования. Такого мнения, в частности, придерживаются X.S. Guo с соавт. (40). В поле это достигается за счет интенсивного проявлявания люцерны в прокосах (через 2-4 ч после скашивания содержание СВ в зеленой массе достигает 35 % и более) (11). Снизить интенсивность протеолиза при силосовании можно посредством быстрого смещения рН до крайних границ действия протеолитических ферментов (25, 41), что трудно сделать при спонтанном заквашивании проявленной массы из-за ее высокой буферной емкости и недостатка сахара. Ситуация осложняется и тем, что оптимальное для протеолиза значение рН в люцерне ниже, чем у клевера лугового, — соответственно 6,0 и 6,5 (42). То есть для устранения протеолиза люцерна должна подкисляться быстрее и интенсивнее клевера лугового.

При невысокой проявленности люцерны ( $\leq 35$  % СВ) стабильность корма обеспечивается только при его быстром подкислении до  $\text{pH} \leq 4,6$ , чего не удается достичь даже с помощью молочнокислых бактерий. Установлено, что применение препаратов молочнокислых бактерий при силосовании люцерны (36 % СВ) не привело к заметному усилению подкисления корма ( $\text{pH}$  4,34-4,40 против 4,42 в обычном силосе) (43). Некоторые исследователи полагают, что при силосовании люцерны даже в свежескошенном виде получить качественный силос можно при использовании препаратов молочнокислых бактерий в сочетании с добавками сахара (44). Однако их же результаты показывают, что этот прием связан со значительными потерями питательных веществ (до 30 %) и малопригоден для практики. По другим данным, влияние мелассы с препаратами молочнокислых бактерий на снижение протеолиза при силосовании люцерны повышалась при увеличении содержания сухого вещества с 20 до 37 % (45). Применение одной мелассы увеличивало количества уксусной кислоты в корме, что свидетельствует об активации нежелательной микрофлоры.

Для повышения обеспеченности сахаром рассматривается возможность силосования люцерны в проявленном виде с ферментными препаратами. Так, в благоприятную погоду ферментный препарат Феркон при силосовании люцерны, проявленной до 30 % СВ, не уступал по эффективности муравьиной кислоте (46). Однако при детальном анализе неэффек-

тивными оказались оба препарата. Как при использовании Феркона, так и при внесении 0,5 % муравьиной кислоты величина рН корма составляла 4,72-4,70, а накопление аммиака в сухом веществе силоса — 0,43-0,41 %. То есть ни один из используемых препаратов не обеспечил создание активной кислотности, способной не допустить маслянокислого брожения. При силосовании клевера лугового, проявленного до того же содержания сухого вещества, с препаратом Феркон и муравьиной кислотой количество аммиака в корме составило соответственно 0,09 и 0,10 %, рН силоса — 4,14 и 4,37. В литературе приводятся сведения об удовлетворительном силосовании обычным способом люцерно-злаковой смеси, проявленной до 35-40 % СВ, с долей люцерны от 50 до 75 % (47). При силосовании люцерны в чистом виде с применением Феркона и муравьиной кислоты положительные результаты получили лишь при проявлении до  $\geq 40$  % СВ (12). В этом случае силос, приготовленный в производственных условиях, подкислялся соответственно до рН 4,47 и 4,33, что обеспечило его высокую стабильность при хранении.

L. Kung с соавт. (48) получили хорошие результаты при силосовании люцерны с тем же количеством сухого вещества при использовании комбинации гетероферментативной молочнокислой бактерии *Lactobacillus buchneri* с ферментами  $\beta$ -глюканазой,  $\alpha$ -амилазой, ксиланазой и галактоманазой. Такое силосование (наряду с улучшением сохранности и качества корма) привело к заметному увеличению его аэробной стабильности. До этого существовала уверенность (35, 39), что сенаж и силос из проявленных бобовых трав довольно устойчивы к аэробной порче, проблема устранения которой возникает только при заготовке силоса из кукурузы восковой спелости зерна (49, 50), сорго (51) и сенажа из зерновых культур и злаковых трав (52, 53).

Необходимость в технологии силосования люцерны с препаратами молочнокислых бактерий обусловлена и тем, что даже в южных регионах России часто не удается проявить массу до сенажной влажности (54), результатом чего становится низкокачественный корм. В Вологодской области свыше половины заготовленного сенажа ежегодно относят к корму низкого класса (55). При благоприятных условиях проявливания, когда содержание СВ в люцерне быстро достигает величины  $\geq 45$  %, стимуляция молочнокислого брожения в корме за счет применения молочнокислых заквасок дает существенный эффект. Согласно данным О.М. Курнаева (56), сенажирование люцерны в производственных условиях с внесением препарата молочнокислых бактерий Литосил снижало накопление аммиака в корме с 26,4 до 10,1 мг%, потери СВ — с 17,6 до 13,2 % и обеспечило стабильность сенажа при хранении. При сенажировании люцерны (с СВ до 50 %) в траншеях рН корма спустя 6 и 12 мес хранения оставался высоким и составлял соответственно 5,21 и 5,06 (56). По этой причине накопление масляной кислоты в натуральном корме продолжало возрастать: спустя 6 и 12 мес хранения оно составляло 0,06 и 0,11 %. В сенаже, где вследствие применения препарата Литосил рН корма быстро снизился до предела, ограничивающего рост маслянокислых бактерий, масляная кислота не накапливалась в течение всего срока хранения. При сенажировании этой же массы в рулонах под пленками рН корма спустя 1 и 6 мес хранения составлял соответственно 5,08 и 5,32, а содержание масляной кислоты — 0,11 и 0,21 %. Применение препарата Литосил и в этом случае обеспечило получение свободного от масляной кислоты корма. Следовательно, даже при проявлении до 50 % СВ гарантированная сохранность корма как при хранении в траншеях, так и в рулонах обеспечивается лишь

при использовании препаратов молочнокислых бактерий.

При снижении содержания СВ в люцерне нестабильность силоса при хранении значительно усиливается. Для решения проблемы нужно прежде всего повысить конкурентоспособность молочнокислых бактерий по отношению к маслянокислым, чему в значительной мере способствует проявление люцерны до  $\geq 40$  % СВ. В этом случае молочная кислота накапливается в большей степени, чем при силосовании люцерны в свежескошенном виде (15). При медленном подкислении важное значение имеет то, что маслянокислые бактерии присутствуют на растениях в виде спор (18). Чем суше растения, тем медленнее прорастают на них споры маслянокислых бактерий, и молочнокислые бактерии (даже при слабой активности) успевают подкислить корм до нужного значения рН. Таким на сегодняшний день представляется механизм силосования люцерны, проявленной до  $\geq 45$  % СВ (33). С этим же связано требование сохранения показателя СВ в пределах от 40 до 50 % (то есть допустимое отклонение от рекомендуемого показателя — не более 5 %) (7), что сильно затрудняет сенажирование люцерны в условиях производства и обуславливает целесообразность применения молочнокислых заквасок, ускоряющих подкисление массы и повышающих стабильность корма при хранении и выемке.

Понятно, что верхний предел проявления силосуемой массы люцерны определяется ее технологическими свойствами, а именно способностью к уплотнению. При закладке люцерны на хранение в траншеи содержание СВ не должно превышать 50 % при условии тщательного измельчения растений и их безукоризненной изоляции от воздуха (7). Нижний предел проявления связан только со способностью массы быстро подкислиться под влиянием биологических препаратов до состояния, исключающего развитие маслянокислых бактерий. Эффективность применения препаратов молочнокислых бактерий при силосовании тем выше, чем больше проявлена зеленая масса. Так, при силосовании люцерны, проявленной до 41,1 % СВ, с препаратом молочнокислых бактерий Ecosyl корм подкислялся до рН 4,45 против 4,64 в обычном силосе (57). При этом была важна не конечная активная кислотность корма, а величина рН в начале силосования, обуславливающая подавление протеолиза (58). На это указывало сокращение доли азота аммиака в общем азоте корма (с 11,2 до 7,6 %) в силосе, приготовленном с молочнокислой закваской.

При меньшем содержании сухого вещества в зеленой массе эффективность применения препарата Ecosyl заметно снижается. Например, при силосовании люцерны с 38,1 % СВ рН контрольного и опытного корма составил соответственно 4,73 и 4,53. Доля азота аммиака от общего азота корма сократилась с 12,7 до 9,4 %. При силосовании люцерны с 22,6 % СВ в контроле и опыте рН равнялся 5,23 и 4,93, доля азота аммиака от общего азота — 17,2 и 14,5 %. Из приведенных данных следует, что при увеличении количества СВ в силосуемой люцерне с 22,6 до 41,1 % доля аммиака относительно общего азота корма сократилась практически вдвое — с 14,5 до 7,6 %, а рН снизился с 4,93 до 4,45. Следовательно, силосование люцерны, проявленной до  $\geq 40$  % СВ, с препаратами молочнокислых бактерий способствует не только ускорению, но и значительному усилению подкисления корма, что улучшает его стабильность при хранении.

Некоторые исследователи полагают, что применение препаратов молочнокислых бактерий — основная причина повышения содержания аммиака в сухом веществе люцернового силоса (59). Основанием для такого заключения служит предположение о том, что при дефиците сахара в

силосуемой массе молочнокислые бактерии утилизируют для энергетического обмена углеродный скелет аминокислот. Это имеет место в тех случаях, когда использование препаратов молочнокислых бактерий не способствует сколько-нибудь значительному усилению подкисления корма. Так, в одном из опытов по силосованию люцерны (сорт Таисия) с 31,3 % СВ обычным способом и с внесением препарата Биотроф в готовом силосе рН составил соответственно 5,06 и 5,02, содержание аммиака в сухом веществе — 0,54 и 0,62 % (11). В то же время при силосовании более обеспеченной сахаром люцерны сорта Пастбищная 88 даже при обычном силосовании растений с 24,5 % СВ корм подкислился до рН 4,70. Препарат Биотроф не оказал заметного влияния на степень подкисления готового силоса (рН 4,68), но ускорил этот процесс. В сухом веществе контрольного образца силоса содержалось 0,17 % масляной кислоты, в опытном варианте ее не было. Ускорение подкисления привело к сокращению накопления аммиака в сухом веществе корма с 0,30 до 0,26 %. Следовательно, при разработке эффективной технологии силосования проявленной люцерны с препаратами молочнокислых бактерий важно учитывать возможную значительную роль сортовых различий растений.

При силосовании люцерны (32,3 % СВ) интересные результаты получили венгерские исследователи (60) при использовании кукурузной муки, в которой 89 % крахмала было гидролизировано до простых сахаров. Кукурузную муку вносили из расчета 1,0 % к массе. По данным авторов, это способствовало получению высококачественного корма с хорошим соотношением молочной и уксусной кислот. В то же время внесение целлюлозолитических ферментов и их комбинации с молочнокислыми бактериями при силосовании люцерны с 34 % СВ, как и в описанных выше опытах, оказалось неэффективным (61). С положительными результатами было испытано силосование проявленной до 33,40 и 53,00 % СВ люцерны с внесением танина (62). Важно отметить, что и в этом случае эффект от применения танина по ограничению протеолиза повышался по мере увеличения количества сухого вещества в зеленой массе. К недостатку описанного приема следует отнести то, что высокие дозы танина ( $\geq 2,0$  % относительно СВ) снижают переваримость питательных веществ корма.

Важнейшая особенность люцернового силоса, приготовленного с внесением препаратов молочнокислых бактерий, — его высокое продуктивное действие, достоверно превышающее продуктивное действие силоса спонтанного брожения. При разнице всего 0,3 кг в потреблении СВ рационов с люцерновым силосом, приготовленным обычным способом и с препаратом молочнокислых бактерий, среднесуточный удой коров различался на 0,8 кг (40,7 против 39,9 кг) при более высокой жирности молока (3,43 против 3,37 %) у животных опытной группы (48). Четкого объяснения этого явления в литературе пока нет. Некоторые исследователи связывают его с увеличением массы рубцовой микрофлоры, которая для высокопродуктивных коров служит источником полноценного белка (63, 64).

В заключении остановимся на факторах, которые, помимо уменьшения протеолиза в проявленной до  $\geq 40$  % СВ зеленой массе люцерны, могут служить причиной повышения подкисления корма при внесении молочнокислых заквасок. Во-первых, этому способствует более гомоферментативный тип молочнокислого брожения в силосе (65, 66). Молочная кислота, которая диссоциирует на ионы в значительно большей степени, нежели другие кислоты брожения (7, 67), способствует созданию в корме более высокой активной кислотности. Важное условие успешного силосования люцерны в глубоко проявленном виде — новообразование сахара



как при быстром проявлении растений до  $\geq 40$  % СВ (11, 15), так и в процессе ферментации проявленной массы в анаэробных условиях. Причиной служит наличие в сухом веществе люцерны до 5 % крахмала (23), который под влиянием кислот брожения гидролизует до простых сахаров. Кроме того, люцерна содержит сапонин ( $C_{27}H_{37}O_{16}$ ), который при ферментации также расщепляется на сапогенин, глюкозу и неизвестное горькое вещество (68). Не исключено, что определенное значение имеет и то, что в сухом веществе проявленной до  $\geq 40$  % СВ люцерны накапливается до 2 % яблочной кислоты, которая, как утверждают некоторые авторы (69), способна сбрасываться молочнокислыми бактериями.

Таким образом, люцерна, наряду с дефицитом сахара, характеризуется очень высокой буферной емкостью, в 1,6-2,3 раза превышающей буферную емкость остальных кормовых растений. Чем выше буферная емкость, тем больше нейтрализуется кислот брожения, что сильно сдерживает подкисление корма, особенно в первую фазу силосования. Высокое содержание белка и пектина приводит к тому, что даже при проявлении люцерны до содержания сухого вещества  $\geq 35$  % она все еще содержит значительное количество слабосвязанной воды, которая в условиях медленного подкисления обуславливает высокую активность протеолитических ферментов и интенсивный гидролиз белка. Это сопровождается накоплением в силосе большого количества аммиака и дальнейшим увеличением буферной емкости. В результате в течение продолжительного времени проявленная люцерна не может подкислиться до значения рН, исключая развитие клостридий, даже при использовании молочнокислых заквасок или их комбинаций с ферментными препаратами, что приводит к порче корма. Чтобы не допустить этого, нужно снизить протеолиз в силосуемой массе и затормозить развитие маслянокислых бактерий в первую фазу силосования люцерны с одновременным усилением интенсивности молочнокислого брожения, а также повысить критическое для развития маслянокислых бактерий значение рН. Все три задачи решаются посредством быстрого проявления люцерны до содержания сухого вещества  $\geq 40$  % и ее силосования с препаратами на основе осмотолерантных штаммов молочнокислых бактерий.

*ФГБНУ ФНЦ кормопроизводства и агроэкологии*

*им. В.Р. Вильямса,*

141055 Россия, Московская обл., г. Лобня, Научный городок, корп. 1,

e-mail: vnii.kormov@yandex.ru ✉

*Поступила в редакцию*

*27 марта 2017 года*

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, V. 53, № 2, pp. 258-269

## BIOLOGY OF ALFALFA SILAGE MAKING

(review)

*Yu.A. Pobednov, V.M. Kosolapov*

*Williams Federal Science Center for Fodder Production and Agroecology, Federal Agency of Scientific Organizations, корп. 3, Nauchnyi gorodok, Lobnya, Moscow Province, 141055 Russia, e-mail vnii.kormov@yandex.ru (✉ corresponding author V.M. Kosolapov)*

ORCID:

Pobednov Yu.A. [orcid.org/0000-0001-8701-009x](https://orcid.org/0000-0001-8701-009x)

Kosolapov V.M. [orcid.org/0000-0001-6311-023x](https://orcid.org/0000-0001-6311-023x)

The authors declare no conflict of interests

Received March 27, 2017

doi: 10.15389/agrobiol.2018.2.258eng

### Abstract

Alfalfa dry matter is characterized by the less content of sugar, celluloses and hemicelluloses and more quantity of pectin in comparison to grasses (P. Mc-Donald et al., 1970). The high level of pectin provides increased rate of feed fermentation in a rumen (E.F. Annison, et al.,

1962). This leads to improved assimilation of alfalfa silage dry matter by cattle, despite the low energy level unlike to cereal grasses silage (M. Grabov, 2016). As a result, the nutrients intake and productivity of cows increase. However, there are some particularities in qualitative alfalfa silage- and haylage-making, such as absence of abundant *Enterobacteriaceae* bacteria on the alfalfa plants (R.A. Shurchno et al., 2008), unlike cereal grasses (Yu.A. Pobednov et al., 2015). Thereof the basic kind of alfalfa silage and haylage spoilage is butyric (putrid) fermentation. With due regard to this fact, the main principle of alfalfa conservation is based on the known rule of G.W. Wieringa (1963), which tells about increasing of clostridium bacteria sensitivity to active acidity (pH) of feed when dry matter content in plants rises. This allows providing feed preservation under significantly higher parameter of pH, than at ensiling the freshly-cut mass (F. Weissbach, 2012). However, fodder must reach fast acidification with determined pH value to eliminate a butyric fermentation at each dry matter content. But this condition especially difficult for performance at alfalfa ensiling, because plants contain much weakly-bound water even at 35 % dry matter content, in contrast to cereal grasses and red clover. At weak acidification, it can lead to intensive proteolysis (X.S. Guo et al., 2012) with ammonia accumulation and an increase in buffer capacity of feed. As a result, pH of alfalfa silage does not decline to necessary level for elimination the clostridium bacteria growth during the long period and it causes to accumulation a butyric acid and the products of putrid decay of the proteins. It is possible to reduce the intensity of proteolysis by increased feed acidification with addition of liquid organic acids or inoculants of lactic acid bacteria combined with sugar. Another way is ensiling of alfalfa wilted to  $\geq 40$  % dry matter content followed by application of the lactic acid bacteria-based inoculants. At this level of dehydration, the content of sugar in dry matter increases 1.6 times (Yu.A. Pobednov et al., 2016), and addition of the bacterial inoculants leads to increasing a degree of feed acidification as well as storage and feed-out stability (F. Weissbach, 2012). Application of enzymes in ensiling alfalfa wilted to  $\geq 40$  % dry matter is one more advanced method of this forage crop conservation (A.A. Anisimov, 2006). Another effective approach of alfalfa silage-making is using enzyme additives combined with lactic acid bacteria (M. Grabov, 2016).

Keywords: alfalfa, proteolysis, dry matter content, acidification, lactic acid bacteria-based inoculants, enzymes, silage quality.

## REFERENCES

1. Laptsev G.Yu., Novikova N.I., Il'ina L.A., Yyldyrym E.A., Soldatova V.V., Nikonov I.N., Filipova V.A., Brazhnik E.A., Sokolova O.N. Dynamics of mycotoxin accumulation in silage during storage. *Agricultural Biology*, 2014, 6: 123-130 (doi: 10.15389/agrobiology.2014.6.123eng).
2. Chub O. *Zhivotnovodstvo Rossii*, 2015, 10: 55-56 (in Russ.).
3. Mak-Donal'd P., Edwards R., Grinkhaldzh Dzh. *Pitanie zhivotnykh* [Animal feeding]. Moscow, 1970 (in Russ.).
4. Ennison E.F., L'yuis D. *Obmen veshchestv v rubtse* [Rumen metabolism]. Moscow, 1962 (in Russ.).
5. Grabov M. *Tsenovik*, 2016, 5: 43 (in Russ.).
6. Albrecht K.A., Beauchemin K.A. Alfalfa and other perennial legume. In: *Silage science and technology, Agronomy Monograph 42*. D.R. Buxton, R.E. Muck, J.H. Harrison (eds.). ASA, CSSA, and SSSA, Madison, 2003: 633-664 (doi: 10.2134/agronmonogr42.c14).
7. Vaisbakh F. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*, 2012, 2: 49-70 (in Russ.).
8. Sosnowski J., Jankowski K., Wiśniewska-Kadžajan B., Jankowska J., Kolczarek R. Effect of the extract from *Ecklonia maxima* on selected micro- and macroelements in aerial biomass of hybrid alfalfa. *J. Elementol.*, 2014, 19(1): 209-217 (doi: 10.5601/jelem.2014.19.1.608).
9. Hancock D.W., Buntin G.D., Ely L.O., Lacy R.C., Heusner G.L., Stewart R.L. *Alfalfa management in Georgia*. Athens, 2005.
10. Pobednov Yu.A., Kosolapov V.M., Bondarev V.A., Akhlamov Yu.D., Mamaev A.A., Klimenko V.P., Otroshko S.A., Shevtsov A.V. *Silosovanie i senazhirovanie kormov (rekomentatsii)* [Silage and hay making]. Moscow, 2012 (in Russ.).
11. Pobednov Yu.A., Mamaev A.A., Ivanova M.S. V sbornike nauchnykh trudov: *Zhuchenkovskie chteniya II* [II Zhuchenko Readings. Iss. 11(59)]. Moscow, 2016. Vypusk 11(59): 180-188 (in Russ.).
12. Anisimov A.A. *Vash sel'skii konsultant*, 2006, 4: 28-30 (in Russ.).
13. Vasin V.G., Zotikov V.I., Vasina A.A. *Proizvodstvo kormov dlya molochnykh kompleksov* [Feed production for dairy commercial farms]. Orel, 2012 (in Russ.).
14. Weissbach F., Honig H. Über die Vorhersage und Steuerung des Gärungsverlaufs bei der Silierung von Grünfütter aus extensiven Anbau. *Landbauforschung Völkenrode*, 1996, 1: 10-17.
15. Pobednov Yu.A. *Teoreticheskie predstavleniya i sposoby konservirovaniya kukuruzy i trav na osnove regulirovaniya mikrobiologicheskikh protsessov* [Theoretical aspects and methods for preserving maize and herbs based on the regulation of microbiological processes]. St. Petersburg, 2017

(in Russ.).

16. Bondarev V.A., Kosolapov V.M., Klimenko V.P., Krichevskii A.N. *Prigotovlenie silosa i senazha s primeneniem otechestvennykh biologicheskikh preparatov* [Domestic biologicals in silage and hay making]. Moscow, 2016 (in Russ.).
17. Fehrmann E., Müller Th. Jaresverlauf des epiphytischen Mikrobenbesatzes auf einen Graslandstandort. *Das Wirtschaftseigene Futter*, 1990, 36(1): 66-78.
18. Shmidt V., Vetterau G. *Proizvodstvo silosa* [Silage making]. Moscow, 1975 (in Russ.).
19. Shurkno R.A., Norina O.S., Tagirov M.Sh., Naumova R.P. *Doklady Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk*, 2008, 6: 23-26 (in Russ.).
20. Viringa Dzh. *Materialy 8-go Mezhdunarodnogo lugopastbishchnogo kongressa (11-21 iyulya, 1960 g., g. Reding, Angliya)* (perevod s angliiskogo) [Proc. 8<sup>th</sup> Int. Grassland Congress, 11-21 July, 1960, Reading, England]. Moscow, 1963: 334-343 (in Russ.).
21. Pahlow G., Weissbach F. New aspects of evaluation and application of silage additives. *Landbauforschung Völkenrode*, 1999, 206: 141-158.
22. Pobednov Yu.A. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*, 2009, 3: 89-100 (in Russ.).
23. *Proizvodstvo grubyykh kormov. Kniga 1* /Pod redaktsiei D. Shpaara [Coarse fodder production. Book 1. D. Shpaar (ed.)]. Torzhok, 2002 (in Russ.).
24. Pobednov Yu.A. *Adaptivnoe kormoproizvodstvo*, 2016, 2: 21-37 (in Russ.).
25. Charmley E., Veira D.M. Inhibition of proteolysis at harvest using heat in alfalfa silages: effect on silage composition and digestion by sheep. *J. Anim. Sci.*, 1990, 68(3): 758-766 (doi: 10.2527/1990.683758x).
26. McKersie B., Buchanan-Smith J. Changes in the levels of proteolytic enzymes in ensiled alfalfa forage. *Canadian Journal of Plant Science*, 1982, 62(1): 111-116 (doi: 10.4141/cjps82-017).
27. Purwin C., Pysera B., Fijałkowska M., Antoszkiewicz Z., Piwczynski D., Wyzlic I., Lipinski K. The influence of ensiling method on the composition of nitrogen fractions in red clover, alfalfa and red fescue silage. *Proc. XVI International Silage Conference*. Hämeenlinna, 2012: 256-257.
28. Uli't'ko V.E., Pykhtina L.A., Desyatov O.A. *Povyshenie produktivnogo deistviya kormov pri proizvodstve moloka i myasa v Srednevolzhskom regione* [Increasing feed effect on milk and meat production in the Middle Volga region]. Ul'yanovsk, 2016 (in Russ.).
29. Li S.S., Pshenichnikova E.N., Kroneval'd E.A. *Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2014, 2(112): 98-102 (in Russ.).
30. Makarov S.A. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal*, 2016, 3(45-3): 109-112 (doi: 10.18454/IRJ.2016.45.035) (in Russ.).
31. Zubrilin A.A. *Konservirovanie zelenykh kormov* [Green forage preserving]. Moscow, 1938 (in Russ.).
32. Gorelikova G.A. *Osnovy sovremennoi pishchevoi biotekhnologii* [Fundamentals of modern food biotechnology]. Kemerovo, 2004 (in Russ.).
33. Pobednov Yu.A. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*, 2016, 2: 42-54 (in Russ.).
34. Driehuis F., Oude Elferink S.J.W.H., Van Wikselaar P.G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass Forage Sci.*, 2001, 56(4): 330-343 (doi: 10.1046/j.1365-2494.2001.00282.x).
35. Weissbach F. Consequences of grassland de-intensification for ensilability and feeding value of herbage. *Landbauforschung Völkenrode*, 1999, 206(Sonderheft): 41-53.
36. Sagiyan A.S. *Enantiomerno chistye nebelkovye aminokisloty. Sposoby polucheniya* [Enantiomeric pure non-protein amino acids — synthesis, isolation, purification technique]. Moscow, 2010 (in Russ.).
37. Luckner M. *Vtorichnyi metabolizm u mikroorganizmov, rastenii i zhivotnykh* [Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals]. Moscow, 1979 (in Russ.).
38. Heldt H.-W. *Biokhimiya rastenii* [Plant biochemistry]. Moscow, 2014 (in Russ.).
39. Davies D.R., Fychan R., Jones R. Aerobic deterioration of silage: causes and controls. *Proc. Alltech's 23rd Annual Symposium «Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries»*. Nottingham, 2007: 227-238.
40. Guo K.H.S., Cheng W., Tao L., Zhu Yu., Zhou H. Contribution of endo — and exopeptidases to formation of nonprotein nitrogen during ensiling of alfalfa. *Proc. KHVI International Silage Conference*. Hämeenlinna, 2012: 58-59.
41. McKersie B.D. Effect of pH on proteolysis in ensiled legume forage. *Agron. J.*, 1983, 77(1): 81-86 (doi: 10.2134/agronj1985.00021962007700010019x).
42. Tao L., Guo X.S., Zhou H., Undersander D.J., Nandety A. Short communication: characteristics of proteolytic activities of endo- and exopeptidases in alfalfa herbage and their implications for proteolysis in silage. *J. Dairy Sci.*, 2012, 95(8): 4591-4595 (doi: 10.3168/jds.2012-5383).
43. Filya I., Muck R.E., Contreras-Govea F.E. Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value. *J. Dairy Sci.*, 2007, 90: 5108-5114 (doi: 10.3168/jds.2006-877).
44. Shifer K., Shtainkhefel' O., Nad' B. *Novoe sel'skoe khozyaistvo*, 2007, 4: 74-78 (in Russ.).
45. Hashemzadeh-Cigari F., Khorvash M., Chorhani G.R., Taghizadeh A. The effects of wilting, molasses and inoculants on the fermentation quality and nutritive value of lucerne silage. *S. Afr.*

- J. Anim. Sci.*, 2011, 41(4): 377-388 (doi: 10.4314/sajas.v41i4.8).
46. Kosolapov V.M., Bondarev V.A., Panov A.A., Akhlamov Yu.D., Udalova E.V., Isaenkov N.I., Anisimov A.A., Otroshko S.A., Klimenko V.P. *Tekhnologiya silosovaniya vysokobelkovykh mnogoletnikh bobovykh trav s polifermentnym preparatom Ferkon (rekomentatsii)* [Silaging of high-protein perennial legumes using multi enzyme preparation Ferkon — recommendation]. Moscow, 2008 (in Russ.).
  47. Smitt K.-O., Pratz H. Mit Luzerne die Futtergrundlage. *Rheinische Bauer Zeitung*, 1996, 5: 20.
  48. Kung L.J., Taylor C.C., Lynch M.P., Neylon J.M. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2003, 86: 336-343 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73611-X).
  49. Ranjit N.K., Taylor C.C., Kung L. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability, and nutritive value of maize silage. *Grass Forage Sci.*, 2002, 57: 72-81 (doi: 10.1046/j.1365-2494.2002.00304.x).
  50. Kristensen N.B., Sloth K.H., Højberg O., Spliid N.H., Jensen C., Thøgersen R. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *J. Dairy Sci.*, 2010, 93: 3764-3774 (doi: 10.3168/jds.2010-3136).
  51. Tabacco E., Righi F., Quarantelli A., Borreani G. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. *J. Dairy Sci.*, 2011, 94: 1409-1419 (doi: 10.3168/jds.2010-3538).
  52. Shah A.A., Xianjun Y., Zhihao D., Siran W., Tao S. Effect of lactic acid bacteria on ensiling characteristics, chemical composition and aerobic stability of king grass. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 2017, 27: 747-755.
  53. Randby A.T., Gismervik K., Andersen A., Skaar I. Effect of invasive slug populations (*Arion vulgaris*) on grass silage: I. Fermentation quality, in-silo losses and aerobic stability. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 2015, 199: 10-19 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2014.09.026).
  54. Marchenko F.Yu., Zabashta N.N., Golovko E.N. *V sbornike nauchnykh trudov Severo-Kavkazskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta zhitovnovodstva* [In: Scientific papers of North-Caucasian Research Institute of Animal Husbandry]. Krasnodar, 2016: 182-188 (in Russ.).
  55. Amerkhanov Kh.A., Tyapugin E.A., Simonov G.A., Tyapugin S.E. *Effektivnost' vedeniya molochnoego skotovodstva v usloviyakh Evropeiskogo Severa Rossii* [Effective dairy cattle farming in the European North of Russia]. Moscow, 2001 (in Russ.).
  56. Kurnaev O.M. Vplyv tekhnologii zagotivli sinazhu na vtraty syrogo proteinu ta iogo fraktsiinyi sklad uprodovzh zberigannya. *Kormi i kormovirobnitstvo. Mizhvidomchii tematichnii naukovii zbirnik (Vinnitsya)*, 2010, 66: 274-280.
  57. Moran J.P., Owen T.R. The effect of bacterial inoculant on the fermentation of lucerne silage. *Proc. KHI International Silage Conference*. Aberystwyth, 1996: 166-167.
  58. Fijałkowska M., Pysera B., Lipiński K., Strusińska D. Changes of nitrogen compounds during ensiling of high protein herbage — a review. *Ann. Anim. Sci.*, 2015, 15(2): 289-305 (doi: 10.1515/aoas-2015-0008).
  59. Ilyaletdinov N.K., Akhmediev A.N. *Izvestiya AN SSSR. Seriya biologicheskaya*, 1979, 3: 427-434 (in Russ.).
  60. Rigó E., Zsédely E., Tóth T., Schmidt J. Ensiling alfalfa with hydrolyzed corn meal additive and bacterial inoculant. *Acta Agronomica Óvariensis*, 2011, 53(2): 15-23.
  61. Lynch J.P., Jin L., Lara E.C., Baah J., Beauchemin K.A. The effect of exogenous fibrolytic enzymes and a ferulic acid esterase producing inoculant on the fibre degradability, chemical composition and conservation characteristics of alfalfa silage. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 2014, 193: 21-31 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2014.03.013).
  62. Tabacco E., Borreani G., Crovetto G.M., Galassi G., Colombo D., Cavallarin L. Effect of chestnut tannin on fermentation quality, proteolysis, and protein rumen degradability of alfalfa silage. *J. Dairy Sci.*, 2006, 89(12): 4736-4746 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72523-1).
  63. Kurtoglu V., Coskum B. Effect of bacterial adding alfalfa silage on milk yield and milk composition of dairy cattle. *Revue Méd. Vét.*, 2003, 154(12): 755-762.
  64. Mohammed R., Stevenson D.M., Beauchemin K.A., Muck R.E., Weimer P.J. Changes in ruminal bacterial community composition following feeding of alfalfa ensiled with a lactic acid bacterial inoculant. *J. Dairy Sci.*, 2012, 95(1): 328-339 (doi: 10.3168/jds.2011-4492).
  65. Silva V.P., Pereira O.G., Leandro E.S., Da Silva T.S., Ribeiro K.G., Mantovani H.C., Santos S.A. Effects of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential on the fermentation profile and chemical composition of alfalfa silage in tropical conditions. *J. Dairy Sci.*, 2016, 99(3): 1895-1902 (doi: 10.3168/jds.2015-9792).
  66. Tao L., Zhou H., Zhang N., Si B., Tu Ya., Ma T., Diao Q. Effects of different source additives and wilt conditions on the pH value, aerobic stability, and carbohydrate and protein fractions of alfalfa silage. *Anim. Sci. J.*, 2017, 88(1): 99-106 (doi: 10.1111/asj.12599).
  67. Lück E. *Chemische Lebensmittelkonservierung*. Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, 1985.
  68. CHukanov N.K., Popenko A.K. *Mikrobiologiya konservirovaniya trudnosilosuemnykh rastenii* Microbiology of preservation of plants which are hard to be silage]. Alma-Ata, 1986 (in Russ.).
  69. McDonald P. *Biokhimiya silosa* [Silage biochemistry]. Moscow, 1985 (in Russ.).