

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИФИТНОЙ МИКРОФЛОРЫ КАК ИСТОЧНИКА ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА СИЛОСА МЕТОДОМ NGS-СЕКВЕНИРОВАНИЯ*

Е.А. ЙЫЛДЫРЫМ¹, Г.Ю. ЛАПТЕВ¹, Л.А. ИЛЬИНА¹, И.Н. НИКОНОВ¹,
В.А. ФИЛИППОВА¹, В.В. СОЛДАТОВА¹, Е.А. БРАЖНИК¹,
Н.И. НОВИКОВА¹, Т.Ю. ГАГКАЕВА²

Состав и структура эпифитной и силосной микрофлоры полностью определяет направленность процессов ферментации в силосной массе, оказывая непосредственное влияние на биохимические показатели качества. Молекулярно-генетические исследования микробиоты кормовых растений и силосуемой массы ограничены небольшим числом описаний состава и функций отдельных групп микроорганизмов. Сведения о разнообразии эпифитной микрофлоры и микробиоценоза силоса, полученные методом NGS (next generation sequencing), в литературе не представлены. Нами впервые использован этот подход для изучения микробиома филлосферы и силоса и описано его достаточно богатое (вопреки традиционным представлениям) родовое разнообразие, показано наличие патогенных и некультивируемых бактерий, в том числе обнаружены типичные обитатели желудочно-кишечного тракта млекопитающих. С помощью метода NGS-секвенирования мы проанализировали структуру бактериального сообщества филлосферы и силоса ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.), полученного в лабораторных условиях с применением химического консерванта AIV 2000 Plus (смесь муравьиной, пропионовой, бензойной кислот) («KEMIRA OYJ, Inc.», Финляндия). Состав, численность и разнообразие микробиоты силоса исследовали в динамике на разных этапах его созревания (3-и, 7-е, 14-е и 30-е сут). Результаты показали, что структура бактериального сообщества силосной массы *D. glomerata* резко отличалась от состава микроорганизмов филлосферы и менялась в значительной степени в процессе сукцессии, происходящей во время созревания силоса в присутствии смеси органических кислот. Структура эпифитной микрофлоры *D. glomerata* включала главным образом представителей фило *Proteobacteria* (94,10 %), силоса — фил *Bacteroidetes* (до 59,50 %) и *Firmicutes* (до 74,90 %). В силосе таксономическое разнообразие бактерий порядка *Lactobacillales*, играющих ключевую роль при силосовании, было представлено родами *Lactobacillus* (до 39,6 %), *Enterococcus* (до 36,36 %), *Lactococcus* (до 14,40 %), *Pediococcus* (до 1,45 %), семейством *Leuconostocaceae* (до 3,52 %). Интересен тот факт, что в силосе были обнаружены микроорганизмы фило *Bacteroidetes*, представители семейств *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* и *Selenomonadales*, которые традиционно считались типичными обитателями желудочно-кишечного тракта млекопитающих, а также некультивируемые и патогенные бактерии (15 родов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе роды *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia* и др., среди которых встречаются опасные возбудители заболеваний млекопитающих). На 3-и и 7-е сут силосования доминировали представители фило *Bacteroidetes* (соответственно 59,53 и 48,91 %), на 14-30-е сут — главным образом, представители фило *Firmicutes* (до 74,85 %), при этом основная доля приходилась на факультативно-анаэробные молочнокислые бактерии порядка *Lactobacillales* (до 74,76 %). Всего в филлосфере методом NGS-секвенирования атрибутировано 70 родов микроорганизмов, в силосе — 84 на 3-и сут, 96 на 7-е сут, 51 на 14-е сут и 69 на 30-е сут. Использование классических методов микробиологии не позволяло ранее выявить присутствие этих бактерий в составе силосной микробиоэкосистемы.

Ключевые слова: микрофлора силоса, эпифитная микрофлора, NGS-секвенирование, органические кислоты.

Российская Федерация занимает первое место в мире по объемам производства силоса (30-40 млн т/год) (1). Обеспечение безопасными объемами кормами собственной заготовки (силос, сенаж, зерносенаж, сено) определяет качество молока, которое крайне важно для производства детского питания, функциональных молочных продуктов, сыров.

Микробиоценоз силоса формируется из эпифитных микроорганизмов, присутствующих на кормовых культурах. Состав и структура эпифитной и силосной микрофлоры обуславливают направленность процессов

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-16-00114).

ферментации в силосной массе, непосредственно влияя на биохимические показатели качества силоса (2-4). Современные молекулярные методы дополнили классические приемы идентификации в микробиологии (2-6). Эти методы не требуют предварительного выделения микроорганизмов, что позволило обнаружить объекты, которые не поддаются культивированию, но при этом, как оказалось, составляют до 99 % микробиоты (7).

Молекулярно-генетические исследования микробиоты кормовых растений и силосуемой массы ограничены небольшим числом описаний состава и функций отдельных групп микроорганизмов (8-11). Сведения о разнообразии эпифитной микрофлоры и микробиоценоза силоса, полученные методом NGS (next generation sequencing), в литературе не представлены.

В этой работе нами впервые изучен микробиом филлосферы и силоса с использованием NGS-секвенирования и описано его достаточно богатое родовое разнообразие (вопреки традиционным представлениям), наличие патогенных и некультивируемых бактерий. В том числе, в силосе обнаружены бактерии филы *Bacteroidetes* и представители семейств *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* и *Selenomonadales*, которые считаются типичными обитателями желудочно-кишечного тракта млекопитающих.

Нашей целью был анализ состава и структуры бактериального сообщества филлосферы и силоса из ежи сборной в процессе его созревания с помощью NGS-секвенирования.

Методика. В модельном силосовании в лабораторных условиях использовали растительную массу ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.) первого укоса (фаза выхода в трубку, влажность 84,7 %) с применением химического консерванта AIV 2000 Plus (смесь муравьиной, пропионовой, бензойной кислот) («KEMIRA OYJ, Inc.», Финляндия) в дозе 4 мл/кг. Растительную массу (320 г) в вакуумных полиэтиленовых пакетах хранили в термостатной комнате при температуре 26 ± 1 °C.

Тотальную ДНК выделяли с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas, Inc.», Литва) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию ДНК в растворе измеряли на флуориметре Qubit («Invitrogen, Inc.», США) с набором Quant-iT dsDNA Broad-Range Assay Kit («Invitrogen, Inc.», США) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР выполняли на ДНК-амплификаторе Verity («Life Technologies, Inc.», США), используя зубактериальные праймеры (IDT) 343F (5'-CTCCTACGG-RRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), фланкирующие участок V1V3 гена 16S-rPHK. Метагеномное секвенирование фрагмента гена 16S-rPHK проводили на установке MiSeq («Illumina, Inc.», США; погрешность — 5 %) с набором MiSeq Reagent Kit v3 («Illumina, Inc.», США). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2×300 нт. Химерные последовательности исключали из анализа с помощью программы USEARCH 7.0 (<http://drive5.com/usearch/>). Обработка ридов с помощью биоинформатической платформы CLC Bio GW 7.0 («Qiagen N.V.», Нидерланды) включала анализ перекрытия, фильтрацию по качеству (QV > 15), триммирование праймеров. Определение таксономической принадлежности микроорганизмов до рода проводили с применением программы RDP Classifier (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

Математическую и статистическую обработку результатов (множественный корреляционный и дисперсионный анализ) проводили в программе Microsoft Excel 2010. Для оценки состояния микробиоэкосистемы рассчитывали индекс доминирования Симпсона и индекс биоразнообразия Шеннона (12).

Результаты. Выявленная структура бактериального сообщества си-

лосной массы резко отличалась от таковой в филлосфере и значительно менялась в процессе сукцессии по мере созревания силоса.

Анализ показал, что состав микробиоценоза филлосферы и силоса характеризовался достаточно богатым родовым разнообразием вопреки общепринятым представлениям (2-6). В составе эпифитной микрофлоры ежи сборной нами было выявлено 70 родов бактерий, в силосе — от 51 до 96 родов. Наибольшее родовое разнообразие в микробиоэкосистеме силоса отмечали на 3-7-е сут — видимо, вследствие того, что на начальных этапах созревания силоса величина рН близка к слабокислому или нейтральному значению при высоком окислительно-восстановительном потенциале, поэтому условия для развития большинства микроорганизмов благоприятны (2-4).

Эпифитная микрофлора *D. glomerata* L. включала главным образом представителей филы *Proteobacteria* (94,08 %) — бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, рода *Pseudomonas*, а также порядка *Burkholderiales*. Среди семейства *Enterobacteriaceae* доминировал роды *Serratia* и *Pantoea*. Эти результаты несколько противоречат традиционному мнению о том (13, 14), что род *Erwinia* — доминирующий представитель семейства *Enterobacteriaceae* в составе эпифитной микрофлоры.

1. Структура бактериального сообщества (встречаемость таксона, %) филлосферы и силоса из ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.) на разных этапах созревания в лабораторных условиях

Таксон	Филлосфера	Созревание силоса, сут			
		3-и	7-е	14-е	30-е
Фила <i>Firmicutes</i>	0,20	20,70	22,20	71,30	74,90
порядок <i>Lactobacillales</i>	0,07	0,02	7,80	71,30	74,80
некультивируемые <i>Lactobacillales</i>	—	—	0,06	0,11	0,07
семейство <i>Lactobacillaceae</i>	—	0,01	1,50	40,20	32,70
род <i>Lactobacillus</i>	—	0,01	1,50	39,60	31,20
род <i>Pediococcus</i>	—	—	0,07	0,55	1,50
семейство <i>Enterococcaceae</i>	0,04	0,01	1,90	12,40	36,40
семейство <i>Streptococcaceae</i>	—	—	4,00	14,40	3,90
семейство <i>Leuconostocaceae</i>	0,03	—	0,31	3,50	1,60
некультивируемые <i>Lactobacillaceae</i>	—	—	—	0,77	0,21
семейство <i>Bacillaceae</i>	0,12	—	0,04	—	0,08
род <i>Staphylococcus</i>	0,02	—	—	—	—
семейство <i>Clostridiaceae</i>	—	0,65	0,45	—	—
семейство <i>Ruminococcaceae</i>	—	10,90	7,40	—	—
семейство <i>Lachnospiraceae</i>	—	1,30	1,00	—	—
некультивируемые <i>Clostridiales</i>	—	4,40	3,20	—	—
порядок <i>Selenomonadales</i>	—	3,40	2,30	—	0,01
род <i>Erysipelothrix</i> sp.	—	0,04	—	—	—
Фила <i>Actinobacteria</i>	0,06	—	—	0,01	0,14
Фила <i>Proteobacteria</i>	94,10	0,03	14,30	26,60	20,60
семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	67,60	0,01	14,30	26,50	20,20
род <i>Pseudomonas</i>	23,40	—	—	0,01	0,06
порядок <i>Rhizobiales</i>	0,08	—	0,01	0,04	0,10
порядок <i>Burkholderiales</i>	3,00	0,02	0,01	0,02	0,24
Фила <i>Bacteroidetes</i>	2,30	59,50	48,90	0,18	0,20
Неидентифицированные бактерии	0,34	7,80	11,30	0,21	0,01
Прочие	3,00	12,00	3,30	1,70	4,20
Всего родов	70	84	96	51	69

Примечание. Прочерки означают, что микроорганизмы присутствовали в количестве ниже предела достоверного определения методом NGS-секвенирования.

Резкое снижение рН, создание условий, близких к анаэробным, изменение температуры, содержания сухого вещества и др. приводили к кардинальным сдвигам в структуре микробиоценоза. Так, в составе бактериального сообщества на 3-и и 7-е сут силосования доминировали представители филы *Bacteroidetes* (соответственно 59,53 и 48,91 %). Увеличение численности бактерий филы *Bacteroidetes* в силосе указывает на отклонения от оптимального процесса силосования, поскольку эти микроорганизмы обладают сахаролитическими свойствами и способны к

утилизации полисахаридов, прежде всего крахмала (15-17). При правильном силосовании эпифитные лактобактерии начинают активно размножаться, накапливаясь в геометрической прогрессии и занимая доминирующее положение уже на 3-5-е сут силосования (2-6). Вероятно, смесь органических кислот использованного консерванта ингибировала рост эпифитных лактобактерий, что повлекло закономерное увеличение численности нежелательной микрофлоры.

Отметим, что использование классических микробиологических методов не позволяло выявить в силосе бактерии филы *Bacteroidetes* (2-6), которые традиционно считались типичными обитателями желудочно-кишечного тракта млекопитающих (15-17). Стоит обратить особое внимание и на значительное содержание в силосе других типичных обитателей желудочно-кишечного тракта млекопитающих (15-17): представителей семейств *Ruminococcaceae* (до 10,88 %), *Lachnospiraceae* (до 1,33 %), а также порядка *Selenomonadales* (до 3,36 %). В качестве основных источников питательных веществ бактерии, принадлежащие к семействам *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae*, помимо целлюлозы, целлобиозы и ксилана, используют некоторые моносахара, конкурируя за субстрат с молочнокислыми бактериями. Присутствие бактерий порядка *Selenomonadales* также нежелательно для силосования: они способны сбрасывать органические кислоты, противодействуя снижению pH (15-17). В классической микробиологии эти таксоны в силосе не описаны (2-6).

На 14-30-е сут доминировали представители филы *Firmicutes* (до 74,85 %), в которой основную долю составляли факультативно-анаэробные молочнокислые бактерии порядка *Lactobacillales* (до 74,76 %). Преобладание молочнокислых бактерий на более поздних этапах сукцессии связано с устойчивостью последних к снижению pH до 3,0-3,5 (18), что делает их крайне конкурентоспособными в условиях анализируемой экосистемы. Эти бактерии играют ключевую роль в формировании микрофлоры силоса, поскольку образуют в качестве основного продукта метаболизма молочную кислоту (19), что способствует снижению pH и угнетению нежелательной микрофлоры (2-6).

Таксономическое разнообразие порядка *Lactobacillales* было представлено родами *Lactobacillus* (до 39,60 %), *Enterococcus* (до 36,36 %), *Lactococcus* (до 14,40 %), *Pediococcus* (до 1,45 %), семейством *Leuconostocaceae* (до 3,52 %), а также некультивируемыми формами (до 0,77 %). Наши результаты совпадают с описанными в литературе данными (8, 20-22). Так, при секвенировании ДНК 161 изолята молочнокислых бактерий, выделенных из рисового силоса (8), показано, что среди них доля *Lactobacillus plantarum* составляла 24 %, *Lactococcus lactis* — 22 %, *Leuconostoc pseudomesenteroides* — 20 %, *Pediococcus acidilactici* — 11 %, *Lactobacillus brevis* — 11 %, *Enterococcus faecalis* — 7 %, *Weissella kimchii* — 3 % и *Pediococcus pentosaceus* — 2 %.

Количество бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в метагеноме сообщества в силосе составляло от 0,01 до 26,49 %, тогда как в составе эпифитной микрофлоры ежи сборной — 67,58 %, то есть значительно больше. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* нежелательны для силосования, поскольку, ферментируя углеводы, конкурируют за источники питания с молочнокислыми бактериями и оказывают противодействие снижению pH. В микробиоэкосистеме силоса из ежи сборной, помимо некультивируемых представителей, выявили 15 родов семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе роды *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia* и др., среди которых встречаются опасные возбудители различных заболеваний млекопитающих. Присутствие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* на 3-и сут силосования было

незначительным (вероятно, эти микроорганизмы ингибировались органическими кислотами), однако после 7-х сут их количество резко возрастало вплоть до 14-х сут. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* в силосе описаны уже достаточно давно (5, 23, 24). В силосе мы также обнаружили некультивируемые микроорганизмы. Так, доля некультивируемых представителей порядка *Clostridiales* на 3-и и 7-е сут силосования составляла соответственно 4,39 и 3,19 %. При силосовании присутствие бактерий *Clostridiales* нежелательно, поскольку они, помимо сахаров, способны расщеплять органические кислоты и протеин (2-6).

Доля бактерий филы *Bacteroidetes*, семейств *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, порядка *Selenomonadales*, а также некультивируемых представителей порядка *Clostridiales* была наибольшей на 3-7-е сут силосования, с 14-х по 30-е сут она резко снижалась. Вероятно, это связано с тем, что нижний порог кислотности для большинства представителей этих таксонов находится в пределах pH 4,5-5,0 (15-17).

Минорными (менее 1 %) таксонами в силосе оказались представители семейств *Clostridiaceae* и *Bacillaceae*, филы *Actinobacteria*, рода *Pseudomonas*, порядков *Rhizobiales* и *Burkholderiales*, тогда как в составе эпифитной микрофлоры представители рода *Pseudomonas* и порядка *Burkholderiales* обнаруживались в значительном количестве (соответственно 23,40 и 3,02 %). Вероятно, ингибирующее действие на эти микроорганизмы оказал низкий окислительно-восстановительный потенциал и снижение pH.

Кроме того, из патогенных для млекопитающих микроорганизмов в составе эпифитной микрофлоры были обнаружены представители рода *Staphylococcus*, а в силосе 3-и сут — представителей рода *Erysipelothrix*, не выявляемые ранее методами классической микробиологии (2-6).

Таким образом, микробиологические сообщества филлосферы и силоса характеризовались значительным богатством состава, что подтвердили расчеты индексов разнообразия Шеннона и Симпсона (табл. 2).

2. Характеристика биоразнообразия бактериального сообщества филлосферы и силоса из ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.) на разных этапах созревания в лабораторных условиях

Индекс	Филлосфера	Силос по срокам созревания, сут			
		3-и	7-е	14-е	30-е
Индекс Шеннона	1,80	2,60	2,90	2,00	2,00
Индекс Симпсона	0,76	0,86	0,90	0,80	0,79

На 3-и и 7-е сут созревания величина индекса Шеннона H была самой высокой (соответственно 2,6 и 2,9), что указывает на наибольшую неопределенность и неоднородность состава микробиоценоза по сравнению с микробиологическим составом эпифитов. Наибольшее родовое разнообразие микроорганизмов (соответственно 84 и 96 родов) и самые высокие значения показателей индекса Симпсона D, характеризующего доминирование, также свидетельствовали о накоплении энтропии и определенной дезорганизации микробного сообщества в эти периоды силосования. Судя по значениям экологических индексов, несколько большей однородностью характеризовалась структура микробиоценоза силоса на 14-е и 30-е сут. Следовательно, в процессе созревания силоса происходила некоторая стабилизация микробиоценоза.

Итак, молекулярно-генетические методы анализа структуры микробиоценоза филлосферы и силоса ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.) на разных стадиях созревания позволили впервые изучить все микробное разнообразие этой микробиоэкосистемы. Как показали наши исследования, структура бактериального сообщества силосной массы резко отли-

чалась от состава микроорганизмов филлосферы и значительно изменялась при сукцессии в период созревания силоса. Вопреки традиционным представлениям, структура микробиоценоза филлосферы и силоса характеризовалась крайне богатым таксономическим разнообразием. В составе эпифитной микрофлоры и силосе выявлены таксоны, играющие важнейшую экологическую роль, которые не удавалось обнаружить ранее методами классической микробиологии.

¹ООО «Биотроф+»,

196602 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин,

ул. Малиновская, 8, лит. А, пом. 7-Н,

e-mail: deniz@biotrof.ru, laptev@biotrof.ru, ilina@biotrof.ru, nikonov@biotrof.ru, dumova@biotrof.ru, biotrof@biotrof.ru, bea@biotrof.ru;

²ФГБНУ Всероссийский НИИ защиты растений,

196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,

e-mail: t.gagkaeva@mail.ru

Поступила в редакцию

30 июня 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 6, pp. 832–838

THE INVESTIGATION OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS AS A SOURCE FOR SILAGE MICROBIOCENOSIS FORMATION USING NGS-SEQUENCING

E.A. Yildirim¹, G.Yu. Laptev¹, L.A. Il'ina¹, I.N. Nikonov¹, V.A. Filippova¹, V.V. Soldatova¹, E.A. Brazhnik¹, N.I. Novikova¹, T.Yu. Gagkaeva²

¹*Biotrof+ Ltd*, 7-N, 8, lit. A, Malinovskaya ul., St. Petersburg, 196602 Russia, e-mail deniz@biotrof.ru, laptev@biotrof.ru, ilina@biotrof.ru, nikonov@biotrof.ru, dumova@biotrof.ru, biotrof@biotrof.ru, bea@biotrof.ru;

²*All-Russian Research Institute of Plant Protection*, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail t.gagkaeva@mail.ru

Acknowledgements:

Supported by grant of Russian Science Foundation, project № 14-16-00114

Received June 30, 2015

doi: 10.15389/agrobiol.2015.6.832eng

Abstract

The composition of plant and silage microflora affects the fermentation processes in the silage and its final quality. To date, reports about studying fodder plants and silage microbiota by means of molecular genetic methods are few and limited to descriptions of composition and function of some groups of microorganisms. Moreover, the NGS (next generation sequencing) data on diversity of epiphytic microflora and silage microbiocoenosis are not still reported. We first used this approach in studying phyllosphere and silage microbiom, and reported it to be rather rich in composition and abundance that is in contrast with conventional understanding. At that, the pathogenic and non-culturable microbes were detected in the microbiota, including specific inhabitants of mammalian gastrointestinal tract. So using NGS we examined the structure and diversity of bacterial community of *Dactylis glomerata* L. harvested plants and the biomass ensilaged with chemical preservative AIV 2000 Plus («KEMIRA OYJ, Inc.», Finland) composed of mixture of formic, propionic and benzoic acids. Assays were carried out on days 3, 7, 14 and 30 of ensilaging. The results showed that the bacterial community of silage from *D. glomerata* sharply differed from the composition of foliage microorganisms and varied greatly in the course of successive changes which occurred during maturation of silage preserved by mixture of organic acids. The composition of plant microorganisms and silage were found to be very various in contrast with a traditional view. Among foliar microorganisms of *D. glomerata* there were mostly the bacteria of phylum *Proteobacteria* (94.1 %), and in the silage the bacteria of phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes* were main representatives (up to 59.5 % and 74.9 %, respectively). In taxonomic diversity of the order *Lactobacillales*, mainly involved in ensilaging, there were genera *Lactobacillus* (up to 39.6%), *Enterococcus* (up to 36.36 %), *Lactococcus* (up to 14.4 %), *Pediococcus* (to 1.45 %) and the family *Leuconostocaceae* (to 3.52 %). Interestingly, in the silage there were the bacteria of phylum *Bacteroidetes*, families *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* and *Selenomonadales* considered the common inhabitants of the mammals' gastrointestinal tract, and also the uncultured and pathogenic microorganisms. Particularly, these were 15 genera of family *Enterobacteriaceae*, including genera *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia*, etc., among which the dangerous mammalian pathogens are frequent. On days 3 and 7, the phylum *Bacteroidetes* prevailed (59.53 and 48.91 %, respectively). On days 14 and 30, the phylum *Firmicutes* was dominant (up to 74.85 %) with the facultative aerobic bacteria of order *Lactobacillales* mostly found (up to 74.76 %). Using

NGS, a total of 70 genera were attributed in the plant phylosphere, and in the silage there were 84 genera on day 3, 96 genera on day 7, 51 genera on day 14, and 69 genera on day 30. Classical microbiology methods are not enough to detect these bacteria among silage microbiota.

Keywords: silage microorganisms, epiphytic microflora, NGS-sequencing, organic acids.

REFERENCES

1. Kosolapov V.M., Trofimov I.A. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury*, 2013, 6(2): 59-63.
2. Mak-Donal'd P. *Biokhimiya silosa* [Silage biochemistry]. Moscow, 1985.
3. Lin C., Bolsen K.K., Brent B.E., Hart R.A., Dickerson A.M., Feyerherm A.M., Aimutis W.R. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. *J. Dairy Sci.*, 1992, 75: 2484-2493 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(92)78010-2).
4. Corsetti A., Gobetti M., Rossi J., Damiani P. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CBI. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 50: 253-256 (doi: 10.1007/s002530051285).
5. Mansfield M.A., Kuldau G.A. Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage. *Mycologia*, 2007, 99: 269-278 (doi: 10.3852/mycologia.99.2.269).
6. Driehuis F. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agricult. Food Sci.*, 2013, 22: 16-34.
7. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microb. Rev.*, 1995, 59: 143-169.
8. Said E., Yimin C., Yasuhito F. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(1): 444-451 (doi: 10.1128/AEM.69.1.444-451.2003).
9. Eikmeyer F.G., Köfinger P., Poschenel A., Jünemann S., Zakrzewski M., Heinl S., Mayrhuber E., Grabherr R., Pühler A., Schwab H., Schlüter A. Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling. *J. Biotechnol.*, 2013, 167(3): 334-343 (doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.07.021).
10. Muck E. Recent advances in silage microbiology. *Agricult. Food Sci.*, 2013, 22: 3-15.
11. Paola D., Ernesto T., Luca C., Giorgio B. Microbial dynamics during aerobic exposure of corn silage stored under oxygen barrier or polyethylene films. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77(21): 7499-7507 (doi: 10.1128/AEM.05050-11).
12. Lakin G.F. *Biometriya* [Biometry]. Moscow, 1990.
13. Voznyakovskaya Yu.M. V sbornike: *Ispol'zovanie mikroorganizmov v sel'skom khozyaistve* [In: Use of microorganisms in agriculture]. Moscow-Leningrad, 1962: 100-112.
14. Voznyakovskaya Yu.M. *Mikroflora rastenii i urozhai* [Plant microflora and yield]. Moscow, 1969.
15. Tarakanov B.V. *Metody issledovaniya mikroflory pishchevaritel'nogo trakta sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh i ptitsy* [Study of gastrointestinal microflora in farm animals and poultry]. Moscow, 2006.
16. Ling J.R., Robert E. Hungate's The rumen and its microbes after 25 years. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1991, 13(4): 179-181 (doi: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00602.x).
17. Ushakova N.A., Nekrasov R.V., Meleshko N.A., Laptev G.Yu., Il'ina L.A., Kozlova A.A., Nifatov A.V. *Mikrobiologiya*, 2013, 82(4): 456-563 (doi: 10.7868/S0026365613040125).
18. Kvasnikov E.I. *Biologiya molochnokisl'nykh bakterii* [Biology of lactic acid bacteria]. Tashkent, 1960.
19. Orla-Jensen S. *The lactic acid bacteria*. Copenhagen, 1919.
20. Lin C., Bolsen K.K., Brent B.E., Fung D.Y.C. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *J. Appl. Bacteriol.*, 1992, 73: 375-387 (doi: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04992.x).
21. Yang J., Cao Y., Cai Y., Terada F. Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *J. Dairy Sci.*, 2010, 93(7): 3136-3145 (doi: 10.3168/jds.2009-2898).
22. Pang H., Tan Z., Qin G., Wang Y., Li Z., Cai Y. Phenotypic and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from forage crops and grasses in the Tibetan Plateau. *J. Microbiol.*, 2012, 50: 63-71 (doi: 10.1007/s12275-012-1284-5).
23. Heron S.J.E., Wilkinson J.F., Carol M. D. Enterobacteria associated with grass and silages. *J. Appl. Bacteriol.*, 1993, 75: 13-17 (doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb03401.x).
24. Lindgren S., Petterson K.L., Jonsson A., Lingvall P., Kaspersson A. Silage inoculation: Selected strains, temperature, wilting and practical application. *J. Agric. Res.*, 1985, 15: 9-18.