

# ESTUDIO DE INOCULANTES PARA EL ENSILADO DE FORRAJES I: SELECCIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO PARA LA FORMULACIÓN DE UN INOCULANTE

VICENTE, F.<sup>1</sup>, SCOLLO, D.<sup>1</sup>, MORA, V.<sup>1</sup>,

GIRAUDO, M.<sup>1</sup>, RAMIREZ, E.<sup>2</sup> & RECHIMONT, R.<sup>2</sup>

## RESUMEN

Fueron seleccionados varios microorganismos (cinco) productores de ácido láctico, extraídos de pasturas y cepas del cepario del Laboratorio de la UNLa, en función de la resistencia a la acidez o al poder simbiótico que genera la asociación. Estos microorganismos fueron probados en microsilos experimentales conteniendo una mezcla de gramíneas con un 10% de trébol blanco. En los 5 casos se obtuvo una buena conservación de la pastura, y el mejor de ellos fue cuando los microorganismos se usaron mezclados en proporciones iguales.

*Palabras claves:* Ácido láctico, microorganismos, pasturas, silos, anaerobiosis, conservación, nutrición animal.

## SUMMARY

### **Study of inoculating for fodder silages I: selection of lactic acid produced bacteria to be used in silaged fodders.**

Several (five) lactic acid producer microorganisms were selected from forage silage samples taken at 7, 14 and 30 days from the beginning of the incubation considering their resistance to acidity or the symbiotic capacity produced by the association. These microorganisms were tested in experimental microsilos containing a mixture of ray-grass with 10% of white clover. A good preservation of the fodder was observed in the five cases, but the best result was obtained when the microorganisms were mixed in equal proportions.

*Key words:* lactic acid, microorganisms, fodder, silo, anaerobiosis, conservation, animal nutrition.

---

1.- Universidad Nacional de Lanús, 29 de Septiembre 3901. (1826) Lanús, provincia de Buenos Aires, tel.: (011) 6322-9200 int. 105, email: mgiraudd@unla.edu.ar

2.- NutriWorld Consultora.

Manuscrito recibido el 20 de marzo de 2008 y aceptado para su publicación el 21 de agosto de 2008.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas naturales o agregadas a los silos de pasturas en anaerobiosis acidifican el medio por transformación de los carbohidratos en ácido láctico, acético, propiónico, etc., inhibiendo el crecimiento de hongos y en especial la fermentación butírica. (Moon, 1983) (Muck, 1993). Esta disminución del pH ayuda a conservar nutrientes minimizando además la proteólisis y la desaminación que produce dicha fermentación butírica, manteniendo el valor proteico de las pasturas.

Estos cambios en el pH hacen que descienda la contaminación microbiana propia del proceso (Cai *et al.*, 1998, Sreenath *et al.*, 2001, Zahiroddini *et al.*, 2004).

Para mejorar el ensilado se ha agregado industrialmente tanto aditivos químicos como bacterias lácticas. Evidentemente los aditivos biológicos son mas ventajosos por ser mas seguros y fáciles de usar, no oxida la maquinaria y no contamina el medio ambiente ya que son considerados productos naturales (Weinberg y Muck, 1996).

Se han usado géneros *Lactobacillus*, lactococos y estreptococos. Inclusive, se adicionan a estos microorganismos diferentes enzimas previo al ensilado (Filya *et al.*, 2000).

## OBJETIVOS

- Seleccionar diferentes bacterias lácticas para ser ensayadas en microsilos experimentales y a futuro desarrollar un producto comercial si los resultados lo ameritan.

- Verificar su efecto sobre la calidad de la pastura ensilada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Debido a la gran cantidad de microorganismos encontrados, fue necesario realizar

ensayos “in Vitro” como metodología rápida para su selección. Para ello se aislaron por dilución/plaqueo, una serie de microorganismos provenientes de pasturas, que fueron desarrollados bajo atmósfera de nitrógeno para eliminar el crecimiento de microorganismos aeróbicos, trabajando a 30°C, en medios M17 y MRS (medios estándares para bacterias lácticas). De los microorganismos que crecieron en estas condiciones, las colonias aisladas de cocos, bacilos y estreptococos fueron pasadas a los correspondientes medios sugeridos por los proveedores de cultivos (Merck, Britania), a tubos agarizados. Verificada la pureza de estos microorganismos mediante estudios morfológicos (verificación de colonias y tinciones), se determinó por ensayo químico presencia/ausencia de ácido láctico en el medio.

## ENSAYOS REALIZADOS “IN VITRO”

### *Experiencia 1*

Se prepararon medios líquidos con base melaza, vitaminas, fosfatos, sales de magnesio, micronutrientes y peptonas (Medio Lacto I con pH inicial de 6.40) y fue esterilizado a 121°C. En condiciones de anaerobiosis (atmósfera de nitrógeno) fueron transferidos a tubos con agar los microorganismos aislados y posteriormente incubados a 30 °C durante 72 horas. Se determinó la presencia/ausencia de ácido láctico (ver Cuadro 1). En dicho medio crecieron, a las 72 hs, (verificado por turbidez) un gran número de microorganismos productores de ácido láctico: el Coco #1, los Estreptococos #5 y # 6, el Bacilo #1 y el Bacilo BP. Estos cinco microorganismos fueron los seleccionados para continuar con los estudios.

### *Experiencia 2*

Para verificar el efecto de la adición de

Cuadro 1: Crecimiento de Microorganismos y presencia/ausencia de ácido láctico.

Microorganismo	Medio Lacto I pH a las 72 hs	Crecimiento por turbidez	Presencia/Ausencia de ácido láctico
Coco#1	5,10	++	+
Coco#2	6,00	+	+
Coco#3	5,90	+	+
Coco#4	6,20	+	-
Coco#5	6,40	+	-
Estreptococo#1	6,30	+	-
Estreptococo#2	6,60	+	-
Estreptococo#3	4,80	++	+
Estreptococo#4	5,20	++	+
Estreptococo#5	3,10	++	+
Estreptococo#6	4,40	++	+
Bacilo#1	3,05	+++	+
Bacilo#2	4,20	++	+
Bacilo#3	4,30	++	+
Bacilo#4	3,80	+++	+
Bacilo BP	3,00	+++	+

glucosa, al medio Lacto I fueron agregados 0.5% de glucosa. Para estudiar la sinergia, se agregó una levadura que aparecía continuamente cuando se dejaban las cajas de Petri en aerobiosis (Cuadro 2).

### **Desarrollo del inoculante experimental UNLa 1**

10 mL de cultivo desarrollado en Lacto I + 15 g. de melaza 74° Brix, agua c.s.p. 1 litro. Se Usó 10 mL de la solución por Kg. de pastura.

Los inóculos utilizados fueron:

a) Cocos #1 crecidos en medio líquido con agregado de buffer específico. El recuento, usando metodología standard dio: más de  $10^{10}$  UFC/mL

b) Bacilos #1: crecidos en medio líquido con agregado de buffer específico. El recuento, usando metodología standard dio: más de  $10^{10}$  UFC/mL

c) Estreptococos #5: crecidos en medio

líquido con agregado de buffer específico. El recuento, usando metodología standard dio: más de  $10^{10}$  UFC/mL

d) Estreptococos #6: crecidos en medio líquido con agregado de buffer específico. El recuento, usando metodología standard dio: más de  $10^{10}$  UFC/mL

e) Bacilos BP: crecidos en medio líquido con agregado de buffer específico. El recuento, usando metodología standard dio: más de  $10^{10}$  UFC/mL

f) Levadura C: crecidas en medio Sabouroud líquido con un recuento de  $10^7$  UFC/mL

### **Ensayos realizados en microsilos experimentales**

A partir de los resultados “in vitro”, se diseñó el experimento con microsilos, en condiciones de anaerobiosis.

La pastura usada para llenar los microsilos fue una mezcla de gramíneas (cebadilla criolla semillando) con un 10 % de trébol blanco

Cuadro 2: Acción de los microorganismos sobre el pH en los diferentes medios.

Microorganismo	Medio Lacto I con glucosa		Medio Lacto I	
	pH final	Turbidez final	pH final	Turbidez final
Cocos#1	5.04	+	5.16	++
Bacilos#1	2.92	++	3.03	++
Estrepto#5	4.29	-	3.16	-
Estrepto#6	4.36	-	4.48	-
Bacilo BP.	2.97	+++	3.02	+++
Levaduras	6.36	+	5.28	-
Mezcla de Cocos#1 + Bacilos#1*	2.96	+	2.99	++
Mezcla de Cocos#1 + Estrepto#5*	4.12	-	4.50	-
Mezcla de Cocos#1 + Estrepto#6*	4.07	-	4.26	-
Mezcla de Cocos#1 + Bacilo BP. *	2.94	++	3.02	++
Mezcla de Cocos#1 + Levaduras*	4.45	++	3.15	++
Mezcla de Bacilo#1 + Estrepto#5*	2.93	++	3.04	++
Mezcla de Bacilo#1 + Estrepto#6*	2.95	++	3.01	++
Mezcla de Bacilo-1 + Bacilo BP*	2.96	++	3.02	+++
Mezcla de Bacilo#1 + Levaduras*	3.00	+++	3.02	+++
Mezcla de Estrepto#5 + Estrepto#6*	4.16	-	3.13	+++
Mezcla de Estrepto#5 + Bacilo BP *	2.96	+++	3.16	++
Mezcla de Estrepto#5 + Levaduras *	3.02	+	3.17	+
Mezcla de Estrepto#6 + Bacilo BP. *	3.00	++	4.12	+
Mezcla de Estrepto#6 + Levaduras *	4.01	+	4.12	++
Mezcla de Bacilo BP + Levaduras *	2.97	+++	3.05	++
Mezcla de Cocos#1 + Bacilos#1 + Estrepto#5 + Estrepto#6 + Bacilo BP*	2.98	+++	3.05	+++
Mezcla de Cocos#1 + Bacilos#1 + Estrepto#5 *	2.99	++	3.02	+++

\* Las mezclas son en proporciones iguales.

en floración, cortada a 5 cm. del piso, ensayo determinado mediante un cuadro de corte y evaluación botánica. La muestra fue recogida fresca en la Provincia de Buenos Aires y llevada al Laboratorio de Fermentaciones Industriales de la UNLa donde se determinó la materia seca. Para evitar la pérdida de la misma, las muestras fueron transportadas en bolsas plásticas siendo ensiladas tal cual.

La pastura fue cortada mecánicamente con una motoguadaña, pasandola más de una vez para poder picarla finamente. La misma fue tratada con el inoculante (ensa-

yo por triplicado) y ensilada en microsilos preparados por el laboratorio, consistentes en tubos de PVC de 11 cm de diámetro por 20 cm de alto, de aproximadamente 1.9 litros de capacidad, usando una prensa hidráulica para obtener una densidad de ensilado de aproximadamente 0.5 kg/dm<sup>3</sup>. (verificados posteriormente por la pesada). Los silos fueron cerrados convenientemente para mantener la anaerobiosis y fueron almacenados en un área oscura a temperatura ambiente. Se realizaron 3 tomas de muestras consecutivas: a los 60, 70 y a los 80 días, tomando un silo cada vez. Los silos abier-

tos fueron descartados.

Se determinó el nuevo contenido de materia seca, el pH, los azúcares solubles totales, la acidez total expresada como ácido láctico y el amoníaco libre. También, caracteres organolépticos (olor, color) y presencia /ausencia de hongos.

### **Metodología Analítica Usada**

**Materia Seca:** por secado a 105 °C hasta peso constante. Paralelamente se realizó la determinación con estufa infrarrojo, obteniéndose resultados similares (datos no mostrados)

**pH:** con pHmetro (1:2)

**Azúcares Solubles Totales:** (Dubois *et al.*, 1956), partiendo de 20 gramos de muestra en 100 mL de agua. Se hirvió la solución y se la enrasó a 250 mL. El estándar usado fue glucosa P.A.

**Acidez:** Se partió de 20 g. de muestra que se hirvió durante 15-20 minutos. Se Filtró por vacío, enrasando a 250 mL. Se tituló con NaOH 0.01 N. Paralelamente se realizó la determinación sin proceder al hervido, siendo los resultados los mismos (datos no mostrados)

**Amoníaco libre:** A la muestra húmeda se le agregó un exceso de base fuerte. Por destilación en corriente de vapor se recibió el amoníaco en un exceso de ácido bórico. Finalmente se tituló con ácido fuerte 0.05 N usando fenolftaleína como indicador.

**Detección de ácido láctico:** Se usó el test de L-Lactic Acid de Megazyme Ltd. basado en 2 reacciones enzimáticas, en donde el ácido láctico en presencia de lactato dehidrogenasa/NAD<sup>+</sup> dio ácido pirúvico, que, por acción de D-glutamato piruvato transaminasa (con un exceso de D-glutamato), fue transformado en D-alanina + 2-oxoglutarato. La cantidad de NADH formado de lee a 340nm. El límite de detección está en 0.21 ppm. El método no presentó interferencias.

**Color:** por observación visual

**Olor:** por observación

**Hongos:** se verificó su presencia/ausencia por observación visual.

## **RESULTADOS**

El Cuadro 1 muestra el crecimiento de los microorganismos y la presencia/ausencia de ácido láctico.

El Cuadro 2 presenta la acción de los microorganismos sobre el pH.

Se observa que:

1. El agregado de glucosa no aumentó la acidez del medio. Por lo tanto, se discontinúa su uso.

2. La presencia de levadura ayudó a disminuir el pH, ya que aceleró la anaerobiosis.

3. Los bacilos acidificaron más rápidamente en presencia de cocos y estreptococos (resultados no mostrados en el Cuadro 2) obteniéndose valores similares de pH.

4. La variable que acidificó más rápido fue la mezcla de microorganismos (cocos + bacilos + estreptococos).

Los Cuadros 3, 4 y 5 muestran el estado de cada silo al momento de la apertura.

### **NOTAS**

El testigo sin melaza presentó la peor conservación que el testigo con melaza. Ello fue debido a que la competencia microbiana desarrolló más bacterias no lácticas que las bacterias lácticas. No ocurrió lo mismo cuando se agregaron bacterias lácticas.

Con relación al hecho observado de que un silo a los 60 días (que estaba en mala condiciones) esté mejor a los 70 / 80 días, ello se debió a fallas en el sellado de los silos. También se observaron presencia de hongos superficiales en los microsilos mal sellados.

Cuadro 3: Resultados obtenidos a los 60 días

Cuadro 3 a los 60 días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Silo inoculado con	Cocos	Bacilos	Streptococos # 5	Streptococos # 6	Lactobacilos P	Levadura	Mezcla de microorganismos*	Muestra comercial en polvo	Testigo sin melaza	Testigo con Melaza	Mezcla de Lactobacilos P y Levadura
Materia Seca a 105%	35,50%	36,30%	37,60%	37,30%	36,00%	36,30%	37,90%	38,30%	36,90%	36,60%	34,60%
pH (1:2) con pHmetro	4,33	4,11	4,03	4,22	4,96	4,87	4,18	4,23	4,62	4,65	4,76
Azúcares totales (s/humeda) g glucosa/100g	0,27	0,36	0,44	0,22	0,13	0,1	0,38	0,34	0,09	0,12	0,07
Azúcares totales (s/seca) g glucosa/100g	0,78	0,99	1,17	1	0,37	0,29	1,06	0,91	0,26	0,35	0,2
Acidez (s/humeda) g Ac.Láctico/100g	1,71	1,82	1,91	1,74	1,36	1,37	1,76	2	1,57	1,23	1,18
Acidez (s/seca) g Ac.Láctico/100g	4,8	5	5	4,6	3,7	3,7	4,6	5,2	4,2	3,3	3,4
Amoniaco Libre (s/humeda) mgN/100g	113,1	71,6	85,1	84,6	111,7	111,8	95,5	97,2	105,2	121,2	119,5
Amoniaco Libre (s/seca) mgN/100g	318,6	197,2	226,3	226,8	310,3	308	252	253,8	285,1	331,4	345,4
Color	Verde oscuro - No atabacado	-	Verde claro	Verde oscuro	-	-	Verde oscuro - No atabacado	Verde Claro	Verde más grisáceo	-	-
Olor	Amoniaco	Agradable Aceituna (++++)	Vinagre (+)	Agradable, algo de láctico (++++)	No olor amoniaco. Agradable, Aceituna (++++)	Ácido + alcohólico	Agradable, a láctico picante (+++)	Agradable, leve aceituna (++++)	Pasto húmedo. Ni aceituna ni alcohólico	A podrido, a hongo,	Mal olor y amoniaco
Humedad	-	-	-	-	-	-	-	-	Se nota mas seco al tacto	Se nota mas seco	-
Hongos	-	Capa superior con Hongos (silo roto)	Bordes con hongos	NO crecimiento de hongos en superficie	NO crecimiento de hongos en superficie	NO crecimiento de hongos en superficie	Hongos en superficie	No hongos en superficie	-	Hongos en superficie	Hongos en superficie

Cuadro 4: Resultados obtenidos a los 70 días.

Cuadro 4 a los 70 días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Silo inoculado con	Cocos	Bacilos	Streptococos # 5	Streptococos # 6	Lactobacilo P	Levadur a	Mezcla de micro-organismos*	Muestra comercial en polvo	Testigo sin melaza	Testigo con Melaza	Mezcla de Lactobacilo P y Levadura
Materia Seca a 105%	36	35,9	36,5	34,5	37,6	35,1	36,7	38,1	35,2	34,1	36,3
pH (1:2) con pHmetro	4,05	4,05	4,18	4,04	4,35	4,92	4,08	4,15	4,79	4,83	4,62
Azúcares totales (s/humeda) g glucosa/100g	0,62	0,63	0,48	0,65	0,45	0,25	0,78	0,52	0,28	0,27	0,23
Azúcares totales (s/seca) g glucosa/100g	1,72	1,75	1,31	1,88	1,19	0,71	2,12	1,36	0,79	0,79	0,63
Acidez (s/humeda) g Ac.Láctico/100 g	1,81	2,14	1,69	1,89	1,86	1,2	1,99	1,89	1,35	1,37	1,47
Acidez (s/seca) g Ac.Láctico/100 g	5,02	5,96	4,63	5,47	4,94	3,41	5,42	4,96	3,83	4,01	4,04
Amoniaco Libre (s/humeda) mgN/100g	75,8	106,5	91,6	83,4	98,1	113	98	96,3	101	99,7	103
Amoniaco Libre (s/seca) mgN/100g	210,5	296,6	250,9	241,7	260,9	321,9	267	252,7	286,9	292,3	283,7
Color	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde oscuro, buen color		Verde oscuro (++++)	Verde oscuro (++++)	Buen color, verde oscuro	Idem al 5	Verde oscuro, buen color	Verde casi original del pasto	Verde bueno
Olor	Suave; aceituna agradable	Ácido picante	Aceituna suave levemente avinagrado	Pasto (++)	Aceituna (++++)	Aceituna suave (+++)	Aceituna (++++)	Dulce en superficie, y suave aceitunado dentro	Desagradable, putrefacto, picante.	Feo, desagradable	Característico
Humedad	Húmedo	Cierre con pelos. Mas seco que el 1ro	Humedad menor al 1ro	Cierre con pelos, está como si faltara fermentar	Muy húmedo	Húmedo = al 5to	Húmedo menor al 5to	Húmedo	Olor desagradable, bastante húmedo	Húmedo	Húmedo menor que el 6to
Hongos	No	Si, en superficie	No	Si	No	No	No	No	Si, en extremos	Si	Si, extremos

Cuadro 5: Resultados obtenidos a los 80 días.

Cuadro 5 a los 80 días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Silo inoculado con	Cocos	Bacilos	Streptococos # 5	Streptococos # 6	Lactobacilo P	Levadura	Mezcla de micro-organismos**	Muestra comercial en polvo	Testigo sin melaza	Testigo con Melaza	Mezcla de Lactobacilo P y Levadura
Materia Seca a 105%	34,7		37,8	34,9			38,9				
pH (1:2) con pHmetro	3,96	4,03	3,99	4,12	4,68	4,41	3,98	3,9	4,63	4,76	4,52
Azúcares totales (s/humeda) g glucosa/100g	0,67		0,25	0,58			0,77				
Azúcares totales (s/seca) g glucosa/100g	1,93		0,66	1,66			1,98				
Acidez (s/humeda) g Ac.Láctico/100g	2,13		1,71	1,67			2,17				
Acidez (s/seca) g Ac.Láctico/100g	6,14		4,52	4,78			5,58				
Amoniaco Libre (s/humeda) mgN/100g	77,7		64,3	74,3			70,5				
Amoniaco Libre (s/seca) mgN/100g	223,9		170,1	212,9			181,2				
Color	Verde Oscuro	Verde Oscuro Bueno	Verde Oscuro Bueno	Verde Oscuro Bueno	Verde Oscuro Bueno	Verde Oscuro Bueno	Verde Oscuro Bueno	Verde Oscuro Bueno	Verde Oscuro Bueno	Verde Oscuro Podrido	Verde Oscuro
Olor	Agradable Dulce Aceituna (+++)	Agradable Vinagre (++)	Amoniacal (+++)	Aceituna Dulce (++++)	Aceituna con olor a hongo	Aceituna leve, olor ácido	Aceituna, acético (++++)	Aceituna acético dulce (++++)	Aceituna leve, picante	Podrido	Similar Aceituna
Humedad	Buena	Buena	más seco que 2	Buena	Más húmedo	Buena	Buena	más bueno	Buena	Buena	húmedo
Hongos	Si	Si	Si	No	Si	No	No	No	No/si	Si	No

\*\* Cocos#1 + Bacilos#1 + Estreptos#5 y #6 + Bacilo BP

## CONCLUSIONES

La variación del pH en las muestras 60, 70 y 80 días fue mínima. Se considerará en una próxima experiencia tomar muestras a los 7, 15, 30 y 60 días.

La observación “in vitro” con relación a la velocidad de acidificación no pudo ser confirmada “in vivo”, debido a que en la mayoría de los silos el valor del pH era estable. El valor del pH final (Cañequé y Sancha, 1998) necesario para inhibir la fermentación butírica, depende del contenido en materia seca: con valores mayores al 30 %, es suficiente obtener un pH final mínimo de 4,4. Si consideramos los valores obtenidos en esta

experiencia, la mayoría de los inoculantes cumplieron con esta premisa.

Los microorganismos que produjeron mayor cantidad de ácido láctico, fueron básicamente uno de los bacilos, el coco usado y la mezcla de cocos + bacilos + estrepto-cocos. Los ensayos “in vitro” determinaron el efecto benéfico estudiando a partir de una mezcla de microorganismos (cocos + bacilos + estreptococos) para aumentar la velocidad de acidificación. Hacemos notar que el Bacilo BP, a pesar que acidificó menos que los otros, fue tomado en consideración porque aportó condiciones organolépticas excepcionales.

Los microorganismos seleccionados en las experiencias “in vitro” mostraron un buen

*Determinación bioquímica de las diferentes cepas de bacterias lácticas por medio del sistema API CH-50 de BioMerieux, Francia.*



BP2 = *Lactobacillus plantarum* 1, que fermenta D-turanosa

BP = *Lactobacillus plantarum* 1, que no fermenta D-turanosa

*Identificación de bacterias lácticas*



*coco 1 = pediococcus acidilactici*

potencial como conservadores de forrajes, en especial, cuando se usó la mezcla de Coco #1 + Bacilos #1 + Bacilos BP + Estreptos #5 y #6. En nuevos experimentos se usará una pastura de alfalfa (una de las más difíciles de ensilar).

Previo a su uso comercial, el inoculante desarrollado deberá ser evaluado estadísticamente, comparándolo con productos comerciales presentes en el mercado.

## BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 2002.** Official Methods of Analysis, 17<sup>th</sup> Edition.
- CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M.; OHMOMO, S.; KUMAI, S. & NAKASE T. 1998.** Characterization and Identification of *Pediococcus* Species Isolated from Forage Crops. *Appl. Environ. Microbiology.* 64, 2982-2987.
- CAÑEQUE, V. & SANCHA, J. 1998.** Ensilado de Forrajes y su Empleo en la Alimentación de Rumiantes. Ediciones Mundi Prensa, pp 18-192.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REVERSE, P. & SMITH, F. 1996.** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
- FILYA, I.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; WEINBERG, Z. 2000.** The Effect of Bacterial Inoculants on the Fermentation of Wheat Silage. *Animal Feed Sci. Technol.*, 88, 39-46.
- MOON, N. 1983.** Influence of *Lactobacillus* spp. from an Inoculant from Forage on Silage Fermentation. *J. Appl. Biotechnol.* 55, 453-460.
- MUCK, R. 1993.** Effects of Lactic Acid Fermentation on Wheat and Barley Carbohydrate Composition. *Proceeding of the National Silage Production. Conference on Silage Production.* N.Y., EE.UU., 106-116.
- SREENATH, H.; MOLDES, A.; KOGEL, R. & STRAUB, R. 2001.** Lactic Acid Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation of Alfalfa Fiber. *J. Biosc. Bioengineering.* 92, 518-523.
- WEINBERG, Z.; ASHBELL, G.; CHEN, Y.; GAMBURG, M. & SELA S. 2004.** Effects of Forage Conservation Method. *Animal Feed Sci. Technol.* 116, 271-280.
- WEINBERG, Z. & MUCK, R. 1996.** The Effect of Sewage Irrigation on Safety of Forage Crops and Silage. *Fems Microbiol. Rev.* 19, 53-68.
- ZAHIRODDINI, H.; BAA, J.; ABSALOM, T. & MC ALLISTER, T. 2004.** Effect of an Inoculant and Enzymes on Fermentation of Crop Barley Silage. *Animal Feed Sci. Technol.* 117, 317-330.