

Aditivos bacterianos para silajes

Ing. Agr. Ph.D. Oscar C. M. Queiroz

El objetivo de la conservación del forraje es mantener la calidad original de la planta ensilada a través de la fermentación. Para lograr este objetivo, son de importancia fundamental establecer una condición anaerobia y de fermentación deseable. Comúnmente son empleados los inoculantes para silo para obtener tal resultado. Una gran variedad de aditivos están disponibles, los cuales tienen diferentes modos de acción y por ende distintos propósitos. Este artículo describe los principales aditivos bacterianos usados actualmente en el mercado, de manera de transmitir información útil para la elección de este tipo de producto.

Aditivos bacterianos

Los aditivos bacterianos o inoculantes contienen cepas de bacterias seleccionadas que fermentan los azúcares simples en ácido láctico, acidificando rápidamente el medio, o en ácidos con poder anti fúngico que inhiben el crecimiento de hongos y levaduras que causan deterioro del material. Estas bacterias son clasificadas como homolácticas o heterolácticas, respectivamente. Ambos tipos pueden ser usados para mejorar la calidad de silaje, aunque tienen diferentes funciones y actúan en distintas fases del proceso de ensilaje.

Bacterias homolácticas

Las bacterias homolácticas fermentan glucosa hasta ácido láctico de manera muy eficiente desde el punto de vista energético. En la fermentación homoláctica, a partir de un mol de glucosa son generados 2 moles de ácido láctico y 2 moles de adenosina trifosfato (ATP). El camino metabólico de la fermentación homoláctica, Embden-Meyerhof, genera alta recuperación de energía (99.3%) y materia seca (100%) (Kung y col., 2003; White, 2007).

Lactobacillus plantarum: El uso de bacterias homolácticas era común desde el final de la década de los 70 (Kung y col., 2003). En aquella época, la mayoría de los inoculantes fueron desarrollados con el criterio de Whittenbury (1961), el cual recomendaba que los inoculantes bacterianos debían ser capaces de crecer vigorosamente y dominar la población natural durante la fermentación, ser homofermentativos y altamente tolerantes al medio ácido, para que se produzcan cantidades significativas de ácido láctico. El microorganismo que reunía todas estas características era el *Lactobacillus plantarum*, el cual hasta hoy es la bacteria más comúnmente utilizada en inoculantes bacterianos comercializados. *Lactobacillus plantarum* es una bacteria Gram positiva, con forma de bastón, que se encuentra en comida fermentada y silaje (Kung y col., 2003). La capacidad de sobrevivencia del *L. plantarum* y sus propiedades fisiológicas y bioquímicas hacen que sea un perfecto candidato, a los criterios de Whittenbury, para inoculantes de silaje (Archibald y Fridovich, 1981).

Lactobacillus plantarum fue inicialmente clasificado como una bacteria homofermentativa obligatoria, basado en su capacidad de convertir 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico, por la vía Embden-Meyerhof. Actualmente, *L. plantarum* es clasificado como una bacteria heterofermentativa facultativa, ya que en la ausencia de glucosa, *L. plantarum* puede fermentar pentosas hasta ácido láctico, gas carbónico y ácido acético por vías heterofermentativas (Holzer y col., 2003). El suplemento inadecuado de glucosa también reduce la concentración de fructosa-1,6-bisfosfato, un activador esencial de la enzima lactato deshidrogenasa (Pahlow y col., 2003).

El nuevo proceso de clasificación se fundamenta en la comparación filogenética del ácido ribonucleico ribosomal 16 (ARNr 16S) y es más preciso que el método tradicional que evalúa las características fisiológicas y bioquímicas del microorganismo. Todavía, *L. plantarum* es considerado como una bacteria homofermentativa cuando la glucosa no es un factor limitante. Así, en silajes con adecuada concentración de azúcares, *L. plantarum* normalmente sintetiza exclusivamente ácido láctico, que causa una re-oxidación del NADH, permitiendo una repetición continua de la vía Embden-Meyerhof y del metabolismo de los carbohidratos (McDonald, 1991).

Lactobacillus plantarum ha sido usado con éxito en la reducción del pH de silajes con alta capacidad de buffer. Filya y colaboradores (2007) reportaron que la aplicación de 3 cepas de *L. plantarum* redujo el pH de silaje de alfalfa de 5.08 en silos no tratados para 4.43, en promedio, en silos tratados con las tres cepas. Además de reducir el pH, la relación entre la concentración de ácido láctico y ácido acético fue aumentada en más de dos veces, lo que indica una actividad mucho más homoláctica. Conaghan y colaboradores (2010) demostraron un aumento en la concentración de ácido láctico en silaje de ryegrass de 22 g/kg de materia seca (MS) y reducción del pH en el orden de unas 5 veces cuando el material era tratado con *L. plantarum*.

***Pediococcus pentosaceus*:** *Pediococcus pentosaceus* es una bacteria homoláctica, Gram positiva y anaerobia facultativa, usada como inoculante de silage. Así como *Lactobacillus plantarum*, es una bacteria con tolerancia a la acidez y es capaz de producir ácido láctico (Garvie, 1986; Axelsson, 1998). *P. Pentosaceus* crece más activamente que *L. plantarum* y otras bacterias del silo cuando el pH está entre 5 - 6.5 y el oxígeno residual está presente durante las primeras etapas de fermentación (Kung y col., 2003; McDonald, 1991). Algunas cepas de *Pediococcus* se desarrollan bien en silos con elevada concentración de MS y baja actividad de agua (Tanaka y Ohmomo, 2000). Estas características permiten a la cepas de *Pediococcus* comenzar la acidificación del silaje durante la fase inicial, en los primeros días de fermentación, cuando el crecimiento de cepas de *Lactobacillus* es menos vigoroso por el alto pH. Debido a estas características, algunos inoculantes en el mercado tienen en su formulación ambas bacterias: *P. pentosaceus* y *L. plantarum*, para que se puedan complementar los nichos de crecimiento y acelerar la tasa de acidificación del silaje (Lin y col., 1992). La capacidad de desarrollo de cepas de *Pediococcus* fue constatada por Cocconcelli y colaboradores (1991) los cuales usaron análisis de ADN para verificar la colonización de *P. pentosaceus* y *L. plantarum* en silaje de maíz. Los investigadores observaron que la población de *Pediococcus pentosaceus* era máxima después de un crecimiento exponencial durante las 12 primeras horas de fermentación, mientras que el crecimiento de *L. plantarum* solamente ocurrió después de 48 horas. Cai y colaboradores (1999) inocularon alfalfa y ryegrass con cepas de *Pediococcus acidilactici* o *Pediococcus pentosaceus* a 25 o 48°C. Los investigadores reportaron que la calidad del silaje conservado a 25 °C fue mejorada gracias a la disminución en las pérdidas de MS y gases, y a la reducción de los productos de la fermentación indeseable (secundarios) tales como amonio y ácido butírico. De manera similar, esto fue observado con menos intensidad en silos mantenidos a 48 °C, lo que sugiere que *P. pentosaceus* puede ser menos eficaz como inoculante de silaje en áreas subtropicales y tropicales.

***Enterococcus faecium*:** *Enterococcus faecium* es un productor importante de ácido láctico en las primeras etapas de fermentación, así como *Pediococcus pentosaceus*. Estas bacterias son Gram positivas, anaeróbicas facultativas y pueden crecer en un pH entre 4.5 - 9.6. Cai (1999) evaluó el efecto de *Enterococcus* y *Lactobacillus* en silos de alfalfa y gramínea. Los silajes inoculados con *Lactobacillus* tuvieron menor pH, ácido butírico, amonio, pérdidas gaseosas y de MS en relación a los silos sin inoculante, mientras que este efecto no fue observado en silos tratados con las cepas de *Enterococcus*. El autor reportó que la posible falta de respuesta al inoculante con *Enterococcus*

fue el resultado de una baja capacidad de crecimiento de este en un pH por debajo de 4.5. Sin embargo, *P. pentosaceus* y *Enterococcus* spp. son usados como inoculantes homolácticos en conjunto con *L. plantarum* para: 1) dominar el inicio de la fermentación y rápidamente empezar la reducción de pH, previniendo así la fermentación secundaria 2) reducir el pH a niveles que favorezcan el crecimiento de *L. plantarum* y otros lactobacillus. Filya y colaboradores (2007) estudiaron el efecto de inoculantes bacterianos en la fermentación de silaje de alfalfa. Los tratamientos usados como inoculantes fueron: dos cepas de *E. faecium* aplicadas por separado; mezcla de *E. faecium* y *L. plantarum*; mezcla de *E. faecium*, *L. plantarum* y *P. pentosaceus*. La combinación de *E. faecium* y *L. plantarum* redujo el pH, aumentó la concentración de ácido láctico y bajó la concentración de etanol (fermentación secundaria causada por enterobacteria y levaduras). Sin embargo, la adición del *P. pentosaceus* no causó un aumento en la eficiencia del inoculante comparado con el tratamiento con solo *Enterococcus* y *Lactobacillus*. Esta investigación demostró la complementariedad del efecto de *L. plantarum* y *E. faecium* en la fermentación del silaje.

Efectos de los inoculantes homolácticos

El efecto de los inoculantes con bacterias homolácticas en la calidad del silaje fue revisado por Kung y Muck (1997). En general, las bacterias homolácticas causan una rápida disminución del pH que es acompañado de un aumento en la concentración de ácido láctico, lo que a su vez causa una reducción de la proteólisis, deaminación y potencial para el surgimiento de fermentación etanólica, butírica o acética. El control en la fermentación secundaria puede ocasionar un aumento en la recuperación de MS al final de la fermentación (Kung, 2003). De esta manera, el principal beneficio del uso de bacterias homofermentativas es reducir las pérdidas de energía, nutrientes y MS asociadas con la fermentación secundaria. Es importante tener en cuenta que el uso de bacterias homolácticas no resulta en mejor estabilidad aeróbica del material. Kung y Muck (1997) reportaron que además de no tener efecto positivo en la estabilidad aeróbica, a veces esta termina siendo peor en silos tratados exclusivamente con inoculantes homofermentativos. Esto puede ocurrir porque el ácido láctico no tiene poder anti fúngico, por lo que no puede impedir el desarrollo de hongos y levaduras una vez que el material está expuesto al aire. Sin embargo, los ácidos propiónico y acético pueden reducir la población de hongos y levaduras y así aumentar la estabilidad durante largos periodos de tiempo (Moon, 1983; Huisden y col., 2009).

Estabilidad aeróbica del silaje

El término estabilidad aeróbica es frecuentemente usado para expresar cuanto tiempo el silo se mantiene sin señales de deterioro microbiano una vez que es expuesto al aire. Durante la fase de exposición aeróbica, levaduras tolerantes a la acidez utilizan ácido láctico como sustrato para su crecimiento, lo que resulta en un aumento de pH a niveles que permiten el desarrollo de otros hongos y agentes de deterioro y microorganismos patogénicos. (Adesogan y Queiroz, 2009; Queiroz y col., 2011). La respiración de estos microorganismos genera un rápido metabolismo de nutrientes acompañado por aumento en las pérdidas de MS y aumento en temperatura (Henderson y col., 1979; Cai, 1999). La baja estabilidad aeróbica es un efecto observado no solamente en el frente del silo (Pitt y Muck, 1993). El aire puede penetrar cerca de 4 metros dentro de la masa de silaje, por lo que el silaje puede empezar a deteriorarse varios días antes que esté expuesta en el frente del silo (Parsons, 1991).

El criterio de Whittenbury no tenía en consideración, como inoculante ideal, la inhabilidad del ácido láctico para reducir el crecimiento de hongos y la deterioración aeróbica. Probablemente, en la década de los 60, los problemas de estabilidad eran menos importantes debido al pequeño tamaño de los silos usados. Con el paso del tiempo, el incremento en los sistemas de producción y

el uso de silos de gran capacidad hicieron esenciales el mantenimiento de la estabilidad y reducción de las pérdidas.

Bacterias heterolácticas

Las bacterias heterofermentativas producen ácido láctico y otros productos como etanol, CO₂, y ácido acético durante la fermentación de la hexosa (Oude Elferink y col., 2001).

Inocular con bacterias heterolácticas puede causar pérdidas de energía y MS. Por ejemplo, se ha reportado pérdidas de MS del 1.7% con el uso de bacterias heterolácticas, mientras que el mismo material ensilado con cepas homolácticas resultaron en pérdidas de 0.7% (McDonald, 1991). Sin embargo, la vía heteroláctica puede ser de interés, ya que esta produce agentes anti fúngicos como acetato y propionato (Oude Elferink y col., 2001; Krooneman, 2002). Los inoculantes heterolácticos han sido usados para reducir hongos y levaduras y aumentar la estabilidad aeróbica de silos de maíz, sorgo y ryegrass. (Kung y Ranjit, 2001; Tabacco y col., 2011; Driehuis y col., 2001; Huisden y col., 2009). El acetato producido por las bacterias heterofermentativas puede también reducir la fermentación de etanol producida por las levaduras, inhibiendo el crecimiento fúngico en forrajes con alta concentración de azúcares.

Lactobacillus buchneri: *Lactobacillus buchneri* es el inoculante heterofermentativo más comúnmente usado en el mercado. *Lactobacillus buchneri* es una bacteria Gram positiva, con forma de bastón, no forma esporas y presenta respiración anaeróbica. *L. buchneri* tiene la propiedad de poder producir ácido acético en ambiente ácido. Oude Elferink y colaboradores (2001) describieron el camino metabólico usado por esta bacteria para convertir ácido láctico en ácido acético, 1,2-propanodiol, y trazos de etanol en condiciones libres de oxígeno. Ellos reportaron también que la conversión de ácido láctico hasta acético es muy dependiente de las condiciones ambientales como pH y temperatura. Todas las cepas de *L. buchneri* evaluadas en este estudio metabolizaron el ácido láctico cuando la temperatura aumento de 15 a 25°C. Sin embargo, cuando las temperaturas pasaron de 30°C, solamente una cepa continuo trabajando, y a 35°C ninguna tenia efecto. La concentración de pH también tiene un efecto importante en la efectividad del inoculante. A pH de 5.8 la concentración de ácido láctico libre para conversión no fue alterada por 200 horas, mientras que la reducción del pH de 4.3 para 3.8 aumentó el metabolismo del ácido.

Lactobacillus buchneri ha sido usado para aumentar la estabilidad aeróbica del maíz, cebada, alfalfa, sorgo, caña de azúcar, gramíneas y otros cultivos (Filya, 2003; Huisden y col., 2009; Pedroso y col., 2005). Kleinschmit y Kung (2006b) realizaron un meta-análisis con 33 estudios para evaluar el efecto de *L. buchneri* en silos de maíz. Los autores observaron un aumento en la concentración de acetato, reducción de lactato y consecuente disminución de levadura. Los efectos de *L. buchneri* en silo de maíz fueron dependiente de la dosis de inoculante, con dosis de 100.000 siendo más efectiva que dosis por debajo de los 100.000.

Aunque la producción de ácido propiónico se evidencie en silos tratados con *L. buchneri*, esta bacteria no es responsable directa por la síntesis de este ácido. La combinación de ácido propiónico y acético resulta en un efecto anti fúngico sinérgico, lo cual aumenta la estabilidad del silo. Driehuis y colaboradores (1999) observaron que el silo de maíz tratado con dosis crecientes de *L. buchneri* resultaron en concentraciones crecientes de los ácidos acético y propiónico además de 1-propanol, y no el 1, 2-propanediol normalmente esperado por el metabolismo de *L. buchneri*. Además, la inoculación con *L. buchneri* de 1×10^6 cfu/g resultó en un aumento de 10 veces de ácido propiónico y 3 veces de ácido acético en relación al silaje no tratado. Este cambio en el perfil fermentativo genero una estabilidad aeróbica de 792 horas contra apenas 42 horas del Control. Los autores estipularon que el 1, 2-propanediol estaba siendo convertido en 1-propanol y ácido

propiónico por otro microorganismo. Esta hipótesis fue confirmada por Krooneman y col. (2002), que aislaron una nueva cepa de bacteria heteroláctica, conocida como *Lactobacillus diolivorans*. Estas cepas coexisten con *L. buchneri* y convierten 1,2-propanediol en 1-propanol y ácido propiónico. La presencia de ácido propiónico es el resultado de una coexistencia entre las dos bacterias y es por esto que el aumento de este ácido en silos tratados con *L. buchneri* es tan inconsistente.

Inoculantes de doble propósito

El rol complementario de las bacterias homolácticas y heterolácticas en la fermentación del silaje ha llevado al desarrollo de inoculantes que contienen ambos tipos de bacterias, de manera de mejorar la fermentación y la estabilidad aeróbica del silaje. Estos inoculantes “doble propósito” o “combos” han sido usado exitosamente para mejorar la preservación de los silos de maíz, alfalfa, sorgo y pasto Bermuda (Filya, 2003; Schmidt y col., 2009; Schmidt y Kung, 2010). Kleinschmit y Kung (2006a) observaron que los silos de maíz tratados con una mezcla de *L. buchneri* (4×10^5 cfu/g) y *P. pentosaceus* (1×10^5 cfu/g) tenían menor concentración de NH_3 , mayor concentración de acetato y mayor estabilidad aeróbica comparado con silos no tratados luego de 361 días de fermentación.

Conclusiones generales

El uso correcto de los inoculantes bacterianos requiere entender los propósitos específicos de las diferentes cepas bacterianas. Como regla general, los inoculantes con bacterias homolácticas son usados para mejorar la fermentación del silo, mientras que los inoculantes con bacterias heterolácticas son utilizados para incrementar la estabilidad aeróbica. Además de comprender la función de cada cepa, la concentración y la tasa de inoculación son de fundamental importancia para la efectividad del producto. El aumento de la demanda por inoculantes desde el sector productivo debería fomentar a sectores académicos y privados de manera de promover el desarrollo de inoculantes cada vez más específicos (de acuerdo al cultivo), efectivos y multifuncionales.

Bibliografía

1. Adesogan, A. T., and O. C. M. Queiroz. 2009. Silage pathogenicity and implications for the ruminant production chain. Pages 225–241 in Proceedings of the International Symposium on Forage Quality and Conservation. M. Zopollato, G. B. Muraro and L. G. Nussio, FEALQ, Piracicaba, SP.
2. Archibald, F. S., and I. Fridovich. 1981. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 145:442–451.
3. Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. Pages 1–72 in: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2nd ed. S. Salminen and A. Von Wright, Marcel Dekker Inc, New York.
4. Cai, Y. 1999. Identification and characterization of *Enterococcus* species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation. *J. Dairy Sci.* 82:2466–2471.
5. Cai, Y., Y. Benno, M. Ogawa, and S. Kumai. 1999. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *J. Dairy Sci.* 82:520–526.
6. Cocconcelli, P. S., E. Triban, M. Basso, and V. Bottazzl. 1991. Use of DNA probes in the study of silage colonization by *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 71:296–301.
7. Conaghan, P., P. O’Kiely, and F. P. O’Mara. 2010. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. *J. Dairy Sci.* 93:628–643.
8. Driehuis, F., S. J. W. H. Oude Elferink, and S. F. Spoelstra. 1999. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Appl. Microbiol.* 87:583–594.
9. Driehuis, F., S. J. W. H. Oude Elferink, and P. G. Van Wijkelaar. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass For. Sci.* 56:330–343.

10. Filya, I., R. E. Muck, and F. E. Contreras–Govea. 2007. Inoculant effects on alfalfa silage: Fermentation products and nutritive value. *J. Dairy Sci.* 90:5108–5114.
11. Garvie, E. I. 1986. Genus *Pediococcus*. Pages 1075–1079 in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
12. Henderson, A. R., J. M. Ewart, and G. M. Robertson. 1979. Studies on the aerobic stability of commercial silages. *J. Sci. Food Agric.* 30:223–228.
13. Holzer, M., E. Mayrhuber, H. Danner, and R. Braun. 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol.* 21:282–287.
14. Huisden, C. M., A. T. Adesogan, S. C. Kim, and T. Ososanya. 2009. Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 92:690–697.
15. Krooneman, J., F. Faber, A. C. Alderkamp, S. J. H. W. Oude Elferink, F. Driehuis, I. Cleenwerck, J. Swings, J. C. Gottschal, and M. Vancanneyt. 2002. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2–propanediol–degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:639–646.
16. Kung, L., and R. E. Muck. 1997. Animal response to silage additives. Pages 200–210 in *Silage: Field to feedbunk*. NRAES–99. Proc. N. American Conf. Hershey, PA. 11– 13 Feb. Northeast Reg. Agric. Eng. Serv., Coop. Ext., Ithaca, NY.
17. Kung, L. and N. K. Ranjit. 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *J. Dairy Sci.* 84:1149–1155.
18. Kung, L., M. R. Stokes, and C. J. Lin. 2003. Silage additives. Pages 31305–3060 in *Silage Science and Technology*. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, ed. ASA–CSSA–SSSA, Madison, USA.
19. Lin, C. 1992. Epiphytic microflora on alfalfa and corn; Lactic acid bacteria succession during the pre–ensiling and ensiling periods; and the effect of additives on microbial succession on silage fermentation. Ph.D. diss. Kansas State University, Manhattan, KS.
20. McDonald, P., N. Henderson, and S. Heron. 1991. *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. Chalcombe Publications, Bucks, UK.
21. Moon, N. J. 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. Appl. Bacteriol.* 55:454–460.
22. Oude Elferink, S. J. W. H., J. Krooneman, J.C. Gottschal, S. F. Spoelstra, F. Faber, and F. Driehuis. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2–propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:125–132.
23. Pahlow, G., R. E. Muck, F. Driehuis, S. J. W. H. Oude Elferink, and S. F. Spoelstra. 2003. Microbiology of ensiling. Pages 31–93 in *Silage Science and Technology (Agronomy Series No. 42)*. D. R. Buxton, R. E. Muck, and H. J. Harrison, eds. American Society of Agronomy. Madison, WI.
24. Parsons, D. J. 1991. Modeling gas flow in a silage clamp after opening. *J. Agric. Eng. Res.* 50:209–218.
25. Pitt, R. E., and R. E. Muck. 1993. A diffusion model of aerobic deterioration at the exposed face of bunker silos. *J. Agric. Engr. Res.* 55:11–26.
26. Queiroz, O. C. M., A. T. Adesogan, and S. C. Kim. 2009. Can bacterial inoculants improve the quality of rust–infested corn silage? *J. Anim. Sci.* 87 (Suppl. E). p 543, Abstr. 663.
27. Queiroz, O. C.M., M. B. Rabaglino, A. T. Adesogan. 2011. Silage pathogenicity and implications for the ruminant production chain. Pages 225–241 in *Proceedings of the International Symposium on Forage Quality and Conservation*. M. Zopollato, Muraro, G. B., Nussio, L. G., FEALQ, Piracicaba, SP, Brazil.
28. Tabacco, E., F. Righi, A. Quarantelli, and G. Borreani. 2011. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. *J. Dairy Sci.* 94:1409–1419.
29. Tanaka, O., and S. Ohmomo. 2000. Effect of inoculation with *Pediococcus* sp M–9 on ensiling. *Grassl. Sci.* 46:153–157.
30. White ,D. 2007. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. Vol. 3rd edn. Oxford University Press., Oxford, New York.
31. Whittenbury, R. 1961. An investigation of the lactic acid bacteria. Ph.D. thesis. Univ. of Edinburg, UK.