

## CAPACIDAD ACIDIFICADORA DE LACTOBACILOS AISLADOS DE PASTIZALES UBICADOS EN LA ZONA NORTE DE LA CIUDAD DE MÉRIDA

Acidification capacity of *Lactobacillus* strains isolated from grasslands in the northern area of Mérida city

---

Alvarado Carmen.

Universidad de Los Andes, Facultad de farmacia y Bioanálisis, Departamento de Microbiología y Parasitología, C.P. 5101, Mérida, Venezuela. Email: carmenu@ula.ve. ORCID: 0009-0009-2914-831X.

**Fecha de inicio:** 20/01/2024

**Fecha de finalización:** 15/06/2024

### RESUMEN

Las bacterias ácido-lácticas (BAL), en especial los lactobacilos se utilizan en la conservación de forrajes mediante ensilaje, especialmente en regiones tropicales donde las altas temperaturas pueden afectar la fermentación. Este estudio tuvo como objetivo aislar, identificar y evaluar cepas autóctonas de *Lactobacillus* presentes en pastizales del norte de Mérida, Venezuela, con potencial para su uso como inoculantes en ensilajes. Se recolectaron muestras de pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus*), estrella (*Cynodon plectostachyus*) y cetárea (*Megathyrsus maximus*), de las cuales se aislaron 106 colonias, y se seleccionaron 10 cepas compatibles con el género *Lactobacillus*. La identificación se realizó mediante el sistema bioquímico API 50 CHL. Se evaluó la capacidad acidificante midiendo el descenso del pH y la producción de ácido láctico por titulación en caldo MRS, así como el crecimiento a 45 °C como indicador de termotolerancia. *L. plantarum* cepas 3 y 5 mostraron alta producción de ácido láctico y crecimiento a temperatura elevada. *L. pentosus* y *L.*

*paracasei* ssp. *Paracasei* 1, evidenciaron resistencia térmica y acidificación moderada. Estos hallazgos respaldan el uso de formulaciones multicepa que combinen cepas homofermentativas y heterofermentativas autóctonas, adaptadas a condiciones tropicales, para mejorar la eficiencia fermentativa, la estabilidad aeróbica y la conservación del forraje en sistemas ganaderos.

**Palabras clave:** *Lactobacillus*, capacidad acidificadora, ensilaje.

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB), particularly *Lactobacillus* species, are used in forage preservation through silage fermentation, especially in tropical regions where high temperatures can affect the fermentation process. This study aimed to isolate, identify, and evaluate native *Lactobacillus* strains from grasslands in northern Mérida, Venezuela, with potential use as silage inoculants. Grass samples (kikuyu, stargrass, and guinea grass) were collected, and 106 bacterial colonies were isolated. Ten strains were identified as *Lactobacillus* using the API 50 CHL biochemical system. Acidification capacity was assessed by measuring pH reduction and lactic acid production via titration in MRS broth. Thermotolerance was evaluated based on growth at 45 °C. *L. plantarum* strains 3 and 5 showed high lactic acid production and growth under elevated temperature, while *L. pentosus* and *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1, demonstrated thermal resistance and moderate acidification. These findings suggest that native LAB strains, particularly those combining homofermentative efficiency and thermal tolerance, are promising candidates for multi strain inoculant formulations. Their use may enhance fermentative efficiency, aerobic stability, and forage conservation under tropical conditions. The study

supports the valorization of local microbial biodiversity for the development of adapted and sustainable silage technologies for livestock systems in warm climates.

**Key words:** *Lactobacillus*, acidification capacity, silage.

## INTRODUCCIÓN

La producción ganadera sostenible depende en gran medida de la disponibilidad y calidad del forraje, cuya adecuada conservación es esencial para garantizar la alimentación del ganado durante períodos de escasez. El ensilaje, basado en la fermentación láctica, es una de las estrategias más eficaces para conservar forrajes. En este proceso, las bacterias ácido-lácticas (BAL), en particular las del género *Lactobacillus*, transforman los azúcares del material vegetal en ácido láctico, reduciendo el pH y limitando el crecimiento de hongos y levaduras, lo que mejora la estabilidad aeróbica y reduce la pérdida de nutrientes (Okoye et al., 2023).

El uso de inoculantes bacterianos, especialmente a base de *Lactobacillus plantarum*, ha demostrado mejorar la fermentación y la estabilidad aeróbica del ensilaje, incluso en regiones tropicales donde las altas temperaturas aceleran el deterioro microbiano. Se ha reportado que la aplicación de *L. plantarum* retarda el deterioro de ensilajes de alfalfa con alta humedad, manteniendo un pH estable y controlando la microbiota competitiva (Jaipolsaen et al., 2022; Yang et al., 2020). Asimismo, en forrajes tropicales como la caña de azúcar, su adición ha mejorado la calidad fermentativa y la conservación en ambientes cálidos (Liu et al., 2022).

La eficacia de estos inoculantes se incrementa cuando las cepas están adaptadas al ambiente de uso. Por ello, la selección de cepas autóctonas directamente desde el forraje representa una estrategia biotecnológica prometedora, ya que mejora la compatibilidad con la planta hospedadora y las condiciones ambientales locales (You et al., 2021). Este enfoque es

particularmente relevante en regiones de altura como los Andes venezolanos, donde la microbiota epífita de los pastizales está influenciada por factores ecológicos específicos como la altitud, el clima y la vegetación (García-Pérez et al., 2019). Aislar y caracterizar BAL de estos ecosistemas permite no solo conocer su diversidad, sino también identificar cepas con capacidades funcionales destacadas, como una elevada producción de ácido láctico, crucial para el éxito del ensilaje (Liu et al., 2022).

Además, la ganadería está asociada a emisiones significativas de gases de efecto invernadero, en particular metano, tanto durante la fermentación ruminal como en procesos de ensilaje mal manejados. Diversos estudios han demostrado que el uso de *L. plantarum* en ensilajes puede contribuir a la mitigación de estas emisiones, mejorando la eficiencia fermentativa y reduciendo el metano generado (Li et al., 2023; Ncho et al., 2024).

En este contexto, el presente estudio retoma cepas de *Lactobacillus* aisladas originalmente en 2007 como parte de un trabajo académico no publicado. En 2024, estas cepas fueron reactivadas y evaluadas desde un enfoque funcional aplicado, con el objetivo de determinar su capacidad acidificadora y su potencial como candidatas para el desarrollo de inoculantes adaptados a condiciones tropicales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestreo**

Las cepas utilizadas en este estudio fueron originalmente aisladas en 2007, como parte de un proyecto de investigación de maestría no publicado, desarrollado en la Universidad de Los Andes. Los procedimientos de aislamiento, así como la caracterización morfológica y bioquímica, no han sido previamente difundidos en la literatura científica. Las cepas fueron conservadas liofilizadas en condiciones controladas hasta su reactivación y evaluación funcional en 2024. La

identificación bioquímica se realizó utilizando el sistema API 50 CHL, cuyos criterios continúan siendo válidos conforme a la taxonomía actual del género *Lactobacillus* (Zheng et al., 2020).

Las muestras de pasto fueron recolectadas en el sector Santa Rosa de la ciudad de Mérida, Estado Mérida, Venezuela. Las parcelas muestreadas, con superficies entre 1900 y 3000 m<sup>2</sup>, estaban sembradas con especies comúnmente utilizadas en zonas tropicales: pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum*), pasto cetárea (*Megathyrsus maximus*) y pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*), reconocidas por su productividad y adaptabilidad (Galasso et al., 2022; Carvajal et al., 2023; Picado et al., 2024).

En dos jornadas distintas se recolectaron muestras de diferentes sectores de las parcelas. Las plantas fueron cortadas asépticamente a 10 cm del suelo y depositadas en envases estériles, siguiendo las recomendaciones de la FAO para el muestreo representativo de pastos y minimización de contaminación (FAO, 2014). Las muestras se almacenaron durante ocho días en un lugar fresco y aireado antes de ser procesadas en laboratorio.

### **Aislamiento de lactobacilos**

Bajo condiciones de asepsia, las plantas fueron mezcladas para formar un “pool”, del cual se extrajeron 25 g y se suspendieron en 500 mL de agua peptonada modificada (APM), preparada con 0,1 % de peptona, 0,1 % de Tween 80 y 0,05 % de cisteína, para reducir el potencial óxido-reducción del diluyente (Haddadin et al., 2004; Leuschner et al., 2003). La mezcla se agitó durante 20 minutos a 120 rpm en una incubadora orbital (marca Precision, GCA Corporation). Se realizaron seis diluciones decimales en APM y se sembraron por duplicado en placas de agar MRS modificado (con 3 % de leche descremada y 0,02 % de azida sódica) y agar Rogosa, empleando técnicas de siembra en superficie y en profundidad (Hanagasaki, 2020; Ajewole et al., 2014).

Las placas se incubaron a 37 °C durante cinco días en condiciones microaerófilas, generadas mediante el método de la vela (candle jar), este método consiste en introducir las placas de Petri apiladas en un frasco de vidrio, luego se introduce una vela prendida en su interior y se cierra herméticamente el frasco con su tapa. Este procedimiento crea en el interior del frasco una atmósfera con aproximadamente 8-10% de O<sub>2</sub> y 3-5% de CO<sub>2</sub>, apropiada para el desarrollo de bacterias microaerófilas como los lactobacilos (Fan & Li, 1997).

Una vez transcurrido el período de incubación, se seleccionaron colonias aisladas que presentaban características compatibles con *Lactobacillus* según Kandler y Weiss (1986): colonias de 2-5 mm de diámetro, convexas, opacas, no pigmentadas, con desarrollo superficial u ovalado en el interior del agar. Estas fueron subcultivadas en caldo MRS con 20% de glicerol, incubadas por 24 h y posteriormente conservadas a 10 °C.

### **Identificación fenotípica de los lactobacilos**

La identificación preliminar incluyó la tinción de Gram y la prueba de catalasa, siguiendo los criterios propuestos por Kandler y Weiss (1986).

- a) **Tinción de Gram:** realizada a partir de cultivos de 24 h conforme a Cappuccino y Welsh (1990).
- b) **Prueba de catalasa:** ejecutada sobre colonias cultivadas en agar MRS según McFaddin (2003).

Posteriormente, se determinó el perfil de fermentación de carbohidratos mediante el sistema bioquímico API 50 CHL y el software APIweb (versión 5.0), siguiendo las instrucciones del fabricante (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). La identificación taxonómica correspondió a la clasificación propuesta por Kandler y Weiss (1986), ampliamente adoptada en microbiología alimentaria. Aunque en

años recientes se ha propuesto una nueva clasificación basada en filogenómica (Zheng et al., 2020), en este trabajo se mantuvo la nomenclatura tradicional, por ser aún la más utilizada en estudios sobre fermentación y ensilaje, lo que facilita la comparación con la literatura existente.

## **Evaluación del potencial tecnológico**

### **Producción de ácido**

La acidificación fue monitoreada mediante medición del pH con un potenciómetro digital portátil (Hanna Instruments). La producción de ácido láctico fue evaluada por titulación con NaOH 0,1 N usando fenolftaleína como indicador (Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 2004). Cada ensayo se realizó por duplicado. Se utilizaron cultivos de 18–20 h en caldo MRS estéril para inocular al 1 % tubos con 10 mL del mismo medio. Se incubaron en baño de agua a 37 °C, y se tomaron medidas de pH y ácido producido a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 y 48 h.

### **Crecimiento a 45 °C**

Para evaluar la termotolerancia, se inocularon tubos con 5 mL de caldo MRS estéril con cada cepa, incubados a 45 °C en baño de agua termostatado durante 24 h. Se consideró crecimiento positivo la presencia de turbidez. La producción de ácido en estas condiciones se evaluó siguiendo el procedimiento antes descrito (Benavides et al., 2016).

### **Selección de cepas con uso potencial para ensilaje**

Las cepas seleccionadas como candidatas a inoculantes fueron aquellas que cumplieron con al menos dos de los siguientes criterios: pertenencia a especie reconocida como funcional, capacidad de crecimiento a 45 °C y alta producción

de ácido láctico. Estas fueron sometidas a análisis estadístico para establecer diferencias significativas entre sus comportamientos fermentativos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las dos muestras de pasto analizadas se aislaron un total de 106 colonias con morfología compatible con bacterias ácido-lácticas del género *Lactobacillus*. Estas colonias fueron numeradas del 1 al 106 y caracterizadas morfológica y bioquímicamente. De ellas, solo 13 presentaron características típicas del género, tales como morfología de bacilos cortos o cocobacilos, reacción Gram positiva y catalasa negativa.

De las 13 cepas compatibles con *Lactobacillus*, 10 fueron finalmente identificadas como pertenecientes a este género mediante pruebas bioquímicas utilizando el sistema API 50 CHL. Las especies identificadas se resumen en la Tabla 1, observándose una clara predominancia de *Lactobacillus plantarum*, seguido de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y *Lactobacillus pentosus*. En adelante las cepas se nombrarán de la siguiente manera: *Lactobacillus plantarum* 1 (cepa 1), *L. plantarum* 2 (cepa 2), *L. brevis* (cepa 22), *L. plantarum* 3 (cepa 3), *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1 (44), *L. plantarum* 4 (cepa 4), *L. plantarum* 5 (cepa 5), *L. plantarum* 6 (cepa 6), *L. pentosus* (cepa 33) y *L. paracasei* spp. *paracasei* 2 (cepa 45).

Estos hallazgos son consistentes con estudios recientes que destacan a *L. plantarum*, *L. paracasei* y *L. pentosus* como miembros habituales de la microbiota epífita de forrajes, capaces de apoyar el proceso fermentativo durante el ensilaje. El predominio de *L. plantarum* observado en este estudio.

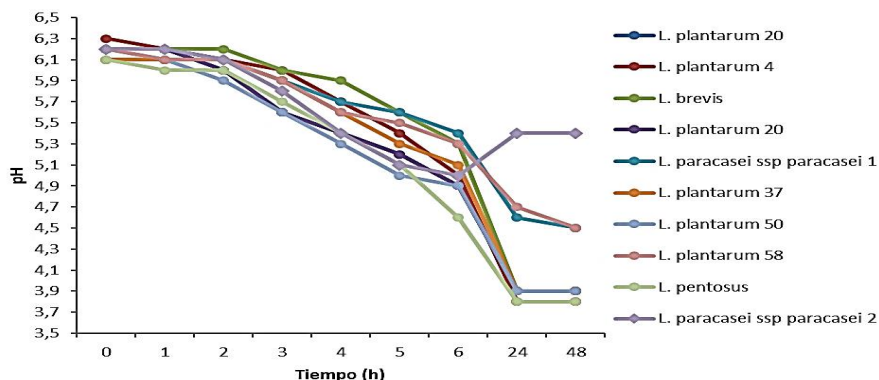
**Tabla 1.** Especies de lactobacilos identificadas con el sistema de identificación bioquímica API.

Cepa	Especie identificada (% de identificación)
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (99,9 %)
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (99,9 %)
22	<i>Lactobacillus brevis</i> 3 (96,1%)
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (99,9)
44	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i> 1 (95,6)
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (99,9)
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (99,9)
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (92,6)
33	<i>Lactobacillus pentosus</i> (99,0)
45	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i> 3 (96,5)

El 60% de los lactobacilos identificados concuerda con múltiples investigaciones que la reconocen como una de las especies más frecuentes y eficientes en pastos tropicales y gramíneas utilizadas para ensilaje (Zhang et al., 2022; Feng et al., 2023; You et al., 2021, Guo, 2022).

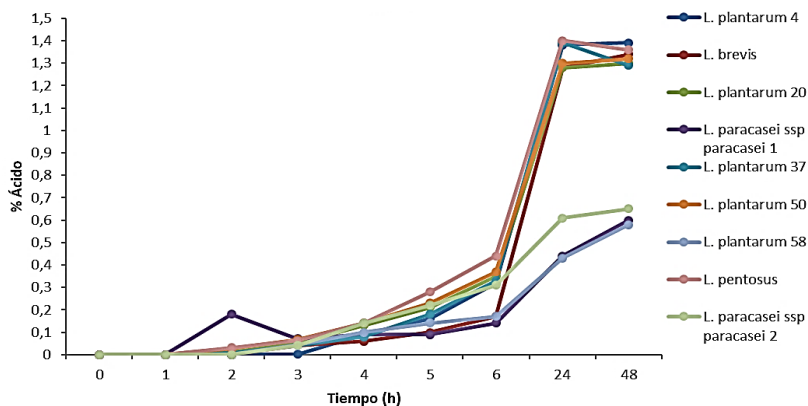
Adicionalmente, *L. paracasei* ha ganado atención por su capacidad de mejorar la estabilidad aeróbica del ensilaje, reducir la producción de compuestos nitrogenados indeseables y colaborar sinérgicamente con otras especies para mantener la calidad del forraje almacenado (Xiong et al, 2022, Scuarra et al 2023).

La Figura 1, muestra la curva de descenso de pH en las cepas de lactobacilos en caldo MRS.



**Figura 1.** Curvas de descenso de pH en las cepas de lactobacilos en caldo MRS.

La Figura 2, muestra la producción de ácidos orgánicos de las cepas de lactobacilos en caldo MRS.



**Figura 2.** Producción de ácidos orgánicos de las cepas de lactobacilos en caldo MRS.

La capacidad acidificante, directamente relacionada con el descenso del pH, es uno de los criterios más relevantes al evaluar el potencial tecnológico de cepas destinadas a la elaboración de inoculantes para ensilaje. En este estudio, todas las cepas seleccionadas demostraron actividad acidificante, aunque con variabilidad entre ellas. Las Figuras 1 y 2 muestran el comportamiento de cada cepa en cuanto al descenso del pH y la producción acumulada de ácido láctico, respectivamente.

Las cepas identificadas como *L. plantarum* (cepas 1, 2, 3, 4, 5 y 6) presentaron un patrón claro de acidificación acelerada, con una disminución progresiva del pH desde valores iniciales de 6,1–6,3 hasta alcanzar niveles de 3,8–3,9 entre las 24 y 48 horas de incubación.

Por su parte, *L. pentosus* evidenció una acidificación efectiva, alcanzando un pH final de 3,8 a las 48 horas, comportamiento comparable al de *L. plantarum* y que respalda su inclusión en formulaciones inoculantes. En contraste, *L. brevis* mostró una acidificación más lenta, estabilizándose en 3,9. Las cepas de *L. paracasei* subsp. *paracasei* fueron las menos acidificantes, con valores finales de

pH entre 4,5 y 5,4. Si bien una de estas cepas mostró un descenso de pH relativamente aceptable durante las primeras 6 horas, su efecto acidificante se redujo considerablemente después de las 24 horas, lo cual limita su eficacia como único inoculante. Este resultado resalta la importancia de evaluar cada cepa de forma individual, incluso dentro de una misma especie, debido a la variabilidad funcional observada.

A pesar de su menor capacidad acidificante, *L. paracasei* y *L. brevis* no deben descartarse. Diversos estudios recomiendan formulaciones multicepa que combinen bacterias homofermentativas como *L. plantarum*, responsables de la acidificación inicial, con especies heterofermentativas como *L. brevis* y *L. paracasei*, las cuales contribuyen a mejorar la estabilidad aeróbica del ensilaje (Wang et al., 2022; Squara et al., 2023).

Estos resultados refuerzan que la producción de ácido, además de ser un parámetro clave para el desempeño fermentativo, varía significativamente entre cepas del mismo género, lo que exige un análisis detallado para el desarrollo de inoculantes eficaces en condiciones tropicales (Xiong et al., 2022; Feng et al., 2023).

Otro aspecto tecnológico importante evaluado fue el crecimiento de las diferentes cepas a 45°C, el resultado se puede evidenciar en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Crecimiento y producción de ácido de las cepas a 45 °C.

Cepa	Crecimiento a 45°C	% de ácido producido
<i>L. plantarum</i> 1	-	-
<i>L. plantarum</i> 2	-	-
<i>L. brevis</i>	-	-
<i>L. plantarum</i> 3	+	0,648
<i>L. paracasei ssp paracasei</i> 1	+	0,405
<i>L. plantarum</i> 4	-	-
<i>L. plantarum</i> 5	+	0,585
<i>L. plantarum</i> 6	-	-
<i>L. pentosus</i>	+	0,27
<i>L. paracasei ssp paracasei</i> 2	-	-

El crecimiento de las cepas de lactobacilos a temperaturas elevadas resulta particularmente relevante debido a que, durante la fase activa de fermentación, especialmente en regiones tropicales, la temperatura interna del silo puede alcanzar valores entre 40 y 60 °C, lo cual puede comprometer la viabilidad de cepas sensibles al estrés térmico (Ni et al., 2020; Kung et al., 2008). Por esta razón, la evaluación del crecimiento a 45 °C se empleó como criterio complementario para identificar cepas con potencial biotecnológico en condiciones ambientales adversas típicas del trópico (Guan et al., 2020; Kung et al., 2018).

Los resultados obtenidos en la prueba de crecimiento a 45 °C, junto con la producción de ácido láctico, evidencian diferencias funcionales significativas entre las cepas analizadas (Tabla 2). Solo cuatro cepas demostraron capacidad de crecimiento bajo esta temperatura elevada: *Lactobacillus plantarum* cepas 3 y 5, *L. pentosus* y *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1. Esta característica es fundamental para la selección de cepas destinadas a la elaboración de ensilajes, dado que en regiones tropicales las temperaturas internas del material ensilado pueden alcanzar entre 40 y 50 °C durante el proceso fermentativo (Guan et al., 2020; Ni et al., 2020).

Dentro del grupo de cepas termotolerantes, *L. plantarum* 3 destacó por presentar, además de crecimiento a 45 °C, la mayor producción acumulada de ácido láctico (0,648 %), seguida por *L. plantarum* 5 (0,585 %). Estos resultados confirman la elevada eficiencia de esta especie tanto en condiciones de estrés térmico como en la acidificación del medio, consolidándola como una candidata óptima para su uso en inoculantes destinados a climas cálidos.

Por otro lado, aunque *L. pentosus* mostró capacidad de crecimiento a 45 °C, la cantidad de ácido láctico producido fue menor (0,27 %), lo que sugiere una funcionalidad complementaria, posiblemente más orientada a la estabilización aeróbica del ensilaje que a la acidificación rápida.

Un comportamiento similar se observó en *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1, que presentó una producción de ácido láctico del 0,405 %. Estos perfiles concuerdan con estudios previos que indican que cepas heterofermentativas como *L. paracasei* y *L. pentosus*, aunque no tan eficaces en acidificación como *L. plantarum*, contribuyen principalmente a la estabilidad del ensilado más que a la reducción inicial del pH (Squara et al., 2023).

En contraste, otras cepas de *L. plantarum* (1, 2, 4 y 6), a pesar de haber mostrado una alta capacidad acidificante en ensayos previos, no lograron crecer a 45 °C, lo cual limita su aplicabilidad en condiciones tropicales extremas (You et al., 2021; Peng et al., 2021).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La metodología de aislamiento aplicada permitió identificar cuatro especies de lactobacilos presentes en las muestras de pastizal analizadas, evidenciando que este constituye una fuente natural valiosa de cepas con potencial biotecnológico para su uso como inoculantes en procesos de ensilaje. Las cepas de *L. plantarum* demostraron alta capacidad acidificante, con pH finales inferiores a 4 y producción acumulada de ácido láctico superior al 1,3 % en la mayoría de los casos, confirmando su eficacia como homofermentativas. Sin embargo, solo algunas cepas (3 y 5) mostraron capacidad de crecimiento a 45 °C, un criterio indispensable para su aplicabilidad en regiones tropicales, donde las temperaturas durante la fermentación pueden ser elevadas. Por otro lado, las cepas de *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1 y *L. pentosus* presentaron menor producción de ácido láctico (0,27 - 0,65%), pero evidenciaron termotolerancia y pudieran contribuir a la estabilidad aeróbica del ensilado, posicionándose como candidatas complementarias en formulaciones multi cepa.

En función de estos resultados, se recomienda diseñar inoculantes mixtos que integren cepas homofermentativas altamente acidificantes (*L. plantarum* 3 y 5)

con cepas heterofermentativas termotolerantes (*L. pentosus* y *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1), para maximizar la sinergia entre rápida acidificación y estabilidad aeróbica. Es imprescindible validar estas cepas en ensayos piloto bajo condiciones tropicales, evaluando su desempeño frente a variables como temperatura, estabilidad aeróbica y composición nutricional del forraje.

La termotolerancia debe considerarse un criterio obligatorio en la selección de cepas para regiones tropicales, dada su influencia directa en la viabilidad de los inoculantes. Finalmente, se sugiere fomentar el aislamiento y caracterización de cepas autóctonas como estrategia sostenible y económicamente viable, adaptada a la realidad agroecológica regional, contribuyendo así a la mejora de tecnologías para la conservación de forrajes y a la reducción del impacto ambiental de la ganadería.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benavides, A. B., Ulcuango, M., Yépez, L., & Tenea, G. N. (2016). **Assessment of the in vitro bioactive properties of lactic acid bacteria isolated from native ecological niches of Ecuador.** Revista Argentina de Microbiología, 48(3), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.003>
- Cappuccino, J. G., & Welsh, C. (2019). **Microbiology: A laboratory manual** (11th ed.). Pearson.
- Carvajal-Tapia, J. I., Barahona-Rosales, R., Castro-Montoya, J., Arango, J., & Vivas-Quila, N. J. (2023). **Nutritional and biomass evaluation of a Megathyrus maximus collection in a dry tropical climate in Colombia.** Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales, 11(1), 11–21. [https://doi.org/10.17138/tgft\(11\)11-21](https://doi.org/10.17138/tgft(11)11-21)
- Fan, X. G., & Li, T. G. (1997). **Growth of Helicobacter pylori in candle jars.** Journal of Medical Microbiology, 46(4), 354-355. [https://www.academia.edu/126326937/Growth\\_of\\_Helicobacter\\_pylo ri\\_in\\_candle\\_jars](https://www.academia.edu/126326937/Growth_of_Helicobacter_pylo ri_in_candle_jars)
- Feng, Q., Zhang, J., Ling, W., Degen, A. A., Zhou, Y., Ge, C., Yang, F., & Zhou, J. (2023). **Ensiling hybrid Pennisetum with lactic acid bacteria or organic acids improved the fermentation quality and bacterial community.** Frontiers in Microbiology, 14, 1216722. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216722>

- Galasso, G., Domina, G., Andreatta, S., Argenti, C., Astuti, G., Bacaro, G., Bacchetta, G., Bagella, S., Banfi, E., Barberis, D., Bartolucci, F., Probo, M., & Verloove, F. (2022). **Notulae to the Italian alien vascular flora: 14.** *Italian Botanist*, 14, 99–118.  
<https://doi.org/10.3897/italianbotanist.14.97758>
- García-Pérez, A. L., Sánchez, M., & Rodríguez, J. (2019). **Microbial diversity of Andean pastures: Implications for forage quality and livestock production.** *Applied Soil Ecology*, 135, 12–20.
- Guan, H., Shuai, Y., Yan, Y., Ran, Q., Wang, X., Li, D., Cai, Y., & Zhang, X. (2020). **Microbial community and fermentation dynamics of corn silage prepared with heat-resistant lactic acid bacteria in a hot environment.** *Microorganisms*, 8(5), 719.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8050719>
- Guo, X., Xu, D., Li, F., Bai, J., & Su, R. (2022). **Current approaches on the roles of lactic acid bacteria in crop silage.** *Microbial Biotechnology*, 16(1), 67–87. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14184>
- Haddadin, M., Awaished, S., & Robinson, R. (2004). **The production of yogurt with probiotic bacteria isolated from infants in Jordan.** *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 290–293
- Jaipolsaen, N., Sangsritavong, S., Uengwetwanit, T., Anghong, P., Plengvidhya, V., Rungrassamee, W., & Yammuenart, S. (2022). **Comparison of the effects of microbial inoculants on fermentation quality and microbiota in Napier grass (*Pennisetum purpureum*) and corn (*Zea mays L.*) silage.** *Frontiers in Microbiology*, 12, 784535.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.784535>
- Kandler, O., & Weiss, N. (1986). **Regular, nonsporing Gram positive rods.** In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 2, pp. 1208–1234). Williams & Wilkins.
- Kung, L. Jr., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). **Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages.** *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4020–4033.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Leuschner, R. G. K., Bew, J., Coeuret, V., Vernoux, J.-P., & Gueguen, M. (2003). **A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic lactobacilli in animal feed.** *Food Microbiology*, 20(1), 57–66.  
[https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00103](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00103)
- Li, Z., Li, F., Akhavan Kharazian, Z., & Guo, X. (2023). **Effect of inoculating two bacteriocin-producing *Lactiplantibacillus plantarum* strains at ensiling on in vitro rumen fermentation and methane emissions of alfalfa silage with two dry matter contents.** *Animals*, 13(3), 384.  
<https://doi.org/10.3390/ani13030384>
- Liu, Y., Chen, T., Sun, R., Zi, X., & Li, M. (2022). **Effects of *Lactobacillus plantarum***

- on silage fermentation and bacterial community of three tropical forages.** *Frontiers in Animal Science*, 3, Article 878909. <https://doi.org/10.3389/fanim.2022.878909>
- Liu, Q., Wang, C., & Zhang, Y. (2022). **Characterization of lactic acid bacteria isolated from silages and evaluation of their acidification ability in MRS broth.** *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 984–996.
- McFaddin, J. F. (2004). **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (3.ª ed.).** Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Ncho, C. M., Kim, S.-H., Rang, S. A., & Lee, S.-S. (2024). **A meta-analysis of probiotic interventions to mitigate ruminal methane emissions in cattle: Implications for sustainable livestock farming.** *Animal*, 18(6), 101180. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101180>
- Okoye, C. O., Wang, Y., Gao, L., Wu, Y., Li, X., Sun, J., & Jiang, J. (2023). **The performance of lactic acid bacteria in silage production: A review of modern biotechnology for silage improvement.** *Microbiological Research*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450132200252X>
- Peng, C., Sun, W., Dong, X., Zhao, L., & Hao, J. (2021). **Isolation, identification and utilization of lactic acid bacteria from silage in a warm and humid climate area.** *Scientific Reports*, 11, Article 12586. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34131227/>
- Picado Pérez, T., Lemus, R., Rivera, D., & Villalobos Villalobos, L. A. (2024). **Nutritive and fermentative traits of African Stargrass (*Cynodon nlemfuensis* Vanderyst) forage preserved for silage and haylage.** *Fermentation*, 10(6), 268. <https://doi.org/10.3390/fermentation10060268>
- Standard Methods for the Examination of Dairy Products. (2004). In **Chemical and physical methods (17.ª ed., Ch. 15: Acidity Tests)**. American Public Health Association / American Dairy Products Institute.
- Squara, S., Ferrero, F., Tabacco, E., & Borreani, G. (2023). **Effect of inoculation with *Lentilactobacillus buchneri* and *Lacticaseibacillus paracasei* on the maize silage volatilome: The advantages of advanced 2D chromatographic fingerprinting approaches.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(10), 4214–4224. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03652>
- Xiong, Y., Xu, J., Guo, L., Chen, F., Jiang, D., Lin, Y., Guo, C., Li, X., Chen, Y., Ni, K., & Yang, F. (2022). **Exploring the effects of different bacteria additives on fermentation quality, microbial community and in vitro gas production of forage oat silage.** *Animals*, 12(9), 1122. <https://doi.org/10.3390/ani12091122>

- Xu, H., Wu, N., Na, N., Ding, H., Sun, L., Fang, Y., Li, D., Li, E., Yang, B., Wei, X., & Xue, Y. (2024). **Dynamics of fermentation quality, bacterial communities, and fermentation weight loss during fermentation of sweet sorghum silage.** BMC Microbiology. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38555522/>
- Yang, F., Wang, Y., Zhao, S., & Wang, Y. (2020). **Lactobacillus plantarum inoculants delay spoilage of high moisture alfalfa silages by regulating bacterial community composition.** Frontiers in Microbiology, 11, 614513. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.01989/full>
- You, S., Du, S., Ge, G., Wan, T., & Jia, Y. (2021). **Selection of lactic acid bacteria from native grass silage and its effects as inoculant on silage fermentation.** Agronomy Journal, 113(4), 3169–3177. <https://doi.org/10.1002/agj2.20720>
- Zhang, Y., Yang, H., Huang, R., Wang, X., Ma, C., & Zhang, F. (2022). **Effects of Lactiplantibacillus plantarum and Lactiplantibacillus brevis on fermentation, aerobic stability, and the bacterial community of paper mulberry silage.** Frontiers in Microbiology, 13, Article 1063914. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1063914>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). **A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of the families Lactobacillaceae and Leuconostocaceae.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>