

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 690**

51 Int. Cl.:

**A23K 10/18** (2006.01)

**A23K 20/20** (2006.01)

**A23K 50/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2010 PCT/NL2010/050473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2011 WO11010921**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2010 E 10740410 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2456323**

54 Título: **Composiciones para reducir la metanogénesis gastrointestinal en rumiantes**

30 Prioridad:

**23.07.2009 EP 09166276**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**22.09.2017**

73 Titular/es:

**CARGILL THE NETHERLANDS HOLDING B.V.  
(100.0%)  
Evert van de Beekstraat 378  
1118 CZ Schiphol, NL**

72 Inventor/es:

**PERDOK, HINDRIK BENE;  
VAN ZIJDERVELD, SANDER MARTIJN;  
HULSHOF, ROB BERNARD ANTON;  
DESWYSEN, DAVID;  
GERRITS, WALTER JAN JOZEF;  
DIJKSTRA, JAN;  
NEWBOLD, JOHN RICHARD y  
LENG, RONALD ALFRED**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 633 690 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones para reducir la metanogénesis gastrointestinal en rumiantes

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de los aditivos y complementos para piensos para rumiantes. Más en particular, la invención se refiere a la reducción de la metanogénesis gastrointestinal en dichos rumiantes con la ayuda de agentes inhibidores que compiten por los átomos de hidrógeno necesarios para los metanógenos durante la fermentación normal del alimento ingerido. La presente invención proporciona, entre otros, complementos para piensos y composiciones de piensos que comprenden dichos agentes inhibidores y su uso no terapéutico para reducir la metanogénesis.

**10 Antecedentes de la invención**

15 La metanogénesis es la principal ruta de eliminación de hidrógeno (H<sub>2</sub>) durante el proceso de fermentación ruminal (Beauchemin et al., 2008). La eliminación de H<sub>2</sub> del medio ruminal es esencial para la continuación eficaz de la fermentación ruminal, pero el metano resultante de la metanogénesis se ha implicado tanto en una pérdida de energía dietética para el animal (Johnson y Johnson, 1995) así como en el gas de efecto invernadero significativo que contribuye al calentamiento global (Steinfeld et al., 2006). Ambos objetos han llevado a una búsqueda global de aditivos para piensos para mitigar la producción de metano de los rumiantes.

20 Una de las opciones exploradas para reducir las emisiones de metano es la redirección del exceso de H<sub>2</sub> en procesos que den productos más beneficiosos para el rumiante, disminuyendo así la metanogénesis. Los ejemplos incluyen la estimulación de la propiogénesis por la adición de precursores del propionato y los intentos de introducir acetogénesis reductora en el rumen (Joblin, 1999, Molano et al., 2008). La inducción satisfactoria de estos procedimientos en el rumen proporcionaría respectivamente propionato o acetato como nutrientes para el animal, mientras que al mismo tiempo reduciría la disponibilidad del H<sub>2</sub> para la metanogénesis. Sin embargo, la introducción de precursores de propionato (malato y fumarato) ha dado efectos variables en la producción de metano (Asanuma et al., 1999, Ungerfeld et al., 2007) y los intentos de introducir acetogénesis reductora en el rumen han fracasado hasta ahora debido a la menor afinidad por el hidrógeno comparado con la metanogénesis (Le Van et al., 1998).

Otras opciones para reducir las emisiones de metano se han descrito en el documento US 5.843.498, que se refiere a composiciones de piensos para rumiantes para disminuir la metanogénesis ruminal y mejorar la eficacia de los piensos que comprenden, como un componente eficaz, cisteína y/o sus sales.

30 Un pequeño número de grupos de investigación han buscado el potencial del nitrato como aditivo de piensos reductor de metano, y la adición de nitrato parece que disminuye sistemáticamente la metanogénesis (Guo et al., 2009, Sar et al., 2005, Takahashi et al., 1998).

35 Leng ("The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants", Noviembre de 2008) también describe el papel potencial del nitrato en la reducción de la producción de metano por los rumiantes. Leng también hacía referencia a Tillman et al. ("Nitrate reduction studies with sheep" *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE*, nº. 24, 1965, páginas 1140-1146), que alimentaba ovejas con un complemento que comprendía nitrato y sulfato. Sin embargo, los autores de la invención no describían el efecto de dicho complemento en la producción de metano.

40 La posibilidad de introducir nitrato (NO<sub>3</sub>) como sumidero de hidrógeno alternativo para reducir la metanogénesis en el rumen se ha ignorado durante mucho tiempo, debido a los hallazgos continuos de efectos tóxicos del nitrito que se forma como compuesto intermedio durante la reducción de nitrato a amoniaco en el rumen (Lewis, 1951). Se han descrito dosis altas de nitrato en dietas de rumiantes para producir metahemoglobinemia, reducir la capacidad de la sangre para transportar oxígeno a los tejidos del animal. Además, la acumulación de nitrito en el rumen se sabe que reduce la actividad microbiana en el rumen, lo que, entre otras cosas, puede reducir la ingestión de pienso por el animal.

45 Se ha sugerido suministrar formiato, lactato o fumarato a rumiantes alimentados con alta cantidad de nitrato, con el fin de aliviar el efecto inhibitor del nitrito en la fermentación (Iwamoto, 1999; Iwamoto, 2001). La administración simultánea de nitrato y GOS o nisina también se ha descrito como una medida eficaz para disminuir la concentración de nitrito en el rumen y el plasma y la metahemoglobina, mientras se mantiene la metanogénesis ruminal a un nivel bajo, comparado con el tratamiento con nitrato solo (Sar, 2004).

50 La aceleración de la reducción de nitrito usando probióticos también ha sido objeto de amplia investigación. La patente de EE.UU. nº 6.120.810 enseña la reducción de la intoxicación de rumiantes por nitratos, administrando al animal una composición que contiene una cantidad eficaz del microorganismo reductor de nitrito *Propionibacterium acidipropionici*. La solicitud de patente europea 1630226 describe una composición de pienso para rumiantes que contiene un microbio que tiene actividad de nitrito reductasa, que se selecciona de bacterias intestinales, bacterias corineformes, *Bacillus subtilis*, bacterias del género *Methylophilus*, *Actinomyces*, bacterias ruminales y combinaciones de las mismas. También se ha descrito (Sar, 2005) que *E. Coli* W3110 se podría usar para disminuir la intoxicación cuando se usa nitrato para inhibir la metanogénesis en rumiantes.

Se han investigado los efectos inhibidores de compuestos de azufre, cobre y tungsteno en la reducción de nitrato (Takahashi, 1989). Los autores describen que en el fluido ruminal de carneros castrados adaptados a nitrato (0,55 g de NaNO<sub>3</sub>/kg de peso corporal dos veces al día) la formación de nitrito no era afectada ni por la incubación con S de sulfato ni por la incubación con S de sulfito.

- 5 De los aminoácidos que contienen S, la metionina ha demostrado ser ineficaz en la inhibición de la reducción microbiana de nitrato mientras que la cisteína disminuía significativamente la formación de nitrito. Esta publicación no se refería o dirigía a efectos reductores de la metanogénesis. La eficacia de la cisteína para prevenir la acumulación de nitrito se confirmó en estudios posteriores (Takahashi, 1991; Takahashi 1998).

- 10 El principal objetivo de la presente invención es proporcionar tratamientos, y las composiciones para usar en los mismos, para reducir más la metanogénesis en rumiantes mientras que se evita o se superan problemas particulares asociados con la acumulación de nitrito.

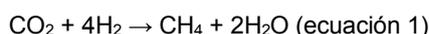
### Resumen de la invención

- 15 La presente invención se ocupa, en un aspecto, de los descubrimientos de que tanto las rutas reductoras de nitrato como también las rutas reductoras de sulfato compiten en la metanogénesis gastrointestinal en rumiantes y que los efectos reductores de la metanogénesis del nitrato y sulfato obtenidos cuando se usan individualmente son completamente aditivos, como se ilustrará con detalle en la parte experimental. Los efectos individuales del nitrato y sulfato parece que son independientes.

- 20 Al mismo tiempo, se encontró que la administración combinada de nitrato y sulfato era completamente eficaz para evitar o mitigar los potenciales problemas de la intoxicación por nitrito encontrados normalmente cuando se usa solo nitrato, como se ilustrará con más detalle en la parte experimental.

Sorprendentemente, mientras que se encontró que la administración de nitrato reducía los recuentos de metanógenos entéricos, la administración de sulfato o de una combinación de nitrato y sulfato no lo hacía. Sin embargo, la administración de la combinación de nitrato y sulfato reduce significativamente la proporción de metanógenos de las bacterias totales.

- 25 Aunque el alcance de la invención no se limita o reduce por ninguna de estas teorías o hipótesis subyacentes, se cree que la reducción de la metanogénesis (ecuación 1) por el nitrato es causada por el uso alternativo de H<sub>2</sub> en la reducción del nitrato a amoníaco. La reducción de nitrato en el rumen se cree que sigue la ruta de reducción descrita en la ecuación 2. Esto implica que 8 moles de H se redirigen a la reducción de nitrato, reduciendo así teóricamente la producción de metano con 1 mol por cada mol de nitrato suministrado. Cada 100 g de NO<sub>3</sub> suministrados de esta  
30 forma conducirían a una reducción de CH<sub>4</sub> de 25,8 g.



- 35 La reducción del nitrato a amoníaco da más energía que la reducción de CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>, y por lo tanto se podría esperar que fuera la ruta principal de eliminación de H<sub>2</sub> si hay suficiente nitrato disponible en el rumen. La reducción completa de NO<sub>3</sub> a NH<sub>3</sub> consume 8 electrones y cada mol de nitrato reducido podría así disminuir las emisiones de metano en 1 mol de metano. El producto final de la reacción, el amoníaco, se puede considerar un nutriente valioso para los rumiantes alimentados con dietas bajas en proteínas.

- 40 Como se ha indicado antes, los autores de la presente invención encontraron que el propio sulfato también es un reductor fuerte eficaz en la reducción de emisiones de metano por un mecanismo independientes de la reducción del nitrato. La reducción de sulfato a H<sub>2</sub>S (ecuación 3) también consume 8 electrones y por lo tanto ofrece el mismo potencial para reducir las emisiones de metano que el nitrato por mol.



- 45 El descubrimiento de que el sulfato también es eficaz en la reducción de la metanogénesis se puede explicar por el hecho de que, desde una perspectiva termodinámica, la reducción de sulfato probablemente también es más favorable que la metanogénesis. Estequiométricamente, la reducción completa de 100 g de sulfato a sulfuro de hidrógeno reduciría la producción de CH<sub>4</sub> en 16,7 g.

Parece que el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) tiene una función como donador de electrones en la reducción del NO<sub>2</sub> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y el enriquecimiento de la dieta con sulfato puede, por lo tanto, producir adicionalmente el alivio de la acumulación de nitrito en el rumen.

- 50 Se encontró además que los resultados se pueden potenciar incluso más por la administración adicional de una cantidad eficaz de microorganismos probióticos reductores de nitrito. Como se ilustrará con detalle en la parte experimental, se observa un retraso inicial en el comienzo de la reducción de nitrito por sulfato, lo cual se puede explicar por un retraso en la disponibilidad del H<sub>2</sub>S inmediatamente después de la ingestión de pienso. Esto a su vez

puede producir una reducción de la ingestión de pienso, y por lo tanto un objeto adicional de la invención es evitar esto. Los autores de la invención encontraron que esto podía realizarse por la coadministración de algunos microorganismos probióticos reductores de nitrito, como se ilustrará con más detalle en la parte experimental.

### Descripción de los dibujos

5 La figura 1 es una gráfica que muestra la producción de metano (l/h) a lo largo de un periodo de 24 en corderos cruzados Texel que recibían una dieta base o una de las tres dietas experimentales, que estaban enriquecidas con un compuesto de nitrato, un compuesto de sulfato o una combinación de un compuesto de nitrato y un compuesto de sulfato.

10 La figura 2 es una gráfica que muestra el consumo de oxígeno (l/kg MW/h) a lo largo de un periodo de 24 en corderos cruzados Texel que recibían una dieta base o una de las tres dietas experimentales, que estaban enriquecidas con un compuesto de nitrato, un compuesto de sulfato o una combinación de un compuesto de nitrato y un compuesto de sulfato.

15 La figura 3 es una gráfica que muestra la concentración de metahemoglobina en la sangre de vacas que recibían una de cuatro dietas experimentales, que estaban enriquecidas con nitrato, o una de las tres combinaciones de nitrato y cantidades crecientes de sulfato.

La figura 4 muestra la producción de gas en la simulación ruminal con diferentes productos de ensayo. Los paneles A a C muestran la producción de gas acumulada en los tiempos de medición indicados. Las barras de error indican el EE entre las repeticiones de los recipientes de simulación y los asteriscos la diferencia estadística respecto al control que contenía  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{MgSO}_4$  (denominado "Nada") con la prueba t.

20 La figura 5 muestra la producción de metano en la simulación ruminal con diferentes productos de ensayo. El panel A muestra la producción de metano acumulada después de la simulación de 12 h, y el panel B la proporción de metano en el gas total producido. Las barras de error indican el EE entre las repeticiones de los recipientes de simulación y los asteriscos la diferencia estadística respecto al control que contenía  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{MgSO}_4$  (denominado "Nada") con la prueba t.

25 La figura 6 muestra la concentración residual de nitrato en la simulación ruminal con diferentes productos de ensayo. Los paneles A a C muestran la concentración residual de nitrato después de 2, 4 y 12 h de fermentación, respectivamente. Las barras de error indican el EE entre las repeticiones de los recipientes de simulación y los asteriscos la diferencia estadística respecto al control que contenía  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{MgSO}_4$  (denominado "Nada") con la prueba t.

30 La figura 7 muestra la concentración residual de nitrito en la simulación ruminal con diferentes productos de ensayo. Los paneles A a C muestran la concentración residual de nitrito después de 2, 4 y 12 horas de fermentación, respectivamente. Las barras de error indican el EE entre las repeticiones de los recipientes de simulación y los asteriscos la diferencia estadística respecto al control que contenía  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{MgSO}_4$  (denominado "Nada") con la prueba t.

35 La figura 8 muestra la concentración residual de amoníaco en la simulación ruminal con diferentes productos de ensayo. Los paneles A a C muestran la concentración residual de amonio después de 2, 4 y 12 horas de fermentación, respectivamente. Las barras de error indican el EE entre las repeticiones de los recipientes de simulación y los asteriscos la diferencia estadística respecto al control que contenía  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{MgSO}_4$  (denominado "Nada") con la prueba t.

### 40 Descripción detallada de la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere a un complemento de pienso para animales que comprende 10-100% de una combinación de un compuesto de nitrato y un compuesto de sulfato.

45 En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitante para significar que están incluidos los elementos que siguen a la palabra, pero elementos no mencionados específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de un elemento, salvo que el contexto claramente requiera que haya uno y solo uno de los elementos. Por lo tanto, el artículo indefinido "un" o "una" normalmente significa "al menos uno".

50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "complemento de pienso para animales" se refiere a una premezcla de aditivos concentrada que comprende los ingredientes activos, cuya premezcla o complemento se pueden añadir a un pienso o ración para animales para formar un pienso enriquecido de acuerdo con la presente invención. Las expresiones "premezcla de pienso para animales", "complemento de pienso para animales" y "aditivo de pienso para animales" en general se considera que tienen significados similares o idénticos y en general se consideran intercambiables. Típicamente, el complemento de pienso para animales de la presente invención está en forma de un polvo o sólido compactado o granulado. En la práctica, típicamente se puede dar al ganado el

complemento de pienso para animales añadiéndolo directamente en la ración, p. ej., como el llamado *top-dress*, o se puede usar en la preparación o fabricación de productos tales como piensos compuestos para animales o bloques para lamer, que se describirán con más detalle en lo sucesivo. La invención no está particularmente limitada en relación con esto. Típicamente un complemento, de acuerdo con la invención, se suministra a un animal en una cantidad en el intervalo de 16-2500 g/animal/día.

El presente complemento de pienso para animales comprende un compuesto de nitrato, típicamente un compuesto de nitrato fisiológicamente aceptable o tolerado. De acuerdo con la invención, el N del nitrato tiene que estar fácilmente disponible por la reducción por los microorganismos del rumen o intestino y el compuesto de nitrato debe tener suficiente solubilidad en agua. Por lo tanto, de acuerdo con esta invención, el compuesto de nitrato preferiblemente es un compuesto de nitrato iónico, lo más preferiblemente una sal de nitrato inorgánico, tal como nitrato sódico, nitrato potásico, nitrato de calcio, nitrato amónico, todos los cuales son fácilmente solubles en agua a temperatura y presión estándar. Además, desde la perspectiva de salud y seguridad, típicamente se prefiere usar complejo de sales de nitrato inorgánicas, tales como el compuesto representado por la fórmula  $5 \cdot \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , que está disponible en el mercado en Yara con el nombre comercial "Calcinit".

El presente complemento de pienso para animales también comprende un compuesto de sulfato, típicamente un compuesto de sulfato fisiológicamente aceptable o tolerado. De acuerdo con la invención se prefiere que el compuesto de sulfato sea un compuesto de sulfato iónico, lo más preferiblemente seleccionado del grupo de sales de sulfato inorgánicas, muchas de las cuales son muy solubles en agua. Las excepciones incluyen sulfato de calcio. Se prefiere en particular que el presente compuesto de sulfato se seleccione del grupo de sales de sulfato inorgánicas solubles, que incluyen sulfato sódico, sulfato potásico, sulfato de magnesio, sulfato de cinc, sulfato de manganeso, sulfato de cobre y sulfato ferroso.

En realizaciones preferidas de la invención, el complemento comprende la combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato en una cantidad en el intervalo de 10-100% en peso, preferiblemente dicha cantidad es superior a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97 o 99% en peso, basado en el peso seco.

Puesto que la presente invención en parte se basa en el descubrimiento de que, para el propósito de reducir la metanogénesis gastrointestinal en el rumiante, el nitrato y el sulfato son en parte intercambiables, la relación molar entre el nitrato y el sulfato en el complemento puede estar típicamente en el intervalo de 100:1-1:50, más preferiblemente de 50:1-1:10, 25:1-1:5, o 10:1- 1:2.5, y lo más preferiblemente 5:1-1:1.

La combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato en el complemento del pienso de la invención, típicamente proporciona una cantidad total de nitrato y sulfato superior a 50 g/kg, basado en el peso seco. En una realización preferida, dicha cantidad total de nitrato y sulfato es superior a 75 g/kg, más preferiblemente 90 g/kg, lo más preferiblemente 100 g/kg. En la práctica dicha cantidad típicamente es inferior a 750 g/kg. En otra realización preferida, la cantidad de sulfato en el complemento de pienso es superior a 25 g/kg, más preferiblemente 40 g/kg, lo más preferiblemente 50 g/kg basado en el peso seco. Típicamente dicha cantidad no es superior a 250 g/kg, preferiblemente no es superior a 200 g/kg, lo más preferiblemente no es superior a 165 g/kg. En otra realización preferida, la cantidad de nitrato en el complemento de pienso es superior a 20 g/kg, más preferiblemente 30 g/kg, lo más preferiblemente 40 g/kg, basado en el peso seco. Típicamente, dicha cantidad es inferior a 600 g/kg, más preferiblemente inferior a 550 g/kg, basado en el peso seco.

Todas las cantidades y/o dosificaciones de "nitrato" y/o "sulfato" usadas en la presente memoria, salvo que se indique otra cosa, se refieren al peso de nitrato y/o sulfato comprendido en o proporcionado por los compuestos de nitrato y/o sulfato, con respecto al peso seco total de la composición, como entenderá el experto en la técnica. Está dentro de la experiencia del profesional entrenado determinar exactamente las cantidades ideales de los componentes que se van a incluir en el complemento y las cantidades del complemento que se usan en la preparación de la ración o el pienso compuesto para animales, etc., teniendo en cuenta el tipo específico de animal y las circunstancias en las que se mantiene. Las dosificaciones preferidas de cada componente se dan a continuación.

Los complementos de piensos para animales de la presente invención pueden comprender cualquier ingrediente adicional sin salirse del alcance de la invención. Típicamente pueden comprender excipientes bien conocidos que son necesarios para preparar la forma de producto deseada y pueden comprender aditivos adicionales dirigidos a mejorar la calidad del pienso y/o mejorar el rendimiento del consumo del complemento por el animal. Los ejemplos adecuados de dichos excipientes incluyen vehículos o cargas, tales como lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa cristalina hidrogenocarbonato sódico, cloruro sódico y similares y aglutinantes, tales como goma arábiga, goma de tragacanto, alginato sódico, almidón, PVP y derivados de celulosa, etc. Los ejemplos de aditivos de piensos conocidos para los expertos en la técnica incluyen vitaminas, aminoácidos y oligoelementos, potenciadores de la digestibilidad y estabilizantes de la flora intestinal y similares.

En una realización preferida, el complemento de pienso para animales comprende adicionalmente un microorganismo probiótico reductor de nitrito. Como se usa en la presente memoria, la expresión "microorganismo probiótico de nitrito" se refiere a microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedante, reduciendo el nitrito que se acumula en el rumen y/o intestino a amonio, como se ha explicado en lo que antecede. Los expertos en la materia conocen muchos ejemplos de dichos

microorganismos reductores de nitrito. Los ejemplos preferidos de microorganismos probióticos reductores de nitrito incluyen bacterias ruminales e intestinales que tienen actividad de nitrito reductasa, *Propionibacterium acidipropionici*, bacterias corineformes, *Bacillus subtilis*, bacterias del género *Methylophilus*, *Actinomyces* y *Escherichia coli* W3110. Lo más preferiblemente, de acuerdo con la presente invención, el microorganismo probiótico reductor de nitrito se selecciona del grupo de *Megasphaera elsdenii*, en particular cepas ruminales de las mismas, y *Propionibacterium acidipropionici*, en particular *Propionibacterium acidipropionici* cepa P5, registrada con el número de acceso 55467 en la colección de microorganismos de the American Type Culture Collection (ATCC) y disponible en el mercado como "Bova-Pro® concentrate" de Agtech Products Inc.

En una realización preferida, se proporciona un complemento de pienso para animales como se ha definido en lo que antecede, que comprende adicionalmente dicho microorganismo probiótico reductor de nitrito en una cantidad de  $1,0 \times 10^8$ - $1,0 \times 10^{14}$  ufc/kg, más preferiblemente  $1,0 \times 10^9$ - $1,0 \times 10^{13}$  ufc/kg, lo más preferiblemente  $1,0 \times 10^{10}$ - $1,0 \times 10^{12}$  ufc/kg, por ejemplo  $1,0 \times 10^{11}$  ufc/kg, basado en el peso seco. Como conocen los expertos en la técnica, la unidad formadora de colonia (UFC) es una medida de cifras de bacterias u hongos viables. A diferencia de los recuentos directos con microscopio donde se cuentan todas las células, vivas y muertas, las UFC miden las células viables y se determinan, por ejemplo, extendiendo una muestra (diluida) sobre una placa de agar, o agar tripticasa soya y contando las colonias así obtenidas.

Además, los autores de la presente invención han encontrado que se obtienen buenos resultados cuando se administra ácido láctico o un compuesto de lactato. Sin querer estar limitado por ninguna teoría particular, se cree que el complemento de ácido láctico o lactato puede potenciar la eficacia de los microorganismos probióticos. Por lo tanto, en una realización preferida, se proporciona un pienso compuesto para animales como se ha definido en lo que antecede, que comprende adicionalmente una cantidad eficaz de lactato o un ácido láctico, preferiblemente comprende ácido láctico o lactato en una cantidad superior a 20 g/kg, más preferiblemente 30 g/kg, lo más preferiblemente 40 g/kg, basado en el peso seco.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a productos tales como piensos compuestos para animales y bloques para lamer, que comprenden un complemento como se define en lo que antecede.

Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona una composición de pienso compuesto para animales que comprende una combinación de un compuesto de nitrato y un compuesto de sulfato, proporcionando dicha combinación una cantidad total de nitrato y sulfato superior a 10 g/kg, basado en el peso seco.

La expresión "composición de pienso compuesto para animales" como se usa en la presente memoria, significa una composición que es adecuada para usar como un pienso para animales y que es una mezcla de varias bases naturales o no naturales o materias primas y/o aditivos. Por lo tanto, en particular, el término "compuesto" se usa en la presente memoria para distinguir las presentes composiciones de piensos para animales de cualquier materia prima que se encuentra de forma natural. Estas mezclas o piensos compuestos se formulan de acuerdo con requisitos específicos del animal objetivo. Los ingredientes principales usados en los piensos compuestos preparados comercialmente típicamente incluyen salvado de trigo, salvado de arroz, harina de maíz, granos de cereales, tales como cebada, trigo, centeno y avena, harina de soja, harina de alfalfa, polvo de trigo y similares. Un pienso compuesto comercial comprenderá típicamente no menos de 15% de proteína bruta y no menos de 70% de nutrientes totales digeribles, aunque la invención no está particularmente limitada en relación con esto. Están abarcadas dentro del alcance de la presente invención composiciones de piensos compuestos para animales líquidas, sólidas, así como semisólidas, siendo particularmente preferidas las formas sólidas y semisólidas. Estas composiciones típicamente se fabrican como tipos de harinas, pellets o desmenuzados. En la práctica, el ganado se puede alimentar típicamente con una combinación de pienso compuesto, tal como el de la presente invención, y forraje ensilado o heno o similares. Típicamente, un pienso compuesto para animales se suministra en una cantidad en el intervalo de 0,3-10 kg/animal/día. Está dentro de las habilidades del experto determinar las cantidades adecuadas de estos componentes que hay que incluir en el pienso compuesto para animales, teniendo en cuenta el tipo de animal y las circunstancias en las que se mantiene.

La combinación de compuesto de nitrato y compuesto de sulfato en el pienso compuesto para animales de la invención, proporciona típicamente una cantidad total de nitrato y sulfato superior a 10 g/kg, basado en el peso seco. En una realización preferida dicha cantidad total de nitrato y sulfato es superior a 15 g/kg, más preferiblemente 17,5 g/kg, lo más preferiblemente 20 g/kg. En la práctica dicha cantidad típicamente es inferior a 750 g/kg, preferiblemente inferior a 500 g/kg, más preferiblemente inferior a 250 g/kg. En otra realización preferida, la cantidad de sulfato en el pienso compuesto para animales es superior a 5 g/kg, más preferiblemente 7,5 g/kg, 10 g/kg, o 12 g/kg, basado en el peso seco. Típicamente dicha cantidad no es superior a 200 g/kg, preferiblemente no es superior a 175 g/kg, lo más preferiblemente no es superior a 150 g/kg. En otra realización preferida, la cantidad de nitrato en el pienso compuesto es superior a 5 g/kg, más preferiblemente 7,5 g/kg, lo más preferiblemente 10 g/kg, basado en el peso seco. Típicamente dicha cantidad es inferior a 600 g/kg, más preferiblemente inferior a 500 g/kg, lo más preferiblemente inferior a 250 g/kg, basado en el peso seco. Además, en una realización preferida, se proporciona un pienso compuesto para animales como se define en lo que antecede, que comprende adicionalmente el microorganismo probiótico reductor de nitrito en una cantidad de  $1,0 \times 10^9$ - $1,0 \times 10^{14}$  ufc/kg, más preferiblemente  $1,0 \times 10^9$ - $1,0 \times 10^{13}$  ufc/kg, lo más preferiblemente  $1,0 \times 10^{10}$ - $1,0 \times 10^{12}$  ufc/kg. Además, en una realización preferida, se proporciona un pienso animal como se define en lo que antecede, que además comprende una cantidad eficaz de

lactato o ácido láctico, preferiblemente en una cantidad superior a 5 g/kg, más preferiblemente 7,5 g/kg, lo más preferiblemente 10 g/kg.

5 Las composiciones de piensos compuestos para animales de la invención pueden comprender cualquier aditivo de pienso adicional típicamente usado en la técnica. Como conocen los expertos en la materia, la expresión “aditivo de pienso” en este contexto se refiere a productos usados en la nutrición animal para los fines de mejorar la calidad del pienso y la calidad de los alimentos de origen animal, o mejorar el rendimiento de los animales, p. ej., proporcionando una mayor digestibilidad de los materiales del pienso. Los ejemplos no limitantes incluyen aditivos tecnológicos tales como conservantes, antioxidantes, emulsionantes, agentes estabilizantes, reguladores de la acidez y aditivos de ensilado; aditivos sensoriales, en especial aromas y colorantes; aditivos nutricionales (adicionales), tales como vitaminas, aminoácidos y oligoelementos; y aditivos zootécnicos (adicionales), tales como potenciadores de la digestibilidad y estabilizantes de la flora intestinal.

Como estará claro para los expertos en la técnica, las presentes composiciones de piensos compuestos para animales pueden comprender cualquier ingrediente o aditivo adicional, sin salirse del alcance de la invención.

15 En un aspecto adicional, la invención proporciona una piedra para lamer o bloque para lamer que comprende el complemento de la invención. Como conocen los expertos en la técnica dichas piedras o bloques para lamer son particularmente convenientes para suministrar complementos minerales (así como proteínas e hidratos de carbono) a los rumiantes que pastan tanto pastos naturales como cultivados o cualquiera de ellos. Dichos bloques para lamer o piedras para lamer de acuerdo con la presente invención típicamente comprenden, además de la combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato y el microorganismo probiótico reductor de nitrito óptimo de la invención, diferentes tipos de aglutinantes, p. ej., cementos, yeso, cal, fosfato cálcico, carbonato y/o gelatina; y opcionalmente aditivos adicionales tales como vitaminas, oligoelementos, sales minerales, aditivos sensoriales, etc.

25 La combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato en el bloque para lamer de la invención típicamente proporciona una cantidad total de nitrato y sulfato superior a 15 g/kg, basado en el peso seco. En una realización preferida, dicha cantidad total de nitrato y sulfato es superior a 25 g/kg, más preferiblemente 30 g/kg. En la práctica dicha cantidad típicamente es inferior a 450 g/kg, preferiblemente inferior a 400 g/kg. En otra realización preferida, la cantidad de sulfato en el bloque para lamer es superior a 3 g/kg, más preferiblemente 5 g/kg, lo más preferiblemente 6 g/kg, basado en el peso seco. Típicamente dicha cantidad no es superior a 150 g/kg, preferiblemente no es superior a 100 g/kg, lo más preferiblemente no es superior a 75 g/kg. En otra realización preferida, la cantidad de nitrato en el bloque para lamer es superior a 10 g/kg, más preferiblemente 20 g/kg, lo más preferiblemente 25 g/kg, basado en el peso seco. Típicamente dicha cantidad es inferior a 400 g/kg, más preferiblemente inferior a 300 g/kg, basado en el peso seco. En una realización preferida, se proporciona un bloque para lamer como se define en lo que antecede, que comprende además el microorganismo probiótico reductor en una cantidad de  $1,0 \cdot 10^8$ - $1,0 \cdot 10^{14}$  ufc/kg, más preferiblemente  $1,0 \cdot 10^9$ - $1,0 \cdot 10^{13}$  ufc/kg, lo más preferiblemente  $1,0 \cdot 10^{10}$ - $1,0 \cdot 10^{12}$  ufc/kg.

35 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de reducción de la producción de metano gastrointestinal en un rumiante, comprendiendo dicho método administrar al rumiante una cantidad eficaz de una combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato, en donde dicho método no es terapéutico.

40 La expresión “reducir la metanogénesis gastrointestinal” como se usa en la presente memoria se refiere a la reducción de la producción de gas metano en el tracto gastrointestinal. Como se ha explicado antes en la presente memoria, la fermentación en el rumen y el intestino de un rumiante da lugar a la producción de gas metano por los llamados metanógenos. La presente invención se dirige a reducir este proceso, de modo que se reduzca la excreción de metano directamente del tracto gastrointestinal. Está dentro de las habilidades de los expertos en la técnica evaluar la excreción de metano por un animal. Como se ha explicado antes, la producción de metano en el rumen y el intestino es un proceso que ocurre normalmente en animales sanos y la disminución de la metanogénesis no potencia o disminuye el estado general de salud o bienestar del rumiante. No obstante, una reducción de la formación de metano usando la combinación de un compuesto de nitrato y un compuesto de sulfato puede aumentar la eficacia del uso de nutrientes del animal, de modo que el presente método puede potenciar el crecimiento y/o productividad del animal.

50 Como reconocerán fácilmente los expertos en la técnica, el presente método de tratamiento no será eficaz en un estado conocido como “meteorismo”. El meteorismo es una afección descrita habitualmente como una distensión anormal del rumen como una consecuencia de la acumulación de gas en el rumen. El gas (dióxido de carbono, metano y otros gases) es producido normalmente durante la fermentación ruminal y normalmente es eructado a través del esófago, previniendo la acumulación de gases. Durante la incidencia del meteorismo, el esófago es bloqueado por una capa de espuma. La abertura del esófago contiene receptores que bloquean el esófago si se detecta líquido (o espuma). La espuma que se forma durante el meteorismo, procede de la rápida fermentación de partículas de pienso pequeñas. La causa del meteorismo es la formación de espuma y no la producción de gases ruminales, que es un proceso que ocurre de forma natural den el rumiante. Como consecuencia, la producción de metano no puede verse como la causa del meteorismo y la reducción de metano no puede verse como un tratamiento para el meteorismo. El tratamiento terapéutico contra el meteorismo está dirigido a la prevención de la formación de la capa de espuma en el rumen o su eliminación, no a la prevención de la producción de gases

ruminales. Además, el dióxido de carbono es el gas principal producido durante la fermentación ruminal. El presente método, por lo tanto, tampoco está dirigido ni es adecuado para el tratamiento del meteorismo o para aliviar los síntomas del mismo.

5 Por lo tanto, el presente método de tratamiento es un método de tratamiento no terapéutico, es decir, el método no mejora la salud de un animal que padezca una afección particular, no previene una enfermedad o afección particulares, ni tampoco afecta en ninguna medida a la salud del rumiante de ninguna otra forma, es decir, comparado con un rumiante que no recibe el presente método de tratamiento. Las ventajas del presente método están limitadas a aspectos medioambientales y/o económicas como se ha explicado antes.

10 Taxonómicamente, un rumiante es un mamífero del orden *Artiodactyla* que digiere alimento basado en plantas ablandándolo inicialmente dentro del primer estómago del animal, conocido como el rumen, después regurgitando la masa semidigerida, conocida ahora como bolo alimenticio, y masticándolo de nuevo. El proceso de remasticado del bolo alimenticio para romper más la materia vegetal y estimular la digestión se llama "rumia". Los animales rumiantes incluyen vacas, cabras, ovejas, jirafas, bisontes, yaks, búfalos de agua, ciervos, camellos, alpacas, llamas, ñus, antílopes, berrentos y ciervos nilgai. La presente invención se refiere principalmente a métodos de tratamiento de  
15 rumiantes domesticados, en especial los mantenidos para la cría de ganado comercial. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el rumiante se selecciona del grupo de ganado, cabras, ovejas y búfalos.

Una realización preferida de la invención proporciona un método como se ha descrito antes, en donde se administra la combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato al rumiante en una cantidad que proporciona una dosificación total de nitrato y sulfato superior a 0,05 g/kg de peso corporal al día. En una realización preferida dicha  
20 dosificación total de nitrato y sulfato en el presente método está en el intervalo de 0,05-10 g/kg de peso corporal al día, más preferiblemente 0,1-5 g/kg de peso corporal al día, lo más preferiblemente 0,2- 2,5 g/kg de peso corporal al día.

En otra realización preferida, se proporciona un método como se define en lo que antecede, en donde la dosificación de sulfato está en el intervalo de 0,025-1,8 g/kg de peso corporal al día, más preferiblemente en el intervalo de 0,05-  
25 0,9 g/kg de peso corporal al día, lo más preferiblemente 0,1-0,45 g/kg de peso corporal al día.

En otra realización preferida, se proporciona un método como se define en lo que antecede, en donde la dosificación de nitrato está en el intervalo de 0,025-8 g/kg de peso corporal al día, más preferiblemente 0,05-4 g/kg de peso corporal al día, lo más preferiblemente 0,1-2 g/kg de peso corporal al día.

30 Las dosificaciones definidas en la presente memoria como la cantidad por kg de peso corporal al día, se refieren a la cantidad media del respectivo compuesto durante un periodo de tratamiento dado, p. ej., durante una semana o un mes de tratamiento. Por lo tanto, los compuestos se pueden administrar cada día, en días alternos, cada dos días, etc., sin salirse del alcance de la invención. Pero preferiblemente, el método comprende la administración diaria de la combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato en las dosificaciones prescritas. Incluso más preferiblemente, la combinación se administra durante la alimentación del animal cada vez que se alimenta al  
35 animal, en cantidades que dan las dosificaciones diarias anteriores.

Como se ha explicado antes, la capacidad de la microflora ruminal para reducir el nitrato a nitrito de animales no adaptados previamente al nitrato en su dieta, supera su capacidad para reducir el nitrito a amoníaco. Esto puede dar como resultado una acumulación neta de nitrito en el rumen, que es absorbido rápidamente a través de la pared del rumen y convierte la hemoglobina de la sangre de la forma ferrosa a la férrica, metahemoglobina, haciendo que la  
40 molécula de hemoglobina sea incapaz de transportar oxígeno a los tejidos. La afección resultante, la metahemoglobinemia, es un estado de anoxia general, que en casos leves puede deprimir el rendimiento del animal, pero en casos graves puede dar como resultado la muerte del animal. Los autores de la presente invención han establecido que, en el presente método, la introducción por pasos, cuidadosa, del nitrato en la dieta de ovejas permite que la microflora ruminal se adapte y aumente su capacidad para reducir tanto el nitrato como el nitrito. Se ha mostrado que la oveja adaptada lentamente a dietas con alto contenido en nitrato, no experimenta signos clínicos de metahemoglobinemia. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el método comprende una  
45 primera fase de adaptación al nitrato y una segunda fase de tratamiento continuado, comprendiendo dicha primera fase dos o más, preferiblemente tres o más, periodos consecutivos de al menos 3 días, preferiblemente al menos 4 días, lo más preferiblemente al menos 5 días, en donde la dosificación diaria media de nitrato durante cada periodo es menor de 100% de la dosificación diaria media administrada durante la segunda fase, y en donde la dosificación diaria media durante cada periodo es mayor que la dosificación diaria media durante el periodo precedente. En una realización preferida, el aumento de la dosificación diaria media desde un periodo al siguiente es menor que 1 g/kg de peso corporal al día, preferiblemente menos de 0,5, más preferiblemente menos de 0,25, lo más preferiblemente  
50 menos de 0,1 g/kg de peso corporal al día. Preferiblemente, dicha segunda fase comprende un periodo de más de 5, 10, 25, 50, 100, 250 o 350 días de administración de la combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato en una dosificación diaria media en el intervalo de 0,15-3 g/kg de peso corporal.

Los métodos definidos antes, con o sin la fase de adaptación inicial, en una realización preferida, también comprenden la administración al rumiante del microorganismo probiótico reductor de nitrito como se ha definido en lo que antecede. Se prefiere en particular administrar dicho microorganismo probiótico en una cantidad de  $1,0 \times 10^5$ -

5  $1,0 \cdot 10^{14}$  ufc/kg de peso corporal al día, más preferiblemente  $1,0 \cdot 10^7$ - $1,0 \cdot 10^{13}$  ufc/kg de peso corporal al día, lo más preferiblemente  $1,0 \cdot 10^9$ - $1,0 \cdot 10^{12}$  ufc/kg de peso corporal al día. En una realización preferida, dichos métodos comprenden la administración del microorganismo probiótico y la administración de ácido láctico o lactato. Se prefiere en particular administrar ácido láctico o lactato en una cantidad de al menos 0,025 g/kg de peso corporal al día, más preferiblemente 0,05-5 g/kg de peso corporal al día, lo más preferiblemente 0,1-2,5 g/kg de peso corporal al día.

10 El presente método puede comprender la administración de la combinación del compuesto de nitrato, el compuesto de sulfato y, opcionalmente, el microorganismo probiótico reductor de nitrito de acuerdo con los regímenes de dosificación descritos antes, durante un periodo de al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250 o 350 días. Como se ha indicado en lo que antecede, un aspecto interesante de la invención está en el hecho de que el presente método proporciona eficacias muy persistentes en la reducción de la metanogénesis entérica, es decir, el efecto no disminuye a lo largo de periodos prolongados de tratamiento, p. ej., como resultado de aumentar la resistencia de microorganismos del rumen o intestino, haciendo así factible el tratamiento a largo plazo del rumiante.

15 Como estará claro a partir de lo anterior, el presente método comprende la administración oral de la combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato y, opcionalmente, el microorganismo probiótico reductor de nitrito. Preferiblemente, el tratamiento comprende la administración oral de las composiciones de piensos compuestos para animales y/o los productos de complementos de piensos para animales como se ha definido en lo que antecede, aunque se pueden usar otras composiciones ingeribles por vía oral líquidas, sólidas o semisólidas, sin salirse del alcance de la invención, como entenderán los expertos en la materia.

20 De acuerdo con lo anterior, un aspecto más de la invención se refiere al uso de una composición que comprende una combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato para una reducción no terapéutica de la producción de metano gastrointestinal en un rumiante. Se prefiere que el uso comprenda administrar la combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato al rumiante en una cantidad que proporcione una dosificación total de nitrato y sulfato superior a 0,05 g/kg de peso corporal al día. Preferiblemente, el compuesto de nitrato y el  
25 compuesto de sulfato se usan en las dosificaciones descritas en lo que antecede. En otra realización preferida, el uso comprende además administrar al rumiante el microorganismo probiótico reductor de nitrito en las dosificaciones descritas en lo que antecede. Todavía más preferiblemente, se proporciona el uso de una cualquiera de las composiciones como se define en lo que antecede para la reducción no terapéutica de la producción de metano gastrointestinal en un rumiante.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a tratamiento terapéuticos de rumiantes que reciben nitrato. Como se ha explicado antes, se sabe que el complemento de nitrato de los rumiantes ayudará a la disminución de la metanogénesis gastrointestinal, pero también aumenta el riesgo de incidencia de la acumulación de nitrito, el llamado "síndrome de toxicidad del nitrato" y/o de metahemoglobinemia, reduciendo la capacidad de la sangre para transportar oxígeno al tejido del animal. Además, la acumulación de nitrito en el rumen se sabe que reduce la actividad microbiana en el rumen, que, entre otras cosas, puede reducir la ingestión de pienso por el animal. Como  
35 se ha explicado antes, los autores de la presente invención han establecido que la administración a dichos rumiantes que reciben nitrato de un compuesto de sulfato, preferiblemente en combinación con un microorganismo probiótico reductor de nitrito, reduce mucho o incluso previene estos efectos adversos.

40 Por lo tanto, un aspecto la invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de la acumulación de nitrito, el "síndrome de toxicidad del nitrato" y/o la metahemoglobinemia en rumiantes que reciben nitrato, que comprende la administración a dicho rumiante de una cantidad eficaz del compuesto de sulfato, opcionalmente en combinación con una cantidad eficaz del microorganismo probiótico reductor de nitrito.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a la preparación que comprende el compuesto de sulfato, opcionalmente en combinación con el microorganismo probiótico reductor de nitrito, para usar en el método de tratamiento o prevención de la acumulación de nitrito, el "síndrome de toxicidad del nitrato" y/o la metahemoglobinemia en rumiantes que reciben nitrato.

Otro aspecto más de la invención se refiere al uso del compuesto de sulfato opcionalmente en combinación con el microorganismo probiótico reductor de nitrito, en la fabricación de la preparación para usar en un método para tratar o prevenir la acumulación de nitrito, el "síndrome de toxicidad del nitrato" y/o la metahemoglobinemia en rumiantes  
50 que reciben nitrato.

De acuerdo con lo anterior, el método de tratamiento y/o prevención de la acumulación de nitrito, el "síndrome de toxicidad del nitrato" y/o la metahemoglobinemia, comprende típicamente la administración de dichas composiciones en cantidades suficientes para proporcionar una dosificación total de sulfato dentro del intervalo de 0,025-1,8 g/kg de peso corporal al día, más preferiblemente 0,05-0,9 g/kg de peso corporal al día, lo más preferiblemente 0,1-0,45 g/kg de peso corporal al día, y opcionalmente, una dosificación total de dicho microorganismo probiótico de  $1,0 \cdot 10^5$ -  
55  $1,0 \cdot 10^{14}$  ufc/kg de peso corporal al día, más preferiblemente  $1,0 \cdot 10^7$ - $1,0 \cdot 10^{13}$  ufc/kg de peso corporal al día, lo más preferiblemente  $1,0 \cdot 10^9$ - $1,0 \cdot 10^{12}$  ufc/kg de peso corporal al día. En una realización preferida, dicho método comprende administrar el microorganismo probiótico y administrar ácido láctico o lactato. Se prefiere en particular administrar ácido láctico o lactato en una cantidad de al menos 0,025 g/kg de peso corporal al día, más

preferiblemente 0,05-5 g/kg de peso corporal al día, lo más preferiblemente 0,1-2,5 g/kg de peso corporal al día.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “rumiante que recibe nitrato” se refiere a un rumiante que recibe cantidades sustanciales de nitrato, típicamente a través del pienso. Preferiblemente el rumiante recibe nitrato en cantidades suficientes para disminuir la metanogénesis gastrointestinal, más preferiblemente en cantidades superiores a 0,025 g/kg de peso corporal al día, lo más preferiblemente 0,05-8 g/kg de peso corporal al día. Como entenderán los expertos en la técnica, el método puede ser igualmente adecuado para tratar o prevenir la acumulación de nitrito, el “síndrome de toxicidad del nitrato” y/o la metahemoglobinemia en ruminantes que reciben cantidades sustanciales de nitrato para otros propósitos o incluso de forma no deliberada, p. ej., como resultado de condiciones ambientales.

- 5
- 10 La invención como se ha definido antes se ilustrará y explicará con más detalle en la siguiente parte experimental, que no se pretende que limite el alcance de la invención de ninguna forma.

Ejemplo I: Nitrato y sulfato en la mitigación del metano

Material y métodos

Animales y alojamiento

- 15 En el presente experimento se evaluaron las propiedades reductoras de metano del nitrato y sulfato en la dieta. Tanto el nitrato como el sulfato se introdujeron lentamente en la dieta durante un periodo de adaptación de 4 semanas. Se vigilaron la ingestión de pienso y el crecimiento durante el experimento. Se planteó la hipótesis de que tanto el nitrato como el sulfato de la dieta reducirían las emisiones de metano de la fermentación entérica.

- 20 El Comité para el Cuidado y Uso de Animales del Grupo de Ciencias Animales, WUR, de Lelystad aprobó el protocolo de este experimento. El experimento se llevó a cabo en 20 corderos cruzados Texel, que pesaban  $42,9 \pm 4,3$  kg (media  $\pm$  desviación estándar) al inicio del experimento. Durante una fase de adaptación de 4 semanas a los aditivos de la dieta, los animales se alojaron en casetas para terneros individuales para permitir la alimentación individual. Las ovejas se pesaron semanalmente para vigilar el crecimiento durante todo el experimento.

- 25 Después del periodo de adaptación, cuatro animales (un bloque) se alojó en cámaras respiratorias de calorimetría indirecta durante una semana para determinar el intercambio gaseoso. En las siguientes semanas se introdujo un nuevo bloque de ovejas en las cámaras cada semana. Cada cámara respiratoria alojaba una oveja individual. Las cámaras respiratorias de calorimetría se describen con detalle en Versteegen et al. (1987). La temperatura se mantuvo a 15°C, y la humedad relativa se fijó en 70%. La tasa de ventilación era 70 l/min para un tipo de cámaras y 90 l/min para el otro tipo.

- 30 Se analizó en el aire que entraba y salía de las cámaras el CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> en intervalos de 9 min. La producción neta y consumo de estos gases se calculó a partir de la diferencia en concentraciones entre el aire de entrada y de salida multiplicado por el flujo de aire y posteriormente recalculado para circunstancias estándar (0°C, 101 kPa, sin vapor de agua).

Diseño del experimento

- 35 El experimento se diseñó como un diseño factorial 2x2, con nitrato y sulfato como factores. Los animales se distribuyeron en bloques por peso y posteriormente dentro de un bloque se asignaron aleatoriamente a cuatro tratamiento dietéticos: CON, NO<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub> o NO<sub>3</sub>+SO<sub>4</sub>.

Alimentación

- 40 La dieta base consistía en 74% de silaje de maíz, 16% de paja de cebada picada, 9% de harina de soja tratada con formaldehído y 1% de una premezcla mineral, basado en la MS (materia seca). Los aditivos de la dieta se incluyeron en una mezcla (tabla 1) que se añadió a la dieta base en un 10% de MS de la dieta. Durante la alimentación, las premezclas se mezclaron manualmente en las dietas. El agua estaba a libre disposición durante el experimento. El nitrato se aportó de una fuente disponible en el comercio (Calcinit, Yara) y el aporte de SO<sub>4</sub> se añadió a la dieta en forma de MgSO<sub>4</sub> anhidro.

- 45 Durante la fase de adaptación, se introdujo a las ovejas en las premezclas en etapas de 25% por semana. Los corderos se alimentaron una vez al día a las 8:30. Antes de la alimentación de la mañana, las sobras de comida se retiraban de las cestas de pienso y se pesaban para determinar la ingestión voluntaria de pienso. Durante la semana en las cámaras respiratorias, la disponibilidad del pienso se restringió a 95% del pienso consumido por el animal que consumía la menor cantidad de pienso dentro de un bloque, la semana anterior al alojamiento en las cámaras respiratorias. La restricción de pienso se aplicó para evitar las interacciones entre el efecto de los aditivos en la IMS (ingestión de materia seca) y el efecto en la producción de metano.
- 50

El nitrato en las dietas experimentales se intercambió por urea en la dieta de control para mantener las dietas isonitrogenadas. Se añadió piedra caliza a la dieta de control para asegurar la misma ingestión de Ca entre

tratamientos. Se incluyó MgO en la dieta para obtener niveles de Mg similares entre dietas. El volumen de las diferentes adiciones a las dietas era diferente para cada tratamiento, y se usó celulosa de madera para equilibrarlo.

Tabla 1: Composición de las mezclas que contienen los aditivos experimentales (% de MS)

	CON	NO <sub>3</sub>	SO <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub> + SO <sub>4</sub>
Harina de soja tratada con formaldehído	22	22	22	22
Urea	15		15	
Fuente de nitrato <sup>2</sup>		38		38
MgSO <sub>4</sub> (anhidro)			33	33
MgO	13	13		
CaCO <sub>3</sub>	22		22	
Celulosa de madera	28	27	8	7
Nitrato añadido en la dieta	0	2,9	0	2,9
Sulfato añadido en la dieta	0	0	0,7	0,7

<sup>2</sup>fórmula química 5·Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>·10H<sub>2</sub>O

#### 5 Toma de muestra de sangre, rumen e hígado

Se extrajo sangre los días d2, d8, d15, d22 y d28, 1, 3 y 5 h después de alimentación. Los días 2, 8, 15 y 22 eran todos 1 día después de una etapa de aumento de 25% de la premezcla experimental en la dieta. El día 28, los corderos habían estado tomando 100% de los tratamientos dietéticos durante una semana. Las muestras de sangre se recogieron en tubos de recogida que contenían heparina (Vacutainers) y se almacenaron directamente en el frigorífico después de la extracción. Al final del día de toma de muestra, las muestras se enviaron para el análisis y se analizaron al día siguiente. El contenido de metahemoglobina de la sangre se determinó por los métodos descritos por Evelyn y Malloy (1938).

Después de completarse el periodo en las cámaras respiratorias, las ovejas se sacrificaron y se tomaron muestras de fluido ruminal (200 ml) del rumen tan pronto como fue posible después del sacrificio. Las muestras se sumergieron en agua helada directamente después de la toma de muestra para detener la fermentación microbiana y se congelaron una vez que se habían tomado todas las muestras. En el sacrificio, se tomaron muestras por duplicado del hígado, se enfriaron y congelaron para la posterior evaluación del estado de vitamina A.

#### Resultados y discusión

##### Contenido de metahemoglobina de la sangre durante el periodo de adaptación

Durante el aporte en la dieta de 25% o 50% de la tasa de inclusión final de premezcla, ninguna de las ovejas tenía un contenido de MetHb en sangre positivo (<2% de Hb). Cuando se incluyó 75% de la tasa de inclusión en la dieta una oveja con la dieta de NO<sub>3</sub> dio la prueba positiva 3 h después de alimentación, pero el valor era solo 3% de la Hb. Cuando las ovejas estuvieron en el 100% de la tasa de inclusión durante una semana (d28), dos ovejas con el tratamiento de NO<sub>3</sub> dieron la prueba positiva con valores de MetHb de 7% y 3% de la Hb respectivamente a las 3 h después de alimentación. Las ovejas en la dieta de control y en ambas dietas que contenían sulfato nunca dieron niveles de MetHb mayores que 2% de la Hb (límite de detección), indicando posiblemente que el S tiene una función en la reducción de nitrito en el rumen.

El periodo de adaptación de 4 semanas parece que era suficiente para prevenir cualquier problema significativo asociado con la toxicidad del nitrito y la metahemoglobinemia. Describieron un hallazgo similar Alaboudi y Jones (1985). Niveles de nitrato de 2,9% de MS se considerarían letales para rumiantes no adaptados, pero la adaptación parece que permitía que las bacterias ruminales aumentaran su capacidad de reducir el nitrito.

##### Ingestión de pienso y crecimiento durante la adaptación al nitrato y sulfato de la dieta

La ingestión de pienso no era diferente como resultado de la adición de NO<sub>3</sub> o SO<sub>4</sub> (tabla 2), pero tendía a ser menor cuando se proporcionaba la dosis completa de nitrato. Sin embargo, con inclusiones de más de 25% de la tasa de inclusión final, la ingestión de pienso se reducía sistemáticamente (aproximadamente 9% en el periodo más allá de 1 semana) como resultado de la inclusión del NO<sub>3</sub>. El pequeño número de animales usado en este estudio impide extraer conclusiones sobre los efectos en la ingestión de pienso, pero la menor ingestión de pienso sistemática no

## ES 2 633 690 T3

debería ignorarse. Bruning-Fann y Kaneene (1993) describen que se han observado en las ovejas efectos negativos en la ingestión de pienso cuando los niveles de nitrato de la dieta superaban 3% de la MS se de la dieta. Esta reducción de la ingestión de pienso puede estar relacionada con una depresión inducida por el nitrito de la digestión de la pared celular como demostró in vitro Marais et al. (1988).

- 5 El aporte de NO<sub>3</sub> o SO<sub>4</sub> no afectó a la ganancia de peso corporal (tabla 3).

Tabla 2: Ingestión de pienso (g/cordero/día) durante la etapa de adaptación de 4 semanas a los aditivos de la dieta

	Efectos principales								Interacción	
	Nitrato				Sulfato				Nitrato*Sufato	
	No	Si	P valor	e.e.m.	No	Si	P valor	e.e.m.	P valor	e.e.m
Semana 1	2682	2686	0,995	85,7	2644	2724	0,500	84,2	0,112	118,6
Semana 2	2836	2591	0,105	100,7	2657	2770	0,425	98,9	0,156	139,3
Semana 3	2741	2526	0,177	103,8	2650	2618	0,836	102,0	0,39	143,7
Semana 4	2696	2411	0,096	104,2	2650	2457	0,216	102,3	0,136	144,1

Tabla 3: Peso corporal (PC; kg/cordero) y ganancia de peso corporal (GPC; kg/cordero/semana) durante la etapa de adaptación a los aditivos de la dieta

	Efectos principales								Interacción	
	Nitrato				Sulfato				Nitrato*Sulfato	
	No	Si	P valor	e.e.m.	No	Si	P valor	e.e.m.	P valor	e.e.m.
PC día 0	42,7	43,0	0,605	0,51	43,2	42,4	0,285	0,51	0,433	0,72
PC día 7	43,8	43,6	0,810	0,55	44,2	43,1	0,199	0,55	0,137	0,77
PC día 14	44,9	44,7	0,741	0,57	45,2	44,3	0,287	0,57	0,176	0,80
PC día 21	45,2	45,2	0,985	0,72	45,7	44,7	0,336	0,72	0,240	1,08
PC día 28	45,7	45,5	0,858	0,81	46,4	44,8	0,182	0,81	0,346	1,15
GPC semana 1	1,11	0,54	0,363	0,426	0,95	0,70	0,685	0,426	0,685	0,602
GPC semana 2	1,16	1,08	0,815	0,236	1,04	1,20	0,641	0,236	0,815	0,334
GPC semana 3	0,30	0,59	0,482	0,282	0,51	0,38	0,750	0,399	0,788	0,399
GPC semana 4	0,48	0,25	0,715	0,436	0,67	0,06	0,342	0,436	0,836	0,616
GPC total	3,05	2,46	0,508	0,611	3,17	2,34	0,356	0,611	0,356	0,864

Tabla 4: Ingestión de pienso, intercambio gaseoso y producción de calor durante la semana de medición en las cámaras respiratorias

	Efectos principales								Interacción	
	Nitrato				Sulfato				Nitrato*Sulfato	
	No	Si	P valor	e.e.m.	No	Si	P valor	e.e.m.	P valor	e.e.m.
Ingestión de pienso (g/cordero/día)	2,39	2,38	0,782	0,02	2,39	2,38	0,631	0,020	0,350	0,03
Producción de metano (l/cordero/día)	23,5	15,4	<0,001	1,06	21,5	17,5	0,02	1,06	0,94	1,50
Producción de metano (l/kg <sup>0,75</sup> /día)	1,4	0,9	<0,001	0,07	1,3	1,0	0,05	0,07	0,90	0,10
Producción de metano (l/kg ingestión pienso/día)	9,85	6,53	<0,001	0,44	8,99	7,4	0,025	0,44	0,91	0,62
Producción de CO <sub>2</sub> (l/kg <sup>0,75</sup> /día)	26,1	24,9	0,03	0,345	25,0	26,1	0,043	0,345	0,487	0,49
Consumo de O <sub>2</sub> (l/kg <sup>0,75</sup> /día)	26,6	25,0	0,006	0,339	25,2	26,3	0,038	0,339	0,552	0,48
Producción de calor (kJ/ kg <sup>0,75</sup> /día)	558	527	0,008	6,9	531	555	0,03	6,9	0,517	9,75

Efectos del NO<sub>3</sub> y SO<sub>4</sub> en intercambio gaseoso

5 Los flujos de gases determinados en las cámaras respiratorias se muestran en la tabla 4. La alimentación racionada que se aplicó durante esta parte del experimento dio como resultado la ingestión de pienso muy similar entre los tratamientos. La producción de metano se disminuyó en 34% como resultado de la adición de la fuente de nitrato a la dieta.

10 La oveja con el tratamiento de NO<sub>3</sub> en el presente experimento consumió una media de 24,9 kg de NO<sub>3</sub> al día, lo que teóricamente reduciría la producción de metano en 6,4 g. La disminución real de la producción de metano en el tratamiento de NO<sub>3</sub> era 8,1 litros, que corresponde a 5,8 g de CH<sub>4</sub> (CH<sub>4</sub> = 0,714 g/l). Por lo tanto, la disminución en la producción de metano es realmente algo menor de lo que se podría explicar por la estequiometría, lo cual se puede explicar por la reducción incompleta del nitrato a amoníaco o el uso del nitrato en otros procesos distintos de la reducción de nitrato. La fuente de nitrato usada en este estudio era muy soluble, y por lo tanto es probable que la mayor parte del nitrato estuviera disponible para la reducción en el rumen. Sin embargo, la mayor parte del nitrato disuelto habría estado en la fase líquida del rumen y puede haber pasado del rumen antes de ser reducido.

La adición de sulfato condujo a una reducción de 19% de la producción diaria de metano.

20 En el presente estudio, las ovejas con el tratamiento de SO<sub>4</sub> consumieron una media de 27,0 g de SO<sub>4</sub>/día, lo que correspondería a una reducción de metano de 4,5 g. La disminución real observada en la reducción de metano era 4 litros o 2,9 g. La diferencia en la capacidad teórica para el SO<sub>4</sub> como sumidero de hidrógeno y su capacidad observada para reducir la emisión de metano puede estar en la solubilidad de MgSO<sub>4</sub> en el rumen.

25 Las ovejas con los tratamientos de SO<sub>4</sub> se alimentaron con una cantidad considerable de S en la dieta (7,4 g de S añadidos/kg de MS). Este nivel está por encima de las recomendaciones máximas como indica el NRC (4 g/kg de MS). El suministro por encima de este límite superior aumenta el riesgo de polioencefalomalacia, debido a altos niveles de H<sub>2</sub>S que se producen en el espacio de cabeza del rumen y la posterior inhalación de H<sub>2</sub>S. Sin embargo, los resultados de este experimento muestran que el SO<sub>4</sub> es eficaz en la reducción de la producción de metano. Cuando se suministra dentro de los niveles recomendados (2-4 kg de S/kg de MS), se espera que el SO<sub>4</sub> todavía tenga un efecto reductor en la producción de metano.

30 El consumo de oxígeno y la producción de CO<sub>2</sub> eran ambos más bajos como consecuencia del tratamiento con el nitrato. Se ha descrito que dosis altas de nitrato en las dietas de rumiantes producen metahemoglobinemia, reduciendo la capacidad de la sangre para transportar oxígeno a los tejidos del animal. Sin embargo, en este experimento se tomaron muestras de sangre regularmente y se encontraron niveles de MetHb ligeramente elevados solo en dos ovejas (el nivel máximo era 7% de la Hb) y no parecía probable que explicara el menor consumo de O<sub>2</sub>. El menor consumo de O<sub>2</sub> puede reflejar un metabolismo diferente cuando se suministra nitrato. Sar et al. (2004) también observaron un menor consumo de O<sub>2</sub> y menor producción de CO<sub>2</sub> cuando se administraron por vía intraruminal 0,9 g de NO<sub>3</sub>/kg<sup>0,75</sup> de PC a las ovejas. En este estudio se suministró considerablemente más nitrato (1,4 g NO<sub>3</sub>/kg<sup>0,75</sup> de PC), pero los niveles de MetHb en el estudio de los autores de la invención eran considerablemente menores (18,4% de Hb en el estudio de Sar et al.). Esto se debe probablemente a la ausencia de un periodo de adaptación en el estudio de Sar et al. (2004) y al hecho de que el nitrato se administró como una solución en el rumen. En otro estudio (Takahashi et al., 1998) administraron NaNO<sub>3</sub> en el rumen de ovejas a una velocidad de 1,5 g/kg de PC<sup>0,75</sup>, que era muy similar a la concentración usada en el estudio de los autores de la

invención. Se observaron concentraciones de MetHb por encima de 30% y a partir de los datos del estudio se concluyó que por cada 10% de aumento de MetHb, el consumo de oxígeno disminuía en 10,3%. En el estudio de los autores de la invención se observó una reducción del consumo de oxígeno de 6%. Usando la ecuación de regresión de (Takahashi et al., 1998) esto habría significado que los animales habrían tenido niveles de MetHb de aproximadamente 5%. En dos animales se observaron realmente niveles similares (3 y 7% de Hb).

La producción de metano en el tratamiento de control era típica para la alimentación racionada de la oveja una vez al día. Los animales se alimentaron a las 8 am, después de lo cual la producción de metano aumentó progresivamente hasta alcanzar la producción máxima de metano a las 5-6 h después de alimentación. Puesto que los animales tenían la alimentación racionada y solo se alimentaban una vez al día, la producción de metano disminuía sucesivamente después del máximo. La adición de nitrato a la ración dio lugar a un patrón de producción de metano notablemente diferente; inmediatamente después de la alimentación, la tasa de producción de metano permaneció a un nivel mucho menor y se planteó la hipótesis de que en este periodo el hidrógeno era utilizado para la reducción de nitrato, limitando así la disponibilidad del H<sub>2</sub> para la metanogénesis. Diez horas después de la alimentación, la tasa de producción de metano ya no era diferente de la del tratamiento de control, reflejando probablemente la ausencia de pienso que contenía nitrato y una vuelta a la metanogénesis como sumidero de H. Aunque la producción de metano era significativamente menor después de la alimentación, como resultado del nitrato suministrado, la producción de metano no se redujo nunca a 0 y la reducción del nitrato y la metanogénesis ocurrían simultáneamente. El nivel basal de la producción de metano puede explicarse, al menos parcialmente, por la producción de metano de la fermentación en el intestino posterior. No es probable que el nitrato alcance el intestino posterior sin ser reducido y por lo tanto, el suministro de nitrato probablemente no influiría en la producción de metano en esta parte del tracto gastrointestinal.

La tasa de producción de metano del tratamiento con SO<sub>4</sub> no fue nunca diferente del tratamiento de control pero era sistemáticamente menor que el tratamiento de control a lo largo del periodo entero de 24 h. Se observó lo mismo cuando el tratamiento de SO<sub>4</sub> se comparó con el tratamiento de NO<sub>3</sub> + SO<sub>4</sub>. Claramente, los efectos del NO<sub>3</sub> y SO<sub>4</sub> en la producción de metano son complementarios y el efecto del SO<sub>4</sub> parece que es menos dependiente de la disponibilidad del pienso que contiene SO<sub>4</sub>.

Los resultados del experimento también se representan en la gráfica de la figura 1, que muestra la producción de metano (l/h) a lo largo del transcurso de un periodo de 24 en los grupos que recibían o bien dieta base o una de las tres dietas experimentales.

Consumo de oxígeno a lo largo de un periodo de 24 h

Directamente después de la alimentación a las 8 am, el consumo de oxígeno era 10-18% menor para el tratamiento de NO<sub>3</sub>. La diferencia en el consumo de oxígeno entre los tratamientos desapareció después de las 16 pm. Este fenómeno coincide con la producción de metano notablemente reducida en el periodo después de la alimentación para el tratamiento de NO<sub>3</sub>. Se plantea la hipótesis de que en este periodo se produce una reducción de nitrato significativa en el rumen, con producción de nitrito como producto intermedio en el tratamiento de NO<sub>3</sub>. La presencia de nitrito durante este periodo puede explicar el menor consumo de oxígeno del tratamiento de NO<sub>3</sub>. Aunque no se observaron nunca niveles de MetHb más allá de 7% de la Hb para el tratamiento de NO<sub>3</sub>, se observó una reducción definida del consumo de oxígeno. El tiempo de almacenamiento de las muestras (las muestras se analizaron aproximadamente 24 h después de la toma de muestra) podría explicar los niveles de MetHb menores de los esperado.

En el tratamiento de NO<sub>3</sub>+SO<sub>4</sub>, el consumo de oxígeno era solo menor directamente después de la alimentación (9 am) y se recuperaba al mismo nivel que el tratamiento de control después de este tiempo de medición. La adición de SO<sub>4</sub> parece que alivia la depresión en el consumo de oxígeno provocado por el suministro de nitrato. Posiblemente, el SO<sub>4</sub> era reducido a H<sub>2</sub>S en el periodo directamente después de la alimentación y tenía una función en la aceleración de la reducción del nitrito, como se ha propuesto. Anteriormente se había encontrado una clara aceleración dependiente de la dosis de la reducción del nitrito cuando se añadía sulfuro al fluido ruminal in vitro (Takahashi et al., 1989). La aceleración en la reducción de nitrito era mucho menor cuando se añadía SO<sub>4</sub> al medio y por lo tanto parece posible que fuera el H<sub>2</sub>S el que restaurara activamente el consumo de oxígeno en el experimento de los autores de la invención.

Los resultados del experimento también se representan en la gráfica de la figura 2, que muestra el consumo de oxígeno (l/kg MW/h) a lo largo del transcurso de un periodo de 24 h en los grupos que recibían la dieta base o una de las tres dietas experimentales.

Ejemplo II: Efecto del sulfato en la metahemoglobinemia en ganado que recibe nitrato

Se evaluó el efecto de la ingestión de sulfato en la dieta en la concentración de la metahemoglobina en la sangre de vacas que recibían nitrato. Se planteó la hipótesis de que el sulfato de la dieta reduciría la acumulación de nitrito en el rumen de las vacas alimentadas con nitrato y por consiguiente prevendría la formación de metahemoglobina en la sangre.

## Material y métodos

## Diseño experimental

El experimento era un diseño de bloques aleatorizados, con 4 animales por bloque y diferentes dosis de sulfato como tratamientos. Los animales se distribuyeron en los bloques por la producción de leche y posteriormente dentro de un bloque se asignaron aleatoriamente a uno de los cuatro tratamientos dietéticos: NO<sub>3</sub>, NO<sub>3</sub> + contenido bajo de SO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub> + contenido medio de SO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub> + contenido alto de SO<sub>4</sub>.

## Alimentación

La dieta base consistía en 45% de silaje de maíz, 7,5% de alfalfa seca, 4,1% de paja de cebada picada, y 42% de una premezcla concentrada, basado en la MS. Los aditivos de la dieta se incluyeron en una premezcla (tabla 5). En la alimentación, las premezclas se suministraron a las vacas como parte de una ración mixta total. El agua estaba a libre disposición durante el experimento. El nitrato se aportó de una fuente disponible en el mercado (Calcinit, Yara AS, Noruega) y el aporte de SO<sub>4</sub> se añadió a la dieta en forma de MgSO<sub>4</sub> anhidro.

Tabla 5. Composición de las mezclas que contenían aditivos experimentales (% de la MS)

Tratamiento	Descripción	% basado en MS			
		NO <sub>3</sub>	Producto añadido	SO <sub>4</sub>	Producto añadido
A	NO <sub>3</sub>	3	3,96	0,15	0,00
B	NO <sub>3</sub> + contenido bajo de SO <sub>4</sub>	3	3,96	0,23	0,32
C	NO <sub>3</sub> + contenido medio de SO <sub>4</sub>	3	3,96	0,32	0,63
D	NO <sub>3</sub> + contenido alto de SO <sub>4</sub>	3	3,96	0,40	0,95

Durante la fase de adaptación, se introdujeron en las vacas las premezclas experimentales en etapas del 25% por semana (tabla 6).

Tabla 6: Composición de las combinaciones de concentrados experimentales durante la fase de adaptación

Alimentación	%	
	Concentrado de control	Premezcla de concentrado A, B, C o D
Día 8-14	75	25
Día 15-21	50	50
Día 22-28	25	75
Día 29-35	0	100

## Extracción de sangre

Se extrajo sangre 3 h después de la alimentación dos veces por semana a lo largo del experimento para vigilar de cerca la concentración de metahemoglobina. La sangre se recogió en tubos en los que se hizo el vacío, que contenían heparina, se sumergieron inmediatamente en agua enfriada con hielo y se almacenaron en el frigorífico a 4°C. Al final de cada día de toma de muestra, las muestras se enviaron para el análisis y se analizaron al día siguiente. El contenido de metahemoglobina en la sangre se determinó por el método de Evelyn y Malloy (1938). El día 37, cuando se suministró nitrato con su máxima tasa de inclusión (3% de nitrato basado en la MS), la extracción de sangre se realizó con más frecuencia (-0,5 h, 0,5 h, 1,5 h, 3 h, 5 h y 8 h) con el fin de establecer la cinética del nitrato y sus diferentes metabolitos en el plasma.

## Resultados y discusión

## Contenido de metahemoglobina de la sangre durante el periodo de adaptación

Ninguna de las vacas tenía metahemoglobina detectable en la sangre durante el enriquecimiento de la dieta con 25% o 50% de la tasa de inclusión final de nitrato. Cuando el nitrato se añadió a la dieta en el 75% de la tasa de inclusión final, las vacas que no recibieron sulfato presentaron nivel elevado de hemoglobina en la sangre 3 h después de la alimentación. En cambio, las vacas a las que se dio sulfato en la dieta dieron la prueba para la metahemoglobina negativa, independientemente de la cantidad de S suministrado. Con la tasa de inclusión de 100% del nitrato, todos los tratamientos presentaban un aumento de la metahemoglobina en la sangre, aunque la elevación era más pronunciada para las vacas que tomaban solo nitrato, comparado con aquellas a las que se les daba nitrato y sulfato. Entre las vacas que recibían sulfato, no era posible distinguir un efecto de la dosis de sulfato (véase la tabla 7). Se concluyó que el sulfato podía contrarrestar la acumulación de nitrito en el rumen, previniendo así (con adición de nitrato moderada) o reduciendo (con adición de nitrato alta) la formación de metahemoglobina en la sangre.

Tabla 7: Metahemoglobina en la sangre (% de hemoglobina)

	NO <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub> + contenido bajo de SO <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub> + contenido medio de SO <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub> + contenido alto de SO <sub>4</sub>	P valor
Metahemoglobina en la sangre (% de hemoglobina)	13,1 <sup>a</sup>	2,6 <sup>b</sup>	6,0 <sup>b</sup>	4,8 <sup>b</sup>	0,063

Las medias con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P<0,1)

Los resultados del experimento también se representan en la gráfica de la figura 3, que muestra la concentración de metahemoglobina en la sangre de vacas que recibían una de las cuatro dietas experimentales.

5 Ejemplo III: Efecto de *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium* en la velocidad de reducción de nitrato y nitrito en el modelo de fermentación ruminal

En el presente experimento, se estudiaron las cinéticas de reducción del nitrato en un sistema de fermentación ruminal in vitro y los efectos en las mismas de *M. elsdenii* y *S. ruminantium*.

#### Materiales y métodos

10 El pienso usado en la simulación ruminal era 1 gramo de materia seca y compuesto de silaje de pasto (0,5 g de materia seca) y pienso compuesto comercial, 0,5 g de materia seca. Los tratamientos eran como se indican en la siguiente tabla:

Tratamiento	Modificaciones
1.	Sin modificación
2.	57 mg de Calcinit/40 ml <sup>*)</sup>
3.	57 mg de Calcinit + 10 µl de <i>M. elsdenii</i> /40 ml <sup>*)</sup>
4.	57 mg de Calcinit + 100 µl de <i>M. elsdenii</i> /40 ml <sup>*)</sup>
5.	57 mg de Calcinit + 1000 µl de <i>M. elsdenii</i> /40 ml <sup>*)</sup>
6.	57 mg de Calcinit + 10 µl de <i>M. elsdenii</i> + 100 mg de lactato-Na/40 ml <sup>*)</sup>
7.	57 mg de Calcinit + 100 µl de <i>M. elsdenii</i> + 100 mg de lactato-Na/40 ml <sup>*)</sup>
8.	57 mg de Calcinit + 1000 µl de <i>M. elsdenii</i> + 100 mg de lactato-Na/40 ml <sup>*)</sup>
9.	57 mg de Calcinit + 10 µl de <i>M. elsdenii</i> + 200 mg de lactato-Na/40 ml <sup>*)</sup>
10.	57 mg de Calcinit + 100 µl de <i>M. elsdenii</i> + 200 mg de lactato-Na/40 ml <sup>*)</sup>
11.	57 mg de Calcinit + 1000 µl de <i>M. elsdenii</i> + 200 mg de lactato-Na/40 ml <sup>*)</sup>
12.	57 mg de Calcinit + 100 mg de lactato-Na/40 ml <sup>*)</sup>
13.	57 mg de Calcinit + 200 mg de lactato-Na/40 ml <sup>*)</sup>
14.	57 mg de Calcinit + 10 µl de <i>S. ruminantium</i> /40 ml <sup>*)</sup>
15.	57 mg de Calcinit + 100 µl de <i>S. ruminantium</i> /40 ml <sup>*)</sup>
16.	57 mg de Calcinit + 1000 µl de <i>S. ruminantium</i> /40 ml <sup>*)</sup>
17.	57 mg de Calcinit /40 ml <sup>*)</sup>
18.	Sin modificaciones

<sup>\*)</sup>Los tratamientos 2 a 17 contienen 7,52 mg de MgSO<sub>4</sub> /40 ml

Todos los tratamientos se llevaron a cabo por cuadruplicado, siendo el número total de recipientes de simulación 72.

15 Los componentes del pienso seco y Calcinit se pesaron en botellas de suero, las botellas se purgaron con CO<sub>2</sub> que se pasó a través de un catalizador de cobre caliente para la depuración de O<sub>2</sub>, y se sellaron con tapones de caucho de butilo gruesos. Se introdujeron 36,5 ml de solución tampón anaerobia, reducida, ajustada a temperatura ambiente

(+37°C), en cada recipiente de simulación bajo flujo de CO<sub>2</sub> exento de oxígeno. Se añadieron los cultivos bacterianos desarrollados durante la noche, solución de MgSO<sub>4</sub>, solución de lactato y solución tampón para igualar el volumen de líquido total a 1,5 ml/recipiente. Finalmente, se añadieron 2 ml de fluido ruminal colado reciente en las botellas de suero, siendo el volumen final 40 ml. Esta inoculación empezó la simulación ruminal real. Se registró el tiempo de inoculación para cada recipiente y se tuvo en cuenta el tiempo de toma de muestra y de detención de la fermentación.

5

La simulación de fermentación ruminal continuó durante 12 h a 37°C. Durante la fermentación la producción de gas total se midió después de 2, 4, 6, 9 y 12 horas de simulación para hacerse una idea de la actividad metabólica general de los microbios ruminales.

10 Todo el gas producido durante las 12 horas en cada recipiente de simulación se recogió individualmente de cada uno de los 72 recipientes en botellas de infusión de 2 litros a las que se ha hecho el vacío, y en las que se había introducido previamente etano como un patrón interno. Se analizó el metano de estas muestras para ver el efecto de los tratamientos en el metano total producido por bacterias ruminales durante las 12 h. El análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases usando un detector de ionización de llama y metano y etano puros como patrones.

15 A las 4 y 12 horas se analizó en todos los recipientes de simulación los ácidos grasos volátiles (VFA) y ácido láctico (denominados colectivamente SCFA). Los ácidos se analizaron por cromatografía de gases usando una columna empaquetada para el análisis de ácidos libres. Los SCFA cuantificados eran los ácidos acético, propiónico, butírico, isobutírico, 2-metilbutírico, valérico, isovalérico y láctico.

20 Se analizaron el NO<sub>3</sub> y NO<sub>2</sub> de todos los recipientes de simulación a las 0, 2, 4 y 12 horas. El método era espectrofotométrico y basado en la reducción de nitrato con vanadio (III) combinado con la detección de la reacción de Griess ácida.

Se analizó el NH<sub>4</sub> de todos los recipientes de simulación a las 0, 2, 4 y 12 horas. El método era colorimétrico y basado en la reacción de fenol-hipoclorito.

25 El análisis estadístico consistía en pruebas t bilaterales para los todos los parámetros medidos. Las pruebas se realizaron frente al tratamiento con modificación con Calcinit y MgSO<sub>4</sub> (tratamientos 2 y 17). La prueba t se eligió para dejar que los tratamientos individuales fueran independientes de los otros tratamientos ensayados simultáneamente. Los resultados están indicados en las figuras, en donde 0,01 < p valor < 0,05 se indica como: \*; 0,001 < p valor < 0,01 se indica como: \*\*; 0,0001 < p valor < 0,001 se indica como: \*\*\*; y p valor < 0,0001 se indica como:\*\*\*\*.

30 Resultados

Efecto de los tratamientos en la producción de gas total

35 En este trabajo se inoculó en todos los recipientes 5% de fluido ruminal, pero además algunos recipientes recibieron una dosis de *Selenomonas ruminantium* o *Megasphaera elsdenii*. Estas bacterias eran los principales utilizadores de lactato en el rumen, y además, se cree que tienen la capacidad de reducir el nitrato y/o nitrito. *M. elsdenii* se ensayó también en combinación con ácido láctico, siendo el fundamento que el ácido láctico es un sustrato para la bacteria y podría tener un efecto positivo en su competitividad en el microcosmo ruminal. Como se muestra en la figura 4, la adición de NO<sub>3</sub> y MgSO<sub>4</sub> produjo una supresión significativa de la producción de gas. Este efecto era más pronunciado cuando pasaba el tiempo; casi 25% de la supresión de la producción acumulativa de gas se midió en el tiempo de medición de 12 h.

40 Cuando se comparó con el tratamiento enriquecido con nitrato, el inóculo de *S. ruminantium* tenía un efecto positivo en la producción de gas durante las primeras 4 horas. Este efecto era estadísticamente significativo con dosis de 100 y 1000 µl/40 ml. La producción de gas inicial también era estimulada por *M. elsdenii*, pero solo con la dosis más alta de 1000 µl. Cuando se proporcionó ácido láctico, se suprimió la producción de gas, lo cual puede deberse a su efecto inhibitorio directo en el metabolismo de los microbióticos ruminales. El efecto estimulador de *S. ruminantium* no se detectó en los tiempos de medición posteriores. Sin embargo, la dosis más alta de *M. elsdenii* continuó aumentando la producción acumulativa de gas, siendo el efecto positivo relativo incluso más significativo en los tiempos de medición posteriores. La adición de ácido láctico continuó suprimiendo la producción de gas de forma dependiente de la dosis durante toda la incubación. Sin embargo, en combinación con el lactato, la dosis alta de *M. elsdenii* anuló la supresión metabólica y, de hecho, se convirtió en estimulación de la producción de gas. A pesar del hecho de que *M. elsdenii* estimulaba la producción de gas general con dosis alta, no pudo superar completamente el efecto negativo del nitrato.

50

Efecto de los tratamientos en la producción de metano

55 Los autores de la invención cuantificaron el CH<sub>4</sub> producido además de la producción total de gas. En este estudio de fermentación, la proporción de metano del total producido era relativamente baja, quedando claramente por debajo de 10% (figura 5B). El nivel de producción de metano depende de la dieta y del estado fisiológico de la vaca usada como donadora de fluido ruminal. En este caso, el animal era una vaca lechera que tomaba una dieta de alta

energía. El nitrato en la dieta suprimía la producción de metano absoluta en casi 80% (figura 5A).

#### Efecto de los tratamientos en la reducción de nitrato

5 Se añadió una cantidad fija de nitrato en todos los recipientes de simulación, excepto para los marcados "Sin modificaciones", en forma del producto "Calcinit" (hasta una concentración final de nitrato 14 mM). En este estudio de fermentación, el metano total producido era de 7 a 8 ml en ausencia de nitrato y se redujo a 1,5 ml cuando se proporcionó nitrato.

10 La concentración de nitrato y los productos de su reducción, nitrito y amonio, se analizaron después de 2, 4 y 12 horas desde la inoculación. Aunque se proporcionó nitrato 14 mM a las 0 horas, se encontró solo aproximadamente una concentración 10 mM de nitrato en el filtrado en todos los recipientes a las 2 horas. Además, el nitrato medido en solución era el mismo o ligeramente mayor 2 horas más tarde. Esto sugiere que el nitrato es absorbido rápidamente por la matriz sólida o absorbido por la microbiota. Este equilibrio en el reparto se mantendría hasta que el consumo de nitrato por las bacterias alcanzara buena velocidad. En el presente estudio la toma de muestra final indicaba un colapso en el nivel de nitrato entre 4 y 12 horas (figura 6). El efecto de la dosis alta de la modificación con *M. elsdenii* sugería que la reducción de nitrato era desacelerada significativamente por la dosis alta de esta bacteria.

15 El análisis del nitrito en los tiempos de medición de 2 y 4 horas estaba de acuerdo con los datos del nitrato. A las 2 horas, la concentración de nitrito era inferior a 0,05 mM con todos los tratamientos, sugiriendo que la velocidad de reducción del nitrato era baja (figura 7A). A las 4 horas, el nivel de nitrito había empezado a elevarse pero era todavía inferior a 0,2 mM. Es importante destacar que aunque parecía que *S. ruminantium* aumentaba el nitrito de forma dependiente de la dosis, *M. elsdenii* lo reducía de forma dependiente de la dosis (figura 7B). Después de 12 horas, el efecto de *M. elsdenii* estaba más claro, puesto que en su ausencia la concentración de nitrito había aumentado a 8 mM y se reducía de forma dependiente de la dosis cuando se añadía la bacteria. Con la modificación de *M. elsdenii* puro, era necesaria la dosis de 1000 µl para eliminar completamente el nitrito. Sin embargo, cuando se combinaba con el lactato, ya una dosis de 100 µl disminuía la concentración de nitrito al límite de detección (figura 7C). El efecto de aumento de nitrito de *S. ruminantium* ya no se detectaba más a las 12 horas, sugiriendo que su función metabólica en el microcosmo del modelo ruminal era despreciable.

20 El amonio es el producto de reducción final del nitrato/nitrito. Sin embargo, no es un producto que se pudiera esperar que se acumulara cuantitativamente en el sistema microbiano porque es una forma de nitrógeno que es asimilada fácilmente por los microbios cuando no están disponibles fuentes de nitrógeno orgánico, preferidas. Esta función transitoria del amonio hace imposible hacer cálculos de equilibrio estequiométrico precisos. Pero, era obvio que cuando se añadía nitrato 14 mM en el sistema de fermentación, la concentración residual de amonio 12 h más tarde aumentaba de 10 a 18 mM. Cuando se añadía también *M. elsdenii* en el medio de fermentación, el nivel de amonio alcanzaba una concentración de 23 a 31 mM dependiendo de la dosis de sustrato lactato adicional proporcionada (figura 8C). Estos datos muestran indiscutiblemente que la modificación de nitrato conduce a la elevada producción o acumulación de amonio. Estos datos también sugieren fuertemente que *M. elsdenii* fortalece además este proceso metabólico. La concentración residual de amonio alcanza el máximo con la dosis de 100 µl de *M. elsdenii*, y con la dosis de 1000 µl mostraba un descenso claro.

#### Conclusiones

30 Los datos presentados aquí confirmaban una vez más que el nitrato en la dieta reduce la producción de metano. También mostraban que el nitrato se reduce a nitrito y además a amonio. Este proceso parecía estar directamente conectado a la producción de metano, puesto que las condiciones que prevenían la reducción cuantitativa del nitrato también reducían el grado de inhibición de metanogénesis.

35 La modificación con *M. elsdenii* no aceleraba la reducción de nitrato sino que, de hecho, parecía que la inhibía. En cambio, la bacteria reducía de forma dependiente de la dosis la concentración residual de nitrito y, simultáneamente, aumentaba la concentración de su producto de reducción, el amoniaco. Estos datos sugerían que esta cepa no expresa nitrato reductasa funcional, pero cuandoquiera que alguna otra bacteria cataliza la reducción de nitrato a nitrito, la cepa de *M. elsdenii* reduce fácilmente el nitrito más a amonio. Esta característica hace que *M. elsdenii* sea un agente de prevención ideal del envenenamiento por nitrito como resultado de la rápida producción y acumulación de nitrito por bacterias reductoras de nitrato.

40 De acuerdo con el conocimiento previo de los autores de la invención, *M. elsdenii* no es un utilizador principal de lactato en las vacas lecheras. Sin embargo, en ganado vacuno que se ha estado alimentando con dietas con alto contenido de cereales las condiciones de *M. elsdenii* son favorables. La razón es que este utilizador de lactato es muy competitivo solo cuando el nivel de ácido láctico en el rumen es alto. Esta característica de la bacteria es la razón por la que se ensayó aquí solo el efecto del ácido láctico en la combinación de *M. elsdenii* - ácido láctico. Los efectos de *M. elsdenii* en diferentes parámetros eran en la misma dirección estuviera o no incluido el ácido láctico, pero cuando se proporcionaba ácido láctico los efectos eran más fuertes. Esto sugiere que la competitividad de *M. elsdenii* mejoraba mediante el lactato.

- 5 ¿Por qué la dosis alta de *M. elsdenii* inhibía la reducción de nitrato? Aquí solo se pueden hacer conjeturas y la respuesta final solo podría venir de un estudio diseñado específicamente. Una posible explicación es que *M. elsdenii* compite por algunos nutrientes vitales o cofactores con una bacteria reductora de nitrato principal. Puesto que el crecimiento de *M. elsdenii* no depende de la reducción de nitrito y compite con el reductor de nitrato. Otra posible explicación es una inhibición del producto final. La dosis alta de *M. elsdenii* conduce al aumento de la concentración de amonio, lo que puede servir como un retroinhibidor de la reducción de nitrato.

## Referencias

- Alaboudi, A. R. and G. A. Jones. 1985. Effect of Acclimation to High Nitrate Intakes on Some Rumen Fermentation Parameters in Sheep. *Canadian Journal of Animal Science* 65:841-849.
- Asanuma, N., M. Iwamoto, and T. Hino. 1999. Effect of the Addition of Fumarate on Methane Production by Ruminal Microorganisms *In Vitro*. *J. Dairy Sci.* 82(4):780-787.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. Oâ€™Mara, and T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48(2):21-27.
- Bruning-Fann, C. S. and J. B. Kaneene. 1993. The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. *Vet Hum Toxicol* 35(3):237-253.
- Evelyn, K. A. and H. T. Malloy. 1938. MICRODETERMINATION OF OXYHEMOGLOBIN, METHEMOGLOBIN, AND SULFHEMOGLOBIN IN A SINGLE SAMPLE OF BLOOD *journal of biological chemistry* 126:655-663.
- Guo, W. S., D. M. Schaefer, X. X. Guo, L. P. Ren, and Q. X. Meng. 2009. Use of nitrate-nitrogen as a sole dietary nitrogen source to inhibit ruminal methanogenesis and to improve microbial nitrogen synthesis *in vitro*. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 22(4):542-549.
- Iwamoto, M., Asanuma N., and Hino, T. 1999 Effects of nitrate combined with fumarate on methanogenesis, fermentation, and cellulose digestion by mixed ruminal microbes *in vitro*. *Animal Science Journal* 70(6):471-478.
- Iwamoto, M., Asanuma N., and Hino, T. 2001. Effects of pH and electron donors on nitrate and nitrite reduction in ruminal microbionics. *Animal Science Journal* 72(2):117-125.
- Joblin, K. N. 1999. Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Australian Journal of Agricultural Research* 50(8):1307-1314.
- Johnson, K. A. and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci* 73(8):2483-2492.
- Le Van, T. D., J. A. Robinson, J. Ralph, R. C. Greening, W. J. Smolenski, J. A. Z. Leedle, and D. M. Schaefer. 1998. Assessment of Reductive Acetogenesis with Indigenous Ruminal Bacterium Populations and *Acetitomaculum ruminis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9):3429-3436.

- Lewis, D. 1951. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep; the reduction of nitrate in the rumen of the sheep. *Biochem. J.* 48(2):175-170.
- Marais, J. P., J. J. Therion, R. I. Mackie, A. Kistner, and C. Dennison. 1988. Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. *British Journal of Nutrition* 59(02):301-313.
- Molano, G., T. W. Knight, and H. Clark. 2008. Fumaric acid supplements have no effect on methane emissions per unit of feed intake in wether lambs. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48(2):165-168.
- Sar, C., B. Mwenya, B. Santoso, K. Takaura, R. Morikawa, N. Isogai, Y. Asakura, Y. Toride, and J. Takahashi. 2005. Effect of *Escherichia coli* wild type or its derivative with high nitrite reductase activity on in vitro ruminal methanogenesis and nitrate/nitrite reduction. *J. Anim Sci.* 83(3):644-652.
- Sar, C., B. Santoso, B. Mwenya, Y. Gamo, T. Kobayashi, R. Morikawa, K. Kimura, H. Mizukoshi, and J. Takahashi. 2004. Manipulation of rumen methanogenesis by the combination of nitrate with [beta]1-4 galacto-oligosaccharides or nisin in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 115(1-2):129-142.
- Steinfeld, H., P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales, and C. De Haan. 2006. *Livestock's Long Shadow*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Takahashi, J., M. Ikeda, S. Matsuoka, and H. Fujita. 1998. Prophylactic effect of L-cysteine to acute and subclinical nitrate toxicity in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 74(3):273-280.
- Takahashi, J., and Young, B.A. 1991. Prophylactic effect of L-cysteine on nitrate-induced alterations in respiratory exchange and metabolic rate in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 35:105-113.
- Takahashi, J., N. Johchi, and H. Fujita. 1989. Inhibitory effects of sulphur compounds, copper and tungsten on nitrate reduction by mixed rumen micro-organisms. *British Journal of Nutrition* 61(03):741-748.
- Ungerfeld, E. M., R. A. Kohn, R. J. Wallace, and C. J. Newbold. 2007. A meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *J. Anim Sci.* 85(10):2556-2563.
- Verstegen, M. W. A., W. Van der Hel, H. A. Brandsma, A. M. Henken, and A. M. Bransen. 1987. The Wageningen respiration unit for animal production research: A description of the equipment and its possibilities. *Energy Metabolism in Farm Animals: Effects of Housing, Stress and Disease*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Combinación de un compuesto de nitrato y un compuesto de sulfato, para usar en un método de reducción de la producción de metano gastrointestinal en un rumiante, comprendiendo dicho método administrar al rumiante una cantidad eficaz de dicha composición.
2. Combinación para usar según la reivindicación 1, en donde la combinación del compuesto de nitrato y el compuesto de sulfato se administra al rumiante en una cantidad que proporciona una dosificación total de nitrato y sulfato superior a 0,05 g/kg de peso corporal al día.
- 10 3. Combinación para usar según la reivindicación 2, en donde el compuesto de nitrato se administra al rumiante en una cantidad que proporciona una dosificación de nitrato de 0,025-8 g/kg de peso corporal al día, y en donde el compuesto de sulfato se administra al rumiante en una cantidad que proporciona una dosificación de sulfato de 0,025-1,8 g/kg de peso corporal al día.
4. Combinación para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además administrar al rumiante un microorganismo probiótico reductor de nitrato en una cantidad de  $1 \cdot 10^5$  -  $1 \cdot 10^{14}$  ufc/kg/día.
- 15 5. Combinación para usar según la reivindicación 6, que además comprende administrar al rumiante una cantidad eficaz de un compuesto de lactato.
6. Pienso compuesto para animales que comprende una combinación de un compuesto de nitrato y un compuesto de sulfato, proporcionando dicha combinación una cantidad total de nitrato y sulfato superior a 10 g/kg, en donde la cantidad de sulfato es superior a 7,5 g/kg basado en el peso seco.
- 20 7. Pienso compuesto para animales según la reivindicación 6, en donde la cantidad de nitrato es superior a 7,5 g/kg basado en el peso seco.
8. Pienso compuesto para animales según la reivindicación 6 o 7, que comprende adicionalmente un microorganismo probiótico reductor de nitrato, preferiblemente seleccionado del grupo de *Megasphaera elsdenii* y *Propionibacterium acidipropionici*.
- 25 9. Complemento de pienso para animales que comprende 10-100% de una combinación de un compuesto de nitrato y un compuesto de sulfato, en donde la cantidad de sulfato en el complemento de pienso para animales, basado en el peso seco, es superior a 25 g/kg.

Fig 1

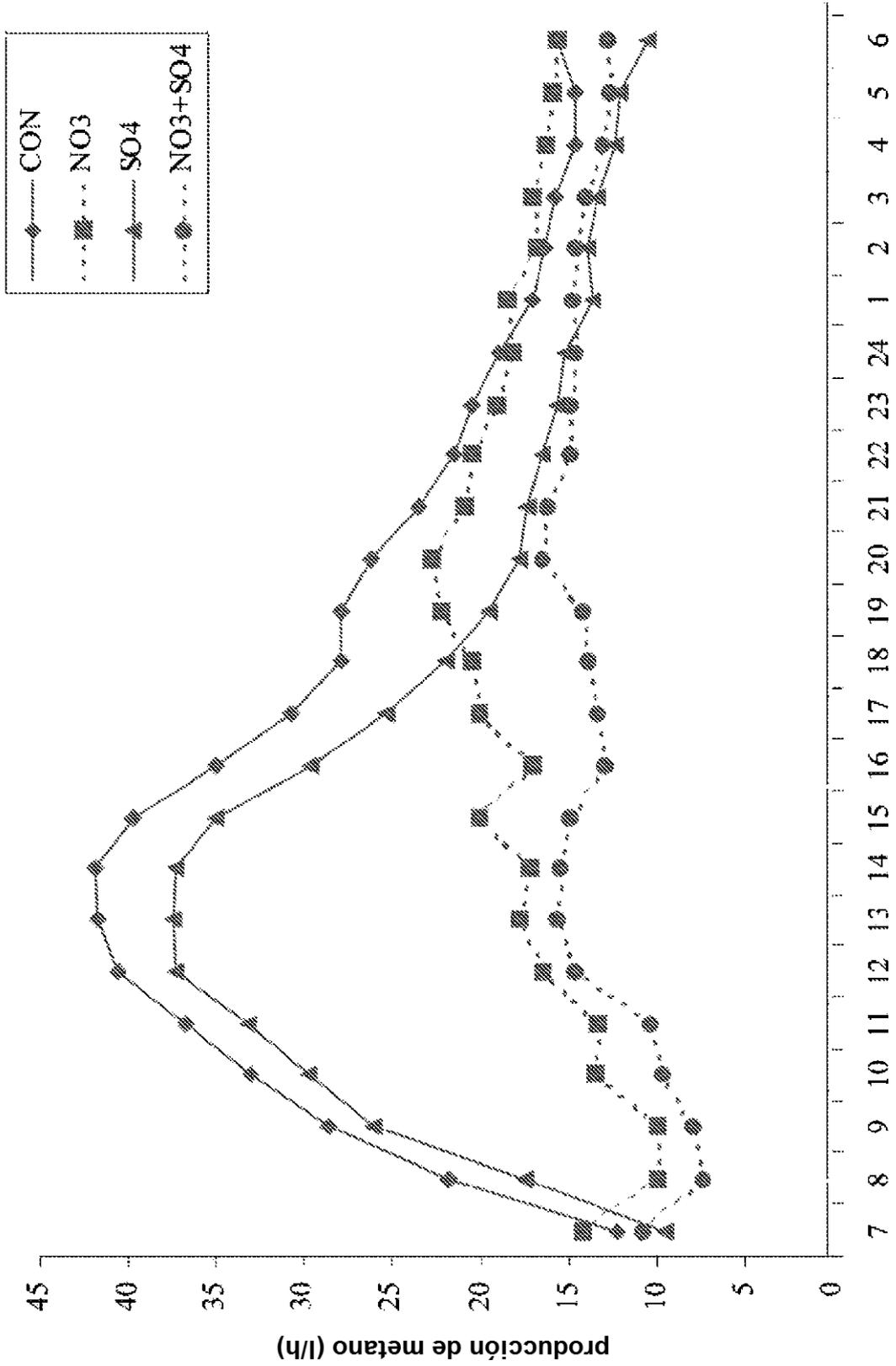
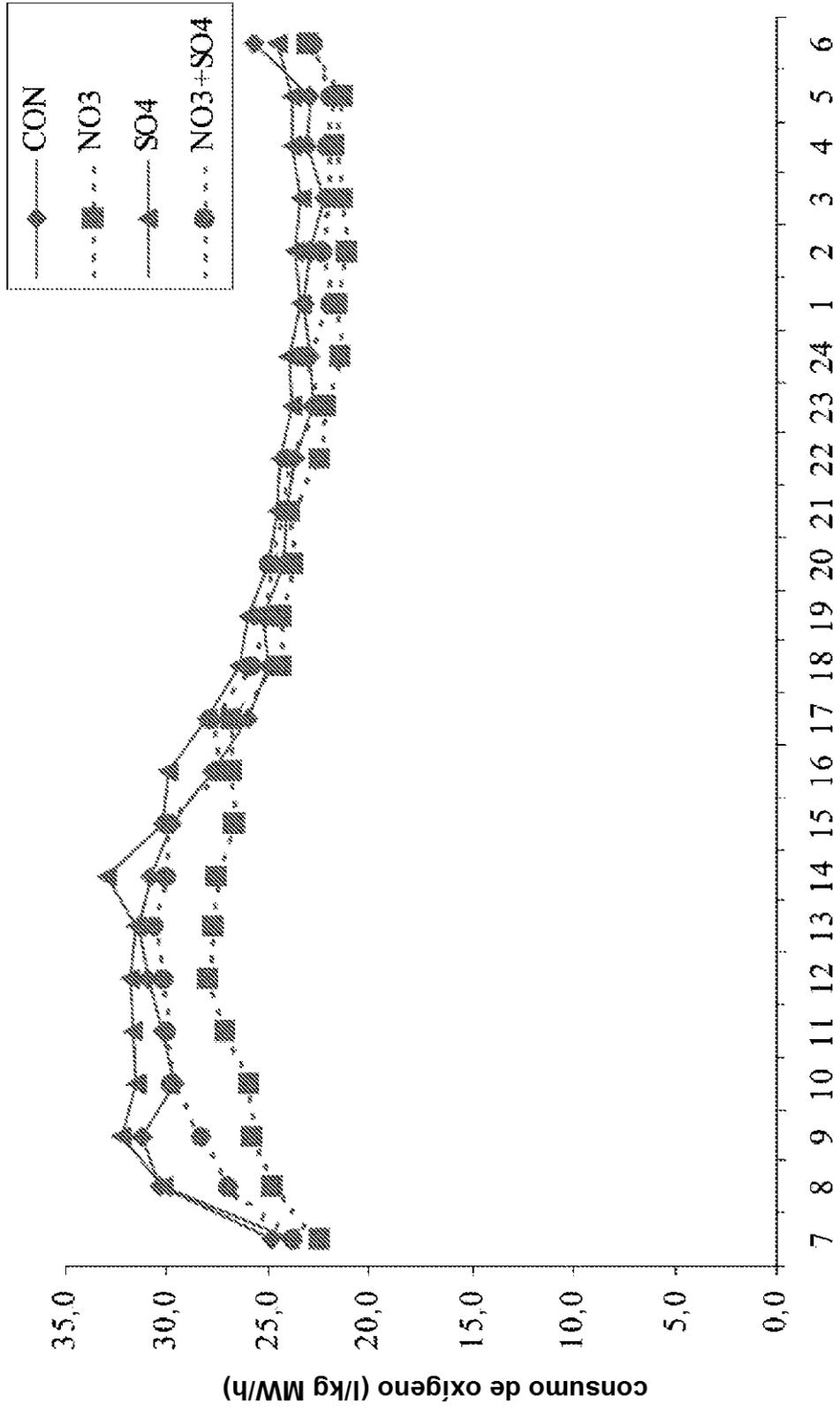


Fig 2



*Fig 3*

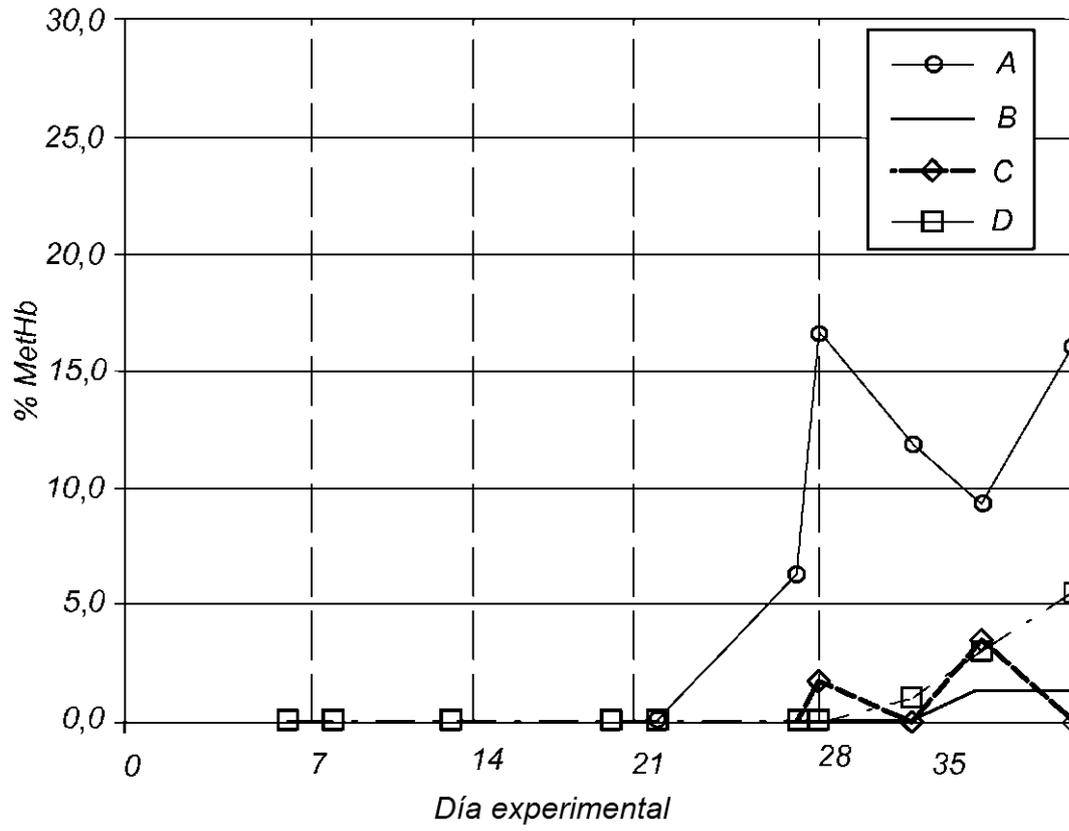


Fig 4a

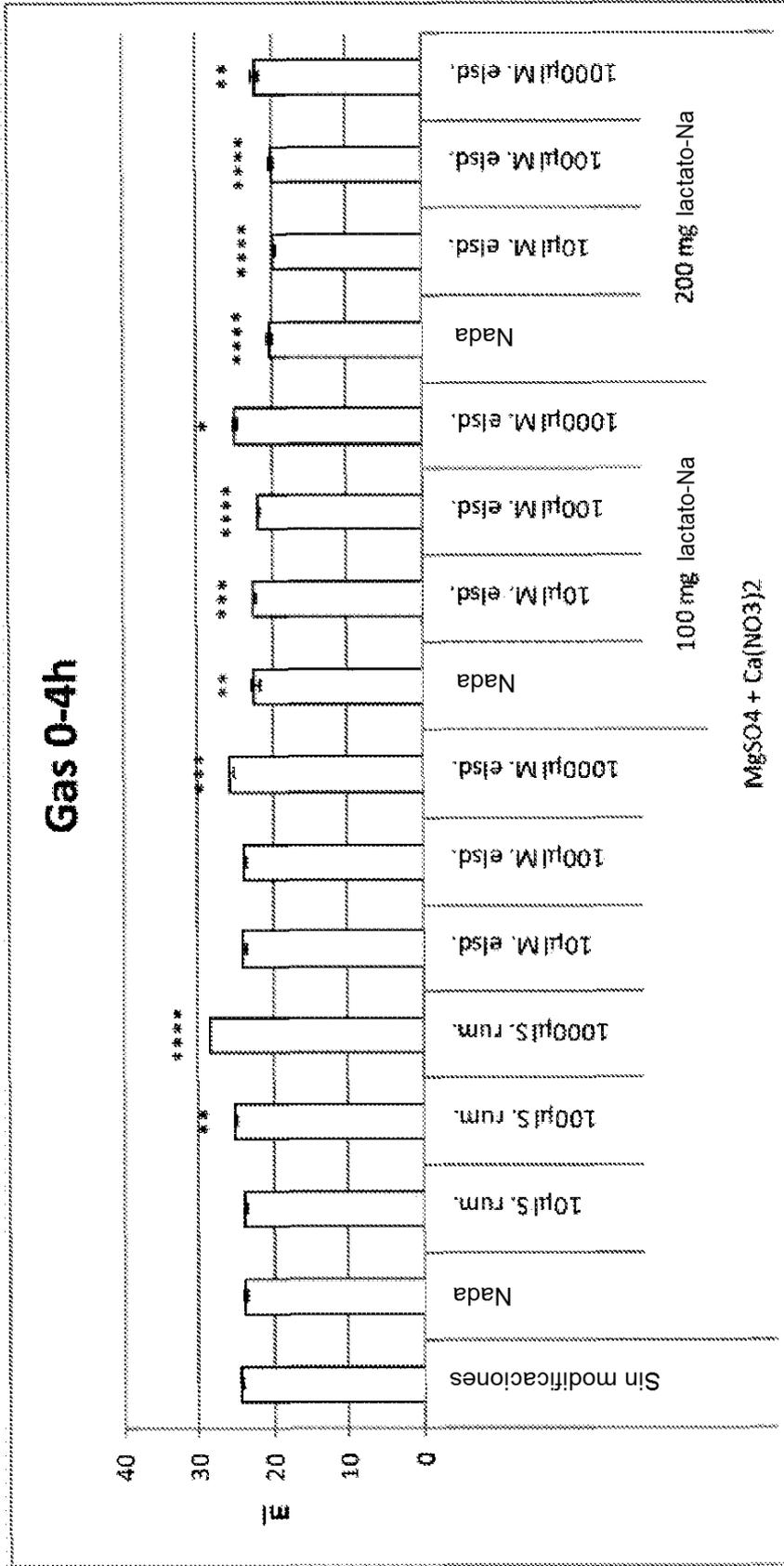


Fig 4b

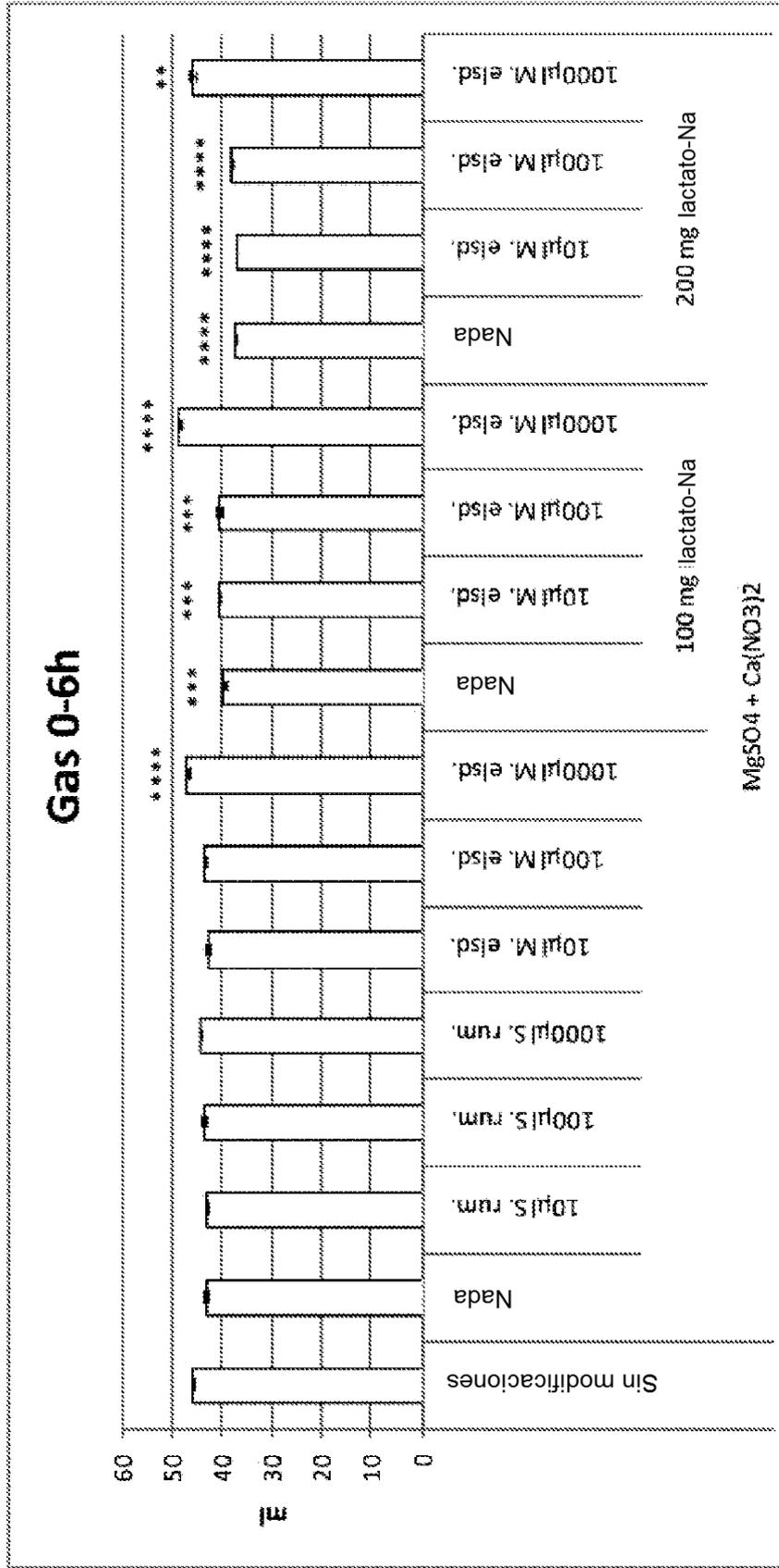


Fig 4C

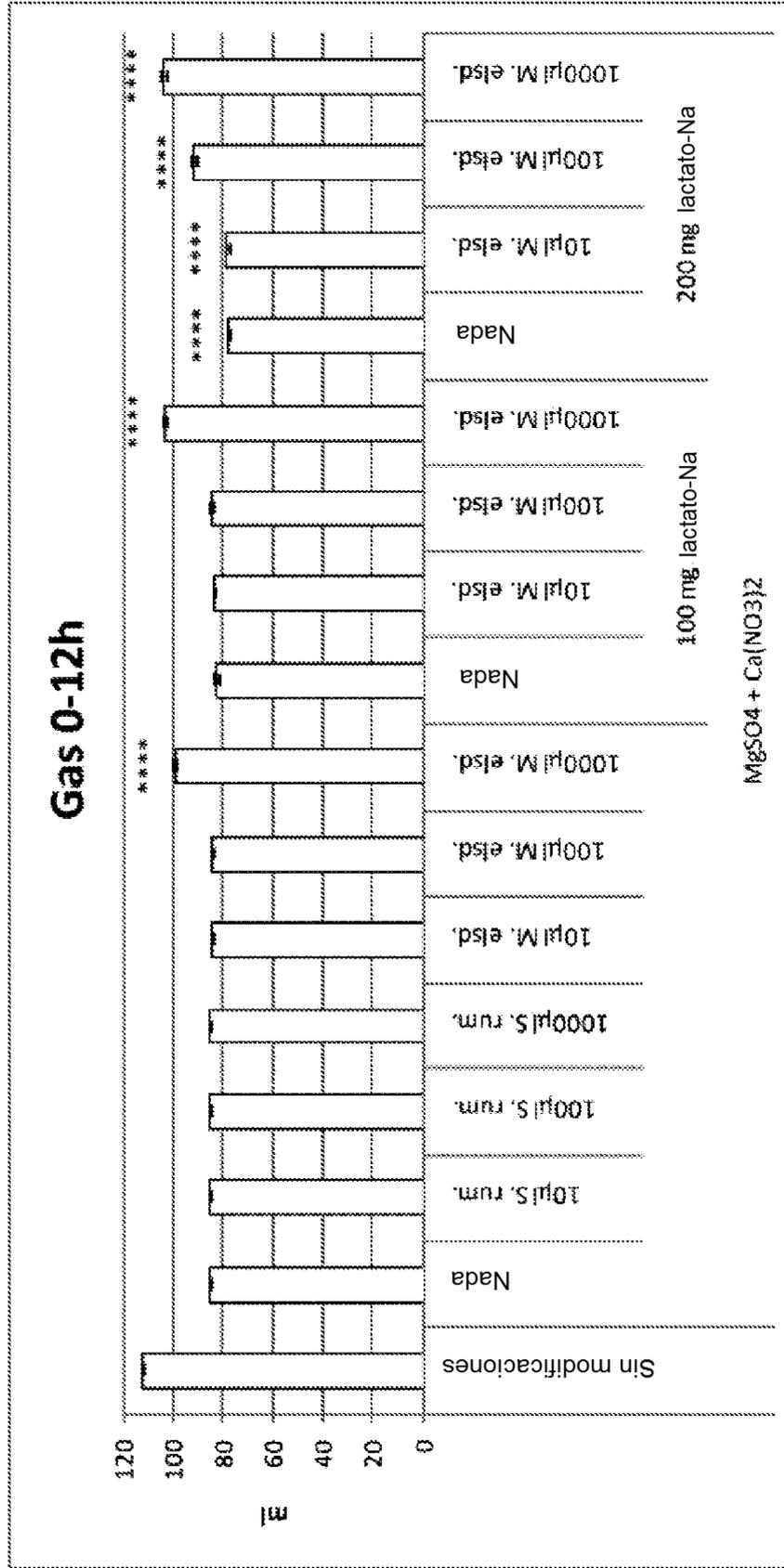


Fig 5a

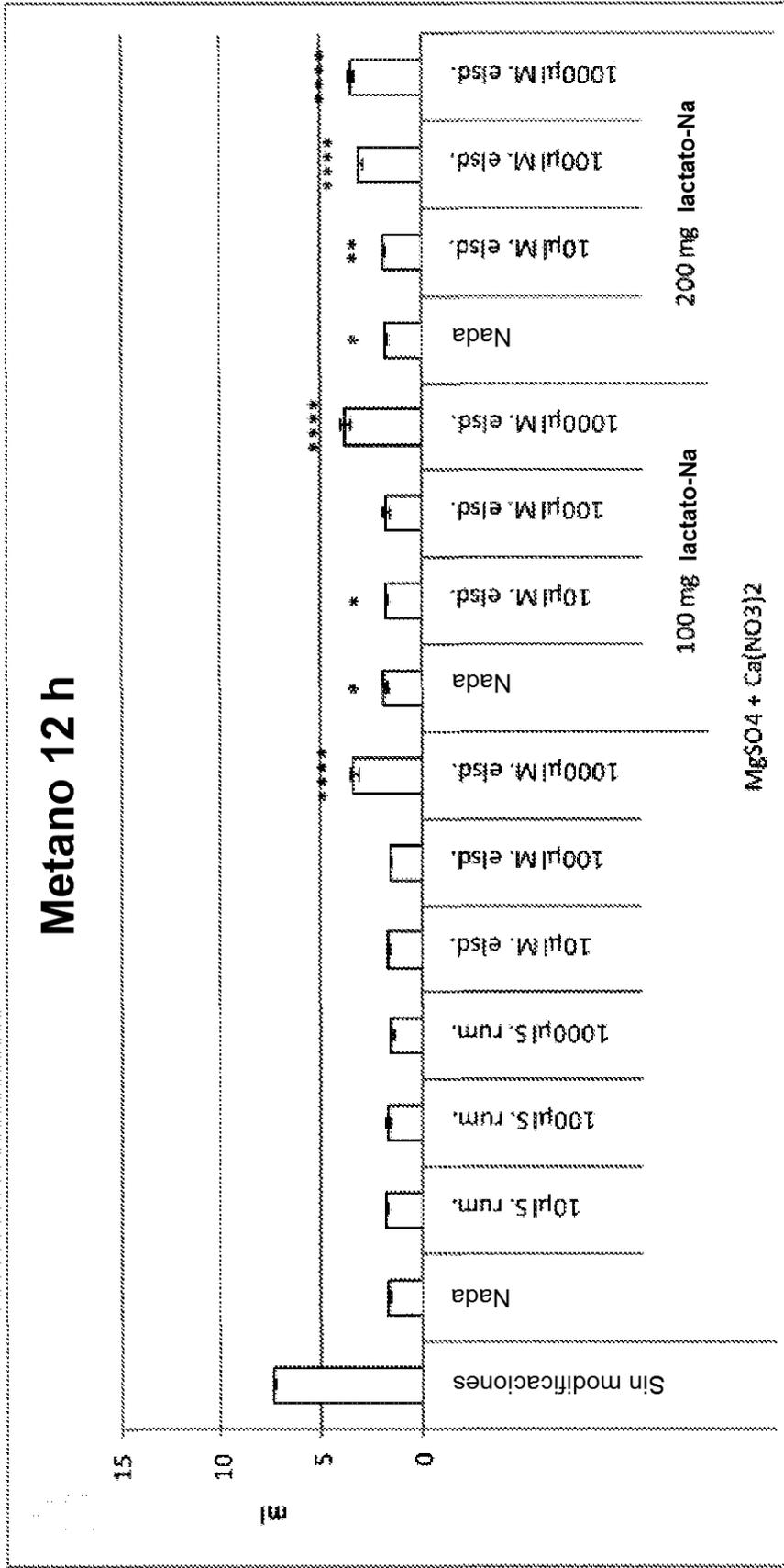






Fig 6b

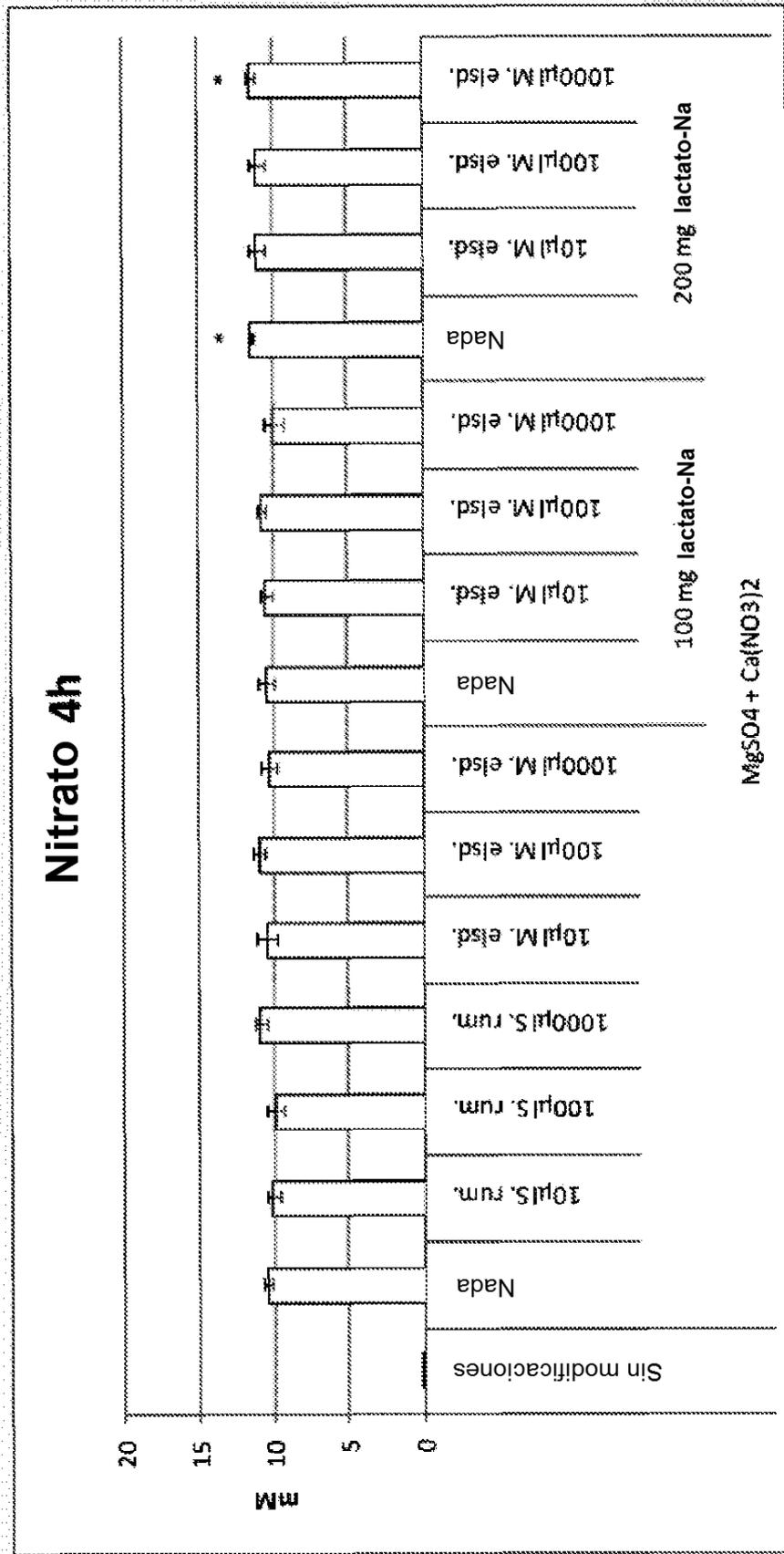


Fig 6c

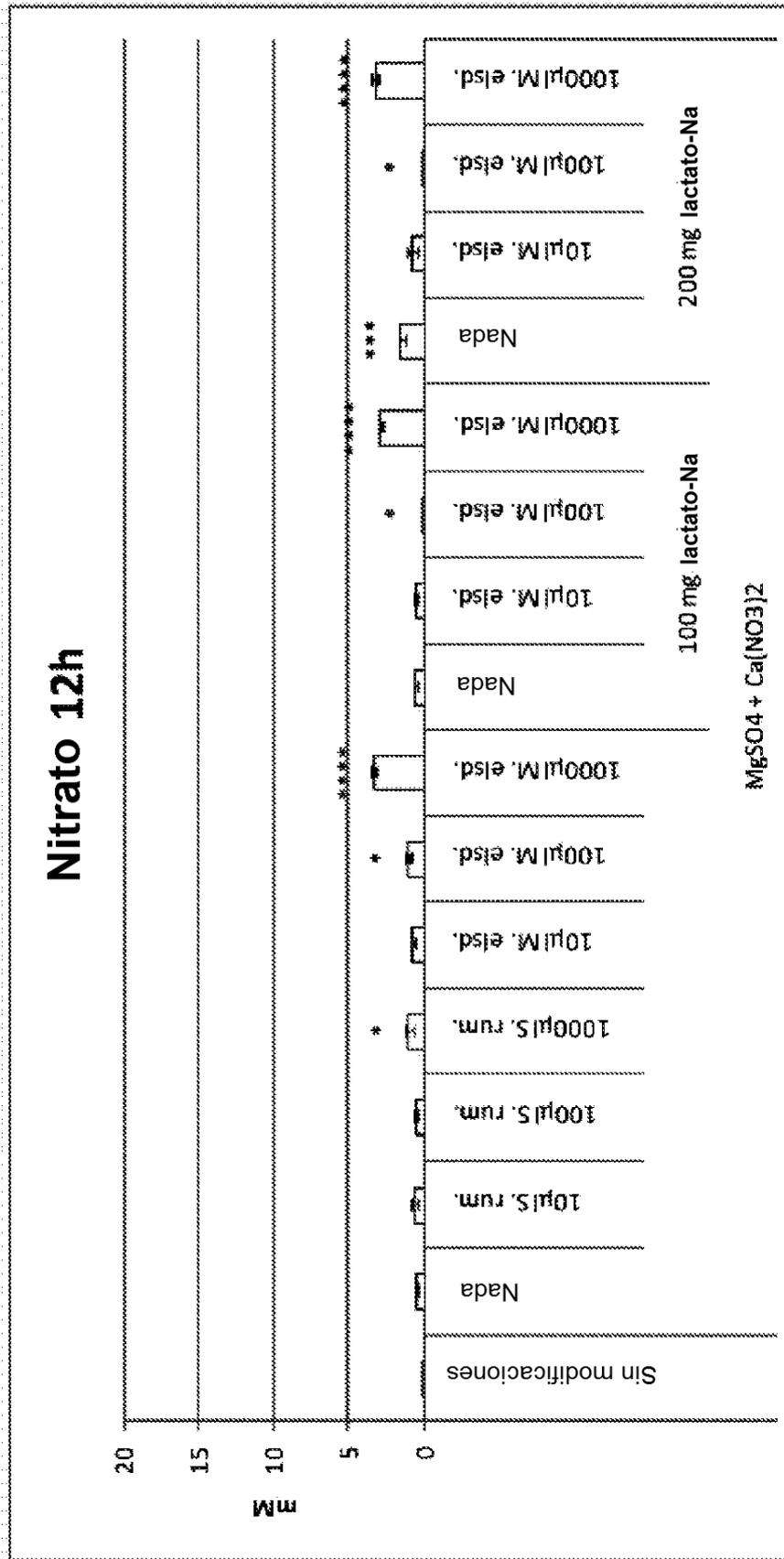


Fig 7a

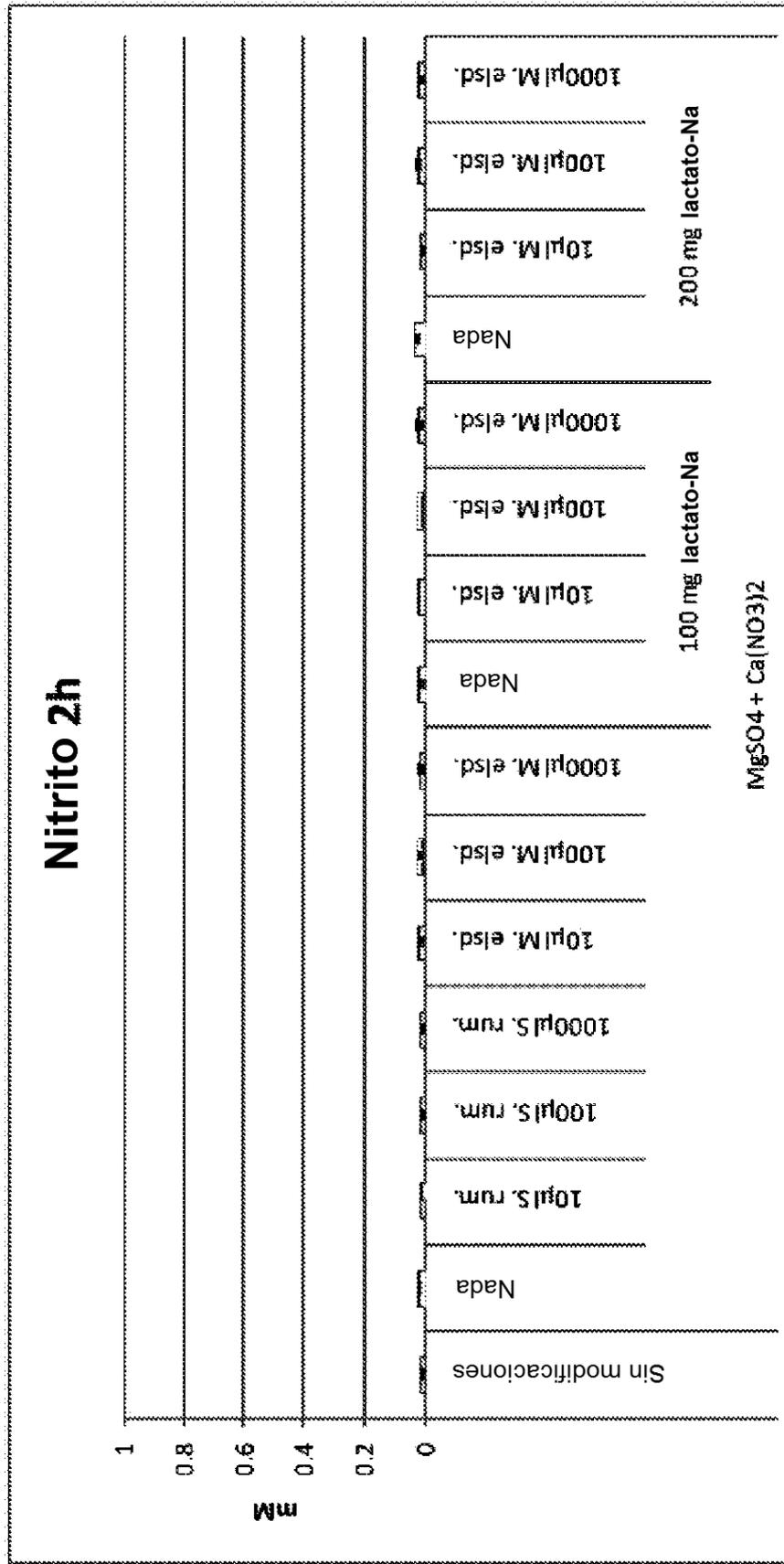




Fig 7c

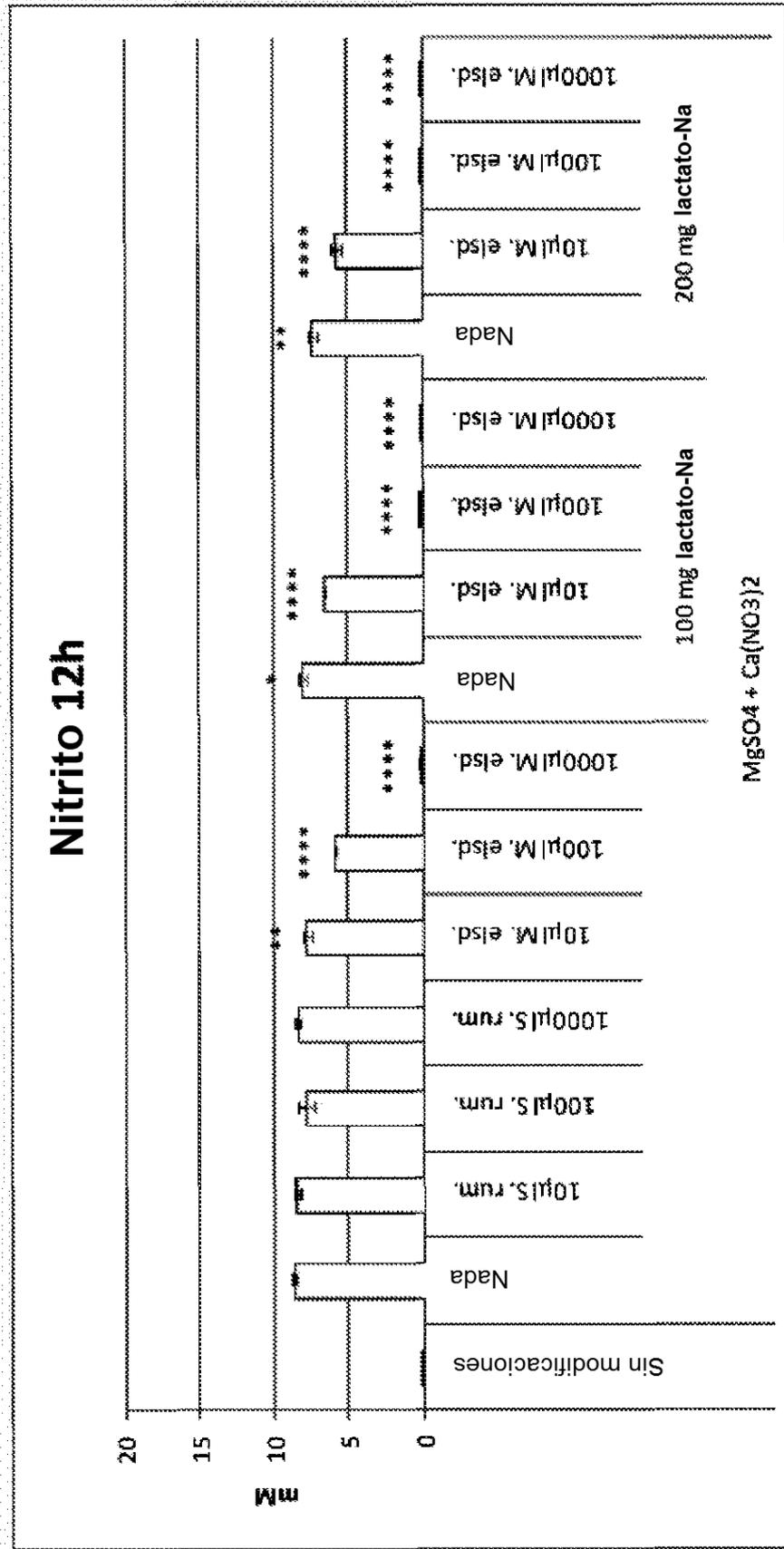


Fig 8a

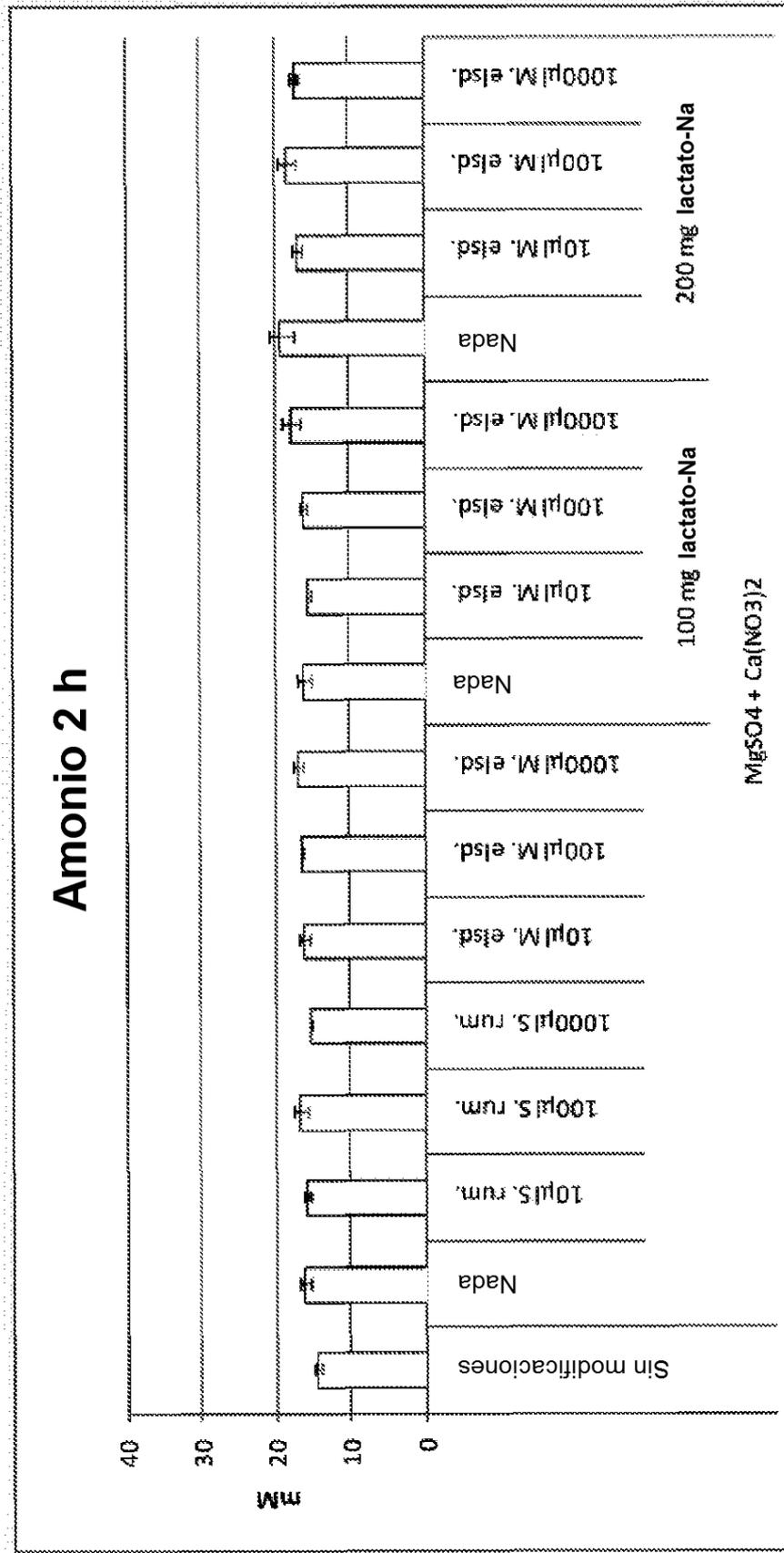


Fig 8b

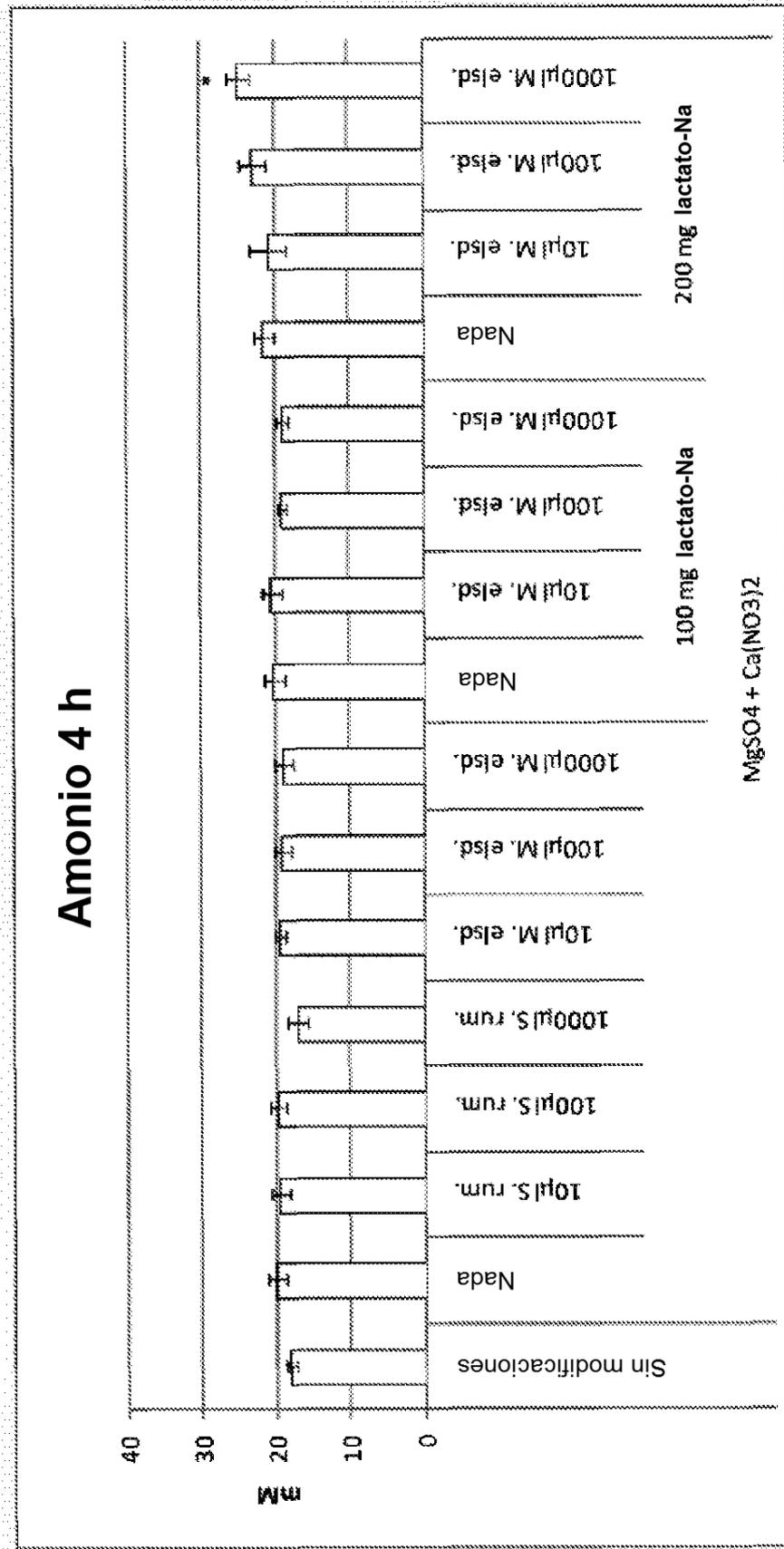


Fig 8c

