

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 409**

51 Int. Cl.:

**A23K 30/15** (2006.01)

**A23K 30/18** (2006.01)

**A23K 10/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2015 PCT/EP2015/069627**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16030456**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2015 E 15767097 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3185696**

54 Título: **Composiciones mejoradas de especies de bacterias ácido lácticas hetero- y homofermentadoras para la conservación del ensilaje de doble función**

30 Prioridad:

**28.08.2014 EP 14182628**

**15.10.2014 EP 14188993**

**10.11.2014 DK 201400652**

**05.05.2015 US 201562156999 P**

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

**09.06.2020**

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)**

**Boege Allé 10-12**

**2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**HINDRICHSEN, IDA;**

**MILORA, NINA y**

**OHLSSON, CHRISTER**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 765 409 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 mejoradas de especies de bacterias ácido lácticas hetero- y homofermentadoras para la conservación del ensilaje de doble función

**Campo de la invención**

5 La presente invención proporciona un inóculo de ensilaje que, como componentes activos, solo comprende (a) bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias de al menos una de las especies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, y *Lactobacillus reuteri*, y (b) bacterias ácido lácticas homofermentadoras de al menos una de las especies *Enterococcus* y *Lactococcus* que no reducen el crecimiento de (a) y que reducen el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico. Las composiciones son  
10 útiles para producir un producto de pienso fermentado, tal como ensilaje. Por tanto, la invención también proporciona métodos para producir un producto alimentario fermentado, y dicho método comprende inocular un material vegetal con el inóculo de ensilaje descrito en la presente. En algunas realizaciones, el material vegetal inoculado es adecuado para su uso después de un periodo corto de incubación, tal como un periodo de incubación de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 días.

**15 Antecedentes de la invención**

El ensilaje es un producto vegetal fermentado que puede usarse para alimentar a rumiantes. El ensilaje puede prepararse a partir de diversos materiales vegetales que se conservan bajo condiciones anaerobias para estimular la fermentación anaerobia. Pueden añadirse inóculos bacterianos para estimular el proceso de fermentación y/o para mejorar el producto de ensilaje. El ensilaje se conserva estableciendo unas condiciones anaerobias y mediante la  
20 reducción rápida del pH asociada con la producción de ácidos orgánicos por las bacterias nativas o bacterias ácido lácticas inoculadas. El pH bajo inhibe el crecimiento de muchas cepas de descomposición que, de otro modo, podrían provocar la pérdida de una gran cantidad de nutrientes.

Cuando el ensilaje se expone al aire, tal como cuando el búnker, el silo, la pila o la paca de ensilaje se abre para acceder al ensilaje para su uso, las condiciones aerobias pueden provocar el crecimiento de cualquier cepa de  
25 descomposición aerobia presente en el ensilaje. El crecimiento de cepas de descomposición aerobias provoca un aumento de la temperatura y una elevada pérdida de nutrientes.

Así, la descomposición al inicio del proceso de fermentación y la descomposición aerobia cuando se extrae el ensilaje para el uso representan fuentes de pérdidas económicas significativas para los agricultores.

La primera generación de inóculos de ensilaje bacterianos incluye especies bacterias homofermentadoras obligatorias (por ejemplo, *L. acidophilus*, *L. salivarius*) y heterofermentadoras facultativas (por ejemplo, *L. plantarum*) dirigidas a reducir el pH con rapidez para evitar el crecimiento de cepas de descomposición que aparecen de modo natural en el material vegetal, tales como las *Enterobacteraceae* Gram-negativas (por ejemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella*, *Shigella*) o *Clostridia* Gram-positivas (*C. tyrobutyricum*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum*). La prevención de las cepas de descomposición mediante la reducción  
35 rápida del pH reduce la pérdida de nutrientes y, a menudo, mejora en algún grado la estabilidad aerobia (Jatkauskas *et al.* (2013), Jatkauskas y Vrotniakiene (2013)).

La segunda generación de inóculos de ensilaje bacterianos se centra en *L. buchneri*, una especie heterofermentadora obligatoria, que se descubrió que tenía una actuación mejor con respecto a evitar la descomposición aerobia realizada por las cepas de descomposición aerobias en el momento de usar el ensilaje, cuando el búnker/pial de ensilaje se expone al aire. Sin embargo, un inconveniente de utilizar *L. buchneri* como  
40 inóculo de ensilaje bacteriano consiste en que tiene una fase de retraso más larga comparada con otras especies y que, en la etapa temprana de la fermentación, su producción de ácido acético y ácido láctico no disminuye con rapidez el pH cuando se compara con especies homofermentadoras obligatorias o heterofermentadoras facultativas.

La figura 1 de Jatkauskas y Vrotniakiene (2013) muestra que *L. buchneri* por sí solo (P0) es mejor comparado con los otros productos ensayados con respecto a la estabilidad aerobia, es decir, el tiempo que tardan las cepas de descomposición aerobias en calentar un búnker de ensilaje cuando se reexpone al aire. El segundo mejor producto para mantener baja la temperatura durante muchas horas fue un producto de combinación de heterofermentador obligatorio/heterofermentador facultativo/homofementador que contenía *L. buchneri*, *L. plantarum*, *E. faecium* (P1), y los siguientes mejores productos eran productos puramente de heterofermentador facultativo/homofementador que contenían *L. plantarum*, *E. faecium*, *L. lactis* con benzoato de sodio (P2a) o sin benzoato de sodio (P2b), un producto de heterofermentador facultativo/homofementador que contenía *L. plantarum*, *E. faecium*, *L. lactis* (P3), y un producto de heterofermentador facultativo que contenía dos cepas de *L. plantarum* (P4) (el ensilaje que no se inoculó presentó la estabilidad aerobia más baja).

Por tanto, siguen siendo necesarias composiciones mejores de inóculos de ensilaje bacterianos.

55

## Sumario de la invención

Se proporcionan composiciones de inóculos bacterianos mejoradas útiles, por ejemplo, para la producción y la conservación del ensilaje. También se proporcionan métodos que comprenden inocular un material vegetal con los inóculos de ensilaje descritos en la presente.

5 La presente invención proporciona un inóculo de ensilaje que, como componentes activos, solo comprende (a) bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias de al menos una de las especies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, y *Lactobacillus reuteri*, y (b) bacterias homofermentadoras de al menos una de las especies *Enterococcus* y *Lactococcus* que no reducen el crecimiento de (a) y que reducen el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico. En algunas realizaciones, las bacterias ácido  
10 lácticas heterofermentadoras obligatorias son de la cepa *Lactobacillus buchneri* depositada como DSM 22501. En algunas realizaciones, al menos una de las especies bacterianas homofermentadoras es un *Enterococcus*, por ejemplo, un *Enterococcus faecium*. En algunas realizaciones, al menos una de las especies bacterianas homofermentadoras es un *Lactococcus*, tal como un *Lactococcus lactis*, tal como la cepa depositada como DSM 11037. En realizaciones específicas, los inóculos de ensilaje consisten fundamentalmente en un *Lactobacillus*  
15 *buchneri* y un *Lactococcus*.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para producir un producto de pienso fermentado, y dicho método comprende inocular un material vegetal con un inóculo de ensilaje como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el material vegetal se incuba con el inóculo de ensilaje durante un periodo de hasta 2 días, o hasta 4 días, o hasta 7 días, o hasta 8 días, o hasta 14 días, o hasta 28 días, o al menos 90 días.

## 20 Descripción detallada de la invención

Tal como se indicó anteriormente, la presente invención proporciona inóculos de ensilaje mejorados útiles, por ejemplo, para la producción y la conservación del ensilaje. En realizaciones específicas, el inóculo de ensilaje solo comprende, como componentes activos: (a) bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias de al menos una de las especies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, y *Lactobacillus reuteri*, y  
25 (b) bacterias ácido lácticas homofermentadoras de al menos una de las especies *Enterococcus* y *Lactococcus* que no reducen el crecimiento de (a) y que reducen el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico. Las composiciones son útiles para producir un producto de pienso fermentado, tal como ensilaje. Por tanto, también se proporcionan métodos que comprenden inocular un material vegetal con el inóculo de ensilaje descrito en la presente. En algunas realizaciones, el material inoculado es adecuado para su uso después de un periodo  
30 corto de incubación.

### Definiciones

Debe considerarse que el uso de los términos "un/una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (en especial en el contexto de las reivindicaciones que aparecen a continuación) abarca el singular y el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente o que el contexto lo contradiga claramente.  
35 Los términos "comprende", "tiene", "incluye" y "contiene" deben considerarse términos abiertos (es decir, que significan "incluye, pero no se limita a") a menos que se indique lo contrario. La indicación de intervalos de valores en la presente solo pretende servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor distinto que se encuentra dentro del intervalo, a menos que en la presente se indique lo contrario, y cada valor distinto se incorpora en la memoria descriptiva del mismo modo que si se mencionase individualmente en la presente. Todas  
40 las etapas de los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o expresiones que indican ejemplos (por ejemplo, "tal como") proporcionadas en la presente solo pretende describir mejor la invención, y no plantea una limitación del alcance de la invención, a menos que se reivindique de otro modo. Ninguna de las expresiones de la memoria descriptiva debe interpretarse como que indique cualquier  
45 elemento no reivindicado como fundamental para la práctica de la invención.

Las bacterias ácido lácticas incluyen géneros tales como *Lactococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Oenococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* y *Lactobacillus spp.* Pueden dividirse en tres subgrupos: heterofermentadoras obligatorias, heterofermentadoras facultativas y homofermentadoras. Las bacterias ácido  
50 lácticas del género *Lactobacillus* pueden ser heterofermentadoras facultativas u homofermentadoras, dependiendo de la especie (Vandamme *et al.*, 1996).

Las bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias fermentan las hexosas para producir ácido láctico, ácido acético y dióxido de carbono por medio de la vía de fosfo-gluconato. Los ejemplos de especies de bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias son *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*.

55 Las bacterias ácido lácticas heterofermentadoras facultativas también pueden fermentar las pentosas para producir ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico y etanol, cuando existe limitación de glucosa. Los ejemplos de bacterias ácido lácticas heterofermentadoras facultativas son *Pediococcus spp.*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*.

Las bacterias ácido lácticas homofermentadoras se definen como bacterias que degradan principalmente hexosas a través de la vía de Embden-Meyerhof para producir ácido láctico. Los ejemplos de bacterias ácido lácticas homofermentadoras son *Lactococcus spp.*, *Enterococcus spp.* y *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*.

5 Muchos productos del mercado combinan cepas heterofermentadoras facultativas/homofermentadoras de alta producción de ácido láctico con *L. buchneri*. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto que esta combinación de bacterias no logra la mejor estabilidad aerobia posible (es decir, no estimula el mantenimiento de la temperatura ambiente en el momento de usar el ensilaje). Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, los inventores creen que esta combinación de bacterias reduce el crecimiento de *L. buchneri* y/o produce cantidades elevadas de ácido láctico que puede ser utilizado por las cepas de descomposición aerobias, con lo cual se inicia el deterioro del ensilaje tras su exposición al aire. Según algunas realizaciones, los inóculos descritos en la presente solucionan este problema combinando una especie heterofermentadora obligatoria (por ejemplo, *L. buchneri*) con especies bacterianas que reducen el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico (por ejemplo, *Lactococcus* y *Enterococcus*). Estas especies homofermentadoras seleccionadas no contrarrestan el efecto positivo de las especies heterofermentadoras obligatorias, o al menos lo hacen en un grado mucho menor.

Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un inóculo de ensilaje que, como componentes activos, solo comprende (a) bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias de al menos una de las especies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, y *Lactobacillus reuteri*, y (b) bacterias ácido lácticas homofermentadoras de al menos una de las especies *Enterococcus* y *Lactococcus* que no reducen el crecimiento de las bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias y que reducen el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico.

"Consiste fundamentalmente en" significa que el inóculo de ensilaje solo comprende las bacterias especificadas como componentes activos, y no comprende otro u otros componentes activos, tales como cualquier otra bacteria, enzima, ácido orgánico, benzoato de sodio, nitrato de sodio o hexamina. Un inóculo, tal como se describe en la presente, que consiste fundamentalmente en las bacterias especificadas no incluye *Lactobacillus plantarum*.

La expresión "al menos una" significa que la composición de inóculo puede comprender una, dos, tres o cuatro especies diferentes de bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias, y una o dos especies bacterianas homofermentadoras diferentes.

Las bacterias ácido lácticas homofermentadoras de al menos una de las especies *Enterococcus* y *Lactococcus* no reducen el crecimiento de las bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias. Esta propiedad puede ensayarse cultivando cepas las bacterianas homofermentadoras y cepas de bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias durante la noche en medio de Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) a 37°C, sembrando en estrías ambas cepas o especies bacterianas homofermentadoras y las cepas o especies de bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias que se van a ensayar sobre la misma placa de agar MRS sustancialmente al mismo tiempo, y después incubando la placa de agar bajo condiciones anaerobias a 37°C durante la noche. Si el crecimiento de las bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias es inhibido en al menos 5 mm, entonces la especie o cepa homofermentadora ensayada no tiene esta propiedad deseada. Si el inóculo de ensilaje incluye más de una especie o cepa de bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias o más de una especie o cepa bacteriana homofermentadora, se ensayan todas las combinaciones pertinentes.

Mediante este tipo de ensayos, se ha descubierto que ciertas cepas productoras de nisina de la especie homofermentadora *Lactobacillus lactis*, tales como *L. lactis* NCIMB 30117 y *L. lactis* ATCC 11454, inhiben a *L. buchneri* DSM 22501, mientras que *L. lactis* DSM 11037 y *E. faecium* DSM 16656, que son cepas que no producen nisina, no inhiben a *L. buchneri* DSM 22501.

Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, estos resultados indican que solo las cepas homofermentadoras productoras de nisina de la especie *Lactobacillus lactis* inhiben la especie o cepa heterofermentadora obligatoria, y que las cepas o especies homofermentadoras que producen bacteriocina que no producen nisina no inhiben la especie o cepa heterofermentadora obligatoria. Por consiguiente, el requisito de que al menos una especie o cepa bacteriana homofermentadora no reduzca el crecimiento de al menos una especie de bacteria ácido láctica heterofermentadora obligatoria puede cumplirse si la especie o cepa bacteriana homofermentadora no produce nisina. Así, en realizaciones específicas, la especie o cepa homofermentadora es una especie o cepa homofermentadora que produce bacteriocina que no produce nisina, aunque una selección directa, tal como se bosquejó anteriormente, puede identificar otras cepas que muestren esta propiedad. La invención indica que el inóculo de ensilaje consiste fundamentalmente en al menos una especie de bacteria ácido láctica heterofermentadora obligatoria (o una de sus cepas) y al menos una especie bacteriana homofermentadora (o una de sus cepas) que (i) no produce nisina, y (ii) reduce el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico.

En realizaciones específicas, la especie o cepa bacteriana homofermentadora reduce el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico. Tal como se indicó anteriormente, una reducción rápida en el pH puede inhibir la descomposición en etapas tempranas de la producción de ensilaje, mediante la inhibición del crecimiento

de microorganismos de descomposición, tales como *Clostridia*, *Enterobacteriaceae*, levaduras y mohos. Los microorganismos de descomposición pueden conducir a la pérdida de nutrientes, el crecimiento de microorganismos patógenos, y sabores desagradables que hacen que el ensilaje sea menos agradable de comer para los animales, tales como rumiantes, a los cuales se le suministra como alimento.

5 Tal como se emplea en la presente, "una especie o cepa que reduce el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico" se define como una especie o cepa que no produce más de 3 mg/ml de ácido láctico después de 24 horas de la inoculación en un baño de agua a 30°C de un tubo que contiene 150.000 CFU/ml de la cepa en 10 ml de medio de ensilaje estéril producido mezclando 5 g/l de extracto de levadura (Oxoid L21), 5 g/l de peptona de soja neutralizada (Oxoid LP0044C), 0,8 g/l de almidón soluble (Merck 1252), 0,08 g/l de sulfato de manganeso(II) dihidrato (Sigma M-1114), 0,037 g/l de ácido succínico (laboratorio de ensayo), 0,069 g/l de ácido cítrico monohidrato, y 0,14 ácido L-málico (Merck 244) en 900 ml de agua Milli Q hasta que se disuelven, ajustando el pH a 6,3, distribuyendo en botellas pequeñas y sometiendo a autoclave a 121°C durante 15 minutos, y después añadiendo 100 ml de disolución de azúcar filtrada estéril que contiene 56 g/l de D(-)-fructosa (Merck 4007), 32 g/l de D(+)-glucosa monohidrato (Merck 8342), 20 g/l de D(+)-xilosa (Merck 8689), 20 g/l de L(+)-arabinosa (Aldrich A9, 190-6), y 32 g/l de sacarosa (Merck 7651).

Según la presente invención, el inóculo de ensilaje incluye al menos una cepa de bacteria ácido láctica heterofermentadora obligatoria que es una especie de *Lactobacillus* seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, y *Lactobacillus reuteri*. En una realización específica, la cepa de bacteria ácido láctica heterofermentadora obligatoria es un *Lactobacillus buchneri*. Los ejemplos de *Lactobacillus buchneri* que se contemplan como útiles en la presente invención son *L. buchneri* KKP .907, *L. buchneri* DSM 22963, *L. buchneri* NCIMB 40788, *L. buchneri* NCIMB 30139, *L. buchneri* DSM 16774, *L. buchneri* DSM 22963, *L. buchneri* DSM 12856. En realizaciones específicas, el *Lactobacillus buchneri* es la cepa de *Lactobacillus buchneri* depositada como DSM 22501.

En algunas realizaciones, el inóculo de ensilaje incluye al menos una especie o cepa bacteriana que reduce el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico que es un *Enterococcus*, tal como un *Enterococcus faecium*. Los ejemplos de *Enterococci* que se contemplan como útiles en la presente invención son *E. faecium* NCIMB 10415, *E. faecium* CNCM I-3236, *E. faecium* BIO 34 y *E. faecium* DSM 16573.

En otras realizaciones, el inóculo de ensilaje incluye al menos una especie o cepa bacteriana que reduce el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico que es un *Lactococcus*, tal como un *Lactococcus lactis*. En realizaciones específicas, el *Lactococcus lactis* es la cepa depositada como DSM 11037.

Por tanto, en algunas realizaciones, el inóculo de ensilaje consiste fundamentalmente en una cepa de *Lactobacillus buchneri* y una cepa de *Enterococcus* que no reduce el crecimiento de la especie (o cepa) de bacteria ácido láctica heterofermentadora obligatoria y que reduce el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico. En otras realizaciones, el inóculo de ensilaje consiste fundamentalmente en una cepa de *Lactobacillus buchneri* y una cepa de *Lactococcus* que no reduce el crecimiento de la especie (o cepa) de bacteria ácido láctica heterofermentadora obligatoria y que reduce el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico.

La presente invención también proporciona métodos para producir un producto de pienso fermentado, tal como un ensilaje, que comprende inocular un material vegetal con el inóculo de ensilaje bacteriano tal como se describe en la presente. Se ha descubierto, de modo sorprendente, que los inóculos de ensilaje descritos en la presente son capaces de proporcionar un efecto muy rápido, es decir, el material inoculado con un inóculo de ensilaje bacteriano, según se describe, puede resultar adecuado para su uso después de un periodo corto de incubación, tal como un periodo de incubación de tan solo 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 días. Así, en algunas realizaciones, el método comprende incubar el material vegetal con un inóculo de ensilaje, según se describe en la presente, durante un periodo de hasta 2 días, o de hasta 4 días, antes de exponer el ensilaje al aire, tal como mediante la apertura del búnker de ensilaje. Sin embargo, el material vegetal también puede incubarse durante un periodo de tiempo más largo, tal como hasta 7 días, hasta 8 días, hasta 14 días, o hasta 28 días, o incluso durante más tiempo, tal como un periodo de al menos 60 días o al menos 90 días, siendo este último el periodo convencional para ensayar el efecto de los inóculos de ensilaje.

Tal como se indicó anteriormente, en realizaciones específicas, los inóculos de ensilaje bacterianos descritos en la presente pueden lograr una reducción rápida del pH al inicio del proceso de ensilaje, manteniendo al mismo tiempo una elevada estabilidad aerobia en el momento del uso del ensilaje, es decir, los inóculos de ensilaje bacterianos descritos en la presente pueden mostrar una fermentación inicial rápida que reduce la pérdida de materia seca ("dry matter", DM) y la descomposición en la fase temprana de la fermentación, y también pueden lograr una estabilidad aerobia que es igual o comparable a la inoculación con una cepa heterofermentadora obligatoria, tal como *L. buchneri* por sí sola. Así, los inóculos descritos en la presente logran una mejor estabilidad aerobia que los productos que contienen solo cepas homofermentadoras o/y heterofermentadoras facultativas, aunque su estabilidad aerobia puede no ser tan buena como la que se logra con el heterofermentador obligatorio *L. buchneri* por sí solo.

Cepas depositadas

5 Una cepa de *Lactobacillus plantarum* ha sido depositada en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 16568 con la fecha de depósito del 13 de julio de 2004, por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha realizado bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines del Procedimiento en Materia de Patentes.

10 Una cepa de *Lactobacillus buchneri* ha sido depositada en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 22501 con la fecha de depósito del 22 de abril de 2009, por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha realizado bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines del Procedimiento en Materia de Patentes.

15 Una cepa de *Enterococcus faecium* ha sido depositada en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 22502 con la fecha de depósito del 22 de abril de 2009, por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha realizado bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines del Procedimiento en Materia de Patentes.

20 Para los microorganismos depositados identificados anteriormente, se aplican las siguientes indicaciones adicionales: con respecto a las respectivas Oficinas de Patentes de los respectivos estados designados, los solicitantes piden solo se dé acceso a una muestra de los microorganismos depositados mencionados anteriormente a un experto indicado por el peticionario hasta la fecha en que se conceda la patente, o hasta la fecha en que la solicitud se rechace o retire o se estime que se va a retirar.

La cepa de *Lactobacillus lactis* DSM 11037 ha sido depositada en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) el 26 de junio de 1996 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, y se menciona en la patente concedida EP 928333.

25 A continuación se describen realizaciones de la presente invención, como ejemplos no limitantes.

**Leyenda de las figuras**

Figura 1a: Reducción de pH a lo largo de 48 h de un medio de ensilaje estéril inoculado con la composición 1 ( $\Delta$ ), la composición 2 ( $\square$ ), la composición 3 (o), la composición 4 ( $\diamond$ ) y la composición 5 (X). La inoculación inicial fue de 150.000 CFU/ml y la temperatura se mantuvo a 30°C, n = 1.

30 Figura 1b: Concentración de ácido láctico en mg/ml a lo largo de 48 h de un medio de ensilaje estéril inoculado con la composición 1 ( $\Delta$ ), la composición 2 ( $\square$ ), la composición 3 (o), la composición 4 ( $\diamond$ ) y la composición 5 (X). La inoculación inicial fue de 150.000 CFU/ml y la temperatura se mantuvo a 30°C, n = 1.

Figura 1c: Concentración de ácido acético en mg/ml a lo largo de 48 h de un medio de ensilaje estéril inoculado con la composición 1 ( $\Delta$ ), la composición 2 ( $\square$ ), la composición 3 (o), la composición 4 ( $\diamond$ ) y la composición 5 (X). La inoculación inicial fue de 150.000 CFU/ml y la temperatura se mantuvo a 30°C.

Figura 2: Reducción de pH a lo largo de 72 h de un medio de ensilaje estéril inoculado con la composición 2 ( $\square$ ), la composición 4 ( $\diamond$ ) y la composición 6 ( $\blacksquare$ ). La inoculación inicial fue de 150.000 CFU/ml y la temperatura se mantuvo a 30°C.

40 Figura 3: Proporción de ácido acético/ácido láctico de maíz recolectado en 2011 en Dinamarca (minisilo 1) y no inoculado (barras blancas), o inoculado con la composición 4 (barras grises) o la composición 7 (barras negras). Las bolsas de vacío del minisilo se conservaron a 25°C hasta su apertura después de 7, 28, 61 y 88 días.

Figura 4: Estabilidad aerobia de maíz recolectado en 2012 en Dinamarca (minisilo 2) y no inoculado ( $\blacksquare$ ), o inoculado con la composición 4 ( $\diamond$ ) o la composición 5 (X). En el eje de abscisas se encuentra el tiempo (h) y en el eje de ordenadas la temperatura (°C). La línea negra discontinua muestra la temperatura ambiente, mientras que la línea gris discontinua es la temperatura ambiente + 3°C.

Figura 5: El pH del minisilo con ensilaje de maíz recolectado en 2012 (minisilo 2) después de siete días de exposición aerobia que incluye PEE de cuatro observaciones. No se inoculó (barra blanca), o se inoculó con la composición 4 (barra gris) o la composición 5 (barra punteada).

50 Figura 6: Estabilidad aerobia de maíz recolectado en 2013 en Dinamarca (minisilo 3) y no inoculado ( $\blacksquare$ ), o inoculado con la composición 2 ( $\square$ ) o la composición 4 ( $\diamond$ ). En el eje de abscisas se encuentra el tiempo (h) y en el eje de ordenadas la temperatura (°C). La línea negra discontinua muestra la temperatura ambiente, mientras que la línea gris discontinua es la temperatura ambiente + 3°C.

Figura 7: Estabilidad aerobia de forraje de maíz rojo recolectado en 2013 (minisilo 4) y no inoculado ( $\blacksquare$ ), o

inoculado con la composición 2 (□), la composición 4 (◇) y la composición 7 (▲). En el eje de abscisas se encuentra el tiempo (h) y en el eje de ordenadas la temperatura (°C). La línea negra discontinua muestra la temperatura ambiente, mientras que la línea gris discontinua es la temperatura ambiente + 3°C.

5 Figura 8: Estabilidad aerobia de forraje de trébol rojo:heno de Timothy:festuca recolectado en 2013 (minisilo 5) y no inoculado (blanco), o inoculado con la composición 2 (□), la composición 4 (◇) y la composición 7 (▲). En el eje de abscisas se encuentra el tiempo (h) y en el eje de ordenadas la temperatura (°C). La línea negra discontinua muestra la temperatura ambiente, mientras que la línea gris discontinua es la temperatura ambiente + 3°C.

10 Figura 9a: Estabilidad aerobia (horas) en ensilaje de maíz (minisilo 6a) después de 7 y 14 días de fermentación, seguido de 7 días de exposición aerobia (7+7 y 14+7, respectivamente) y no inoculado (blanco), o inoculado con la composición 4 (gris) o la composición 7 (negro).

Figura 9b: Estabilidad aerobia (horas) en ensilaje de maíz (minisilo 6b) después de 2, 4, y 8 días de fermentación, seguido de 7 días de exposición aerobia (2+7, 4+7, y 8+7, respectivamente) y no inoculado (blanco), o inoculado con la composición 4 (gris).

15 Figura 10: Número de levaduras (cfu/g) en ensilaje de maíz (minisilo 6a) después de 2, 7 y 14 días de fermentación y no inoculado (blanco), o inoculado con la composición 4 (gris) o la composición 7 (negro).

Figura 11: Desarrollo del pH de ensilaje de maíz (minisilo 6a) después de 2, 7 y 14 días de fermentación y no inoculado (blanco), o inoculado con la composición 4 (gris) o la composición 7 (negro).

20 Figura 12: Producción de gas acumulada a lo largo de 162 horas de maíz de recolectado en 2014 (minisilo 7a) y no inoculado (cuadrados grises) o inoculado con la composición 4 (círculos negros). En el eje de abscisas se encuentra el tiempo (h) y en el eje de ordenadas aparece el volumen en ml/g de forraje fresco.

Figura 13: Diferencia en la producción de gas entre un control y maíz inoculado con la composición 4 (minisilo 7b). En el eje de abscisas se encuentra el tiempo (h) y en el eje de ordenadas aparece la diferencia en volumen en ml/g de forraje fresco.

25 Figura 14: Porcentaje de pérdida de peso de maíz envasado al vacío recolectado en 2014 después de 162 horas (minisilo 7b) y no inoculado (blanco) o inoculado con la composición 4 (gris) o la composición 7 (negro).

Figura 15: Diferencia en la emisión de gas en maíz envasado al vacío recolectado en 2014 después de 6 días de fermentación. Bolsas envasadas al vacío de forraje sin inoculación (lado izquierdo de la fotografía) o con inoculación de la composición 4 (150.000 CFU/g de maíz, lado derecho de la fotografía).

### Ejemplos

30 Ejemplo 1: Cultivos discontinuos *in vitro* estériles

35 Se ensayaron cepas individuales de bacterias ácido lácticas homofermentadoras y heterofermentadoras y productos de combinación en dos configuraciones experimentales independientes usando un medio de ensilaje estéril que contenía diversas fuentes de carbohidratos para imitar la composición de carbohidratos del pasto. El pH y el contenido en ácidos orgánicos se midieron a lo largo del tiempo. El medio contenía 5 g/l de extracto de levadura (Oxoid L21), 5 g/l de peptona de soja neutralizada (Oxoid LP0044C), 0,8 g/l de almidón soluble (Merck 1252), 0,08 g/l de sulfato de manganeso(II) dihidrato (Sigma M-1114), 0,037 g/l de ácido succínico (laboratorio de ensayo), 0,069 g/l de ácido cítrico monohidrato, y 0,14 ácido L-málico (Merck 244) que se mezclaron en 900 ml de agua Milli Q hasta que se disolvieron. El pH se ajustó a 6,3 y se distribuyó en botellas pequeñas y se sometió a autoclave a 40 121°C durante 15 minutos. Después de someter a autoclave, se añadieron 100 ml de una disolución de azúcar filtrada estéril que contenía 56 g/l de D(-)-fructosa (Merck 4007), 32 g/l de D(+)-glucosa monohidrato (Merck 8342), 20 g/l de D(+)-xilosa (Merck 8689), 20 g/l de L(+)-arabinosa (Aldrich A9, 190-6) y 32 g/l de sacarosa (Merck 7651) para obtener el medio de ensilaje final. En ambos experimentos 1 y 2 se usó el medio de ensilaje estéril y se inoculó con las diversas composiciones de inóculos diferentes indicadas en la tabla 1.

Tabla 1 - Composiciones usadas en los dos estudios de cultivos discontinuos *in vitro*

Composición n.º	Experimento	Cepas bacterianas	Porcentaje	CFU/ml
1	1	<i>L. plantarum</i> DSM 16568	100	150.000
2	1, 2	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	100	150.000
3	1	<i>L. lactis</i> DSM 11037	100	150.000
4	1, 2	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	50	150.000

		<i>L. lactis</i> DSM 11037	50	
5	1	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	70	150.000
		<i>L. lactis</i> DSM 11037	20	
		<i>L. plantarum</i> DSM 16568	10	
6	2	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	50	150.000
		<i>L. plantarum</i> DSM 16568	50	

**Experimento 1**

Se distribuyeron 10 ml del medio de ensilaje inoculado con las diversas composiciones de inóculos de la tabla 1 en cada uno de siete tubos estériles y se mantuvieron en un baño de agua a 30°C. Después de 0, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 24 y 48 horas, se tomaron muestras para el análisis de los ácidos orgánicos volátiles ("volatile organic acid", VFA) y del ácido láctico y el pH. El pH se controló usando un pH-metro manual, mientras que los ácidos orgánicos volátiles se analizaron con una HPLC (Dionex).

**Experimento 2**

El experimento 2 fue similar al experimento 1 con respecto al medio de ensilaje estéril, el nivel de inoculación y la temperatura. Se usaron las composiciones 2, 4 y 6 como inóculos. Se usó un pH-metro automático, y el ácido acético, el ácido láctico y el ácido fórmico se midieron con una HPLC (Dionex) después de 72 h.

**Resultados**

Se proporcionan los resultados de los experimentos 1 y 2 que muestran los efectos de las diversas composiciones de inóculos sobre el pH y el contenido en ácidos orgánicos en las figuras 1a, b, c y la figura 2, así como en la tabla 2.

La figura 1a muestra el cambio en el pH a lo largo del tiempo del experimento 1. La composición 2 reduce el pH muy lentamente. La composición 1 y la composición 3 reducen el pH con mucha más rapidez y, después de 14 horas, el pH se encontraba por debajo de 5,0, mientras que la composición 2 aún mantenía un pH por encima de 6,0. La composición 4 reduce el pH con la misma rapidez que la composición 3. La composición 5 produjo una curva de pH muy similar a la composición 1.

La figura 1b muestra la concentración de ácido láctico a lo largo del tiempo del experimento 1. Después de 24 horas, la composición 1 produjo mucho más ácido láctico, comparado con la composición 2, la composición 3 o la composición 4. Después de 48 horas, la concentración de ácido láctico de la composición 1 era mayor que 8 mg/ml, en oposición a 4 mg/ml o menor con la composición 2, la composición 3 o la composición 4. La composición 5 produjo una concentración de ácido láctico muy similar a la composición 1.

La figura 1c muestra la concentración de ácido acético a lo largo del tiempo del experimento 1. Después de 48 horas, la composición 2 presentaba una concentración de ácido acético mayor que 2 mg/ml, mientras que la composición 1 y la composición 3 produjo menos de 0,5 mg/ml de ácido acético. La composición 4 produjo 1 mg/ml de ácido acético después de 48 horas, mientras que la composición 5 produjo una concentración menor que 0,5 mg/ml.

La figura 2 muestra el cambio en el pH a lo largo del tiempo del experimento 2. De nuevo, la composición 2 reduce el pH muy lentamente. La composición 4 reduce el pH con mucha más rapidez y, después de 15 horas, el pH se encontraba por debajo de 4,5, mientras que la composición 6 aún mantenía un pH por encima de 6,0. La composición 6 produjo una disminución en el pH ligeramente más lenta comparado con la composición 4. Sin embargo, la reducción en el pH continúa con rapidez y el pH ya se encontraba por debajo de 4,0 después de 18 horas. Después de 72 horas, el pH de la composición 2 y de la composición 4 alcanzó 3,6 y 3,7, respectivamente, mientras que la composición 6 bajó tanto como 3,2.

Tabla 2 - Producción de ácidos orgánicos del medio de ensilaje estéril inoculado después de 72 horas (experimento 2)

Composición n.º	Cepas bacterianas	%	Ácido fórmico (mg/ml)	Ácido acético (mg/ml)	Ácido láctico (mg/ml)
2	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	100	0,012	2,895	4,077
4	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	50	0,447	1,760	3,488



	<i>L. lactis</i> DSM 11037	50			
6	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	50	0,014	0,554	10,777
	<i>L. plantarum</i> DSM 16568	50			

La tabla 2 muestra que la producción de ácido acético se redujo mucho con la composición 6, que contiene *L. buchneri* DSM 22501 y *L. plantarum* DSM 16568, por contraste con la composición 4, que contiene *L. buchneri* DSM 22501 y *L. lactis* DSM 11037. La composición 6 también mostró una alta concentración de ácido láctico después de 72 horas. La composición 4 no solo presenta una concentración de ácido acético mucho mayor, comparado con la composición 6, sino que también presenta una concentración alta de ácido fórmico.

Ejemplo 2: Estabilidad aerobia en minisilos

*Minisilos 1, 2 y 3 - Recolección de maíz en 2011, 2012 y 2013, Dinamarca*

Se configuraron cinco experimentos de minisilos diferentes para ensayar diversas composiciones de inóculos de ensilaje. Tres experimentos se configuraron en Dinamarca con el maíz recolectado de tres granjas diferentes en 2011 (minisilo 1), 2012 (minisilo 2) y 2013 (minisilo 3), y dos experimentos se llevaron a cabo en Lituania en 2013 usando maíz y trébol rojo:heno de Timothy:césped de festuca (60:30:10) (minisilos 4 y 5). En la tabla 3 se lista un resumen de los inóculos usados y las tasas de aplicación.

Tabla 3 - Composiciones de cepas usadas en los estudios de minisilos

Composición n.º	Minisilo n.º	Forraje	Cepas bacterianas	Porcentaje	CFU/g de forraje
Sin aditivo	1, 2, 3, 4, 6, 7a, 7b	Maíz		0	
	5	Pasto/trébol			
2	3, 4	Maíz	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	100	150.000
	5	Pasto/trébol			
4	1, 2, 3, 4, 6, 7a, 7b	Maíz	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	50	150.000
	5	Pasto/trébol	<i>L. lactis</i> DSM 11037	50	
5	2	Maíz	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	70	150.000
			<i>L. lactis</i> DSM 11037	20	
			<i>L. plantarum</i> DSM 16568	10	
7	1, 4	Maíz	<i>L. buchneri</i> DSM 22501	50	150.000
	5, 6	Pasto/trébol	<i>E. faecium</i> DSM 22502 <i>L. plantarum</i> DSM 16568	30 20	

Para el minisilo 1, el maíz se recolectó en el sudoeste de Jutlandia. El tiempo de transporte hasta el laboratorio fue de 4 horas. Después, el maíz se conservó durante la noche en el exterior antes de congelarse a -20°C. En el momento de la inoculación, el maíz se descongeló durante 1-2 horas y después se mantuvo en una nevera a 4-5°C. Los inóculos se suspendieron en agua del grifo y se introdujeron en botellas de pulverización. La dosificación deseada para cada tratamiento fue de 150.000 CFU/g de maíz, y la cantidad necesaria para alcanzar la dosificación deseada del inóculo se calculó basándose en la potencia real de las composiciones. Se pesaron 1000 g de maíz en una bolsa de plástico poco a poco, para que el inóculo pudiera pulverizarse de modo homogéneo sobre el maíz. La bolsa después se agitó para asegurar una distribución igualitaria del inóculo en la bolsa. Los 1000 g de maíz inoculados después se distribuyeron en cinco bolsas Alubag a 200 g en cada una para cada momento del tiempo (7, 28, 61 y 88 días). Las bolsas Alubag envasadas al vacío se conservaron a 25°C.

Se abrieron cinco bolsas Alubag por tratamiento en los diferentes momentos del tiempo. Las muestras después se ensayaron para ácidos orgánicos pequeños.

Para el minisilo 2, se recogió maíz recién recolectado de una granja en Zelandia central, Dinamarca, y se transportó inmediatamente al laboratorio. Se ensayaron los cinco tratamientos diferentes listados en la tabla 3, así como un grupo control en la configuración de minisilo. Los inóculos se suspendieron en agua del grifo y se introdujeron en

botellas de pulverización. La dosificación deseada para cada tratamiento fue de 150.000 CFU/g de maíz, y la cantidad necesaria para alcanzar el inóculo deseado se calculó basándose en la potencia real de las composiciones. Se pesaron 1000 gramos de maíz en una bolsa de plástico poco a poco, para que el inóculo pudiera pulverizarse de modo homogéneo sobre el maíz. Después de agitar la bolsa para asegurarse de una mejor distribución del inóculo, la bolsa se envasó al vacío. Se prepararon cuatro bolsas de cada tratamiento y se conservaron a 25°C para su posterior análisis después de tres meses. Después de tres meses se configuró un estudio de estabilidad aerobia usando el ensilaje que se había conservado en bolsas de vacío. El ensilaje se distribuyó en recipientes (botellas de plástico abiertas en su parte superior y con un orificio en la parte inferior) con un detector de temperatura localizado en la parte intermedia, se colocaron en un nicho de poliestireno, se cubrieron con una placa de plástico grande y se conservaron a temperatura ambiente. Se controló la temperatura de cada muestra individual después de su exposición al aire a lo largo de un periodo de 7 días.

Para el minisilo 3, se recogió maíz recién recolectado de una granja del noreste de Zelandia. El procedimiento fue el mismo que el descrito para el minisilo 2, excepto que el estudio de estabilidad aerobia se realizó después de tan solo dos semanas.

#### Resultados de los minisilos 1, 2 y 3

En la figura 3 se muestran las proporciones de ácido acético a ácido láctico en el ensilaje del minisilo 1 a diferentes momentos. La proporción de ácido acético a ácido láctico es mayor en el control no inoculado comparado con la composición 7 después de siete días y después de 28 días. Sin embargo, después de 88 días, la composición 7 presenta una elevada proporción de ácido acético a ácido láctico comparado con el control. La composición 4 presenta una elevada proporción de ácido acético a ácido láctico desde el día siete, que aumenta a lo largo del tiempo. El pH promedio de todas las muestras fue menor que 4,0 en todos los momentos.

Los resultados del minisilo 2 se muestran en la figura 4. Puede observarse que la temperatura del ensilaje control no inoculado estaba a más de 3°C por encima de la temperatura ambiente después de 78 horas, mientras que con la composición 5 aumentó por encima de 3°C de la temperatura ambiente después de 96 horas. La composición 4 mantuvo el ensilaje de maíz estable durante las 162 horas de mediciones. Tal como se muestra en la figura 5, después de 162 horas, el pH del control se encontraba a un promedio de 6,74, mientras que el ensilaje tratado con la composición 5 presentaba un pH promedio de 5,67 y la composición 4 presentaba un pH promedio de 4,05.

Para el minisilo 3, el ensilaje envasado al vacío abierto después de la conservación que no se había inoculado resultó inestable después de 93 horas, mientras que el ensilaje inoculado con la composición 2 fue estable durante todo el periodo de 160 horas, y el ensilaje inoculado con la composición 4 fue estable durante 129 horas (figura 6).

#### Minosilos 4 y 5 - Recolección de maíz y pasto/trébol en 2013, Lituania

Para el mini-silo 4, se recolectó maíz (*Zea mays* L.) en el estadio masoso de la maduración del grano. La concentración de materia seca (DM) del maíz era del 38,85 % y la concentración de carbohidratos hidrosolubles era del 2,54 %. El maíz se cortó mediante una cosechadora de forraje bajo condiciones de granja en trozos con una longitud de aproximadamente 2 cm.

Para el minisilo 5, se recolectó una mezcla de pasto y trébol que contenía 60% de trébol rojo, 30% de heno Timothy y 10% de césped de festuca y se secó hasta alcanzar 32,8 % de materia seca. Esta mezcla de forraje se denomina mezcla de pasto/trébol. El contenido en carbohidratos hidrosolubles era de 20,3 g/kg de DM (2,03 % de forraje fresco). La mezcla de pasto/trébol se cortó mediante una cosechadora de forraje bajo condiciones de granja en trozos con una longitud de 2-3 cm.

En el minisilo 4 y el minisilo 5, se tomaron cinco muestras representativas (>500 g cada una) para el análisis del valor nutricional de los forrajes y el tratamiento. Los forrajes se transportaron en una bolsa de polietileno hasta el laboratorio. Los experimentos en el laboratorio comenzaron dentro de 0,5 h desde la preparación de la cosecha. Se tomó una muestra representativa de 500 g de hierba marchita y cortada para los análisis del valor nutricional, capacidad tampón, nitratos y composición microbiana. Se usaron los mismos inóculos de ensilaje y procedimientos en los ensayos de maíz y de forraje de pasto/trébol.

El inóculo de ensilaje se suspendió en agua destilada inmediatamente antes de su aplicación hasta una dosis deseada como se describe en la tabla 3. Se realizaron cinco duplicados para cada tratamiento. Las tasas de aplicación de los productos se calcularon según la dosis indicada en la tabla 3 y la concentración bacteriana real de los productos. Se usó agua sin cloro en la dilución de los productos. Se empleó el mismo volumen de agua destilada en lugar de la suspensión en el tratamiento control (para la fermentación espontánea). Después de la inoculación, se rellenaron tarros de vidrio de 3 l con 1,80-1,84 kg de la cosecha fresca que es igual a 1 kg de DM por 5 litros de volumen. Los tarros se cerraron con tapas 15 min después de ser rellenados. La producción de gas durante la fermentación se liberó con un purgador de gas durante el experimento. Después de 90 días de conservación en los tarros de vidrio a una temperatura constante de 20°C, se realizaron los análisis químicos y microbianos.

Para medir la estabilidad aerobia de los ensilajes, se controló la temperatura dentro del ensilaje durante 10 días. Para ello, se insertaron cables de termopares en el punto intermedio de las muestras de ensilaje que se colocaron

5 en cajas de poliestireno abiertas. La parte superior e inferior de las cajas contenían un orificio de 2 cm de diámetro para permitir la entrada del aire y la salida del CO<sub>2</sub>. Se colocó un transductor en el centro de la masa del ensilaje a través de un orificio en la cubierta de la caja, que expone el ensilaje al aire. Estos ensilajes no se tocaron durante el periodo de registro de las temperaturas. Las cajas se mantuvieron a una temperatura ambiente constante (≈ 20°C). La temperatura ambiente y la temperatura de cada ensilaje se registraron cada 6 h mediante un registrador de datos. La temperatura ambiente de la estancia se midió usando una caja control vacía. Se examinó la estabilidad aerobia de los ensilajes calculando las diferencias entre la temperatura del ensilaje y la temperatura ambiente de la estancia. El deterioro aerobio se indicó por medio de los días (u horas) hasta el inicio de un aumento sostenido en la temperatura de más de 3°C por encima de la temperatura ambiente.

10

Tabla 4 - Métodos analíticos

Parámetros de calidad	Objeto	Descripción breve o fundamento del método, referencia
Materia seca (DM)	Pasto* Ensilaje**	Secado en estufa a 67°C durante 24 h, equilibrado hasta la humedad ambiente durante la noche, triturado a través de un tamiz de 1 mm y después secado a 105°C hasta alcanzar un peso constante.
Proteína bruta	* **	Kjeldahl-AOAC 984.13. Se usaron 10,5 g de catalizador. Con digestión en bloque y sistema Tecator Kjeltec 1002 unidad de destilación
Grasa bruta	* **	Extracción mediante el sistema Soxtec usando éter de petróleo 40-600C. El residuo de grasa bruto se determinó gravimétricamente después del secado.
Fibra bruta	* **	Con Fibercap (Foss Tecator) usando un tratamiento con ácido sulfúrico e hidróxido de Na
Fibra de detergente ácido (FDA)	* **	Técnica de la bolsa de filtro ANKOM A200 (FBT)
Fibra de detergente neutro (FDN)	* **	Técnica de bolsa de filtro A200 (FBT)
Carbohidratos solubles en agua (CSA)	* **	Usando el ensayo de reacción de antrona (MAFF, 1986), a partir de extractos de pasto o ensilaje procedentes del macerado de pasto o ensilaje fresco en agua.
Cenizas brutas	* **	Método AOAC 942.05. Ca - AOAC 968.08 cenizas seca, método espectrofotométrico de absorción atómica, P - método de molibdovanadofosfato espectrofotométrico
Capacidad tamponante	*	Según Playne y McDonald (1966), expresada como mequiv. de álcali necesarios para cambiar el pH de 4 a 6 por 100 g de materia seca.
Nitrato	*	Extractos de pasto obtenidos a partir la maceración de pasto fresco en agua analizados usando el electrodo selectivo de ion nitrato.
Ácido láctico	**	En un extracto acuoso procedente de ensilaje fresco según los métodos convencionales (Naumann y Bassler, 1997)
Ácido acético	**	
Ácido butírico	**	
Amoniaco N	**	Destilación - AOAC 941.04
pH después de 3, 90 y 97 días	**	Extractos de ensilaje obtenidos de la maceración de pasto fresco en agua, analizado usando ThermoOrion Posi-pHlo SympHony Electrode y el medidor Thermo Orion 410
pH antes de ensilaje	*	
Pérdida de peso (pérdidas de DM)	**	Calculada midiendo las diferencias en el peso de los silos antes y después del ensilaje

Levaduras y mohos	* **	LST ISO 21527-2:2008
Bacterias ácido lácticas	*	ISO 15214:1998
Clostridios***	*	ISO 7937:2004

\* Se recogieron cinco muestras de pasto inmediatamente después de pulverizar y en el momento de cargar los silos.

\*\* Se tomaron muestras de los ensilajes de cada silo en cada variante (incluyendo el control) después de 90 días de conservación.

\*\*\* Si aparecen más de 1500 cfu/g de clostridios en el forraje fresco, se realizan análisis del ensilaje para determinar la presencia de clostridios

Se determinaron las concentraciones de VFA y ácido láctico y alcoholes inferiores mediante una cromatografía de gas-líquido de extractos de ensilaje acuosos obtenidos macerando 30 g de ensilaje fresco en 150 ml de agua desionizada durante 16 horas a 40°C en un recipiente sellado, seguido de una filtración preliminar a través de un papel de filtro de 3 µm. Se añadió agua desionizada (3 ml) de una disolución de patrón interno (0,5 g de ácido 3-metil-n-valérico en 1000 ml de ácido oxálico 0,15 mol l-1) a 1 ml del filtrado anterior, y la disolución se filtró a través de una membrana de poliétersulfona de 0,45 µm hacia un vial de muestras cromatográfico para el análisis. El cromatógrafo de gas-líquido GC-2010 SHIMADZU emplea una columna capilar de orificio ancho (Stabilwax®-DA 30 m, 0,53 mm, DI, 0,5 µm) según los métodos oficiales de analizador de cromatografía de gases y bioquímica. Se determinó el amoníaco-nitrógeno (NH<sub>3</sub>N) mediante destilación - AOAC 941.04.

10 *Resultados de los minisilos 4 y 5*

Los resultados del minisilo 4 de maíz se muestran en la figura 5. Los tres ensilajes de maíz inoculados tenían un pH significativamente menor (P>0,05) comparados con el control después de 3 días de fermentación anaerobia. La composición 4 y la composición 7 tienen una pérdida de DM significativamente menor (%/kg), una fracción de N-NH<sub>3</sub> significativamente menor (P<0,05) (%/kg del N total) y una concentración de ácido láctico significativamente mayor (P<0,05) (%/kg de DM) comparadas con la composición 2 y el control. La inoculación del maíz con la composición 2 y la composición 4 produjo unas concentraciones significativamente mayores (P<0,05) de ácido acético (%/kg de DM) y ácido propiónico (%/kg de DM) comparadas con la composición 7 y el control. Todos los ensilajes de maíz inoculados tenían un recuento de levaduras y mohos menor (log CFU/g) comparados con el control.

20 Tal como puede observarse en la figura 7, la exposición aerobia de 10 días produjo un aumento de la temperatura mayor que 3°C por encima de la temperatura ambiente después de 66 horas para el ensilaje control no inoculado, mientras que la composición 7 aumentó a más de 3°C por encima de la temperatura ambiente después de 178 horas, que es un tiempo significativamente mayor (P<0,05) comparado con el control y un tiempo significativamente menor (P<0,05) comparado con las composiciones 2 y 4. Después de 240 horas de exposición aerobia, el pH del control era tan alto como 8,29, mientras que la composición 7 tenía un pH de 5,66, que es significativamente menor (P<0,05) comparado con el control.

Tabla 5 - Efecto de diversas composiciones sobre las variables de fermentación y la composición microbiana del maíz ensilado

	Control	Composición 2 (porcentaje)	Composición 4 (porcentaje)	Composición 7 (porcentaje)
<i>L. buchneri</i> DSM 22501		100	50	50
<i>L. lactis</i> DSM 11037			50	
<i>E. faecium</i> DSM 22502				30
<i>L. plantarum</i> DSM 16568				20
Mediciones después de 3 días de fermentación anaerobia				
pH después de 3 días	4,36 <sup>a</sup>	4,18 <sup>b</sup>	4,17 <sup>b</sup>	4,14 <sup>c</sup>
Mediciones después de 90 días de fermentación anaerobia				
pH después de 90 días	4,04 <sup>a</sup>	3,91 <sup>b</sup>	3,92 <sup>b</sup>	3,90 <sup>b</sup>
DM, %/kg desensilado†	36,69 <sup>a</sup>	37,52 <sup>b</sup>	37,62 <sup>b</sup>	37,77 <sup>b</sup>

Pérdida de DM, %/kg	6,74 <sup>a</sup>	4,42 <sup>b</sup>	3,90 <sup>c</sup>	3,43 <sup>c</sup>
Fracción de N-NH <sub>3</sub> , %/kg N total	5,18 <sup>a</sup>	4,38 <sup>b</sup>	3,92 <sup>c</sup>	3,83 <sup>c</sup>
Ácido láctico, %/kg	2,78 <sup>a</sup>	3,01 <sup>a</sup>	3,47 <sup>c</sup>	4,06 <sup>b</sup>
Ácido acético, %/kg	1,11 <sup>c</sup>	2,83 <sup>a</sup>	2,68 <sup>a</sup>	1,72 <sup>c</sup>
Ácido butírico, %/kg	0,034 <sup>a</sup>	0,008 <sup>b</sup>	0,006 <sup>b</sup>	0,004 <sup>b</sup>
Ácido propiónico, %/kg	0,012 <sup>b</sup>	0,028 <sup>a</sup>	0,026 <sup>a</sup>	0,012 <sup>b</sup>
Alcoholes, %/kg de DM	1,00 <sup>a</sup>	0,62 <sup>b</sup>	0,50 <sup>c</sup>	0,49 <sup>c</sup>
Levaduras (log CFU/g)	3,93 <sup>a</sup>	1,04 <sup>b</sup>	1,26 <sup>c</sup>	1,56 <sup>c</sup>
Mohos (log CFU/g)	3,00 <sup>a</sup>	1,0 <sup>b</sup>	1,16 <sup>b</sup>	1,25 <sup>c</sup>
Mediciones después de 10 días de exposición aerobia				
pH después del ensayo de estabilidad aerobia	8,29 <sup>a</sup>	4,44 <sup>b</sup>	4,39 <sup>b</sup>	5,66 <sup>c</sup>
Estabilidad aerobia, horas	66,0 <sup>b</sup>	240,0 <sup>a</sup>	240,0 <sup>a</sup>	177,6 <sup>c</sup>

Las diferentes letras en una fila muestran la diferencia estadísticamente significativa (P<0,05).

No se produjo efluyente en los silos tras su apertura.

† Materia seca corregida para los volátiles.

- 5 Los resultados del minisilo 5 cuando se emplea una mezcla de pasto/trébol se muestran en la tabla 6. Los tres ensilajes de pasto/trébol inoculados tienen un pH significativamente menor (P>0,05) comparados con el control después de 3 días de fermentación anaerobia. La composición 4 y la composición 7 presentan una pérdida de DM significativamente menor (P<0,05) (%/kg). Mientras que todos los ensilajes de pasto/trébol inoculados presentaban una fracción de N-NH<sub>3</sub> significativamente menor (P<0,05) (%/kg del N total) comparados con el control, y una concentración de ácido láctico significativamente mayor (P<0,05) (%/kg de DM) que el control, la inoculación del maíz con la composición 4 produjo una concentración de ácido acético significativamente mayor (P<0,05) (%/kg de DM) comparada con la composición 7 y el control. Todos los ensilajes de pasto/trébol inoculados tenían un recuento de levaduras y mohos menor (log CFU/g) comparados con el control.
- 10 Tal como puede observarse en la figura 8, la exposición aerobia de 10 días produjo un aumento de la temperatura del ensilaje control no inoculado hasta más de 3°C por encima de la temperatura ambiente después de 91 horas, mientras que la composición 7 aumentó a más de 3°C por encima de la temperatura ambiente después de 169 horas. La composición 4 aumentó a más de 3°C después de 191 horas, y la composición 2 alcanzó el mismo incremento después de 214 horas. Después de 240 horas de exposición aerobia, el pH del control era tan alto como 7,93, mientras que el pH de la composición 7 era de 5,41, el pH de la composición 4 era de 5,35, y el pH de la composición 2 era el más bajo, de 4,93.
- 15

Tabla 6 - Efecto de diversas composiciones sobre las variables de fermentación y la composición microbiana de trébol rojo:heno Timothy:festuca ensilado

Tratamiento	Control	Composición 2 (porcentaje)	Composición 4 (porcentaje)	Composición 7 (porcentaje)
<i>L. buchneri</i> DSM 22051		100	50	50
<i>L. lactis</i> DSM 11037			50	
<i>E. faecium</i> DSM 22502				30
<i>L. plantarum</i> DSM 16568				20
Mediciones después de 3 días de fermentación anaerobia				
pH después de 3 días	4,75 <sup>a</sup>	4,39 <sup>b</sup>	4,40 <sup>b</sup>	4,34 <sup>c</sup>
Mediciones después de 90 días de fermentación anaerobia				
pH después de 90 días	4,38 <sup>a</sup>	4,20 <sup>b</sup>	4,17 <sup>b</sup>	4,12 <sup>c</sup>

ES 2 765 409 T3

DM, %/kg desensilado†	30,49 <sup>a</sup>	31,19 <sup>b</sup>	31,45 <sup>b</sup>	31,64 <sup>c</sup>
Pérdida de DM, %/kg	7,90 <sup>a</sup>	6,20 <sup>b</sup>	4,94 <sup>c</sup>	4,23 <sup>c</sup>
Fracción de N-NH <sub>3</sub> , %/kg N total	5,38 <sup>a</sup>	4,05 <sup>b</sup>	3,79 <sup>b</sup>	3,57 <sup>c</sup>
Ácido láctico, %/kg	4,55 <sup>a</sup>	6,28 <sup>c</sup>	5,34 <sup>b</sup>	5,89 <sup>c</sup>
Ácido acético, %/kg	2,42 <sup>a</sup>	2,38 <sup>b</sup>	3,59 <sup>b</sup>	2,01 <sup>c</sup>
Ácido butírico, %/kg	0,24 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>
Ácido propiónico, %/kg	0,02 <sup>a</sup>	0,02 <sup>c</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>
Alcoholes, %/kg de DM	0,94 <sup>a</sup>	0,71 <sup>c</sup>	0,82 <sup>b</sup>	0,69 <sup>c</sup>
Levaduras (log CFU/g)	3,21 <sup>a</sup>	1,00 <sup>b</sup>	1,16 <sup>b</sup>	1,65 <sup>c</sup>
Mohos (log CFU/g)	3,03 <sup>a</sup>	1,00 <sup>b</sup>	1,32 <sup>c</sup>	1,34 <sup>c</sup>
Mediciones después de 10 días de exposición aerobia				
pH después del ensayo de estabilidad aerobia	7,93 <sup>a</sup>	4,93 <sup>b</sup>	5,35 <sup>c</sup>	5,41 <sup>c</sup>
Estabilidad aerobia, horas	91,20 <sup>a</sup>	213,60 <sup>b</sup>	190,8 <sup>c</sup>	169,20 <sup>c</sup>

Las diferentes letras en una fila muestran la diferencia estadísticamente significativa (P<0,05).

No se produjo efluente en los silos tras su apertura.

† Materia seca corregida para los volátiles.

*Minosilo 6a - Recolección de maíz en 2014, EE. UU.*

Para el minisilo 6a, el maíz se recolectó en Delaware, EE. UU., con aproximadamente 35% de contenido en DM en la planta completa. Las composiciones 4 y 7 se disolvieron en agua desionizada y se aplicaron a cinco pilas de 20 kg de forraje de maíz recién troceado por tratamiento para obtener duplicados verdaderos. El forraje de cada pila se ensiló en silos de cubeta de 7,6 l y se selló con tapas de plástico con juntas tóricas.

Se prepararon un total de 5 muestras en el día 0 (material fresco) y 5 cubetas por tratamiento para cada intervalo de fermentación (días 2, 7 y 14). Las cubetas se cargaron con aproximadamente 6 kg de forraje fresco para lograr una densidad de carga final de entre 0,208-0,266 kg de DM/l. Las cubetas se conservaron a 22 ± 1°C y se abrieron después de 2, 7 y 14 días de ensilaje.

Para la determinación de la estabilidad aerobia, se introdujeron 2 kg de una muestra representativa de cada silo en una cubeta limpia (sin cargar) y se colocó un registrador de datos en el centro geométrico de la masa de forraje. Los registradores se ajustaron para que registraran la temperatura cada 10 minutos y se promediaron por hora. Las cubetas se cubrieron con estopilla por la parte superior para evitar un secado excesivo y se dejaron en incubación en una estancia a 22 ± 1°C. La temperatura ambiente en la estancia se midió y se registró simultáneamente. La estabilidad aerobia se define como la cantidad de tiempo antes de que la masa de ensilaje aumente 3°C por encima de una línea de base estable tras la exposición al aire.

*Resultados del minisilo 6a*

Los resultados para el minisilo 6a se muestran en las figuras 10 y 11 y en la tabla 7a.

Tabla 7a - Efecto de diversas composiciones sobre el pH y el recuento de levaduras en el momento de la apertura después de diversos periodos de fermentación y sobre la estabilidad aerobia a lo largo de un periodo de 7 días de exposición aerobia

Día 0	Control	Composición 4	Composición 7
pH	5,75	5,73	5,80
En el momento de la apertura después de 2 días de fermentación			
pH	3,92	3,91	3,90

ES 2 765 409 T3

Levaduras, cfu/g	524.807	467.735	891.251
En el momento de la apertura después de 7 días de fermentación			
pH	3,62	3,91	3,90
Levaduras, cfu/g	144.543	186.208	151.356
Después de 7 días de fermentación y 7 días de exposición aerobia			
Estabilidad aerobia, h	41	44	41
En el momento de la apertura después de 14 días de fermentación			
pH	3,63	3,61	3,63
Levaduras, cfu/g	6.918	1.445	1.819
Después de 14 días de fermentación y 7 días de exposición aerobia			
Estabilidad aerobia, h	57	66	63

*Minosilo 6b - Recolección de maíz en 2014, Lituania*

Para el minisilo 6b, el maíz se recolectó en Lituania, con aproximadamente 35% de contenido en DM en la planta completa. La composición 4 se disolvió en agua desionizada y se aplicó a 150.000 cfu/g de forraje a una pila de forraje de maíz recién troceado para obtener duplicados verdaderos. El forraje de esta pila, así como una pila de control sin tratar, se ensiló en tarros de cristal de 3 l sellados con juntas tóricas.

5 Se prepararon un total de 5 muestras en el día 0 (material fresco) y 5 tarros de cristal por tratamiento para cada intervalo de fermentación (días 2, 4 y 8). Los tarros se cargaron con aproximadamente 1 kg de forraje fresco para lograr una densidad de carga final de entre 0,208-0,266 kg de DM/l. Los tarros de cristal se conservaron a (20 ± 1°C) y se abrieron después de 2, 4 y 8 días de fermentación anaerobia.

10 Estabilidad aerobia:

Se determinó la estabilidad aerobia controlando el aumento de temperatura en los ensilajes conservados en tubos de PVC aislados (1300 ml) a 20 ± 1°C de temperatura ambiente (temperatura ambiente de la estancia documentada durante el experimento) (figura 9a).

15 El deterioro aerobio se indicó por medio de las horas hasta que la temperatura del ensilaje alcanzó 3°C por encima de la temperatura ambiente (tabla 7b y figura 9b).

*Resultados del minisilo 6b*

Tabla 7b - Efecto de la composición 4 sobre la estabilidad aerobia

	Control	Composición 4
2 días de fermentación anaerobia y 7 días de exposición aerobia		
Estabilidad aerobia, h	30	48
4 días de fermentación anaerobia y 7 días de exposición aerobia		
Estabilidad aerobia, h	40	50
8 días de fermentación anaerobia y 7 días de exposición aerobia		
Estabilidad aerobia, h	68	97

20 El aumento del tiempo de la fermentación anaerobia aumentó la estabilidad del ensilaje control y del ensilaje de maíz inoculado con la composición 4. Sin embargo, merece la pena advertir que la inoculación con la composición 4 fue capaz de mantener el ensilaje de maíz estable durante 18 horas más que el control después de tan solo dos días de fermentación anaerobia, y que la diferencia entre el control y la composición 4 sigue siendo considerable (10 y 29 horas, respectivamente) cuando se fermenta durante 4 días o 8 días antes de la exposición aerobia.

*Minosilos 7a, 7b y 7c - Recolección de maíz en 2014, Dinamarca*

Para el minisilo 7a, se recogió maíz recién recolectado (28,6% de DM) de una granja en el norte de Zelanda, Dinamarca, y se transportó inmediatamente al laboratorio. El maíz se usó para ensayar el efecto de la composición 4 frente al control empleando tarros de vidrio de 1,8 l con purgadores de liberación de gases automáticos (www.ANKOM.com). Los tarros de vidrio se rellenaron con un promedio de 746 g de maíz recién recolectado que se inoculó con 150.000 CFU/g de la composición 4 (n = 5) o se inoculó con la misma cantidad de agua del grifo (n = 5) como control. Los tarros se mantuvieron a una temperatura ambiente de aproximadamente 21°C. La producción de gas se midió en intervalos de 10 minutos automáticamente, y el gas también se liberó automáticamente cuando se alcanzaba 10,34 kPa (1,5 psi). El gas acumulado se convirtió en ml por g de forraje fresco (Volumen = P (presión en psi) x C (volumen del tarro)/promedio de presión atmosférica registrada de 0 a 162 horas x muestra total del pienso (peso fresco)). La producción de gas se midió durante 162 horas (figura 12), y la diferencia entre el control y el maíz tratado con la composición 4 se muestra en la figura 13.

Para el minisilo 7b, se usó 1 kg del mismo maíz que en el minisilo 7a el mismo día y se envasó al vacío retirando 90% del aire y se selló. Se usaron cinco bolsas por tratamiento sin inoculación (barra blanca), con la composición 4 (150.000 CFU/g de maíz, barra gris) o con la composición 7 (150.000 CFU/g de maíz, barra punteada). Después de 162 horas, las bolsas se abrieron, se liberó el gas y se midió la pérdida de peso (figura 14).

Para el minisilo c, se usó el mismo maíz que en el minisilo 7a después de conservarse en la nevera a -18°C. Tras esto, el forraje se descongeló, y se envasaron al vacío muestras de 1 kg retirando 90% del aire y se sellaron. Las bolsas envasadas al vacío de forraje sin inóculo o con la composición 4 (150.000 CFU/g de maíz) se dejaron en el exterior a temperatura ambiente para imitar las "condiciones verdaderas del exterior" y para averiguar la producción de gas después de 6 días de fermentación (figura 15).

#### Resultados de los minisilos 7a, 7b y 7c

Una producción muy temprana (primeras 48 horas) de gas en el ensilaje se asocia con microorganismos aerobios epifíticos de la familia *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, etc.). La producción de gas está relacionada con la pérdida de nutrientes del ensilaje. La inoculación del maíz con la composición 4 dio como resultado una menor producción de gas, comparado con el maíz no inoculado (figura 12). La diferencia en la producción de gas aumentó desde 10 horas a 116 horas, cuando alcanzó un máximo con una diferencia de 0,17 ml de gas por g de maíz (figura 13).

En el maíz envasado al vacío, la pérdida de nutrientes puede evaluarse pesando las bolsas. La composición 4 tiene una pérdida de peso menor comparado con el control, pero también comparado con la composición 7 (figura 14).

En condiciones reales, muchos agricultores indican que sus búnkeres de ensilaje tienden a "inflarse" después del sellado. Tal como se ilustra en la figura 15, la diferencia en la emisión de gas entre el maíz no inoculado (a la izquierda) e inoculado con la composición 4 (a la derecha) puede detectarse fácilmente de modo visual.

#### Análisis

Se sabe que el ácido acético producido por *L. buchneri* es un ácido importante para combatir el crecimiento de cepas de descomposición aerobias en el momento de usar el ensilaje, cuando el ensilaje se expone al oxígeno. Sin embargo, el crecimiento de *L. buchneri* tiene un tiempo de retraso largo, y la reducción en el pH por la utilización de *L. buchneri* es muy lenta. Para solucionarlo, se ha combinado *L. buchneri* con una especie bacteriana productora de una elevada cantidad de ácido láctico, tal como *L. plantarum*. Sin embargo, la combinación de cepas productoras de una elevada cantidad de ácido láctico puede contrarrestar la eficacia de *L. buchneri* sobre la estabilidad aerobia. Este fenómeno aparece en el minisilo 2, en el que la composición 5, que contiene 70% de *L. buchneri* DSM 22501 y 10% de *L. plantarum* DSM 16568, 20% de *L. lactis* DSM 11037, produce un ensilaje mucho menos estable comparado con la composición 4, que contiene solo una cepa productora de una baja cantidad de ácido láctico (50% de *L. lactis* DSM 11037) combinada con *L. buchneri* DSM 22501 (50%) (figura 4).

La composición 4 logra un nivel de pH rápido y alto comparado con otras combinaciones con especies productoras de una elevada cantidad de ácido láctico. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que, en la composición 4, *L. buchneri* DSM 22501 sigue siendo capaz de crecer y/o ser metabólicamente activo, tal como indica el elevado nivel de ácido acético (figura 1c). La elevada proporción de ácido acético/ácido láctico de la composición 4 también puede observarse en el minisilo 1 (figura 3). Además, la elevada proporción de ácido acético/ácido láctico en una etapa temprana de la fermentación anaerobia aparentemente tiene un efecto positivo sobre la estabilidad aerobia en el minisilo 3, que se abrió después de tan solo un periodo corto (2 semanas) de fermentación anaerobia.

Estos resultados también demuestran que la pérdida de DM, un importante parámetro de la calidad del forraje, fue tan baja para la composición 4 como para los productos que contienen cepas productoras de una elevada cantidad de ácido láctico (véanse el minisilo 4 y el minisilo 5), mientras que la composición 4 también logró una elevada producción de ácido acético. El elevado nivel de ácido acético produce un ensilaje muy estable (figuras 4, 5, 6 y 7) que, en los tres casos con los minisilos (ejemplo 2), fue superior comparado con las otras composiciones con *L. buchneri* DSM 22501 (composiciones 5 y 7), en las que se incluyó *L. plantarum* DSM 16568, una cepa productora de una elevada cantidad de ácido láctico.



Tal como se muestra en la figura 9a, la composición 4 aumentó la estabilidad aerobia comparada con el control no tratado tras un corto periodo de fermentación de 7 días o 14 días. Además, y de modo muy sorprendente, la composición 4 también mostró una estabilidad aerobia mejor que la del control positivo (composición 7) en ambos momentos.

5 Tal como se ilustra en la figura 9b, la composición 4 aumentó la estabilidad aerobia comparada con el control no tratado después de 8 días de fermentación, seguidos de 7 días de exposición aerobia. Además, y de modo muy sorprendente, la composición 4 aumentó la estabilidad aerobia comparada con el control no tratado incluso tras un periodo de fermentación muy corto de tan solo 2 días o 4 días.

10 Tal como se ilustra en la figura 10, se observó un patrón de reducción en los recuentos de levaduras en general reconocido como función de un mayor tiempo de fermentación. Sin embargo, de modo sorprendente, la reducción en los recuentos de levaduras fue mayor usando la composición 4, frente al control negativo y positivo (composición 7) después de 2 y de 14 días de fermentación.

15 De modo sorprendente, tal como se ilustra en la figura 11, el nivel de pH cuando se emplea la composición 4 se redujo al mismo nivel que el control positivo (composición 7), a pesar de la falta de *Lactobacillus plantarum* en la composición 4.

Por tanto, estos experimentos demuestran que el inóculo de ensilaje que consiste fundamentalmente en la cepa heterofermentadora facultativa *L. buchneri* y solo cepas homofermentadoras logra una buena calidad del forraje con una mejor estabilidad aerobia incluso en ensilajes abiertos después de tan solo un corto periodo de fermentación anaerobia.

## 20 Referencias

Jatkauskas, J. y V. Vrotniakiene, "Evaluation of fermentation parameters, microbiological composition and aerobic stability of grass and whole crop maize silages treated with microbial inoculants", *Zemdirbyste-Agriculture.*, 2013, vol. 100, n.º 2, págs. 143-150.

25 Jatkauskas, J. *et al.* (2013), The effects of three silage inoculants on aerobic stability in grass, clover-grass, lucerne and maize silages, *Agricultural and Food Science*, 2013, 22, 137-144,

Vandamme, B. *et al.*, Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics, *Microbiological Reviews*, 1996, vol. 60, n.º 2, 407-438.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un inóculo de ensilaje que, como componentes activos, solo comprende
- (a) bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligatorias de al menos una de las especies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, y *Lactobacillus reuteri*;
- 5 y
- (b) bacterias ácido lácticas homofermentadoras de al menos una de las especies *Enterococcus* y *Lactococcus* que no reducen el crecimiento de (a) y que reducen el pH con rapidez sin producir una cantidad excesiva de ácido láctico.
- 10 2.- El inóculo de ensilaje según la reivindicación 1, que consiste fundamentalmente en un *Lactobacillus brevis* y un *Enterococcus*.
- 3.- El inóculo de ensilaje según la reivindicación 1, que consiste fundamentalmente en un *Lactobacillus brevis* y un *Lactococcus*.
- 4.- El inóculo de ensilaje según la reivindicación 1, que consiste fundamentalmente en un *Lactobacillus fermentum* y un *Enterococcus*.
- 15 5.- El inóculo de ensilaje según la reivindicación 1, que consiste fundamentalmente en un *Lactobacillus fermentum* y un *Lactococcus*.
- 6.- El inóculo de ensilaje según la reivindicación 1, que consiste fundamentalmente en un *Lactobacillus reuteri* y un *Enterococcus*.
- 20 7.- El inóculo de ensilaje según la reivindicación 1, que consiste fundamentalmente en un *Lactobacillus reuteri* y un *Lactococcus*.
- 8.- Un método para producir un producto de pienso fermentado, comprendiendo dicho método inocular un material vegetal con el inóculo de ensilaje según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 9.- Un método según la reivindicación 8, en el que el material vegetal se inocula con el inóculo de ensilaje y se incuba durante un periodo de hasta 7 días.
- 25 10.- Un método según la reivindicación 8, en el que el material vegetal se inocula con el inóculo de ensilaje y se incuba durante un periodo de hasta 14 días.
- 11.- Un método según la reivindicación 8, en el que el material vegetal se inocula con el inóculo de ensilaje y se incuba durante un periodo de hasta 28 días.
- 30 12.- Un método según la reivindicación 8, en el que el material vegetal se inocula con el inóculo de ensilaje y se incuba durante un periodo de hasta 90 días.

Figura 1a

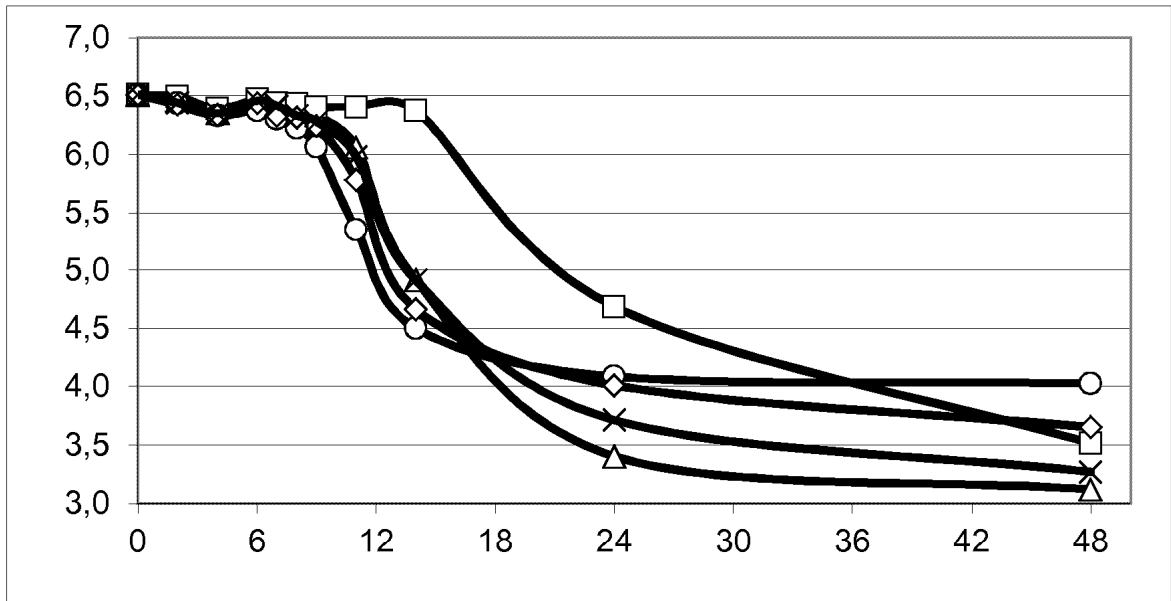


Figura 1b

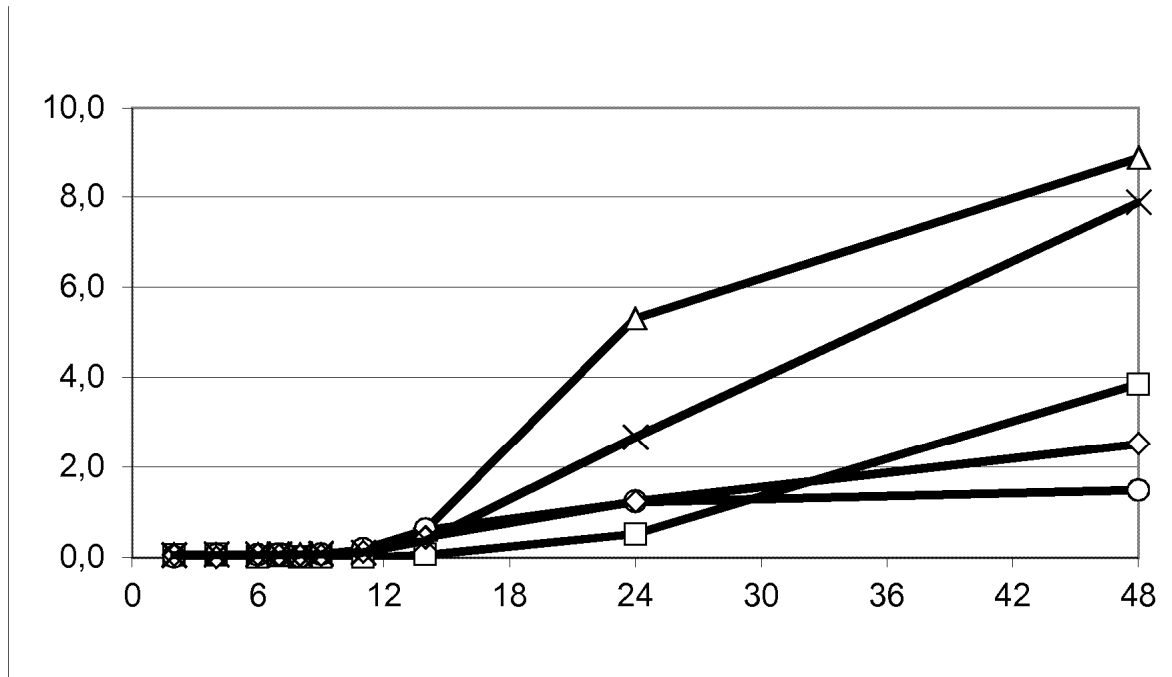


Figura 1c

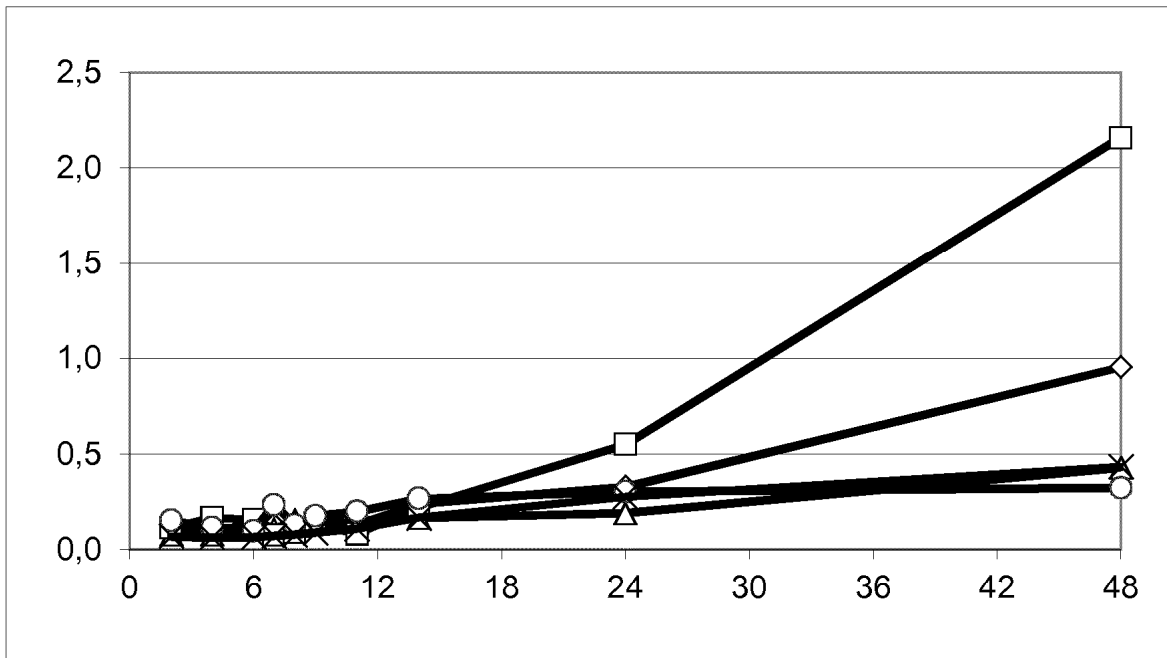


Figura 2

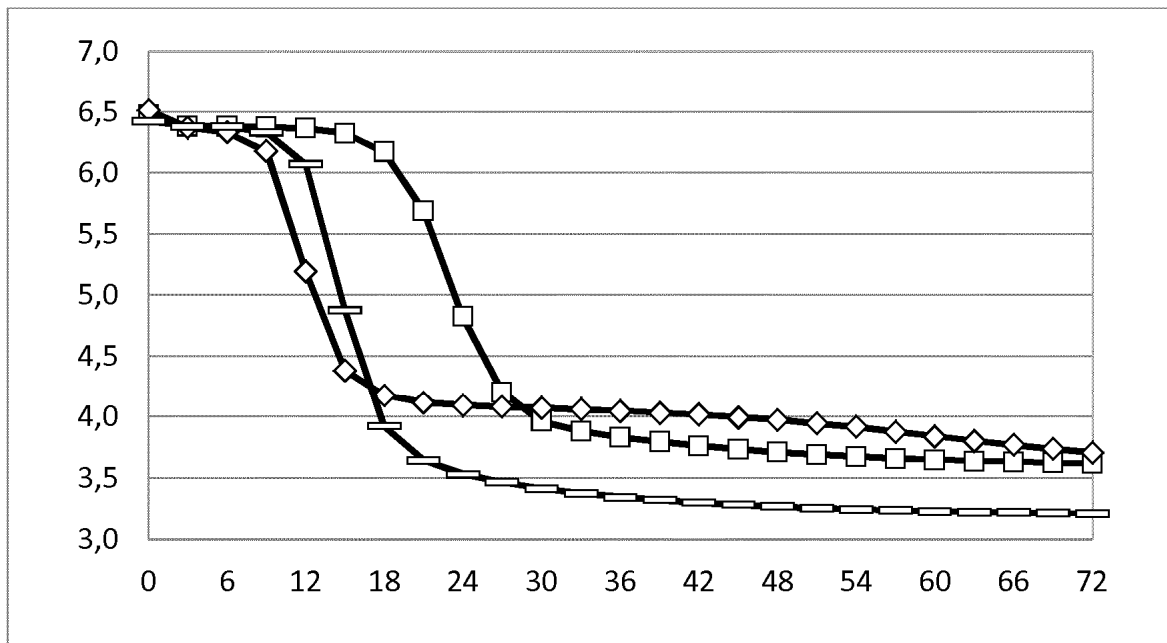


Figura 3

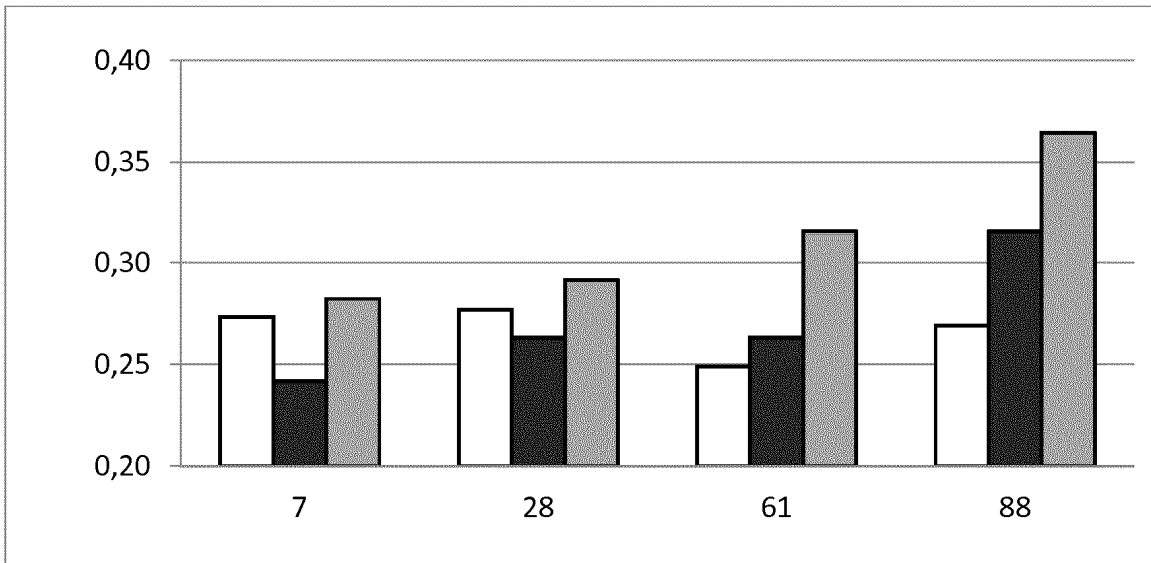


Figura 4

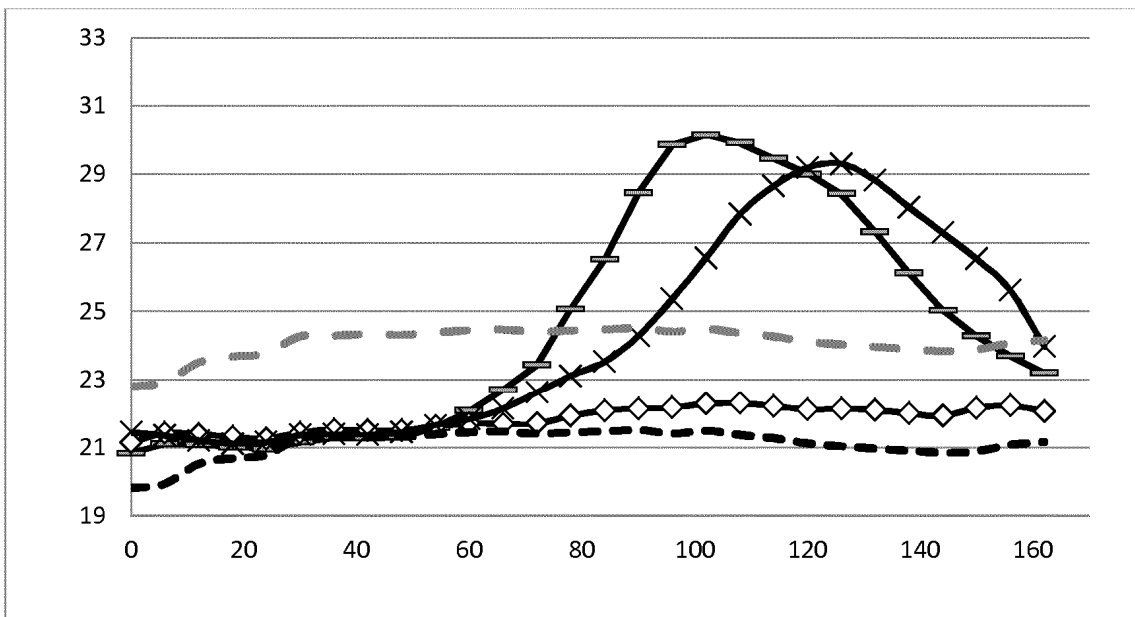


Figura 5

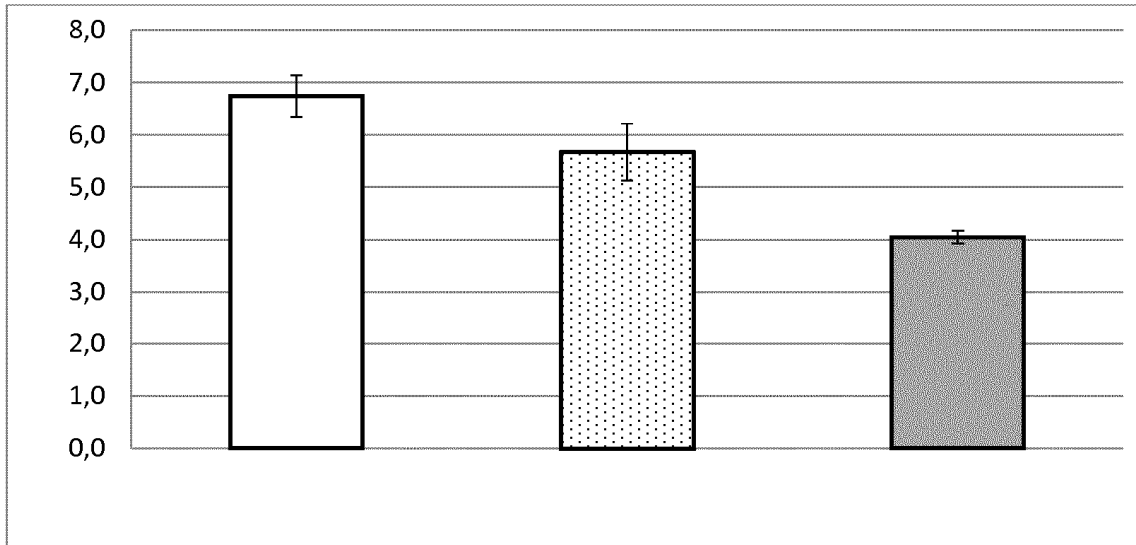


Figura 6

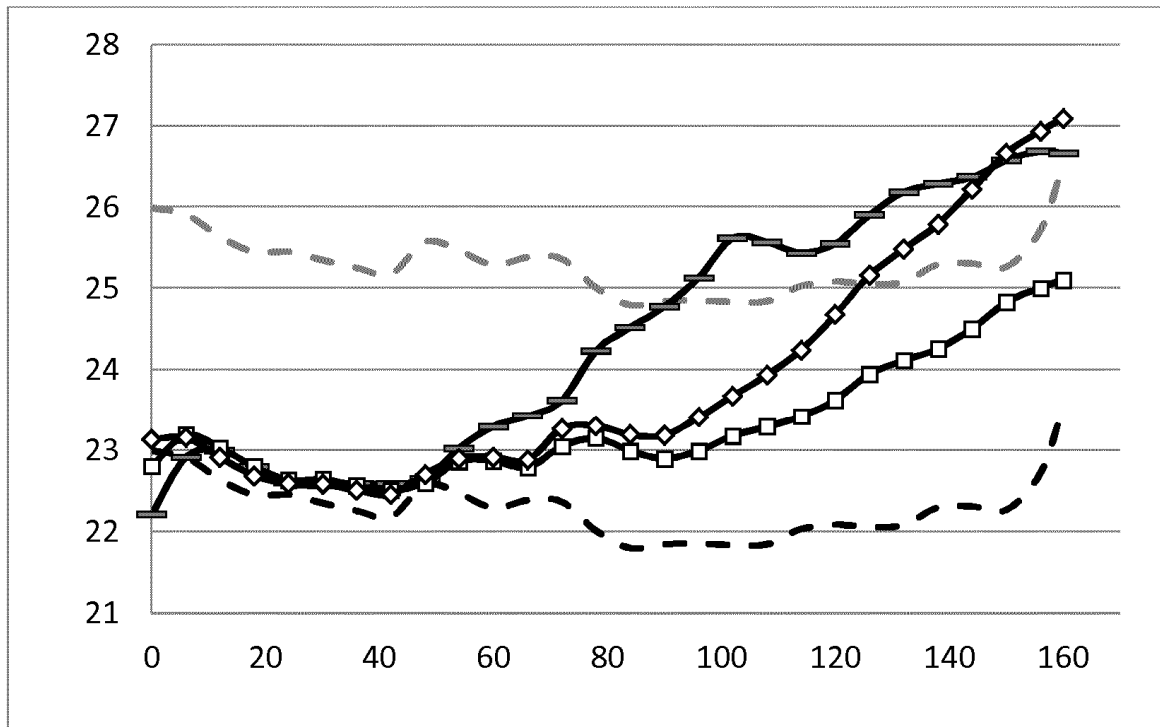


Figura 7

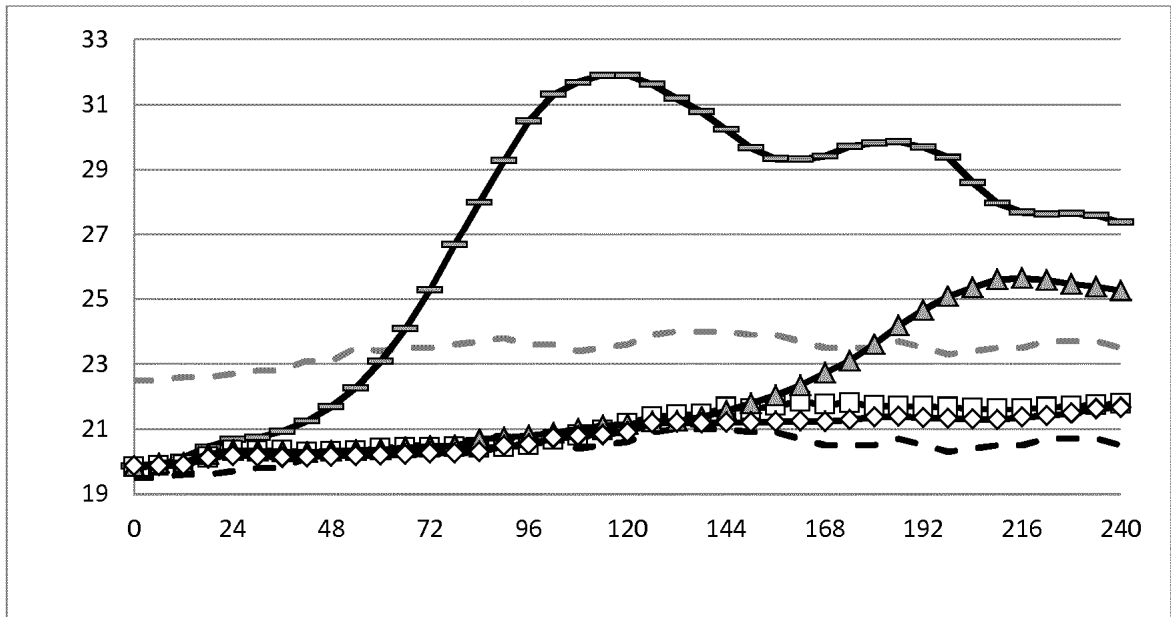


Figura 8

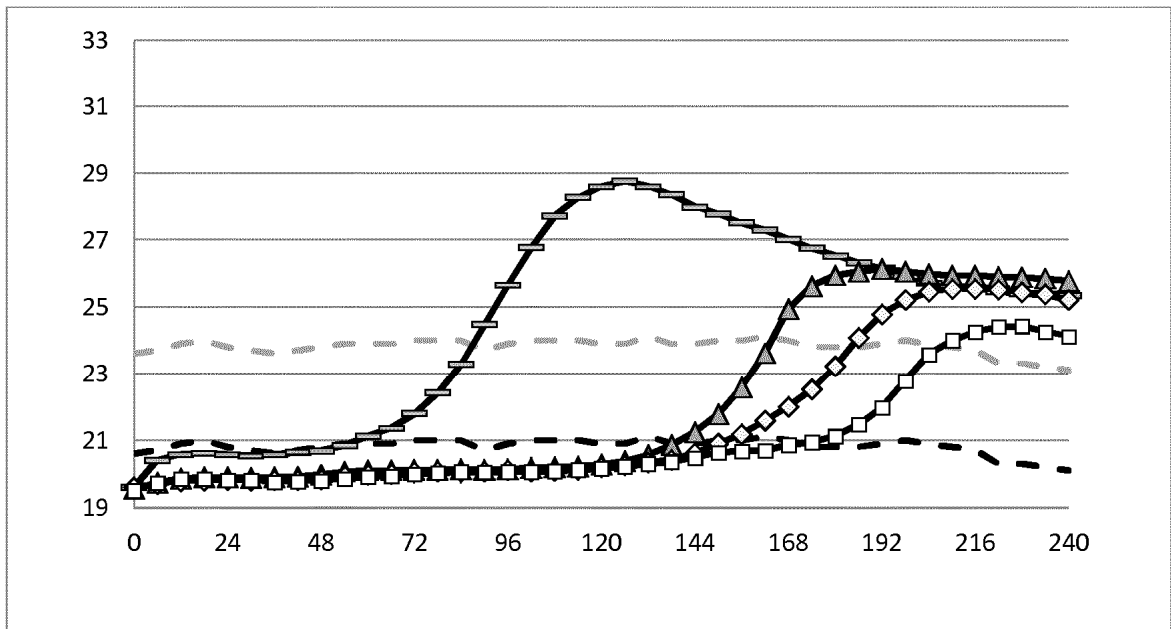


Figura 9a

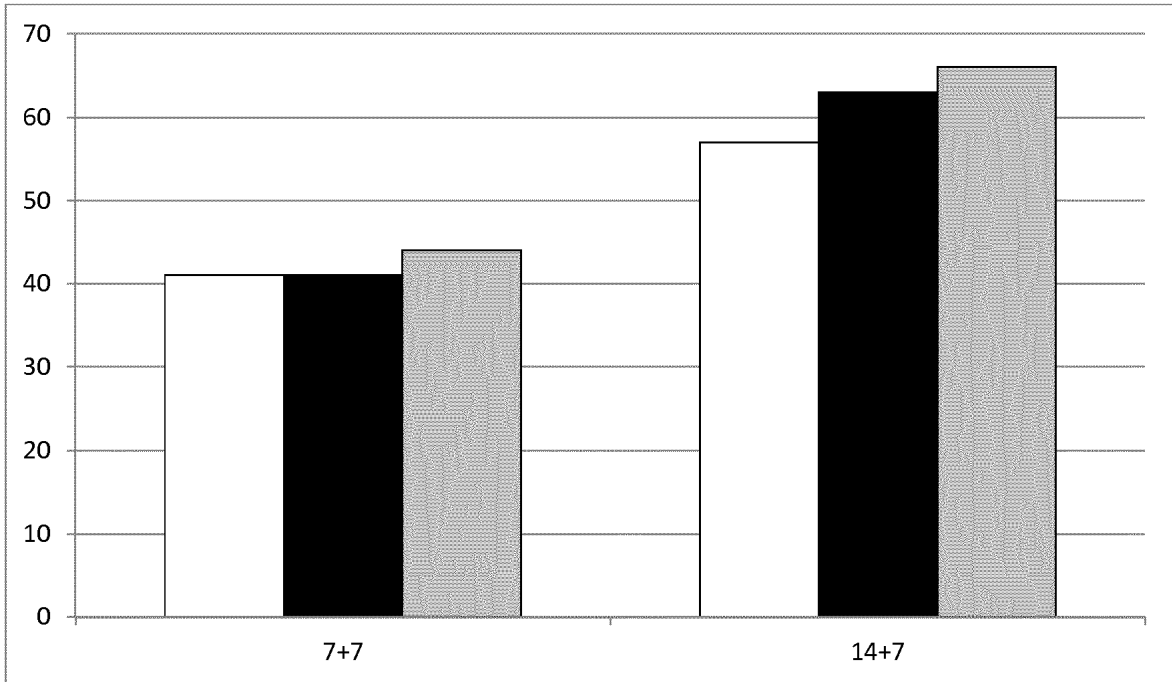


Figura 9b

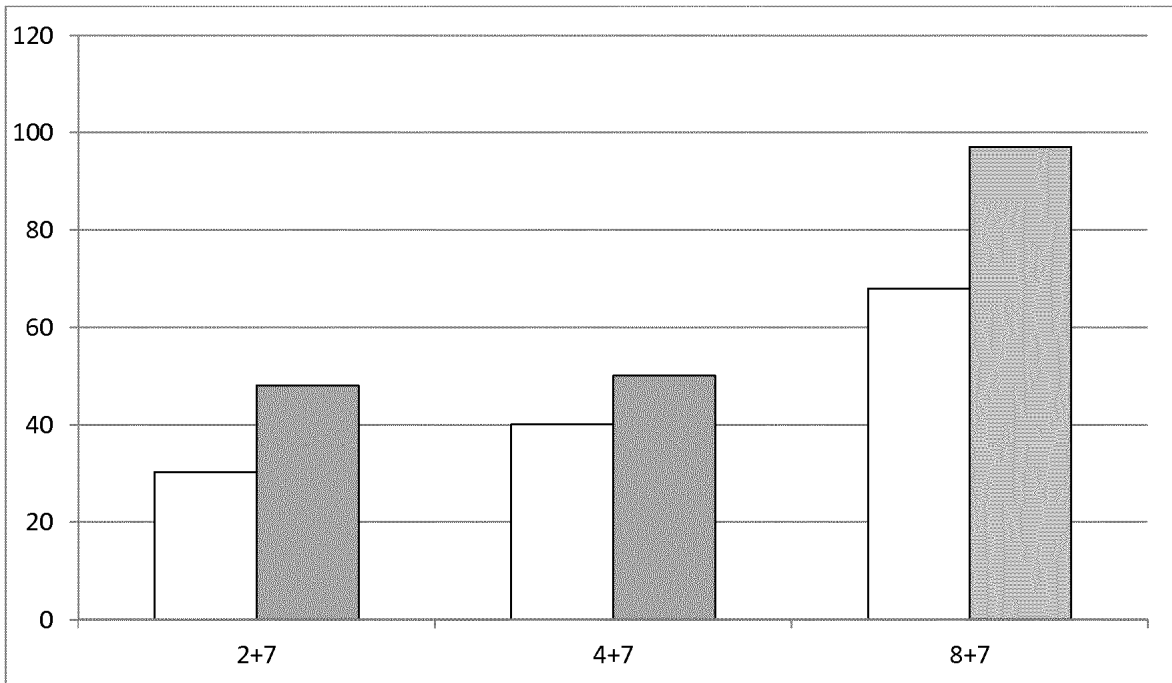




Figura 10

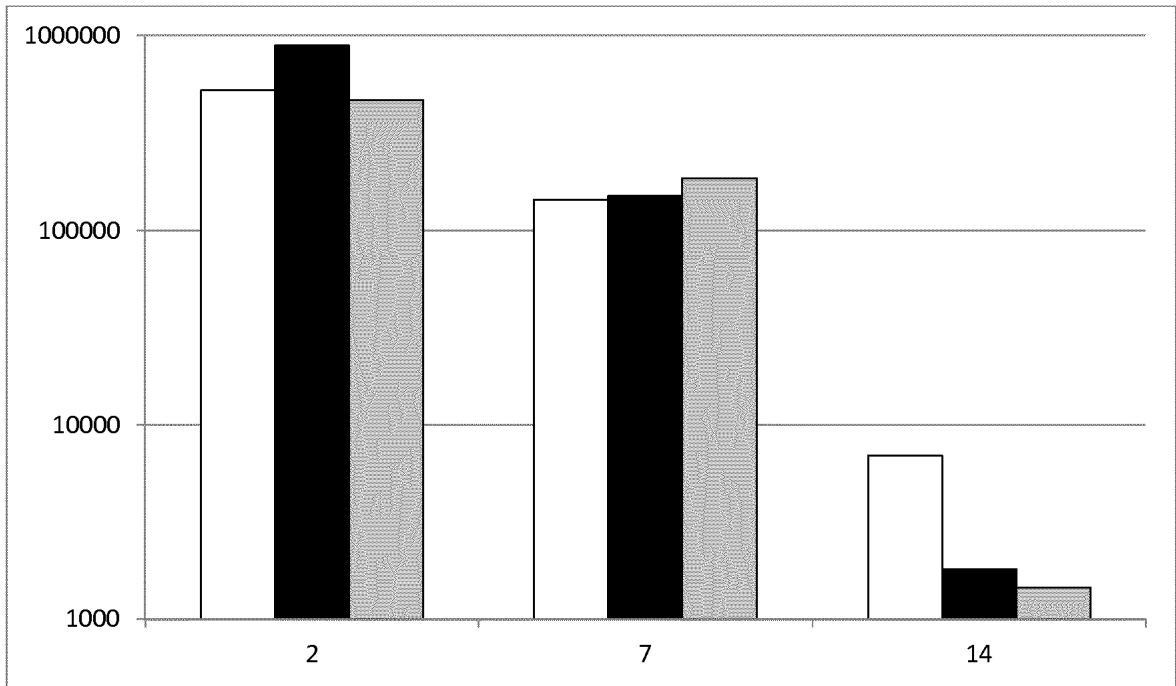


Figura 11

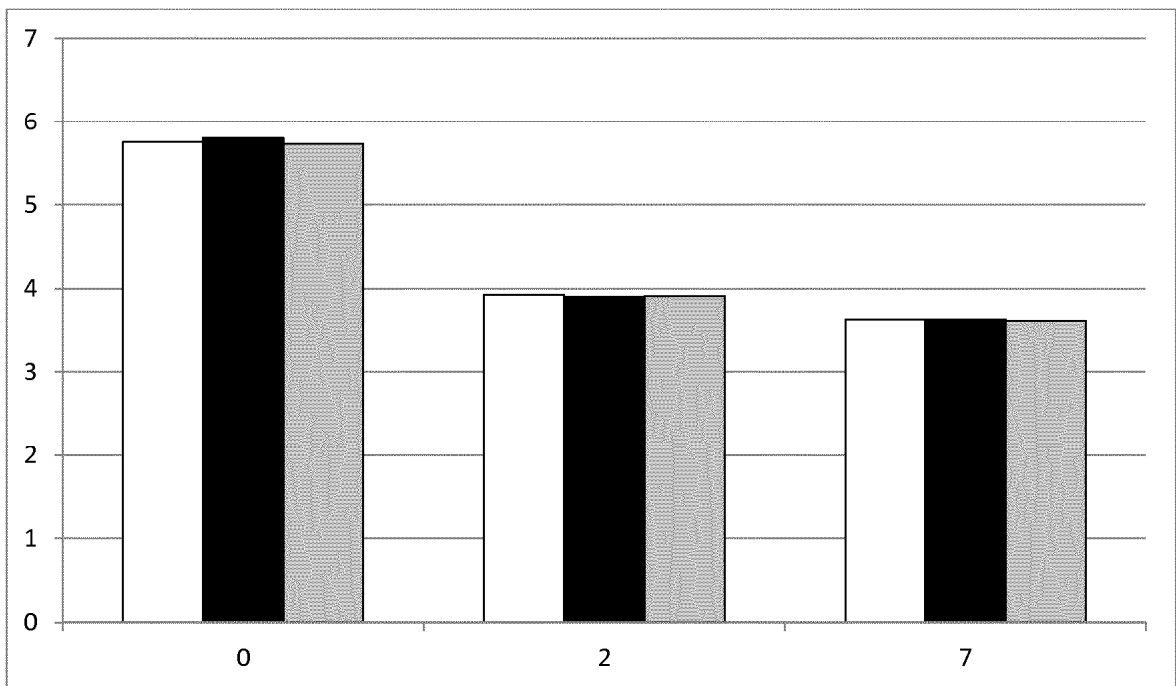


Figura 12

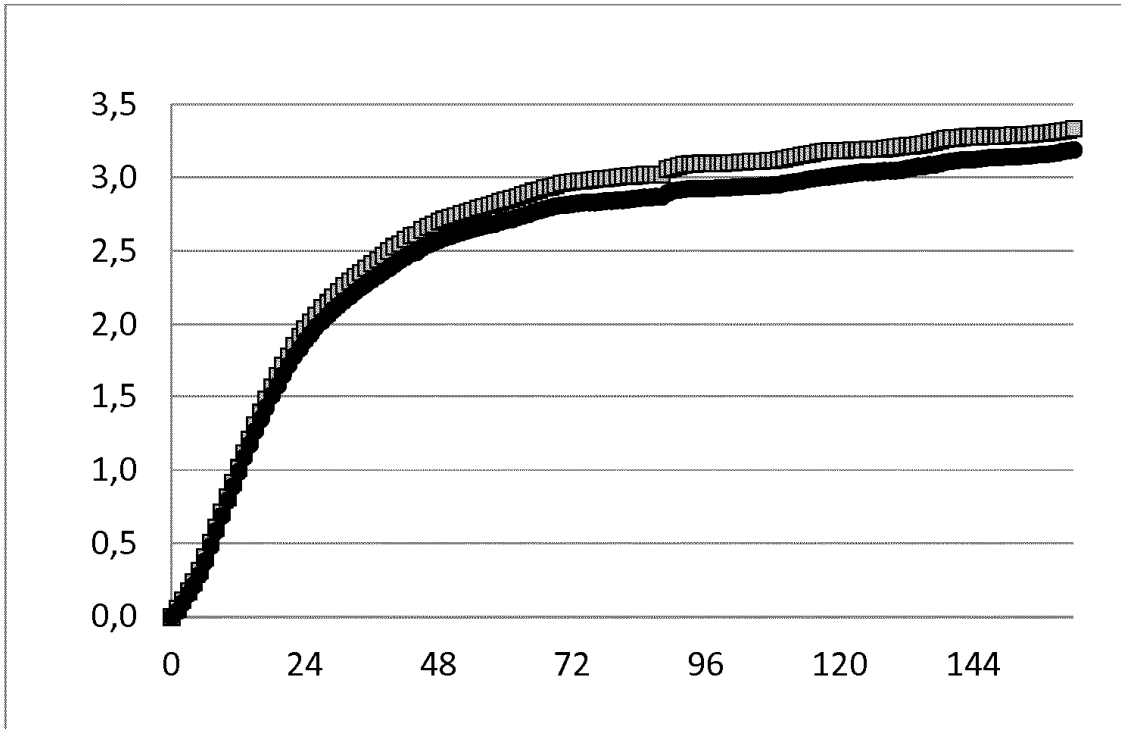


Figura 13

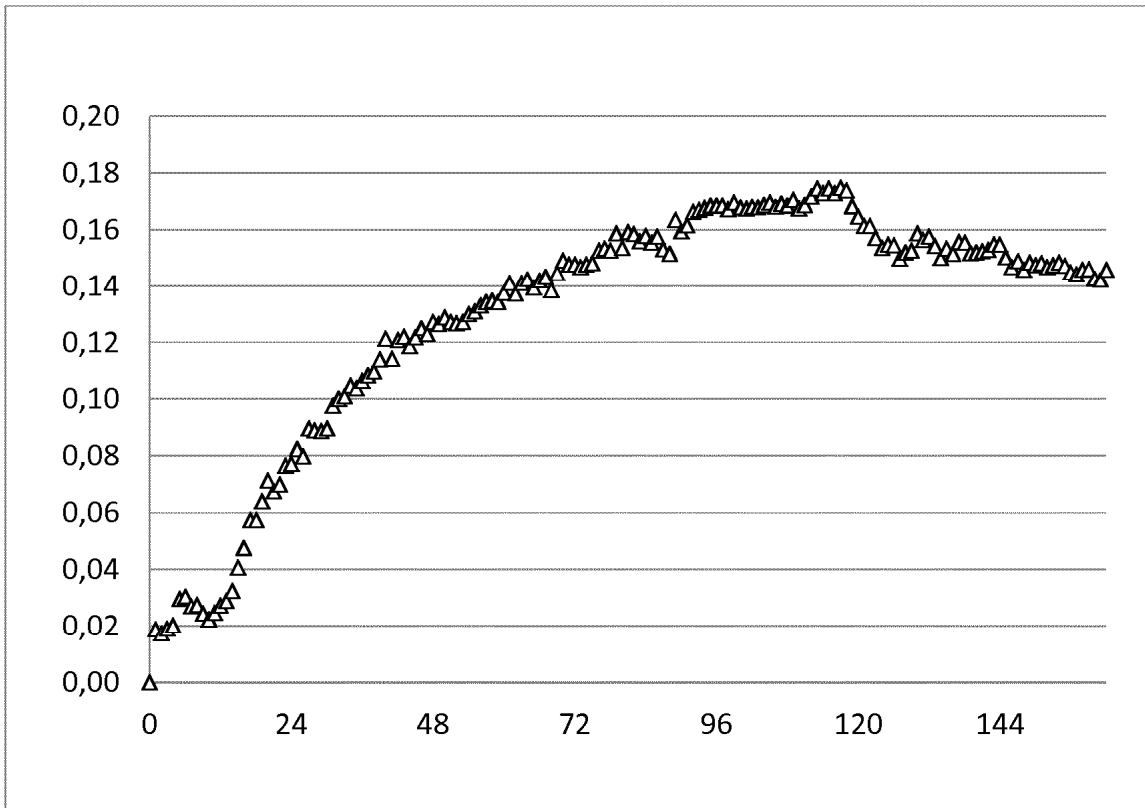


Figura 14

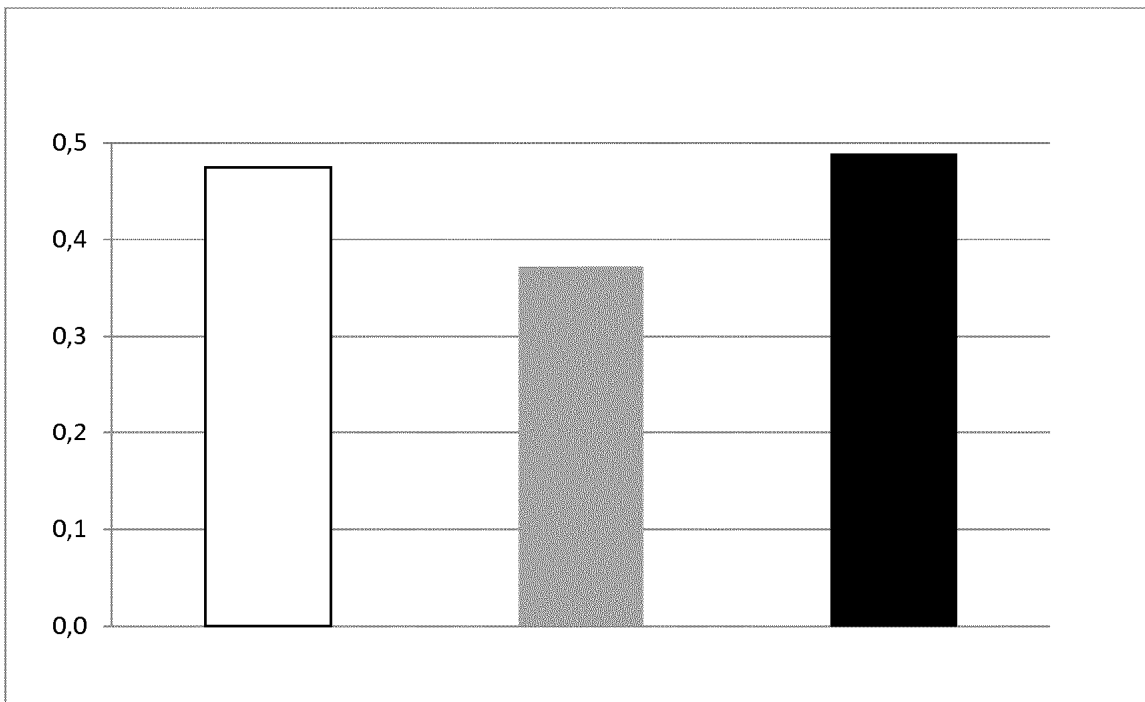


Figura 15

