

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 857**

51 Int. Cl.:

**C12R 1/24** (2006.01)

**C12N 1/22** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

**A23K 30/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2015 PCT/US2015/017516**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15134254**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2015 E 15710983 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3137635**

54 Título: **Cepas de Lactobacillus de acción rápida y su uso para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilado**

30 Prioridad:  
**07.03.2014 US 201414200231**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.07.2020**

73 Titular/es:  
**PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.**  
**(100.0%)**  
**7100 N.W. 62nd Avenue**  
**Johnston, Iowa 50131-1014, US**

72 Inventor/es:  
**HARMAN, ELIZABETH;**  
**RUTHERFORD, WILLIAM y**  
**SMILEY, BRENDA KAY**

74 Agente/Representante:  
**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 771 857 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

Cepas de *Lactobacillus* de acción rápida y su uso para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilado

### 5 Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones y métodos para tratar alimento para animales y conservar el ensilado para potenciar la estabilidad aeróbica.

### 10 Antecedentes de la invención

El proceso de ensilado es un método de conservación del forraje húmedo y se utiliza en todo el mundo. El ensilado representa más de 200 millones de toneladas de materia seca almacenadas anualmente en Europa Occidental y Estados Unidos solamente. El proceso implica la fermentación natural, en la que las bacterias del ácido láctico fermentan carbohidratos solubles en agua para formar ácidos orgánicos en condiciones anaeróbicas. Esto provoca una disminución en el pH que inhibe después los microbios perjudiciales para preservar el forraje húmedo.

La inestabilidad aeróbica es el principal problema en la producción de ensilado. Tradicionalmente, la recomendación ha sido permitir que el ensilado fermente durante al menos treinta (30) días antes de la alimentación para ayudar a aumentar la digestibilidad del ensilado. Incluso antes de que las unidades de almacenamiento estén abiertas para la alimentación, el ensilado puede estar expuesto a oxígeno debido a problemas de manejo (es decir, mal empaque o sellado). En estos tipos de condiciones aeróbicas, el rápido crecimiento de la levadura y el moho hace que los ensilados se calienten y estropeen, disminuyendo su valor nutricional. Alimentar con un cultivo que no ha sido fermentado adecuadamente puede reducir la ingesta de materia seca (IMS), disminuir la producción de leche y causar trastornos digestivos. Permitir tiempo para una fermentación adecuada crea una alimentación más sabrosa y digerible para una IMS y producción de leche óptimas.

La inestabilidad aeróbica puede ser un problema incluso en el ensilado inoculado que ha sufrido lo que tradicionalmente se consideraría una "fermentación buena": una caída rápida del pH y un pH terminal bajo. Sin embargo, los organismos de levadura que contribuyen a la inestabilidad en estas condiciones pueden ser tolerantes a las condiciones ácidas y pueden metabolizar el ácido láctico producido por las bacterias del ácido láctico durante la fermentación.

Es posible utilizar aditivos tanto químicos como biológicos para hacer ensilado para promover patrones de fermentación adecuados, especialmente en condiciones subóptimas. Los aditivos químicos típicos son con mayor frecuencia ácidos orgánicos y los aditivos biológicos que comprenden inoculantes bacterianos y enzimas. Los inoculantes bacterianos tienen ventajas sobre los aditivos químicos porque son seguros, fáciles de usar, no corrosivos para la maquinaria agrícola, no contaminan el medio ambiente y se consideran productos naturales.

La producción de cepas de inoculantes de ensilado y el proceso de ensilado es complejo e implica interacciones de numerosos procesos químicos y microbiológicos. Las diferentes cepas de incluso la misma especie no tienen propiedades idénticas y varían en sus características de fermentación y producción. Además, diferentes ensilados y diferentes métodos de ensilado presentan una variedad de necesidades diferentes. Existe una necesidad continua en la técnica de composiciones y métodos mejorados para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilado y aumentar la producción eficaz de alimento para animales ensilado.

La presente invención proporciona nuevas cepas de *L. buchneri* y *L. brevis* y combinaciones superiores de las mismas para su uso como inoculantes de ensilado.

El documento US 6337068 B1 divulga composiciones de *Lactobacillus buchneri* para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilado.

### Sumario de la invención

La invención proporciona una composición para su uso como inoculante de ensilado que comprende: *Lactobacillus buchneri* LN7125, o *Lactobacillus brevis* LB5328, o *Lactobacillus brevis* LB7123, o mezclas de los mismos, y un vehículo adecuado.

Las composiciones de bacterias heterofermentativas de ácido láctico, aisladas y purificadas, mejoran la estabilidad aeróbica del forraje ensilado, aumentando la fermentación y la estabilización del ensilado para permitir una exposición aeróbica más temprana.

Dichas composiciones pueden comprender de aproximadamente  $10^1$  a aproximadamente  $10^{11}$  organismos viables por gramo de peso húmedo de ensilado, opcionalmente de aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^7$  organismos viables por gramo de peso húmedo de ensilado, por ejemplo de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^6$  organismos viables por gramo de peso húmedo de ensilado. El vehículo en las composiciones de las realizaciones

puede ser un líquido o un sólido, tal como, pero sin limitación, carbonato de calcio, almidón y celulosa.

La invención proporciona además un cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus buchneri*, cepa LN7125, que tiene el Depósito de Patente N.º NRRL B-50733, o *Lactobacillus brevis*, cepa LB5328, que tiene el Depósito de Patente N.º NRRL B-50731, o *Lactobacillus brevis*, cepa LB7123, que tiene Depósito de Patente N.º NRRL B-50732.

Aún más, la invención proporciona un método para tratar material vegetal previamente ensilado que comprende: añadir la composición como se define anteriormente al material vegetal previamente ensilado.

## 10 Descripción detallada de la invención

Las unidades, los prefijos y los símbolos se pueden denotar en su forma aceptada del SI. Los intervalos numéricos citados dentro de la memoria descriptiva incluyen los números que definen el intervalo e incluyen cada número entero dentro del intervalo definido.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa uno o más elementos.

Como se usa en el presente documento, "rendimiento animal" significa el rendimiento de carne, leche, huevos, descendencia o trabajo.

Como se usa en el presente documento, "ensilar" o "ensilado" se refiere a un proceso de fermentación anaeróbica utilizado para conservar forrajes, cultivos de granos inmaduros y otros cultivos de biomasa para forrajes y biocombustibles. En algunas realizaciones, el proceso de ensilado comprende las etapas de poner en contacto el forraje con un inoculante microbiano y almacenar la mezcla en condiciones anaeróbicas. En determinadas realizaciones, el proceso de ensilado comprende las etapas de almacenar el forraje en condiciones anaeróbicas de manera que se excluya el aire. El forraje, habiendo sido inoculado con el inoculante microbiano descrito en otra parte del presente documento, también se empaqueta y almacena de manera que se excluya el aire. El contenido de humedad del forraje puede ser de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 80 %, dependiendo de los medios de almacenamiento, la cantidad de compresión y la pérdida de humedad esperada durante el almacenamiento. El ensilado se puede producir en silos, montones de ensilado, pozos de ensilado, pacas de ensilado o cualquier otro método apropiado para ensilar el material vegetal elegido. El material vegetal con el inoculante microbiano descrito en otra parte del presente documento puede ensilarse durante cualquier cantidad de tiempo apropiado para producir ensilado en la etapa de madurez deseada. En algunas realizaciones, ensilado se produce durante aproximadamente 7, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70 días, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 18 meses o aproximadamente 24 meses o cualquier período de tiempo que el profesional considere adecuado. El proceso de ensilado puede tener lugar a cualquier temperatura ambiente, por ejemplo a una temperatura ambiente de 0-45 °C. Sin embargo, la temperatura del material vegetal a ensilar puede aumentar por encima de 45 °C. El ensilado maduro puede usarse para alimentación de animales, congelarse y almacenarse para un uso posterior, o añadirse a un generador de biogás para la producción de biogás.

Como se usa en el presente documento, "mutante funcional" significa una cepa bacteriana obtenida directa o indirectamente por modificación genética de, o usando, las cepas referenciadas y que conservan al menos el 50 % de la actividad de la cepa referenciada. La modificación genética se puede lograr a través de cualquier medio, tal como, pero sin limitación, mutágenos químicos, radiación ionizante, mutagénesis basada en transposones, o mediante conjugación, transducción o transformación utilizando las cepas referenciadas bien como receptor o donante de material genético.

Como se usa en el presente documento, la expresión "especies de bacterias del ácido láctico heterofermentativas" se interpretará que incluye, pero sin limitación, leuconostocs, algunas especies de lactobacilos, oenococos y weissella. Los heterofermentadores producen ácido láctico, etanol, ácido acético y dióxido de carbono, y las proporciones dependen de los sustratos disponibles.

Como se usa en el presente documento, la expresión "especies de bacterias del ácido láctico homofermentativas" se interpretará que incluye, pero sin limitación, algunos lactobacilos y la mayoría de las especies de enterococos, lactococos, pediococos, estreptococos, tetragenococos y vagococos que fermentan hexosas por la vía Embden-Meyerhof (E-M). Homofermentativo indica que el ácido láctico es el metabolito principal sin la producción de dióxido de carbono. Por cada molécula de azúcar de seis carbonos, las bacterias homofermentativas del ácido láctico producirán dos moléculas de ácido láctico.

Como se usa en el presente documento, "aislado" significa eliminado de una fuente natural incluyendo, pero sin limitación, ensilado no inoculado u otro material vegetal.

- 5 Como se usa en el presente documento, "inoculante microbiano" se refiere a una composición que comprende al menos un cultivo bacteriano y un vehículo adecuado. Una "combinación de inoculantes microbianos" comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o más cultivos bacterianos y un vehículo adecuado. Los cultivos bacterianos comprenden al menos una cepa bacteriana y pueden comprender múltiples cepas bacterianas, incluyendo, por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o más. Los cultivos bacterianos útiles en los métodos y composiciones divulgados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, LN7125, LB5328 o LB7123.
- 10 Como se usa en el presente documento, "material vegetal previamente ensilado" incluye, pero sin limitación, hierbas, maíz, alfalfa, trigo, césped inglés, cereales, semillas oleaginosas, sorgo, girasol, cebada y mezclas de los mismos antes de la fermentación. La totalidad de estos puede tratarse con éxito con los inoculantes de las realizaciones de la presente invención. Los inoculantes de las realizaciones de la presente invención también son útiles en el tratamiento del maíz con alta humedad (HMC, por sus siglas en inglés).
- 15 Como se usa en el presente documento, "semillas oleaginosas" incluye, pero sin limitación girasol, colza, soja y mezclas de las mismas.
- 20 Como se usa en el presente documento, "purificado" significa que una especie o cepa bacteriana está sustancialmente separada de y enriquecida en relación con: levaduras, mohos y/u otras especies o cepas bacterianas encontradas en la fuente de la que se aisló.
- 25 El término "ensilado", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los tipos de productos agrícolas fermentados, incluyendo, pero sin limitación, ensilado de hierba, ensilado de alfalfa, ensilado de trigo, ensilado de leguminosas, ensilado de girasol, ensilado de cebada, ensilado de maíz de plantas enteras (WPCS), ensilado de sorgo, granos fermentados y mezclas de hierbas, etc.
- 30 Como se usa en el presente documento, el término "cepa" o "cepa(s)" se interpretará que incluye, pero sin limitación, cualquier mutante o derivado de las diversas cepas bacterianas divulgadas en el presente documento, por ejemplo, cepa LN7125 de *L. buchneri*, (Depósito de Patente N.º NRRL B-50733), o cepa LB5328 de *L. brevis*, (Depósito de Patente N.º NRRL B-50731), o cepa LB7123 de *L. brevis*, (Depósito de Patente N.º NRRL B-50732) que conserva la actividad funcional de mejorar la estabilidad aeróbica del forraje como se describe y define mediante los métodos y ejemplos divulgados en el presente documento.
- 35 Se han aislado y purificado varios microorganismos que mejoran la estabilidad aeróbica del forraje ensilado, aumentando la fermentación y la estabilización del ensilado para permitir una exposición aeróbica más temprana. Se ha demostrado que las cepas específicas de las especies *L. buchneri* o *L. brevis* potencian la estabilidad aeróbica del ensilado al no solo reducir los niveles de ácido láctico sino también al producir una sustancia es inhibidora de los microorganismos que contribuyen a causar inestabilidad aeróbica en el ensilado. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, es probable que una combinación de metabolitos sea responsable de este efecto. Además, se cree que el metabolismo de *L. buchneri* o *L. brevis* produce tanto ácido acético como ácido propiónico, conocidos ambos por inhibir el crecimiento de levaduras y mohos.
- 40 El objetivo principal de ensilar forrajes es conservar la cantidad máxima de materia seca original, nutrientes y energía en el cultivo para la alimentación en un momento posterior. El proceso puede caracterizarse por cuatro fases generales de fermentación de ensilado.
- 45 Al ensilar en la unidad de almacenamiento, la primera fase es aeróbica, cuando todavía hay oxígeno entre las partículas de la planta y el pH es de 6,0 a 6,5. Estas condiciones permiten la respiración continua de las plantas, la actividad de la proteasa y la actividad de los microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos.
- 50 La segunda fase es la fermentación, que dura varios días o varias semanas después de que el ensilado se vuelva anaeróbico. Las bacterias del ácido láctico crecen y se convierten en la población microbiana primaria, produciendo así ácidos lácticos y otros ácidos orgánicos, disminuyendo el pH de 3,8 a 5,0.
- 55 La tercera fase es estable y se producen pocos cambios en las características del forraje, siempre que se impida la entrada de aire a la unidad de almacenamiento.
- 60 La fase final es la alimentación, cuando el ensilado finalmente se descarga y se expone al aire. Esto da como resultado la reactivación de microorganismos aeróbicos, principalmente levaduras, mohos, bacilos y bacterias del ácido acético que pueden causar deterioro.
- 65 Las técnicas de manejo que se pueden usar para ayudar a prevenir este proceso, incluyen, pero sin limitación, el cuidado de empacar bien el ensilado durante el proceso de ensilado, compactación, sellado, llenado rápido, manejo del frente y, también, el cuidado en la eliminación del ensilado para alimentación para minimizar la aireación del ensilado restante.

La susceptibilidad del ensilado al deterioro aeróbico está determinada por factores físicos, químicos y microbiológicos. El manejo (compactación, velocidad de descarga) afecta en gran medida el movimiento del oxígeno hacia el ensilado. Durante la alimentación, el aire puede penetrar hasta 1 m detrás del frente del ensilado, por lo que la exposición al oxígeno se prolonga. Los ácidos de fermentación y el pH inhiben la tasa de crecimiento microbiano, pero las tasas de deterioro también se ven afectadas por los números microbianos y la tasa de crecimiento de microbios aeróbicos en los sustratos disponibles.

Las bacterias del ácido láctico (LAB, por sus siglas en inglés) están presentes como parte de la microflora normal en las plantas en crecimiento. Las LAB se pueden clasificar como uno de dos tipos dependiendo de sus productos finales metabólicos primarios; homofermentativas que producen solo ácido láctico a partir del metabolismo de la glucosa y heterofermentativas que producen ácido láctico, etanol, etanol, acetato y CO<sub>2</sub>. Las apariciones de estos tipos son bastante variables tanto en tipo como en número, de cultivo a cultivo y de ubicación a ubicación.

Los inoculantes de ensilado que comprenden principalmente bacterias del ácido láctico homofermentativas se han convertido en los aditivos dominantes en muchas partes del mundo. Su función es promover la utilización rápida y eficiente de los carbohidratos solubles en agua de un cultivo, dando como resultado la producción intensiva de ácido láctico y una disminución rápida del pH, minimizando así las pérdidas de materia seca. Los inoculantes también pueden mejorar el rendimiento animal. Sin embargo, los inoculantes homofermentativos a menudo tienen un efecto negativo sobre la estabilidad aeróbica debido a la conservación de sustratos fácilmente disponibles para organismos de descomposición.

El concepto de bacterias del ácido láctico heterofermentativas en un inoculante ha ganado un favor reciente. La idea es que el aumento de los niveles de ácidos grasos volátiles no disociados, tal como acetato, puede inhibir otros microbios que inician el deterioro aeróbico. Los heterofermentadores producen ácido láctico, etanol, ácido acético y dióxido de carbono, y las proporciones dependen de los sustratos disponibles. El acetato producido puede inhibir organismos nocivos en el ensilado. Adicionalmente, los heterofermentadores, tal como *Lactobacillus buchneri*, son capaces de metabolizar el ácido láctico a acetato y 1,2 propanodiol en condiciones anaeróbicas. Con tales mecanismos, una sexta parte del carbono se pierde en forma de dióxido de carbono durante la fermentación de glucosa y un tercio del carbono del ácido láctico se pierde durante la conversión anaeróbica en ácido acético. Sin embargo, una pequeña pérdida del 1 % o quizás hasta del 2 % de la materia seca se compensa fácilmente con pérdidas mucho mayores por la acción de descomposición de los microorganismos aeróbicos. Las preocupaciones con las bacterias del ácido láctico heterofermentativas incluyen, pero sin limitación, los efectos sobre el rendimiento animal, así como la identificación de cepas apropiadas útiles para el procedimiento. Las diferentes cepas de incluso la misma especie no tienen propiedades idénticas y varían en sus características de fermentación.

Nilson (Arch Microbiol. (1956) 24: 396-411) descubrieron que las LAB predominantes en el ensilado son *Streptococcus* y *Lactobacilos*, siendo *L. plantarum* la especie más frecuente. Gibson et. al (J. Gen. Micro. (1958) 24: 60-70) indicaron que *L. plantarum* y *L. acidophilus* eran los componentes dominantes de la flora homofermentativa. Beck (Landwirtschaftliche Forschung. (1972) 27: 55-63) demostraron que incluso en el ensilado de hierba donde la población de epifitas estaba dominada por LAB heterofermentativas, en el cuarto día del proceso de ensilado, el 85% de los organismos presentes eran homofermentativos. Langston et. al. (Boletín Técnico del USDA N.º 1187 (1958)) ha demostrado que el 69 % de los aislados en ensilado maduro eran homofermentativos. Algunas veces se observa un cambio hacia el LAB heterofermentativas en el ensilado maduro debido a su tolerancia al pH bajo y a las altas concentraciones de acetato. Szigeti (Acta Alimentaria. (1979) 8: 25-40) encontraron que la flora de LAB a pH extremadamente bajo consistía principalmente en *L. plantarum* y *L. brevis*. Grazia y Suzzi (J. Appl. Bacteriol. (1984) 56: 373-379) han demostrado que se observó una fuerte sensibilidad al pH 3,6 entre las LAB heterofermentativas.

Se puede encontrar una revisión del proceso de ensilado y el uso de inoculantes en Weinberg, ZNG. y Muck, RE. (1996) FMS Microbiology Rev. 19:53-68, Wilkinson, J.M. y Davies, D.R. (2012) Grass and Forage Science 68:1-19, y Muck, Richard E. (2013) Agricultural and Food Science 22:3-15.

En aspectos de la presente divulgación, la inhibición de los organismos responsables del deterioro se logra tratando el ensilado con organismos de las especies *L. buchneri* o *L. brevis*, especialmente las cepas LN7125, LB5328 o LB7123 o con composiciones que comprenden LN7125, LB5328 o LB7123 o con organismos estrechamente relacionados, y también mediante tratamiento con mutantes o equivalentes eficaces de LN7125, LB5328 o LB7123 y composiciones que los comprenden.

En el presente documento se divulga un inoculante microbiano que comprende especies de *Lactobacillus* que alterarán la fermentación y potenciarán la estabilización del ensilado para permitir una exposición aeróbica más temprana después del ensilado que la que se practica actualmente. Actualmente, es la norma de la industria recomendar permitir un mínimo de treinta (30) días y preferentemente sesenta (60) días para que los ensilados inoculados permanezcan en condiciones anaeróbicas para lograr el máximo beneficio de la capacidad del inoculante para conservar y potenciar la estabilidad aeróbica del forraje almacenado. Con frecuencia, los productores no pueden permitir que su ensilado permanezca sin abrir durante el período de tiempo recomendado debido a sus limitaciones individuales de ensilado disponible para la alimentación. Un aspecto de la divulgación es establecer un objetivo de menos de treinta (30) días

para la fermentación anaerobia, en una estructura de ensilado sellada, con una cepa de *Lactobacillus* con o sin una combinación de bacterias del ácido láctico (LAB). Una estructura de ensilado sellada puede tener un objetivo para la fermentación anaeróbica de al menos 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 o 7 días.

5 Una realización de la invención es un cultivo biológicamente puro de la cepa LN7125 de *L. buchneri*, que tiene el Depósito de Patente N.º NRRL B-50733), o cepa LB5328 de *L. brevis*, que tiene el Depósito de Patente N.º NRRL B-50731), o cepa LB7123 de *L. brevis*, que tiene Depósito de Patente N.º NRRL B-50732.

10 El presente documento divulga un método de tratamiento de alimento para animales o ensilado, que comprende administrar un inoculante de ensilado que comprende LN7125, LB5328 o LB7123 al forraje o ensilado a aproximadamente  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^6$  UFC/g de forraje o ensilado. Adicionalmente, el presente documento divulga un método para aumentar el rendimiento animal, que comprende alimentar al animal con el alimento para animales que se ha inoculado con los inoculantes de ensilado como se describe en las otras realizaciones.

15 Un aspecto adicional es un inoculante de ensilado, que comprende cultivos viables de una bacteria del ácido láctico homofermentativa y una bacteria del ácido láctico heterofermentativa, véase por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.403.084. Los aspectos adicionales incluyen alimento para animales o ensilado que comprende este inoculante de ensilado.

20 Las realizaciones de la invención incluyen métodos para tratar el ensilado inhibiendo el crecimiento en el mismo de organismos de descomposición seleccionados de levaduras, mohos y bacterias formadoras de esporas, que comprende: añadir al ensilado una cantidad inhibitoria de organismos de descomposición de las composiciones de las realizaciones. El ensilado a tratar por los métodos de las realizaciones puede realizarse de una variedad de fuentes vegetales, incluyendo, pero sin limitación, hierba, maíz, alfalfa, trigo, césped inglés, cereales, semillas oleaginosas, 25 sorgo, girasol y cebada. Las composiciones de las realizaciones también pueden añadirse al ensilado tras el almacenamiento. El ensilado se puede ensilar de varias maneras, que incluyen en forma de paca, una bolsa, un búnker, un silo de duelas o una pila. Los métodos para tratar el ensilado usando las composiciones de las realizaciones incluyen añadir al ensilado una cantidad de LN7125, LB5328 o LB7123 que conserve la calidad del ensilado.

30 Los aspectos de la divulgación incluyen además ensilado que comprende una cantidad de LN7125, LB5328 o LB7123 que conserva la calidad del ensilado o una cantidad de un mutante de los mismos que conserva la calidad del ensilado.

35 El ensilado incluido en los aspectos proporciona métodos para tratar el ensilado para alimento para animales con el inoculante de ensilado de la presente invención, así como el alimento para animales tratado o el ensilado mismo. Con frecuencia, el alimento para animales o ensilado será ensilado de maíz de plantas enteras (WPCS) o maíz con alta humedad (HMC). También se divulga, en el presente documento, un método para mejorar el rendimiento animal alimentando el ensilado inoculado. También se incluyen recipientes que comprenden el inoculante de ensilado de la presente invención y un vehículo.

40 Un aspecto de la divulgación es un método para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilado al tiempo que potencia la digestión de la fibra vegetal en un animal al alimentarlo una cantidad eficaz de ensilado que se ha inoculado con LN7125, LB5328 o LB7123 combinados con una cepa bacteriana productora de ferulato esterasa o un mutante funcional de la misma y un vehículo adecuado. Los métodos para su uso tales cepas productoras de ferulato esterasas se describen en la Patente de Estados Unidos 7.799.551. La cepa con ferulato esterasa puede ser, por ejemplo, una 45 cepa *Lactobacillus* o un mutante funcional de la misma, tal como una cepa de *Lactobacillus* seleccionada del grupo que consiste en *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. alimentarius*, *L. crispatus*, y *L. paralimentarius*. Dichas cepas pueden incluir, por ejemplo, aquellas seleccionadas del grupo que consiste en *L. buchneri*, cepa LN4017 (Depósito de Patente N.º PTA-6138), *L. plantarum*, cepa LP678 (Depósito de Patente N.º PTA-6134), *L. plantarum*, cepa LP3710 (Depósito de Patente N.º PTA-6136), *L. plantarum*, cepa LP3779 (Depósito de Patente N.º PTA-6137), *L. plantarum*, cepa LP7109 (Depósito de Patente N.º PTA-6139), *L. brevis*, cepa LB1154 (Depósito de Patente N.º NRRL B-30865), *L. buchneri*, cepa LN4888 (Depósito de Patente N.º NRRL B-30866), *L. reuteri*, cepa LR4933 (Depósito de Patente N.º NRRL B-30867), cepa L12127 de *L. crispatus* (Depósito de Patente N.º NRRL B-30868), *L. crispatus*, cepa L12350 (Depósito de Patente N.º NRRLB-30869), *L. crispatus*, cepa L12366 (Depósito de Patente N.º NRRL B-30870), especies de *Lactobacillus* no conocidas, cepa UL3050 (Depósito de Patente N.º NRRL B-30871), y mezclas de las mismas (Véase la Patente de Estados Unidos 7.799.551). Dichas composiciones pueden incluir de aproximadamente  $10^1$  a aproximadamente  $10^{10}$  organismos viables de las cepas bacterianas o mutantes funcionales de las mismas por gramo de un material vegetal previamente ensilado. Opcionalmente, pueden incluir de aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^7$  organismos viables de las cepas bacterianas o mutantes funcionales de las mismas, por ejemplo de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^6$  organismos viables de las cepas bacterianas o mutantes funcionales de las mismas por gramo de un material vegetal previamente ensilado. 60

La composición con la que se alimenta al animal puede tratarse con una cantidad catalítica eficaz de la cepa bacteriana productora de ferulato esterasa o mutante funcional de la misma, como es fácilmente determinable por los expertos en la materia en la crianza de ganado. Los animales que se benefician de las realizaciones de la presente invención son mamíferos y aves, incluyendo, pero sin limitación, especies de rumiantes, equinos, bovinos, porcinos, caprinos, 65

ovinos y aviares, por ejemplo, aves de corral.

Las composiciones que se usan en las realizaciones de la invención pueden estar en bien forma líquida o seca y pueden comprender cepas bacterianas adicionales. En formas de tratamiento sólidas, la composición puede comprender un cultivo bacteriano mixto que comprende LN7125, LB5328 o LB7123 junto con un vehículo.

El vehículo puede tener la naturaleza de un líquido acuoso o no acuoso o un sólido. En las formas sólidas, la composición comprende vehículos sólidos, diluyentes sólidos o expansores físicos. Ejemplos de dichos vehículos sólidos, diluyentes sólidos o expansores físicos incluyen maltodextrina, almidones, carbonato de calcio, celulosa, suero de leche, mazorcas de maíz molidas y dióxido de silicio. Los vehículos líquidos pueden ser soluciones, pero sin limitación, en forma de concentrados emulsionables, suspensiones, emulsiones que incluyen microemulsiones y/o suspoemulsiones, que opcionalmente pueden espesarse en geles. En resumen, el vehículo puede ser un expansor físico orgánico o inorgánico. La composición sólida se puede aplicar directamente al forraje en forma de un polvo ligero en polvo, o si se desembolsa en un vehículo líquido, que se puede rociar con éxito sobre el forraje.

Los expertos en la materia conocerán otros vehículos y formas de dosificación adecuados, o podrán determinarlos, usando experimentación de rutina. Además, la administración de las diversas composiciones puede llevarse a cabo utilizando técnicas convencionales comunes a los expertos en la materia.

Otra realización de la invención es la combinación de LN7125, LB5328 o LB7123 con otras especies bacterianas específicas en la proporción adecuada para proporcionar tanto un aumento en la fermentación como la estabilización del ensilado o alimento para animales así como una estabilidad aeróbica potenciada tras la exposición del ensilado o forraje al aire para permitir la exposición aeróbica temprana. El inoculante de ensilado puede ser una combinación aislada y purificada de al menos una cepa viable de la bacteria del ácido láctico homofermentativa *Lactobacillus plantarum* combinada con la bacteria heterofermentativa de LN7125, LB5328 o LB7123. En algunas realizaciones, el inoculante de ensilado comprenderá al menos 2 a 10 cepas de homofermentador y/o heterofermentador. Cepas ejemplares de *L. plantarum* incluyen al menos una de LP286, LP287, LP329, LP346, LP347, o mutantes funcionales de las mismas (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 6.403.084). Cepas ejemplares de *L. buchneri* que podrían combinarse con LN7125, LB5328, o LB7123 incluyen LN1391, LN4637, LN4750, o mutantes funcionales de las mismas. El inoculante de ensilado comprende opcionalmente al menos una cepa viable de *Enterococcus faecium*, tal como, pero sin limitación, cepas EF301, EF202, o mutantes funcionales de las mismas. El número de bacterias homofermentativas viables y bacterias heterofermentativas en el inoculante están presentes en una proporción de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:15. En algunas realizaciones la proporción es aproximadamente: 1:6 a 1:14, 1:7 a 1:13, 1:8 a 1:12, 1:9 a 1:11, o 1:10.

Los métodos de uso de cultivos mixtos para mejorar bien la fermentación o la estabilidad aeróbica del ensilado se divulgan en la Patente de Estados Unidos 6.403.084.

En el presente documento se divulga una composición para su uso como inoculante de ensilado que comprende LN7125, LB5328 o LB7123 o un mutante funcional de la misma y un vehículo adecuado. En una realización de la invención la composición contiene de aproximadamente  $10^1$  a aproximadamente  $10^{10}$  organismos viables de la cepa bacteriana o un mutante funcional de la misma por gramo de un material vegetal previamente ensilado. En una realización adicional de la invención la composición contiene de aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^7$  organismos viables de la cepa bacteriana o un mutante funcional de la misma por gramo de un material vegetal previamente ensilado. En otra realización más, la composición contiene de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^6$  organismos viables de la cepas bacteriana o un mutante funcional de la misma por gramo de un material vegetal previamente ensilado.

Materiales que son adecuados para ensilar o almacenar, de acuerdo con los métodos de la invención, son cualquiera que sea susceptible al deterioro aeróbico. El material generalmente contendrá al menos un 25 % en peso de materia seca. Dichos materiales incluyen, pero sin limitación, césped inglés o tradicional, maíz, que incluye maíz húmedo, planta completa de maíz, alfalfa, trigo, legumbres, cereales, semillas oleaginosas, sorgo, girasol, cebada u otros cereales integrales. La gestión del almacenamiento de ensilado incluye, pero sin limitación, en pacas (una forma particularmente susceptible al deterioro aeróbico), bolsas limitantes de oxígeno, búnkeres, silos de duelas verticales, silos limitantes de oxígeno, bolsas, pilas o cualquier otra forma de almacenamiento que pueda ser susceptible al deterioro aeróbico.

La actividad asociada con la presente invención se puede encontrar en otras cepas de *L. buchneri*, en otras especies de *Lactobacillus*, p.ej., *L. kefir*, *L. parakefir* y *L. parabuchneri*, *L. brevis*, *L. sake*, *L. curvatus*, en otras especies de bacterias del ácido láctico homofermentativas y posiblemente también en otros géneros. Esto puede establecerse mediante experimentación de rutina, basándose en la información contenida en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "cepa" o "cepas" se interpretará para incluir cualquier mutante o derivado de las diversas cepas bacterianas descritas en el presente documento, por ejemplo, cepa LN7125 de *L. buchneri*, (Depósito de Patente N.º NRRL B-50733), o cepa LB5328 de *L. brevis*, (Depósito de Patente N.º NRRL B-50731), o cepa LB7123 de *L. brevis*, (Depósito de Patente N.º NRRL B-50732) que conserva la actividad funcional de

mejorar la estabilidad aeróbica del forraje como se describe y define mediante los métodos y ejemplos divulgados en el presente documento.

5 El microorganismo LN7125, LB5328 o LB7123 de las realizaciones se purificó y aisló del maíz o de las heces de ovejas alimentadas con maíz. Después de mucha experimentación, este se descubrió al probar una colección de aislados.

Después de la purificación y el aislamiento de la cepa específica, se realizaron estudios taxonómicos para identificar la cepa. Se identificó como *L. buchneri* o *L. brevis* y se le dio el número de prototipo LN7125, LB5328 o LB7123. De acuerdo con la invención, estas cepas, las composiciones que comprenden estas cepas o los factores producidos por estas cepas, se usan para tratar materiales forrajeros.

Las realizaciones de la presente invención se definen adicionalmente en los siguientes Ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican ciertas realizaciones de la invención, se proporcionan solamente a modo de ilustración.

15 Depósitos

La cepa LN7125 de *Lactobacillus buchneri*, la cepa LB5328 de *Lactobacillus brevis* y la cepa LB7123 de *Lactobacillus brevis* se depositaron el 14 de marzo de 2012, en la Colección de Cultivos del Agricultural Research Service (ARS), alojada en la Unidad de Investigación de Genómica y Bioprocesamiento Microbianos del National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR), bajo las disposiciones del Tratado de Budapest. Las cepas recibieron el Depósito de Patente N.º NRRL B-50733, Depósito de Patente N.º NRRL B-50731 y Depósito de Patente N.º NRRL B-50732, respectivamente. La dirección de NCAUR es 1815 N. University Street, Peoria, IL, 61604. Los depósitos estarán disponibles de manera irrevocable y sin restricciones o condiciones al momento de la emisión de una patente. Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención objeto en la derogación de los derechos de patente concedidos por el gobierno.

Los solicitantes cumplirán con todos los requisitos de 37 C.F.R. §§ 1.801-1.809, que incluye proporcionar una indicación de la viabilidad de la muestra cuando se realiza el depósito. Cada depósito se mantendrá sin restricciones en el depósito NRRL, que es un depósito público, por un período de 30 años, o 5 años después de la solicitud más reciente, o durante la vigencia de la patente, lo que sea más largo y será reemplazado si alguna vez se vuelve inviable durante ese período. Los depósitos estarán disponibles de manera irrevocable y sin restricciones o condiciones al momento de la emisión de una patente. Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención objeto en la derogación de los derechos de patente concedidos por la acción gubernamental.

**Ejemplos**

40 **Ejemplo 1: Cepas de *Lactobacillus* de Acción Rápida para Mejorar la Estabilidad Aeróbica del Ensilaje en Maíz**

Se realizaron estudios para desarrollar un inoculante microbiano que comprende especies de *Lactobacillus* que pueden aumentar la fermentación y la estabilización del ensilado de maíz de plantas enteras para permitir la apertura temprana (exposición aeróbica) a menos de treinta (30) días después del ensilado.

45 Selección de la Cepa:

Los cultivos de bacterias del ácido láctico heterofermentativas (252 aislados), tomados de la colección de cultivos microbianos de Pioneer Hi-Bred, se cultivaron en caldo De Man Rogosa Sharpe (caldo MRS; Difco™ *Lactobacilli* MRS; Becton Dickinson and Company, Sparks, MD 21152 EE. UU.), preparado según lo descrito por el fabricante, durante 24 a 48 horas. Se transfirió una parte alícuota de suspensión celular a un extracto de caldo de forraje de maíz de plantas enteras (mezcla 1:10 de forraje de maíz molido seco en agua, se esterilizó por autoclave, se esterilizó por filtro de 0,2 micras y después 0,5 % de glucosa añadida) y se cultivó durante 40 horas a 37 °C.

Después de un proceso de exploración inicial, se seleccionaron cinco aislados para pruebas de campo en 2011 para evaluar su capacidad de potenciar la estabilidad aeróbica del forraje de maíz de plantas enteras ensilado. Se descubrieron e identificaron cepas del maíz o de las heces de muestras de ovejas alimentadas con maíz tomadas en Estados Unidos. En 2012, tres de los aislados se repitieron en maíz de plantas enteras y en combinación con las cepas homofermentativas comerciales LP286 y LP329.

60 Prueba de campo:

Características de la Cepa de Prueba:

Cepa	ID de especie de ADNr 16S	Fuente	Producción de gas en MRS
LB7123	<i>Lactobacillus brevis</i>	Heces de oveja alimentadas con WPCS, Polk City, IA, 2008	gas positivo

## ES 2 771 857 T3

<b>LB4616</b>	Lactobacillus brevis	HMC, Dallas Center, 1997	gas positivo
<b>LB5328</b>	Lactobacillus brevis	WPCS, IA, 1995	gas positivo
<b>LB31</b>	Lactobacillus brevis	WPCS, Kersey, CO, 1993	gas positivo
<b>LN7125</b>	Lactobacillus buchneri	WPCS, Polk City, IA, 2008	gas positivo

Prueba de campo:

5 Cosecha de maíz en 2011: Tres híbridos (P1162, 33M16, DeKalb 61669vt3) de forraje de maíz de plantas enteras se cosecharon individualmente el 1 de septiembre de 2011 en el Livestock Nutrition Center en Sheldahl, IA con un intervalo de materia seca del 33-37 %.

10 Cosecha de maíz en 2012: Tres híbridos (P90115XR, P1162XR, P1395XR) de forraje de maíz de plantas enteras se cosecharon individualmente el 21 de septiembre de 2012 en el Livestock Nutrition Center en Sheldahl, IA con un intervalo de materia seca del 33-37 %.

### Tratamientos de ensilado de maíz en 2011:

Inoculantes comerciales de maíz para plantas enteras marca Pioneer®
<b>11A44</b>
<b>1132</b>
<b>11C33</b>
<b>11CFT</b>
Cepas Experimentales de Prueba
<b>LB31</b>
<b>LB4616</b>
<b>LB5328</b>
<b>LB7123</b>
<b>LN7125</b>

### Tratamientos de ensilado de maíz en 2012:

Inoculantes comerciales de maíz para plantas enteras marca Pioneer®
<b>11A44</b>
<b>1132</b>
<b>11C33</b>
<b>11CFT</b>
Cepas Experimentales de Prueba y Combinaciones
<b>LB5328</b>
<b>LB7123</b>
<b>LN7125</b>
<b>LB5328 + LP286 + LP329</b>
<b>LB7123 + LP286 + LP329</b>
<b>LN7125 + LP286 + LP329</b>

15 Inoculación:

20 En 2011, se cultivaron cepas experimentales de prueba individuales y se suministraron como cultivo recién cultivado. En 2012, se cultivaron cepas experimentales de prueba individuales, se liofilizaron internamente y se suministraron como cultivo en polvo seco. Los productos liofilizados comerciales y experimentales se suspendieron en agua y después todos los tratamientos se ajustaron a una concentración patrón de  $4,54 \times 10^7$ . Se aplicaron suspensiones de tratamiento usando una jeringa de 10 cc a un caudal de 1,0 ml/lb (453,6 g) de forraje. La dosis de aplicación para todos los tratamientos fue de  $1 \times 10^5$  UFC/g de forraje.

25 Silos:

Los silos de PVC se llenaron con 160 kg de MS/m<sup>3</sup> de forraje de maíz para plantas enteras y se infundió aire durante 24 horas como se describe a continuación según los días de apertura.

Día de Apertura del Silo	Día de infusión de Aire las 24 horas
7	0
(continuación)	
Día de Apertura del Silo	Día de infusión de Aire las 24 horas
14	7
28	14
60	45

**Estabilidad Aeróbica:** Se usó el método de Honig (Proc. Of the Eurobac.Conf., P. Lingvall y S. Lindgren (ed.) (12-16 de agosto de 1986) Swed.Univ. of Agric. Sci. Grass and Forrage Report No. 3-1990.páginas 76-81.Uppsala, Suecia.) para medir la estabilidad aeróbica. Las pérdidas de materia seca aeróbicas (PMS) se estimaron a partir del aumento de la temperatura después de la exposición al aire según lo descrito por Honig.

5

## Resultados y análisis

### Estabilidad Aeróbica

10 Los tratamientos con lactobacilos heterofermentativos disminuyen la pérdida de materia seca aeróbica y aumentan el tiempo de calentamiento. Se observaron diferencias entre las cepas a lo largo del tiempo.

#### 2011 - Ensilaje de maíz (Tabla 1)

15 La apertura en los días 7 y 14 dio como resultado diferencias estadísticas entre los tratamientos con LB5328, LB7123 y LN7125 y el ensilado de control no inoculado que se mantuvo hasta el día 60, cuando se observaron efectos numéricos.

20 El tratamiento con LB5328, LB7123 y LN7125 también dio como resultado una mejora estadística sobre los inoculantes comerciales actuales (11A44, 11C33 y 11CFT) cuando se evaluó en los primeros tiempos de apertura. Estas tres cepas muestran una mejora notable sobre otras cepas heterofermentativas seleccionadas (LB31 y LB4616).

25 Dos *Lactobacillus brevis* (LB7123 y LB5328) y un *Lactobacillus buchneri* (LN7125) seleccionados de estos estudios fueron eficaces para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilado de maíz de plantas enteras cuando se abrieron antes del día 30 (días 7 y 14). Se observaron diferencias obvias con respecto al control y cepas menos eficaces. Las tres cepas se avanzaron para su inclusión en los ensayos de ensilado de maíz de plantas enteras de 2012 para probarse individualmente y en combinación con las cepas homofermentativas comerciales actuales LP286 y LP329.

#### 2012 - Ensilaje de maíz (Tabla 2)

30 Los días de apertura 7 y 14, dieron como resultado diferencias biológicas y estadísticas entre el tratamiento con cepa única con LB7123 y el ensilado de control no inoculado. Las diferencias en los días 28 y 60 fueron numéricamente pero no estadísticamente mejores entre LB7123 y el control.

35 Hubo una tendencia continua para los tratamientos de combinación de LB5328+, LB7123+ y LN7125+ que respondieron positivamente los días 7 y 14. La apertura del día 7 dio como resultado una mejora numérica en la PMS aeróbica sobre el control, mientras que los tratamientos de combinación fueron significativamente mejores que el control en el día 14. Los tres tratamientos de combinación mantuvieron la mejora (30-40 %) sobre el control. Se observó una mejora similar en las pérdidas de materia seca aeróbicas con 11A44 y 11CFT.

40 Los productos comerciales no parecían estar mejorando activamente la PMS en los días 7, 14 o 28; sin embargo, 11A44 y 11CFT tuvieron un impacto positivo en la estabilidad aeróbica en el día 60, como se observó en ensayos de investigación anteriores.

#### 45 Estudios Combinados de Ensilaje de Maíz en 2011 y 2012- (Tabla 3)

50 En general, el rendimiento de los tratamientos de cepa única con LB5328, LB7123 y LN7125 durante dos años de ensayos de ensilado de maíz de plantas enteras (6 estudios, 24 silos/tmt), fue consistente en reducir la pérdida de materia seca aeróbica sobre ensilado de control no inoculado y productos comerciales actuales en aperturas antes de 28 días.

55 Los tratamientos con LB7123 y LN7125 fueron estadísticamente mejores que los tratamientos de control y comerciales en los días 7 y 14. LN7123, LN7125 y LN7125 también demostraron diferencias estadísticas del control en el día 14. Para los días 28 y 60, estas tres cepas individuales eran numéricamente mejores que el control y mostraron una estabilidad aeróbica equivalente a los productos comerciales 11A44, 11C33 y 11CFT.

### Sumario

60 Debido a la pérdida de materia seca aeróbica reducida que proporcionan estas cepas y las combinaciones con homofermentadores, se observan mejoras repetibles en las pérdidas de materia seca en la apertura temprana de forrajes ensilados de plantas enteras que proporcionan una ventaja económica para el productor que utiliza inoculantes específicamente seleccionados de *L. buchneri* o *L. brevis*.

65 **Tabla 1. Efecto de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus brevis* sobre las pérdidas de materia seca tras la exposición al aire en ensilado de maíz de plantas enteras ensilado durante varios periodos de tiempo.**

2011	Pérdida de MS- Días posteriores al ensilado
------	---

	7	14	28	60
Control	3,36 <sup>a</sup>	5,73 <sup>a</sup>	4,93 <sup>a</sup>	4,37 <sup>ab</sup>
1132	2,74 <sup>a</sup>	5,22 <sup>a</sup>	2,91 <sup>bc</sup>	5,77 <sup>a</sup>
11A44	3,71 <sup>a</sup>	5,76 <sup>a</sup>	3,19 <sup>abc</sup>	5,39 <sup>ab</sup>
11C33	2,99 <sup>a</sup>	5,39 <sup>a</sup>	4,26 <sup>ab</sup>	4,57 <sup>ab</sup>
11CFT	2,29 <sup>ab</sup>	4,75 <sup>ab</sup>	3,14 <sup>abc</sup>	4,39 <sup>ab</sup>
LB31	2,09 <sup>abc</sup>	5,41 <sup>a</sup>	3,52 <sup>abc</sup>	5,09 <sup>ab</sup>
LB4616	2,12 <sup>abc</sup>	4,41 <sup>abc</sup>	3,17 <sup>abc</sup>	5,04 <sup>ab</sup>
LB5328	1,95 <sup>abc</sup>	3,23 <sup>bc</sup>	2,40 <sup>c</sup>	3,88 <sup>ab</sup>
LB7123	0,94 <sup>bc</sup>	3,32 <sup>bc</sup>	2,67 <sup>bc</sup>	3,95 <sup>b</sup>
LN7125	0,51 <sup>bc</sup>	2,99 <sup>c</sup>	2,14 <sup>c</sup>	3,95 <sup>b</sup>

Tabla 2. Efecto de *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis* y combinaciones con homofermentadores sobre las pérdidas de materia seca tras la exposición al aire en ensilado de maíz de plantas enteras ensilado durante varios periodos de tiempo.

2012	Pérdida de MS- Días posteriores al ensilado			
	7	14	28	60
Control	2,91 <sup>ab</sup>	4,66 <sup>a</sup>	2,90 <sup>b</sup>	2,95 <sup>a</sup>
1132	2,94 <sup>ab</sup>	4,17 <sup>ab</sup>	2,97 <sup>b</sup>	2,35 <sup>ab</sup>
11A44	3,60 <sup>a</sup>	3,60 <sup>abcd</sup>	2,95 <sup>b</sup>	1,03 <sup>b</sup>
11C33	2,99 <sup>ab</sup>	3,89 <sup>abc</sup>	4,09 <sup>ab</sup>	2,70 <sup>a</sup>
11CFT	3,46 <sup>a</sup>	4,45 <sup>a</sup>	4,72 <sup>a</sup>	1,55 <sup>ab</sup>
LB5328	2,91 <sup>ab</sup>	3,37 <sup>abcd</sup>	3,89 <sup>ab</sup>	2,39 <sup>ab</sup>
LB7123	0,95 <sup>c</sup>	2,54 <sup>de</sup>	2,77 <sup>b</sup>	2,52 <sup>a</sup>
LN7125	2,20 <sup>b</sup>	3,39 <sup>abcd</sup>	3,32 <sup>ab</sup>	2,28 <sup>ab</sup>
LB5328+LP286+LP329	2,76 <sup>ab</sup>	2,80 <sup>bcde</sup>	2,82 <sup>b</sup>	2,02 <sup>ab</sup>
LB7123+LP286+LP329	2,20 <sup>b</sup>	1,85 <sup>e</sup>	3,31 <sup>ab</sup>	1,86 <sup>ab</sup>
LN7125+LP286+LP329	2,03 <sup>bc</sup>	2,70 <sup>cde</sup>	2,50 <sup>b</sup>	1,74 <sup>ab</sup>

5

Tabla 3. Efecto de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus brevis* sobre las pérdidas de materia seca tras la exposición al aire en ensilado de maíz de plantas enteras ensilado durante varios periodos de tiempo.

2011 y 2012 Combinados	Pérdida de MS- Días posteriores al ensilado			
	7	14	28	60
Control	3,10 <sup>ab</sup>	5,02 <sup>a</sup>	3,77 <sup>ab</sup>	3,66 <sup>a</sup>
11A44	3,76 <sup>a</sup>	4,72 <sup>a</sup>	2,98 <sup>ab</sup>	3,31 <sup>a</sup>
11C33	2,99 <sup>ab</sup>	4,67 <sup>a</sup>	4,17 <sup>a</sup>	3,63 <sup>a</sup>
11CFT	2,87 <sup>ab</sup>	4,44 <sup>ab</sup>	3,77 <sup>ab</sup>	3,03 <sup>a</sup>
LB5328	2,43 <sup>b</sup>	3,56 <sup>bc</sup>	3,00 <sup>ab</sup>	3,66 <sup>a</sup>
LB7123	0,94 <sup>c</sup>	2,82 <sup>c</sup>	2,72 <sup>b</sup>	3,20 <sup>a</sup>
LN7125	1,35 <sup>c</sup>	3,08 <sup>c</sup>	2,64 <sup>b</sup>	3,33 <sup>a</sup>

10 **Ejemplo 2: Cepas de *Lactobacillus* de Acción Rápida para Mejorar la Estabilidad Aeróbica del Ensilaje en Hierbas**

**Selección de la Cepa:**

15 Los cultivos de bacterias del ácido láctico heterofermentativas (252 aislados), tomados de la colección de cultivos microbianos de Pioneer Hi-Bred, se cultivaron en caldo De Man Rogosa Sharpe (caldo MRS; Difco™ *Lactobacilli* MRS; Becton Dickinson and Company, Sparks, MD 21152 EE. UU.), preparado según lo descrito por el fabricante, durante 24 a 48 horas. Se transfirió una parte alícuota de suspensión celular a un extracto de caldo de forraje de maíz de plantas enteras (mezcla 1:10 de forraje de maíz molido seco en agua, se esterilizó por autoclave, se esterilizó por

20 Se descubrieron e identificaron cepas del maíz o de las heces de muestras de ovejas alimentadas con maíz tomadas en Estados Unidos. En 2012, tres de los aislados se analizaron en césped inglés Europeo y en 2013 solo se analizaron dos aislados como cepas individuales y en combinación con las cepas homofermentativas comerciales actuales LP286 y LP329.

25

**Características de las Cepas Experimentales de Prueba:**

Cepa	ID de especie de ADNr	Fuente	Producción de gas
------	-----------------------	--------	-------------------

	16S		en MRS
LB7123	Lactobacillus brevis	Heces de oveja alimentadas con WPCS, Polk City, IA, 2008	gas positivo
LB5328	Lactobacillus brevis	WPCS, IA, 1995	gas positivo
LN7125	Lactobacillus buchneri	WPCS, Polk City, IA, 2008	gas positivo

**Prueba de campo:**

5 Cosecha de Hierba en 2012: El césped inglés Europeo se cosechó alrededor de Buxtehude, Alemania, el 22, 23 y 24 de mayo de 2012 en un intervalo de materia seca del 33-49 %.

Cosecha de Hierba en 2013: El césped inglés Europeo se cosechó alrededor de Buxtehude, Alemania, el 3, 4 y 6 de junio de 2013 en un intervalo de materia seca del 36-46 %.

10 **Tratamientos de ensilado de Césped Inglés Europeo en 2012:**

Inoculantes Comerciales de Hierba marca Pioneer®
<b>11A44</b>
<b>11G22</b>
<b>11GFT</b>
Cepas Experimentales de Prueba
<b>LB5328</b>
<b>LB7123</b>
<b>LN7125</b>

**Tratamientos de ensilado de Césped Inglés Europeo en 2013:**

Inoculantes comerciales de maíz para plantas enteras marca Pioneer®
<b>11A44</b>
<b>11GFT</b>
Cepas Experimentales de Prueba y Combinaciones
<b>LB7123</b>
<b>LN7125</b>
<b>LB7123 + LP286 + LP329</b>
<b>LN7125 + LP286 + LP329</b>

**Inoculación:**

15 en 2012 y 2013, se cultivaron cepas experimentales de prueba individuales, se liofilizaron internamente y se suministraron como cultivo en polvo seco. Los productos liofilizados comerciales y experimentales se suspendieron en agua y después todos los tratamientos se ajustaron a una concentración patrón de  $4,54 \times 10^7$ . Se aplicaron suspensiones de tratamiento usando una jeringa de 10 cc a un caudal de 1,0 ml/lb (453,6 g) de forraje. La dosis de aplicación para todos los tratamientos fue de  $1 \times 10^5$  UFC/g de forraje.

**Silos:**

25 Los silos de PVC se llenaron con 100 kg de MS/m<sup>3</sup> de hierba y se infundió aire durante 24 horas como se describe a continuación según los días de apertura.

Día de Apertura del Silo	Día de infusión de Aire las 24 horas
7	0
14	7
28	14
60	45

30 Estabilidad Aeróbica: Se usó el método de Honig (Proc. Of the Eurobac.Conf., P. Lingvall y S. Lindgren (ed.) (12-16 de agosto de 1986) Swed.Univ. of Agric. Sci. Grass and Forrage Report No. 3-1990.páginas 76-81.Uppsala, Suecia.) para medir la estabilidad aeróbica. Las pérdidas de materia seca aeróbicas (PMS) se estimaron a partir del aumento de la temperatura después de la exposición al aire según lo descrito por Honig.

**Resultados y Análisis:**

**Estabilidad Aeróbica**

5 Los tratamientos con lactobacilos heterofermentativos disminuyeron la pérdida de materia seca aeróbica y aumentaron el tiempo de calentamiento. Se observaron diferencias entre las cepas a lo largo del tiempo.

**2012 - Ensilaje de hierba (Tabla 1)**

10 La apertura de los silos de hierba en los días 14, 28 y 60 dio como resultado diferencias entre los tratamientos de cepa única con LB5328, LB7123 y LN7125 y el ensilado de control no inoculado. Estos tres tratamientos en los días 7, 14 y 28 fueron numéricamente mejores que los productos de control y comerciales.

15 Los productos comerciales no parecían reducir la PMS aeróbica en los días 7 o 14; sin embargo, para el día 28, 11A44 y 11G22 mejoraron significativamente sobre el control. Para el día 60, con la excepción de 11GFT, todos los tratamientos se mejoraron estáticamente sobre el control.

**2013 - Ensilaje de Hierba (Tabla 2)**

20 Los tratamientos de cepa única con LN7125 y LB7123 dieron como resultado una reducción considerable en la pérdida de materia seca aeróbica en comparación con el control no inoculado en todos los días de apertura probados. La combinación de LB7123 y las cepas de *L. plantarum* fue eficaz para reducir las pérdidas de materia seca aeróbicas en todos los días, mientras que las combinaciones de *L. plantarum* con LN7125 no fueron estadísticamente diferentes al control no inoculado.

25 Los productos comerciales tuvieron poco efecto sobre la pérdida de materia seca aeróbica hasta el día 90 posterior al ensilado. El tratamiento con 11A44 fue más eficaz en reducir las pérdidas de materia seca que el producto de combinación con 11G22.

**Sumario**

30 Debido a la pérdida de materia seca aeróbica reducida que proporcionan estas cepas y las combinaciones con homofermentadores, se observaron mejoras repetibles en las pérdidas de materia seca en la apertura temprana de forrajes ensilados de hierba que proporcionan una ventaja económica para el productor que utiliza inoculantes específicamente seleccionados de *L. buchneri* o *L. brevis*.

35 **Tabla 1. 2012 - Efecto de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus brevis* sobre las pérdidas de materia seca tras la exposición al aire en ensilado de hierba Europea ensilada durante varios períodos de tiempo.**

Hierba Europea en 2012	Pérdida de MS- Días posteriores al ensilado			
	7	14	28	60
Control	2,76 <sup>ab</sup>	7,10 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>	3,30 <sup>a</sup>
11A44	2,27 <sup>abc</sup>	4,3 <sup>ab</sup>	2,72 <sup>b</sup>	1,18 <sup>b</sup>
11G22	3,25 <sup>a</sup>	6,35 <sup>a</sup>	2,31 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>
11GFT	2,5 <sup>ab</sup>	6,05 <sup>a</sup>	6,07 <sup>a</sup>	3,42 <sup>a</sup>
LB5328	1,68 <sup>abc</sup>	2,41 <sup>b</sup>	2,72 <sup>b</sup>	0,77 <sup>b</sup>
LB7123	0,29 <sup>c</sup>	2,47 <sup>b</sup>	1,58 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>
LN7125	0,75 <sup>bc</sup>	2,34 <sup>b</sup>	2,02 <sup>b</sup>	0,11 <sup>b</sup>

<sup>abc</sup> dentro de un día, los valores con diferentes superíndices difieren en  $p \leq 0,05$ .

40 **Tabla 2. 2013 - Efecto de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus brevis* solos y en combinación con *Lactobacillus plantarum* sobre las pérdidas de materia seca tras la exposición al aire en ensilado de hierba Europea ensilada durante varios períodos de tiempo.**

Hierba Europea en 2013	Pérdida de MS- Días posteriores al ensilado			
	7	14	28	90
Control	7,11 <sup>a</sup>	6,46 <sup>ab</sup>	6,08 <sup>ab</sup>	1,77 <sup>a</sup>
11A44	3,54 <sup>abc</sup>	2,63 <sup>bcd</sup>	0,22 <sup>c</sup>	0,10 <sup>a</sup>
11GFT	5,77 <sup>ab</sup>	7,56 <sup>a</sup>	7,44 <sup>a</sup>	1,46 <sup>a</sup>

(continuación)

Hierba Europea en 2013	Pérdida de MS- Días posteriores al ensilado			
	7	14	28	90
LB7123	0,00 <sup>c</sup>	0,23 <sup>d</sup>	0,00 <sup>c</sup>	0,00 <sup>a</sup>
LN7125	1,25 <sup>ab</sup>	1,35 <sup>cd</sup>	0,11 <sup>c</sup>	0,00 <sup>a</sup>
LN7125+LP286+LP329	6,18 <sup>a</sup>	5,24 <sup>abc</sup>	3,52 <sup>bc</sup>	0,17 <sup>a</sup>
LB7123+LP286+LP329	0,44 <sup>c</sup>	1,08 <sup>cd</sup>	2,58 <sup>bc</sup>	0,46 <sup>a</sup>

<sup>abcd</sup> dentro de un día, los valores con diferentes superíndices difieren en  $p \leq 0,05$ .

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para su uso como inoculante de ensilado que comprende: *Lactobacillus buchneri* LN7125, o *Lactobacillus brevis* LB5328, o *Lactobacillus brevis* LB7123 o mezclas de los mismos y un vehículo adecuado.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición contiene:
- (a) de aproximadamente  $10^1$  a aproximadamente  $10^{11}$  organismos viables por gramo de peso húmedo de ensilado;
- (b) de aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^7$  organismos viables por gramo de peso húmedo de ensilado;
- 10 o
- (c) de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^6$  organismos viables por gramo de peso húmedo de ensilado.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde el vehículo es:
- 15 (a) líquido;
- (b) sólido; o
- (c) cualquiera de carbonato de calcio, almidón o celulosa.
4. Un cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus buchneri*, cepa LN7125, que tiene el Depósito de Patente N.º NRRL B-50733, o *Lactobacillus brevis*, cepa LB5328, que tiene el Depósito de Patente N.º NRRL B-50731, o *Lactobacillus brevis*, cepa LB7123, que tiene Depósito de Patente N.º NRRL B-50732.
- 20 5. Un método para tratar material vegetal previamente ensilado que comprende: añadir la composición de la reivindicación 1 al material vegetal previamente ensilado.
- 25 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el material vegetal es uno cualquiera de: hierba, maíz, alfalfa, trigo, legumbres, semillas oleaginosas o sorgo.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende almacenar el material vegetal tratado durante:
- 30 (a) veintinueve (29) días;
- (b) veintiocho (28) días;
- (c) catorce (14) días; o
- d) siete (7) días.
- 35 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el método de tratamiento es uno cualquiera de:
- (a) ensilar en una paca;
- (b) ensilar en una bolsa;
- 40 (c) ensilar en un búnker;
- (d) ensilar en una pila;
- (e) ensilar en un silo de duelas; y
- (f) ensilar en un silo.
- 45 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende añadir al ensilado al menos una cepa viable de la bacteria del ácido láctico homofermentativa *Lactobacillus plantarum*.