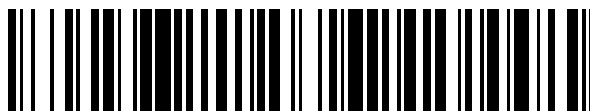


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 683**

51 Int. Cl.:

A23K 10/30 (2006.01)

A23L 3/3508 (2006.01)

A23K 30/15 (2006.01)

A23L 3/358 (2006.01)

A23K 10/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2021** **E 21170200 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2023** **EP 4079162**

54 Título: **Preparación de aditivos para ensilaje para suprimir microorganismos bacterianos no deseados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2023

73 Titular/es:

**KONSIL EUROPE GMBH (100.0%)
Martha-Brautzsch-Straße 13
06108 Halle (Saale), DE**

72 Inventor/es:

AUERBACH, HORST

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 952 683 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

Preparación de aditivos para ensilaje para suprimir microorganismos bacterianos no deseados

5 La invención se refiere a un aditivo para ensilaje así como un método para ensilar forraje.

10 El ensilaje se produce a partir de diversos forrajes. La mayoría de las veces, se ensilan pastos y leguminosas (trébol, alfalfa, frijoles, guisantes, vezas), así como ensilaje de maíz de cosecha entera y productos de mazorca de maíz (maíz con alto contenido de humedad, HMC, maíz-mazorca-mezcla, CCM, ensilado con cabezal) y cereales de cultivo integral. Se distingue entre una fase de almacenamiento en ausencia de aire (fermentación) hasta la apertura del silo (independientemente del tipo de silo) y una fase que inevitablemente sigue después de que el silo es abierto en presencia de aire durante el vaciado del silo para alimentación (lo que puede durar semanas o meses, dependiendo de las dimensiones del silo o cantidad de ensilaje y el ganado a alimentar).

15 Hasta aproximadamente finales de los años 80, el ácido fórmico (AF) puro o parcialmente regulado fue la referencia hasta el desarrollo de Cekafusil (Chemiekombinat Bitterfeld), un producto de 245 g/kg de nitrito de sodio (NaNO_2) y 165 g/kg de hexametilentetramina (algunas veces denominada hexamina), que no era en absoluto corrosivo para piel, ojos, metal, debido a su naturaleza como solución salina (pH 8-10). Esta solución todavía se comercializa hoy y es sin duda el aditivo de ensilaje mejor estudiado (>140 ensayos). En estas pruebas, las comparaciones con FA puro mostraron la misma eficacia. Se ha encontrado que básicamente no hay diferencia entre 3 litros por tonelada de Cekafusil (aplicación de 1500 g de ingredientes activos por tonelada de forraje) y 4 litros por tonelada de FA (85%) (4080 g de ingrediente activo por tonelada de forraje). El efecto se basa en los dos ingredientes activos diferentes que actúan en diferentes momentos del proceso de fermentación. NaNO_2 actúa en la fase de fermentación temprana (hasta aproximadamente 2 semanas como máximo) ya sea directamente a través de la molécula o a través de la conversión microbiana a NO_x , que a su vez se reduce a NH_3 . Después del comienzo espontáneo de la fermentación natural del ácido láctico por bacterias epifitas del ácido láctico presentes en el forraje (NaNO_2 a la concentración utilizada no tiene efecto inhibitorio sobre las bacterias ácido lácticas que ingresan al silo con el forraje), el pH disminuye de manera que el formaldehído y el NH_3 se liberan de la hexametilentetramina. El NH_3 permanece en el silo y el formaldehído inmediatamente se une a las superficies de las células bacterianas, previniendo la germinación y la multiplicación de esporas de *Clostridium* que pueden haber sobrevivido al ataque de NaNO_2 .

20 En principio, hay dos problemas en la producción de ensilaje que ocurren, pero casi nunca juntos: fermentaciones no deseadas en condiciones anaeróbicas por clostridios principalmente formadores de ácido butírico y degradadores de proteínas durante el almacenamiento del ensilaje en el silo O por levaduras/mohos bajo condiciones aeróbicas después de la apertura de los silos durante la alimentación. Se ha encontrado que los aditivos de ensilaje desarrollados más recientemente son bastante ineficaces para combatir los clostridios.

25 También, la hexametilentetramina (a veces también llamada hexamina) se ha utilizado en aditivos para ensilaje en el pasado. Sin embargo, se ha encontrado que las regulaciones alimentarias para animales no favorecen la hexametilentetramina en muchos países.

30 WO2011100956A2 describe un aditivo de ensilaje para el tratamiento de remolachas sin triturar.

WO2009034091A1 describe un aditivo de ensilaje para forraje.

35 DE4034749A1 describe una combinación de preparación y proceso para acidificar el forraje verde y prevenir los procesos de degradación aeróbica en el forraje fermentado utilizando bacterias del ácido láctico y formiato. No se utilizan nitritos.

40 DD300627A5 describe un aditivo de ensilaje que comprende nitrito y formiato, así como hexametilentetramina y C_2 - C_6 sales de ácido carboxílico, aplicadas en dosis extremadamente altas de mínimo 5 litros por tonelada de forraje.

US4079150A describe un agente de ensilar para plantas forrajeras y un método para fermentar plantas forrajeras.

45 DE4112866A1 describe un proceso para inhibir el crecimiento de listeria en el forraje.

50 GB1291837A describe el tratamiento del heno y la paja para inhibir el deterioro indeseable.

55 GB1483340A describe un aditivo líquido para ensilaje. Woolford sugiere en sus publicaciones que la hexametilentetramina tiene un efecto inhibitorio pronunciado (*in vitro* pruebas MIC) en clostridios, que es 10 veces más fuerte que el formiato (Woolford, M., J. Sci. Food Agric. 1975, 26, 219 - 228; Woolford, M. J. Sci. Food Agric. 1975, 26, 229 - 237; hexametilentetramina 0.14 g/l MIC, 2.3 g/l equivalente de ácido fórmico MIC, ambos medidos a pH 5).

60 El problema de acuerdo con la presente invención es proporcionar un aditivo para ensilaje que se dirija específicamente a los clostridios y que, no obstante, pueda evitar el uso de hexametilentetramina contra el perjuicio en el dominio público.

65

En una primera realización, el problema de acuerdo con la presente invención se soluciona mediante un aditivo para ensilaje que comprende:

- 5 a) 40 a 90% en peso de nitrito,
b) 10 a 60% en peso de formiato de amonio o sodio,

caracterizado porque comprende menos de 2% en peso de hexametilentetramina.

10 El alto contenido de nitrito en comparación con el estado de la técnica permite aplicar dosis menores al forraje debido al mayor contenido de principio activo contra clostridios. Sorprendentemente, se encontró que la hexametilentetramina se puede reemplazar por formiato y, opcionalmente, sustancias activas adicionales, sin pérdida de rendimiento.

15 El aditivo de ensilaje puede contener más nitrito que formiato en peso. Preferiblemente, la relación de nitrito a formiato está en una relación de 1.1:1 a 3:1, más preferiblemente de 1.3:1 a 2.5:1.

El contenido de nitrito puede estar en un rango de 50 a 80% en peso. El nitrito puede ser nitrito de amonio, nitrito de potasio o nitrito de sodio. Sin embargo, el nitrito de sodio es el más preferido.

20 El contenido de formiato puede estar en un rango de 15 a 50% en peso. El formiato puede ser formiato de amonio, formiato de potasio o formiato de sodio. Sin embargo, el formiato de sodio o el formiato de amonio son los más preferidos.

Preferiblemente, el nitrito es nitrito de sodio.

25 El aditivo de ensilaje puede comprender adicionalmente de 1 a 5% en peso de sorbato. El sorbato puede ser sorbato de sodio, sorbato de potasio o sorbato de amonio. Sin embargo, el sorbato preferiblemente es sorbato de potasio.

30 El aditivo de ensilaje puede comprender adicionalmente de 1 a 5% en peso de benzoato. El benzoato puede ser benzoato de sodio, benzoato de potasio o benzoato de amonio. Sin embargo, el benzoato preferiblemente es benzoato de sodio.

Preferiblemente, el aditivo de ensilaje comprende sorbato pero no benzoato o, por otro lado, benzoato pero no sorbato.

35 Preferiblemente, el aditivo de ensilaje comprende menos del 3% en peso de ácido propiónico o propionato, más preferiblemente sin ácido propiónico o propionato.

Preferiblemente, el aditivo de ensilaje comprende menos del 3% en peso de ácido láctico o sales del mismo, más preferiblemente sin ácido láctico.

40 Preferiblemente, el aditivo de ensilaje no comprende hexametilentetramina.

Preferiblemente, el aditivo de ensilaje comprende menos del 3% en peso de tetraformiato, más preferiblemente sin tetraformiato.

45 Preferiblemente, el aditivo de ensilaje comprende menos del 3% en peso de ácidos grasos o sales de los mismos, más preferiblemente sin ácidos grasos.

50 Preferiblemente, el aditivo de ensilaje comprende menos del 3% en peso de glicerina, más preferiblemente sin glicerina.

Preferiblemente, el aditivo de ensilado comprende menos del 3% en peso de formamidas, más preferiblemente sin formamidas.

55 Preferiblemente, el aditivo de ensilaje comprende menos del 3% en peso de ácido libre o sales del mismo, más preferiblemente sin ácido libre.

60 Una combinación de nitrito y amonio o formiato de sodio se puede usar para inhibir el crecimiento de clostridios. Los clostridios pueden desarrollarse especialmente con bajo contenido de materia seca (DM) en forrajes ricos en proteínas. Preferiblemente, esta combinación no se usa para ensilar remolachas porque los clostridios no pueden crecer en este sustrato de fermentación rápida alcanzando niveles de pH los cuales no soportan el desarrollo de clostridios muy rápidamente.

65 En otra realización, el problema según la presente invención se resuelve mediante un método de ensilar forraje que comprende la etapa de añadir el aditivo de ensilaje según la presente invención al forraje en una cantidad de 200 a 1500 g por tonelada de forraje, preferiblemente en una cantidad de 300 a 1200 g por tonelada de forraje.

El aditivo de ensilaje se puede agregar como una solución acuosa.

La solución acuosa puede comprender de 200 a 450 g del aditivo de ensilaje por litro de agua.

La solución acuosa del aditivo de ensilaje se puede agregar al forraje en una cantidad de 1 a 3 litros por tonelada de forraje. Esto da como resultado costes más bajos y cantidades más bajas para enviar y manejar.

El forraje utilizado en el método puede ser preferentemente hierba verde y/o forraje verde.

El método se puede aplicar al ensilaje almacenado no solo en bolsas de plástico, sino también en silos de torre y silos horizontales, incluyendo búnkeres amurallados, abrazaderas, fosos transitables.

El tiempo de espera entre el tapado del silo y la apertura del silo puede estar en un rango de 2 a 8 semanas, dependiendo del nivel de humedad al ensilar, en el método de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos

Otras realizaciones prácticas y ventajas de la invención se describen a continuación en la figura y los ejemplos:

Figura 1: Relación entre la concentración de ácido butírico en ensilajes de alfalfa y dactilo (n=24, Auerbach et al., 2016) y las pérdidas de materia seca (DM) durante la fermentación

La Figura 1 muestra la relación entre la concentración de ácido butírico en ensilajes elaborados a base de alfalfa y dactilo (n=24, Auerbach et al., 2016) y las pérdidas de materia seca durante la fermentación.

Ejemplos comparativos y antecedentes generales

Perdidas cuantitativas (Borreani et al., 2018, J. Dairy Sci., 101:3952-3979, doi: 10.3168/jds.2017-13837) y cualitativas (Borreani et al., 2018, J. Dairy Sci., 101:3952-3979, doi: 10.3168/jds.2017-13837; Auerbach y Nadeau, 2020, Agronomy, 10, 1229-; doi:10.3390/agronomy10091229) en la producción de ensilaje a partir de un rango de forrajes desde el campo hasta el almacenamiento en el silo y la alimentación posterior hasta la ingesta por parte de los rumiantes afectan significativamente la ingesta y el rendimiento animal y, por lo tanto, la rentabilidad de la granja. De todas las rutas metabólicas facilitadas por los microorganismos no deseados del ensilaje, las que dan como resultado la formación de ácido butírico y la degradación de proteínas por los clostridios y la formación de etanol por las levaduras son las causas más destacadas asociadas con las mayores pérdidas de DM durante el almacenamiento anaeróbico (Figura 1, donde DM significa materia seca). Según revisado por Rooke y Hatfield (2003), Silage Science and Technology, número 42 de la serie Agronomy, American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI, EE. UU., páginas 95-140, la eficiencia del proceso de fermentación del ensilaje se ve afectada negativamente por la actividad de la levadura y clostridios, como se refleja en la recuperación de DM de tan solo el 51% (metabolismo de la levadura) y el 66% (metabolismo de los clostridios), respectivamente, cuando se usa glucosa como sustrato.

Ejemplos comparativos: Comparación de ácido fórmico frente a NaNO_2 /Hexametilentetramina (Cekafusil/KOFASIL LIQUID/Xtrasil classic, todos 245 g/kg NaNO_2 y 165 g/kg de hexametilentetramina, o 300 a/L NaNO_2 /200 g/L, densidad 1.23 kg/L o 1.23 g/cm³)

Se formó un aditivo acuoso para ensilaje añadiendo los componentes mencionados (típicamente dados en g de componente por kg de solución) al agua y formando una solución. Esta solución, luego se agregó a y se mezcló con el forraje (generalmente se da en litros de aditivo de ensilaje por tonelada de forraje en L/t), que luego fue subsecuentemente ensilado.

- Los resultados de numerosas pruebas en un amplio rango de forrajes templados (Tabla 1) mostraron que 3 L/t (litros de aditivo de ensilaje por tonelada de forraje) de mezcla no corrosiva de NaNO_2 (300 g/L) y hexametilentetramina (200 g/L), dando un total de 1500 g de ingredientes activos por tonelada de forraje, fueron tan efectivos contra los clostridios como el ácido fórmico puro y corrosivo (85%) aplicado a 4 L/t (=4,080 g/t, densidad: 1.20 g/cm³).

- Los resultados en pastos tropicales (Tabla 2) mostraron el mismo efecto que en forrajes templados (Universidad de Maringa, Brasil, citado por Auerbach y Nadeau, 2019, Actas del VI Simposio Internacional sobre Calidad y Conservación de Forrajes, 6-7 de noviembre de 2019, Piracicaba, Brasil, páginas 49-88, ISSN: 2175-4624).

- Conclusión: La NaNO_2 /Hexametilentetramina es igual de eficaz que el ácido fórmico puro (85%) pero con mejores propiedades de manipulación (no corrosivo para ojos, piel, metal) y con una tasa de aplicación más baja de ingredientes activos totales (1500 g/t para combinado de NaNO_2 / Hexametilentetramina y 4080 g/t de ácido fórmico puro).

La Tabla 1 muestra los efectos de los aditivos químicos en las pérdidas de materia seca (DM) durante la fermentación, la producción de ácido butírico y los conteos de clostridios (Weiss-bach, 2010a, citado por Auerbach y Nadeau, 2019, Proceedings of the VI International Symposium on Forage Quality y Conservación, 6-7 de noviembre de 2019, Piracicaba, Brasil, páginas 49-88, ISSN: 2175-4624).

5

Parámetro	Control	Nitrito/Hexametilentetramina ¹ (3 l/t)	Ácido fórmico (85%) (4 l/t)
pérdida de DM ² (%)	11.0	7.1*	6.2*
Frecuencia de ensilajes con bajas pérdidas de DM ³ (%)	28	70*	73*
Contenido de ácido butírico (% materia fresca) ²	1.17	0,35*	0,45*
Frecuencia de ensilajes libres de ácido butírico ⁴ (%)	27	74*	67*
Proporción de ensilajes con bajos recuentos de esporas ⁵ (%)	44	71*	43

¹que contiene nitrito de sodio (300 g/L) y hexametilentetramina (200 g/L); ²n=363, pérdida de ³DM ≤ 8%, n=291; ⁴ácido butírico < 0,2% de materia fresca (FM); ⁵≤ 1000 clostridios (MPN)/g, n=75; * indica diferencias significativas de tratamiento frente a control en P < 0,05.

La Tabla 2 muestra los efectos de los aditivos en la fermentación y las pérdidas por materia seca (DM) de pastos tropicales (*Panicum maximo cv. Mombaça*) (Universidad de Maringá, Paraná, Brasil, inédito).

Artículo	Control	cáscaras de soja ¹	Nitrito de sodio ²	Nitrito de sodio + Hexametilentetramina ³	Ácido fórmico ⁴	SEM	valor p
pH	4.60 ^{bc}	4.89 ^a	4.66 ^b	4.79 ^{ab}	4.44 ^C	0.053	<0.01
Pérdida de DM, %	15.8 ^a	12.9 ^b	9.2 ^C	6.5 ^d	7.1 ^d	0.07	<0.01
Ácido láctico (% de DM)	0.20 ^C	0.92 ^c	1.72 ^b	2.99 ^a	3.71 ^a	0.323	<0.01
NH ₃ -N (% de DM)	0.26 ^a	0.24 ^a	0.21 ^a	0.22 ^a	0.13 ^b	0.014	<0.01
NH ₃ -N (% de DM) ⁵	0.26 ^a	0.24 ^a	0.17 ^b	0.09 ^C	0.13 ^{bc}	0.014	<0.01

¹100 kg/t; ²1 kg/t; ³1 kg/t de nitrito de sodio + 0.65 kg/t de hexametilentetramina; ⁴85%, 4 L/t; ⁵corregido por la adición de nitrógeno por aditivos.

10

Ejemplo 1

Reemplazo de hexametilentetramina por otros activos, que no se degradan durante la fermentación y no son volátiles (por ejemplo formiato, sorbato, benzoato):

15 Auerbach et al. (2016), 17th Congreso Internacional sobre Conservación de Forrajes, 27-29 de septiembre de 2017, Sary Smokovec, High Tatras, páginas 116-117

La Tabla 3 muestra la fermentabilidad de los forrajes (alfalfa, *Medicago sativa*; dactilo, *Dactylis glomerata*) antes de ensilar (Medias de 3 repeticiones ± desviación estándar entre paréntesis).

20

Especies forrajeras	DM ¹	CP ²	CF ³	CA ⁴	WSC ⁵	BC ⁶	FC ⁷
	(g/kg)	(g kg/DM)					
Alfalfa	231	244	251	182	42	102	26
	(0.4)	(5.3)	(8.9)	(6.6)	(0.9)	(3.5)	(0.6)

ES 2 952 683 T3

Dactilo	200	187	274	132	40	99	23
	(3.0)	(9.6)	(7.1)	(2.3)	(13.6)	(2.7)	(0.9)

¹materia seca; ²proteína cruda; ³fibra cruda; ⁴ceniza cruda; ⁵carbohidratos solubles en agua; ⁶capacidad reguladora, g ácido láctico/kg DM; ⁷coeficiente de capacidad de fermentación=DM+8*WSC/BC

Evaluación de forrajes con respecto a la fermentabilidad: ambos forrajes fueron muy difíciles de ensilar (alto riesgo de desarrollo de clostridios) según la Sociedad Agrícola Alemana (DLG) (2018): Directrices de ensayo de la DLG para la concesión y el uso de la marca de calidad de la DLG para agentes de ensilar. Para ser citado como: DLG TestService GmbH., 2018. "Directrices de ensayo de la DLG para la concesión y el uso de la marca de calidad de la DLG para agentes de ensilar":

- difícil de ensilar: FC<35

10 • forrajes moderadamente difíciles a fáciles de ensilar en el rango inferior de contenido de materia seca: FC≥35, DM<35%

- forrajes moderadamente difíciles a fáciles de ensilar en el rango inferior de contenido de materia seca: FC≥35, DM ≥ 35 a ≤50%

15

Tratamiento	DML ¹	pH	NH ₃ -N ²	LA ³	AA ⁴	BA ⁵	EtOH ⁶	Bam ⁷
Lucerna (<i>Medicago sativa</i>)								
sin aditivo	12.3 ^a	6.23 ^a	36.0 ^a	1.6 ^b	34,0	93.0 ^a	11.0 ^a	6.4 ^a
XC	6.6 ^b	4.88 ^b	12.6 ^b	74.1 ^a	39.0	2.0 ^b	5.7 ^b	2.4 ^b
XFS	6.6 ^b	4.84 ^b	13.1 ^b	74.6 ^a	35.5	0.6 ^b	5.9 ^b	2.4 ^b
XFB	6.6 ^b	4.85 ^b	13.5 ^b	71.8 ^a	35.7	0.2 ^b	5.4 ^b	2.4 ^b
SEM	0.12	0.047	1.58	2.18	1.70	3.49	0.52	0.39
Significado	***	***	***	***	ns	***	***	***
Dactilo (<i>Dactylis glomerata</i>)								

Resultados del Ejemplo 1

20 Se formó un aditivo acuoso para ensilaje añadiendo los componentes mencionados (típicamente dados en g de componente por kg de solución) al agua y formando una solución. Luego, esta solución se agregó y se mezcló con el forraje (normalmente dado en litros de aditivo de ensilaje por tonelada de forraje en L/t), que posteriormente se ensiló. Las siguientes tablas muestran las pérdidas de DM (materia seca), que reflejan la eficiencia del proceso de fermentación, el patrón de fermentación, la degradación de proteínas y la formación de aminas biogénicas.

25 La Tabla 4 muestra los efectos de los aditivos químicos para ensilaje que contienen nitrito de sodio en combinación con hexametilentetramina (XC), formiato de amonio/sorbato de potasio (XFS) o formiato de sodio/benzoato de sodio sobre la fermentación y la producción de amina biogénica en ensilaje de alfalfa y dactilo almacenados durante >300 días (Auerbach et al., 2016).

sin aditivo	11.1 ^a	5.85 ^a	23.0 ^a	2.1 ^b	18.1 ^b	54.4 ^a	10.2 ^b	14.1 ^a
XC	7.5 ^b	5.00 ^b	11.9 ^b	39.7 ^a	33.2 ^a	0.1 ^b	12.6 ^a	2.3 ^b
XFS	7.5 ^b	4.94 ^b	14.2 ^b	37.7 ^a	36.6 ^a	0.5 ^b	11.1 ^{ab}	2.0 ^b
XFB	7.5 ^b	4.90 ^b	14.8 ^b	38.9 ^a	36.7 ^a	0 ^b	11.2 ^{ab}	2.6 ^b
SEM	0.03	0.097	0.19	0.84	1.15	1.72	0.37	0.50
Significado	***	***	***	***	***	***	*	***

¹pérdidas de materia seca durante la fermentación, %; ²% de N-total, corregido por la adición de N por los aditivos; ³ácido láctico, g/kg DM; ⁴ácido acético, g/kg DM; ⁵suma de ácidos n- e iso-buítricos, ácidos n- e iso-valérico y ácido n-caproico, g/kg DM; ⁶etanol, g/kg DM; ⁷aminas biogénicas totales comprendidas por putrescina, cadaverina, histamina, feniletilamina y tiramina, g/kg DM; los valores en las columnas dentro de las especies forrajeras que llevan diferentes superíndices difieren en $P < 0,05$ (prueba de Tukey); * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ns no significativo.
 XC: ejemplo comparativo (control positivo = referencia), Xtrasil clasico (composición 245 g/kg NaNO₂, 165 g/kg hexametilentetramina)
 XFS: composición 245 g/kg NaNO₂, 100 g/kg formiato de amonio, 20 g/kg sorbato de potasio
 XFB: composición 245 g/kg NaNO₂, 67 g/kg formiato de sodio, 33 g/kg benzoato de sodio

Conclusiones de la Tabla 4:

- todos los aditivos químicos redujeron las pérdidas de DM y la degradación de proteínas y mejoraron la calidad de la fermentación del ensilaje en comparación con el ensilaje sin tratar

- no hay diferencia en el rendimiento entre NaNO₂/hexametilentetramina y otros aditivos con respecto a todos los rasgos probados, por lo tanto, se permite la declaración de que la hexametilentetramina puede ser reemplazada por formiato/sorbato o formiato/benzoato a tasas de aplicación muy similares de ingredientes activos totales

Ejemplo 2

Comparación entre NaNO₂ (245 g/kg) / hexametilentetramina (165 g/kg) (XC) aplicado a 3 L/t y composiciones amparadas por las reivindicaciones de la invención:

- XFS 245 g/kg NaNO₂ + 100 g/kg formiato de amonio + 20 g/kg sorbato de potasio
- XFB 245 g/kg NaNO₂ + 67 g/kg formiato de sodio + 33 g/kg benzoato de sodio

Se utilizaron las siguientes condiciones:

- 7 ensayos con pastos, alfalfa, centeno de corte temprano y una mezcla de avena y alfalfa,
- duración de la fermentación > 90 días

La Tabla 5 muestra los efectos de los aditivos químicos para ensilaje que contienen nitrato de sodio (245 g/kg) en combinación con hexametilentetramina (165 g/kg) (XC), formiato de amonio (100 g/kg) y sorbato de potasio (20 g/kg). (XFS), o formiato de sodio (67 g/kg) y 33 g/kg de benzoato de sodio (XFB), aplicados a razón de 2 L/t, sobre las pérdidas de materia seca (DM) durante la fermentación en ensilajes de pastos, centeno de corte temprano, alfalfa o una mezcla de avena/alfalfa almacenada durante >90 días (Medias de mínimos cuadrados (LSmeans) de 3 repeticiones por tratamiento, error estándar de la media entre paréntesis). Meta-análisis de 7 ensayos.

Tratamiento	Pérdida de DM durante la fermentación (%)
sin aditivo	6.1 (0.22)
XC	4.8 (0.22)
XFB	4.9 (0.22)
XFS	5.0 (0.23)
Contrastes sin aditivo frente a XC	<i>Significancia estadística</i>
	$P < 0.001$
sin aditivo frente a XFB	$P < 0.001$
sin aditivo frente a XFS	$P < 0.001$
XC frente a XFB	insignificante ($P > 0.05$)
XC frente a XFS	insignificante ($P > 0.05$)
XFB frente a XFS	insignificante ($P > 0.05$)

Conclusiones de la Tabla 5:

- todos los aditivos químicos redujeron las pérdidas de DM en comparación con el ensilaje sin tratar

• sin diferencias estadísticamente significativas entre NaNO₂/ hexametilentetramina y otros aditivos. Por lo tanto, se permite la declaración de que la hexametilentetramina puede ser reemplazada por formiato/sorbato o formiato/benzoato a una tasa de aplicación de ingredientes activos totales muy similar o incluso menor que XC porque la densidad es mayor que la de XFB/XFS, 1.23 g/cm³ frente a aproximadamente 1.20 g/cm³ para ambas invenciones

5

• Para comparación - concentración de ingredientes activos totales:

◦ XC: 410 g/kg

10 ◦ XFB: 345 g/kg

◦ XFS: 365 g/kg.

Ejemplo 3

15

Este ejemplo es una comparación entre NaNO₂ (245 g/kg)/hexametilentetramina (165 g/kg) aplicado a 3 L/t y fórmula amparada por las reivindicaciones de la invención (composición 245 g/kg NaNO₂ + 100 g/kg formiato de sodio + 20 g/kg sorbato de potasio) al ensilar, forrajes marchitos con bajo contenido de DM y muy alta concentración de cenizas (las cenizas reflejan el nivel de contaminación del suelo donde se encuentran las esporas de clostridios), por lo tanto, alto riesgo de contaminación por clostridios de forrajes

20

• pastizales permanentes clasificados como difíciles de ensilar (FC<35), centeno de corte temprano clasificado como moderadamente difícil a fácil de ensilar forrajes en el rango más bajo de contenido de materia seca: FC≥35, DM<35%

25

La Tabla 6 muestra la fermentabilidad de los forrajes (pastizales permanentes compuestos principalmente por especies de *Lolium*; centeno de corte temprano, cereales de *Secale*) antes de ensilar (Medias de 3 repeticiones ± desviación estándar entre paréntesis).

Especies forrajeras	DM ¹ (g/kg)	CP ² (g kg/DM)	CF ³	CA ⁴	WSC ⁵	BC ⁶	FC ⁷
Pastizales permanentes	228 (1.2)	244 (5.3)	240 (7.0)	182 (4.1)	67 (6.4)	48 (0.8)	34 (1.3)
centeno de corte temprano	228 (3.6)	168 (4.2)	239 (3.9)	202 (10.4)	85 (2.7)	44 (0.4)	38 (0.9)

¹materia seca; ²proteína cruda; ³fibra cruda; ⁴ceniza cruda; ⁵carbohidratos solubles en agua; ⁶capacidad reguladora, g ácido láctico/kg DM; ⁷coeficiente de capacidad de fermentación=DM +8*WSC/BC

30

La Tabla 7 muestra los efectos de los aditivos químicos para ensilaje que contienen nitrito de sodio (245 g/kg) en combinación con hexametilentetramina (165 g/kg) (XC) o formiato de sodio (100 g/kg) y sorbato de potasio (20 g/kg) (XFS), aplicado a diferentes tasas de aplicación, sobre las pérdidas de materia seca (DM) durante la fermentación en ensilaje elaborado a partir de pastizales permanentes y centeno de corte temprano almacenado durante >90 días (medias de mínimos cuadrados de 3 repeticiones del tratamiento).

Ensayo	Tratamiento (tasa de aplicación)	Pérdida de DM durante la fermentación (%)
Pastizales permanentes	sin aditivo	7.5 ^a
(DM al ensilar: 228g/kg)	XC (2 L/t)	4.5 ^b
	XC (3 L/t)	5.0 ^b
	XFS (2 L/t)	4.5 ^b
	XFS (3 L/t)	4.6 ^b
	Error estándar de la media	0.129
	valor p	<0.001
centeno de corte temprano	sin aditivo	4.8 ^a
(DM al ensilar: 228g/kg)	XC (2 L/t)	4.2 ^b
	XC (3 L/t)	4.2 ^b

ES 2 952 683 T3

Ensayo	Tratamiento (tasa de aplicación)	Pérdida de DM durante la fermentación (%)
	XFS (2 L/t)	3.9 ^c
	XFS (3 L/t)	3.8 ^c
	Error estándar de la media	0.002
	valor p	<0.001

^{a-c} Las medias de mínimos cuadrados dentro de la prueba, a diferencia de los superíndices, difieren en $P < 0.05$ (procedimiento GLM de SAS, versión 9.4, Cary, NC, EE. UU.; prueba de Tukey)

Conclusiones de estos 2 ejemplos en la tabla 7:

- 5 • en comparación con sin aditivo (sin tratar), las pérdidas de materia seca se reducen con todos los aditivos independientemente de la tasa de aplicación
- XFS es al menos tan bueno como XC, lo que corrobora aún más la suposición de que la hexametilentetramina puede reemplazarse por formiato/sorbato
- 10 Las características de la invención descritas en la presente descripción, en los dibujos así como en las reivindicaciones pueden ser esenciales, tanto individualmente como en cualquier combinación, para la realización de la invención en sus diversas realizaciones. La invención no se limita a las realizaciones descritas. Puede variar dentro del alcance de las reivindicaciones y teniendo debidamente en cuenta los conocimientos del experto en la materia.

REIVINDICACIONES

1. Aditivo de ensilaje que comprende:
- 5 a. 40 a 90% en peso de nitrito,
b. 10 a 60% en peso de formiato de amonio o sodio,
- caracterizado porque comprende menos del 2% en peso de hexametilentetramina.
- 10 2. Aditivo para ensilaje según la reivindicación 1, caracterizado porque el contenido de nitrito está en un rango de 40 a 80% en peso.
3. Aditivo de ensilaje según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende más nitrito que formiato en peso.
- 15 4. Aditivo de ensilaje según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque además comprende de 1 a 5% en peso de sorbato.
5. Aditivo de ensilaje según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende adicionalmente de 1 a 5% en peso de benzoato.
- 20 6. Aditivo de ensilaje según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el nitrito es nitrito de sodio.
- 25 7. Método de ensilado de forraje que comprende la etapa de adicionar al forraje el aditivo de ensilaje según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 al forraje en una cantidad de 200 a 1500 g por tonelada de forraje.
8. Método según la reivindicación 7, caracterizado porque el aditivo de ensilaje se agrega como una solución acuosa.
- 30 9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque la solución acuosa comprende de 200 a 450 g del aditivo de ensilaje por litro de agua.
10. Método según la reivindicación 8 o 9, caracterizado porque la solución acuosa del aditivo de ensilaje se agrega al forraje en una cantidad de 1 a 3 litros por tonelada de forraje.
- 35

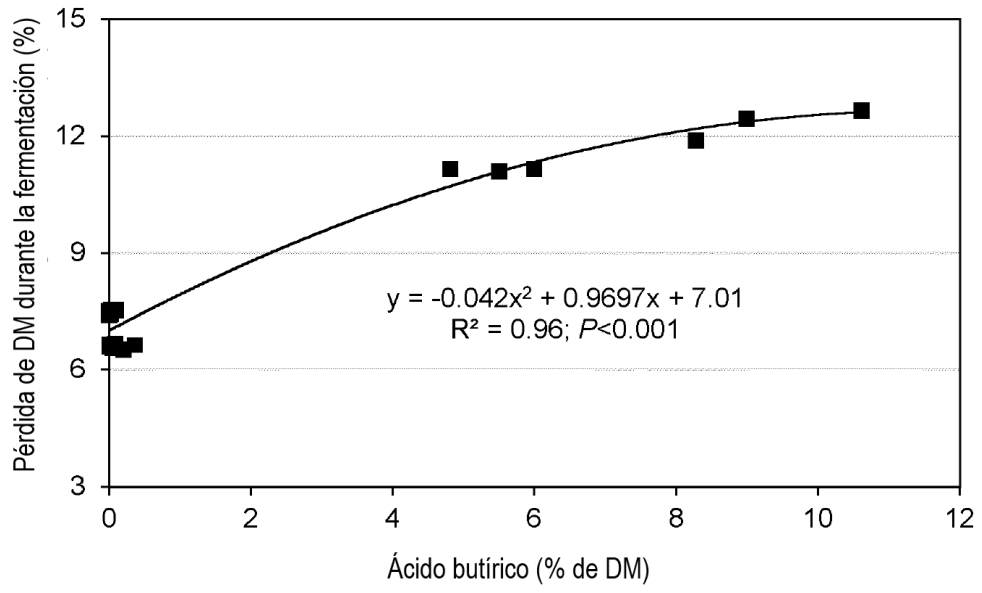


Fig. 1