

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 673**

51 Int. Cl.:

**A23K 1/00** (2006.01)

**A23K 1/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2009 E 09815204 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2348880**

54 Título: **Procedimiento para usar una cepa de Bacillus subtilis para potenciar la salud animal**

30 Prioridad:

**17.09.2008 US 192436 P**

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

**28.01.2015**

73 Titular/es:

**BAYER CROPSCIENCE LP (100.0%)  
T.W. Alexander Drive  
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**SCHMIDT, JOSEPH EARL y  
JIMENEZ, DESMOND RITO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 527 673 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

Procedimiento para usar una cepa de *Bacillus subtilis* para potenciar la salud animal

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de los probióticos y a su capacidad para potenciar la salud animal o la condición física general de los animales.

**Antecedentes de la invención**

10 El género *Bacillus* comprende numerosas bacterias formadoras de endoesporas que tienen múltiples usos en los campos agrícola y de nutrición animal, entre otros. Actualmente se comercializan varias cepas de *Bacillus* para su uso como probióticos en el pienso como alternativa a los antibióticos. Estos probióticos potencian la salud animal, incluyendo la mejora del crecimiento animal y la eficacia alimentaria, modulando la flora gastrointestinal. Se ha incrementado el uso de dichos probióticos debido a las preocupaciones por los residuos de los antibióticos en los productos animales para consumo humano y el desarrollo de resistencia a los antibióticos. Se han llevado a cabo trabajos en los últimos años para cribar bacterias formadoras de esporas para su uso como probióticos. Aunque varios productos comerciales contienen cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, y *Bacillus coagulans*, dicho cribado revela que no todas las cepas de *Bacillus* son aditivos alimentarios eficaces. Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 00/29426 A1 describe el sobrenadante del medio en el que se hizo crecer la cepa OST 713 para su uso para someter a prueba la actividad antiinsecticida de la cepa. La solicitud de patente de EE. UU. 2003/147923 describe composiciones y procedimientos correspondientes de uso de esporas de la cepa 168 de *Bacillus subtilis* [número ATCC 23857] para estimular y/o potenciar la respuesta inmunitaria en mamíferos. Marrone (Barriers to adoption of biological control agents and biological pesticides. CAB Reviews: Perspectives in agriculture. Veterinary Science, nutrition and natural resources, Vol. 2, N.º 51, 2007) describe QST de *Bacillus subtilis* como ejemplo de una acción sinérgica de un bioplaguicida cuando se combina con un plaguicida químico.

**Sumario de la invención**

25 La presente invención proporciona una composición que comprende *Bacillus subtilis* QST713 (número de acceso NRRL: B21661) o un mutante de *Bacillus subtilis* QST713, en la que el mutante tiene todas las características identificativas de *Bacillus subtilis* QST173, en la que el mutante tiene una identidad de secuencia de ADN para *Bacillus subtilis* QST713 de al menos un 95 % para potenciar la salud de un animal distinto de insecto y distinto de ser humano, en la que se incrementa la eficacia de la utilización alimentaria o ganancia de peso del animal distinto de insecto y distinto de ser humano. Se divulga en la invención que la cepa *Bacillus subtilis* QST713 cuando se administra a un animal, potencia la salud de dicho animal. Específicamente, la presente invención se refiere a la potenciación de la salud de animales distintos de insectos y distintos de seres humanos o para la mejora de la condición física general de dichos animales alimentando a dichos animales, en el pienso o agua potable (y no a través de alimentación forzada), con composiciones que comprenden (i) *Bacillus subtilis* QST 713, (ii) un mutante de (i), una preparación libre de células de (i) o (ii), o un metabolito de (i) o (ii). En un modo de realización, la composición de la presente invención comprende *Bacillus subtilis* 713 o mutantes del mismo y metabolitos producidos por las bacterias. En otro modo de realización, la composición comprende *Bacillus subtilis* QST713 principalmente en su forma de spora.

40 En algunos modos de realización de la presente invención, las composiciones se administran a animales en el pienso durante múltiples días a lo largo de la vida del animal o durante etapas o partes particulares de la vida del animal. Por ejemplo, en algunos modos de realización, las composiciones se administran sólo en una dieta de iniciación (starter) o sólo en una dieta de finalización (finisher) de animales de granja.

45 Las composiciones de la presente invención se usan para incrementar la ganancia de peso de un animal, para incrementar la eficacia de la utilización de pienso, y se pueden usar para reducir la morbilidad, para incrementar la resistencia a enfermedades, para incrementar las tasas de supervivencia, para incrementar la respuesta inmunitaria del animal y para mantener la microflora intestinal sana. En un modo de realización, la presente invención se usa para ayudar al restablecimiento del equilibrio sano de la microflora intestinal después de la administración de un ciclo de antibióticos con fines terapéuticos.

50 En el presente documento se reivindica también una composición para incrementar la eficacia de la utilización de pienso o la ganancia de peso de un animal distinto de insecto y distinto de ser humano que comprende (i) *Bacillus subtilis* QST713 (número de acceso NRRL: B21661) o un mutante de *Bacillus subtilis* QST713, en la que el mutante tiene todas las características identificativas de *Bacillus subtilis* QST173, en una cantidad que es eficaz para incrementar la eficacia de la utilización de pienso o ganancia de peso del animal y (ii) al menos un ingrediente de pienso que comprende carbohidrato para pienso y proteína para pienso, en la que el mutante tiene una identidad de secuencia de ADN para *Bacillus subtilis* QST713 de al menos un 95 %, en la que la cantidad eficaz del *Bacillus subtilis* QST713 es de aproximadamente  $1 \times 10^3$  CFU/g pienso a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  CFU/g pienso. Una composición usada en la presente invención comprende *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes del mismo y se administra a un animal a una tasa de aproximadamente  $1 \times 10^3$  CFU/g pienso o ml de agua potable, o aproximadamente  $1 \times 10^4$  CFU/g pienso o ml de agua potable o aproximadamente  $1 \times 10^5$  CFU/g pienso o ml de agua potable, o aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/g pienso o ml de agua potable, o aproximadamente  $1 \times 10^7$  CFU/g pienso o ml de agua potable, o aproximadamente  $1 \times 10^8$

CFU/g pienso o ml de agua potable, o aproximadamente  $1 \times 10^9$  CFU/g pienso o ml de agua potable, o aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  CFU/g pienso o ml de agua potable, o aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/g pienso o ml de agua potable.

5 En otro modo de realización, las composiciones de la presente invención se administran o se dan como pienso a un animal en una cantidad eficaz para disminuir el crecimiento de bacterias patógenas en el intestino del animal. Dichas bacterias patógenas incluyen *Clostridia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y *Vibrio*. De forma relacionada, la presente invención se puede usar para disminuir la cantidad de bacterias patógenas excretadas en las heces del animal. La presente invención también se puede usar para mantener o incrementar el crecimiento de bacterias beneficiosas, tales como bacterias ácido-lácticas, en el intestino del animal. Al disminuir las bacterias patógenas y/o incrementar o mantener las bacterias beneficiosas, las composiciones de la presente invención pueden mantener una microflora intestinal sana general.

15 Las composiciones de la presente invención se pueden usar para todos los animales distintos de seres vivos y distintos de insectos. Los animales que se pueden beneficiar de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aves, cerdo, rumiantes, mascotas y animales exóticos, animales de zoológico, animales acuáticos y caballos, entre otros. En un modo de realización, los animales son animales de granja, que se crían para el consumo o como productores de alimento, tales como pollos de engorde y gallinas productoras de huevos.

20 La presente invención también proporciona composiciones que están adaptadas para potenciar la salud del animal o para mejorar la condición física del animal. Por tanto, las composiciones de la presente invención pueden incluir *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, preparaciones libres de células de los mismos o metabolitos de los mismos y vehículos que hagan adecuadas estas composiciones para alimentar a animales como aditivo de pienso o como aditivo para agua potable. La *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, y posiblemente preparaciones libres de células de los mismos o metabolitos de los mismos se formulan con ingredientes de pienso, incluyendo proteína para pienso y carbohidratos para pienso. Dichas combinaciones pueden estar en forma de pellas que se extrudan a través de procedimientos de granulación estándar.

25 Las composiciones de la presente invención también comprenden combinaciones de *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, preparaciones libres de células de QST713 o sus mutantes y metabolitos de QST713 y sus mutantes con otros probióticos y/o con prebióticos.

30 En el presente documento también se divulga un procedimiento para preparar un pienso que contiene un producto microbiano de alimentación directa que comprende añadir esporas de *Bacillus subtilis* QST713 en una cantidad eficaz para potenciar la salud animal después de alimentar a los animales con componentes de pienso estándar, tales como carbohidratos y proteínas, antes del procedimiento de granulado.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados de una prueba de preparación libre de células de *Bacillus subtilis* QST713 para determinar la eficacia frente a varias cepas aisladas de *Clostridia*.

35 La figura 2 representa los resultados de una prueba de una preparación libre de células tratada con calor de *Bacillus subtilis* QST713 para determinar la eficacia frente a varias cepas aisladas de *Clostridia*.

La figura 3 muestra los resultados de una prueba de una preparación libre de células de *Bacillus subtilis* QST713 para determinar la eficacia frente a varias cepas aisladas de *Listeria*.

40 La figura 4 representa los resultados de una prueba de una preparación libre de células tratada con calor de *Bacillus subtilis* QST713 para determinar la eficacia frente a varias cepas aisladas de *Listeria*.

La figura 5 muestra los resultados de una prueba de una preparación libre de células de *Bacillus subtilis* QST713 para determinar la eficacia frente a varias cepas aisladas de *Salmonella*.

La figura 6 representa los resultados de una prueba de una preparación libre de células tratada con calor de *Bacillus subtilis* QST713 para determinar la eficacia frente a varias cepas aisladas de *Salmonella*.

45 La figura 7 muestra placas de agar sobre las que se sembraron de forma cruzada *Bacillus subtilis* QST713 (vertical) y varias cepas aisladas de *Clostridium perfringens* (horizontal) para someter a prueba la eficacia de QST713 frente a los patógenos.

50 La figura 8 muestra placas de agar sobre las que se sembraron de forma cruzada *Bacillus subtilis* QST713 (vertical) y varias cepas aisladas de *Campylobacter jejuni* (horizontal) para someter a prueba la eficacia de QST713 frente a los patógenos.

### Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para entender la presente invención. Esto no es una admisión que cualquier información proporcionada en el presente documento es técnica anterior o es relevante para

las invenciones actualmente reivindicadas, o que cualquier publicación referenciada específica o implícitamente es técnica anterior.

La presente invención se refiere a un uso novedoso de la cepa QST 713 de *Bacillus subtilis* y/o sus metabolitos que son eficaces para potenciar la salud animal como probiótico. Se usan probióticos en aplicaciones de salud animal para mantener la microflora intestinal sana, incluyendo una reducción en las bacterias perjudiciales tales como *Clostridia* y *Campylobacter* y un incremento en las bacterias beneficiosas tales como *LactoBacillus* spp. y *Bifidobacterium*. Los probióticos son muy adecuados para mantener un equilibrio sano entre las bacterias patógenas y beneficiosas ya que, a diferencia de los antibióticos, no destruyen las bacterias indiscriminadamente ni dan lugar a cepas de bacterias patógenas resistentes a antibióticos. Existen muchos mecanismos por los que se cree que los probióticos mantienen la microflora intestinal sana: exclusión competitiva de bacterias patógenas, reducción de bacterias patógenas a través de la producción de sustancias antimicrobianas, potenciación del crecimiento y la viabilidad de la microflora intestinal beneficiosa, y estimulación de una respuesta inmunitaria sistémica en el animal.

En el presente documento también se describe un procedimiento para potenciar la salud animal administrando a un animal una composición que comprende (i) *Bacillus subtilis* QST713, (ii) mutantes de *Bacillus subtilis* QST713, (iii) preparaciones libres de células de (i) o (ii), o (iv) metabolitos de (i) o (ii).

*Bacillus subtilis* QST713, sus mutantes, sus sobrenadantes, y sus metabolitos, y procedimientos para su uso para controlar insectos y patógenos de plantas se describen completamente en las patentes de los EE. UU. N.º 6.060.051, 6.103.228, 6.291.426, 6.417.163 y 6.638.910. En estas patentes, la cepa se denomina AQ713. *Bacillus subtilis* QST713 se ha depositado con el NRRL el 7 de mayo de 1997 en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del Depósito de microorganismos para el propósito del procedimiento de patente bajo el número de acceso B21661. Cualquier referencia en esta memoria descriptiva a QST713 se refiere a *Bacillus subtilis* QST713 (número de acceso NRRL B21661).

Se ha descubierto que la cepa *Bacillus subtilis* QST713 tiene determinadas propiedades que, sorprendentemente, hacen que la cepa sea muy adecuada para potenciar la salud animal. Las esporas de QST713 son viables a pH bajos y las células de QST713 crecen (dadas las condiciones de nutrientes conductoras) a pH de tan sólo 4,5. Además, como se describe en los ejemplos 8 y 4, respectivamente, a continuación, QST713 puede crecer con condiciones de alta salinidad durante al menos diez días y puede sobrevivir a las altas temperaturas necesarias para el granulado del pienso. QST713 también tiene la capacidad de agregarse, o aglomerarse, como se muestra en el ejemplo 2, superando y reduciendo de este modo las bacterias patógenas. Sin quedar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que *Bacillus subtilis* QST713 potencia la salud animal por un modo de acción multifacético, incluyendo producir metabolitos antibacterianos y competir con patógenos usando más nutrientes y espacios de unión que los patógenos, evitando de este modo un establecimiento eficaz de las bacterias patógenas en el intestino.

Las composiciones de la presente invención o usadas en la presente invención comprenden mutantes de *Bacillus subtilis* QST713 que tienen todas las características identificativas de QST713. Dichos mutantes tienen una identidad de secuencia de ADN para QST713 de al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %. En algunos modos de realización, los mutantes son mutantes espontáneos. El término mutante espontáneo se refiere a mutantes que surgen de QST713 sin el uso intencional de mutágenos. Dichos mutantes espontáneos se pueden obtener por procedimientos clásicos, tales como hacer crecer la cepa *Bacillus subtilis* en presencia de un determinado antibiótico para el que el precursor es susceptible y someter a prueba cualquier mutante resistente para una mejora en la actividad biológica o, en esta solicitud, mejorar la capacidad para potenciar uno o más de los indicios de salud animal descritos a continuación. Otros procedimientos para identificar mutantes espontáneos serán conocidos por los expertos en la técnica.

Todas las referencias en esta solicitud a *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes se refieren a bacterias que se han aislado de la naturaleza y se hacen crecer por humanos, por ejemplo, en el laboratorio o bajo condiciones industriales.

Las células de *Bacillus subtilis* QST713 pueden estar presentes en las composiciones de la presente invención como esporas (que son inactivas), como células vegetativas (que están en crecimiento), como células en estado de transición (que están en transición de la fase de crecimiento a la fase de esporulación) o como combinación de todos estos tipos de células. En algunos modos de realización, la composición comprende principalmente esporas.

Los metabolitos de QST713 o sus mutantes incluyen lipopéptidos, tales como iturinas, surfactinas, plipastatinas y agrastatinas y otros compuestos con propiedades antibacterianas. Los metabolitos lipopeptídicos de QST713 se describen en detalle en las patentes de los EE. UU. N.º 6.291.426 y 6.638.910.

Las composiciones de la presente invención se pueden obtener cultivando *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo el uso de medios y otros procedimientos descritos en la patente de los EE. UU. N.º 6.060.051. Los procesos de cultivo microbiano a gran escala convencionales incluyen fermentación sumergida, fermentación en estado sólido o cultivo en superficie líquido. Hacia el final de la fermentación, a medida que se reducen los nutrientes, las células de *Bacillus subtilis* QST713 empiezan la transición de la fase de crecimiento a la fase de esporulación, de modo que el producto final de la fermentación es

mayoritariamente esporas, metabolitos y medio de fermentación residual. La esporulación es parte del ciclo vital natural de esta *Bacillus subtilis* y en general se inicia por la célula en respuesta a la limitación de nutrientes. La fermentación se configura para obtener niveles altos de unidades formadoras de colonias de *Bacillus subtilis* QST713 y para promover la esporulación. Las células, esporas y metabolitos bacterianos en medios de cultivo que resultan de la fermentación se pueden usar directamente o se pueden concentrar por procedimientos industriales convencionales, tales como centrifugación, filtración de flujo tangencial, filtración de profundidad y evaporación. En algunos modos de realización, se lava el caldo de fermentación concentrado, por ejemplo por medio de un proceso de diafiltración, para retirar el caldo de fermentación residual y los metabolitos.

El caldo de fermentación o el concentrado del caldo se puede secar con o sin la adición de vehículos usando procesos de secado convencionales o procedimientos tales como secado por pulverización, liofilización, secado en bandejas, secado por lecho fluidizado, secado con tambor o evaporación. Los productos secos resultantes se pueden procesar adicionalmente, tal como por molienda o granulación, para lograr un tamaño de partícula o formato físico específico. Los vehículos, descritos a continuación, también se pueden añadir después del secado.

Se pueden obtener preparaciones libres de células de caldo de fermentación de QST713 por cualquier medio conocido en la técnica, tal como extracción, centrifugación y/o filtración del caldo de fermentación. Los expertos en la técnica apreciarán que las denominadas preparaciones libres de células puede que no estén desprovistas de células sino más bien están mayoritariamente libres de células o esencialmente libres de células, dependiendo de la técnica usada (por ejemplo, velocidad de centrifugación) para retirar las células. La preparación libre de células resultante se puede secar y/o formular con componentes que ayuden en su administración a los animales. Los procedimientos de concentración y las técnicas de secado descritas anteriormente para el caldo de fermentación también son aplicables a las preparaciones libres de células.

Los metabolitos de QST713 se pueden obtener de acuerdo con los procedimientos expuestos en la patente de los EE. UU. N.º 6.060.051. El término "metabolitos" como se usa en el presente documento puede referirse a metabolitos semipuros y puros o esencialmente puros, o a metabolitos que no se han separado de *Bacillus subtilis* QST713. Los lipopéptidos y otros metabolitos bactericidas de QST713 están entre 600 kilodaltons y 100 daltons. Por lo tanto, en algunos modos de realización, después de preparar una preparación libre de células por centrifugación de caldo de fermentación de QST713, los metabolitos se pueden purificar por filtración de exclusión por tamaño que agrupa los metabolitos en diferentes fracciones basándose en el peso molecular de corte, tal como peso molecular menor de 600 kDa, menor de 500 kDa, menor de 400 kDa, etc. Los procedimientos de concentración y las técnicas de secado descritas anteriormente para la formulación de caldo de fermentación también son aplicables a los metabolitos.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir vehículos, que son ingredientes de formulación inertes añadidos a composiciones que comprenden células, preparaciones libres de células o metabolitos para mejorar la recuperación, la eficacia o las propiedades físicas y/o para ayudar a su envasado y administración. Dichos vehículos se pueden añadir individualmente o en combinación. En algunos modos de realización, los vehículos son agentes antiaglomerantes, agentes antioxidantes, agentes voluminizadores y/o protectores. Los ejemplos de vehículos útiles incluyen polisacáridos (almidones, maltodextrinas, metilcelulosas, proteínas, tales como proteína de suero, péptidos, gomas), azúcares (lactosa, trehalosa, sacarosa), lípidos (lecitina, aceites vegetales, aceites minerales), sales (cloruro de sodio, carbonato de calcio, citrato de sodio) y silicatos (arcillas, sílice amorfo, sílices de combustión/precipitados, sales de silicatos). Los vehículos adecuados para los aditivos de pienso se exponen en American Feed Control Officials, Inc.'s Official Publication, que se publica anualmente. Véase, por ejemplo, Official Publication of American Feed Control Officials, Sharon Krebs, editor, edición 2006, ISBN 1-878341-18-9. En algunos modos de realización, los vehículos se añaden después de concentrar el caldo de fermentación y durante y/o después del secado.

En modos de realización en los que se formulan las composiciones como aditivos de pienso, la concentración en base a peso entre peso (p/p) de (i) *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, (ii) preparaciones libres de células de QST713 o sus mutantes, (iii) metabolitos de QST713 o sus mutantes o (iv) combinaciones de células y metabolitos en la composición formulada puede ser de aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 11 %, aproximadamente un 12 %, aproximadamente un 13 %, aproximadamente un 14 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 16 %, aproximadamente un 17 %, aproximadamente un 18 %, aproximadamente un 19 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 95 %. En algunos modos de realización, por ejemplo, en los que la el caldo de formulación concentrado se ha lavado y secado sin calor, tal como por medio de liofilización, la concentración de *Bacillus subtilis* QST 713 o sus mutantes en la composición final puede ser de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 100 %.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar/dar como pienso a animales distintos de insecto y distintos de seres humanos para mejorar la salud animal o la condición física global general de dichos animales. Las composiciones se pueden administrar para aplicaciones tanto terapéuticas como no terapéuticas. Una cantidad eficaz de una composición es una cantidad eficaz para potenciar la salud de un animal en comparación con un animal al que no se le ha administrado la composición pero por lo demás se le ha administrado la misma dieta (incluyendo pienso y

otros compuestos) que tiene el animal que recibe las composiciones de la presente invención. Los indicios de salud potenciada incluyen uno o más de los siguientes: incremento en la ganancia de peso, que puede incluir un incremento en el peso de una parte específica del animal o un incremento en el peso global; mantenimiento de la microflora intestinal; incremento en la eficacia de utilización del pienso; reducción en el riesgo de mortalidad; incremento en la resistencia a la enfermedad; reducción en la morbilidad; incremento en la respuesta inmunitaria; disminución en la aparición de diarrea, incremento en productividad; y/o reducción de la diseminación de patógenos. Por tanto, en línea con lo anterior, los modos de realización de la presente solicitud hacen referencia a procedimientos no terapéuticos tales como el incremento del peso del animal, el mantenimiento de la microflora intestinal, o un incremento en la eficacia de la utilización del pienso administrando/alimentando al animal una composición que comprende *Bacillus subtilis* QST 713, un mutante de *Bacillus subtilis* QST 713, una preparación libre de células derivada de *Bacillus subtilis* QST713 o su mutante, o metabolitos de QST713 o sus mutantes.

En algunos modos de realización en los que las composiciones de la presente invención se administran/dan como pienso a animales de granja, las composiciones se usan para mejorar el rendimiento de crecimiento de los animales de granja. Como se usa en el presente documento, las mejoras en el rendimiento de crecimiento se refieren a un incremento en el crecimiento (peso o longitud) y/o eficacia en la utilización del pienso y/o disminución en la mortalidad/incremento en la tasa de supervivencia en comparación con animales a los que no se les ha administrado las composiciones de la presente invención. En un aspecto de la presente invención, se logran incrementos en el peso de entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 20 %, o de entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 15 %, o de entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 9 %. Las composiciones de la presente invención también se usan para incrementar la eficacia de utilización de pienso en animales. Típicamente, se evalúa la eficacia del pienso usando la proporción de conversión de pienso, que es la proporción de consumo de pienso con respecto a la ganancia de peso. Una reducción de esta proporción se refiere a un incremento en la eficacia del pienso. La eficacia del pienso se puede mejorar en entre aproximadamente un 1 % y un 15 %, entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 10 % y entre aproximadamente un 3 % y aproximadamente un 8 %. La presente invención también puede reducir la mortalidad. Se pueden lograr mejoras en la tasa de supervivencia de entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 20 %, o entre aproximadamente un 2 % y un 17 % o entre aproximadamente un 4 % y aproximadamente un 13 % o entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 10 %. El incremento en el crecimiento, las mejoras en la eficacia del pienso y la disminución en la mortalidad se pueden determinar por comparación individual con promedios conocidos en el campo de la cría de animales o por comparación con promedios de datos de rendimiento del crecimiento de un grupo de animales de granja de aproximadamente la misma edad, típicamente, criados juntos y/o bajo condiciones similares, de los que algunos no reciben las composiciones de la presente invención.

El mantenimiento de la microflora intestinal se refiere a la disminución de (matando o inhibiendo el crecimiento de) microorganismos dañinos, que provocan enfermedades, que son un problema de salud pública y/o al incremento de bacterias beneficiosas, tales como lactobacilos y bifidobacterias, en comparación con un animal al que no se le ha aplicado la presente invención. Sin quedar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que se pueden provocar incrementos de bacterias beneficiosas estimulando el crecimiento de dichas bacterias o simplemente disminuyendo selectivamente las bacterias patógenas, dando de este modo a las bacterias beneficiosas más espacio para crecer y unirse a la pared intestinal. Las bacterias dañinas, que provocan enfermedades, que se pueden disminuir por la presente invención incluyen *Clostridia* spp. (tal como *perfringens* y *dificile*), *Listeria* spp. (tal como *monocytogenes*, *seeligeri* y *welshimeri*), *Salmonella* spp. (tal como *enterica*, *arizonae*, *typhirium*, *enteritidis* y *bonglori*), *E. coli*, *Enterococcus* spp. (tal como *faecalis* y *faecium*), *Campylobacter*, *Aeromonas* spp., *Staphylococcus aureus* y *Vibrio* spp. En algunos modos de realización, los microorganismos dañinos, que provocan enfermedades, se pueden reducir en aproximadamente 0,5 log, aproximadamente 1 log, aproximadamente 2 log, aproximadamente 3 log, aproximadamente 4 log, o aproximadamente 5 log.

Las bacterias patógenas anteriores dan lugar a diversas enfermedades en los animales. Por ejemplo, en aves de corral, el pienso contaminado con *Clostridium perfringens* ha estado implicado en brotes de enteritis necrótica (o lesiones necróticas en la pared intestinal) en pollos. De forma interesante, aunque esta bacteria se encuentra comúnmente en el tubo digestivo de los pollos, no siempre da como resultado enteritis necrótica, aunque el incremento en los niveles se ha relacionado con la enfermedad. La reducción de este patógeno por medio del uso de un probiótico da como resultado una potenciación en la salud y ganancia de peso, como se muestra en los ejemplos, a continuación. Por tanto, el control de estas bacterias disminuyendo su capacidad para crecer en el intestino reduce la incidencia de enfermedad provocada por dichas bacterias. La tabla 1, a continuación, muestra diversos microorganismos y las enfermedades o afecciones con las que están relacionados.

Tabla 1

Organismo	Enfermedad y/o animal afectado
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	neumopatía en aves de corral
<i>Mycoplasma synoviae</i>	artropatía y neumopatía en aves de corral
<i>Pasterella multocida</i>	cólera aviar
<i>Staphylococcus aureus</i>	patógeno secundario común para aves de corral
<i>Aspergillus fumigatus</i>	patógeno respiratorio de aves de corral, en especial pavo
<i>Avibacterium paraglaaiarum</i>	coriza en pollos
<i>Bordetella avium</i>	pavo
<i>Salmonella arizonae</i>	coriza en pavos
<i>Salmonella typhimurium</i>	tifus aviar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	patógeno secundario común para aves de corral
<i>E. coli</i> O18 o O45 k88positivo	diarrea tras destete (cerdos)
<i>Brachyspira hyodysenteria</i>	disentería porcina
<i>Lawsonia intracellularis</i>	ileítis (cerdos)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	rinitis atrófica (cerdos)
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	erisipela (cerdos)

5 El mantenimiento de la microflora intestinal sana y, en particular, la reducción de una o más de las bacterias perjudiciales descritas anteriormente, también provoca una reducción en la diseminación de patógenos a través de las heces del animal. Las cantidades de patógenos se pueden determinar por varios procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo el análisis de patógenos liberados en las heces del animal o el sacrificio de los animales durante los estudios y el análisis de las poblaciones de bacterias (beneficiosas y patógenas) en su intestino.

10 La presente invención también se puede usar para restablecer el equilibrio intestinal normal después de la administración de cantidades terapéuticas de antibióticos inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y/o incrementando o manteniendo el crecimiento de bacterias beneficiosas. El término "cantidad terapéutica" se refiere a una cantidad suficiente para mejorar o invertir un estado de enfermedad en un animal.

El incremento en la productividad obtenido a través de la presente invención se refiere a cualquiera de los siguientes: producción de más huevos, leche o carne o de mayor calidad, o incremento en la producción de crías destetadas.

15 La presente invención se puede aplicar a cualquier animal, incluyendo vertebrados, tales como mamíferos y animales acuáticos, y crustáceos, tales como langostinos, pero excluyendo insectos y seres humanos. Los mamíferos que se pueden tratar con la composición de la presente invención incluyen animales de granja; animales usados para actividades deportivas, recreo o para trabajo, tales como caballos, incluyendo caballos de carreras; animales de compañía domésticos, incluyendo perros, gatos, aves y animales exóticos; y animales de zoológico. Los animales de granja se refieren a animales criados para su consumo o como productores de alimento. En un modo de realización, la composición se aplica a animales monogástricos tales como aves de corral y aves de caza. Aves de corral pueden incluir pollo, pavo, pato, ganso, gallina de Guinea y estrucioniformes, tales como avestruz y emú. Aves de caza pueden incluir codorniz, perdiz chukar, faisán, urogallo, gallinas de Cornualles y perdiz. Pollo se refiere a pollo para carne, que engloba pollos que se crían para sacrificio, que también se denominan pollos de engorde, y pollos productores de huevos, que son los que se usan para producir huevos para el consumo humano. En otro modo de realización, la composición se puede aplicar a mamíferos tales como el cerdo. Aún en otro modo de realización, la composición se puede aplicar a animales poligástricos, tales como ganado vacuno, cabras y ovejas, también denominados en el presente documento rumiantes. En un modo de realización, las composiciones de la presente invención se pueden dar como pienso a prerrumiantes para potenciar su salud y, en particular, para disminuir la incidencia de diarrea en estos animales. Los prerrumiantes son rumiantes, incluyendo terneros, que varían en edad desde el nacimiento hasta aproximadamente doce semanas. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar a prerrumiantes junto con sustitutos lácteos. Sustitutos lácteos se refieren a pienso formulado destinado a reemplazar el calostro durante las etapas de alimentación láctea del prerrumiante.

35 En un aspecto, las composiciones de la presente invención son aditivos de pienso que se añaden al pienso o agua potable del animal objeto antes de su alimentación. En dicho caso, las composiciones se pueden formular con un vehículo, tal como carbonato de calcio o proteína de suero, como se describe anteriormente. En un aspecto de la invención, dicho vehículo es higróforo.

En otro aspecto, las composiciones que comprenden *Bacillus subtilis* QST713, sus mutantes, preparaciones libres de células de QST713 y sus mutantes, y metabolitos de QST713 y sus mutantes se pueden formular en combinación con ingredientes de pienso necesarios para promover y mantener el crecimiento de un animal. Dichos ingredientes de pienso pueden incluir uno o más de los siguientes: proteína, carbohidrato, grasas, vitaminas, minerales,

coccidiostáticos, productos a base de ácidos y/o medicamentos, tales como antibióticos. En algunos modos de realización, también estarán presentes vehículos, tales como los descritos anteriormente. Las proteínas y carbohidratos necesarios para promover y mantener el crecimiento se denominarán proteína de pienso y carbohidrato de pienso para distinguirlos de cualquier proteína y/o carbohidrato residual que pueda permanecer del proceso de fermentación bacteriana.

En otro aspecto, las composiciones de la presente invención que comprenden *Bacillus subtilis* QST713, sus mutantes, preparaciones libres de células de QST713 y sus mutantes y metabolitos de QST713 y sus mutantes pueden incluir además otros probióticos, tales como otras especies y cepas de *Bacillus* que se dan como pienso a los animales para potenciar la salud animal o para mejorar la condición física general del animal. Las cepas ejemplares incluyen *Bacillus subtilis* PB6 (como se describe en la patente de los EE. UU. N.º 7.247.299 y depositada con el n.º de acceso ATCC PTA-6737), que se vende por Kemin bajo la marca comercial CLOSTAT® o *Bacillus subtilis* C-3102 (como se describe en la patente de los EE. UU. N.º 4.919.936 y depositada como FERM BP-1096 con el Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, en Japón), vendida por Calpis como CALSPORIN®, o una mezcla de esporas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* vendida por Chr. Hansen bajo la marca comercial BIOPLUS2B®, *Bacillus coagulans*, incluyendo las cepas descritas en la patente de los EE. UU. N.º 6.849.256, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus laterosporus* y *Bacillus alevi*. En las composiciones de la presente invención también se pueden usar otros probióticos distintos de *Bacillus*, tales como *Saccharomyces cerevisiae*. Si dichos otros probióticos no se formulan como parte de las composiciones de la presente invención, se pueden administrar con (al mismo tiempo o bien en momentos diferentes) las composiciones de la presente invención.

En otro aspecto, las composiciones de la presente invención pueden incluir o se pueden administrar con (al mismo tiempo o bien en momentos diferentes) enzimas que ayudan en la digestión del pienso, tal como amilasa, glucañasa, glucoamilasa, celulasa, xilanañasa, glucañasa, amilasa y pectinasa; inmunomoduladores, tales como anticuerpos, citocinas, plasma secado por pulverización; interleucinas, interferones; y/u oligosacáridos, tales como fructooligosacáridos, mananoligosacáridos, galactooligosacáridos, inulina, inulina enriquecida con oligofructosa, tagatosa y polidextrosa.

En modos de realización en los que las composiciones comprenden QST713 o sus mutantes, las bacterias se deben añadir al pienso o agua potable y se deben dar a los animales en una cantidad que sea eficaz para potenciar la salud de los animales. En un modo de realización, se puede añadir a una tasa de inclusión de desde aproximadamente  $1 \times 10^4$  CFU *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua potable a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua potable. En otro modo de realización, se debe administrar de aproximadamente  $1 \times 10^5$  CFU *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua potable a aproximadamente  $1 \times 10^9$  *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua potable. Aún en otro, se debe administrar de aproximadamente  $1 \times 10^5$  CFU *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua potable a aproximadamente  $1 \times 10^9$  *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua potable. Aún en otro, se debe administrar de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua potable a aproximadamente  $1 \times 10^8$  *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua potable. En algunos modos de realización, la tasa de inclusión es de aproximadamente  $1 \times 10^3$  CFU *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua potable, o aproximadamente  $1 \times 10^4$  o aproximadamente  $1 \times 10^5$  o aproximadamente  $1 \times 10^6$  o aproximadamente  $1 \times 10^7$  o aproximadamente  $1 \times 10^8$  o aproximadamente  $1 \times 10^9$  o aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  o aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua potable. En modos de realización en los que se proporcionan composiciones que contienen QST713 o sus mutantes como aditivos de pienso, dichas composiciones deben tener un recuento de CFU que represente la dilución hasta para los intervalos descritos anteriormente tras la adición al pienso o agua potable del animal.

Las composiciones que comprenden *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, preparaciones libres de células de los mismos, o metabolitos de los mismos, se pueden añadir al pienso antes del procedimiento de granulado, de modo que la composición usada en el procedimiento descrito anteriormente forma parte de las pellas de pienso. En este aspecto, si se usan células bacterianas en la composición, típicamente se añaden en forma de esporas a otros componentes del pienso antes del procedimiento de granulado. Se pueden usar procedimientos de granulado estándar conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo el procesado por extrusión de piensos secos o semihúmedos. En algunos modos de realización, el procedimiento de granulado implica temperaturas de al menos aproximadamente 65 °C. En otros, las temperaturas de granulado están entre aproximadamente 65 °C y aproximadamente 120 °C. Todavía en otros, las temperaturas de granulado están entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 100 °C. Aún en otros, la temperatura de granulado es de aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 80 °C, aproximadamente 85 °C, aproximadamente 90 °C o aproximadamente 100 °C.

Las composiciones de la presente invención también se pueden administrar por vía oral como un producto farmacéutico en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los niveles de dosificación óptimos para varios animales se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica, evaluando, entre otras cosas, la capacidad de la composición para (i) inhibir o reducir las bacterias patógenas en el intestino en diversas dosis, (ii) incrementar o mantener los niveles de bacterias beneficiosas y /o (ii) potenciar la salud animal a diversas dosis.

Para animales acuáticos, incluyendo salmón, trucha, langostino y peces ornamentales, en un modo de realización, las composiciones de la presente invención se pueden añadir a aguas para la cría de peces (en lugar de o además de al



alimento de los peces) en una cantidad eficaz para potenciar la salud del pez. Dichas cantidades eficaces pueden estar entre aproximadamente  $10^4$  y aproximadamente  $10^{10}$  CFU *Bacillus subtilis* QST713 por ml de agua para cría, o en otro modo de realización entre aproximadamente  $10^5$  y aproximadamente  $10^9$  CFU *Bacillus subtilis* QST713 por ml de agua para cría, o aún en otro modo de realización entre aproximadamente  $10^6$  y aproximadamente  $10^8$  CFU *Bacillus subtilis* QST713 por ml de agua para cría.

5

Los siguientes ejemplos se dan mayoritariamente con fines ilustrativos y no limitantes de la presente invención.

### Ejemplos

Ejemplo 1 - Estudios *in vitro* de la eficacia de preparaciones libres de células de QST713 frente a patógenos de animales

10 Se sometieron a prueba preparaciones libres de células de QST713 para determinar la actividad antimicrobiana frente a *Clostridia* (*Clostridia perfringens* ATCC13124 y dos cepas aisladas ambientales de *Clostridia perfringens*); *Listeria* (*Listeria monocytogenes* ATCC 19116 y 19111, *Listeria seeligeri* ATCC 35968 y *Listeria welshimeri* ATCC 35897); *Salmonella* (*Salmonella enterica* ATCC 10398, *Salmonella arizonae* ATCC 13314 y *Salmonella bongori* ATCC 43975); y *E. coli*, usando las técnicas de Kirby-Bauer y de concentración inhibitoria mínima (MIC).

15 Se prepararon preparaciones libres de células haciendo crecer QST713 en medio correspondiente al medio en el que se hizo crecer el patógeno objetivo, como se muestra en la tabla 1, a continuación, centrifugando el cultivo durante 15 minutos a 3000 rpm a 23 C y filtrándolo a través de una unidad de filtro Nalgene de 0,45  $\mu$ m. Para someter a prueba la estabilidad térmica, se calentó una parte de la preparación libre de células hasta 50 °C durante una hora antes de cada uno de las pruebas de Kirby-Bauer y MIC.

20 Tabla 2

Género	Especie/ATCC	Medio de crecimiento	Condiciones para crecimiento
<i>Clostridia</i>	<i>Perfringens</i> ATCC 13124	Medio de <i>Clostridial</i> reforzado (n.º cat. Oxoid CM0149).	Crecimiento durante la noche en el recipiente AnaeroPak como antes con 1 bolsita de MGC Anaero-Indicator (n.º cat. Remel 68-3001)
<i>Clostridia</i>	Cepa aislada ambiental de <i>Perfringens</i>	Igual que antes	Igual que antes
<i>Clostridia</i>	Cepa aislada ambiental de <i>Perfringens</i>	Igual que antes	Igual que antes
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i> ATCC 19116	Caldo de infusión de cerebro-corazón	Durante la noche a 37 °C
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i> ATCC 19111	Igual que antes	Igual que antes
<i>Listeria</i>	<i>seeligeri</i> ATCC 35968	Igual que antes	Igual que antes
<i>Listeria</i>	<i>welshimeri</i> ATCC 35897	Igual que antes	Igual que antes
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> ATCC 10398	Caldo con triptona y soja	Igual que antes
<i>Salmonella</i>	<i>arizonae</i> ATCC 13314	Igual que antes	Igual que antes
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i> ATCC 43975	Igual que antes	Igual que antes

En los experimentos de Kirby-Bauer, se sumergieron 2 mm de discos de papel de filtro estéril en sobrenadante de QST713 y se secaron al aire bajo condiciones estériles. A continuación, se colocaron estos discos sobre césped del patógeno objetivo, se incubaron durante la noche y se midieron las zonas de inhibición. Se observaron las zonas de inhibición para los objetivos *Clostridia* y *Listeria*.

25 En la técnica de MIC, se inocularon pocillos de placas de microlitro con 75  $\mu$ l de cada patógeno objetivo, se diluyeron hasta  $1 \times 10^5$ . La preparación libre de células descrita anteriormente se añadió a cada pocillo a diluciones finales de 1:2, 1:10 y 1:50. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C y OD600 y se leyeron con un lector de microvaloración Wallach. La preparación libre de células (con tratamiento térmico y sin tratamiento térmico) era significativamente eficaz frente a los objetivos *Clostridia* y *Listeria* e inhibió el crecimiento de *Salmonella* y *E. coli*, aunque no se observaron zonas de inhibición para estos dos últimos patógenos sobre placas de Kirby-Bauer. Los datos para *Clostridia*, *Listeria* y *Salmonella* se muestran en las figuras 1-6.

30

Ejemplo 2 - Estudios *in vitro* de la eficacia de QST713 frente a varias bacterias

Se sometió a prueba una formulación en polvo de *Bacillus subtilis* QST713 para determinar la eficacia frente a varias cepas aisladas ambientales de las siguientes bacterias: *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Samonella*

5 *enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*. Se preparó esta formulación en polvo fermentando *Bacillus subtilis* QST713, concentrando el caldo de fermentación, y secando, como se describe anteriormente en la Descripción detallada de la invención. Tenía un 14,6 % de caldo concentrado, seco, y 85,4 % de productos inertes de formulación (elegidos de las posibilidades descritas anteriormente) y contenía como mínimo aproximadamente  $7,3 \times 10^9$  CFU *Bacillus subtilis*/gramo y como máximo aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  CFU *Bacillus subtilis*/gramo. Esta formulación se denominará Composición 1. Se prepararon soluciones madre de la composición 1 añadiendo 0,2 gramos del polvo formulado a 1,8 ml de agua destilada estéril, de modo que la solución contenía aproximadamente  $1 \times 10^9$  CFU *Bacillus subtilis* por ml. Se sembraron los organismos de prueba para agar con triptano y soja con sangre de oveja al 5 % con hasta cuatro organismos sembrados para una placa de agar individual cada uno en una línea individual que biseca la placa de agar. Se dejó que los organismos se secaran durante la noche. A continuación, se sembraron las placas inoculadas con la suspensión de QST713 formulada descrita anteriormente, que se cultivó perpendicular a los organismos de prueba. Se incubaron las cepas aisladas *Clostridium perfringens* y *Campylobacter jejuni* en una atmósfera de gas Campy (10 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub>, 8 % N<sub>2</sub>) a  $41 \pm 2$  C durante la noche. Las otras cepas aisladas, que son aerobias, se incubaron en  $36 \pm 2$  durante la noche sin gas Campy. La QST713 provocó la inhibición de varios de las cepas aisladas de *Clostridium perfringens*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*, aunque no provocó la inhibición de *E. coli*. Además, en algunos casos, la *Bacillus subtilis* QST713 mostró un crecimiento excesivo competitivo agresivo de las bacterias patógenas. Los resultados se resumen en la tabla a continuación. Se midieron las zonas de inhibición informadas en la tabla, desde el borde del crecimiento de *Bacillus* hasta el comienzo del crecimiento del organismo de prueba. Además, las fotografías de las placas de *Clostridium perfringens* y *Campylobacter jejuni* se muestran en las figuras 7 y 8, respectivamente.

Tabla 3

Nombre del cultivo	ID cepa aislada	Atmósfera y temperatura	Zona de inhibición (mm)	Comentarios
<i>Clostridium perfringens</i>	CL-2	Gas Campy, 41 °C	0	Ligera inhibición del crecimiento aunque en ninguna zona, aglomeración de <i>Bacillus</i>
	CL-3		3	
	CL-14		0	Aglomeración de <i>Bacillus</i>
	CL-15		0	Aglomeración de <i>Bacillus</i>
<i>Escherichia coli</i> O157	EC-80	Aerobio, 36 °C	0	
	EC-81		0	
	EC-82		0	
<i>Salmonella enteritidis</i>	SE27	Aerobio, 36 °C	0	
	SE28		2	
	SE29		1	
	SE03		1	
	SE09		1	
	SE22		0	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cj-1	Gas Campy, 41 °C	1	Aglomeración de <i>Bacillus</i>
	Cj-2		0	Ligera inhibición del crecimiento aunque en ninguna zona, aglomeración de <i>Bacillus</i>
	NCj1		0	Aglomeración de <i>Bacillus</i>
	NCj2		1	
<i>Listeria monocytogenes</i>	LM1	Aerobio, 36 °C	2	

Ejemplo 3 - Estudios *in vivo* de QST713 en pollos de engorde

25 Se añadió la composición 1 a las dietas de iniciación y finalización de los pollos de engorde y se observaron la ganancia de peso y la eficacia del pienso. Se separaron aleatoriamente 252 pollos de engorde Jumbo Cornish Cross en cuatro grupos y se les dio una de las dietas enumeradas a continuación.

- Dieta basal sólo - control
  - Dieta basal + 0,05 % de CALSPORIN® (0,5 g/kg; 10<sup>6</sup> CFU/g) (designada como CS en la tabla a continuación)
  - Dieta basal + 0,05 % de Composición 1 (0,5 g/kg; 10<sup>6</sup> CFU/g) (designada como Comp. 1 -10 en la tabla a continuación)
- 5 ➤ Dieta basal + 0,0005 % de Composición 1 (0,5 mg/kg; 10<sup>3</sup> CFU/g) (designada como Comp. 1-10<sup>3</sup> en la tabla a continuación)

La dieta basal consistía en la siguiente dieta de iniciación durante los días 1-22 y la siguiente dieta de finalización durante los días 22-42.

10 Tabla 4 - Composición de ingredientes de las dietas basales de iniciación (d 1 a 21) y finalización (d 22 a 42) para los pollos de engorde

Ingrediente %	Iniciador	Finalización
Maíz	45,6	49,2
Harina de soja (48 % CP)	23,5	16,8
Granos secos de destilería	5,0	5,0
Harina de gluten de maíz	2,0	4,0
Harina de pescado	1,0	2,5
Harina de alfalfa	--	0,5
Vitamina, mineral, otro	22,9	22,0

Los resultados a continuación en la tabla 5 muestran que la composición 1 mejoró la ganancia de peso de las aves al nivel de 10<sup>6</sup> CFU/g. Se mejoró la eficacia del pienso durante el periodo de los días 21-42 y para el periodo de crecimiento global (1-42 días). En el gráfico a continuación, ADG se refiere al promedio de ganancia diaria, ADFI se refiere al promedio de la ingesta de pienso diaria.

15 Tabla 5 - Efecto del tratamiento dietético sobre el rendimiento de pollos de engorde

Apartado	Tratamiento			
	Control	CS	Comp. 1-10 <sup>6</sup>	Comp. 1-10 <sup>3</sup>
Peso corporal, g				
d 1	40,5 ± 0,43	40,0 ± 0,40	40,8 ± 0,43	40,7 ± 0,43
d 21	861,8 ± 22,3	815,6 ± 20,3	880,0 ± 22,3	842,3 ± 22,3
d 42	2494,4 ± 66,7	2469,0 ± 60,9	2617,0 ± 66,7	2460,3 ± 66,7
ADG, g				
d 1-21	39,8 ± 0,89	37,7 ± 0,81	39,8 ± 0,89	38,9 ± 0,89
d 21-42	77,9 ± 3,18	77,5 ± 2,90	82,5 ± 3,18	78,3 ± 3,18
d 1-42	58,4 ± 1,46	57,8 ± 1,33	61,3 ± 1,46	57,9 ± 1,46
ADFI, g				
d 1-21	57,3 ± 1,15	55,9 ± 1,05	59,4 ± 1,15	57,6 ± 1,15
d 21-42	156,6 ± 3,56	158,3 ± 3,25	155,3 ± 3,56	158,7 ± 3,56
d 1-42	105,2 ± 2,30	104,9 ± 2,10	106,6 ± 2,30	106,7 ± 2,30
Ganancia:Pienso, g/g				
d 1-21	0,69 ± 0,015	0,67 ± 0,014	0,66 ± 0,015	0,67 ± 0,015
d 21-42	0,50 ± 0,024	0,50 ± 0,022	0,52 ± 0,024	0,49 ± 0,024
d 1-42	0,50 ± 0,022	0,51 ± 0,020	0,52 ± 0,022	0,48 ± 0,022
Mortalidad, n	1,2 ± 0,51	1,2 ± 0,46	1,4 ± 0,51	1,4 ± 0,51

Ejemplo 4 - Estabilidad de QST713 en el procedimiento de granulado de pienso

Para determinar la estabilidad de *Bacillus subtilis* QST713 durante el procedimiento de granulado de pienso, se prepararon pellas de pienso que contenían la composición 1 y se sometieron a prueba las muestras a varias temperaturas. El pienso de control contenía los ingredientes mostrados en la tabla 6, mientras que el pienso experimental se complementó con un 8 % de la composición 1.

20

Tabla 6

Ingrediente	%
Maíz	68,94
Harina de soja	20,40
Harina de pescado	5,50
Monocalcio	
Fosfato	0,51
Caliza	0,58
Sal	0,33
DL-metionina	0,31
L-lisina 98 %	0,18
Vit/Min ave de corral	
Premezcla	0,25
Aceite de soja	3,00
<b>TOTAL</b>	<b>100,000</b>

5 Se mezclaron los ingredientes en un mezclador Foberg a temperatura ambiente y a continuación se calentaron a varias temperaturas objetivo a las que se mantuvieron durante aproximadamente 30 s antes del granulado a aproximadamente 2000 lbs/hora (907,2 kg/h) a través de un troquel de pellas de 5/32" x 1 1/4" (39,7 mm x 31,75 mm). Se tomaron diez muestras de diez lugares diferentes en todo el mezclador. Se tomaron muestras de las pellas a las temperaturas objetivo de 65 °C, 75 °C, 80 °C, y 85 °C dentro del mismo lote de 750 lb. (340,2 kg).

10 Se diluyeron las muestras del mezclador y se dejó que se asentaran cinco minutos hasta su total humectación. Se remojaron las muestras de pellas durante 30 minutos en tampón fosfato para recuperar las células de QST713. Se plaquearon las muestras diluidas para determinar las unidades formadoras de colonias. Las unidades formadoras de colonias disminuyeron de forma insignificante del mezclador a los estados de granulado, como se muestra en la tabla 7, a continuación.

Tabla 7

Material	CFU/g
8 % <i>Bacillus</i> Mezclador 1	1,98E+09
8 % <i>Bacillus</i> Mezclador 2	1,62E+09
8 % <i>Bacillus</i> Mezclador 3	1,62E+09
8 % <i>Bacillus</i> Mezclador 4	1,42E+09
8 % <i>Bacillus</i> Mezclador 5	1,73E+09
8 % <i>Bacillus</i> Mezclador 6	1,64E+09
8 % <i>Bacillus</i> Mezclador 7	1,63E+09
8 % <i>Bacillus</i> Mezclador 8	1,44E+09
8 % <i>Bacillus</i> Mezclador 9	1,72E+09
8 % <i>Bacillus</i> Mezclador 10	1,64E+09
8 % <i>Bacillus</i> Pellas 85 °C	1,56E+09
8 % <i>Bacillus</i> Pellas 80 °C	1,71E+09
8 % <i>Bacillus</i> Pellas 75 °C	1,73E+09
8 % <i>Bacillus</i> Pellas 65 °C	1,09E+09

Ejemplo 5 - Estudios *in vivo* de QST713 en cerdos

15 Se realizó un ensayo usando QST713 en forma de pella de pienso usando 750 cerdos en un marco de lechones destetados. Se añadió la composición 1 al pienso antes de su granulado por procedimientos estándar. Los estudios de CFU de QST713 antes y después del procedimiento de granulado estándar fueron consistentes con los resultados obtenidos en el ejemplo 4, anterior, y mostraron que las CFU de QST713 no disminuyeron drásticamente después del

granulado.

El peso inicial aproximado/cerdo fue de 10 lbs (4,5 kg) y el objetivo era que los cerdos crecieran hasta aproximadamente 40 lbs (18,1 kg). Un tratamiento de control que consistía en una dieta estándar sin ningún antibiótico ni *Bacillus* se le dio a aproximadamente 250 cerdos. Otros 250 cerdos recibieron la dieta estándar más  $1 \times 10^6$  CFU *Bacillus subtilis* QST713 por g de pienso. A un tercer grupo de 250 cerdos se le dio  $1 \times 10^7$  CFU *Bacillus subtilis* QST713 por gramo de pienso. El número de cerdos eliminados selectivamente en el tercer grupo se redujo significativamente en comparación con el grupo de control. La práctica de eliminación selectiva implica retirar de la alimentación en la que se dan los productos terapéuticos a los cerdos menos sanos o de tamaño insuficiente o sacrificarlos.

Ejemplo 6 - Estudios *in vivo* de QST713 en aves de corral

Se realizó un ensayo usando la Composición 1 como aditivo de pienso usando pollos de engorde con 50 aves por corral con lecho de paja y 6 corrales por tratamiento. Se añadió la composición 1 a pienso estándar para aves de corral (que no contiene otros probióticos o antibióticos) a una tasa de 91 gramos de composición 1 por tonelada de pienso (aproximadamente  $6,64 \times 10^{11}$  CFU/tonelada). Uno de los grupos de control y el grupo de aves administrado con pienso con la composición 1 se expusieron a *Clostridium perfringens* los días 19, 20 y 21 del estudio. Se registró el peso en todo el estudio y se muestra en la tabla 8, a continuación. Se determinó la eficacia de pienso y se informó como proporción de conversión de pienso en la tabla 9, a continuación. Se ajustó la tasa de conversión de pienso con los pesos de las aves muertas y retiradas. El día 22 del estudio, cinco aves de cada corral se seleccionaron, se sacrificaron, se pesaron y se examinaron para determinar el grado de presencia de lesiones por enteritis necrótica (NE). La puntuación de NE se basó en una escala de puntuación de 0 a 3, siendo 0 normal y siendo 3 el más grave. En las tablas 8 y 9, las medias dentro de las columnas con superíndices diferentes son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). El EEM es el error estándar de LSMEANS.

Tabla 8. Efectos del tratamiento dietético sobre las ganancias de peso de pollos de engorde en un modelo de exposición a *Clostridium perfringens* en corrales de lecho de paja.

Tratamientos	Promedio de peso (kg)	Promedio de ganancia de peso (kg)		
	Día 0	Días 0 a 21	Días 0 a 42	Días 21 a 42
Control (NC)	0,044	0,515 <sup>A</sup>	1,892 <sup>A</sup>	1,377 <sup>A</sup>
Control expuesto (CP)	0,044	0,469 <sup>B</sup>	1,704 <sup>B</sup>	1,235 <sup>B</sup>
Composición 1 (CP)	0,044	0,496 <sup>AB</sup>	1,838 <sup>A</sup>	1,342 <sup>AB</sup>
EEM	0,000	0,011	0,041	0,037
Pr>F	0,3712	0,0415	0,0049	0,0083

Tabla 9. Efectos del tratamiento dietético sobre la conversión de pienso y las lesiones por enteritis necrótica de pollos de engorde en un modelo de exposición a *Clostridium perfringens* en corrales de lecho de paja.

Tratamientos	Proporción de conversión de pienso (proporción pienso a ganancia)			Puntuación de lesión por enteritis necrótica
	Días 0 a 21	Días 0 a 42	Días 21 a 42	
Control (NC)	1,723 <sup>B</sup>	1,943 <sup>B</sup>	2,055 <sup>B</sup>	0,17 <sup>C</sup>
Control expuesto (CP)	1,893 <sup>A</sup>	2,051 <sup>A</sup>	2,183 <sup>A</sup>	1,30 <sup>A</sup>
Composición 1, CP	1,765 <sup>B</sup>	1,964 <sup>B</sup>	2,128 <sup>A</sup>	0,77 <sup>B</sup>
EEM <sup>4</sup>	0,026	0,021	0,040	0,17
Pr>F	0,0003	0,0010	0,0490	0,0009

Ejemplo 7 - Uso de la composición 2 para varios estudios

Se realizaron ensayos para someter a prueba la mejora en el rendimiento del crecimiento usando una segunda formulación de *Bacillus subtilis* QST713. Esta formulación en polvo se prepara fermentando, concentrando el caldo de fermentación, secándolo y lavándolo por medio de un procedimiento de diafiltración para retirar el medio de fermentación residual y metabolitos, todo como se describe anteriormente, de modo que la composición esté comprendida esencialmente de células - principalmente esporas y algunas células vegetativas. Esta composición contiene un 14,6 % de cultivo concentrado, secado, lavado y un 85,4 % de productos inertes de formulación (elegidos de las posibilidades descritas anteriormente en la Descripción detallada de la invención) y aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  CFU *Bacillus subtilis*/gramo y se denominará en el presente documento Composición 2. La composición 2 se sustituye por la composición 1 en los ensayos descritos en los ejemplos 3-6 y se espera que los resultados sean los mismos que

los logrados con la composición 1.

#### Ejemplo 8 -Viabilidad de las esporas de QST713 en agua de mar

Se sometió a prueba la composición 1 para determinar la viabilidad en agua de mar y NaCl. Se preparó agua de mar artificial en tres concentraciones; 10 ppt, 30 ppt, 50 ppt; 4 tubos de 25 ml por concentración. Se preparó un caldo de nutrientes con tres concentraciones de NaCl; 1 %, 3 %, y 5 %; 4 tubos de 25 ml por concentración. Se esterilizaron tanto el agua de mar como los caldos de nutrientes en autoclave antes de la inoculación. Se preparó una suspensión de la composición 1 disolviendo 0,5 g en 10 ml de agua DI. Se inocularon alícuotas (0,5 ml) de la suspensión en cada una de las tres concentraciones de agua de mar y cultivo. Se estimó que los tubos contenían  $>10^7$  cfu/ml (cfu=unidad formadora de colonias). Se prepararon frascos de dilución de un 1 % de caldo de nutrientes y un 1 % de NaCl (99 ml por frasco) y se esterilizaron con autoclave. Se preparó agar de nutrientes de acuerdo con las indicaciones del fabricante; se prepararon placas de 15x100 mm para la prueba de recuento de placas, una placa por prueba más controles no inoculados.

Se incubaron los tubos a 28 °C en una incubadora con agitación, usando 125 rpm, durante 14 días. Se tomaron muestras para subcultivo los días 0, 2, 10 días. El día 0 se sometieron a prueba todos los tubos; los días 2 y 10 sólo se sometieron a prueba las 2 concentraciones más altas de agua de mar y NaCl. Se obtuvieron recuentos de placas plaqueando 10 µl del tubo original el día 0 (= hasta dilución  $10^{-2}$ ) y se prepararon 100 ul de diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  en un 1 % de caldo de nutrientes/1 % NaCl los días 2 y 10. Por tanto, los recuentos obtenidos estaban realmente en el nivel  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$ . Se incubaron las placas a 28 °C. Se observaron las colonias a las 24 y 48 h.

Se obtuvieron lecturas de turbidez usando un instrumento Spectronic 20D+, tubos de fracción de poliestireno 12x75 como cubetas, y longitud de onda 660 midiendo la absorbancia de cada muestra. Se prepararon las muestras de prueba el día 0 preparando una dilución 1:10 de cada tubo (0,5 ml en 4,5 ml de 1 % de solución salina y los días 2 y 10 sometiendo a prueba 5 ml de los subcultivos de 24 h de las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$ ). Además, se obtuvieron lecturas de la turbidez el día 8 de incubación de las diluciones del día 2.

Tanto los cultivos de placas como las lecturas de turbidez indicaron que las esporas persistieron con poca o ninguna disminución de los números durante al menos diez días.

Se leyeron las placas de cultivo a las 24 y 48 h. A las 24 h, las placas de  $10^{-3}$  eran todas confluentes con el crecimiento bacteriano. Las placas de  $10^{-3}$  eran más ligeras pero aún tenían ~1000 colonias por placa. A las 48 h, todas las placas tenían un gran crecimiento confluyente, por tanto más de 10 cfu por ml en el tubo original. Este número se mantuvo los días 0, 2 y 10. No se observaron diferencias en los cultivos que crecieron con un intervalo de concentraciones de agua de mar o NaCl. El cultivo de la composición 1 creció bien en todos los intervalos sometidos a prueba. No se produjo crecimiento en ningún momento en el agua de mar no inoculado ni el caldo de cultivo con NaCl.

Las pruebas de turbidez (lecturas de absorbancia) dieron resultados similares, pero fueron más difíciles de interpretar. Los tubos originales no se pudieron leer directamente ya que estaban demasiado turbios, en especial para la mayor concentración de agua de mar. Se usó una dilución de 1:10 para obtener la lectura del día 0. Las lecturas del día 2 y día 10 fueron sobre diluciones usadas para inocular las placas de cultivo y se pudieron tomar a partir de frascos de dilución. Puesto que los números estimados los días 2 y 10 eran mayores que  $10^8$  por ml se produjo muy poco, o ningún, efecto adverso sobre el crecimiento debido a las concentraciones salinas.

Se sometió a prueba la composición 1 en tres concentraciones de agua de mar artificial (10 ppt, 30 ppt, y 50 ppt), y tres concentraciones de NaCl en caldo de nutrientes (1 %, 3 %, y 5 %), para determinar su persistencia. Los probióticos crecieron en todas las concentraciones y fueron viables durante al menos diez días en números altos  $>10^8$  /ml. La concentración de sal en el agua de mar o en el caldo no afectó a la capacidad de las esporas para germinar y crecer.

#### Ejemplo 9 - Estudios *in vivo* de QST713 en truchas

Se dividieron truchas arcoíris de aproximadamente 14 gramos en dos grupos de 20 peces cada uno. Al grupo de control se le dio alimento para peces estándar, mientras que el grupo tratado recibió alimento para peces y  $1 \times 10^6$  CFU *Bacillus subtilis* QST713 por gramo de alimento. Se espera que el grupo tratado muestre un incremento en el peso corporal en comparación con el grupo de control.

#### Ejemplo 10 - Estudios *in vivo* en langostinos

Para determinar la acción inhibidora de QST713 frente a patógenos conocidos gambas y langostinos *Penaedae* y *Palaemonidae*, se sometieron a prueba las composiciones 1 y 2 frente a tres patógenos bacterianos aislados de langostino cultivado: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, y *V. vulnificus* y un hongo patógeno de langostino, *Fusarium solani*. Se prepararon soluciones madre de la composición 1 y composición 2 añadiendo 0,2 gramos del polvo formulado a 1,8 ml de agua destilada estéril, de modo que cada solución contiene aproximadamente  $1 \times 10^9$  CFU *Bacillus subtilis* por ml.

Se cultivan condiosporas de cultivos de 5 días de *Fusarium solani* crecidas en agar dextrosa-Sabouraud en 2 % de NaCl estéril. Se hacen crecer *Vibrio* en medio de caldo Luria a 37 °C. Se enriquecen subcepas bacterianas marinas

son agar Mueller Hinton o medio 2216 de caldo marino a 30 °C y a continuación, se cultivan en caldo de triptona y soja (TSB), complementado con 1-3 % de NaCl a 30 °C. Se hacen crecer selectivamente cepas de *V. parahaemolyticus* en agar de sales biliares de tiosulfato y citrato a 42 °C y a continuación se cultivan en TSB complementado con 3 % de NaCl a 30 °C.

- 5 Los organismos de prueba, *Vibrio* y *Fusarium*, se siembran en una única placa de agar de soporte, cada uno en una línea individual que biseca la placa de agar. Se deja que los organismos se sequen durante la noche. A continuación, se siembran dos conjuntos de las placas inoculadas con la suspensión de la composición 1 o bien de la composición 2 descritas anteriormente, que se cultivan perpendiculares a los organismos de prueba. Las placas cultivadas se incuban en 36 °C ± 2 durante la noche. Se espera que QST713 provoque la inhibición de varias de las cepas aisladas de los patógenos *Vibrio* y *Fusarium*. Además, en algunos casos se espera que *Bacillus subtilis* QST713 muestre un crecimiento excesivo competitivo agresivo de las bacterias patógenas.
- 10

A menos que se indique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención.

- 15 Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan exclusivamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud.

Aunque la invención se ha descrito en relación con modos de realización específicos de la misma sólo se define por las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende *Bacillus subtilis* QST713 (número de acceso NRRL: B21661) o un mutante de *Bacillus subtilis* QST713, en donde el mutante tiene todas las características identificativas de *Bacillus subtilis* QST173, en donde el mutante tiene una identidad de secuencia de ADN para *Bacillus subtilis* QST713 de al menos un 95 % para potenciar la salud de un animal distinto de insecto y distinto de ser humano, en donde se incrementa la eficacia de la utilización alimentaria o ganancia de peso del animal distinto de insecto y distinto de ser humano.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición comprende la *Bacillus subtilis* QST713, en donde la composición preferentemente comprende además metabolitos producidos por la *Bacillus subtilis* QST713.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición se administra a un animal de granja en una cantidad eficaz para mejorar el rendimiento del crecimiento.
4. La composición para el uso de la reivindicación 3, en donde el animal distinto de insecto y distinto de ser humano es ave de corral, en la que el ave de corral se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un pollo de engorde, y un pollo productor de huevo.
5. La composición para el uso de la reivindicación 3, en donde el animal se selecciona del grupo que consiste en un cerdo, un rumiante o a prerrumiante.
6. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición comprende además un vehículo.
7. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición se administra con pienso, en donde los ingredientes del pienso comprenden preferentemente proteína de pienso, en donde los ingredientes de pienso preferentemente comprenden además carbohidrato de pienso.
8. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición comprende además agua potable.
9. La composición para el uso de la reivindicación 3, en donde la composición comprende además un sustituto lácteo para prerrumiantes.
10. La composición para el uso de la reivindicación 7, en donde la composición se administra a una tasa de aproximadamente  $1 \times 10^3$  CFU *Bacillus subtilis* QST713 por gramo del pienso a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  CFU *Bacillus subtilis* QST713 por gramo del pienso.
11. Una composición para incrementar la eficacia de la utilización de pienso o la ganancia de peso de un animal distinto de insecto y distinto de ser humano que comprende (i) *Bacillus subtilis* QST713 (número de acceso NRRL: B21661) o un mutante de *Bacillus subtilis* QST713, en donde el mutante tiene todas las características identificativas de *Bacillus subtilis* QST173, en una cantidad que es eficaz para incrementar la eficacia de la utilización de pienso o ganancia de peso del animal y (ii) al menos un ingrediente de pienso que comprende carbohidrato para pienso y proteína para pienso, en donde el mutante tiene una identidad de secuencia de ADN para *Bacillus subtilis* QST713 de al menos un 95 %, en donde la cantidad eficaz del *Bacillus subtilis* QST713 es de aproximadamente  $1 \times 10^3$  CFU/g pienso a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  CFU/g pienso.



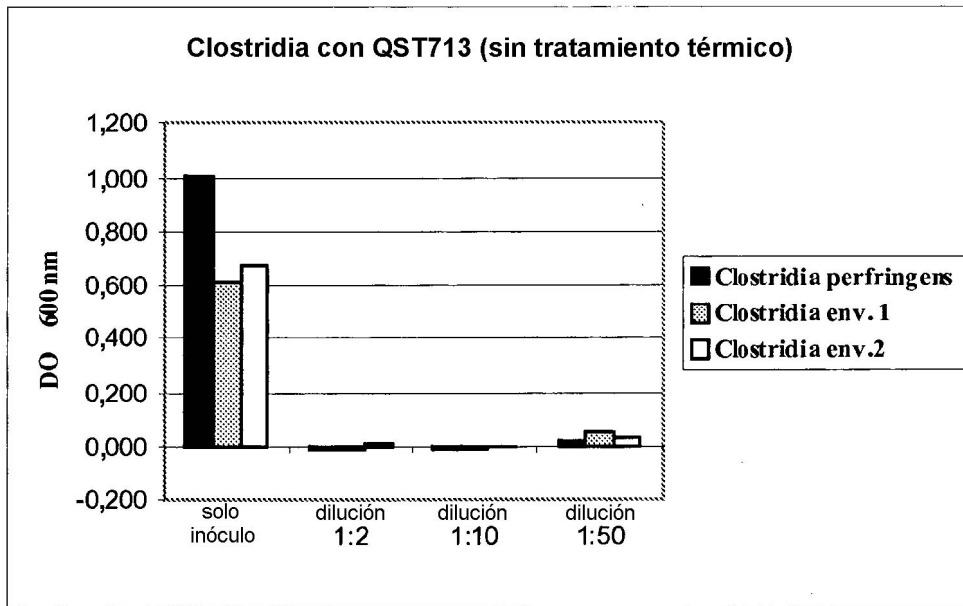


FIGURA 1

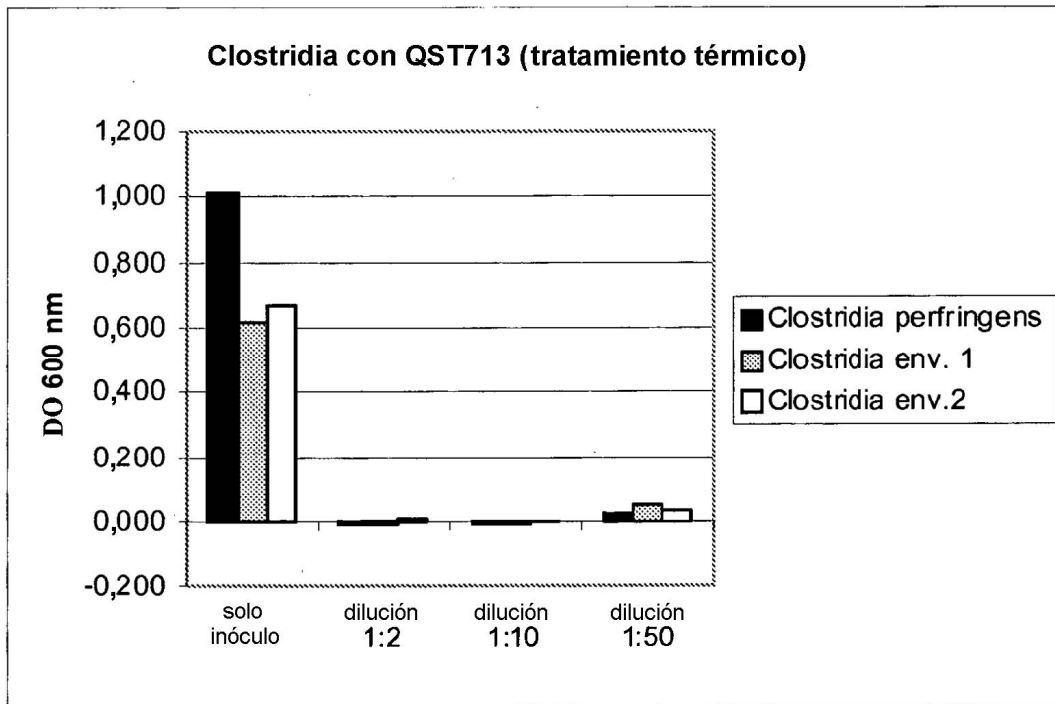


FIGURA 2

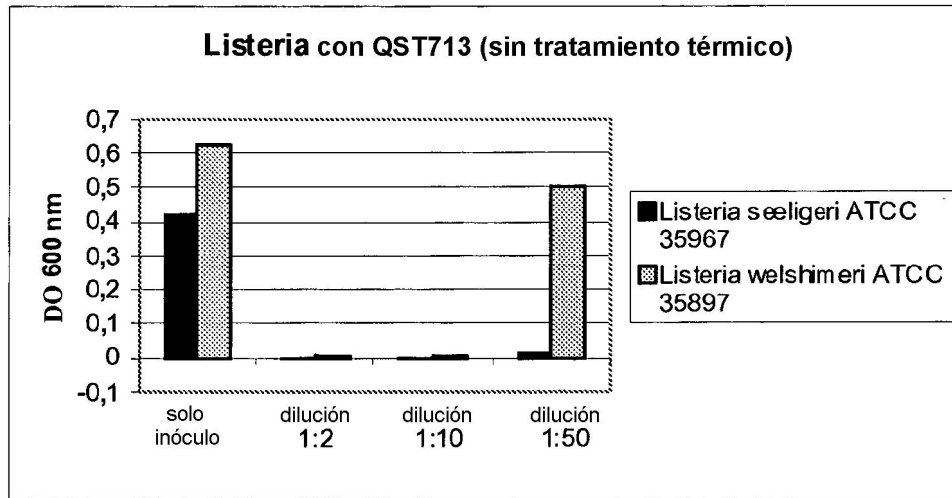


FIGURA 3

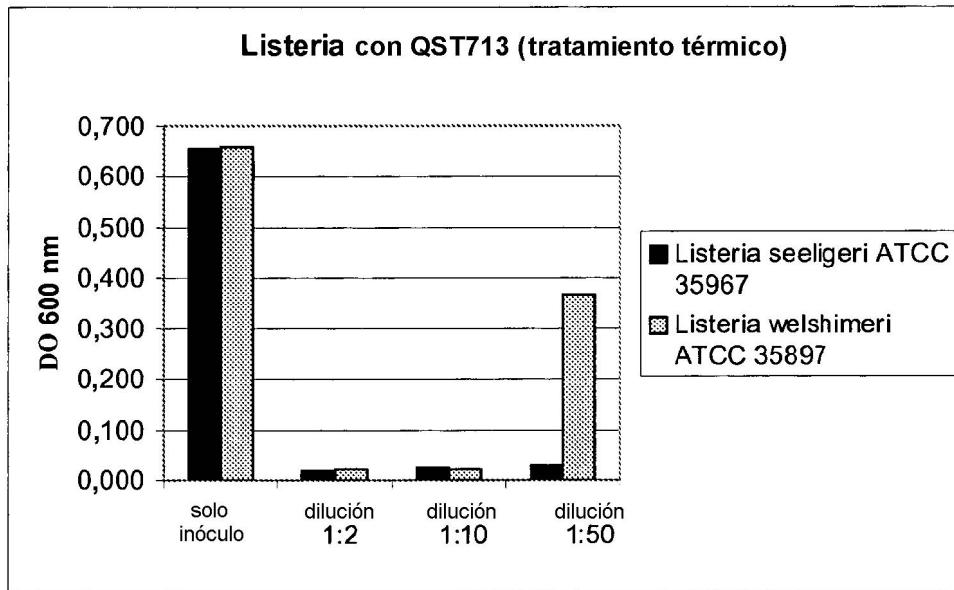


FIGURA 4

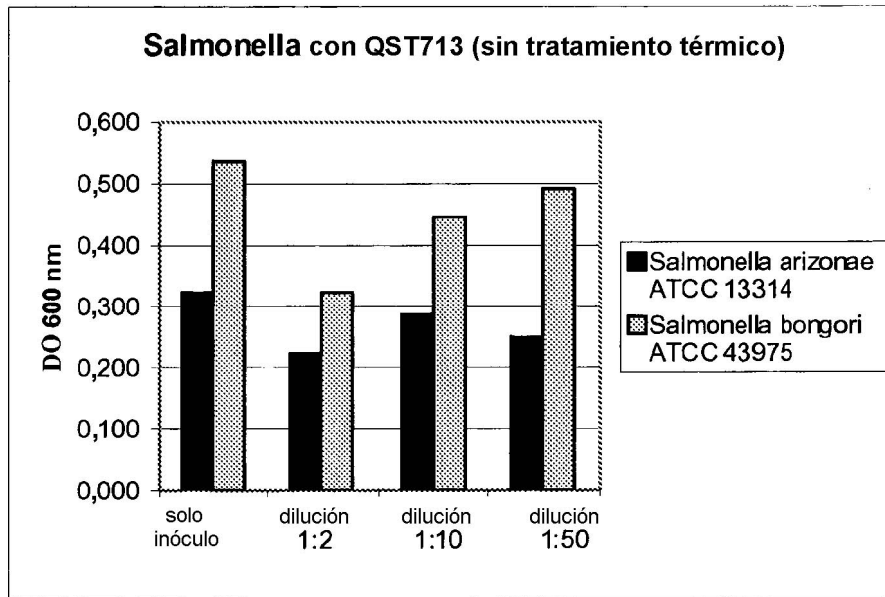


FIGURA 5

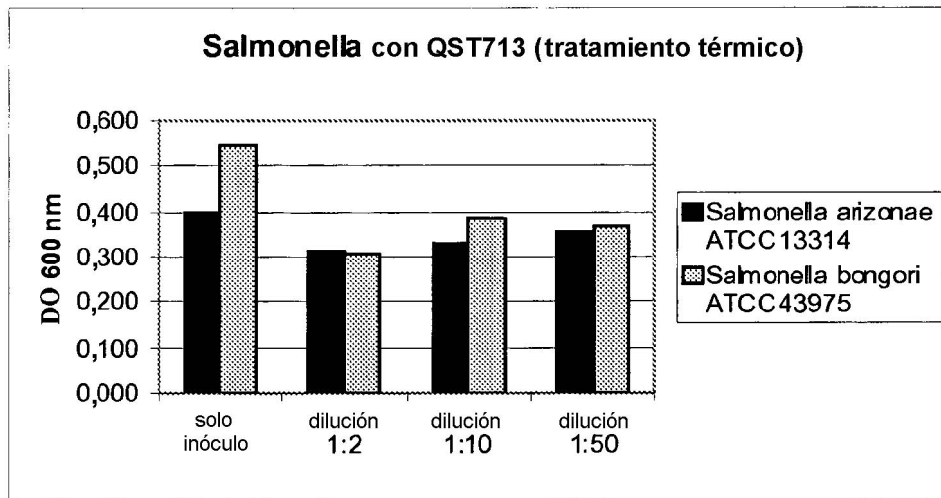


FIGURA 6



FIGURA 7



FIGURA 8