

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 482**

51 Int. Cl.:

**C12P 1/04** (2006.01)

**G01N 33/554** (2006.01)

**C12R 1/07** (2006.01)

**C12R 1/46** (2006.01)

**A23K 10/00** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2009 PCT/US2009/066392**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10065625**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 09831041 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2370585**

54 Título: **Cepas y métodos para mejorar la salud y/o el rendimiento de los rumiantes**

30 Prioridad:

**02.12.2008 US 119256 P**

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

**22.11.2016**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (50.0%)  
Langebrogade 1  
1411 Copenhagen K, DK y  
LALLEMAND, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MERTZ, KEITH, J. y  
REHBERGER, THOMAS, G.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 590 482 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Cepas y métodos para mejorar la salud y/o el rendimiento de los rumiantes

**Bibliografía**

- 5 Pueden encontrarse las citas bibliográficas completas de las referencias mencionadas en el presente texto, por el apellido del primer autor y el año de publicación en la sección de Bibliografía, inmediatamente antes de las Reivindicaciones.

**Campo de la invención**

- 10 La invención se refiere a cepas y métodos para controlar la acidosis. Más concretamente, la invención se refiere a cepas bacterianas útiles para mejorar la salud y/o el rendimiento de los rumiantes y a los métodos de preparación y uso de las cepas.

**Descripción de la técnica relacionada**

- 15 La provisión de altas concentraciones de hidratos de carbono fermentables a los rumiantes se ha convertido en una práctica común en la industria cárnica y láctea en los últimos 50 años. La necesidad de mejorar la eficiencia de la producción y la calidad de la carne ha dado lugar a esta tendencia. Las mejoras en la producción han tenido lugar no sin algunas dificultades. El aumento del consumo por los rumiantes de hidratos de carbono fermentables mediante la alimentación con niveles más altos de grano de cereales ha tenido como resultado un aumento de la incidencia de trastornos metabólicos tales como la acidosis. La relación entre el elevado consumo de concentrado y la acidosis ruminal y ha sido bien documentada en las revisiones (Dunlop, 1972; Slyter, 1976). Muchos investigadores han demostrado un descenso del pH ruminal después de la alimentación de los altos niveles de hidratos de carbono fácilmente fermentable (RFC: readily fermentable carbohydrate) para el ganado y la subsiguiente interrupción de la microbiota o microflora ruminal y cambios fisiológicos que ocurren en el animal (Allison, et. Al., 1975, Hungate et al., 1952.; Elam, 1976). La mayor parte de ellos han atribuido este descenso a una producción excesiva de ácidos orgánicos por bacterias ruminales como *Streptococcus bovis*. Sin embargo, el efecto de los hidratos de carbono excesivos en la microbiota ruminal que inicia esta respuesta no ha sido bien documentado.

- 25 En el pasado, la gestión intensiva de la alimentación ha sido el único método para combatir la acidosis. Más concretamente, los granos se diluyen con fibra y el aumento del porcentaje de concentrado en la dieta se controla cuidadosamente en un método por etapas para asegurar una transición suave a niveles elevados de concentrado durante un período de 14 - 21 días. La mayoría de los lotes de engorde comerciales formulan y suministran varias dietas "de adaptación" que contienen diferentes relaciones de grano a forraje.

- 30 Aunque la gestión intensiva de la alimentación suele ser bastante eficaz en el control de la acidosis, es muy costosa para el productor debido al elevado coste de producir, transportar, picar el forraje, disponer del aumento de los desechos animales, y eficiencias de producción más bajas. Los productores y gestores de los lotes de engorde necesitan establecer estrategias que permitan la producción eficiente de raciones de alto concentrado para alimentación del ganado.

- 35 Otras estrategias han sido combinar el uso de dietas de adaptación con la provisión de componentes antimicrobianos tales como los ionóforos. Los ionóforos inhiben la ingesta y reducen la producción de ácido láctico en el rumen reduciendo las poblaciones ruminales de organismos gram-positivos que producen ácido láctico, tales como *Streptococcus bovis* y *Lactobacillus* spp. (Muir et al. 1981).

- 40 Aunque el uso de ionóforos ha reducido la incidencia de acidosis aguda en los lotes de engorde, la preocupación de los consumidores acerca del uso de antibióticos en la producción de carne y la necesidad de que los gestores de lotes de engorde de encontrar continuamente formas de reducir costes mejorando al mismo tiempo el rendimiento del animal y la composición de la canal, ha conducido al examen de métodos alternativos para reducir la acidosis y mejorar el rendimiento del ganado de los lotes de engorde.

- 45 El uso de agentes microbianos de alimentación directa como método para modular la función rumiante y mejorar el rendimiento del ganado ha ido ganando una aceptación creciente en los últimos 10 años. Hay dos tecnologías microbianas básicas de alimentación directa que están actualmente disponibles para la industria cárnica para el control de la acidosis ruminal: (1) usar la tecnología de DFM de la producción de ácido láctico y (2) añadir especies bacterianas específicas capaces de utilizar el ácido láctico ruminal. Aunque el modo de acción publicado de cada una de estas tecnologías es diferente, ambos intentan dirigir la acumulación de ácido láctico ruminal.

- 50 El primer planteamiento, es decir, usar la tecnología de DFM de la producción de ácido láctico, intenta aumentar la tasa de utilización del ácido láctico ruminal estimulando la microbiota ruminal nativa. Como se ha publicado, la adición de bacterias productoras de ácido láctico de crecimiento relativamente lento, tales como las especies de *Enterococcus*, produce una concentración ligeramente elevada de ácido láctico ruminal. El aumento gradual fuerza la adaptación de la microflora ruminal a una porción más alta de utilizadores de ácido láctico tolerantes al ácido. Sin embargo, estas cepas de *Enterococcus* no lograron controlar ni prevenir la acidosis de forma adecuada.

El segundo planteamiento, es decir, añadir especies bacterianas específicas capaces de utilizar ácido láctico ruminal, se basa en el hallazgo de que las especies de *Propionibacterium* reducen al mínimo significativamente la acumulación de ácido láctico ruminal durante una provocación de acidosis con una gran cantidad de hidrato de carbono fácilmente fermentable (RFC). *Propionibacterium* son habitantes naturales del rumen tanto en el ganado lechero como de carne y funcionan en el rumen usando ácido láctico para producir importantes ácidos grasos volátiles como el acetato y el propionato.

Las tecnologías de DFM actuales desarrolladas hasta la fecha se han desarrollado basándose en un concepto microbiológico anticuado de la incidencia de acidosis en el rumen. Hasta hace poco, los métodos de estudio de la ecología microbiológica del rumen se han basado en las técnicas de cultivo. Estas técnicas se han limitado a causa del desconocimiento de los requisitos de crecimiento y las condiciones anaerobias no adecuadas para muchos de los microorganismos del rumen. Así pues, los estudios ecológicos que dependen de estas técnicas de cultivo se han basado en una comprensión limitada de la microbiota ruminal.

Las DFM actuales cuando se utilizan solas o con la levadura para reducir al mínimo el riesgo de acidosis ruminal y para mejorar la utilización de una dieta de ganado de lote de engorde que contiene alto concentrado proporcionan resultados mixtos. Sin embargo, un estudio de cepas DFM de *Propionibacterium* P15, y *Enterococcus faecium* EF212, y *E. faecium* EF212, alimentado solo o alimentado combinado con una levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, indicó que la adición de combinado de DFM con o sin levadura no tuvo efecto alguno en la prevención de la acidosis ruminal (Yang, W., 2004).

En vista de lo que antecede, sería deseable proporcionar una o más cepas para prevenir y/o tratar la acidosis. Sería ventajoso si una o más cepas también mejoraran otras medidas de salud y/o del rendimiento de los rumiantes. También sería deseable proporcionar métodos de preparación y de uso de las cepas.

#### Sumario de la invención

Se entiende que la invención, que se define por las reivindicaciones expuestas al final de esta descripción, resuelve al menos algunos de los problemas señalados anteriormente. La presente invención proporciona una cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* aislada, depositada como NRRL B-50174.

Adicionalmente se proporciona una combinación que incluye una cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174) y monensina.

También se proporciona una cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* aislada (NRRL B-50174) en una cantidad efectiva, para su uso en el tratamiento de un animal y una combinación que incluye una cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* aislada (NRRL B-50174) en una cantidad efectiva y monensina, para su uso en el tratamiento de un animal.

En al menos algunas realizaciones, la administración de una o más cepas al animal proporciona al menos una de las siguientes ventajas en el animal o para el animal en comparación con un animal al que no se administra la cepa: (a) reduce la acidosis, (b) estabiliza el metabolismo ruminal como se indica por la acumulación de ácido láctico retardada y la producción prolongada de ácidos grasos volátiles, (c) se recupera con más rapidez de la provocación de la acidosis como se mide por la recuperación del pH y la disminución de ácido láctico, (d) reduce la exhibición de los síntomas clínicos asociados con la acidosis (e) aumenta la producción de leche en vacas lecheras lactantes, (f) aumenta el contenido de grasa láctea en vacas lecheras lactantes, (g) disminuye el recuento de células somáticas (SCC) en vacas lecheras, (h) mejora la respuesta inmunológica y la salud como se pone evidencia por la disminución de SCC y (i) aumenta la eficiencia de la producción de leche en vacas lecheras en lactancia.

También se proporciona un método para preparar un agente microbiano de alimentación directa. En el método, una cepa de *Bacillus pumilus*, cepa 8G-134 (NRRL B-50174), se cultiva en un caldo nutritivo líquido. La cepa se separa del caldo nutritivo líquido para preparar el agente microbiano de alimentación directa. En al menos algunas realizaciones del método la cepa se liofiliza. De acuerdo con otro aspecto de la invención, se añade monensina al agente microbiano de alimentación directa.

#### Breve descripción de los dibujos

En los dibujos adjuntos se ilustran ejemplos de realización preferidos descritos en este documento, en los que números de referencia iguales representan siempre partes iguales y en los que:

La Figura 1 es un gráfico que muestra las diferencias de pH entre las poblaciones de *tester* (no acidótico; Cluster 2) y de *driver* (acidótico; Cluster 1).

La Figura 2 es un gráfico que muestra las diferencias de acumulación de ácido láctico entre las poblaciones de *tester* (no acidótico; Cluster 2) y *driver* (acidótico; Cluster 1).

La Figura 3 es un gráfico que muestra la glucosa in vitro por tratamiento a lo largo del tiempo.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la acumulación de ácido láctico in vitro por tratamiento a lo largo del tiempo.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la acumulación a lo largo del tiempo de VFA total (acetato + propionato + butirato).

La Figura 6 es un gráfico que muestra el pH ruminal media a lo largo del tiempo en ganado DFM de control y candidato.

- 5 La Figura 7 es un gráfico que muestra el lactato ruminal medio a lo largo del tiempo en DFM en ganado de control y candidato.

La Figura 8 es un gráfico que muestra las concentraciones de VFA ruminal a lo largo del tiempo de tratamiento. (VFA total = acetato + propionato + butirato).

- 10 Antes de explicar con detalle las realizaciones descritas en el presente texto, se ha de entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y a la disposición de los componentes expuestos en la descripción que sigue o ilustrados en los dibujos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser practicada o llevada a cabo de varias maneras. Además, ha de entenderse que la fraseología y terminología empleadas en el presente texto es con fines de descripción y no deben considerarse como limitantes.

### Descripción detallada

- 15 En la presente invención se proporcionan cepas. También se proporcionan métodos de preparación y uso de las cepas.

En al menos algunas realizaciones, un agente microbiano de alimentación directa (DFM) preparado con la cepa proporcionada en esta invención permite a los productores de carne y leche continuar gestionando regímenes de alimentación para optimizar el crecimiento y el rendimiento sin sacrificar la salud a causa de trastornos digestivos asociados con la acidosis ruminal. Al menos algunas realizaciones de los DFMs se eligieron basándose en la gestión de las concentraciones de lactato ruminal a través de la utilización de lactato o cebando el rumen para mantener la microflora que utiliza lactato. Al menos se han desarrollado algunas realizaciones de los DFMs para gestionar concentraciones de energía ruminal. A diferencia de los actuales DFMs comercializados para los productores de ganado para aliviar la acidosis, al menos algunas de las realizaciones de la invención no fueron desarrolladas para gestionar un problema después de que se presente, sino más bien para aliviar el problema antes de que suceda.

Cepas:

La cepa proporcionada en esta invención es la cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus*, que en el presente texto se denomina también 8G-134.

- 30 La cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* fue depositada el 29 de agosto de 2008 en el organismo Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604, y se le ha dado el número de registro B-50174. El depósito se hizo bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest acerca del reconocimiento del depósito de microorganismos para los fines de procedimientos de patente. La cepa proporcionada en la presente invención puede usarse como agente microbiano de alimentación directa (DFM).

- 35 A efectos de esta descripción, una "cepa biológicamente pura" significa una cepa que no contiene otras cepas bacterianas en cantidades suficientes para interferir con la replicación de la cepa o para ser detectables por técnicas bacteriológicas normales. "Aislado", cuando se usa en conexión con los organismos y cultivos descritos en el presente texto, incluye no sólo una cepa biológicamente pura, sino también cualquier cultivo de organismos que se desarrolla o se mantiene distinto a como se encuentra en la naturaleza. También quedará claro que la adición de otras cepas microbianas, portadores, aditivos, enzimas, levaduras o similares también proporcionará el control de la acidosis y no constituirá un DFM sustancialmente diferente.

- 40 Las cepas de *Bacillus* tienen muchas cualidades que las hacen útiles como DFMs. Por ejemplo, varias especies de *Bacillus* tienen también estatus GRAS, es decir, son generalmente reconocidos como seguros por la US Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos) y también están aprobados para su uso en alimentación animal por la Association of American Feed Control Officials (Asociación Americana de Oficiales de Control de la Alimentación (AAFCO)). Las cepas de *Bacillus* descritas en el presente texto son productoras de esporas aerobias y facultativas, y por tanto son estables. Las especies de *Bacillus* son las únicas que producen esporas que se consideran GRAS. Una cepa de *Bacillus* que se ha encontrado que previene o trata la acidosis es *Bacillus pumilus* cepa 8G-134.

Preparación de las cepas:

- 50 En al menos una realización, la cepa descrita en el presente texto se cultiva individualmente utilizando técnicas convencionales de fermentación líquida o sólida. En al menos una realización, la cepa de *Bacillus* se desarrolla en un caldo nutritivo líquido a un nivel al cual se forma el mayor número de esporas. La cepa de *Bacillus* se produce fermentando la cepa bacteriana, que puede iniciarse escalando un cultivo de siembra. Esto implica la transferencia repetida y aséptica del cultivo a un volumen cada vez mayor que sirve de inóculo para la fermentación, que se puede

llevar a cabo en grandes fermentadores de acero inoxidable en un medio que contiene las proteínas, los hidratos de carbono y los minerales necesarios para un crecimiento óptimo. Medios ejemplares no limitantes son MRS o TSB. Sin embargo, también se pueden utilizar otros medios. Después de añadirse el inóculo al recipiente de fermentación, la temperatura y la agitación se controlan para permitir el máximo crecimiento. En una realización, la cepa se cultivó a una temperatura entre 32° y 37° con agitación. Una vez que el cultivo alcanza una densidad de población máxima, el cultivo se recolecta separando las células del medio de fermentación. Esto se hace normalmente mediante centrifugación.

En una realización, para preparar la cepa de *Bacillus*, la cepa de *Bacillus* se fermenta a un nivel de  $5 \times 10^8$  UFC/ml a aproximadamente  $4 \times 10^9$  UFC/ml. En al menos una realización, se usa un nivel de  $2 \times 10^9$  UFC/ml. Las bacterias se recolectan mediante centrifugación, y se retira el sobrenadante. Las bacterias sedimentadas se pueden entonces utilizar para producir un DFM. En al menos algunas formas de realización, las bacterias sedimentadas se liofilizan y después se usan para formar un DFM. Sin embargo, no es necesario liofilizar el *Bacillus* antes de usarlo. Las cepas también pueden ser utilizadas con o sin conservantes, y en forma concentrada, no concentrada, o diluida.

Entonces se puede determinar el recuento del cultivo. El UFC o unidades formadoras de colonias es el recuento de células viables de una muestra resultante de métodos estándar de cultivos microbiológicos en placa. El término se deriva del hecho de que una célula individual, cuando se siembra en un medio apropiado, crece y se convierte en una colonia viable en el medio de agar. Como múltiples células individuales pueden dar lugar a una colonia visible, el término unidad formadora de colonias es una unidad de medida más útil que el número de células.

Uso de la cepa:

En al menos algunas realizaciones, se usa la cepa para formar un DFM. Se pueden añadir a la cepa uno o más vehículos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, sacarosa, maltodextrina, piedra caliza y cáscara de arroz.

Para mezclar la cepa y los portadores (cuando se utilicen), se pueden añadir a un mezclador de cinta o de palas y mezclarse preferiblemente durante aproximadamente 15 minutos, aunque el programa de tiempo puede ser aumentado o disminuido. Los componentes se mezclan de manera que resulte una mezcla uniforme de los cultivos y portadores. El producto final es preferiblemente un polvo seco fluido y se puede formular basándose en la concentración de DFM final deseada en el producto final.

En al menos una realización de un método de preparar un DFM, una cepa descrita en el presente texto se cultiva en un medio, tal como un caldo nutritivo líquido. La cepa se separa del caldo nutritivo líquido para preparar el agente microbiano de alimentación directa. La cepa puede secarse por liofilización y después se separa del caldo.

El *Bacillus pumilus* cepa 8G-134 puede darse a los animales para reducir o incluso eliminar la aparición de acidosis. Para ello, una cantidad efectiva de esta cepa es administrada a los animales. Después de la administración a los animales, la cepa proporciona al menos una de las siguientes ventajas en los animales o para los mismos: (a) reduce la acidosis en los animales, (b) estabiliza el metabolismo ruminal como se indica por el retardo de la acumulación de ácido láctico y la producción prolongada de ácidos grasos volátiles, (c) se recupera más rápidamente de la provocación de acidosis como se mide por la recuperación de pH y la disminución del ácido láctico, y (d) no presenta signos clínicos asociados con la acidosis.

Los animales pueden ser ganado, incluyendo tanto el ganado vacuno de carne como el ganado lechero, es decir, uno o más entre toros, bueyes, novillas, terneras o vacas; cabras; ovejas; llamas; alpacas; otros animales con estómago de cuatro compartimientos y rumiantes, que pueden encontrar desequilibrio ruminal cuando se alimentan de carbohidrato fácilmente fermentable (RFC).

En al menos una realización, cuando se alimenta *Bacillus pumilus* cepa 8G-134, la cepa se administra a los animales a un nivel tal que los animales se dosifican diariamente con de aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC/animal/día a aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  UFC/animal/día. Se pueden alimentar a los animales otros niveles de la cepa. La cepa se puede administrar a los animales desde aproximadamente los 30 días de edad a través del resto de la vida productiva del rumiante adulto, u otros períodos de tiempo.

En al menos una realización, la cepa se administra como agente microbiano de alimentación directa (DFM), y el DFM se utiliza como *top dressing* en una ración diaria. Además, la cepa puede ser administrada en una ración mixta total, pienso granulado, mezclada con alimento líquido, mezclada en una premezcla de proteínas, suministrada a través de una premezcla de vitaminas y minerales.

En al menos una realización, la cepa se administra como un DFM, y el DFM se administra en combinación con monensina Artículo Medicado de tipo A (Rumensin®), con una dosis diaria de aproximadamente 50 mg a 660 mg por cabeza. La monensina se administra para aumentar la eficiencia del alimento. La monensina, como ionóforo, crea permeabilidad en la membrana celular bacteriana creando un desequilibrio iónico entre los espacios intracelulares y extracelulares. Esta respuesta afecta a las poblaciones de la microbiota ruminal e influye en la fermentación del pienso para mejorar la eficiencia de la alimentación del ganado.

En al menos una realización, la cepa se administra como un DFM, y el DFM se administra en combinación con fosfato de tilosina Artículo Medicado de Tipo A (Tylan®), con una dosis diaria de aproximadamente 60 a 90 mg/cabeza. El fosfato de tilosina se administra al ganado de carne para reducir los abscesos hepáticos causados por *Fusobacterium necrophorum* y *Actinomyces pyogenes*.

## 5 Ejemplos

Los ejemplos que siguen se proporcionan solamente con fines ilustrativos. Los ejemplos se incluyen en el presente texto únicamente para ayudar a obtener una comprensión más completa de la invención descrita en el presente texto. Los ejemplos no limitan el alcance descrito o reivindicado en el presente texto en modo alguno.

### Ejemplo 1

#### 10 Diseño experimental del modelo de acidosis:

Diez bueyes mestizos fueron bloqueados por peso y asignados a dos corrales. La ración de alimento diaria para todos los grupos de tratamiento antes del experimento consistió en 45% de forraje y 55% de concentrado sobre la base de materia seca. El ganado se alimentó a razón de 15 libras (6,8 kg)/cabeza /día de la ración una vez por la mañana y tenía la alimentación restante empujada más próxima al puntal de alimentación a última hora de la tarde. Ambos corrales se quedaron en ayunas durante 24 horas antes de la provocación con los tratamientos de dieta concentrada. Los tratamientos de dieta concentrada consistieron en fuentes de hidratos de carbono muy fermentables de copos de maíz al vapor en un 90% como base de alimento. Después de un ayuno de 24 horas, la dieta de concentrado se administró *ad libitum* a razón de 100 libras (45,5 kg)/corral para todos los corrales (0 h). El consumo de dieta de provocación se controló visualmente y se añadió alimentación adicional según las necesidades.

Se obtuvieron muestras de fluido ruminal de animales individuales a través de intubación oral, usando un tubo de recogida unido a un frasco de vacío. Se utilizaron diferentes frascos y tubos de recogida para cada corral para reducir al mínimo la contaminación cruzada de la microbiota entre los tratamientos. El fluido ruminal recogido en los frascos de vacío se decantó en tubos Falcon estériles de 50 ml etiquetados con el tiempo de la muestra y el número de identificación del animal (número de la etiqueta de la oreja). Se obtuvieron muestras ruminales de todos los corrales a -36 h, -24 h y -12 h. Las muestras de tiempo -36 h y -24h representan la línea de base fisiológica para cada animal. Las muestras de tiempo -12 h representan fluido ruminal en estado de ayuno para cada animal. El tiempo 0 h fue designado como el comienzo del experimento de alimentación. Se obtuvieron muestras ruminales de todos los animales cada 4 horas de +6 a +22 horas. Todos los corrales fueron muestreados a +28, +36, y +48 horas. El pH de muestras ruminales individuales se analizó inmediatamente después de su adquisición. Todas las muestras se congelaron y se prepararon para su envío a Agtech Products, Inc. (Waukesha, WI) para su posterior análisis.

Las concentraciones de ácidos grasos volátiles y de hidratos de carbono se midieron en muestras ruminales individuales. Las muestras se prepararon para el análisis por HPLC retirando asépticamente muestras de duplicados de 1,0 ml de fluido ruminal recogido de cada animal en cada período de tiempo. Las muestras se pusieron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y los residuos se sedimentaron por centrifugación (10 minutos a 12.500 rpm). El líquido sobrenadante (750 µl) se pasó a un tubo limpio y se acidificó con un volumen igual de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM. El fluido acidificado se mezcló intensamente y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm directamente en un vial de automuestreador de HPLC de 2 ml y se tapó. Las muestras se analizaron utilizando un sistema de HPLC Waters 2690 (Waters Inc., Milford, MA). Las muestras se inyectaron en fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM calentada a 65 °C y se separaron usando una columna BioRad HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). La HPLC fue estandarizada usando un conjunto de concentraciones para cada compuesto de interés. Los compuestos utilizados como patrones incluyen dextrosa (glucosa), lactato, metilglioxal, butirato, propionato y acetato.

Descubrimiento de los genes bacterianos en la microflora ruminal de ganado no acidótico: Hibridación supresiva sustractiva.

Se utilizó el Kit de Sustracción Genómica (Clontech, Palo Alto, CA) para determinar las diferencias de población microbiana entre dos conjuntos de muestras ruminales agrupadas. Se realizó el análisis de agrupamiento jerárquico para determinar similitudes y diferencias entre los animales basándose en los perfiles de pH y de ácido láctico a lo largo del tiempo. El análisis de clúster posicionó el ganado 2069, 2071, 2078, 2113 y 2127 en el Cluster 1 y el ganado 2107, 2115, 2088, 2133 y 2124 en el Cluster 2. Se realizaron análisis de medidas repetidas para comparar el pH y el ácido láctico a partir del Cluster 1 y del Cluster 2. Todas las variables se analizaron por separado. El Cluster 1 tenía un perfil de ácido láctico medio significativamente mayor que el Cluster 2 (P = 0,0004) acompañado con un pH medio menor (P = 0,0075) a lo largo del curso del período de experimentación de dieta (Figuras 1 y 2). El fluido ruminal de animales individuales se agrupó dentro del cluster para los procedimientos de hibridación supresiva sustractiva (SSH).

Se desarrollaron estrategias de hibridación supresiva sustractiva (SSH) para comparar muestras de ADN ruminal agrupadas del ganado del Cluster 1 con las del Cluster 2 en los tiempos de muestreo +6 h, +10 h, +14 h, y +18 h. La hibridación supresiva sustractiva se realizó utilizando el Cluster 2 como *tester* (ganado no acidótico) y el Cluster 1 como *driver* (ganado acidótico). La SSH se planteó como hipótesis para dar el resultado de fragmentos de ADN

únicos a partir de organismos que dieron como resultado niveles más bajos de ácido láctico y un pH más alto (organismo de modulación de energía ruminal). Realizando sustracciones utilizando muestras de tiempo +10 h, los fragmentos de ADN (genes) encontrados eran de organismos que pudieron modular la utilización de exceso de energía en el entorno ruminal en forma de RFC y aliviar los efectos potenciales de la acidosis.

5 Clonación y cribado de la biblioteca de secuencias de *tester* única:

Se clonaron secuencias de ADN específicas de la cepa que se recuperan después de la sustracción para posterior análisis. Las secuencias de ADN se insertaron en el vector pCR2.1 (Invitrogen) y se transformaron en células TOP10 químicamente competentes de *E. coli*. La mezcla de transformación se cultivó sobre placas de agar LB de 22 × 22 cm que contenían 50 µg/ml de kanamicina y se superpuso con 40 mg/ml de X-gal en DMF. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Las colonias recombinantes (colonias blancas) se recogieron en placas de microtítulo estériles que contenían medio LB y kanamicina a 50 µg/ml. Todos los pocillos que contenían productos de PCR recombinantes se separaron en partes alícuotas de 1 ml. Una parte alícuota se purificó usando el kit de purificación PCR Qiaquick (Qiagen), con la segunda parte alícuota sedimentada por centrifugación, se resuspendió en LB + Kan + 10% de glicerol y se almacenó a -80 °C.

15 Hibridación Southern:

Se realizaron hibridaciones *slot-blot* (transferencia en ranura) utilizando protocolos estándar. Para confirmar la especificidad de los insertos de ADN clonados, se hibridaron membranas de transferencia Zeta-Probe® cargadas positivamente (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA) con sondas hechas a partir del ADN de *tester* y *driver* originales digeridas con *Alu* I y etiquetadas con el kit de marcaje de ADN DIG High Prime (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN). Insertos recombinantes que muestran homología de secuencia con el ADN de *tester*, pero no con el ADN de *driver* se seleccionaron para análisis de secuencia. Las hibridaciones se llevaron a cabo en insertos clonados. En cada período de tiempo, se llevó a cabo la sustracción, SSH 6, 10, 14 y 18. De SSH 6, 10, 14 y 18, había 12, 29, 105, y 29 insertos clonados, respectivamente, que eran específicos del *tester*.

Se determinó la secuencia de ADN de cada inserto positivo al *tester* (Lark Technologies; Houston, TX). La secuencia de cada inserto se comparó con secuencias de la base de datos NCBI usando la función blastX. Las secuencias de nucleótidos se tradujeron y la función génica se dedujo comparando las secuencias con las encontradas en la base de datos NCBI usando la función blastX. La función del gen se puso en una categoría de genes usando el sitio web Clusters of Orthologous Groups (COG). Los genes COG específicos identificados se utilizaron para construir sondas de oligonucleótidos para experimentos de hibridación de colonias y de hibridación slot-blot. Cuatro genes de los veintinueve fueron seleccionados de SSH 10 para ser utilizados para la hibridación de colonias basándose en atributos funcionales basados en la selección de ganado no acidótico. Los genes fueron seleccionados entre los clones 79, 84, 94, y 110 y se identificaron a través del uso de la función NCBI blastX con funciones asignadas: beta-xilosidasa, transportador de glucosa/galactosa, 4-alfa-glucanotransferasa, y 4-alfa-glucanotransferasa, respectivamente. Todos los genes seleccionados para hibridación de colonias tenían asignadas propiedades como se identifican por COG como la función de hidratos de carbono y metabolismo de transporte, que habría proporcionado a las bacterias que contienen estos genes una ventaja para metabolizar la energía en exceso como la que se encuentra en el rumen cuando fueron provocados con RFC.

Hibridación de colonias:

Se utilizó el fluido ruminal recogido durante el experimento de acidosis del ganado, en los tiempos 10 h, 14 h, y 18 h. Se seleccionó el ganado 2107, 2124, 2115, 2088 y 2133 de cada uno de estos períodos de tiempo. Estos animales son representativos de los animales que fueron seleccionados previamente para la "población de *tester*" o grupo no-acidótico. Se tomaron muestras del rumen individuales de -20 °C y se dejaron descongelar a temperatura ambiente. Las muestras de rumen descongeladas se sembraron individualmente en placas en tres medios distintos por duplicado. Los medios utilizados consistieron en agar lactato sódico (NLA: Natrium Lactate Agar), agar selectivo lactato Propionibacterium (LPSA: Lactate Propionibacterium Selective Agar), y medio clostridial reforzado modificado (RCS: reinforced Clostridial Media). El RCS se preparó de forma similar al medio clostridial reforzado disponible comercialmente sans glucosa. Por lo tanto, la principal fuente de hidratos de carbono en el RCS es el almidón. La Tabla 1 que sigue indica las condiciones de incubación y diluciones de fluido ruminal cultivado en placa en cada medio.

| Tabla 1. Condiciones de incubación y diluciones puestas en placa en cada medio. |                |                      |                           |                     |
|---|----------------|----------------------|---------------------------|---------------------|
| Condiciones de incubación   |                |                      |                           |                     |
| Medio   | Condiciones O2 | Tiempo de incubación | Temperatura de incubación | Diluciones en placa |
| LPSA  | Anaerobio      | 7 días               | 32°C                      | 10-1, 10-2          |
| NLA   | Anaerobio      | 5 días               | 37°C                      | 10-2, 10-3          |

| Tabla 1. Condiciones de incubación y diluciones puestas en placa en cada medio. |                |                      |                           |                     |
|---|----------------|----------------------|---------------------------|---------------------|
| Condiciones de incubación   |                |                      |                           |                     |
| Medio   | Condiciones O2 | Tiempo de incubación | Temperatura de incubación | Diluciones en placa |
| RCS   | Anaerobio      | 48 horas             | 37°C                      | 10-1, 10-2          |

Después de la incubación, se recogieron las colonias individuales de cada placa y se inocularon en tubos de caldo de 10 ml consistentes en los medios respectivos, excepto LPSA, que se inoculó en NLB. Se seleccionaron las colonias de cada período de tiempo y cada animal (cinco animales x tres períodos de tiempo). Para los medios RCS, se recogieron cinco colonias para cada animal-período de tiempo. El LPSA exhibió menos colonias y diversidad en las placas y el número de colonias seleccionadas por animal-período de tiempo fue variable. Dos colonias por animal-período de tiempo fueron seleccionados de los medios NLA, excepto el animal 2107 en el período de tiempo 18. Seis colonias fueron recogidas de este animal-período de tiempo debido a la diversidad visible aumentada. No todos los tubos inoculados mostraron crecimiento después de la incubación.

Los tubos que muestran crecimiento se separaron en dos partes alícuotas distintas de 9 ml y 1 ml. La parte alícuota de 1 ml se utilizó para los procedimientos de aislamiento de ADN utilizando el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Alemania). La parte alícuota de 9 ml se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml estéril y se centrifugó hasta que se formó un sedimento sólido. Después, el sedimento se reconstituyó en caldos NLB o RCS que contienen 10% de glicerol. La muestra reconstituida se puso en el -80 °C para su uso futuro. Después, el ADN extraído se utilizó para el análisis RAPD-PCR de aislados individuales para determinar las relaciones filogenéticas. El análisis se realizó usando Bio-Numerics (Applied Maths Inc., Austin, TX) en los patrones de bandas RAPD ADN para determinar los relacionados de los aislados. El coeficiente de similitud de los aislados se determinó mediante el coeficiente de Dice y un método de agrupamiento de pares no ponderados (UPGMA: Un-weighted pair group method). Una similitud de 80% o mayor se usó para agrupar los 109 aislados en 65 *clusters* separados. De los 65 *clusters*, 23 crecieron sólo en RCS, 11 crecieron sólo en LPSA, 14 crecieron sólo en NLA, 4 *clusters* crecieron tanto en RCS como en LPSA, 6 crecieron tanto en RCS como en NLA, 3 crecieron tanto en LPSA como en NLA, y se encontró que 4 *clusters* no estaban presentes en los tres medios.

Se prepararon hibridaciones slot blot usando el aparato de microfiltración Bio-Dot SF (BIO-RAD; Hercules, CA). Se seleccionó el ADN genómico de un aislado individual dentro de una *cluster* para representar el clúster y se hizo transferencia a membranas. Las sondas se prepararon para la hibridación utilizando el PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Alemania). Las sondas seleccionadas se derivaron del análisis del inserto clonado descrito anteriormente y consistió en cuatro insertos de clones (clones 79, 84, 94 y 110) de SSH10. Las sondas marcadas se agruparon antes de las hibridaciones. Las hibridaciones se realizaron a 45 °C durante 5 horas. Se dejaron desarrollar reacciones colorimétricas durante toda la noche en las membranas. Treinta de los 37 aislados (*clusters*) en la membrana RCS mostraron hibridación como se identificó por reacción colorimétrica y 25 de los 28 aislados en la membrana LPSA/NLA.

Después se prepararon los aislados que muestran hibridación, para la secuenciación de ARNr 16 s. Brevemente, los rRNA 16 S de cada uno de los 55 aislados se amplificó mediante PCR usando los cebadores 8F (AGAGTTTGATYMTGGCTCAG) y 1406R (ACGGGCGGTGTGTRC). El producto de la PCR se purificó usando el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, Valencia, CA). El producto purificado se analizó por electroforesis en gel. Cuando se dispuso de suficiente producto, la muestra purificada se envió en hielo durante la noche para la secuenciación de una sola pasada (Lark Technologies, Houston, TX). Las secuencias 16 s de cada *cluster* fueron comparadas con secuencias de la base de datos NCBI usando la función blastn. Los organismos de interés adelantados de esta comparación consistían en *Enterococcus faecium* cepa 8G-1, *Enterococcus faecium* cepa 8G-73, y *Bacillus pumilus* cepa 8G-134.

## Ejemplo 2

Pruebas in vitro de la cepa:

Se recogió fluido ruminal para los ensayos in vitro a partir de dos novillas Hereford de un año. Las novillas fueron identificadas mediante etiquetas de identificación y se denominan como 101 y 133. Las novillas fueron alimentadas con 6 libras (2,72 kg)/cabeza/ día de grano de destilería seco (DDGS: dried distillers grain) y tenían acceso a forraje de libre elección.

El protocolo in vitro fue seguido lo más ajustadamente posible para disminuir el error experimental entre cada experimento. Brevemente, se recogió fluido ruminal de cada novilla y se puso en termos precalentados marcados. Los termos fueron transportados a Agtech Products, Inc. para su procesamiento. Se añadió fluido ruminal por duplicado a botellas que contienen tampón de McDougall y 3,0% de glucosa (concentración final después de que el tampón de McDougall y el fluido ruminal han sido mezclados a un volumen de 180 ml), que había sido atemperado a 39 °C. Cepas candidato DFM, *Enterococcus faecium* cepa 8G-1, *Enterococcus faecium* cepa 8G-73, y *Bacillus pumilus* cepa 8G-134, se añadieron a las botellas designadas a razón de 1,0 x 10<sup>7</sup> UFC/ml (concentración final). La

- unidad de observación fue la botella, y los tratamientos se realizaron por cuadruplicado. Los tratamientos consistieron en control (con glucosa añadida pero sin DFM), *Enterococcus faecium* cepa 8G-1, *Enterococcus faecium* cepa 8G-73, y *Bacillus pumilus* cepa 8G-134. Las botellas se purgaron con CO<sub>2</sub> y se taparon. Las botellas se mantuvieron en un baño de agua agitado a 39 °C y 140 rpm. Aproximadamente 10 minutos antes de la toma de muestras, las botellas fueron ventiladas brevemente para liberar gases producidos como subproducto de la fermentación. El fluido ruminal fue sacado de cada botella inicialmente y cada 6 horas hasta la marca de 36 horas. El pH del rumen y los ácidos grasos volátiles se midieron y se registraron. Se realizó el análisis estadístico usando el análisis de medidas repetidas para determinar los efectos de DFM a lo largo del tiempo o ANOVA de un solo factor para determinar si el tratamiento afecta a puntos específicos en el tiempo.
- El foco de los experimentos ruminales in vitro era determinar si las cepas DFM candidatas, *Enterococcus faecium* cepa 8G-1, *Enterococcus faecium* cepa 8G-73, y *Bacillus pumilus* cepa 8G-134, podían influir positivamente en la fermentación ruminal en un entorno de exceso de energía. Se añadió exceso de glucosa a cada ruminal in vitro, para replicar la congestión del ganado con un hidrato de carbono fácilmente fermentable. Como se muestra en la Figura 3, la adición de cada una de las cepas candidatas aumentó significativamente la utilización de la glucosa a lo largo del tiempo (P = 0,0001). En comparación con el control (Figura 4), la influencia sobre la producción de ácido láctico a lo largo del tiempo también se vio afectada significativamente por la adición del DFM candidato al modelo in vitro provocado (P = 0,0025). En el momento puntual de 36 horas, había una producción de ácido láctico de 17% menos en el *B. pumilus* y 32% menos de acumulación de ácido láctico en los dos candidatos de *Enterococcus*.
- El análisis de ácidos grasos volátiles se realizó a través de HPLC. Los VFA (volatile fatty acids) totales (acetato + propionato + butirato) se vieron afectados significativamente por la adición de los *Enterococcus* candidatos (P = 0,0279) (Figura 5). Los *Enterococcus* candidatos, 8G-1 y 8G-73, parecían hacer aumentar la cantidad de VFA de total producida a lo largo del tiempo. No hubo ningún efecto significativo en la producción total de VFA cuando se compara el candidato *B. pumilus* con el control.
- Los resultados in vitro indicaron que los DFMs candidatos 8G-1, 8G-73 y 8G-134 afectaron positivamente a la fermentación ruminal aumentando la utilización de glucosa sin el correspondiente aumento de la producción de ácido láctico en comparación con la del tratamiento testigo o de control. El exceso de glucosa en el rumen es fermentado típicamente de una manera rápida con la producción de ácido láctico. Es la acumulación de ácido láctico lo que impulsa una respuesta acidótica aguda. Utilizando la glucosa sin la producción concurrente de ácido láctico, los DFMs candidatos han demostrado el potencial para mejorar los efectos de la acidosis. El modelo ruminal in vitro sugiere que estas cepas pueden ser capaces de modular con éxito la energía ruminal en exceso en ganado alimentado con cantidades elevadas de hidratos de carbono fácilmente fermentables.

### Ejemplo 3

Prueba de DFM candidato en ganado alimentado con hidratos de carbono fácilmente fermentables – provocación de una acidosis aguda:

#### 35 Materiales y métodos:

Ganado y asignaciones de corrales:

- Se compraron veinte bueyes de carne mestizos en los establos de venta locales. El ganado fue alojado en las instalaciones de investigación durante un período de dos semanas antes de la iniciación del experimento para la observación de la morbilidad o la mortalidad. El ganado se bloqueó aleatoriamente a través del tratamiento por el peso. Cinco cabezas de ganado fueron asignadas a un corral y los corrales se designaron a uno de cuatro tratamientos. Los tratamientos consistieron en 3 corrales recibiendo cada uno un DFM diferente como se detalla a continuación, no recibiendo DFM el cuarto corral (control). Las asignaciones de tratamiento se pueden ver en la Tabla 2 a continuación.

| ID del corral | DMF candidato (TX) | Dosis mínima (UFC/cabeza/día) | Identificación del rANR 16s |
|---------------|--------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1             | Ninguno            | 0                             | Ninguno (control)           |
| 2             | 8G-1               | 5 x 10 <sup>10</sup>          | <i>Enterococcus spp.</i>    |
| 3             | 8G-73              | 5 x 10 <sup>10</sup>          | <i>Enterococcus spp.</i>    |
| 4             | 8G-134             | 5 x 10 <sup>9</sup>           | <i>Bacillus pumilus</i>     |

- La ración de pienso diaria para todos los grupos de tratamiento antes de la provocación consistió en 62,5% de fibra celulósica y 30% de maíz quebrado y 7,5% de suplemento de proteínas (Tabla 3). El suplemento de proteínas contenía monensina (Rumensin®) administrada a razón de 375 mg/cabeza /día. El suplemento de proteínas también contenía fosfato de tilosina (Tylan®).

| Tabla 3. Composición de la ración de provocación |                                   |               |
|--|-----------------------------------|---------------|
|  | Ingrediente                       | % de la dieta |
| Dieta previa a la provocación                    | Heno de suelo                     | 62,5          |
|  | Maíz quebrado                     | 30            |
|  | Steakmaker ® K+ 45-25 R500 T 180* | 7,5           |
| Dieta de provocación                             | Maíz descamado al vapor           | 87,4          |
|  | Pellas de alfalfa                 | 5,1           |
|  | Steakmaker ® K+ 45-25 R500 T 180* | 7,5           |
| *Ambas raciones contienen Rumensina y Tylan.     |                                   |               |

El ganado se alimentó con 15 libras (6,8 kg)/cabeza /día de la ración una vez por la mañana y tenía cualquier alimento restante empujado próximo al puntal de alimentación a última hora de la tarde. Catorce días antes del ayuno, los grupos de tratamiento fueron DFM candidatos alimentados a las dosis designadas en la Tabla 2 anterior como *top dressing* en la ración diaria.

- 5 El *Bacillus pumilus* cepa 8G-134 se administró a un mínimo de  $5 \times 10^9$  UFC/cabeza/día. Los *Enterococcus* candidatos 8G-1 y 8G-73 fueron administrados a razón de  $5 \times 10^{10}$  UFC/cabeza/día.

Preparación de DFM candidato:

10 Cepas de DFM candidatos, previamente seleccionadas para el ensayo de provocación, fueron *Enterococcus spp.* 8G-1 y 8G-73, y *Bacillus pumilus* cepa 8G-134. Las cepas se almacenaron a  $-80$  °C. Cada cultivo se inoculó en tubos de caldo de 10 ml que contienen MRS (Man, Rogosa y Sharp) o TSB (caldo triptico de soja). Los tubos de caldo se incubaron durante 24 horas a  $32$  °C y  $37$ °C para los candidatos *Bacillus* y *Enterococcus*, respectivamente. Los cultivos se señalaron para el aislamiento en el medio de agar respectivo y se incubaron. Se recogió una colonia aislada en 10 ml de caldo y se dejó crecer hasta la fase semilogarítmica (18 a 24 h) y se transfirió a caldo fresco (10% vol/vol de transferencia). Los *Enterococcus* candidatos se cultivaron a  $37$ °C en caldo MRS. El *Bacillus* se desarrolló en un incubador con agitación a 130 rpm a  $32$  °C en tubos de TSB horizontales. Para el crecimiento de *Enterococcus*, se transfirieron 2 ml a una botella de 250 ml que contiene 198 ml de caldo y se incubaron durante 18 horas.

15 Los 200 ml de cultivo se inocularon en una botella de 2 L que contenía 1,8 L de caldo y se dejó incubar durante 18 hr. Para los *Bacillus* candidatos, se transfirieron 5 ml a un matraz de 250 ml que contiene 50 ml de TSB y después se incubó a  $32$ °C en un incubador con agitación a 130 rpm durante 24 horas. Los 50 ml se utilizaron para inocular un matraz de 1 litro conteniendo 600 ml y se dejó incubar durante otras 24 horas.

20 Se tomó la densidad óptica (OD) del cultivo de 18 h de candidatos de *Enterococcus* antes de recolectar las células. La OD fue comparada con las curvas de crecimiento previas para determinar el valor de UFC/ml de cultivo. Las muestras se pusieron en placas para la enumeración y la huella genética. Se aseguró el control de calidad entre cada lote de fermentación mediante el análisis RAPD-PCR. Con un objetivo mínimo de  $5,0 \times 10^9$  ufc/cabeza/día para candidatos de *Enterococcus*, se dispensó la cantidad calculada de cultivo en botellas de centrifuga Nalgen de 250 ml y se centrifugó a  $4$  °C durante 10 minutos a 4500 rpm. El objetivo mínimo para el candidato de *Bacillus* era  $5,0 \times 10^9$  cfu/cabeza/día y un total de 100 ml del cultivo de *Bacillus* fue centrifugado de modo similar al *Enterococcus*. El sedimento se resuspendió en 30 ml de medio de crecimiento que contiene 10% de glicerol. Esta cantidad fue transferida a un tubo cónico de 50 ml. Las botellas de centrifuga se enjuagaron después con 10 ml de caldo y se transfirieron al mismo tubo cónico. Las muestras fueron etiquetadas con la cepa, la fecha en la que se recolectó el candidato, y el número de lote de fermentación. Se utilizaron recuentos de placa para determinar la UFC total en cada tubo. Los tubos se combinaron para suministrar recuentos de un mínimo de  $5,0 \times 10^{10}$  ufc/cabeza/día para candidatos de *Enterococcus* y  $5,0 \times 10^9$  ufc/cabeza/día para candidatos de *Bacillus*. Todos los tubos cónicos fueron congelados a  $-20$  °C.

Dieta de provocación y fase de recogida de fluido ruminal:

40 Se obtuvieron muestras de fluido ruminal de los animales individuales a través de una intubación ruminal usando un tubo de recogida dotado de un filtro y unido a una fuente de vacío a través de un matraz de vacío. El pH se midió inmediatamente después de la adquisición del fluido ruminal y las muestras se congelaron para transportarlas a Agtech Products, Inc. para su análisis de VFA. Se recogieron muestras de todo el ganado en los tiempos de toma de muestra  $-12$  h,  $+6$  h,  $+10$  h,  $+14$  h,  $+18$  h,  $+22$  h,  $+30$  h,  $+36$  h y  $+48$  h, representando el tiempo 0 h el inicio de la

provocación. Todo el alimento fue retirado del ganado en el tiempo -24 h para iniciar el ayuno y persuadir al ganado para engullir la ración de provocación en el momento 0.

5 Todos los corrales se mantuvieron en ayunas durante 24 horas antes de la provocación con la dieta de concentrado (Tiempo 0). La dieta de concentrado consistió en 28 libras (12,7 kg) de maíz en copos al vapor en peso de copos (Tabla 3 anterior). La ración de provocación fue alimentada para suministrar 20 libras (9,1 kg)/cabeza. El consumo de la ración de desafío se controló visualmente y se añadió alimentación adicional como base necesaria a lo largo del resto del experimento.

10 Cada 4 horas se recogieron muestras ruminales de todo el ganado desde +6 hasta +22 horas. El pH de cada muestra de rumen se analizó inmediatamente después de la adquisición. El fluido ruminal se congeló después y se transportó a Agtech Products, Inc. para el análisis de VFA mediante HPLC. Se realizó el análisis de medidas repetidas sobre el pH ruminal, VFA y niveles de glucosa usando animales individuales como unidad de observación. Se realizaron comparaciones por pares a lo largo del tiempo entre cada uno de los corrales de tratamiento con DFM y el corral de control para determinar la eficacia de los candidatos para alterar los patrones de fermentación ruminal.

Resultados y discusión:

15 Veinte cabezas de ganado vacuno mestizo con un peso promedio de 731,95 libras (332,3 kg) fueron bloqueadas aleatoriamente por peso a través de tratamiento de manera que no había diferencias significativas en peso entre los grupos de tratamiento (Tabla 4). Hubo 3 corrales de tratamiento y un corral de control con cinco cabezas/corral. La asignación del tratamiento por corral puede verse en la Tabla 2 anterior.

| <b>Tabla 4. Asignaciones de tratamiento por corral</b> |                    |          |   |  |
|--|--------------------|----------|---|--|
| <b>Corral</b>  | <b>Tratamiento</b> | <b>N</b> | <b>Peso medio del corral en kg (sd)</b> | <b>Consumo medio de alimento/novillo<sup>1</sup><br/>(% del peso corporal)</b> |
| 1  | Control            | 5        | 332,15 (36,29)                          | 4,8  |
| 2  | 8G-1               | 5        | 336,50 (42,69)                          | 3,9  |
| 3  | 8G-73              | 5        | 332,15 (31,83)                          | 3,7  |
| 4  | 8G-134             | 5        | 330,33 (33,01)                          | 3,6  |

<sup>1</sup> El consumo medio de alimento/novillo se calculó como porcentaje del peso medio de los novillos para ese corral.

20 El ganado se alimentó con la ración de provocación en el tiempo 0 y se recogió fluido ruminal en los tiempos designados para medir los valores de la fermentación ruminal. Se controló y se registró el consumo medio de alimento/corral después de 24 horas. El promedio de consumo de alimento/novillo se calculó como porcentaje del peso medio de los novillos para ese corral (Tabla 4 anterior). El corral de control (corral 1) parecía tener el consumo de alimento más alto en comparación con los otros grupos de tratamiento, consumiendo el novillo promedio un 4,8% de su peso corporal. El consumo más bajo de ración de provocación/corral estaba en el corral 4, comiendo el novillo promedio aproximadamente el 3,6% de su peso corporal. El ganado en todos los corrales en promedio habrían consumido aproximadamente 5,625 libras (2.553,7 kg) de concentrado/día como parte de la ración previa a la provocación, que en promedio habría constituido un 0,8% del peso corporal promedio de los novillos. A pesar de la variación del corral del consumo de ración de provocación, la diferencia no fue mayor que el aumento en el consumo de concentrado de la ración previa a la provocación y no sería causa de diferencias de fermentación entre corrales.

30 Después de 24 horas, la alimentación fue retirada del ganado y se administró libremente heno de pradera. Se dio heno al ganado a libre elección como precaución contra la disminución constante de los valores de pH del rumen. La adición de heno estimularía la rumia adicional y ayudaría a amortiguar el rumen. A pesar de la adición de heno, el pH ruminal siguió aún disminuyendo.

35 Inmediatamente después de la recogida del fluido ruminal, se analizó el pH de la muestra. Todos los grupos de tratamiento mostraron una disminución del pH ruminal como el que puede observarse en la Figura 6. El pH para el grupo de control alcanzó el punto más bajo en el tiempo de 30 horas y comenzó a subir gradualmente a partir de ese momento. En la última recogida de muestras de rumen el pH medio para el corral de control era todavía notablemente acidótico con un pH de 4,94. La acidosis aguda está asociada con un pH que permanece por debajo de 5,2 y acidosis crónica o subaguda está caracterizada por un pH inferior a 5,6 (Owens, et. al., 1998). Tendencias medias numéricamente más altas aparecieron para las cepas 8G-1, 8G-73 y 8G-134 en los corrales 2, 3 y 4 en comparación con la del control del tiempo + 22 a + 48. Esto sugiere que el ganado tratado con los DFMs candidatos en estos corrales se recuperaron más rápidamente de la provocación acidótica. El pH medio para el ganado tratado con 8G-1, 8G-73 y 8G-134 en el tiempo +48 fue 5,96, 6,02, y 6,14, respectivamente, que es mayor que 1,0 unidad de pH por encima del corral de control o testigo. El análisis de medidas repetidas de estas tres cepas a lo largo del

tiempo (+6 a +48) no mostró diferencias significativas en comparación con el corral de control. Sin embargo, cuando se realizaron comparaciones de pH de corrales tratados con 8G-1, 8G-73 y 8G-134 con el corral de control del tiempo +22 h a +48 h, las diferencias fueron significativas o se acercaron a la significación ( $P = 0,1562, 0,0965$  y  $0,0466$  para 8G-1, 8G-73 y 8G-134, respectivamente).

5 En la Figura 7 se muestran perfiles de ácido láctico promedio de todos los grupos de tratamiento. Picos de acumulación de ácido láctico ruminal media a 105 mM para el corral de control 30 horas después de recibir la ración de provocación. Las cepas DFM candidato 8G-1, 8G-73 y 8G-134 mostraron de nuevo diferencias numéricas medias visibles en la acumulación de lactato en comparación con la del corral de control. La acumulación media de ácido láctico fue similar entre el ganado de control y el ganado tratado con 8G-1 a lo largo de las primeras 14 horas de la provocación. Los niveles subsiguientes de acumulación durante el resto del ensayo fueron mucho menos en el ganado tratado con 8G-1 aunque no significativos ( $p = 0,1892$ ). Los corrales de tratamiento con 8G-73 demostraron una disminución de los niveles de acumulación de ácido láctico en los tiempos 30 y se mantuvieron más bajos que el corral de control para el resto del ensayo. La cepa candidata 8G-134 mostró también disminución de los niveles de ácido láctico a partir de las +22 h, y se mantuvo consistentemente más baja que el corral de control a través de +48 h.

Se midieron y analizaron valores de VFA individuales. Las concentraciones de ácidos grasos volátiles (VFA) aumentaron en el corral de control y en los tratamientos con 8G-73 y 8G-134 y alcanzaron un pico a las seis horas (Figura 8). Al cabo de seis horas cada uno de estos corrales de tratamiento mostró disminución de los niveles de VFA totales (acetato, propionato y butirato). No hubo diferencias significativas entre estos tratamientos y el control. El tratamiento con 8G-1, sin embargo, mostró un retraso en la disminución de VFA que no apareció hasta +14 h. En el curso del ensayo no hubo diferencias significativas en los niveles de concentración total de VFA o la VFA individual (consistente en acetato, butirato o propionato).

Además de la monitorización y la medición de las características de fermentación ruminal a lo largo del experimento acidótico, se observó el ganado a lo largo de todo el ensayo en relación con los efectos clínicos visibles asociados con la acidosis. Poco después de la provocación acidótica (+0 h a +14 h), los efectos de la dieta de provocación fueron mínimos. El ganado no mostró signos de depresión y siguió alimentándose con la ración de provocación. A las +22 horas después de recibir la ración de provocación todo el ganado, excepto los que están recibiendo tratamiento 8G-1) mostraban signos de dolor muscular y depresión, y tenían excreción fecal suelta, líquida. El ganado del corral 2 no siguió consumiendo alimento, pero no mostró síntomas clínicos, a pesar de tener niveles de pH en disminución de forma similar.

La acidosis ruminal aguda, por definición, es la disminución del pH ruminal a niveles perjudiciales no sólo para la función del rumen sino también para la salud del ganado. La acidosis aguda está marcada por la acumulación de ácido láctico y la disminución de la producción de VFA. La función correcta del rumen es una combinación de la gestión de la energía disponible y los componentes de nitrógeno disponibles en el pienso. Cuando aparecen desequilibrios en el metabolismo ruminal, normalmente sigue el malestar digestivo y puede manifestarse en forma de acidosis. En este experimento, las cepas 8G-1, 8G-73 y 8G-134 mejoran la recuperación de la función del rumen como se indica por los parámetros de la fermentación ruminal.

Las reses alimentadas con 8G-1, *Enterococcus faecium*, como promedio se recuperaron más rápidamente de la provocación de acidosis, según se mide por la recuperación del pH y la disminución del ácido láctico. Además de los patrones de fermentación ruminal medidos, el candidato de DFM 8G-1 de alimento del ganado no mostró signos clínicos asociados con la acidosis.

La cepa candidata 8G-73, *Enterococcus faecium*, mejoró la fermentación ruminal en el curso del ensayo. Los niveles medios de ácido láctico fueron los más bajos para todas las cepas candidatas ensayadas a +48 horas a 12,54 mM. Un aumento correspondiente en el pH también se asoció con la recuperación con un pH final de 6,02, que era 1,08 unidades de pH más alto que el del control.

La cepa candidata 8G-134, *Bacillus pumilus*, también mejoró la recuperación ruminal durante la provocación acidótica. Los niveles medios de ácido láctico, en el ganado alimentado con 8G-134, alcanzaron un máximo de 89 mM en el tiempo +22 h, mientras que el corral de control siguió aumentando y alcanzaron un máximo de 105 mM en el tiempo +30 horas. Los niveles medios de ácido láctico habían descendido a 57 mM a +30 horas. Como con la acumulación de ácido láctico, el pH ruminal en el ganado alimentado con 8G-134 se recuperó más rápidamente que el del control y se encontró que era significativamente diferente de +22 a +48 h ( $p = 0,0466$ ).

#### Ejemplo 4

##### Sumario:

Treinta vacas Holstein primíparas y múltiparas fueron bloqueadas por lactancia previa y la capacidad productora prevista (PPA: predicted producing ability) y asignadas a uno de tres tratamientos. Diez vacas fueron asignadas por tratamiento y los tratamientos consistieron en un grupo de control (Tratamiento 1) que recibió una ración mixta total basal (TMR), Tratamiento 2 y Tratamiento 3, que recibieron ración mixta total basal TMR y se alimentaron con *Bacillus pumilus* 8G-134 a  $5 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFC/cabeza/día, respectivamente, a partir de 3 semanas previas al

parto a 22 semanas después del parto. El principal objetivo fue determinar los efectos de *B. pumilus* 8G-134 en la producción de la vaca lechera y el rendimiento por encima del ganado de control anterior durante este período de tiempo. El objetivo secundario fue determinar si había una respuesta a la dosis asociada con la alimentación de *B. pumilus* 8G-134. Los regímenes de *B. pumilus* 8G-134 incrementaron significativamente la producción de leche y la grasa de leche, e hicieron disminuir el recuento de células somáticas. Estos significativos efectos en la producción de *B. pumilus* 8G-134 no se produjeron a expensas de la puntuación de la condición corporal de la vaca, el peso corporal, aumentos en la ingesta de materia seca o cambia significativamente los perfiles de metabolitos de la sangre, e indicarían que *B. pumilus* 8G-134 también proporcionaron ventajas de eficiencia a las vacas lecheras.

Materiales y métodos:

#### 10 Ganado:

Treinta vacas Holstein fueron asignadas aleatoriamente a uno de tres tratamientos dietéticos en un experimento de lactancia continua a partir de 3 semanas antes del parto a lo largo de 22 semanas después del parto. No hubo diferencias significativas para el rendimiento previo de leche para las vacas segunda y mayores, o para la capacidad de producción prevista (PPA) para vacas de primera lactancia para los diferentes grupos de tratamiento. El número de animales de primera y segunda lactancia se desvió entre los grupos, pero no influyó en la producción media global, ya que la lactancia se ajustó en el modelo estadístico. Los animales estuvieron en estudio desde aproximadamente tres semanas antes del parto a lo largo de 22 semanas después del parto.

Nutrición:

20 Los ingredientes de la dieta y la composición formulada de raciones mixtas totales (TMR) se presentan en la Tabla 5 que sigue, para vacas secas y lactantes, respectivamente. La TMR de base fue la misma para cada grupo y difirió en el tratamiento del *top dress*. Cada grupo recibió un *top dress* de 8 onzas (226,5 gramos) de maíz finamente molido al que se añadió 1 onza (28,3 gramos) de maltodextrina (Tratamiento 1, control), *Bacillus spp* a  $5 \times 10^9$  UFC/cabeza/día (Tratamiento 2), y *Bacillus spp* a  $1 \times 10^{10}$  UFC/cabeza /día (Tratamiento 3).

**Tabla 5.** Composición formulada de TMR ofrecida a vacas secas y en lactancia.

|                              | Periodo seco | Periodo de lactancia |
|------------------------------|--------------|----------------------|
| Ingredientes, base % Mat Sec |              |                      |
| Maíz ensilado                | 52,57        | 39,14                |
| Centeno ( <i>Ryelage</i> )   | 18,54        |                      |
| Forraje de alfalfa           | -            | 16,52                |
| Heno                         | 14,45        | 1,77                 |
| SBM48                        | 5,74         | 10,77                |
| Harina de sangre             | 4,41         |                      |
| AminoPlus                    | -            | 6,01                 |
| Maíz                         | 2,41         | 21,07                |
| Grasa                        | 0,65         | 1,42                 |
| Caliza                       | -            | 1,26                 |
| Bicarbonato sódico           | -            | 0,84                 |
| MagOx                        | 0,65         | 0,42                 |
| Sal                          | 0,32         | 0,53                 |
| TMin Vit                     | 0,27         | 0,26                 |
| Composición, % Mat Sec       |              |                      |
| CP                           | 16,50        | 16,64                |
| SP, % CP                     | 32,29        | 28,58                |
| NDF                          | 41,06        | 30,65                |
| Almidón                      | 19,56        | 29,82                |
| Azúcar                       | 3,19         | 2,68                 |

|              | Periodo seco | Periodo de lactancia |
|--------------|--------------|----------------------|
| NFC          | 33,47        | 41,87                |
| Grasa        | 3,82         | 4,15                 |
| Ca           | 0,31         | 0,87                 |
| P            | 0,29         | 0,34                 |
| Mg           | 0,54         | 0,42                 |
| K            | 1,72         | 1,33                 |
| NeL, mcal/kg | 1,60         | 1,74                 |

Recogida de muestras y datos:

5 Se recogieron muestras diarias y rechazos de TMR y se compusieron semanalmente, las composiciones semanales se combinaron mensualmente, y las muestras mensuales se analizaron en relación con la materia seca (MS), proteína cruda (CP), proteína unida a fibra detergente ácida (ADF-CP), proteína unida a fibra detergente neutra (NDF-CP), proteína soluble (SP), fibra detergente ácida (ADF), fibra detergente neutra (FDN), lignina, grasa, almidón, azúcar, ceniza, calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg), potasio (K), azufre (S), sodio (Na), cloro (Cl), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), y cobre (Cu), por Cumberland Valley Analytical Services, Maugansville, MD.

10 Las vacas se ordeñaron dos veces al día, y el volumen de leche se registró electrónicamente en cada ordeño y las cantidades am-pm (de mañana y tarde) se sumaron para un total diario. Una vez a la semana las muestras de leche de ordeños de mañana (am) y tarde (pm) se juntaron para el análisis del contenido de grasa, proteínas, células somáticas, sólidos no grasos, y nitrógeno de urea en la leche (MUN) por el laboratorio lácteo Dairy One en State College, PA utilizando un Fossomatic 4000 (FOSS; Eden Prairie, MN).

15 Los animales estuvieron en estudio desde aproximadamente tres semanas antes del parto a través de 22 semanas después del parto. El peso del animal se estimó por el perímetro torácico en las semanas 1, 3, 7, 11, 15 y 18 después del parto. La condición corporal fue evaluada por dos observadores independientes al mismo tiempo que se tomó el peso corporal.

20 Se tomaron muestras de sangre de la vena coccígea, se recolectó suero, se congeló y se analizó en relación con la glucosa, beta-hidroxil butirato (BHB), y ácidos grasos no esterificados (NEFA) en las semanas 2 y 8 después del parto. La glucosa y el BHB se analizaron usando un medidor Abbott Precision Xtra™ (Abbott Diabetes Care Inc., Alameda, CA). Se usó un kit de ensayo Randox (Cat. HN 1530, Randox Laboratories, Irlanda del Norte) para medir la concentración en suero de ácidos grasos no esterificados (NEFA) adaptado a un lector de placas de un ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA) a una longitud de onda de 550 nm para muestras múltiples. El kit Randox usa Acil CoA sintetasa y oxidasa para convertir NEFA en 2,3-trans-Enoil-CoA más peróxido; peróxido más de N-etil-N-(2-hidroxil 3-sulfopropil) m-tolueno conduce a un producto púrpura, que es el indicador de la concentración de NEFA en el suero.

Modelos estadísticos.

30 La producción de leche y el contenido, peso corporal y puntuación de la condición corporal se analizaron usando el procedimiento mixto en el software estadístico SAS. La vaca fue el sujeto repetido con la matriz de covarianza ajustada a la estructura de correlación de tipo 1. Las observaciones diarias de la leche fueron agregadas por semana después del parto. El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_i = u_i + TRT_j + Lact_k + Semana_1 + TRT_j * Lact_k + TRT_j * Semana_1 + TRT_j * Lact_k * Semana_1 + e_{ijklm}$$

en donde

$Y_i$  = media de mínimos cuadrados de las variables dependientes de la producción;

$u_i$  = media global de las diversas variables de producción;

35  $TRT_j$  = j-ésimo efecto del tratamiento, 1, 2, 3;

$Lact_k$  = k-ésima lactancia, 1, 2+;

$Semana_1$  = 1ª semana, 1 . . . 22;

términos de interacción ( $TRT_j * Lact_k + TRT_j * Semana_1 + TRT_j * Lact_k * Semana_1$ )

$e_{ijklm}$  = error

Muestras mensuales de TMR y rechazos de alimento para cada tratamiento fueron ensayadas en cuanto a la diferencia usando el procedimiento de medias en SAS.

5 Las concentraciones en sangre de glucosa, BHB y NEFA se analizaron usando los modelos lineales generales en el software estadístico SAS. Las variables de clase eran vaca, semana y tratamiento. El tratamiento se anidó en la vaca y fue el término de error para la prueba de significación del tratamiento. El tratamiento por interacción de semana se ensayó para la significación estadística utilizando el error residual.

Resultados:

La composición media de TMR para TMR secas y en lactancia se presenta en la Tabla 6 en el curso del estudio. La composición no fue diferente entre los grupos de tratamiento.

10 **Tabla 6.** Composición analizada de TMR para vacas secas y vacas en lactancia.

| --                            |       |       |       |       |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| --                            |       |       |       |       |
| Tratamiento, base % Mat. seca |       |       |       |       |
| Item                          | 1     | 2     | 3     | SEM   |
| --                            |       |       |       |       |
| TMR seca                      |       |       |       |       |
| N                             | 3     | 3     | 3     |       |
| CP                            | 13,64 | 13,17 | 13,11 | 0,14  |
| ADF                           | 29,55 | 28,37 | 27,88 | 0,53  |
| NDF                           | 48,54 | 48,04 | 47,14 | 0,93  |
| Lignina                       | 3,64  | 3,52  | 3,58  | 0,09  |
| Almidón                       | 18,74 | 18,19 | 17,97 | 0,87  |
| Azúcar                        | 6,71  | 6,15  | 6,57  | 0,23  |
| Ceniza                        | 8,44  | 7,56  | 7,79  | 0,10  |
| NFC                           | 39,49 | 36,93 | 38,20 | 0,86  |
| Ca                            | 0,49  | 0,46  | 0,47  | 0,01  |
| P                             | 0,37  | 0,35  | 0,35  | 0,004 |
| TMR lactante                  |       |       |       |       |
| N                             | 9     | 9     | 9     |       |
| CP, %                         | 14,54 | 14,81 | 14,37 | 0,10  |
| ADF, %                        | 21,54 | 21,38 | 21,64 | 0,25  |
| NDF, %                        | 33,51 | 33,21 | 33,30 | 0,32  |
| Lignina, %                    | 3,27  | 3,27  | 3,26  | 0,06  |
| Almidón, %                    | 25,36 | 26,52 | 25,48 | 0,38  |
| Azúcar, %                     | 6,25  | 6,15  | 6,25  | 0,15  |
| Grasa, %                      | 3,89  | 3,65  | 3,62  | 0,04  |
| Ceniza, %                     | 8,73  | 8,67  | 8,60  | 0,09  |
| NFC, %                        | 41,22 | 42,02 | 41,44 | 0,34  |
| Ca, %                         | 0,95  | 0,97  | 0,96  | 0,005 |

| --  |      |      |      |       |
|---|------|------|------|-------|
| Tratamiento, base % Mat. seca   |      |      |      |       |
| Item  | 1    | 2    | 3    | SEM   |
| P, %  | 0,36 | 0,36 | 0,36 | 0,003 |
| error estándar de la media (SEM)  |      |      |      |       |
| NFC, carbohidrato no de fibra   |      |      |      |       |
| NDF, fibra detergente neutra  |      |      |      |       |
| ADF, fibra detergente ácida   |      |      |      |       |
| Tratamiento 1 control; Tratamiento 2, <i>Bacillus pumilus</i> a 8G-134 $5 \times 10^9$ ; Tratamiento 3, <i>Bacillus pumilus</i> a 8G-134 a $1 \times 10^{10}$ |      |      |      |       |

5 Una vaca de control (Tratamiento 1) mostró una producción anómala de leche y sus datos se eliminaron del análisis de datos. El análisis de la producción de leche se repitió en 29 vacas. La producción de leche se vio influenciada significativamente por el tratamiento (Tabla 7, más abajo). Las vacas fueron alimentadas con *Bacillus pumilus* 8G-134 a  $5 \times 10^9$  UFC/cabeza/día (Tratamiento 2) y *Bacillus pumilus* 8G-134 a  $1 \times 10^{10}$  UFC/cabeza/día (Tratamiento 3). Los Tratamientos 2 y 3 produjeron aproximadamente 2 kg más de leche que los tratamientos 1 (Tabla 7). Hubo una interacción significativa con la paridad o número de parto. Los aumentos de producción fueron significativos en vacas en segunda paridad en 5,2 kg, pero no hay diferencias significativas en la producción de leche en las vacas en primera paridad.

10 **Tabla 7.** Producción media de leche por mínimos cuadrados en vacas Holstein desde el parto a lo largo de 22 semanas posteriores al parto alimentadas con un aditivo microbiano.

| ---         |             |           |                    |      |                                   |     |
|-------------|-------------|-----------|--------------------|------|-----------------------------------|-----|
| Efecto      | Tratamiento | Lactancia | Leche, kg/d        | sem  | Cambio en relación con el control | sem |
| Tratamiento | 1           |           | 33,12 <sup>a</sup> | 0,65 | 0,00                              |     |
|             |             |           |                    | 0,66 |                                   |     |
| Tratamiento | 2           |           | 35,38 <sup>b</sup> | 0,60 | 2,30*                             |     |
|             |             |           |                    | 0,60 |                                   |     |
| Tratamiento | 3           |           | 35,08 <sup>b</sup> | 0,61 | 1,99*                             |     |
|             |             |           |                    | 0,61 |                                   |     |
| Lactancia   |             | 1         | 31,59 <sup>a</sup> | 0,47 | -0,83                             |     |
|             |             |           |                    | 0,47 |                                   |     |
| Lactancia   |             | 2         | 36,84 <sup>b</sup> | 0,39 | 3,09*                             |     |
|             |             |           |                    | 0,39 |                                   |     |
| Interacción |             |           |                    |      |                                   |     |
|             | 1           | 1         | 32,44 <sup>a</sup> | 1,07 | 0,00                              |     |
|             |             |           |                    | 1,07 |                                   |     |
|             | 2           | 1         | 31,70 <sup>a</sup> | 0,93 | -0,72                             |     |
|             |             |           |                    | 0,93 |                                   |     |
|             | 3           | 1         | 31,36 <sup>a</sup> | 0,93 | -1,07                             |     |
|             |             |           |                    | 0,93 |                                   |     |
|             | 1           | 2         | 33,80 <sup>b</sup> | 0,74 | 0,00                              |     |
|             |             |           |                    | 0,74 |                                   |     |

| ---    |             |           |                     |      |                                      |     |
|--------|-------------|-----------|---------------------|------|--------------------------------------|-----|
| Efecto | Tratamiento | Lactancia | Leche, kg/d<br>kg/d | sem  | Cambio en relación<br>con el control | sem |
|        | 2           | 2         | 39,06 <sup>c</sup>  | 0,76 | 5,24*                                |     |
| 0,76   |             |           |                     |      |                                      |     |
|        | 3           | 2         | 38,79 <sup>c</sup>  | 0,79 | 5,17*                                |     |
| 0,79   |             |           |                     |      |                                      |     |

Las medias difieren dentro del grupo con superíndice diferente, P < 0,05

El cambio de media con \* difiere significativamente de 0.

Tratamiento 1 control; Tratamiento 2, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 5 x 10<sup>9</sup>; Tratamiento 3, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1 x 10<sup>10</sup>

5 La grasa de leche y el rendimiento se presentan en la Tabla 8 que sigue. La grasa de la leche aumentó significativamente por los Tratamientos 2 y 3 por encima del control. Las respuestas del rendimiento siguieron el rendimiento de leche con el rendimiento de grasa aumentado en los grupos de tratamiento alimentados con *Bacillus pumilus* 8G-134. El ganado de *Bacillus pumilus* 8G-134 para el tratamiento 2 y 3 produjo un porcentaje de grasa significativamente más alto por encima del control con niveles 0,24% y 0,31% más altos, respectivamente (Tabla 8). Unido al aumento significativo de la producción de leche, el rendimiento de grasa diario para ambos tratamientos 2 y 3 proporcionó un aumento significativo en la producción diaria de grasa por encima de la del control (Tabla 8).

**Tabla 8.** Contenido de grasa en la leche por grupos de tratamiento.

| ---         |             |           |                   |      |                               |       |
|-------------|-------------|-----------|-------------------|------|-------------------------------|-------|
| Efecto      | Tratamiento | Lactancia | Grasa, %          | sem  | Rendimiento de<br>grasa, kg/d | sem   |
| ----        |             |           |                   |      |                               |       |
| Tratamiento | 1           |           | 3,57 <sup>a</sup> | 0,09 | 1,206 <sup>a</sup>            | 0,042 |
|             | 2           |           | 3,81 <sup>b</sup> | 0,08 | 1,351 <sup>a</sup>            | 0,039 |
|             | 3           |           | 3,88 <sup>b</sup> | 0,08 | 1,351 <sup>b</sup>            | 0,039 |
| Lactancia   |             | 1         | 3,76              | 0,06 | 1,159 <sup>a</sup>            | 0,030 |
|             |             | 2         | 3,78              | 0,05 | 1,395 <sup>b</sup>            | 0,025 |

Medias dentro de la columna con diferente superíndice difieren en P < 0,05. Tratamiento 1 control; Tratamiento 2, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 5 x 10<sup>9</sup>; Tratamiento 3, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1 x 10<sup>10</sup>

10 El log de las puntuaciones del recuento de células somáticas (LogSCC) lineales fueron diferentes por tratamiento y lactancia. Los tratamientos con *Bacillus pumilus* 8G-134 (Tratamientos 2 y 3) tenían puntuación log lineal significativamente más baja que las vacas de control (Tabla 9, más abajo). Las vacas de los tratamientos 2 y 3 tenían LogSCC de 4,97 y 4,96, respectivamente, en comparación con los de las vacas de control a 5,92. Las vacas de paridad dos tenían una puntuación lineal log significativamente más alta que las vacas de primera lactancia. Los recuentos de células somáticas se asocian a la infección, así como al estado inmunológico y la salud de la vaca lechera en lactación. Además el aumento de SCC es indicativo de respuestas inflamatorias a la infección. Las disminuciones en SCC demostradas aquí pueden indicar que las vacas alimentadas con el *Bacillus pumilus* 8G-134 son inmunológicamente mejores para manipular la provocación infecciosa durante la lactancia y mantener la salud de la ubre y de la vaca.

**Tabla 9.** Efectos del tratamiento sobre el recuento de células somáticas (SCC).

| ---         |             |           |                   |      |
|-------------|-------------|-----------|-------------------|------|
| Efecto      | Tratamiento | Lactancia | LogSCC            | sem  |
| ---         |             |           |                   |      |
| Tratamiento | 1           |           | 5,92 <sup>a</sup> | 0,32 |
|             | 2           |           | 4,97 <sup>b</sup> | 0,30 |
|             | 3           |           | 4,96 <sup>b</sup> | 0,30 |
| Lactancia   |             | 1         | 5,27 <sup>a</sup> | 0,23 |
|             |             | 2         | 5,86 <sup>b</sup> | 0,19 |

LogScc = log del recuento de células somáticas

Tratamiento 1 control; Tratamiento 2, *Bacillus pumilus* a 8G-134 5 x 10<sup>9</sup>; Tratamiento 3, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1 x 10<sup>10</sup>

5 Los datos para DMI medio para grupos para períodos secos y lactantes en la Tabla 10 más abajo. La ingesta de materia seca para vacas secas estaba en el intervalo de 10,79 a 11,64 kg/d a lo largo de los grupos. Los grupos lactantes consumieron 22,02, 21,31 y 21,48 kg/d para los grupos de tratamiento 1, 2, y 3, respectivamente (Tabla 10). El DMI previsto basado en la ecuación de NRC para las vacas por semana después del parto se presenta en la Tabla 10. La ingesta para el tratamiento 1 fue 0,83 kg mayor que lo previsto; la ingesta para el tratamiento 2 fue -1,37 kg inferior a la prevista; la ingesta para el tratamiento 3 fue -1,04 kg menor que lo previsto. El aumento de la producción de leche en los Tratamientos 2 y 3 se llevó a cabo sin aumento en DMI. De hecho, el DMI previsto o 10 esperado basado en las predicciones de NRC en comparación con la ingesta media del grupo sugiere que estas vacas consumieron de 1,0 a 1,5 kg/d DMI menos. Así pues, la eficiencia de utilización de DM aumentó en los Tratamientos 2 y 3.

**Tabla 10.** Medias de mínimos cuadrados para la ingesta de alimento del grupo, glucosa en suero, beta-hidroxi butirato, ácidos grasos no esterificados, por grupo de tratamiento.

| ----- Grupo de tratamiento -----   |       |      |       |      |       |     |
|------------------------------------|-------|------|-------|------|-------|-----|
| ----                               |       |      |       |      |       |     |
| Item                               | 1     | sem  | 2     | sem  | 3     | sem |
| -----                              |       |      |       |      |       |     |
| Ingesta de materia seca, kg/d      |       |      |       |      |       |     |
| Vacas secas 0,25                   | 10,79 | 0,27 | 11,64 | 0,25 | 11,12 |     |
| Vacas en lactancia 0,11            | 22,02 | 0,11 | 21,31 | 0,11 | 21,48 |     |
| DMI previsto, kg/d 0,58            | 21,19 | 0,58 | 22,68 | 0,57 | 22,52 |     |
| Valores en suero                   |       |      |       |      |       |     |
| Glucosa, mg/dl 1,98                | 53,95 | 1,98 | 51,5  | 1,98 | 53,5  |     |
| Beta-OH butirato, mg/dl 0,15       | 1,05  | 0,15 | 0,88  | 0,15 | 1,15  |     |
| NEFA, ueq/ml 0,04                  | 0,23  | 0,04 | 0,16  | 0,04 | 0,17  |     |
| Valores en suero por semana, 2, 8; |       |      |       |      |       |     |
| Glucosa, mg/dl 2,80                | 52,90 | 2,80 | 47,00 | 2,80 | 48,90 |     |
| 2,80                               | 55,0  | 2,80 | 56,00 | 2,80 | 58,10 |     |

| Item              | ----- Grupo de tratamiento ----- |      |      |      |      |     |
|-------------------|----------------------------------|------|------|------|------|-----|
|                   | 1                                | sem  | 2    | sem  | 3    | sem |
| BHB, mg/dl 0,21   | 0,92                             | 0,21 | 0,86 | 0,21 | 1,39 |     |
| 0,21              | 1,17                             | 0,21 | 0,89 | 0,21 | 0,91 |     |
| NEFA, ueq/ml 0,05 | 0,41                             | 0,05 | 0,23 | 0,05 | 0,28 |     |
| 0,05              | 0,07                             | 0,05 | 0,10 | 0,05 | 0,07 |     |

BHB = beta-hidroxi butirato

Tratamiento 1 control; Tratamiento 2, *Bacillus pumilus* a 8G-134 5 x 10<sup>9</sup>; Tratamiento 3, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1 x 10<sup>10</sup>

DMI previsto: (0,372 \* FCM + 0,0968 \* BWT (kg)<sup>0,75</sup>) \* (1 - exp(-0,192 \* (semana+3,67)))

5 Las diferencias de DMI y los valores de producción podrían sugerir que las vacas en los tratamientos 2 y 3 podrían haber movilizado más tejido corporal que las vacas de control para producir más leche y haber comido menos de lo esperado. Sin embargo, los valores de NEFA, glucosa y BHB en suero sugieren que estas vacas estaban en un estado de energía similar al de las vacas de control (Tabla 10, más arriba). Además, el peso corporal y BCS fueron similares para los grupos de *Bacillus* en relación con el grupo de control (Tabla 11, más abajo). Esto sugiere que no movilizaron más tejido corporal para producir el volumen de leche adicional, indicando la eficiencia de conversión del alimento en los Tratamientos 2 y 3 de alimentación de las vacas, al margen de la dosis.

**Tabla 11.** Peso corporal medio de mínimos cuadrados (libras (kg)) y puntuación de la condición corporal por grupos de tratamiento. La puntuación de la condición corporal es la puntuación media de dos observadores.

| Efecto                                  | Tratamiento | Lactancia | Peso            |                 |               |             |      |
|---|-------------|-----------|-----------------|-----------------|---------------|-------------|------|
|   |             |           | sem             | BCS             | sem           | libras (kg) |      |
| Tratamiento                             | 1           |           | 1343,10 (609,7) | 28,49 (12,93)   | 2,92          | 0,03        |      |
|   | 2           |           | 1324,60 (601,1) | 27,54 (12,50)   | 3,13          | 0,03        |      |
|   | 3           |           | 1388,02 (630,2) | 27,73 (12,59)   | 3,06          | 0,03        |      |
| Lactancia                               |             | 1         | 1223,31 (550,7) | 21,87 (9,93)    | 3,04          | 0,02        |      |
| Lactancia                               |             | 2         | 1476,62 (670,1) | 19,94 (8,14)    | 3,01          | 0,02        |      |
| Tratamiento<br>interacción<br>lactancia | x           | 1         | 1               | 1170,78 (531,2) | 27,72 (12,58) | 3,06        | 0,05 |
|   |             | 2         | 1               | 1242,64 (563,9) | 25,26 (11,47) | 3,17        | 0,05 |
|   |             | 3         | 1               | 1208,50 (548,4) | 24,00 (10,90) | 2,94        | 0,05 |
|   | 1           | 2         | 1486,02 (674,6) | 19,33 (8,78)    | 2,78          | 0,04        |      |
|   | 2           | 2         | 1406,42 (638,3) | 19,96 (9,06)    | 3,10          | 0,04        |      |
|   | 3           | 2         | 1547,85 (702,7) | 20,79 (9,44)    | 3,16          | 0,04        |      |

Peso en libras (kg)

BCS = puntuación de la condición corporal, escala 1 a 5 en 0,25 puntos; 1 = animal emaciado, 2 = delgado, 3 = medio, 4 = gordo, 5 = obeso

Tratamiento 1 control; Tratamiento 2, *Bacillus pumilus* a 8G-134 5 x 10<sup>9</sup>; Tratamiento 3, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1 x 10<sup>10</sup>

Se entiende que las diversas realizaciones preferidas se muestran y se describen arriba para ilustrar diferentes posibles características descritas en el presente texto y las diversas formas en las que pueden combinarse estas características. Aparte de combinar las diferentes características de las realizaciones anteriores de varias maneras, también se considera que dentro del alcance descrito en el presente texto están otras modificaciones. No se pretende que la invención esté limitada a las realizaciones preferidas descritas anteriormente.

**Bibliografía.**

- Allison, M.J., M. Robinson, R.W. Dougherty, y J.A. Bucklin. 1975. Grain overload in cattle and sheep: Changes in microbial populations in the cecum and rumen. *Amer. J. Vet Res.* 36:181.
- Dunlop, R.H.. 1972. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis. *Adv. Vet Sci. Comp Med.* 16:259.
- 10 Elam, C.J. 1976. Acidosis in feedlot cattle: Practical observations. *J. Anim. Sci.* 43:898.
- Hungate, R.E., R.W. Dougherty, M.P. Bryant, and R.M. Cello. 1952. Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. *Cornell Vet.* 42:423.
- Muir, L.A., E.L. Rickes, P.F. Duquette, and G.E. Smith. 1981. Prevention of induced lactic acidosis in cattle by thiopeptin. *J. Anim. Sci.* 52:635.
- 15 Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J., Gill, D.R. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- Slyter, L.L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43:910.
- Yang, W., 2004. Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*, 114(4): 179-193.

**REIVINDICACIONES**

1. Una cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* aislada, depositada como NRRL B-50174.
- 5 2. Una combinación que comprende una cepa de *Bacillus pumilus* aislada, según la reivindicación 1, y monensina.
3. Una cepa de *Bacillus pumilus* según la reivindicación 1 en una cantidad efectiva, para su uso en el tratamiento de un animal.
- 10 4. La cepa para uso según la reivindicación 3, en la que, cuando se administra al animal, la cepa proporciona al menos uno de los siguientes beneficios en el animal o para el animal, en comparación con un animal al que no ha sido administrada la cepa: (a) reduce la acidosis, (b) estabiliza el metabolismo ruminal, como se indica por el retardo de la acumulación de ácido láctico y la prolongación de la producción de ácidos grasos volátiles, (c) se recupera con más rapidez de la provocación de acidosis, como se determina por la recuperación del pH y la disminución de los ácidos grasos volátiles, y (d) reduce la exhibición de síntomas clínicos asociados con la acidosis, (e) aumenta la producción de leche, (f) aumenta el contenido en materia grasa de la leche, (g) disminuye el recuento de células somáticas (SCC), (h) mejora la respuesta inmunológica y la salud, como se evidencia por el descenso de SCC, y (i) aumenta la eficiencia de la producción de leche.
- 15 5. La cepa para uso según la reivindicación 3, en la que el animal es un rumiante.
6. La cepa para uso según la reivindicación 3, en la que el animal es un toro, un buey, una novilla, una vaca o un ternero.
- 20 7. La cepa para uso según la reivindicación 3, en la que la cepa es administrada al animal a un nivel tal que el animal recibe diariamente una dosis de aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC a aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  UFC/animal/día.
8. La cepa para uso según la reivindicación 5, en la que la cepa es administrada al animal a partir de aproximadamente 30 días de edad.
9. La cepa para uso según la reivindicación 3, en la que el animal es una res de carne o una vaca lechera.
- 25 10. La cepa para uso según la reivindicación 9, en la que, en la administración a la vaca lechera, la cepa proporciona al menos uno de los siguientes beneficios en la o a la vaca lechera en comparación con la vaca lechera a la que no se ha administrado la cepa: (a) la cepa hace aumentar el rendimiento graso diario y el porcentaje de grasa en la leche, (b) la cepa reduce las puntuaciones del log del recuento de células somáticas (LogSCC), (c) mejora la respuesta inmunológica y la salud, como se evidencia por la disminución de LogSCC, (d) hace aumentar la eficiencia de la producción de leche, y (e) cuando las vacas lecheras son vacas de segundo parto o más, la cepa hace aumentar la producción lechera.
- 30 11. La cepa para uso según la reivindicación 10, en la que el aumento de la producción de leche se obtiene sin ningún aumento sustancial en la ingesta de materia seca.
- 35 12. Una combinación que comprende una cepa de *Bacillus pumilus* según la reivindicación 1 en una cantidad efectiva, y monensina, para uso en el tratamiento de un animal.
13. Un método para preparar un agente microbiano de alimentación directa, comprendiendo el método:
  - (a) cultivar en un caldo nutritivo líquido una cepa de *Bacillus pumilus* según la reivindicación 1; y
  - (b) separar la cepa del caldo nutritivo líquido para preparar el agente microbiano de alimentación directa.
14. El método según la reivindicación 13, que comprende además liofilizar la cepa.
- 40 15. El método según la reivindicación 13, que comprende además:
  - (c) añadir monensina al agente microbiano de alimentación directa.

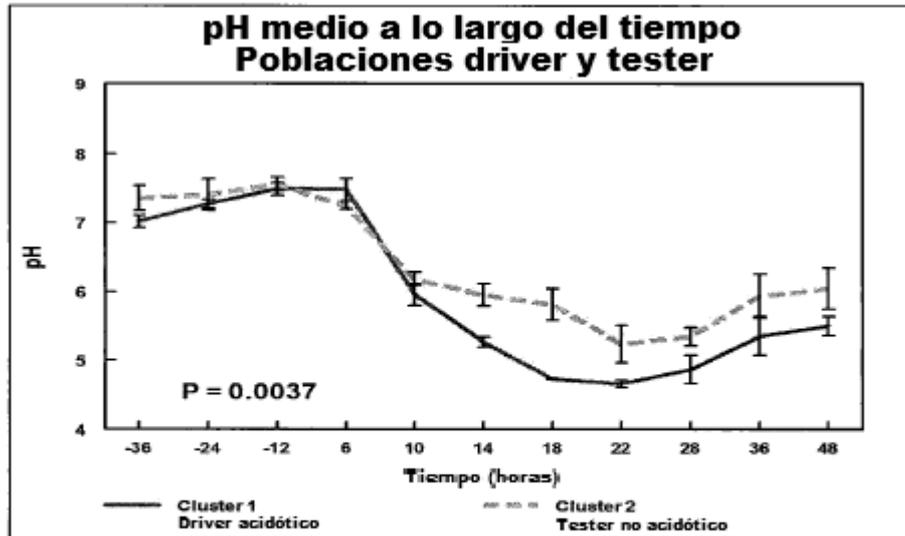


Fig. 1

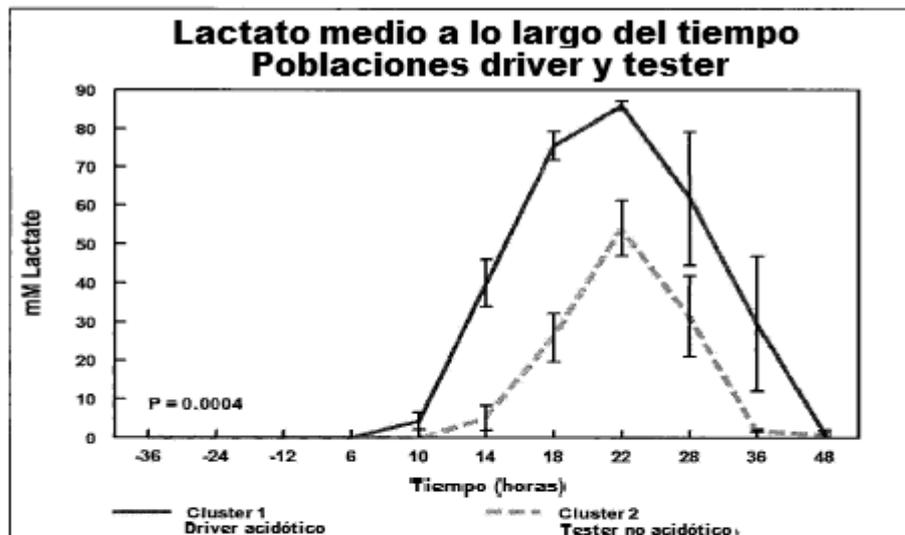


Fig. 2

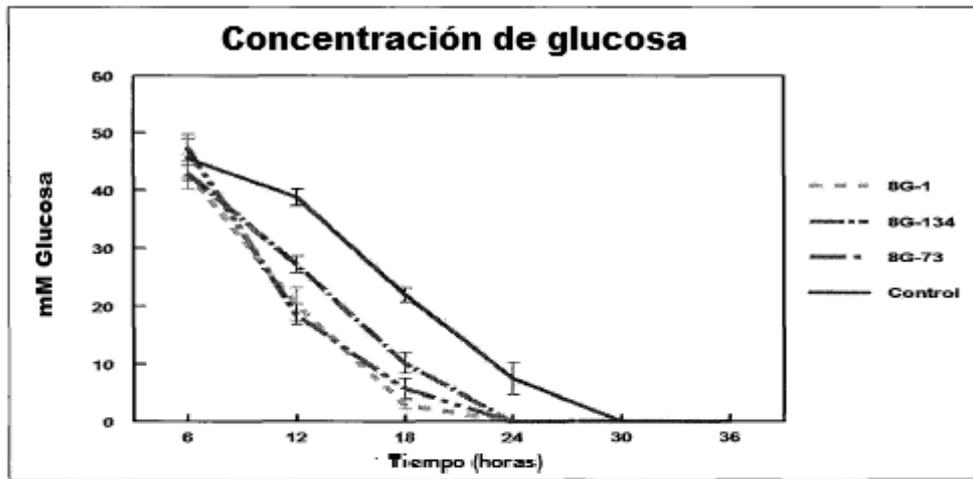


Fig. 3

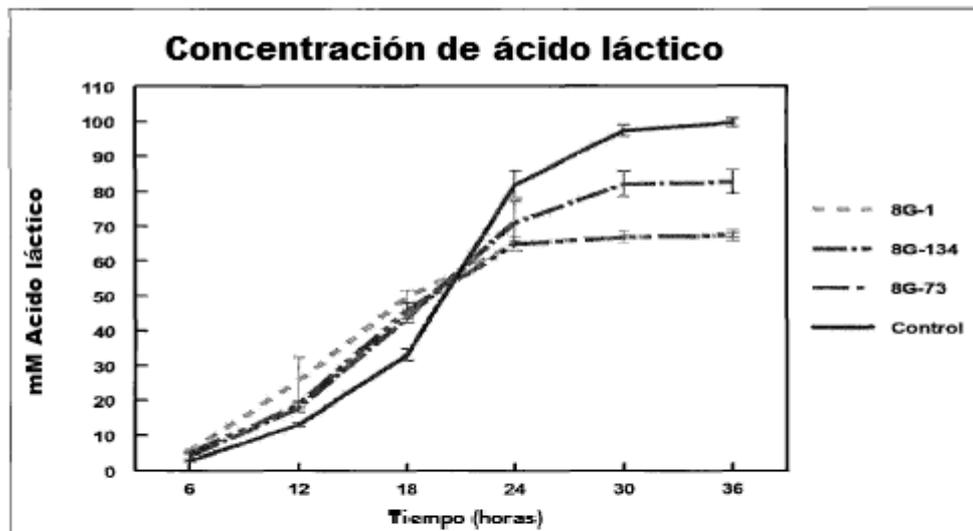


Fig. 4

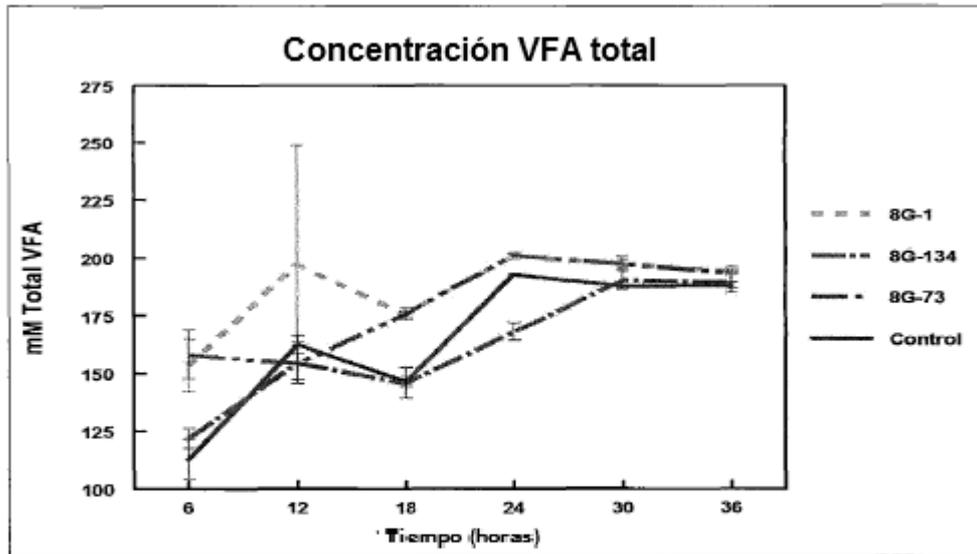


Fig. 5

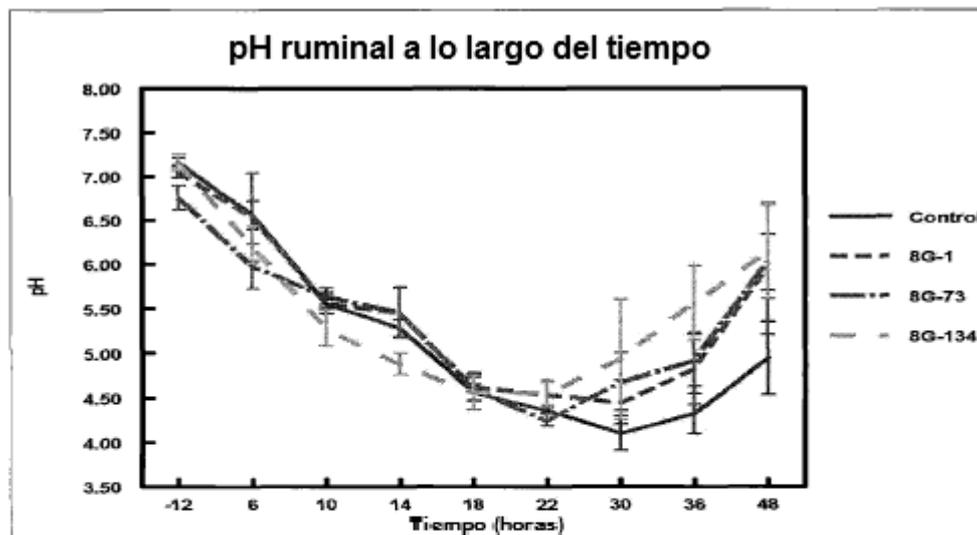


Fig. 6

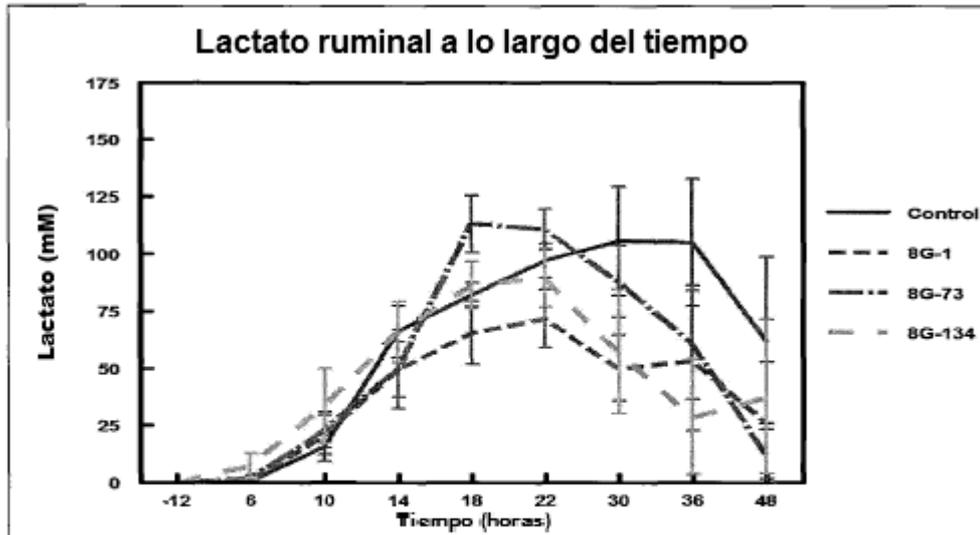


Fig. 7

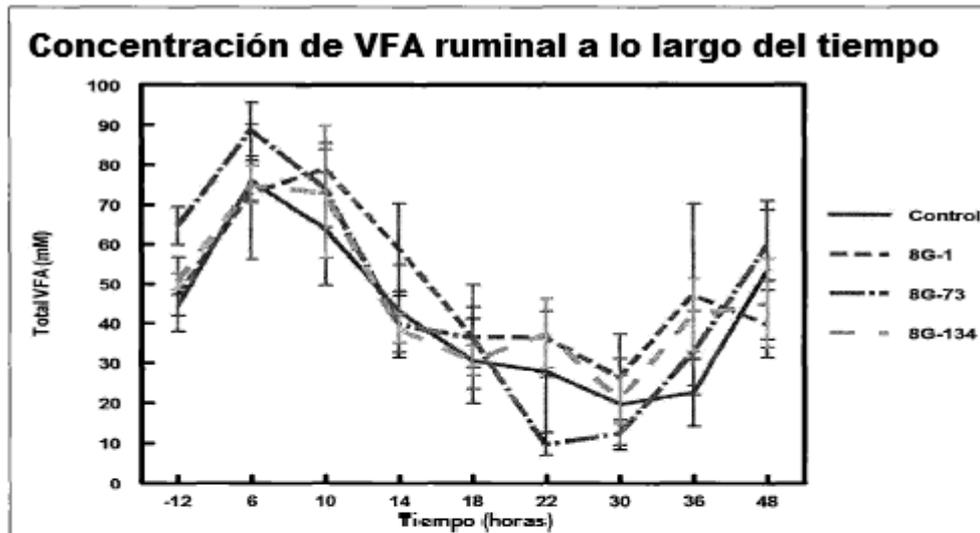


Fig. 8