(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 695 149**

(51) Int. Cl.:

A23K 10/00	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01)
C12N 15/01	(2006.01)
C12R 1/07	(2006.01)
C12R 1/125	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2013** **PCT/EP2013/057590**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013** **WO13153159**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2013** **E 13717479 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 2836589**

(54) Título: **Cepas de Bacillus sensibles a antibióticos que tienen efecto antimicrobiano contra E. coli y Clostridium perfringens y que tienen alta capacidad de esporulación**

(30) Prioridad:

13.04.2012 EP 12164087

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.01.2019

(73) Titular/es:

CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Boege Allé 10-12
2970 Hoersholm, DK

(72) Inventor/es:

NIELSEN, BEATRICE;
CANTOR, METTE DINES;
STUER-LAURIDSEN, BIRGITTE;
DERKX, PATRICK y
JOHANSEN, ERIC

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 695 149 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepas de *Bacillus* sensibles a antibióticos que tienen efecto antimicrobiano contra *E. coli* y *Clostridium perfringens* y que tienen alta capacidad de esporulación

Campo de la invención

Bacillus spp se usan para disoluciones probióticas en la industria de piensos y se conocen bien los efectos positivos de los probióticos basados en *Bacillus* en la producción y la salud en animales de cría (Spiehs *et al*., 2008; Cutting, 2011). Su uso está relacionado con la capacidad de *Bacillus* para reemplazar o reducir el uso de antibióticos, que se usan como estimuladores del crecimiento en la industria de piensos.

Sin embargo, hay una necesidad no satisfecha de cepas de *Bacillus* que no tengan resistencia a antibióticos contra antibióticos que se usan comúnmente para seres humanos. La presente invención proporciona cepas aisladas de *Bacillus* que se caracterizan por sensibilidad a ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloramfenicol y que también inhiben el crecimiento de patógenos principales tales como *E. coli* y *Clostridium perfringens.* Las cepas tienen además un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide en el día 2, lo que posibilita producir eficazmente esporas de *Bacillus* útiles y seguras para la producción de piensos.

La invención se refiere además al uso de las esporas de las cepas de *Bacillus* de la invención para la producción de aditivos de piensos, en particular productos para cerdos y aves, donde las cepas tienen un efecto probiótico (estimulación del crecimiento, la utilización de piensos y la salud).

Antecedentes de la invención

Los cerdos, especialmente los lechones, padecen diarrea del ganado, que puede producirse por bacterias tales como *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Clostridium perfringens* tipos A y C (*C. perfringens*). La diarrea del ganado puede producir pérdidas por fallecimiento y graves pérdidas de producción, incluyendo pérdida de peso, si no se trata.

E. coli es la causa principal de la diarrea en lechones y el 50-75% del antibiótico usado en granjas se usa contra diarrea en el destete, producida principalmente por *E. coli.* La diarrea es el mayor problema en animales en destete y en engorde (hasta 40 kg) y *E. coli* es el patógeno más importante que produce diarrea (Klose *et al*., 2010).

Las infecciones clostridiales entéricas en cerdos se producen predominantemente en el periodo antes del destete pero también están asociadas con síndrome hemorrágico intestinal que afecta a cerdos en el periodo de finalización. Aunque la inmunización contra *C. perfringens* tipo *C* ha reducido enormemente la mortalidad antes del destete, actualmente no se dispone de vacunas comerciales para *C. perfringens* tipo A. Las infecciones por *C. perfringens* tipo A se reconocen ahora con frecuencia creciente en cerdos antes del destete y los enfoques de diagnóstico y profilaxis son tanto diferentes como más complejos que los de las infecciones por tipo C.

Varias infecciones y enfermedades en aves están producidas por bacterias patógenas, incluyendo *E. coli* y *Clostridium perfringens.* Las infecciones y enfermedades producidas por patógenos dan como resultado una mortalidad aumentada, rendimiento disminuido y costes de producción aumentados. Además, muchos de estos patógenos pueden transmitirse a seres humanos. La colibacilosis aviar es una infección sistémica producida por *E. coli* y se produce con la mayor frecuencia en polluelos y pollos de engorde.

Los probióticos se usan en aplicaciones de salud animal con el fin de mantener una microflora intestinal sana, incluyendo una reducción en las bacterias perjudiciales tales como *Clostridia* y *E. coli* y un aumento en las bacterias beneficiosas tales como *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium.* Los probióticos son muy adecuados para mantener un equilibrio sano entre bacterias patógenas y beneficiosas, porque a diferencia de los antibióticos, no destruyen las bacterias indiscriminadamente ni conducen a cepas de bacterias patógenas resistentes a antibióticos. Hay muchos mecanismos mediante los cuales se cree que los probióticos mantienen una microflora intestinal sana: exclusión competitiva de bacterias patógenas, reducción de bacterias patógenas a través de producción de sustancias antimicrobianas, potenciación del crecimiento y viabilidad de la microflora intestinal beneficiosa, y estimulando una respuesta inmunitaria sistémica en el animal.

En vista de lo anterior, sería deseable tener una o más cepas de *Bacillus* para tratar o prevenir enfermedades debido a infecciones con *E. coli* y/o *Clostridium* en cerdos y aves.

Guo *et al*., 2006, describen el examen de cepas de *Bacillus* como probióticos potenciales y una prueba de *Bacillus subtilis* MA139 en cerdos. Se recogieron 124 muestras de pollos de engorde, cerdos, suelos, alimentos fermentados y hierbas chinas. Se aislaron 750 cepas aerobias formadoras de esporas de estas muestras. Se sometió a prueba la actividad inhibidora contra *E. coli* K88 y K99, *Salmonella* y *Staphilococcus aureus* usando un ensayo de difusión en placa. Se sometieron a prueba 6 bacilos con mejor actividad para determinar su supervivencia dentro de las condiciones de GIT simulado (pH 2 y 0,3% de sales biliares). *B. subtilis* MA139 fue el mejor candidato y se sometió a prueba *in vivo* en lechones en un ensayo de alimentación de 28 días con 90 lechones. Se mejoró la ADG y la utilización de pienso. Se aumentaron las bacterias del ácido láctico, se disminuyó *E. coli* en las heces. Sin embargo,

no se sometió a prueba la actividad antimicrobiana contra *Clostridium perfringens* y la sensibilidad a antibióticos.

Barbosa *et al*., 2005 describen el aislamiento de 237 *Bacillus* de heces de pollos de engorde criados ecológicamente (en contacto con el suelo). Se caracterizaron 31 aislados. *B. subtilis* y *B. licheniformis* estaban entre ellos. Varias cepas de *B. subtilis* mostraron inhibición a *C. perfringens* y *S. aureus. B. licheniformis* también mostró efecto contra *C. perfringens.* Sin embargo, ninguno de los aislados de *Bacillus* seleccionados mostró actividad antimicrobiana contra *E. coli* tal como se define en la presente solicitud. Un aislado de *Bacillus* mostró reducción en la intensidad de crecimiento, pero ausencia de inhibición completa contra la cepa de *E. coli,* O78:K80 y ningún efecto contra la otra cepa de *E coli* sometida a prueba (véase la tabla 5). No se proporcionan datos sobre el porcentaje de esporulación después de 2 días de incubación ni sobre la sensibilidad a vancomicina, kanamicina, estreptomicina y clindamicina.

Chaiyawan *et al*., 2010, dan a conocer una cepa de *Bacillus* sp. T3-1, que es sensible a antibióticos usados ampliamente en el tratamiento médico y que muestra actividad antimicrobiana contra C. *perfringens* ATCC 15191. La cepa no tiene actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157. No se proporcionan datos sobre el porcentaje de esporulación después de 2 días de incubación.

Benitez *et al*., 2011 han descrito recientemente que la presencia de *E. coli* intacto o inactivado potenció la síntesis de péptidos antimicrobianos por la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens,* LBM 5006.

El documento US 7.754.469 se refiere a microorganismos y métodos para tratar aves y el documento US 8.021.654 se refiere a métodos de tratamiento de cerdos con cepas de *Bacillus*.

Sin embargo, en ninguno de estos artículos o patentes hay alguna descripción o sugerencia para seleccionar cepas de *Bacillus* que son sensibles a antibióticos que se usan comúnmente para seres humanos, inhiben el crecimiento tanto de *Clostridium perfringens* como de *E. coli* y tienen un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide después de 2 días de incubación con el fin de hacer que la cepa sea útil para esporulación eficaz y por tanto para la producción probiótica de *Bacillus*.

Ninguno de los documentos de la técnica anterior, por ejemplo Barbosa *et al*., 2005, Chaiyawan *et al*., 2010, y Guo *et al*., 2006 da a conocer cepas que tienen sensibilidad a antibióticos que se usan comúnmente para seres humanos, inhiben el crecimiento tanto de *Clostridium perfringens* como de *E. coli,* y tienen un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide después de 2 días de incubación.

En resumen, la técnica anterior en relación con el examen de cepas de *Bacillus* no proporciona las tres características distintivas de la presente invención, es decir, sensibilidad a antibióticos que se usan comúnmente para seres humanos, inhibición del crecimiento de *E. coli* y *Clostridium perfringens* y un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide después de 2 días de incubación. La técnica anterior tampoco proporciona cepas de *Bacillus* que cumplan estos tres criterios.

Sumario de la invención

El problema que va a resolverse por la presente invención es proporcionar una cepa de *Bacillus*, que se caracteriza por sensibilidad a ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloramfenicol; inhibición del crecimiento de *E. coli* y *Clostridium perfringens;* y un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide en el día 2.

La solución se basa en un método de selección desarrollado por los presentes inventores para la identificación de cepas de *Bacillus* mejoradas que tienen estas propiedades mejoradas.

Una primera etapa esencial del método de selección es examinar específicamente las cepas de *Bacillus* que son sensibles a los antibióticos que se usan comúnmente para seres humanos. Más específicamente, las cepas se examinan para determinar la sensibilidad a ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloramfenicol.

Además, las cepas se examinan para determinar la actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *Clostridium perfringens* y para tener un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide en el día 2.

De los 261 aislados de fuentes de suelo y heces y alimentos investigados por los presentes inventores, 161 aislados eran resistentes a antibióticos en la prueba de pre-examen descrita en los ejemplos. De los 100 aislados que eran sensibles a antibióticos, 56 tenían efecto antimicrobiano contra *Clostridium perfringens* y sólo 22 tenían efecto tanto contra *E. coli* como contra *Clostridium perfringens.* De ellos, 12 aislados eran de la especie *B. amyloliquefaciens.* Otras cepas representativas eran de las especies *B. subtilis* y B. *mojavensis.* Las tablas 2 y 3 resumen los resultados de cepas propiedad de Chr. Hansen (22 de las 32 cepas seleccionadas para el examen secundario).

El procedimiento de selección se centró en (i) seguridad, (ii) efecto y (iii) alta esporulación en medios adecuados para la producción. El aspecto de la seguridad se basa principalmente en la ausencia de resistencia a antibióticos, lo que es importante debido a los casos aumentados de bacterias resistentes en seres humanos. Estas bacterias han dado como resultado enfermedades bien conocidas que ya no pueden tratarse con antibióticos ya que las bacterias

patógenas se han vuelto resistentes.

Se sabe bien que *Bacillus* puede producir sustancias que pueden tener actividad antimicrobiana, es decir, bacteriocinas, enzimas bacteriolíticas o surfactinas. El segundo criterio de selección, el efecto contra *E. coli* y *Clostridium perfringens,* es importante ya que ambos patógenos son causas principales para diarrea en cerdos y aves. El efecto se somete a prueba contra tres cepas de *E. coli* y contra *Clostridium perfringens* tipo A, pero se contempla que los resultados sean indicativos de un efecto general contra *E. coli* y de un efecto también contra otros tipos de clostridios tales como *Clostridium perfringens* tipo C.

El tercer criterio de selección es importante para la producción del probiótico. El procedimiento de producción tiene lugar en fermentadores donde crecen los *Bacillus* y al final del procedimiento es necesaria una alta tasa de esporulación para una alta eficacia de producción. El proceso de esporulación de *Bacillus* se ha investigado durante muchos años pero todavía hay muchas incógnitas. Por tanto, se conoce bien entre los expertos en la técnica que trabajan con el desarrollo de producción y procedimiento de *Bacillus* que algunas cepas de *Bacillus* tienen una tasa de esporulación muy baja. Se ha sugerido que *Bacillus* se diferencia para dar subpoblaciones de células especializadas como comunidades que esporulan, comunidades que producen enzimas para la degradación de nutrientes complejos y comunidades que mueren (Lopez y Kolter, 2010). Esta diferenciación parece estar regulada por señales extracelulares, la mayoría de ellas producidas por el propio *Bacillus*. Por tanto, se ha lanzado la hipótesis de que una alta producción de enzimas o sustancias antimicrobianas pueda dar como resultado una baja eficacia de esporulación. Por tanto, para el experto habitual en la técnica es inusual y sorprendente que una cepa de *Bacillus* tenga tanto actividad antimicrobiana como un alto porcentaje de esporulación.

Figuras

La figura 1 muestra esquemáticamente la actividad antimicrobiana de 261 cepas de *Bacilli*. Es sorprendente que muchas cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* tienen efecto antimicrobiano.

Descripción detallada de la invención

La retirada progresiva de promotores del crecimiento antibióticos en la Unión Europea en 2006 ha dado como resultado una necesidad creciente de aditivos de piensos rentables con alta eficacia y por tanto la necesidad de nuevos probióticos. Los aditivos de piensos probióticos basados en *Bacillus* se conocen por sus efectos positivos sobre la salud y la producción en cerdos y aves. Estos productos son relevantes para la industria alimentaria porque las esporas son termoestables y pueden sobrevivir al procedimiento de granulación a temperaturas de hasta 90-95ºC.

Es necesario que los probióticos para cerdos sean seguros para los animales, los seres humanos y el entorno y deben aumentar el crecimiento y la utilización de pienso en el animal. El objetivo de la presente invención era examinar en tres etapas una amplia variedad de bacterias aerobias formadoras de endoesporas (AEB) procedentes de diferentes fuentes para determinar su efecto probiótico en cerdos. Las AEB se aislaron de alimentos fermentados (entrantes Kantong y Gergoush), heces de cerdo, suelo y diferentes extracciones de cultivo. Se identificaron 261 aislados de AEB secuenciando genes de ADNr 16S, y se investigaron para determinar la resistencia a antibióticos relevante mediante la determinación de la concentración inhibidora mínima (MIC) de varios antibióticos relevantes.

Los análisis adicionales incluyeron tolerancia a bilis y ácido, inhibición de patógenos, crecimiento en diferentes medios, esporulación así como interacciones con líneas celulares animales para evaluar la probabilidad de efectos positivos positive sobre uniones estrechas en el sistema intestinal. Los resultados muestran una alta diferencia tanto entre especies como entre cepas. Las especies aisladas fueron principalmente del género *Bacillus* incluyendo *B. amyloliquefaciens, B. subtilis* y *B. safensis* de fuentes de alimentos, B. *subtilis, B. pumilus, B. amyloliquefaciens, B. licheniformis, B. megaterium* de heces y *B. licheniformis* y *B. simplex* del suelo.

Muchos de los aislados mostraron resistencia a antibióticos indeseable por encima de los valores críticos definidos por EFSA y se desecharon debido a problemas de seguridad. Se observó un buen crecimiento para la mayoría de las cepas cuando se hicieron crecer durante la noche en caldo de infusión de ternera, mientras que el 16% tuvo un crecimiento insatisfactorio en un medio adecuado para la fermentación. En la etapa 2 del procedimiento de examen, se identificaron 32 cepas seleccionadas sin resistencia a antibióticos secuenciando el gen de gyrB, y la obtención de huellas mediante PFGE. Además, se sometió a prueba su efecto antimicrobiano sobre patógenos seleccionados y se observó una variación considerable entre aislados. Varios de los aislados mostraron inhibición de *Clostridium perfringens*, mientras que sólo algunos aislados inhibieron *E. coli.* Los resultados de la presente invención confirman por tanto que la inhibición del crecimiento tanto de *Clostridium perfringens* como de *E. coli* solo se combinan en casos poco frecuentes. La etapa 3 del procedimiento de examen implicó 10 cepas con alta inhibición de patógenos e incluyó la determinación de la termoestabilidad de las esporas, la secuenciación del genoma y estudios *in vitro* adicionales que mostraron su efecto sobre las uniones estrechas.

La presente invención proporciona cepas de *Bacillus* caracterizadas por (i) sensibilidad a ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloramfenicol.

Mediante el término “sensibilidad a ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina,

clindamicina, tetraciclina y cloramfenicol" quiere decirse que una cepa, que va a considerarse sensible a un antibiótico particular, no debe crecer al nivel de valor crítico facilitado por EFSA (EFSA, 2008) explicado resumidamente en la tabla 1.

Los valores de MIC explicados resumidamente en la tabla 1 se basan en las directrices publicadas por EFSA (Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Sustances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human and veterinary importance. The EFSA Journal (2008) 732, 1-15), que proporciona una lista de antibióticos y valores de puntos de corte aceptables para el género *Bacillus*. EFSA no facilita ningún valor crítico para ampicilina para *Bacillus,* sin embargo, existe un valor crítico para otras diversas bacterias, es decir, *Lactobacillus* spp. Por tanto, esta sensibilidad de cepas de *Bacillus* contra ampicilina se ha elegido como valor crítico para la presente invención.

Tabla 1. Valores críticos de EFSA para diversos antibióticos usados comúnmente para seres humanos

Tipo de antibiótico	Antibiótico	Valor crítico de EFSA, mg/l
B-lactámico	Ampicilina	4
Glucopeptídico	Vancomicina	4
	Gentamicina	4
Aminoglucósido	Kanamicina	8
	Estreptomicina	8
Macrólido	Eritromicina	4
Lincosamida	Clindamicina	4
Tetraciclina	Tetraciclina	8
Cloramfenicol	Cloramfenicol	8

Para que esté dentro del alcance de la presente invención la cepa tiene que ser sensible a todos los antibióticos anteriores. En la práctica, esto significa que no se observe crecimiento de la cepa en el nivel de valor crítico cuando se somete a prueba mediante un método de microdilución (concentración inhibidora mínima (MIC)).

Según la presente invención, la MIC se mide mediante un método de microdilución en caldo tal como se explica resumidamente por la norma de CLSI (Instituto de normas clínicas y de laboratorio, M07-A8 y M45-A2) realizado tal como sigue:

Se inocula una suspensión de un crecimiento durante la noche de la cepa que va a someterse a prueba en caldo ISO-SENSITEST (Oxoid CM0473) en placas de microtitulación a una concentración aproximada de 10^5 ufc/ml (unidades formadoras de colonias/ml) en diluciones en serie dos veces del antibiótico que va a someterse a prueba (volumen total 100 μl/pocillo) y se incuba de manera aerobia durante 20-24 horas a 37ºC. Pueden usarse los paneles prefabricados VetMIC Lact-1 & Lact-2 que comprenden los antibióticos ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloramfenicol. Se registran los resultados tras 24 horas como la concentración más baja del antibiótico que inhibe el crecimiento visible.

La primera parte del aspecto (ii) de la invención se refiere a una cepa de *Bacillus* que presenta actividad antimicrobiana contra *E. coli.* Según la presente invención, esta se mide mediante la prueba de manchas en agar de *E. coli* realizada tal como sigue:

Se inoculan 9 ml de caldo de infusión de ternera (VIB) con el cultivo de *Bacillus* que va a someterse a prueba y se incuban a 37ºC y 175 rpm durante la noche. Simultáneamente, se inoculan 9 ml de caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI) con una cepa de *E. coli* seleccionada de *E. coli* O149 (O149:k91,k88a), *E. coli* O147 (O147:K89 F4), y *E. coli* O101 (O101, F5) y se incuban durante la noche a 37ºC.

Se añaden cultivos de *E. coli* incubados durante la noche en un volumen de 2 ml cada uno en 200 ml de agar VIB líquido a 50ºC, y se vierten en cada placa de bioensayo. Las placas se secan en una mesa de laboratorio estéril. El cultivo de *Bacillus* incubado durante la noche que va a someterse a prueba se dispone en manchas sobre la superficie del agar VIB mezclado con *E. coli* y se incuba a 37ºC durante 2 días. Se registran los radios de las zonas de inhibición alrededor de las manchas y los diámetros de las manchas.

Se considera que una cepa de *Bacillus* presenta actividad antimicrobiana hacia *E. coli* si la zona de inhibición es de al menos 1,5 mm. Preferiblemente, la zona de inhibición es de al menos 2,0 mm, tal como al menos 2,5 mm, más preferiblemente al menos 3 mm, lo más preferiblemente al menos 3,5 mm e incluso más preferiblemente al menos 4 mm. La zona de inhibición puede ser diferente para las diversas cepas de *E. coli.* Para que se considere que una cepa presenta actividad antimicrobiana contra *E. coli* según la presente invención debe presentar una zona de inhibición de al menos 1,5 mm para todas las cepas de *E. coli* sometidas a prueba. Preferiblemente, la zona de inhibición de dos o incluso más, preferiblemente la zona de inhibición de las tres cepas de *E.* es de al menos 2 mm. Una cepa de *Bacillus* de la invención se caracteriza por inhibición del crecimiento de *E. coli,* en particular inhibición del crecimiento de las especies sometidas a prueba. Tal como se pone de manifiesto por la técnica anterior y se confirma por los presentes inventores, la ausencia de inhibición del crecimiento de una especie de *E. coli* a menudo se combina con ausencia de inhibición del crecimiento de otra especie de *E. coli* (tabla 5, Barbosa *et al.*, 2005) y viceversa, es decir, la actividad inhibidora de una especie de *E. coli* a menudo se combina con la actividad inhibidora

de otra especie de *E. coli* (tabla 1, Guo *et al*., 2006).

La segunda parte del aspecto (ii) de la invención se refiere a una cepa de *Bacillus* que presenta actividad antimicrobiana contra *Clostridium perfringens.* Según la presente invención, esta se mide mediante la prueba de manchas en agar de *Clostridium perfringens* realizada tal como sigue:

Se inoculan 9 ml de VIB con el cultivo de *Bacillus* que va a someterse a prueba y se incuba a 37ºC y 175 rpm durante la noche. Simultáneamente, se inoculan 9 ml de caldo BHI con *Clostridium perfringens* Tipo A, DSM 756, y se incuba durante la noche a 37ºC en un frasco anaerobio.

Los cultivos de *Bacillus* se disponen en manchas sobre la superficie del agar VIB en placas de Petri y se incuban a 37ºC durante la noche. Un cultivo de *C. perfringens* incubado durante la noche en un volumen de 2 ml se mezcla con 200 ml de agar BHI líquido, y se vierte sobre agar VIB con manchas de *Bacillus* cultivados. Se incuban las placas anaeróbicamente a 37ºC durante 1 día. Se miden los radios de las zonas de inhibición clarificadas alrededor de las manchas.

Se considera que una cepa de *Bacillus* presenta actividad antimicrobiana hacia *Clostridium perfringens* si la zona de inhibición es de al menos 5 mm. Preferiblemente, la zona de inhibición es de al menos 6 mm, más preferiblemente al menos 7 mm. Una cepa de *Bacillus* de la invención se caracteriza por inhibición del crecimiento de *Clostridium perfringens,* en particular inhibición del crecimiento de las especies sometidas a prueba. Tal como conoce el experto en la técnica, la ausencia de inhibición del crecimiento de una especie a menudo se combina con ausencia de inhibición del crecimiento de otras especies de *Clostridium perfringens* y viceversa, es decir la inhibición del crecimiento de una especie de *Clostridium perfringens* a menudo se combina con la inhibición del crecimiento de otras especies de *Clostridium perfringens*.

Las células de *Bacillus* existen como células de esporas de *Bacillus* y células vegetativas de *Bacillus*. Cuando se hace referencia en el presente documento a células de *Bacillus*, se refiere a ambas.

El término *"*espora de *Bacillus*" en relación una célula de espora de *Bacillus* se refiere en el presente documento a una espora que según la técnica puede caracterizarse como una estructura latente, resistente, no reproductiva producida por las bacterias de *Bacillus*. La principal función de las esporas generalmente es garantizar la supervivencia de una bacteria a través de periodos de estrés medioambiental. Por tanto, son resistentes a la radiación ultravioleta y gamma, la desecación, las lisozimas, la temperatura, inanición y desinfectantes químicos. Las esporas se encuentran comúnmente en el suelo y el y agua, donde pueden sobrevivir durante periodos de tiempo prolongados. La cubierta de la espora es impermeable a muchas moléculas tóxicas y también puede contener enzimas que están implicadas en la germinación. El núcleo tiene estructuras celulares normales, tales como ADN y ribosomas, pero es metabólicamente inactivo. Cuando una bacteria detecta que las condiciones medioambientales están volviéndose desfavorables, puede comenzar el proceso de esporulación, que dura aproximadamente ocho horas.

El término "célula vegetativa de *Bacillus*" se refiere a células de *Bacillus* vegetativas funcionales, que pueden dividirse para producir más células vegetativas.

En el aspecto (iii), la invención se refiere a una cepa de *Bacillus* que presenta un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide en el día 2. Según la presente invención, el porcentaje de esporulación se somete a ensayo tal como sigue:

Se añade una cepa de *Bacillus* que va a someterse a prueba en un volumen de 50 μl a 700 μl de VIB en una placa de pocillos profundos (DW) y se incuba a 37ºC y 175 rpm durante la noche. Se transfiere el cultivo de *Bacillus* incubado durante la noche en un volumen de 50 μl a 700 μl de un medio de esporulación que comprende (p/p) el 95% de agua; el 1,5% de fuente de nitrógeno (es decir, levadura); el 3% de sacarosa; el 0,06% de microminerales; hidrogenofosfato de dipotasio al 0,1% en placas DW. La placa se incuba a 37ºC y 175 rpm durante 3 días.

Se realiza un seguimiento de la esporulación microscópicamente y se determina el porcentaje de esporas (número de esporas en comparación con el número total de células de *Bacillus*) mediante evaluación visual después de 1 día (24 horas), 2 días (48 horas) y 3 días (72 horas) de incubación. Mediante el término "que tiene un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide en el día 2" quiere decirse que al menos el 80% de las células han esporulado después de 2 días de incubación. El porcentaje de esporulación puede ser preferiblemente mayor, tal como al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99%. Un objeto importante de la presente invención es seleccionar cepas de *Bacillus* que tienen células con un alto porcentaje de esporulación con el fin de hacer que la cepa sea útil para la producción de pienso. Es necesario un alto porcentaje de esporulación, que también puede denominarse alta tasa de esporulación, para obtener una alta eficacia de producción tal como se describió anteriormente.

Tal como se describió anteriormente, la técnica anterior ha descrito métodos para seleccionar cepas de *Bacillus*, pero los métodos de examen de la técnica anterior no se han centrado en el porcentaje de esporulación. Por consiguiente, no es probable que las cepas de *Bacillus* seleccionadas de la técnica anterior esporulen en un grado suficiente como para cumplir con el porcentaje de esporulación tal como se describe en el presente documento.

Se han seleccionado y depositado tres cepas que tienen la capacidad combinada de altas propiedades de crecimiento y esporulación, sin resistencia a antibióticos y alta actividad antimicrobiana. Pero también otras cepas, en particular cepas de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* (véase las cepas D-J en las tablas 2 y 3) cumplen los criterios explicados resumidamente en las reivindicaciones y por tanto se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

Tal como resulta evidente a partir de la figura 1, en particular muchas cepas de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* están dentro del alcance de la presente invención. Es sorprendente que muchas cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* tienen un efecto antimicrobiano, ya que hasta la fecha se ha supuesto que el efecto antimicrobiano del género *Bacillus* es específico de cepa y no está relacionado con la especie.

Basándose en las descripciones de ensayo detalladas, el experto habitual en la técnica puede repetir estos ensayos para determinar si una cepa específica de *Bacillus* cumple con la sensibilidad del punto (i), la actividad antimicrobiana del punto (ii) y el porcentaje de esporulación del punto (iii) de los diversos aspectos de la invención. De este modo, el experto habitual en la técnica podrá producir de manera sistemática cepas con las propiedades establecidas. Preferiblemente, el método de selección también incluirá (iv) someter a ensayo para determinar la sensibilidad de las células vegetativas a pH 4, y (v) someter a ensayo para determinar la resistencia a la bilis para garantizar que las cepas pueden sobrevivir en un grado suficiente en el tracto gastrointestinal. Evidentemente, estos ensayos pueden realizarse en cualquier orden y algunas cepas pueden excluirse durante el procedimiento si no cumplen los criterios.

Se conoce a partir de la bibliografía que la bilis tiene algunas influencias negativas en la supervivencia y la germinación y el crecimiento de células de espora a células vegetativas de *Bacillus* en el GIT de los animales.

Por tanto, las bacterias probióticas generalmente podrán sobrevivir y proliferar en el intestino de los animales al poder tolerar un pH bajo y resistir la sal biliar con el fin de ser útiles como composiciones probióticas de *Bacillus* para la adición a pienso. Los ejemplos proporcionan pruebas útiles *in vitro* a este respecto. La prueba para determinar la sensibilidad a pH bajo (simulando las condiciones gástricas) se centran en la resistencia de las células vegetativas a pH 4. Se conoce bien que las esporas son resistentes a valores de pH de 2-3 y que las células vegetativas morirán a pH 2. Sin embargo, el pH gástrico puede tener valores de pH de hasta 4, especialmente en condiciones de alimentación. Esto puede dar como resultado germinación de las esporas y por tanto es relevante someter a prueba la sensibilidad de las células vegetativas a pH 4. Las cepas seleccionadas deben ser resistentes preferiblemente a pH 4. Los resultados para las cepas seleccionadas se presentan en la tabla 2.

El género *Bacillus* comprende la especie *Bacillus amyloliquefaciens,* tal como *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* o *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum, Bacillus simplex, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus mojavensis, Bacillus pumilus, Bacillus safensis, Bacillus simplex, Bacillus subtilis, Bacillus atrophaeus, Bacillus metilotrophicus, Bacillus siamensis, Bacillus vallismortis* o *Bacillus tequilensis.*

El método inicial de identificación de las 261 cepas se basó en 16S. Este método no puede distinguir entre algunas especies estrechamente relacionadas de *Bacillus.* Por tanto, una cepa puede identificarse como relacionada con el grupo que consiste en las especies *Bacillus amyloliquefaciens*/*atrophaeus*/*metilotrophicus*/*siamensis*/*vallismortis* o el grupo que consiste en las especies *Bacillus mojavensis*/*subtilis*/*tequilensis.* Ambos grupos contienen muchas cepas que cumplen los criterios de la invención y estos grupos representan por tanto realizaciones importantes de la invención.

Cuando se consideró apropiado, las cepas se identificaron adicionalmente mediante un método más detallado (*gyr* B)).Los datos mostrados en las tablas 2 y 3 se basan principalmente en *Bacillus amyloliquefaciens* (identificado mediante *gyr* B). Los aislados seleccionados de *Bacillus amyloliquefaciens* se identificaron adicionalmente mediante el análisis de secuencia génica mediante la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpo* B) y las subespecies se identifican y se presentan en las tablas 4, 5 y 6.

Es deseable que la cepa presente termoestabilidad. Los resultados para las cepas seleccionadas se presentan en la tabla 4. La termoestabilidad a 99,5ºC se mide en ufc como reducción después de 2, 5 y 10 min en relación con el tiempo 0 (log/log). Una reducción por debajo de 2 se logra con formulaciones de esporas de *Bacillus* comerciales comunes. Para las cepas dentro del alcance de la presente invención, la reducción debe ser preferiblemente de 0,5 o menos tras 2 min, más preferiblemente de 0,25 o menos, lo más preferiblemente de 0,05 o menos. En realizaciones preferidas, la reducción después de 5 min debe ser preferiblemente de 2,5 o menos, más preferiblemente de 1 o menos, lo más preferiblemente de 0,5 o menos y después de 10 min, la reducción también debe ser preferiblemente de 2,5 o menos, más preferiblemente de 1 o menos, lo más preferiblemente de 0,5 o menos. Todas las cepas en la tabla presentan una termoestabilidad apropiada. Tal como resulta evidente a partir de la tabla, las cepas B, D y F tienen una termoestabilidad muy alta incluso después de 10 min. Es significativo que tanto B como F son cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* lo que hace que esta subespecie sea una realización preferida de la presente invención.

En el ejemplo 4 se ha investigado la producción de enzimas. Los presentes hallazgos muestran, para todas las cepas investigadas, una actividad celulasa de 50 mU/ml o más. Se contempla que una actividad de este tipo será

una propiedad beneficiosa para una cepa de *Bacillus* de la invención. Para una realización determinada puede preferirse que la cepa tenga una actividad celulasa incluso mayor, tal como 100 mU/ml o más, tal como se encuentra para las cepas de B. *amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* lo que hace que esta subespecie sea una realización preferida de la presente invención. Para las cepas dentro del alcance de la presente invención, la actividad celulasa debe ser preferiblemente de 50 mU/ml o más, más preferiblemente de 100 mU/ml o más, lo más preferiblemente de 250 mU/ml o más, incluso más preferiblemente de 400 mU/ml o más.

Algunas cepas muestran una alta actividad xilanasa de 70 mU/ml o más. La tabla 5 muestra que para las cepas investigadas, la alta actividad celulasa no se combina necesariamente con alta actividad xilanasa o alta actividad proteasa definida como 40000 RFU/DO o más. Las cepas G, I y J que son todas ellas B. *amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* son ejemplos de cepas que demuestran alta actividad para las tres enzimas.

Una cepa de *Bacillus* de la invención se selecciona del grupo que consiste en (a) la cepa de *Bacillus mojavensis* con número de registro DSM 25839; (b) las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* con número de registro DSM 25840, número de registro DSM 27032 o número de registro DSM 27033, y (c) la cepa de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 25841.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para obtener una cepa mutante de

(a) la cepa de *Bacillus mojavensis* con número de registro DSM 25839;

(b) las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* con número de registro DSM 25840, número de registro DSM 27032 o número de registro DSM 27033; o

(c) la cepa de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 25841;

comprendiendo el método someter opcionalmente la cepa de (a), (b) o (c) a tratamiento de mutagenización y seleccionar las cepas mutantes de (a), (b) o (c) que tienen las propiedades siguientes

(i): sensibilidad a ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloramfenicol;

(ii) inhibición del crecimiento de *E. coli* y *Clostridium perfringens,* y

(iii) un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide en el día 2.

La cepa puede someterse a un tratamiento de mutagenización tal como se describe en mayor detalle a continuación para obtener cepas mutantes y después se realiza un procedimiento de selección. Alternativamente, se realiza una selección para mutantes que se produzcan espontáneamente.

El método para obtener una cepa mutante también puede incluir (iv) someter a ensayo para determinar la sensibilidad de las células vegetativas a pH 4, y (v) someter a ensayo para determinar la resistencia a la bilis para garantizar que las cepas pueden sobrevivir en un grado suficiente en el tracto gastrointestinal. Evidentemente, estos ensayos pueden realizarse en cualquier orden y algunas cepas pueden excluirse durante el procedimiento si no cumplen los criterios.

Una “cepa” bacteriana, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una bacteria que permanece sin cambiar genéticamente cuando crece o se multiplica. Se incluye la multiplicidad de bacterias idénticas.

“Cepa de tipo silvestre” se refiere a la forma no mutada de una bacteria, tal como se encuentra en la naturaleza.

Una “bacteria mutante” o una “cepa mutante” se refiere a una bacteria mutante natural (que se produce de manera espontánea o natural) o una bacteria mutante inducida que comprende una o más mutaciones en su genoma (ADN) que están ausentes en el ADN de tipo silvestre. Un “mutante inducido” es una bacteria donde la mutación se indujo mediante tratamiento humano, tal como tratamiento con cualquier tratamiento de mutagenización usado convencionalmente incluyendo tratamiento con mutágenos químicos, tal como un mutágeno químico seleccionado de (i) un mutágeno que se asocia con o que llega a incorporarse en el ADN tal como un análogo de base, por ejemplo, 2-aminopurina o un agente interquelante tal como ICR-191, (ii) un mutágeno que reacciona con el ADN incluyendo agentes alquilantes tales como nitrosoguanidina o hidroxilamina, o metilsulfonato de etano (EMS) o N-metil-N’-nitro-N-nitroguanidina (NTG), radiación UV o gamma, etc. En contraposición, un “mutante espontáneo” o “mutante que se produce de manera natural” no se ha mutagenizado por el hombre.

Un mutante puede haberse sometido a varios tratamientos de mutagenización (un tratamiento individual debe entenderse como una etapa de mutagenización seguida por una etapa de examen/selección), pero se prefiere actualmente que no se lleven a cabo más de 20, o no más de 10, o no más de 5, tratamientos (o etapas de examen/selección). En un mutante preferido actualmente, menos del 1%, menos del 0,1, menos del 0,01, menos del 0,001% o incluso menos del 0,0001% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han reemplazado por otro nucleótido, o se han delecionado, en comparación con la cepa madre.

Las bacterias mutantes, tal como se describió anteriormente, no son OMG, es decir, no están modificadas por tecnología de ADN recombinante. Como alternativa al método preferido anterior de proporcionar el mutante mediante mutagénesis al azar, también es posible proporcionar un mutante de este tipo mediante mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, usando técnicas de PCR diseñadas de manera apropiada o usando un transposón que puede integrarse en los replicones bacterianos.

Cuando el mutante se proporciona como un mutante que se produce espontáneamente, la cepa de tipo silvestre anterior se somete a la etapa de selección sin ningún tratamiento de mutagenización anterior.

Varias especies de *Bacillus* tienen estado GRAS, es decir, se reconocen generalmente como seguras. Todas las cepas de *B. subtilis* son GRAS. Las cepas de *Bacillus* descritas en el presente documento son aerobias y formadoras de esporas facultativas. Las especies de *Bacillus* son las únicas formadoras de esporas que se consideran GRAS. Alimentar con microorganismos que tienen estado GRAS al ganado es una práctica aceptable entre productores, veterinarios y otros en la industria del ganado.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición de *Bacillus* que comprende células de una cepa de *Bacillus* de la invención. La composición puede comprender células de al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o incluso más cepas de *Bacillus* elegidas de al menos una de las cepas de la invención. Preferiblemente, las células de la composición de *Bacillus* son células de esporas.

Las cepas de *Bacillus* relevantes de la composición pueden estar presentes en una forma comercialmente relevante conocida por el experto. Por consiguiente, en una realización, las cepas de *Bacillus* de la composición están presentes como células secas (por ejemplo, secadas por pulverización) o como células congeladas. La composición puede proporcionarse en cualquier forma adecuada tal como en la forma de un líquido, una suspensión, un polvo o un gránulo.

En una realización preferida, la composición de *Bacillus* comprende desde 10^5 hasta 10^{12} UFC/g, más preferiblemente desde 10^6 hasta 10^{12} UFC/g, y lo más preferiblemente desde 10^7 hasta 10^{12} UFC/g.

El término “UFC/g” se refiere al peso en gramos de la composición como tal, incluyendo aditivos relevantes adecuados presentes en la composición. Tal como conoce el experto, una composición bacteriana comercialmente relevante generalmente también comprende otros aditivos relevantes tales como por ejemplo un portador/componente del grupo que pertenece al suero de la leche, permeado de suero de la leche, carbonato de calcio/caliza y agentes antiapelmazantes tales como silicatos de aluminio y kieselgur (tierra de diatomeas). No incluye el peso de un recipiente adecuado usado para envasar la composición de *Bacillus*. Una realización se refiere a una composición envasada en un recipiente adecuado.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir una cepa de *Bacillus* de la invención y portadores que hacen que esas composiciones sean adecuadas para alimentar a animales como aditivo de piensos o como aditivo para agua potable. Alternativamente, la cepa de *Bacillus* de la invención puede formularse con componentes de pienso, incluyendo proteína de pienso y/o hidratos de carbono de pienso. Tales combinaciones pueden estar en forma de gránulos que se extruyen a través de procedimientos de granulación convencionales.

La composición de *Bacillus* tal como se describe en el presente documento puede usarse como aditivo probiótico para pienso. La invención también proporciona un método para producir un pienso o premezcla que comprende añadir una composición de *Bacillus* de la invención a un pienso.

Tal como se usa en el presente documento, el término “premezcla” se refiere a una cepa de *Bacillus* añadida a un portador para obtener una premezcla que entonces se añade al pienso a una tasa de inclusión deseada y se alimenta al animal.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para alimentar a un animal que comprende administrar una composición de *Bacillus* de la invención o un pienso o premezcla producido según la invención a un animal.

El ejemplo 5 describe ensayos de alimentación con cepas B y C y muestra que ambos productos probióticos de cepas de *Bacillus* complementados a dietas para recién nacidos mejoraron numéricamente el rendimiento productivo en comparación con un grupo de control negativo. Pudo observarse un efecto significativo sobre los parámetros de producción durante el ensayo. El porcentaje de mortalidad se redujo en ambos grupos de *Bacillus* y en ambos ensayos.

En uno de los centros, el número de animales tratados por pocilga con enrofluxacina para superar diarrea grave fue significativamente mayor ($P>0,05$) en los animales alimentados con la dieta de control que en los alimentados con *Bacillus.*

Por tanto, este ejemplo demuestra que la administración de la composición de *Bacillus* de la invención puede usarse para tratar y prevenir enfermedades, por ejemplo, inhibiendo patógenos, tales como *E. coli* y *Clostridium,* en el animal. La composición de *Bacillus* puede alimentarse como agente microbiano de alimentación directa o como aditivo de pienso para el pienso. Las composiciones de la presente invención se administran o se alimentan a un

animal en una cantidad eficaz para disminuir el crecimiento de bacterias patógenas tales como *Clostridia* y *Escherichia coli* en el intestino del animal.

El animal puede seleccionarse del grupo que consiste en aves, rumiantes, terneros, cerdos, conejos, caballos, pescado y mascotas. En una realización preferida, el animal es un animal de granja, que se cría para el consumo, tal como cerdos, o como productores de alimentos, tales como pollos de engorde y gallinas ponedoras de huevos.

También se proporcionan métodos de administrar una o más cepas de *Bacillus* de la invención a un lechón. Tales métodos pueden incluir alimentar una o más cepas de *Bacillus* de la invención a una madre de un lechón. La(s) cepa(s) puede(n) alimentarse durante la gestación, la lactancia o ambas. La una o más cepas de *Bacillus* también puede alimentarse a cerdos destetados y a cerdos en crecimiento-finalización.

Ha de considerarse que el uso de los términos “un” y “una” y “el/la” y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” han de considerarse como términos abiertos (es decir, que significan “que incluyen, pero sin limitarse a,”) a menos que se señale de otro modo. La mención de intervalos de valores en el presente documento pretende únicamente servir como método resumido para referirse individualmente a cada valor individual que entra dentro del intervalo, a menos que se indique de otro modo en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) provisto en el presente documento, pretende únicamente aclarar mejor la invención y no supone una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reivindique de otro modo. Nada del lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativo de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

<u>Cepas depositadas</u>

La cepa de *Bacillus mojavensis* CHCC 15510 se ha depositado en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 25839 con una fecha de depósito de 3 de abril de 2012 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha realizado en las condiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes.

La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15516 se ha depositado en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 25840 con una fecha de depósito de 3 de abril de 2012 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha realizado en las condiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes.

La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15536 se ha depositado en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 27032 con una fecha de depósito de 21 de marzo de 2013 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha realizado en las condiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes.

La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15539 se ha depositado en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 27033 con una fecha de depósito de 21 de marzo de 2013 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha realizado en las condiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes.

La cepa de *Bacillus subtilis* CHCC 15541 se ha depositado en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 25841 con una fecha de depósito de 3 de abril de 2012 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha realizado en las condiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes.

Para todos los microorganismos depositados identificados anteriormente, se aplican las siguientes indicaciones adicionales:

En lo que se refiere a las oficinas de patente respectivas de los estados designados respectivos, los solicitantes piden que una muestra del microorganismo depositado indicado anteriormente sólo esté disponible para un experto nombrado por el peticionario hasta la fecha en que la patente se conceda o la fecha en que la solicitud se rechace o se retire o se considere que ha de retirarse.

A continuación se describen realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Materiales:

Caldo de infusión de ternera (VIB) (Difco, 234420)

Agar de caldo de infusión de ternera (VIB) (VIB + 1,5% de agar bacteriológico (Agar n.º 1), Oxoid LP0011)

Placas de agar T3 (por litro: 3 g de triptona, 2 g de triptosa, 1,5 g de extracto de levadura, hidrogenofosfato de sodio 0,05 M y 0,005 g de $MnCl_2$ [pH 6,8], y 15 g de agar)

Caldo Laura-Bertani (LB) (g/l: triptona Bacto 10 (Difco 0123), extracto de levadura 5 (Oxoid L21), NaCl 10 (Merck n.º 106404))

Caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI) (Oxoid CM225)

Agar de infusión de cerebro-corazón (BHI) (Oxoid CM375)

Sales biliares (extracto biliar, porcino; Sigma B8631)

Placas de bioensayo (Nunc 240845)

Placas de Petri (Procudan 140096, placa de Petri con estrías)

Medio de esporulación: %(p/p) 95% de agua; 1,5% de fuente de nitrógeno (es decir, levadura); 3% de sacárido; 0,06% de microminerales; hidrogenofosfato de dipotasio al 0,1%.

Solución salina fisiológica con peptona (cloruro de sodio al 0,9%, peptona al 1%) FKP VetMIC Lact-1 & Lact-2 (SVA, Uppsala, Suecia)

Caldo ISO-SENSITEST (Oxoid CM0473)

Cultivos:

Se aislaron cepas de *Bacillus* de heces, suelo, fuentes de alimentos y recogidas de colecciones de bancos de cepas, y se mantuvieron en VIB con glicerol al 20% en placas madre MTP a -80ºC.

Antibióticos:

Ampicilina (Sigma, A9518-5G)

Vancomicina (Sigma, V1764-250MG)

Gentamicina (Sigma, G1264-50MG)

Kanamicina (Sigma, K1377-1G)

Estreptomicina (Sigma, S6501-5G)

Eritromicina (Sigma E-5389)

Clindamicina (Sigma, C2569-10MG)

Tetraciclina (Sigma T-7660)

Cloramfenicol (Sigma, C0378-5G)

Patógenos:

E. coli O101 F5 (State Serum Institute, Copenhague, Dinamarca)

E. coli O147:K89 F4 (State Serum Institute, Copenhague, Dinamarca)

E. coli O149:k91,k88a (NCTC 10650) Colección Nacional de Cultivos Tipo

Las cepas de *E. coli* se mantuvieron en LB con glicerol al 20% en placas maestras MTP a -80ºC

Clostridium perfringens Tipo A, DSM 756, se mantuvo en BHI con glicerol al 20% a -80ºC

EJEMPLO 1: Antes del examen

Se sometieron a pre-examen 261 aislados de fuentes de suelo y heces y alimentos para determinar la sensibilidad a antibióticos, la inhibición de patógenos, la resistencia a la bilis y la sensibilidad a pH bajo.

1.1 Sensibilidad a antibióticos

Se añadieron cepas de *Bacillus* en un volumen de 50 µl de placas madre MTP a 700 µl de VIB en placas DW y se incubaron a 37ºC y 175 rpm durante la noche. Se añadieron muestras de prueba ISO, complementadas con los antibióticos enumerados en la tabla 1 a 2 concentraciones y controles ISO sin antibióticos a placas MTP en un volumen de 180 µl. Sediluyeron los cultivos de *Bacillus incubados durante la* 100 veces y se transfirieron en alícuotas de 20 µl a muestras de prueba y controles ISO. Se incubaron las placas MTP a 37ºC. Se midió la densidad óptica (DO) a 620 nm en el inóculo y en las placas de prueba MTP después de 24 y 48 horas de incubación. Se estimó la sensibilidad a antibióticos de las bacterias como el porcentaje de DO en las muestras de prueba ISO con respecto a la DO en los controles ISO.

1.2 Examen de las cepas de *Bacillus* para determinar la inhibición de patógenos

Se añadieron cepas de *Bacillus* en un volumen de 50 µl de placas madre MTP a 700 µl de VIB en placas DW y se incubaron a 37ºC y 175 rpm durante la noche.

Antes del ensayo, se hicieron crecer cepas de *E. coli* en LB durante la noche a 30ºC. Se hizo crecer C. *perfringens* CHCC14372 en BHI durante la noche en un frasco anaerobio a 37ºC.

1.2.1 Inhibición de *E. coli* mediante la prueba de manchas en agar

Se mezclaron 2 ml de cultivo de *E. coli* incubado durante la noche con 200 ml de agar VIB líquido a 50ºC, y se vertieron en cada placa de bioensayo. Se secaron las placas en una mesa de laboratorio estéril. Se dispusieron en manchas cultivos de *Bacillus* incubados durante la noche, 2 µ de cada uno, sobre la superficie del agar VIB mezclado con *E. coli* y se incubaron a 37ºC durante 2 días. Se midieron los radios de las zonas de inhibición clarificadas alrededor de las manchas y se registraron como “altas” - radio de más de 2 mm, “medias” – radio de entre 0,5 - 2 mm y “bajas” – radio de menos de 0,5 mm.

1.2.2 Inhibición de *C. perfringens* mediante la prueba de manchas en agar

Se vertió agar VIB en las placas de bioensayo (200 ml por placa) y se secaron completamente en una mesa de laboratorio estéril. Se dispusieron en manchas cultivos de *Bacillus* incubados durante la noche, 2 µl de cada uno, sobre la superficie de las placas de agar VIB y se incubaron a 37ºC durante la noche. Se añadió *C. perfringens* Tipo A CHCC14372 en un volumen de 2 ml a 200 ml de agar BHI líquido, se mezcló y se recubrieron suavemente las placas de bioensayo con manchas de *Bacillus*. Se incubaron las placas anaeróbicamente a 37ºC durante 1 día. Se midieron los radios de las zonas de inhibición clarificadas alrededor de las manchas y se registraron como “altas” más de 2 mm, “medias” - entre 1-2 mm, “bajas” – menos de 1 mm.

1.2.3 Inhibición de *C. perfringens* mediante difusión en pocillo

Se mezclaron 2 ml de cultivo de *C. perfringens* CHCC14372 incubado durante la noche con 200 ml de agar BHI líquido y se vertieron en cada placa de bioensayo. Tras la solidificación, se realizaron los pocillos de 10 mm en agar BHI con un elemento de perforación estéril y se transfirieron 80 µl de cultivos de *Bacillus* incubados durante la noche a cada pocillo. Se incubaron las placas anaeróbicamente a 37ºC durante 1 día. Se midieron los radios de las zonas de inhibición clarificadas alrededor de los pocillos y se registraron como “altas” - más de 2 mm, “medias” - entre 0,5 - 2 mm y “bajas” – menos de 0,5 mm.

1.3 Ensayo de resistencia a bilis

Se añadieron cepas de *Bacillus* en un volumen de 50 µl de placas madre MTP a 700 µl de VIB en placas DW y se incubaron a 37ºC y 175 rpm durante la noche. Se transfirieron cultivos de *Bacillus* incubados durante la noche en un volumen de 50 µl a 800 ml VIB complementado con el 0,3% de sales biliares (muestras de prueba) y VIB sin bilis (controles) en placas DW. Se incubaron las placas a 37ºC y 175 rpm. Se midió la densidad óptica a 620 nm (DO_{620}) en los tiempos de 0, 6 y 24 horas en VIB con bilis y se restó de los valores de DO_{620} correspondientes en controles de VIB. Se clasificaron los cultivos según las diferencias en los valores de DO_{620} en los grupos A (DO < 0,1), B (DO= 0,1-0,4) y C (DO > 0,4). Se consideró que las cepas en el grupo A son más resistentes a las sales biliares. Las cepas seleccionadas deben estar en el grupo A o B. Los resultados para las cepas seleccionadas se presentan en la tabla 2.

1.4 Sensibilidad a pH bajo (que simula las condiciones gástricas)

Se distribuyeron alícuotas de VIB de 800 µl ajustadas a pH4 con ácido clorhídrico 1,0 M y controles de VIB (pH 7) en placas DW. Se añadieron cepas de *Bacillus* en un volumen de 50 µl de placas madre MTP a placas DW y se incubaron a 37ºC y 175 rpm durante 24 horas. Se midió la densidad óptica (DO_{620}) en 200 µl de suspensiones celulares en los tiempos de 0 y después de 24 horas de incubación. El crecimiento bacteriano a pH 4 se definió

restando los valores de DO_{620} antes de la incubación de los valores correspondientes después de la incubación. Los cultivos que mostraron aumento en la DO_{620} de más de 0,1 se consideraron resistentes a pH 4 (indicado con una R en la tabla 2), mientras que los cultivos con valores de DO_{620} de menos de 0,1 (sin crecimiento o valores negativos) se consideraron sensibles a pH 4 (indicado con una S en la tabla 2).

1.5 Resultados de pre-examen:

Basándose en la prueba de pre-examen, se seleccionaron 32 cepas para el examen secundario. Las cepas seleccionadas deben ser sensibles a los antibióticos descritos y mostrar efecto antimicrobiano tanto contra *E. coli* como contra *Clostridium perfringens* y comportarse de manera razonable en las otras pruebas realizadas.

De los 261 aislados de fuentes de suelo, heces y alimentos, 161 aislados eran resistentes a antibióticos en la prueba de pre-examen. De los 100 aislados que eran sensibles a antibióticos, 56 tenían efecto antimicrobiano contra *Clostridium perfringens* y sólo 22 tenían efecto tanto contra *E. coli* como contra *Clostridium perfringens.* De ellos, 12 aislados eran de la especie *B. amyloliquefaciens.* Otras cepas representativas eran de las especies *B. subtilis* y *B. mojavensis.* Las tablas 2 y 3 resumen los resultados de cepas propiedad de Chr. Hansen (22 de las 32 cepas seleccionadas para el examen secundario).

EJEMPLO 2: Examen secundario

Basándose en los resultados del examen primario, se sometieron a prueba 40 aislados seleccionados y cepas de referencia para determinar la inhibición de patógenos mediante la repetición de las pruebas de manchas en agar y para determinar la esporulación. También se sometieron a prueba 32 cepas para determinar la sensibilidad a antibióticos mediante la prueba de MIC.

2.1 Examen de cepas de *Bacillus* para determinar la inhibición de patógenos

Antes del ensayo, se inocularon 9 ml de VIB con cultivos de *Bacillus* y se incubaron a 37ºC y 175 rpm durante la noche. Simultáneamente, se inocularon 9 ml de caldo BHI con cepas de *E. coli*, y se incubaron durante la noche a 37ºC. Se hizo crecer *Clostridium perfringens* en las mismas condiciones en un frasco anaerobio.

2.1.1 Inhibición de *E. coli* mediante la prueba de manchas en agar:

Se añadieron cultivos de patógenos incubados durante la noche en un volumen de 2 ml cada a 200 ml de agar VIB líquido a 50ºC, y se vertieron en cada placa de bioensayo. Se secaron las placas en una mesa de laboratorio estéril. Se dispusieron en manchas cultivos de *Bacillus* incubados durante la noche sobre la superficie del agar VIB mezclado con patógenos y se incubaron a 37ºC durante 2 días. Se registraron los radios de las zonas de inhibición alrededor de las manchas y los diámetros de las manchas.

2.1.2 Inhibición de *C. perfringens* mediante la prueba de manchas en agar

Se dispusieron en manchas cultivos de *Bacillus* sobre la superficie del agar VIB en placas de Petri y se incubaron a 37ºC durante la noche. Se mezcló cultivo de *C. perfringens* incubado durante la noche en un volumen de 2 ml con 200 ml de agar BHI líquido, y se vertió en agar VIB con manchas de *Bacillus* cultivados. Se incubaron las placas anaeróbicamente a 37ºC durante 1 día. Se midieron los radios de las zonas de inhibición clarificadas alrededor de las manchas.

2.2 Crecimiento en VIB y en medio de esporulación

Se añadieron cepas de *Bacillus* en un volumen de 50 μl de placas madre MTP a 700 μl de VIB o medio de esporulación en placas DW y se incubaron a 37ºC y 175 rpm durante 24 horas. Se determinó el crecimiento bacteriano mediante la densidad óptica a 620 nm (DO_{620}) en suspensiones de 200 μl. Debido a la alta turbidez del medio de esporulación y a su variación entre los pocillos, se restaron los valores de DO_{620} antes de la incubación de los valores DO_{620} en los pocillos correspondientes después de la incubación. Los cultivos que mostraron una DO_{620} de más de 0,4 se clasificaron en el grupo A (alto crecimiento) y los que mostraron DO_{620} de menos de 0,4, en el grupo B (bajo crecimiento).

2.3 Esporulación en medio de esporulación

Se añadieron cepas de *Bacillus* en un volumen de 50 μl de placas madre MTP a 700 μl de VIB en placas DW y se incubaron a 37ºC y 175 rpm durante la noche. Se transfirieron cultivos de *Bacillus* incubados durante la noche en un volumen de 50 μl a 700 μl de un medio de esporulación (SM) en placas DW. Se incubaron las placas a 37ºC y 175 rpm durante 3 días. Se realizó un seguimiento de la esporulación microscópicamente y se determinó el porcentaje de esporas (número de esporas en relación con las células totales) mediante evaluación visual después de 1 día (24 horas), 2 días (48 horas) y 3 días (72 horas) de incubación.

2.4 Sensibilidad a antibióticos medida mediante MIC

Se analizaron las cepas para determinar la sensibilidad a antibióticos midiendo la concentración inhibidora mínima

(MIC) para varios antibióticos. El método usado fue un método de microdilución en caldo tal como se explica resumidamente por la norma de CLSI (Instituto de normas clínicas y de laboratorio, M07-A8 y M45-A2).

Se inocula una suspensión de un crecimiento durante la noche de la cepa que va a someterse a prueba en caldo ISO-SENSITEST (Oxoid CM0473) en placas de microtitulación a una concentración aproximada de 10^5 ufc/ml (unidades formadoras de colonias/ml) en diluciones en serie dos veces del antibiótico que va a someterse a prueba (volumen total 100 μl/pocillo) y se incuba aeróbicamente durante 20-24 horas a 37ºC. Pueden usarse los paneles prefabricados VetMIC Lact-1 y Lact-2 que comprenden los antibióticos ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloramfenicol. Los resultados se registran después de 24 horas a la concentración más baja del antibiótico para inhibir el crecimiento visible. La prueba se realizó dos veces como dos repeticiones biológicas independientes.

2.5 Resultados

Los resultados de las 32 cepas seleccionadas mostraron que *Bacillus amyloliquefaciens* tenía las mejores propiedades combinadas de sensibilidad a antibióticos, efecto antimicrobiano y esporulación, véase la tabla 2. Sólo se incluyen los datos relacionados con las cepas propiedad de Chr. Hansen (22 de las 32 cepas).

Tabla 2

Datos básicos para cepas de *Bacillus* seleccionadas

Fuente, especie según gyrB, crecimiento en VIB y medio de esporulación, así como porcentaje de esporulación.

Cepa A=15510; cepa B=15516; cepa C=15541; cepa H=15536; cepa I 15539

				Crecimiento		Esporulación, %		
Cepas	Fuente	Especie	Resistencia a antibióticos	VIB	SM	Día 1	Día 2	Día 3
A	Heces	*B. mojavensis*	Sensible	A	B	5	95	90
B	Heces	*B. amyloliquefaciens*	Sensible	A	A	10	99	99
C	Heces	*B. subtilis*	Sensible	B	A	0	80	95
D	Heces	*B. amyloliquefaciens*	Sensible	B	A	40	99	99
E	Heces	*B. amyloliquefaciens*	Sensible	B	A	20	99	99
F	Heces	*B. amyloliquefaciens*	Sensible	B	A	50	99	99
G	Heces	*B. amyloliquefaciens*	Sensible	B	A	95	95	95
H	Heces	*B. amyloliquefaciens*	Sensible	A	A	99	99	99
I	Heces	*B. amyloliquefaciens*	Sensible	B	A	80	99	99
J	Heces	*B. amyloliquefaciens*	Sensible	B	A	50	99	99
K	LMG	*B. amyloliquefaciens*	Sensible	A	A	2	99	99
L	Heces	*B. licheniformis*	Sensible	B	A	90	99	ND
M	Suelo	*B. licheniformis*	Resistente	B	A	0	1	80
N	Suelo	*B. megaterium*	Resistente	B	A	0	0	0
O	Heces	*B. subtilis*	Sensible	A	B	0	60	10
P	Heces	*B. pumilus*	Resistente	A	A	0	10	99
Q	Heces	*B. licheniformis*	Resistente	A	A	0	1	5
R	Heces	*B. licheniformis*	Resistente	A	A	0	poco	40
S	Heces	*B. pumilus*	Sensible	A	A	0	10	95
T	Suelo	*B. megaterium*	Resistente	B	A	0	0	0
U	Suelo	*B. licheniformis*	Resistente	A	A	0	poco	70
V	Heces	*B. subtilis*	Resistente	A	B	95	99	90

Tabla 3

Inhibición de *E. coli* y *Clostridium perfringens* (mm) así como resistencia contra bilis y ácido mediante cepas de *Bacillus* seleccionadas

Cepa A=CHCC15510; cepa B=15516; cepa C=15541; cepa H=15536; cepa I=15539

O149, O147 y O101 son los tres patógenos de *E. coli* en cerdos mencionados en la sección Patógenos

		Bilis			*E. coli*, mm de inhibición			*Cl. perfringens*, mm
Cepas	Especies	6 h	24 h	Ácido	O149	O147	O101	Mm
A	*B. mojavensis*	C	A	S	1,5	1,7	2,3	7
B	*B. amyloliquefaciens*	A	A	S	2,5	2,3	3,5	8

C	*B. subtilis*	A	B	R	1,8	1,5	2,7	7
D	*B. amyloliquefaciens*	A	A	R	2	1,7	2,5	6
E	*B. amyloliquefaciens*	B	A	S	3	3	3,5	6
F	*B. amyloliquefaciens*	B	A	S	2,5	2,5	3,3	7
G	*B. amyloliquefaciens*	B	B	R	2	1,7	2	7
H	*B. amyloliquefaciens*	A	A	R	3,5	3	4,5	7
I	*B. amyloliquefaciens*	B	A	R	2	2	2	8
J	*B. amyloliquefaciens*	B	A	S	2	2,5	2,5	8
K	*B. amyloliquefaciens*	B	A	S	0,3	<1	1	4
L	*B. licheniformis*	A	B	S	<1	<1	1,3	8
M	*B. licheniformis*	B	A	S	0	0	0	4
N	*B. megaterium*	B	A	S	0	0	0	0
O	*B. subtilis*	B	A	S	1	<1	1,3	7
P	*B. pumilus*	A	A	R	1	0	1,7	8
Q	*B. licheniformis*	B	B	S	0	0	0	2
R	*B. licheniformis*	B	B	S	0	0	0	2
S	*B. pumilus*	A	A	R	<1	0	<1	6
T	*B. megaterium*	A	A	S	0	0	0	0
U	*B. licheniformis*	B	B	S	0	0	0	3
V	*B. subtilis*	C	A	S	2,5	1	2,5	10

EJEMPLO 3: Termoestabilidad

3.1 Método para prueba de termoestabilidad

Se hicieron crecer cepas de *Bacillus* durante la noche en VIB a 37ºC y 220 rpm. Se extendieron los cultivos incubados durante la noche sobre placas de agar T3 (100 μl de diluciones 10^5 -10^6) y se incubaron a 37ºC durante 1-2 días hasta que se completó la esporulación. Se rasparon las esporas de las placas, se suspendieron en disolución FKP y se incubaron a 80ºC durante 15 min con el fin de inactivar las células vegetativas. Se colocaron las suspensiones de esporas en hielo inmediatamente después del calentamiento. Se lavaron las preparaciones de esporas dos veces en FKP, se resuspendieron en FKP con glicerol al 20% y se mantuvieron a 80ºC antes de su uso. Se obtuvo la termorresistencia de las esporas bacterianas manteniendo tubos Eppendorf con 500 μl de suspensiones de esporas en FKP (a una concentración de aproximadamente $1x10^6$ UFC por ml) a 99,5ºC durante 2, 5 y 10 min. Se determinaron los recuentos de UFC en diluciones de suspensiones calentadas sembradas en placa sobre agar VIB después de incubación a 37ºC durante la noche.

3.2 Resultados de la prueba para termoestabilidad

En la tabla 4 se muestran los datos de termoestabilidad.

Tabla 4. Termoestabilidad a 99,5ºC de cepas de *Bacillus* seleccionadas; medida en ufc como reducción después de 2, 5 y 10 min en relación con tiempo 0 (log/log)

Cepa B=15516; cepa C=15541, cepa H=15536

Cepas	Especies	Reducción en ufc después de		
		2 min	5 min	10 min
B	*B. amyloliquefaciens* subsp *amyloliquefaciens*	0,05	0	0
C	*B.* subtilis	0,25	2,5	3,8
D	*B. amyloliquefaciens*/relacionada con *siamensis*	0	0	0,05
E	*B. amyloliquefaciens* subsp. plantarum	0,34	3,8	5,3
F	*B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*	0	0	0
H	*B. amyloliquefaciens* subsp. plantarum	0,19	2,5	5

En general, una reducción de menos de 2 (log/log) ufc después de 2 min en relación con tiempo 0 es apropiada para que las esporas se incluyan en el pienso para granulación y se logran resultados por debajo de 2 con preparaciones comerciales comunes de esporas de *Bacillus*. Por tanto, todas las cepas sometidas a prueba y mostradas en la tabla 4 tienen buena termoestabilidad. Algunas cepas también mostraron buena termoestabilidad después de 5 y 10 minutos, es decir la cepa B y la cepa F, ambas B. *amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens,* que no mostraron reducción de ufc.

EJEMPLO 4: Producción de enzimas

4.1 Método para ensayo de celulasa

Se hicieron crecer cepas de *Bacillus* en medio de carboximetilcelulosa (CMC) (Abou-Taleb *et al*. 2009) (por l: 10,0 g de carboximetilcelulosa (C9481), 2,0 g de triptona Bacto (cat. 211705, Becton Dickinson A/S, Dinamarca), 4 g de KH_2PO_4, 4,0 g de Na_2HPO_4, 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,004 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7) a 37ºC y

agitación magnética vigorosa durante 24 horas. Se determinó la producción de celulasa usando el kit EnzChek Cellulase Sustrat (cat. E33953, Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se recogieron los sobrenadantes de cultivo mediante centrifugación y se distribuyeron en MTP (200 μl por pocillo) en diluciones en serie. Se construyeron curvas patrón usando celulasa de *Aspergillus niger* (C1184) partiendo de 2 U ml^{-1}. Se añadió la disolución de sustrato EnzChek a los sobrenadantes de cultivo en placas Black FluoroNunc de 96 pocillos de Nunc (cat. 237105, Thermo Fisher Scientific, NUNC Inc.). Se registró la fluorescencia a excitación de 360 nm/emisión de 420 nm después de 30 min de incubación (Enspire 2300 Multilabel Reader, Perkin Elmer Inc.). Se calculó la actividad celulasa a partir de curvas patrón en dos experimentos independientes y se expresó como medias (U ml-1).

4.2 Método para el ensayo de xilanasa

Se hicieron crecer cultivos de *Bacillus* en medio que contenía xilano de madera de haya (Cordeiro *et al*. 2002) (por l: 5,0 g de xilano (X4252), 2,0 g de extracto de levadura (cat. 288620, Becton Dickinson A/S, Dinamarca), 5,0 g de peptona Bacto (cat. 211677, Becton Dickinson A/S, Dinamarca), 0,5 g de NaCl, 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,15 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, pH 7,5) a 37ºC y agitación magnética vigorosa durante 24 horas. El ensayo de xilanasa se realizó con el uso del kit EnzChek Ultra Xilanase Assay (cat. E33650, Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recogieron los sobrenadantes de cultivo mediante centrifugación, se distribuyeron en MTP (200 μl por pocillo), en diluciones en serie y se añadió disolución de trabajo de sustrato de xilanasa. Se midió la fluorescencia en los sobrenadantes de cultivo a excitación de 360 nm/emisión de 420 nm después de la incubación durante 30 min (Enspire 2300 Multilabel Reader, Perkin Elmer Inc.). Se usó *Thermomyces lanuginosis* (X2753) como enzima patrón y se cargó en MTP en diluciones en serie, partiendo de 25 mU ml^{-1}. Se calculó la actividad xilanasa de las cepas de *Bacillus* a partir de las curvas patrón y se expresó como medias (mU ml^{-1}) de dos ensayos independientes.

4.3 Método para ensayo de proteasa

Se transfirieron cultivos de *Bacillus* incubados durante la noche (cultivados en VIB a 37ºC) a una mezcla de reacción con isotiocianato de fluoresceína-caseína (FITC-C) como sustrato (Sigma C3777) y se incubaron a 37ºC 3 horas. Después de la precipitación, se midió la cantidad de péptidos solubles mediante fluorescencia, a excitación de 497 nm, emisión de 515 nm. Este ensayo detecta una amplia variedad de proteasas (serina, ácido aspártico, cisteína y metaloproteasas).

4.4 Métodos para la producción de biopelícula

Se añadieron cepas de *Bacillus* en VIB (aproximadamente 10^7 UFC ml^{-1}), se distribuyeron en MTP de polipropileno (PP) (96 Well Conical Btm PP Plt Natural; NUNC Inc., Dinamarca) y se incubaron a 37ºC durante 24 horas sin agitación. Se controló el crecimiento mediante mediciones de la densidad óptica (DO) a 620 nm. Se evaluó la formación de biopelícula mediante tinción con cristal violeta tal como se describió anteriormente (Auger *et al*. 2009). Brevemente, tras lavar los pocillos con agua destilada, se añadió disolución de cristal violeta del 0,1% (p v^{-1}) a MTP de PP y se incubaron las placas durante 30 min. Entonces, se repitió el procedimiento de lavado y se añadió etanol el 96% (v v^{-1}) a las placas. Se midió la absorbancia a 570 nm después de 15 min de incubación (espectrofotómetro Wallac Victor2, Perkin Elmer Inc.). Se clasificaron las cepas de *Bacillus* spp. o bien como altos ($Abs_{570\ nm}$ > 2,0), medios ($Abs_{570\ nm}$ = 1,0 - 2,0) o bajos ($Abs_{570\ nm}$ < 1,0) productores de biopelícula. El ensayo se realizó dos veces por duplicado.

4.5. Resultados para los ensayos de enzimas

Tabla 5. Producción de enzimas y biopelícula

(RFU= Unidad de fluorescencia relativa)

Cepa A=15510; cepa B=15516; cepa C=15541; cepa H=15536; cepa I=15539

Cepas	Especie	Celulasa, mU/ml	Xilanasa, mU/ml	Proteasa, RFU/DO	Biopelícula
A	*B.* mojavensis	1734	50	142117	+
B	*B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*	67	47	599919	+
C	*B. subtilis*	1037	24	445091	+
D	*B. amyloliquefaciens*/relacionada con *siamensis*	2196	70	291908	+++
E	*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*	612	28	381459	+++
F	*B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*	54	57	400456	+++
G	*B. amyloliquefaciens* subsp.	371	71	453158	+++

	plantarum				
H	*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*	631	30	252377	++
I	*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*	466	121	411206	+++
J	*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*	469	72	421338	+++

La tabla muestra que las cepas E, G, H, I y J que son todas ellas *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* tienen alta actividad celulasa, mientras que las cepas B y F que son *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* tienen baja actividad celulasa.

EJEMPLO 5: Ensayos con lechones

Se complementaron dietas para recién nacidos con dos cepas de *Bacillus* seleccionadas (cepa B o C) para evaluar su efecto sobre el rendimiento del crecimiento y la mortalidad de lechones tras el destete. Dado que *E. coli* es uno de los principales patógenos en el periodo de recién nacidos con un gran impacto en los parámetros de producción y la mortalidad, estos ensayos pueden dar información sobre el efecto en la inhibición de *E. coli* en los animales. Los ensayos se realizaron en 2 centros diferentes: el centro 1 era una granja de investigación y el centro 2 una universidad. La organización del ensayo fue similar en ambos centros.

Tabla 6

Visión general de los centros usados en los ensayos con lechones

	N.º total de cerdos	N.º de repeticiones	Pesaje	Días en el ensayo
Centro 1	576	96	28, 35, 42, 63	35
Centro 2	720	24	28, 35, 49, 63	35

5.1.1 Organización experimental en el centro 1

El día del destete, se usaron en el experimento 576 lechones (de 28 días de edad) procedentes de dos lotes de destete consecutivos (288 lechones cada uno), que se originaron a partir de la granja experimental. Los lechones eran lechones cruzados (ACMC x Pietrain). Los lechones seleccionados estaban sanos con buen aspecto general y no recibieron ninguna vacunación en la fase de recién nacidos. La granja experimental fue positiva para el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), pero bajo control, y tuvo algunos problemas de colibacilosis en la fase tras el destete. Los lechones se clasificaron según el peso corporal y luego se asignaron a 48 pocilgas en ambos lotes de destete (96 pocilgas en total) de manera que cada bloque de pocilgas contenía 6 lechones, 3 machos y 3 hembras, de peso corporal similar en ambos tratamientos. Los tratamientos se asignaron a las pocilgas de lechones de poco y mucho peso por bloque, de modo que cada tratamiento se aplicó a 24 pocilgas de 6 lechones (6 pocilgas por tratamiento y sala; 12 pocilgas por tratamiento y lote de destete). Se añadieron productos de *Bacillus* al pienso a 400 g/ton de pienso o 1,28 $*10^7$ UFC g/pienso.

Los cerdos se pesaron individualmente a los 28 (día 0; día de destete), 35, 42 y 63 días de edad para calcular el aumento de peso diario promedio (ADWG). Se midieron la ingesta de pienso diaria promedio (ADFI) y la razón de conversión de pienso (FCR) por pocilga en las mismas fases (28-35; 35-42; 42-63) y durante periodos principales (primera edad: 28-42 días de edad; segunda edad: 42-63 días de edad; y periodo de recién nacido total). Se controlaron diariamente la mortalidad y la incidencia de patologías, incluyendo el registro de tratamientos antibióticos individuales aplicados.

Tabla 7

Parámetros de producción en el centro 1

Valores de P en comparación con control (A: P=< 0,1; a =<0,05)

Cepa B= 15516; cepa C=15541

SE= Error estándar

	Peso corporal, kg		28-42 días de edad (14 días en el ensayo)			42-63 días de edad			Total (28-63 días)		
	28d	63d	ADG	ADFI	FCR	ADG	ADFI	FCR	ADG	ADFI	FCR
Control	7,7	20,7	179	254	1,43	493	697	1,42	371	522	1,40
Cepa B	7,7	21,1	196A	264	$1,37^A$	513	723A	1,41	383	535	1,40
Cepa C	7,8	21,0	199a	267A	$1,37^A$	501	710	1,42	380	532	1,40

SE	0,150	0,254	0,007	0,006	0,024	*0,010*	0,010	*0,008*	0,007	0,007	0,009

5.1.2 Resultados

Los productos probióticos de ambas cepas de *Bacillus* complementados a dietas de recién nacidos mejoraron numéricamente el rendimiento productivo en comparación con un grupo de control negativo, sin mostrar diferencias entre ellos. Pudo observarse un efecto significativo tanto en ADG como en FU en la fase de primera edad (28-42 días de edad). El porcentaje de mortalidad se redujo en ambos grupos de *Bacillus* (% de mortalidad: control (3,47), cepa B (1,39%), cepa C (2,08))

5.2.1 Organización experimental en el centro 2

Justo tras el destete, todos los lechones seleccionados se alojaron en una sala de destete de 24 pocilgas con treinta animales por pocilga. La sala estaba equipada con calefacción central y ventilación forzada con sistema de refrigeración y suelos completamente de listones. Cada establo estaba equipado con un comedero de dos lados en húmedo-seco comercial para garantizar la alimentación a voluntad y el acceso libre al agua, con capacidad para alimentar a tres animales al mismo tiempo. El pienso se distribuyó a voluntad a lo largo de toda la fase experimental.

Se usó un total de setecientos veinte lechones recién destetados cruzados comerciales [Pietrain x (Land-race x Large White)]. Los animales se obtuvieron de las cerdas de la misma granja en el día del destete y se trasladaron a la instalación experimental (sin transporte). Se usaron lechones machos y hembra de 26 d de edad de 7,0 kg DE=1,64 kg de peso corporal. Se usó identificación con etiqueta de plástico en la oreja con el número del animal. Los animales se distribuyeron en tres bloques por el peso corporal inicial. Dentro de cada bloque los lechones se distribuyeron en pocilgas para una distribución de peso corporal equilibrada. Por tanto, cada bloque consistió en 8 pocilgas de 30 animales a los que se asignaron aleatoriamente dietas experimentales.

El ensayo comenzó en el destete a los 28 días de edad. Los animales se pesaron individualmente en los días 0 y 7 y se pesaron en grupo en los días 21 y 35 días en el ensayo. Se midió la desaparición de pienso de cada depósito a lo largo de todo el experimento. Así se calculó la ingesta de pienso diaria promedio (ADFI), el aumento de peso diario promedio (ADG) y la razón de pienso:aumento de peso (FCR) según la ingesta total de pienso. Se evaluó regularmente el estado de salud de los lechones y se registró cualquier signo anómalo o medicación administrada. También se calcularon la tasa de mortalidad y el porcentaje de sacrificios.

Tabla 8

Parámetros de producción en el centro 2

Medias por mínimos cuadrados, valores de P en comparación con control (A: P=< 0,1)

Cepa B= 15516; cepa C=15541

	28-35 días de edad			49-63 días de edad			Total (28-63 días)		
	ADG	ADFI	FCR	ADG	ADFI	FCR	ADG	ADFI	FCR
Control	73,8	157	2,26	345	602	1,76	227	388	1,72
Cepa B	80,9	174	2,26	375A	584	1,58[A]	235	383	1,64
Cepa C	87,1	166	1,96	379	586	1,60	232	389	1,69
SE	0,010	0,008	0,0002	0,019	0,025	0,0001	0,0091	0,0066	0,00065

5.2.2 Resultados

Ambas cepas de *Bacillus* complementadas a dietas de recién nacidos mejoraron numéricamente el rendimiento productivo en comparación con un grupo de control negativo, sin mostrar diferencias entre ellos. Pudieron observarse efectos significativos tanto en ADG como en FU en los periodos de ensayo.

El número de animales tratados por pocilga con enrofluxacina para superar una diarrea grave fue significativamente mayor (P>0,05) en aquellos animales alimentados con la dieta de control que en los alimentados con *Bacillus* durante la primera semana tras el destete. Se observaron los mismos resultados (P<0,05) durante todo el periodo experimental (de 0 a 35 días tras el destete). El porcentaje de mortalidad se redujo en ambos grupos de *Bacillus* (% de mortalidad: control (4,17), cepa B (0,04%), cepa C (2,65))

Bibliografía

Barbosa *et al.*, 2005, Screening for Bacillus Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract, Applied and Environmental Microbiology, 968-978

Benitez *et al.*, 2011, Antimicrobial Activity of Bacillus amyloliquefaciens LBM 5006 is enhanced in the Presence of Escherichia Coli, Curr Microbiol 62, 1017-1022

Chaiyawan *et al.*, 2010, Characterization and probiotic properties of Bacillus strains isolated from broiler, The Thai

Journal of Veterinary Medicine, 40, 2, 207-214

Cutting, S. M. 2011. Bacillus probiotics. Food Microbiology 28 (2):214-20.

EFSA 2008. Technical Guidance. Update of antibiotic resistance criteria. The EFSA Journal 732, 9-15

Guo *et al*, 2006, Screening of Bacillus strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of Bacillus subtilis MA139 in pigs, Antonie van Leeuwen-hoek 90:139-146

Klose *et al.*, 2010. In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. Vet. Microbiology 144: 515-521.

Lopez, D., and R. Kolter. 2010. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in bacillus subtilis. FEMS Microbiol. Rev. 34(2): 134-149.

Spiehs, M. J., G. C. Shurson, and L. J. Johnston. 2008. Effects of two direct-fed microbial on the ability of pigs to resist an infection with salmonella enterica serovar typhimurium. Journal of Swine Health and Production. 16(1): 27-36.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Bacillus* seleccionada del grupo que consiste en

(a) la cepa de *Bacillus mojavensis* con número de registro DSM 25839;

(b) las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* con número de registro DSM 25840, número de registro DSM 27032 o número de registro DSM 27033; y

(c) la cepa de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 25841.

2. Método para seleccionar una cepa de *Bacillus* que tiene

(i): sensibilidad a ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloramfenicol;

(ii) inhibición del crecimiento de *E. coli* y *Clostridium perfringens;* y

(iii) un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide después de 2 días de incubación,

comprendiendo el método las etapas siguientes:

(i): seleccionar y aislar de un conjunto de cepas de *Bacillus* una cepa de *Bacillus* que es sensible a ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloramfenicol,

(ii) seleccionar y aislar de un conjunto de cepas de *Bacillus* una cepa de *Bacillus* que inhibe el crecimiento de *E. coli* y *Clostridium perfringens,*

(iii) seleccionar y aislar de un conjunto de cepas de *Bacillus* una cepa de *Bacillus* que tiene un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide después de 2 días de incubación,

(iv) someter a ensayo un conjunto de cepas de *Bacillus* para determinar la sensibilidad de las células vegetativas a pH 4, y

(v) someter a ensayo un conjunto de cepas de *Bacillus* para determinar la resistencia a la bilis.

3. Método para obtener una cepa mutante de

(a) la cepa de *Bacillus mojavensis* con número de registro DSM 25839;

(b) las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* con número de registro DSM 25840, número de registro DSM 27032 o número de registro DSM 27033; o

(c) la cepa de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 25841;

comprendiendo el método

someter opcionalmente la cepa de (a), (b) o (c) a tratamiento de mutagenización, y

seleccionar una cepa mutante de (a), (b) o (c) que tiene las propiedades siguientes

(i): sensibilidad a ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloramfenicol;

(ii) inhibición del crecimiento de *E. coli* y *Clostridium perfringens,* y

(iii) un porcentaje de esporulación de al menos 80 cuando se mide después de 2 días de incubación.

4. Composición de *Bacillus* que comprende células de al menos una cepa de *Bacillus* según la reivindicación 1.

5. Composición de *Bacillus* según la reivindicación 4, que comprende células de al menos dos cepas según la reivindicación 1.

6. Composición de *Bacillus* según la reivindicación 4 ó 5, que comprende células de al menos tres cepas según la reivindicación 1.

7. Composición de *Bacillus* según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que las células de la cepa o cepas de *Bacillus* son esporas.

8. Método para producir un pienso o premezcla que comprende añadir una composición de *Bacillus* según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 a un pienso.

9. Método para alimentar a un animal que comprende administrar una composición de *Bacillus* según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 o un pienso o premezcla producido según el método según la reivindicación 8 a un animal.

10. Método para alimentar a un animal según la reivindicación 9, en el que el animal es un animal seleccionado del grupo que consiste en aves, rumiantes, terneros, cerdos, conejos, caballos, pescado y mascotas.

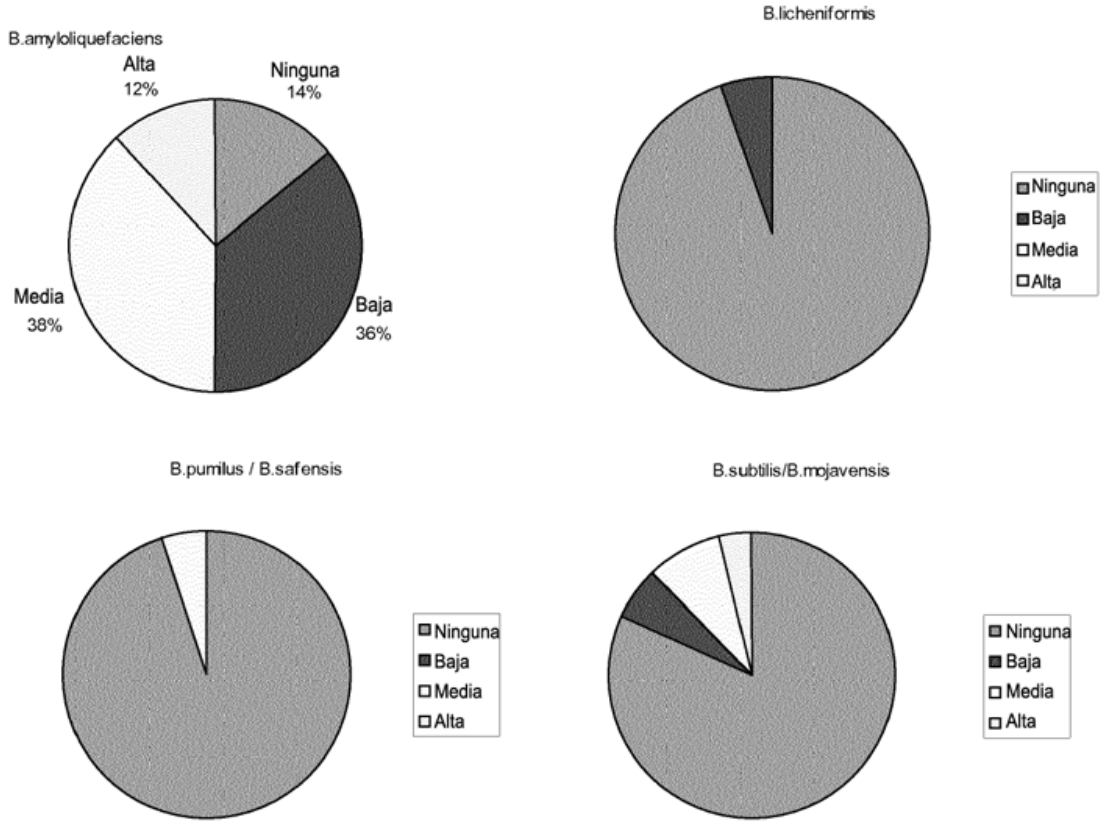
B.amyloliquefaciens
Alta
12%
Ninguna
14%
Media
38%
Baja
36%
B.licheniformis
Ninguna
Baja
Media
Alta
B.pumilus / B.safensis
Ninguna
Baja
Media
Alta
B.subtilis/B.mojavensis
Ninguna
Baja
Media
Alta

Figura 1