

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 230**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2012 PCT/US2012/052360**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13029013**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2012 E 12753898 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2748300**

54 Título: **Cepas de Bacillus productoras de enzimas**

30 Prioridad:

24.08.2011 US 201161526881 P
25.08.2011 US 201161527371 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2019

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K , DK

72 Inventor/es:

DAVIS, MARI, ELLEN;
SAWALL, JUSTIN;
NEUMANN, ANTHONY;
SIRAGUSA, GREG y
ROMERO, LUIS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 702 230 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* productoras de enzimas

Bibliografía

5 Las citas bibliográficas completas de las referencias mencionadas en la presente memoria por el apellido del primer autor entre paréntesis se pueden encontrar en la sección de bibliografía, inmediatamente antes de las reivindicaciones.

Campo

10 La descripción se refiere a cepas de *Bacillus* productoras enzimas que proporcionan beneficios a animales, y a métodos de uso de estas cepas. En una realización, la descripción se refiere a métodos para mejorar el rendimiento productivo de un animal. En otra realización, la descripción se refiere a productos microbianos de alimentación directa, y pienso para un animal complementado con un producto microbiano de alimentación directa.

Antecedentes

15 La industria porcina mundial ha visto un aumento en la alimentación de subproductos (granos secos de destilería con solubles (DDGS), harinillas de trigo, etc.) inicialmente desde 0-10% a los extremos actuales de 30-60%. Estos ahorros en los costes de la dieta han sido una gran oportunidad para que la industria ahorre en costes de insumos de alimentación, pero también conlleva una serie de desafíos. El procedimiento de fermentación para extraer etanol del maíz elimina casi todo el almidón, dejando el subproducto de alimentación DDGS resultante que contiene aproximadamente 40% de fibra. Este mayor contenido de fibra en relación con el maíz da como resultado una digestibilidad reducida de la materia seca y una digestibilidad aproximadamente 10 unidades porcentuales menor de la mayoría de los aminoácidos en los DDGS en comparación con el maíz (Stein y Shurson, 2009).

20 En consecuencia, la inclusión de DDGS en las dietas del ganado puede tener impactos negativos en el rendimiento productivo animal y las características de la canal. Además de los efectos negativos en el crecimiento animal y calidad de la canal, las alteraciones en la digestibilidad de los nutrientes como resultado de añadir DDGS con un alto contenido de fibra tienen implicaciones para la gestión, almacenamiento y descomposición del estiércol porcino. La industria porcina comercial ha indicado que la capacidad de explotación del estiércol es menor en las unidades anaeróbicas de almacenamiento de estiércol porcino de fosas profundas y que el estiércol de cerdos alimentados con alto nivel de DDGS tiene más acumulación de sólidos, así como emisiones gaseosas de amoníaco, metano y sulfuro de hidrógeno.

25 En vista de lo anterior, sería deseable proporcionar cepas de *Bacillus* que produzcan enzimas que proporcionen beneficios a los animales, y métodos de uso de estas cepas

Resumen

La descripción se refiere a cepas de *Bacillus* que producen enzimas. En una realización, las cepas son *Bacillus subtilis*. En otra realización, las cepas son *Bacillus pumilus*.

35 En al menos algunas realizaciones, la o las cepas de *B. subtilis* son *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 y *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 y *Bacillus subtilis* AGTP 944, y cepas que tienen todas las características de las mismas, cualquier derivado o variante de las mismas, y sus mezclas. En algunas realizaciones, la o las cepas de *B. pumilus* es *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068.

40 En una realización, la descripción se refiere a métodos que comprenden administrar una cantidad eficaz de cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas, a un animal, en donde la administración mejora al menos uno de los siguientes peso corporal, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, índice de conversión, características de la canal, digestibilidad de nutrientes y problemas de residuos de estiércol.

45 Como se describe en la presente memoria, las cepas productoras de enzimas se pueden administrar a un animal para mejorar al menos uno de la descomposición de componentes complejos de la dieta, problemas de residuos de estiércol, eficiencia de producción, características de la canal y el rendimiento cuando se alimenta con altos niveles de DDGS.

50 Se pueden administrar una o más cepas productoras de enzimas como productos microbianos de alimentación directa (DFM, por sus siglas en inglés *direct-fed microbial*). Un producto microbiano de alimentación directa incluye una o más cepas de *Bacillus*. La(s) cepa(s) productora(s) de enzimas es(son) eficaces en la degradación de piensos no digeribles de otra forma, como los DDGS. Esto permite una mayor disponibilidad de nutrientes, dando como resultado una mejor respuesta del crecimiento animal. Además, la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas reduce(n) los olores asociados con el estiércol, mejorando así la calidad del aire en el entorno operativo. La reducción de olores

puede ser por reducción de ácidos grasos volátiles, la producción de gases amoníaco y/o metano y sulfuro de hidrógeno.

- 5 La descripción se refiere a un método que comprende administrar una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluyen una o más cepas o sus mezclas, a un cerdo en una cantidad eficaz para mejorar la unidad de almacenamiento de estiércol. La unidad de almacenamiento de estiércol porcino puede ser una fosa de estiércol. La administración mejora al menos uno de los siguientes: menos incidencia de formación de espuma, menos acumulación de sólidos y menos nitrógeno, azufre, fósforo, nitrógeno unido a fibra, contenido total de proteínas, grasa y fibra en comparación con una fosa de estiércol de control.
- 10 La(s) cepa(s) productora(s) de enzimas se pueden aplicar directamente a una unidad de almacenamiento de estiércol, tal como una fosa de estiércol. Las mejoras que resultan de poner en contacto la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas directamente con una unidad de almacenamiento de estiércol incluyen al menos una de menor incidencia de formación de espuma, menor acumulación de sólidos y menos nitrógeno, azufre, fósforo, nitrógeno unido a fibra, contenido total de proteínas, grasas y fibra que las fosas de estiércol de control.
- 15 La descripción se refiere a un método para alterar la composición de ácidos grasos volátiles en una fosa de estiércol que comprende administrar una cantidad eficaz de cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de la(s) cepa(s), uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas, a animales cuyo estiércol se almacena en la fosa de estiércol. Las cepas productoras de enzimas se pueden poner en contacto directamente con la fosa de estiércol.
- 20 La descripción se refiere a un método para alterar las emisiones de gases que se acumulan en una sala que aloja un animal, que comprende administrar cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de la(s) cepa(s), uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas, a animales en una cantidad eficaz para reducir las emisiones de gases.
- 25 También se describen en la presente memoria métodos para aliviar una respuesta inflamatoria, que comprenden administrar cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de la(s) cepa(s), uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas, a animales en una cantidad eficaz para aliviar la respuesta inflamatoria.

Breve descripción de los dibujos

- 30 Se ilustran realizaciones de ejemplo de la invención en los dibujos que acompañan; en donde las figuras 19 a 21 se refieren a una cepa de bacilo que no está dentro del alcance de la invención actualmente reivindicada.
- La figura 1 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5.
- La figura 2 es una secuencia parcial del ADNr 16S de *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5.
- La figura 3 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus subtilis* AGTP BS442.
- La figura 4 es una secuencia parcial del ADNr 16S de *Bacillus subtilis* AGTP BS442.
- 35 La figura 5 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus subtilis* AGTP BS521.
- La figura 6 es una secuencia parcial del ADNr 16S de *Bacillus subtilis* AGTP BS521.
- La figura 7 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus subtilis* AGTP BS918.
- La figura 8 es una secuencia parcial del ADNr 16S de *Bacillus subtilis* AGTP BS918.
- La figura 9 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus subtilis* AGTP BS1013.
- 40 La figura 10 es una secuencia parcial del ADNr 16S de *Bacillus subtilis* AGTP BS1013.
- La figura 11 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068.
- La figura 12 es una secuencia parcial del ADNr 16S de *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068.
- La figura 13 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus subtilis* AGTP BS1069.
- La figura 14 es una secuencia parcial del ADNr 16S de *Bacillus subtilis* AGTP BS1069.
- 45 La figura 15 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus subtilis* AGTP 944.
- La figura 16 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus subtilis* AGTP 944.

La figura 17 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus subtilis* AGTP 944.

La figura 18 es la secuencia parcial del ADNr 16S de *Bacillus subtilis* AGTP 944.

La figura 19 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus pumilus* KX11-1.

La figura 20 es una fotografía de un gel que muestra un perfil de PCR de RAPD de *Bacillus pumilus* KX11-1.

5 La figura 21 es la secuencia parcial del ADNr 16S de *Bacillus pumilus* KX11-1.

La figura 22 es una representación esquemática de un diseño de placa de cultivo celular para el cribado de cepas de bacilos para los efectos antiinflamatorios. Se usó LPS para inducir la respuesta inflamatoria, pero se puede usar cualquier agente que induzca la respuesta inflamatoria.

10 La figura 23 es una gráfica de barras que representa los efectos antiinflamatorios de las cepas de bacilos como se muestra en la línea celular de macrófagos representativa (HD11 de pollo). El agente usado para inducir la respuesta inflamatoria era LPS. Los efectos en la expresión del gen de IL-1 β se muestran mediante barras blancas ($P < 0,01$). Los efectos en la expresión del gen de IL-8 se muestran mediante las barras negras ($P < 0,01$). Letras diferentes (a, b, c) indican medias que difieren estadísticamente ($P < 0,01$).

15 La figura 24 es una representación esquemática de un diseño de placa para el cribado en el cultivo celular de un candidato de producto microbiano de alimentación directa. Se usó LPS como agente para inducir la respuesta inflamatoria.

20 La figura 25 es una gráfica de barras que representa los efectos antiinflamatorios de las cepas de *Bacillus* en una línea celular de mamífero (línea de células epiteliales intestinales de rata (IEC-6)). Se usó LPS para inducir la respuesta inflamatoria. Se midió la expresión del gen del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Letras diferentes (a o b) indican medias que difieren estadísticamente ($P < 0,10$).

La figura 26 es una gráfica de rectas que muestran las características de la espuma en una fosa a lo largo de 3 tomas de muestra en el periodo de ensayo de 170 días.

La figura 27 es un esquema representativo de una medición de bioluminiscencia en cada corral en la zona marcada con una "x".

25 Antes de explicar realizaciones de la invención con detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos; estando la invención definida por las reivindicaciones. La invención puede tener otras realizaciones o ponerse en práctica o llevarse a cabo en diferentes formas. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología usadas en la presente memoria tienen el propósito de descripción y no deben considerarse como limitantes.

30

El marco organizativo de esta descripción no debe limitar ninguna realización o elemento dentro de la descripción. Se pretende que los elementos y aplicaciones citados en una realización, se puedan aplicar a otras realizaciones dentro de la descripción.

Descripción detallada

35 Los intervalos numéricos en esta descripción son aproximados, y por lo tanto pueden incluir valores fuera de los intervalos salvo que se indique otra cosa. Los intervalos numéricos incluyen todos los valores desde e incluyendo los valores inferiores y los superiores, en incrementos de una unidad, con la condición de que haya una separación de al menos dos unidades entre cualquier valor inferior y cualquier valor superior. Como ejemplo, si una propiedad de composición, física u otra, tal como, por ejemplo, peso molecular, viscosidad, etc., es de 100 a 1.000, se pretende

40 que todos los valores individuales, tales como 100, 101, 102, etc., y subintervalos, tales como de 100 a 144, de 155 a 170, de 197 a 200, etc., estén expresamente enumerados. Para intervalos que contienen valores que son menores de uno o que contienen números fraccionarios mayores que uno (p. ej., 1,1, 1,5, etc.), una unidad se considera que es 0,0001, 0,001, 0,01 o 0,1, según sea adecuado. Para intervalos que contiene números de un solo dígito menores de diez (p. ej., de 1 a 5), una unidad típicamente se considera que es 0,1. Esto son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente, y debe considerarse que todas las posibles combinaciones de valores numéricos entre el

45 valor más bajo y el valor más alto citados, están expresamente indicados en esta descripción. En esta descripción se proporcionan intervalos numéricos para, entre otras cosas, cantidades relativas de componentes en una mezcla y diferentes intervalos de temperatura y otros parámetros citados en los métodos.

50 Por "administrar" se entiende la acción de introducir al menos una cepa y/o líquido sobrenadante de un cultivo de al menos una cepa, descrito en la presente memoria, en el tracto gastrointestinal del animal. Más en particular, esta administración es una administración por vía oral. Esta administración se puede llevar a cabo en particular complementando el pienso destinado al animal con al menos una cepa, ingiriendo después el animal el pienso así

complementado. La administración también se puede llevar a cabo usando un tubo al estómago o cualquier otra forma que permita introducir directamente la al menos una cepa en el tracto gastrointestinal del animal.

Por "al menos una cepa", se entiende una sola cepa pero también mezclas de cepas que comprenden al menos dos cepas de bacterias. Por "una mezcla de al menos dos cepas", se entiende una mezcla de dos, tres, cuatro, cinco, seis o incluso más cepas. En algunas realizaciones de una mezcla de cepas, estas proporciones pueden variar de 1% a 99%. En determinadas realizaciones, la proporción de una cepa usada en la mezcla es al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%. Otras realizaciones de una mezcla de cepas son de 25% a 75%. Realizaciones adicionales de una mezcla de cepas son aproximadamente 50% para cada cepa. Cuando una mezcla comprende más de dos cepas, las cepas pueden estar presentes en proporciones sustancialmente iguales en la mezcla o en diferentes proporciones.

Por "poner en contacto" se entiende la acción de llevar al menos una cepa y/o líquido sobrenadante de un cultivo de al menos una cepa descrito en la presente memoria, muy cerca de un sustrato, recipiente o sustancia, que incluye, pero no se limita a una unidad de almacenamiento de estiércol. En algunas realizaciones, la unidad de almacenamiento de estiércol es una fosa de estiércol. El poner en contacto puede ser de una forma directa o indirecta. Como se usa en la presente memoria, poner en contacto incluye aplicar, pulverizar, inocular, dispersar, dispensar, verter y otros términos similares.

Por "cantidad eficaz", se entiende una cantidad de cepa y/o líquido sobrenadante suficiente para permitir la mejora en al menos uno de los siguientes: la eficacia de la producción animal, las características de la canal, rendimiento productivo de un animal, rendimiento productivo cuando un animal se alimenta con niveles altos de DDGS, digestibilidad de nutrientes, descomposición de componentes complejos de la dieta, rendimiento productivo de aves de corral, rendimiento productivo de cerdos, índice de conversión, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, ganancia de peso corporal:pienso o pienso:ganancia consumo y moralidad.

En otras realizaciones, "cantidad eficaz" significa una cantidad de cepa y/o líquido sobrenadante suficiente para permitir la mejora en al menos uno de los siguientes: problemas de residuos de estiércol, la cantidad de formación de espuma en una unidad de almacenamiento de estiércol, la ecología microbiana de una unidad de almacenamiento de estiércol, la cantidad de ácidos grasos volátiles en una unidad de almacenamiento de estiércol, la cantidad de producción de gases en una sala que aloja animales o una unidad de almacenamiento de estiércol, incluyendo, pero no limitado a metano y sulfuro de hidrógeno.

En otra realización, "cantidad eficaz" significa una cantidad de cepa y/o líquido sobrenadante suficiente para permitir la mejora en al menos uno de los siguientes: la expresión de un gen implicado en la respuesta inflamatoria, la expresión de una proteína implicada en la respuesta inflamatoria, y la actividad de una proteína implicada en la respuesta inflamatoria.

Como se usa en la presente memoria, "rendimiento" se refiere al crecimiento de un animal, tal como un cerdo o ave de corral, medido por uno o más de los siguientes parámetros: ganancia media diaria (GMD), peso, diarreas neonatales, mortalidad, conversión de pienso, que incluye tanto pienso:ganancia como ganancia:pienso, y consumo de pienso. "Una mejora en el rendimiento" o "rendimiento mejorado" como se usa en la presente memoria, se refiere a una mejora en al menos uno de los parámetros citados en la definición de rendimiento.

Como se usa en la presente memoria, una "variante" tiene al menos 80% de identidad de secuencias genéticas con las cepas descritas usando el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR). El grado de identidad de las secuencias genéticas puede variar. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de las secuencias genéticas con las cepas descritas usando el análisis de RAPD-PCR. Seis cebadores que se pueden usar para el análisis por RAPD-PCR incluyen los siguientes: Cebador 1 (5'-GGTGCGGAA-3') (SEQ ID NO.1); Cebador 2 (5'-GTTTCGCTCC-3') (SEQ ID NO. 2); Cebador 3 (5'-GTAGACCCGT-3') (SEQ ID NO.3); Cebador 4 (5'-AAGAGCCCGT-3') (SEQ ID NO.4); Cebador 5 (5'-AACGCGCAAC-3') (SEQ ID NO. 5); y cebador 6 (5'-CCCGTCAGCA-3') (SEQ ID NO.6). El análisis de RAPD se puede llevar a cabo usando perlas de análisis Ready-to-Go™ RAPD (Amersham Biosciences, Sweden), que están diseñadas como reacciones premezcladas, predispensadas para llevar a cabo el análisis de RAPD.

Los autores de la invención han encontrado que algunas cepas de *Bacillus* tienen actividad(es) enzimática(s) que descomponen fibras, lípidos, hidratos de carbono y proteínas. Esta(s) cepa(s) se denomina(n) en la presente memoria "cepa(s) productora(s) de enzimas", "cepa(s) de *Bacillus* " o "cepa(s)". En algunas realizaciones, la(s) actividad(es) enzimática(s) es(son) de celulasa, α -amilasa, xilanasa, esterasa, caseína proteasa, almidón de maíz amilasa, β -mananasa, lipasa, y/o proteasa, p. ej., zeínasa y proteasa de soja.

Los autores de la invención han encontrado que se pueden usar determinados microorganismos para dirigirse a los componentes que son un desafío en los granos secos de destilería con solubles (DDGS).

Los autores de la invención han encontrado también que las cepas productoras de enzimas pueden mejorar al menos uno de los siguientes: (1) descomposición de componentes complejos de la dieta, (2) problemas de residuos

del estiércol; (3) la eficacia de la producción animal; (4) las características de la canal del animal; y (5) el rendimiento productivo de un animal. También se describen en la presente memoria los efectos de una respuesta inflamatoria.

Cepas productoras de enzimas

5 Las cepas productoras de enzimas incluyen cepas de *Bacillus*, incluyendo, pero no limitado a *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. brevis*, *B. alkalophilus*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis* y cepas de *B. lentus*, y cepas que tienen todas las características de las mismas, cualquiera de sus derivados o variantes, y sus mezclas.

10 En al menos algunas realizaciones, la(s) cepa(s) de *B. subtilis* es(son) *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, and *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, y *Bacillus subtilis* AGTP 944, y cepas que tienen todas las características de las mismas, cualquiera de sus derivados o variantes, y sus mezclas. En algunas realizaciones, la(s) cepa(s) de *B. pumilus* es(son) *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068.

15 Estas cepas fueron depositadas por Danisco USA, Inc. de Waukesha, Wisconsin en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Ill., 61604. Las fechas de los depósitos originales y los números de acceso son los siguientes: *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, 13 de mayo, 2011 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442, 4 de agosto, 2011 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521, 4 de agosto, 2011 (NRRL B-50545), *Bacillus subtilis* AGTP BS918, 13 de mayo, 2011 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, 13 de mayo, 2011 (NRRL B-50509), *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, 4 de agosto, 2011 (NRRL B-50544), *Bacillus subtilis* AGTP 944, 11 de agosto, 2011 (NRRL B-50548) y *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068, 4 de agosto, 2011 (NRRL B-50543). Todos los depósitos se hicieron bajo las provisiones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes.

20 En algunas realizaciones, las cepas productoras de enzimas tienen actividad(es) enzimática(s) que incluyen, pero no se limitan a celulasa, α -amilasa, xilanasa, esterasa, proteasa de caseína, amilasa de almidón de maíz, β -mananasa, lipasa, y/o proteasa, p. ej., zeína y proteasa de soja.

En al menos algunas realizaciones, se combinan más de una de las cepas descritas en la presente memoria.

30 Cualquier derivado o variante de *Bacillus* también está incluido y es útil en los métodos descritos y reivindicados en la presente memoria. En algunas realizaciones, las cepas que tienen todas las características de *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944 y *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068, también están incluidas y son útiles en los métodos descritos y reivindicados en la presente memoria.

35 En algunas realizaciones, cualquier derivado o variante de *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944 y *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068, también está incluida y es útil en los métodos descritos y reivindicados en la presente memoria.

En al menos algunas realizaciones, la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas se usa(n) en combinación. En una realización, las cepas productoras de enzimas se pueden usar en combinación con cepas bacterianas del género *Bacillus* y otras cepas bacterianas de un género diferente.

40 En al menos algunas realizaciones, la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas y los métodos proporcionados en la presente memoria, mejoran uno o más de los siguientes: la descomposición de componentes complejos de la dieta, problemas de residuos del estiércol, la eficacia de la producción, características de la canal, y rendimiento cuando se alimenta con altos niveles de DDGS comparado con un control.

45 Los problemas de residuos del estiércol incluyen, pero no se limitan a composición de nutrientes y microbiana del estiércol indeseable, y emisiones de gases indeseables de las unidades de almacenamiento de estiércol, tales como fosas de estiércol. Una mejora en los problemas de residuos del estiércol incluye, pero no se limita a al menos uno de (1) menos nutrientes acumulados en el estiércol, (2) cambio en las comunidades microbianas del estiércol a poblaciones favorables para la descomposición de sólidos, y (3) una disminución en las emisiones de gases amoníaco, metano y sulfuro de hidrógeno.

50 Una mejora en las características de la canal se puede medir por al menos uno de mayor porcentaje de rendimiento magro y porcentaje de la canal, y menores índices de yodo de la grasa. El rendimiento se puede medir por la ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, y pienso necesario por unidad de ganancia, y otras mediciones conocidas en la técnica.

Cuando son ingeridas, la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas produce(n) enzimas. En algunas realizaciones, la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas produce(n) enzimas in vivo. En otras realizaciones, la(s) cepa(s) productora(s) de

enzimas sobrevive(n) en el estiércol de animales a los que se administra la cepa y producen enzimas en el estiércol excretado.

Métodos de cultivo de una cepa

5 Las cepas de *Bacillus* se producen por fermentación de las cepas bacterianas. La fermentación se puede iniciar aumentando gradualmente un cultivo sembrado. Esto implica la transferencia repetida y aséptica del cultivo a un volumen cada vez mayor para que sirva de inóculo para la fermentación, lo cual se lleva a cabo en fermentadores de acero inoxidable grandes en medio que contiene proteínas, hidratos de carbono y minerales necesarios para el crecimiento óptimo. Un medio de ejemplo no limitante es TSB. Después de añadir el inóculo al recipiente de fermentación, se controlan la temperatura y la agitación para permitir el crecimiento máximo. Una vez que el cultivo alcanza la densidad de población máxima, se recoge el cultivo separando las células del medio de fermentación. Esto se hace habitualmente por centrifugación.

10 Después se puede determinar el recuento del cultivo. Las UFC o unidades formadoras de colonias es el recuento de células viables de una muestra que resulta de métodos de cultivo microbiológico convencionales. El término deriva del hecho de que una sola célula, cuando se cultiva en medio adecuado, crecerá y se convertirá en una colonia viable en el medio agar. Puesto que múltiples células pueden dar lugar a una colonia visible, el término unidad formadora de colonia es una unidad de medición más útil que el número de células.

20 En una realización, cada cepa de *Bacillus* se fermenta entre un nivel de 5×10^8 UFC/ml a aproximadamente un nivel de 4×10^9 UFC/ml. En al menos una realización, se usa un nivel de 2×10^9 UFC/ml. Las bacterias se recogen por centrifugación, y se separa el líquido sobrenadante. El líquido sobrenadante se puede usar en los métodos descritos en la presente memoria. En al menos algunas realizaciones, las bacterias se sedimentan. En al menos algunas realizaciones, las bacterias se liofilizan. En al menos algunas realizaciones, las bacterias se mezclan con un vehículo. Sin embargo, no es necesario liofilizar los *Bacillus* antes de usarlos. Las cepas también se pueden usar con o sin conservantes, y en forma concentrada, no concentrada o diluida.

DFM y métodos para preparar un DFM

25 Se proporciona una composición que incluye una o más cepas descritas en la presente memoria. La composición se puede suministrar a un animal como un producto microbiano de alimentación directa (DFM). Se pueden añadir uno o más vehículos u otros ingredientes al DFM. El DFM se puede presentar en diferentes formas físicas, por ejemplo, como un recubrimiento superior, como un concentrado soluble en agua para usar como una poción líquida o para añadir a un sustituto de leche, cápsula de gelatina o geles. En una realización de la forma de recubrimiento superior, se añade el producto de fermentación de bacterias liofilizadas a un vehículo, tal como suero de leche, maltodextrina, sacarosa, dextrosa, caliza (carbonato de calcio), cáscaras de arroz, cultivo de levaduras, almidón seco y/o aluminosilicato sódico. En una realización del concentrado soluble en agua para una poción líquida o complemento sustituto de leche, el producto de fermentación de bacterias liofilizadas se añade a un vehículo soluble el agua, tal como suero de leche, maltodextrina, sacarosa, dextrosa, almidón seco, aluminosilicato sódico, y se añade un líquido para formar la poción o el complemento que se añade a la leche o sustituto de leche. En una realización de la forma de cápsula de gelatina, el producto de fermentación de bacterias liofilizadas se añade a un vehículo, tal como suero de leche, maltodextrina, azúcar, caliza (carbonato de calcio), cáscaras de arroz, cultivo de levaduras, almidón seco y/o aluminosilicato sódico. En una realización, las bacterias y el vehículo se encierran en una cápsula de gelatina degradable. En una realización de la forma de geles, el producto de fermentación de bacterias liofilizadas se añade a un vehículo, tal como aceite vegetal, sacarosa, dióxido de silicio, polisorbato 80, propilenglicol, hidroxianisol butilado, ácido cítrico, etoxiquina y/o colorante artificial para formar el gel.

45 La(s) cepa(s) se pueden mezclar opcionalmente con una formulación seca de aditivos que incluyen, pero no se limitan a sustratos de crecimiento, enzimas, azúcares, hidratos de carbono, extractos y microingredientes que promueven el crecimiento. Los azúcares podían incluir los siguientes: lactosa; maltosa; dextrosa; maltodextrina; glucosa; fructosa; manosa; tagatosa; sorbosa; rafinosa; y galactosa. Los azúcares están en el intervalo de 50-95%, sea individualmente o en combinación. Los extractos podían incluir levadura o compuestos solubles de fermentación de levaduras secos en el intervalo de 5-50%. Los sustratos de crecimiento podían incluir: tripticasa, en el intervalo de 5-25%; lactato sódico, en el intervalo de 5-30%; y, Tween 80, en el intervalo de 1-5%. Los hidratos de carbono podían incluir manitol, sorbitol, adonitol y arabitól. Los hidratos de carbono están en el intervalo de 5-50% individualmente o en combinación. Los microingredientes podían incluir los siguientes: carbonato de calcio, en el intervalo de 0,5-5,0%; cloruro de calcio, en el intervalo de 0,5-5,0%; fosfato dipotásico, en el intervalo de 0,5-5,0%; fosfato cálcico, en el intervalo de 0,5-5,0%; proteinato de manganeso, en el intervalo de 0,25-1,00%; y, manganeso, en el intervalo de 0,25-1,0%.

55 Para preparar los DFM descritos en la presente memoria, el(los) cultivos y vehículo(s) (cuando se usan) se pueden añadir a un mezclador de cintas o palas y mezclar durante aproximadamente 15 minutos, aunque el tiempo se puede aumentar o disminuir. Los componentes se mezclan de modo que resulte una mezcla uniforme de los cultivos y vehículos. El producto final preferiblemente es un polvo fluido, seco. Después, se puede añadir la(s) cepa(s) al pienso animal o una premezcla de pienso, añadir al agua de un animal o administrar de otras formas conocidas en la

técnica. Un pienso para un animal se puede complementar con una o más cepas descritas en la presente memoria o con una composición descrita en la presente memoria.

El DFM proporcionado en la presente memoria se puede administrar, por ejemplo, como una solución de cultivo que contiene la cepa, el líquido sobrenadante que produce la cepa o el producto bacteriano de una solución de cultivo.

- 5 La administración de un DFM proporcionado en la presente memoria a un animal puede aumentar el rendimiento del animal. En una realización, la administración de un DFM proporcionado en la presente memoria a un animal, puede aumentar el consumo medio diario de pienso (CMDP), ganancia media diaria (GMD) o índice de conversión (ganancia:pienso; G:F o pienso:ganancia, F:G) (colectivamente, "parámetros de productividad"). Se puede mejorar uno o más de estos parámetros de productividad.
- 10 El DFM se puede administrar a un animal en una de muchas formas. Por ejemplo, la(s) cepa(s) se pueden administrar en una forma sólida como una forma farmacéutica veterinaria, se pueden distribuir en un excipiente, preferiblemente agua, y suministrar directamente al animal, se pueden mezclar físicamente con material de pienso en una forma seca, o la(s) cepa(s) se pueden formar en una solución y después pulverizar sobre el material de pienso. El método de administración de la(s) cepa(s) al animal se considera que se basa en la experiencia del experto.
- 15

Métodos de administración a un animal

- En una realización, las cepas se pueden administrar en una cantidad eficaz a animales. En al menos algunas realizaciones, la descripción se refiere a un método que comprende administrar a un animal una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), o pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas. En una realización, el animal es un cerdo. En otra realización, el animal es un ave de corral. En otra realización más, el animal es un rumiante
- 20

La administración de una o más cepas productoras de enzimas a animales se lleva a cabo por cualquier método conveniente, que incluye la adición de las cepas al agua de beber de los animales, a su pienso, o en el lecho, o por inserción oral directa, tal como mediante un aerosol o por inyección.

- 25 En otra realización, la administración de una o más cepas productoras de enzimas es por pulverización del animal con las cepas productoras de enzimas. El animal puede limpiarse o acicalarse e ingerir las cepas productoras de enzimas.

En una realización, las cepas de *Bacillus* se administran como esporas.

- 30 Como se usa en la presente memoria, el término "animal", incluye, pero no se limita a ser humano, mamífero, anfibio, ave, reptil, cerdo, puercos, vacas, ganado, cabras, caballos, ovejas, aves de corral y otros animales mantenidos o criados en una granja o rancho, oveja, carnero, búfalo, antílope, buey, burro, mula, ciervo, alce, caribú, búfalo de agua, camello, llama, alpaca, conejo, ratón, rata, cobaya, hámster, hurón, perro, gato y otras mascotas, primates, monos, simios y gorilas.

- 35 En algunas realizaciones, los animales son aves de diferentes edades, tales como recién nacido, en crecimiento y de finalización. En determinadas realizaciones, los animales son aves de corral y aves exóticas, que incluyen, pero no se limitan a pollos, pollos de pavo, ansarinos, patitos, crías de pintadas, pollitas, gallinas, gallos (también conocidos como gallus), gallitos y capones

- 40 En algunas realizaciones, los animales son cerdos, que incluyen, pero no se limitan a lechones destetados, reproductores, cerdas, cerdas jóvenes, jabalíes, lechones en fase de lactancia y cerdos en finalización. La(s) cepa(s) se pueden suministrar a una cerda durante el periodo de lactación, aunque la(s) cepa(s) se pueden suministrar durante diferentes duraciones y en diferentes tiempos. En determinadas realizaciones, la(s) cepa(s) se administran a lechones suministrando la(s) cepa(s) a una cerda joven o cerda reproductora. Se cree que la transferencia a los lechones desde la cerda se produce por la vía fecal-oral y/u otras vías.

- 45 Las cepas productoras de enzimas se pueden administrar a un animal para mejorar al menos uno de digestibilidad de nutrientes, respuestas de rendimientos productivos de aves de corral, índice de conversión (ganancia:pienso o pienso:ganancia), peso corporal, consumo de pienso, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, la descomposición de componentes complejos de la dieta, la eficacia de la producción de aves de corral, la eficacia de la producción porcinas, y la mortalidad. Estos beneficios pueden ser particularmente útiles cuando se suministran dietas que contienen niveles altos de DDGS. Inicialmente, los DDGS eran de 0% a 10% de la dieta del animal.
- 50 Actualmente, los DDGS son de 30% a 60%.

La cantidad de mejora se puede medir como se describe en la presente memoria o por otros métodos conocidos en la técnica. Estas cantidades eficaces se pueden administrar al animal proporcionando acceso libre al pienso que contiene el DFM. El DFM se puede administrar también en una o más dosis.

En determinadas realizaciones, la mejora es de al menos 1-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o mayor de 99% as comparado con un control no tratado.

5 En al menos algunas realizaciones, la mejora en estas mediciones en un animal al que se le administra(n) la(s) cepa(s) es al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, y mayor de 99% comparado con un animal de control.

En otras realizaciones, la mejora de estas mediciones en un animal al que se le administra(n) la(s) cepa(s) es 2-8% comparado con un animal de control. En algunas otras realizaciones, la mejora de estas mediciones en un animal al que se le administra(n) la(s) cepa(s) es al menos 8% comparado con un animal de control.

15 En algunas realizaciones, un animal de control es un animal al que no se le han administrado cepas productoras de enzimas.

Esta cantidad eficaz se puede administrar al animal en una o más dosis. En algunas realizaciones, la una o más cepas de *Bacillus* se añaden a un pienso de animal en una tasa de al menos 1×10^4 UFC/animal/día.

20 En una realización, la administración mejora al menos uno de digestibilidad de nutrientes, respuestas de rendimiento productivo, p. ej., índice de conversión, la descomposición de componentes complejos de la dieta, la eficacia de la producción, ganancia de peso corporal, consumo de pienso y mortalidad.

En determinadas realizaciones del método, la(s) cepa(s) se administra(n) de aproximadamente 1×10^5 UFC/animal/día a aproximadamente 1×10^{11} UFC/animal/día. En algunas realizaciones, el animal es un cerdo. En otra realización, el animal es un ave de corral.

25 En al menos algunas realizaciones, el método se usa cuando el animal se alimenta con niveles altos de granos secos de destilería con solubles (DDGS). Los niveles altos de DDGS pueden ser una tasa por encima de 10% de la dieta del animal. Los niveles altos de DDGS pueden ser también una tasa por encima de 30% de la dieta del animal.

30 En al menos algunas realizaciones, la cantidad eficaz de al menos una cepa de bacteria se administra a un animal complementando un pienso destinado al animal con la cantidad eficaz de al menos una cepa de bacteria. Como se usa en la presente memoria, "complementar" significa la acción de incorporar la cantidad eficaz de bacterias proporcionadas en la presente memoria directamente en el pienso destinado al animal. Por lo tanto, el animal, cuando se alimenta, ingiere las bacterias proporcionadas en la presente memoria.

Las cepas productoras de enzimas se pueden administrar como una sola cepa o como múltiples cepas. Se puede administrar el líquido sobrenadante de una o más cepas productoras de enzimas a un animal. Cuando son ingeridas, las cepas productoras de enzimas producen enzimas.

35 En determinadas realizaciones, se suministran una o más cepas productoras de enzimas a los cerdos. La una o más cepas productoras de enzimas se dirigen a los componentes problemáticos en los granos secos de destilería con solubles (DDGS).

40 En una realización, la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas se añaden al pienso animal en una tasa de 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} y mayor de 1×10^{13} UFC por gramo de pienso animal.

En otra realización, la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas se añaden al pienso animal en una tasa de 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} y mayor de 1×10^{13} UFC por animal por día.

45 En algunas realizaciones, la una o más cepas de *Bacillus* se añaden a un pienso de cerdo en una tasa de aproximadamente $3,75 \times 10^5$ UFC por gramo de pienso. También se pueden suministrar de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^{11} UFC/animal/día. En algunas realizaciones, la una o más cepas de *Bacillus* se suministran en aproximadamente 1×10^8 UFC/animal/día.

Para rumiantes, la una o más cepas de *Bacillus* se suministran en aproximadamente 5×10^9 UFC/cabeza/día.

50 Para aves de corral, la una o más cepas de *Bacillus* se suministran en aproximadamente 1×10^4 UFC/g de pienso a aproximadamente 1×10^{10} UFC/g de pienso. En al menos algunas realizaciones, la una o más cepas de *Bacillus* se suministran de aproximadamente 1×10^5 UFC/ave/día a aproximadamente 1×10^8 UFC/ave/día.

Material de alimentación

En otra realización, un pienso para un animal comprende al menos una cepa de bacteria descrita en la presente memoria. En al menos algunas realizaciones, el pienso se complementa con una cantidad eficaz de al menos una cepa de bacteria. Como se usa en la presente memoria, "complementar" significa la acción de incorporar la cantidad eficaz de bacterias proporcionadas en la presente memoria directamente en el pienso destinado al animal. Por lo tanto, el animal, cuando se alimenta, ingiere las bacterias proporcionadas en la presente memoria.

Cuando se usa en combinación con un material de alimentación, para dietas de monogástricos, el material de alimentación puede incluir maíz, harina de soja, subproductos tales como granos secos de destilería con solubles (DDGS) y complementos de vitaminas/minerales. El material de alimentación para rumiantes puede ser grano o heno o ensilado o hierba, o sus combinaciones. Están incluidos entre dichos materiales de alimentación el maíz, granos secos, alfalfa, cualquier ingrediente de pienso y subproductos de la industria alimentaria y de piensos, así como subproductos de la industria del biocombustible y harina de maíz y sus mezclas. También se pueden usar otros materiales de alimentación.

El tiempo de administración puede variar siempre que se muestre una mejora en uno o más de los siguientes: (1) descomposición de componentes complejos de la dieta, (2) digestibilidad de nutrientes, (3) problemas de residuos del estiércol, (4) la eficacia de producción, (5) características de la canal, (6) rendimiento productivo, (7) rendimiento productivo cuando se alimenta con niveles altos de DDGS, (8) respuestas de rendimiento productivo de aves de corral, (9) respuestas de rendimiento productivo de cerdos, (10) la eficacia de la producción de aves de corral, (11) la eficacia de la producción porcina, (12) ganancia de peso corporal, (13) consumo de pienso, (14) índice de conversión, y (15) mortalidad. La administración es posible en cualquier momento con o sin pienso. Sin embargo, la bacteria se administra preferiblemente con o inmediatamente antes del pienso.

Métodos para mejorar el rendimiento productivo de un animal

En una realización, la descripción se refiere a un método para mejorar el rendimiento productivo de un animal, que comprende usar una o más cepas productoras de enzimas o líquidos sobrenadantes de las mismas, para mejorar el rendimiento productivo del animal con respecto al animal al que no se le han administrado cepas productoras de enzimas. En una realización, el animal es un cerdo. En otra realización, el animal es un ave de corral. En otra realización más, el animal es un rumiante

En una realización, el rendimiento productivo incluye, pero no se limita a digestibilidad de nutrientes, respuestas de rendimiento productivo de aves de corral, respuestas de rendimiento productivo de cerdos, índice de conversión, la descomposición de componentes complejos de la dieta, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, ganancia de peso corporal, consumo de pienso, características de la canal y la mortalidad. En otra realización más, los métodos descritos en la presente memoria se usan para mejorar el rendimiento productivo de un animal alimentado con un pienso animal que comprende DDGS.

En determinadas realizaciones, la mejora del rendimiento productivo es de al menos 1-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o mayor de 99% comparado con un control no tratado.

En al menos algunas realizaciones, la mejora del rendimiento productivo de un animal al que se le administra(n) la(s) cepa(s) es al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, y mayor de 99% comparado con un animal de control.

En una realización, las cepas productoras de enzimas para mejorar el rendimiento productivo de un animal comprenden una cepa de *Bacillus*. En una realización, la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis*. En otra realización, la cepa de *Bacillus* es *Bacillus pumilus*.

En otra realización, las cepas productoras de enzimas para mejorar el rendimiento productivo incluyen, pero no se limitan a *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, y *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944 y *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068.

La(s) cepa(s) productora(s) de enzimas para mejorar el rendimiento productivo de un animal se pueden administrar como una sola cepa, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas.

A. Digestibilidad de nutrientes

- 5 En otra realización más, la descripción se refiere a un método de aumento de la digestibilidad de un pienso para animales, que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un animal en una cantidad eficaz para aumentar la digestibilidad de un pienso para animales, comparado con un animal al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas. En otra realización, el método comprende además medir la cantidad de nutrientes acumulados en una fosa de estiércol del animal al que se ha administrado la cepa productora de enzimas y comparar esa cantidad de nutrientes con la cantidad de nutrientes en una fosa de estiércol de un animal al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas. En otra realización más, el pienso para animales comprende DDGS.
- 10 En otra realización más, la descripción se refiere a un método de aumento de la digestibilidad de un pienso para animales, que comprende administrar un pienso complementado con una cepa productora de enzimas a un animal en una cantidad eficaz para aumentar la digestibilidad del pienso para animales, en comparación con un animal al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.
- 15 En una realización, los métodos para mejorar el rendimiento productivo de un animal comprenden administrar una cepa productora de enzimas a un animal, y reducir la cantidad de nutrientes no digeridos por el animal en comparación con un animal al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.
- En otra realización, los métodos para mejorar el rendimiento productivo de un animal comprenden reducir la cantidad de nutrientes no digeridos por un animal administrando una cepa productora de enzimas al animal, en comparación con un animal al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.
- 20 En otra realización, los métodos para mejorar el rendimiento productivo de un animal comprenden administrar una cepa productora de enzimas a un animal, medir la cantidad de nutrientes acumulados en una fosa de estiércol del animal al que se le ha administrado la cepa productora de enzimas, y comparar la cantidad de nutrientes en la fosa de estiércol de un animal al que se le ha administrado las cepas productoras de enzimas con la cantidad de nutrientes en una segunda fosa de estiércol de un animal al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.
- 25 En una realización, la digestibilidad de un pienso para animales se puede medir por la cantidad de nutrientes en una fosa de estiércol. Se puede medir cualquier nutriente de la fosa de estiércol incluyendo, pero no limitado a materia seca, cenizas, nitrógeno total, nitrógeno amónico, fósforo y calcio.
- 30 La(s) cepa(s) productora(s) de enzimas para mejorar la digestibilidad de nutrientes se pueden administrar como una sola cepa, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas.

B. Rendimiento productivo de aves de corral

- 35 En una realización, la descripción se refiere a un método de aumento del rendimiento productivo de aves de corral que comprende administrar una cepa productora de enzimas a las aves de corral en una cantidad eficaz para aumentar el rendimiento productivo del ave de corral en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas. Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para mejorar el rendimiento productivo independientemente del pienso o la dieta de las aves de corral.
- 40 En una realización, la descripción se refiere a un método de aumento del rendimiento productivo en aves de corral alimentadas con una dieta de subproductos con alto contenido fibroso, que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un ave de corral, que es alimentada con una dieta de subproductos de alto contenido fibroso, en una cantidad eficaz para aumentar el rendimiento productivo del ave de corral en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas.
- 45 En otra realización, la descripción se refiere a un método de aumento de la ganancia media diaria en aves de corral que comprende administrar una cepa productora de enzimas a las aves de corral en una cantidad eficaz para aumentar la ganancia media diaria del ave de corral, en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas.
- 50 En otra realización, la descripción se refiere a un método de aumento del consumo medio diario de pienso en aves de corral que comprende administrar una cepa productora de enzimas a las aves de corral en una cantidad eficaz para aumentar el consumo medio diario de pienso en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas.
- En otra realización, la descripción se refiere a un método de mejora del índice de conversión de un pienso para animales en aves de corral que comprende administrar a aves de corral un pienso para animales complementado con una cepa productora de enzimas en una cantidad eficaz para aumentar el índice de conversión en aves de corral, en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas.

5 En otra realización más, la descripción se refiere a un método de mejora de las características de la canal que comprende administrar una cepa productora de enzimas a las aves de corral en una cantidad eficaz para mejorar las características de la canal de las aves de corral en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas. Las características de la canal que se pueden mejorar incluyen, pero no se limitan a profundidad de la grasa, pesos de los órganos, características de la pechuga, peso de la canal, calidad de la canal y valor de la canal.

En una realización, el valor medido de las características de la canal se puede aumentar o disminuir.

10 En otra realización más, se aumenta el valor medido de una o más de las siguientes características de la canal: profundidad de la grasa, pesos de los órganos, características de la pechuga, peso de la canal, calidad de la canal y valor de la canal.

En otra realización más, se disminuye el valor medido de una o más de las siguientes características de la canal: profundidad de la grasa, pesos de los órganos, características de la pechuga, peso de la canal, calidad de la canal y valor de la canal.

15 En otra realización más, la descripción se refiere a un método de reducción de la mortalidad en aves de corral que comprende administrar una cepa productora de enzimas a las aves de corral en una cantidad eficaz para reducir la mortalidad de dichas aves de corral en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas.

20 En otra realización, la descripción se refiere a un método de mejora de la digestibilidad de la lignina que comprende administrar una cepa productora de enzimas a aves de corral en una cantidad eficaz para mejorar la digestibilidad de la lignina en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas.

25 En otra realización, la descripción se refiere a un método de mejora de la digestibilidad de la lignina en dietas con alto contenido de fibra, que comprende administrar una cepa productora de enzimas a aves de corral en una cantidad eficaz para mejorar la digestibilidad de la lignina de dietas con alto contenido de fibra en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas. En otra realización, las dietas con alto contenido de fibras comprenden dietas basadas en subproductos. En otra realización más, la dieta comprende DDGS.

30 En otra realización, la descripción se refiere a un método de mejora de la digestibilidad ileal aparente que comprende administrar una cepa productora de enzimas a aves de corral en una cantidad eficaz para mejorar la digestibilidad ileal aparente en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas.

En otra realización más, la descripción se refiere a un método de mejora de la digestibilidad en el tracto total aparente que comprende administrar una cepa productora de enzimas a aves de corral en una cantidad eficaz para mejorar la digestibilidad en el tracto total aparente, en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas.

35 En otra realización más, la descripción se refiere a un método de reducción del pH de la digesta ileal que comprende administrar una cepa productora de enzimas a las aves de corral en una cantidad eficaz para reducir el pH de la digesta ileal en comparación con aves de corral a las que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas.

En otra realización más, los métodos citados antes comprenden además administrar un pienso complementado con una cepa productora de enzimas.

40 La(s) cepa(s) productora(s) de enzimas para mejorar el rendimiento productivo de aves de corral se pueden administrar como una sola cepa, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas.

C. Rendimiento productivo de cerdos

45 En una realización, la descripción se refiere a un método de aumento del rendimiento productivo de un cerdo que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un cerdo en una cantidad eficaz para aumentar el rendimiento productivo del cerdo en comparación con un cerdo al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas. Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para mejorar el rendimiento productivo independientemente del pienso o la dieta del cerdo.

50 En una realización, la descripción se refiere a un método de aumento del rendimiento productivo en un cerdo alimentado con una dieta de subproductos con alto contenido fibroso que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un cerdo, que es alimentado con una dieta de subproductos con alto contenido fibroso, en una cantidad eficaz para aumentar el rendimiento productivo del cerdo en comparación con un cerdo al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.

En otra realización, la descripción se refiere a un método de aumento de la ganancia media diaria de un cerdo que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un cerdo en una cantidad eficaz para aumentar la ganancia media diaria del cerdo en comparación con un cerdo al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.

- 5 En otra realización, la descripción se refiere a un método de aumento del consumo medio diario de pienso de un cerdo que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un cerdo en una cantidad eficaz para aumentar el consumo medio diario de pienso en comparación con un cerdo al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.

- 10 En otra realización, la descripción se refiere a un método de mejora del índice de conversión de un pienso para animales en un cerdo, que comprende administrar a un cerdo un pienso para animales complementado con una cepa productora de enzimas en una cantidad eficaz para aumentar el índice de conversión en el cerdo, en comparación con un cerdo al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.

- 15 En otra realización más, la descripción se refiere a un método de mejora de las características de la canal de un cerdo que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un cerdo en una cantidad eficaz para mejorar las características de la canal del cerdo en comparación con un cerdo al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas. Las características de la canal que se pueden mejorar incluyen, pero no se limitan a profundidad de la grasa, profundidad del lomo; porcentaje de carne magra; peso de la canal en caliente, pesos de los órganos, calidad de la canal y valor de la canal.

En una realización, el valor medido de las características de la canal se puede aumentar o disminuir.

- 20 En otra realización más, se aumenta el valor medido de una o más de las siguientes características de la canal: profundidad de la grasa, profundidad del lomo; porcentaje de carne magra; peso de la canal en caliente, pesos de los órganos, calidad de la canal y valor de la canal.

- 25 En otra realización más, se disminuye el valor medido de una o más de las siguientes características de la canal: profundidad de la grasa, profundidad del lomo; porcentaje de carne magra; peso de la canal en caliente, pesos de los órganos, calidad de la canal y valor de la canal.

En otra realización más, la descripción se refiere a un método de reducción de la mortalidad en cerdos que comprende administrar una cepa productora de enzimas a cerdos en una cantidad eficaz para reducir la mortalidad de dichos cerdos en comparación con cerdos a los que no se les ha administrado la cepa productora de enzimas.

- 30 En otra realización, la descripción se refiere a un método de mejora de la digestibilidad de la lignina que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un cerdo en una cantidad eficaz para mejorar la digestibilidad de la lignina en comparación con un cerdo al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.

- 35 En otra realización, la descripción se refiere a un método de mejora de la digestibilidad de la lignina en dietas con alto contenido fibroso, que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un cerdo en una cantidad eficaz para mejorar la digestibilidad de la lignina de las dietas con alto contenido fibroso, en comparación con un cerdo al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas. En otra realización, las dietas con alto contenido fibroso comprenden dietas basadas en subproductos. En otra realización más, la dieta comprende DDGS.

- 40 En otra realización, la descripción se refiere a un método de mejora de la digestibilidad ileal aparente que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un cerdo en una cantidad eficaz para mejorar la digestibilidad ileal aparente en el cerdo en comparación con un cerdo al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.

En otra realización más, la descripción se refiere a un método de mejora de la digestibilidad en el tracto total aparente que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un cerdo en una cantidad eficaz para mejorar la digestibilidad en el tracto total aparente en el cerdo en comparación con un cerdo al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.

- 45 En otra realización más, la descripción se refiere a un método de reducción del pH de la digesta ileal que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un cerdo en una cantidad eficaz para reducir el pH de la digesta ileal en el cerdo en comparación con un cerdo al que no se le ha administrado la cepa productora de enzimas.

En otra realización más, los métodos citados antes comprenden administrar un pienso complementado con una cepa productora de enzimas.

- 50 En otra realización, las cepas productoras de enzimas en los métodos citados antes en relación con el rendimiento productivo del cerdo, son una composición que comprende cepas de *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) y AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510).

La(s) cepa(s) productora(s) de enzimas para mejorar el rendimiento productivo del cerdo se pueden administrar como una sola cepa, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas.

Métodos para mejorar unidades de almacenamiento de estiércol

- 5 En una realización, la descripción se refiere a un método de mejora de las unidades de almacenamiento de estiércol que comprende administrar la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas, a un animal en una cantidad eficaz para mejorar la unidad de almacenamiento de estiércol. En una realización, el animal es un cerdo. En determinadas realizaciones, la unidad de almacenamiento de estiércol es una fosa de estiércol.
- 10 En una realización más, la descripción se refiere a un método de mejora de la calidad del aire en una sala que aloja un animal, que comprende administrar la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas, a un animal en una cantidad eficaz para mejorar la calidad del aire en la sala. En una realización, la mejora de la calidad del aire comprende rebajar los olores en la sala. En otra realización, la mejora de la calidad del aire comprende reducir la producción de uno o más de los siguientes: ácidos grasos volátiles, amoníaco, metano o sulfuro de hidrógeno.
- 15

En al menos algunas realizaciones, la administración mejora al menos uno de los siguientes: menos incidencia de formación de espuma, menos acumulación de sólidos y menos nitrógeno, azufre, fósforo, nitrógeno unido a fibra, proteínas totales, grasa y contenido de fibra, en comparación con una fosa de estiércol de control.

- 20 En una realización, las cepas productoras de enzimas para mejorar las unidades de almacenamiento de estiércol comprenden una cepa de *Bacillus*. En una realización, la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis*. En otra realización, la cepa de *Bacillus* es *Bacillus pumilus*.

- 25 En otra realización, las cepas productoras de enzimas para mejorar la unidad de almacenamiento de estiércol incluyen, pero no se limitan a *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 y *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944 y *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068.

- 30 En otra realización, la descripción se refiere a un método de mejora de una unidad de almacenamiento de estiércol que comprende poner en contacto la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), composiciones que incluyen una o más cepas o sus mezclas, directamente con una unidad de almacenamiento de estiércol, tal como una fosa de estiércol. Las mejoras que resultan de poner en contacto la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas directamente con una unidad de almacenamiento de estiércol incluyen al menos uno de menos incidencia de formación de espuma, menos acumulación de sólidos y menos nitrógeno, azufre, fósforo, nitrógeno unido a fibra, proteínas totales, grasa y contenido de fibra, que fosas de estiércol de control.

- 35 En otra realización, los métodos descritos antes se pueden usar para mejorar los problemas de residuos del estiércol, que incluyen, pero no se limitan a la formación de espuma en la fosa de estiércol, acumulación de sólidos, aumentos en (a) nitrógeno, (b) azufre, (c) fósforo, (d) nitrógeno unido a fibra, (e) proteínas totales, (f) grasa y (g) contenido de fibra.

A. Métodos para controlar o reducir la espuma en una unidad de almacenamiento de estiércol

- 40 En otra realización, la descripción se refiere a un método para controlar o reducir la espuma en una unidad de almacenamiento de estiércol que comprende administrar una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas, a un animal en una cantidad eficaz para controlar o reducir la cantidad de espuma en una unidad de almacenamiento de estiércol en comparación con una unidad de almacenamiento de estiércol donde a los animales no se les han administrado las cepas productoras de enzimas. En otra realización más, se reduce la relación espuma:líquido de la unidad de almacenamiento de estiércol.
- 45

- 50 En otra realización, la descripción se refiere a un método para controlar o reducir la espuma en una unidad de almacenamiento de estiércol que comprende poner en contacto la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), composiciones que incluyen una o más cepas o sus mezclas, directamente con una fosa de almacenamiento de estiércol en una cantidad eficaz para controlar reducir la espuma en una fosa de almacenamiento de estiércol en comparación con una fosa de almacenamiento de estiércol sin las cepas productoras de enzimas. En otra realización, se reduce la relación espuma:líquido de la unidad de almacenamiento de estiércol.

- 55 La cantidad de espuma en una unidad de almacenamiento de estiércol está asociada con la cantidad de sólidos en la unidad de almacenamiento de estiércol. Las unidades de almacenamiento de estiércol con un porcentaje mayor de sólidos en general tienen una relación espuma:líquido mayor, y por lo tanto más espuma.

5 En otra realización, la descripción se refiere a un método para controlar o reducir la espuma en una unidad de almacenamiento de estiércol que comprende administrar una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas, a un animal en una cantidad eficaz para reducir la cantidad de sólidos y de esta forma reducir la cantidad de espuma, en una unidad de almacenamiento de estiércol en comparación con una unidad de almacenamiento de estiércol donde a los animales no se les han administrado las cepas productoras de enzimas. En otra realización más, se reduce la relación espuma:líquido de la unidad de almacenamiento de estiércol.

10 En otra realización, la descripción se refiere a un método para controlar o reducir la espuma en una unidad de almacenamiento de estiércol que comprende poner en contacto la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), composiciones que incluyen una o más cepas o sus mezclas, directamente con una unidad de almacenamiento de estiércol en una cantidad eficaz para reducir la cantidad de sólidos en una unidad de almacenamiento de estiércol en comparación con una unidad de almacenamiento de estiércol sin las cepas productoras de enzimas. En otra realización, se reduce la relación espuma:líquido de la unidad de almacenamiento de estiércol.

B. Métodos para alterar una ecología microbiana en una unidad de almacenamiento de estiércol

20 En una realización, la descripción se refiere a un método para alterar una ecología microbiana en una unidad de almacenamiento de estiércol que comprende administrar la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas, a un animal en una cantidad eficaz para alterar la ecología microbiana en una unidad de almacenamiento de estiércol en comparación con una unidad de almacenamiento de estiércol donde a los animales no se les han administrado las cepas productoras de enzimas.

25 En otra realización, la descripción se refiere a un método para alterar una ecología microbiana en una unidad de almacenamiento de estiércol que comprende poner en contacto la(s) cepa(s) productora(s) de enzimas, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), composiciones que incluyen una o más cepas o sus mezclas, directamente con una unidad de almacenamiento de estiércol en una cantidad eficaz para alterar la ecología microbiana en una unidad de almacenamiento de estiércol en comparación con una unidad de almacenamiento de estiércol donde no se han usado las cepas productoras de enzimas.

30 En una realización, las cepas productoras de enzimas pueden alterar, directa o indirectamente, la ecología microbiana en una unidad de almacenamiento de estiércol y producir un aumento de la población de determinadas especies bacterianas y una disminución en la población de otras especies bacterianas. Las especies bacterianas que se pueden alterar, directa o indirectamente, mediante las cepas productoras de enzimas incluyen, pero no se limitan a metanógenos, bacteroides, grupo Clostridium I, grupo clostridium IV, grupo clostridium XIVa, y bacterias reductoras de sulfato.

35 En una realización, las cepas productoras de enzimas tiene la capacidad de cambiar el uso de nutrientes por la población microbiana y posteriormente alterar la ecología microbiana de modo que se alivien incidentes de formación de espuma agregada, sea por la disminución de la producción de gases que están disponibles para ser atrapados en la matriz de espuma, alteración de la disponibilidad de los compuestos moleculares que componen la matriz de espuma, o directamente por inhibición del crecimiento de bacterias asociadas con los incidentes de formación de espuma.

C. Métodos para alterar la composición de ácidos grasos volátiles

45 En una realización, la descripción se refiere a un método para alterar la composición de ácidos grasos volátiles en estiércol, que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un animal en una cantidad eficaz para alterar la composición de ácidos grasos en el estiércol de dicho animal en comparación con el estiércol de un segundo animal al que no se le ha administrado una cepa productora de enzimas. En una realización, la alteración de la composición de ácidos grasos puede dar como resultado un aumento de algunos ácidos grasos y una disminución de otros ácidos grasos. En otra realización, la alteración de composiciones de ácidos grasos se puede producir de una forma directa o indirecta.

50 En una realización, la descripción se refiere a un método para alterar la composición de ácidos grasos volátiles en una unidad de almacenamiento de estiércol, que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un animal en una cantidad eficaz para alterar la composición de ácidos grasos en el estiércol de dicho animal que se almacena en dicha unidad de almacenamiento de estiércol en comparación con el estiércol de un segundo animal al que no se le ha administrado una cepa productora de enzimas. En una realización, el animal es un cerdo. En otra realización, la unidad de almacenamiento de estiércol es una fosa de estiércol.

55 En otra realización más, la descripción se refiere a un método para alterar la composición de ácidos grasos volátiles en una unidad de almacenamiento de estiércol, que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un animal; medir la cantidad de ácidos grasos volátiles en el estiércol del animal al que se han suministrado las cepas

productoras de enzimas; y ajustar la concentración de la cepa productora de enzimas suministrada al animal para lograr una concentración de ácidos grasos volátiles deseada en el estiércol almacenado en la fosa de estiércol.

5 En otra realización más, la descripción se refiere a un método para alterar la composición de ácidos grasos volátiles en una unidad de almacenamiento de estiércol, que comprende poner en contacto una cepa productora de enzimas directamente con la unidad de almacenamiento de estiércol en una cantidad eficaz para alterar la composición de ácidos grasos en la unidad de almacenamiento de estiércol en comparación con una unidad de almacenamiento de estiércol sin una cepa productora de enzimas.

10 En otra realización, los ácidos grasos volátiles que se pueden alterar mediante los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a acetato, propionato, butirato, I-butilato, 4-metil-valerato. En otra realización, los métodos descritos en la presente memoria aumentan el ácido graso butirato en el estiércol. En otra realización más, los métodos descritos en la presente memoria disminuyen el ácido graso 4-metil-valerato en el estiércol.

En otra realización, se pueden alterar los ácidos grasos totales. En otra realización, los métodos descritos en la presente memoria reducen los ácidos grasos volátiles totales en el estiércol.

Métodos para alterar las emisiones de gases

15 En una realización, la descripción se refiere a un método para alterar las emisiones de gases que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un animal en una cantidad eficaz para alterar las emisiones de gases en comparación con un segundo animal al que no se le ha administrado una cepa productora de enzimas. En una realización, la alteración de las emisiones de gases puede dar como resultado un aumento en determinadas emisiones de gases y una disminución en otras emisiones de gases. En otra realización, la alteración de las emisiones de gases se puede producir de una forma directa o indirecta.

En una realización, las cepas productoras de enzimas para alterar las emisiones de gases comprenden una cepa de *Bacillus*. En una realización, la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis*. En otra realización, la cepa de *Bacillus* es *Bacillus pumilus*.

25 En otra realización, las cepas productoras de enzimas para alterar las emisiones de gases incluyen, pero no se limitan a *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, y *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944 y *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068.

30 La(s) cepa(s) productora(s) de enzimas para alterar las emisiones de gases se pueden administrar como una sola cepa, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas.

Los gases que se pueden alterar mediante las cepas productoras de enzimas incluyen, pero no se limitan a amoníaco, dióxido de carbono, metano y sulfuro de hidrógeno.

35 En otra realización, la descripción se refiere a un método para alterar las emisiones de gases en una sala que aloja un animal, que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un animal en una cantidad eficaz para alterar las emisiones de gases en la sala en comparación con una sala que aloja animales a los que no se les han administrado las cepas productoras de enzimas. En una realización, el animal es un cerdo. En otra realización, el recinto se encuentra en un establo. En una realización, se reducen las emisiones de metano y sulfuro de hidrógeno en la sala que aloja animales a los que se les han administrado las cepas productoras de enzimas.

40 En otra realización, la descripción se refiere a un método para alterar las emisiones de gases en una sala que aloja animales, que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un animal en una cantidad eficaz para alterar las emisiones de gases en la sala que aloja el animal; y medir la cantidad de gas en la sala.

45 En otra realización, la descripción se refiere a un método para alterar las emisiones de gases en una unidad de almacenamiento de estiércol, que comprende administrar una cepa productora de enzimas a un animal en una cantidad eficaz para alterar las emisiones de gases en la unidad de almacenamiento de estiércol en comparación con una unidad de almacenamiento de estiércol con un estiércol de animales a los que no se les han administrado las cepas productoras de enzimas. En una realización, el animal es un cerdo. En otra realización, la unidad de almacenamiento de estiércol es una fosa de estiércol.

50 En otra realización, la descripción se refiere a un método para alterar las emisiones de gases en una unidad de almacenamiento de estiércol, que comprende poner en contacto una cepa productora de enzimas directamente con la unidad de almacenamiento de estiércol en una cantidad eficaz para alterar las emisiones de gases en comparación con una unidad de almacenamiento de estiércol sin las cepas productoras de enzimas. En una realización, el animal es un cerdo. En otra realización, la unidad de almacenamiento de estiércol es una fosa de estiércol.

En una realización, se reducen las emisiones de gases metano y sulfuro de hidrógeno.

Métodos para aliviar la respuesta inflamatoria

También se describe en la presente memoria un método para aliviar los efectos inflamatorios en un animal, que comprende administrar una cepa productora de enzimas al animal en una cantidad eficaz para aliviar o inhibir la respuesta inflamatoria. En un ejemplo, el animal es un mamífero. En otro ejemplo, el animal es un ave de corral. En otro ejemplo, el animal es un pollo. En otro ejemplo más, el animal es un cerdo.

Las cepas productoras de enzimas pueden aliviar o inhibir la respuesta inflamatoria en 2-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, y más de 95% en comparación con un control de referencia (p. ej., un agente sin propiedades antiinflamatorias, tal como una solución salina tamponada o una cepa sin propiedades antiinflamatorias).

En un ejemplo, las cepas productoras de enzimas para aliviar los efectos inflamatorios en un animal comprenden una cepa de *Bacillus*. En un ejemplo, la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis*. En otro ejemplo, la cepa de *Bacillus* es *Bacillus pumilus*.

En otro ejemplo, las cepas productoras de enzimas para aliviar los efectos inflamatorios en un animal comprenden *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, y *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944 y *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068.

En otro ejemplo, las cepas productoras de enzimas para aliviar los efectos inflamatorios en un animal son una composición que comprende *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 y *Bacillus subtilis* AGTP 944.

Las cepas productoras de enzimas pueden aliviar o inhibir la respuesta inflamatoria reduciendo la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria. En un ejemplo, las cepas productoras de enzimas pueden reducir la expresión de un gen en 2-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95% y más de 95% en comparación con un control de referencia (p. ej., un agente sin propiedades antiinflamatorias, tal como una solución salina tamponada o una cepa sin propiedades antiinflamatorias).

En otro ejemplo, las cepas productoras de enzimas pueden aliviar o inhibir la respuesta inflamatoria reduciendo la expresión de una proteína implicada en la respuesta inflamatoria.

En otro ejemplo más, las cepas productoras de enzimas pueden aliviar o inhibir la respuesta inflamatoria reduciendo la actividad de una proteína implicada en la respuesta inflamatoria.

En otro ejemplo, las cepas productoras de enzimas pueden reducir la expresión o actividad de una proteína en 2-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95% y más de 95% en comparación con un control de referencia (p. ej., un agente sin propiedades antiinflamatorias, tal como una solución salina tamponada o una cepa sin propiedades antiinflamatorias).

En otro ejemplo, las cepas productoras de enzimas pueden reducir la expresión de un gen o reducir la actividad de una proteína implicados en cualquier ruta implicada en la respuesta inflamatoria incluyendo, pero sin limitar migración por adhesión y extravasación; señalización de apoptosis; señalización de calcio; cascada de complementos; citoquinas y señalización de citoquinas; síntesis y señalización de eicosanoides; señalización de glucocorticoides/PPAR; señalización del receptor acoplado a proteína G; detección de patógenos innatos; señalización leucocitaria; señalización de MAPK; señalización de linfocitos citolíticos naturales; señalización de NK-kappa B; presentación de antígenos; señalización de PI3K/AKT; ROS/glutación/gránulos citotóxicos; y superfamilia y señalización de TNF.

En un ejemplo, las cepas productoras de enzimas pueden reducir la actividad o expresión de citoquinas que incluyen, pero no se limitan a interleuquinas, interferones, factor de necrosis tumoral, eritropoyetina, Tpo, Fit-3L, SCF, M-CSF y MSP.

En un ejemplo, las interleuquinas incluyen, pero no se limitan a interleuquina (IL) -1, IL-1 α , similar a IL-1, IL- β , IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, similar a IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, similar a IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, GM-CSF y OSM.

En otro ejemplo, los interferones incluyen, pero no se limitan a IFN- α , IFN- β e IFN-gamma.

En otro ejemplo, el factor de necrosis tumoral incluye, pero no se limitan a CD154, LT- β , TNF- α , TNF- β , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK y TRANCE.

En otro ejemplo, las cepas productoras de enzimas se pueden usar para reducir la actividad o reducir la expresión de quimioquinas que incluyen, pero no se limitan a quimioquinas C, quimioquinas CC, quimioquinas CXC y quimioquinas CXC3.

En un ejemplo, las quimioquinas C incluyen, pero no se limitan a XCL1 y XCL2.

- 5 En otro ejemplo, las quimioquinas CC incluyen, pero no se limitan a CCL1, CCL 2, CCL 3, CCL 4, CCL 5, CCL 6, CCL 7, CCL 8, CCL 9, CCL 10, CCL 11, CCL 12, CCL 13, CCL 14, CCL 15, CCL 16, CCL 17, CCL 18, CCL 19, CCL 20, CCL 21, CCL 22, CCL 23, CCL 24, CCL 25, CCL 26, CCL 27 y CCL 28.

En otro ejemplo, las quimioquinas CXC incluyen, pero no se limitan a CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13 y CXCL14.

- 10 La(s) cepa(s) productora(s) de enzimas que están previstas para aliviar una respuesta inflamatoria se pueden administrar como una sola cepa, una o más combinaciones de las cepas, uno o más líquidos sobrenadantes de un cultivo de la(s) cepa(s), pienso que incluye una o más cepas o sus mezclas.

Las cepas, métodos y composiciones descritos en la presente memoria se pueden describir mejor mediante los apartados numerados.

- 15 1. Una cepa de *Bacillus* aislada que tiene actividad enzimática.

2. La cepa del apartado 1, en donde la actividad enzimática se selecciona del grupo que consiste en actividad de celulasa, actividad de α -amilasa, actividad de xilanasa, esterasa, β -manasa, actividad de lipasa, actividad de proteasa y sus combinaciones.

- 20 3. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la actividad enzimática se selecciona del grupo que consiste en actividad de zeína y actividad de proteasa de soja, y sus combinaciones.

4. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa se administra a un animal, la cepa proporciona una mejora no terapéutica en al menos uno de la descomposición de componentes complejos de la dieta, problemas de residuos del estiércol, eficacia de la producción porcina, características de la canal y productividad del cerdo cuando se alimenta con niveles altos de DDGS en comparación con un animal de control.

- 25 5. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa se administra a un animal, la cepa proporciona una mejora no terapéutica en al menos uno de la descomposición de componentes complejos de la dieta, problemas de residuos del estiércol, eficacia de la producción porcina, características de la canal y productividad del cerdo cuando se alimenta con niveles altos de DDGS en al menos 2% en comparación con un animal de control.

- 30 6. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa se administra a un animal, la cepa proporciona una mejora no terapéutica en al menos uno los siguientes: peso corporal, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, índice de conversión, características de la canal, digestibilidad de nutrientes y problemas de residuos del estiércol en comparación con un animal de control.

- 35 7. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa se administra a un animal, la cepa proporciona una mejora no terapéutica en al menos uno los siguientes: peso corporal, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, índice de conversión, características de la canal, digestibilidad de nutrientes y problemas de residuos del estiércol, en al menos 2% en comparación con un animal de control.

- 40 8. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa se selecciona del grupo que consiste en las especies *B. subtilis* y *B. pumilus*, cepas que tienen todas las características de las mismas, cualquiera de sus derivados o variantes, y sus mezclas.

- 45 9. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la(s) cepa(s) se selecciona(n) del grupo que consiste en *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544), *Bacillus subtilis* AGTP 944 (NRRL B-50548), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 (NRRL B-50543), y *Bacillus pumilus* KX11-1 (NRRL B-50546), y cepas que tienen todas las características de las mismas, cualquiera de sus derivados o variantes, y sus mezclas.

- 50 10. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la(s) cepa(s) se selecciona(n) del grupo que consiste en *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544), *Bacillus subtilis* AGTP 944 (NRRL B-50548), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 (NRRL B-50543), y *Bacillus pumilus* KX11-1 (NRRL B-50546), cualquiera de sus derivados o variantes, y sus mezclas.

11. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510).
12. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (NRRL B-50542).
- 5 13. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545).
14. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508).
- 10 15. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509).
16. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS 1068 (NRRL B-50543).
17. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544).
- 15 18. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP 944 (NRRL B-50548).
19. La cepa de cualquiera de los apartados precedentes, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus pumilus* KX11-1 (NRRL B- 50546).
- 20 20. Una composición que comprende líquido sobrenadante de uno o más cultivos de una o más cepas según uno cualquiera de los apartados 1-19, y sus mezclas.
21. Una composición que comprende una o más cepas según uno cualquiera de los apartados 1-19, y sus mezclas.
22. La composición de los apartados 20 o 21, en donde las cepas son *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), y *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509).
- 25 23. La composición de los apartados 20 o 21, en donde las cepas son *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS944 (NRRL B-50509), y *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509).
24. Un pienso para un animal, en donde el pienso está complementado con la(s) cepa(s) aislada(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19 o con la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23 o sus mezclas.
- 30 25. Un método no terapéutico que comprende la etapa de administrar a un animal una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19 o la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, en donde la administración descompone enzimáticamente al menos uno de fibras, proteínas, hidratos de carbono y lípidos en una dieta suministrada al animal cuando se suministran niveles altos de DDGS al animal.
- 35 26. Un método no terapéutico que comprende la etapa de administrar a un animal una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, en donde la administración mejora al menos uno de la descomposición de componentes complejos de la dieta, problemas de residuos del estiércol, la eficacia de la producción porcina, características de la canal y rendimiento del cerdo.
- 40 27. Un método no terapéutico que comprende la etapa de administrar a un animal una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, en donde la administración mejora al menos uno de los siguientes, peso corporal, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, índice de conversión, características de la canal, digestibilidad de nutrientes y problemas de residuos del estiércol, en comparación con un animal de control.
- 45 28. Un método no terapéutico que comprende la etapa de administrar a aves de corral una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, en donde la administración mejora al menos uno de los siguientes, peso corporal, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, índice de conversión, características de la canal, digestibilidad de nutrientes y problemas de residuos del estiércol, en comparación con un animal de control.
- 50

29. Un método no terapéutico que comprende la etapa de administrar a un cerdo una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, en donde la administración mejora al menos uno de los siguientes, peso corporal, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, índice de conversión, características de la canal, digestibilidad de nutrientes y problemas de residuos del estiércol, en comparación con un animal de control.
30. El método no terapéutico de los apartados 25-29, en donde la composición es la composición del apartado 22 o 23.
31. El método no terapéutico de uno cualquiera de los apartados 25-30, en donde la(s) cepa(s) se administra(n) de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{11} UFC/animal/día.
32. El método no terapéutico de uno cualquiera de los apartados 25-27, y 29-31, en donde el animal es un cerdo.
33. El método no terapéutico de uno cualquiera de los apartados 25-32, en donde el animal se alimenta con niveles altos de granos secos de destilería con solubles (DDGS).
34. El método no terapéutico de uno cualquiera de los apartados 25-33, en donde al animal se alimenta con granos secos de destilería con solubles (DDGS) en una proporción de más de 10% de la dieta del animal.
35. El método no terapéutico de uno cualquiera de los apartados 25-34, en donde al animal se alimenta con granos secos de destilería con solubles (DDGS) en una proporción de más de 30% de la dieta del animal.
36. Un método no terapéutico que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19 o la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23 a unidad de almacenamiento de estiércol porcino.
37. El método no terapéutico del apartado 36, en donde la unidad de almacenamiento de estiércol porcino es una fosa de estiércol.
38. El método no terapéutico del apartado 36 o 37, que además comprende mejorar al menos uno de los siguientes: menos incidencia de formación de espuma, menos acumulación de sólidos y menos nitrógeno, azufre, fósforo, nitrógeno unido a fibra, proteínas totales, grasa y contenido de fibra, en comparación con una fosa de estiércol de control.
39. Un método de formación de una composición, comprendiendo el método: (a) cultivar, en un caldo líquido, un cultivo que incluye una de la(s) cepa(s) aislada(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19; y (b) separar la cepa del caldo líquido.
40. El método del apartado 39, que además comprende liofilizar la cepa aislada y añadir la cepa liofilizada a un vehículo.
41. El método del apartado 39 o 40, que además comprende retener el caldo líquido después de haber separado la cepa del mismo, para generar un líquido sobrenadante.
42. Un método no terapéutico para mejorar el rendimiento productivo de un animal, que comprende administrar a un animal una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, en comparación con un animal de control.
43. El método no terapéutico del apartado 42, en donde la administración mejora al menos uno de los siguientes, peso corporal, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, índice de conversión, características de la canal, digestibilidad de nutrientes y problemas de residuos del estiércol.
44. Un método no terapéutico para mejorar las unidades de almacenamiento de estiércol, que comprende administrar a un animal una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, en una cantidad eficaz para mejorar la unidad de almacenamiento de estiércol en comparación con el estiércol de un animal de control, que se almacena en una segunda unidad de almacenamiento de estiércol.
45. Un método no terapéutico para mejorar las unidades de almacenamiento de estiércol, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, directamente con la unidad de almacenamiento de estiércol.
46. El método no terapéutico de los apartados 44 o 45, en donde las mejoras incluyen al menos una de los siguientes: menos incidencia de formación de espuma, menos acumulación de sólidos y menos nitrógeno, azufre, fósforo, nitrógeno unido a fibra, proteínas totales, grasa y contenido de fibra, que fosas de estiércol de control.

47. Un método no terapéutico para control o reducir la espuma en una fosa de estiércol, que comprende administrar una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, a animales cuyo estiércol se almacena en la fosa de estiércol.
- 5 48. Un método no terapéutico para controlar o reducir la espuma en una fosa de estiércol, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, directamente con la fosa de estiércol.
- 10 49. Un método no terapéutico para alterar la ecología microbiana en una fosa de estiércol, que comprende administrar una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, a animales cuyo estiércol se almacena en la fosa de estiércol.
- 15 50. Un método no terapéutico para alterar la ecología microbiana en una fosa de estiércol, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, directamente con la fosa de estiércol.
- 20 51. Un método no terapéutico para alterar la composición de ácidos grasos en una fosa de estiércol, que comprende administrar una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, a animales cuyo estiércol se almacena en la fosa de estiércol.
- 25 52. Un método no terapéutico para alterar la composición de ácidos grasos volátiles en una fosa de estiércol, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, directamente con la fosa de estiércol.
- 30 53. Un método no terapéutico para alterar las emisiones de gas en una sala que aloja un animal, que comprende administrar una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, a animales en una cantidad eficaz para reducir las emisiones de gas.
- 35 54. Un método no terapéutico para alterar las emisiones de gases en una unidad de almacenamiento de estiércol, que comprende administrar una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, a animales en una cantidad eficaz para reducir las emisiones de gases.
- 40 55. Un método para alterar las emisiones de gases en una unidad de almacenamiento de estiércol, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz de la(s) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, directamente con la unidad de almacenamiento de estiércol en una cantidad eficaz para reducir las emisiones de gases.
- 45 56. En una realización no reivindicada, una(las) cepa(s) según uno cualquiera de los apartados 1-19, la(s) composición(es) según uno cualquiera de los apartados 20-23, el pienso según el apartado 24 o sus mezclas, para usar en un método para aliviar una respuesta inflamatoria en animales mediante la administración de una cantidad eficaz para aliviar la respuesta inflamatoria.
- 50 57. Una cepa aislada según los apartados 1-19 o composición según los apartados 20-23 o un pienso según el apartado 24, para usar como un medicamento para mejorar al menos uno de la descomposición de componentes complejos de la dieta, problemas de residuos del estiércol, la eficacia de la producción porcina, características de la canal, y rendimiento del cerdo cuando se alimenta con niveles altos de DDGS.
58. Uso de la cepa aislada según los apartados 1-19 o composición según los apartados 20-23 o un pienso según el apartado 24, en la preparación de un medicamento para proporcionar una o más enzimas.
60. Una cepa aislada de *Bacillus* descrita en los apartados 1-19, para usar en la mejora de la descomposición de componentes complejos de la dieta, problemas de residuos del estiércol, la eficacia de la producción porcina, características de la canal, y rendimiento del cerdo cuando se alimenta con niveles altos de DDGS.
61. Uso de una cepa de *Bacillus* descrita en los apartados 1-19, en la preparación de un medicamento para proporcionar actividad enzimática.
62. Uso de la cepa aislada de *Bacillus* descrita en los apartados 1-19, en la preparación de un medicamento para mejorar al menos uno de la descomposición de componentes complejos de la dieta, problemas de residuos del

estiércol, la eficacia de la producción porcina, características de la canal, y rendimiento del cerdo cuando se alimenta con niveles altos de DDGS.

Ejemplos

5 Los siguientes ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos. Los ejemplos se incluyen en la presente memoria solo para ayudar a una comprensión más completa de la presente invención descrita. Los ejemplos no limitan el alcance de la invención descrita o reivindicada en la presente memoria de ninguna forma.

Ejemplo 1

Aislamiento de bacterias ambientales e identificación de actividades enzimáticas.

10 Se recogieron muestras de residuos agrícolas y ambientales de diversas localizaciones de fuentes a lo largo de un periodo de varios años. Tras la llegada, todas las muestras se diluyeron en una solución de peptona al 1%, se trataron con esporas durante 35 minutos a 65°C y se hicieron diluciones seriadas en placas de agar de soja tríptico (BD Difco, Franklin Lakes, NJ). Después de incubación a 32°C durante 48 h, los cultivos de diversas colonias ambientales desconocidas se cultivaron de la placa en caldo de soja tríptico (TSB), se volvieron a incubar de forma similar y se almacenaron a -85°C para el análisis posterior.

15 Se recogieron aproximadamente 4000 supuestos aislados de *Bacillus* de origen ambiental y se cribaron según su capacidad para degradar una variedad de sustratos de interés. Los cultivos ambientales se cogieron de depósitos del congelador de la biblioteca y se incubaron en 0,5 ml de TSB a 32°C durante 24 horas en una incubadora con agitación orbital, con ajuste de la velocidad a 130 (Gyromax 737R). El cribado de alta productividad de estas cepas de ensayo se llevó a cabo por cultivo en mancha por duplicado de 2 microlitros de cultivo líquido en 15,0 ml de diferentes tipos de medios de sustratos de interés en placas con rejilla de 100x100x15 mm. Las actividades de celulasa, α-amilasa, zeínasa, proteasa de soja, esterasa, lipasa y xilanasas se determinaron basándose en el uso de sustrato específico por las cepas individuales. Los componentes de los medios usados para ensayar las propiedades de uso de sustratos de la actividad enzimática de las cepas de origen ambiental, se describen en la tabla 1. Las placas de ensayo se dejaron secar durante 30 minutos después de la aplicación del cultivo, y después se incubaron a 32°C durante 24 horas. Las actividades enzimáticas para cada cepa se determinaron midiendo la zona de degradación del sustrato en milímetros, como indica la transparencia del borde alrededor del crecimiento de la colonia. Se registraron los valores medios de las placas por duplicado.

20 Se seleccionaron nueve cepas de las aproximadamente 4000 cribadas como candidatas a cepas microbianas de alimentación directa que demostraban una variedad de actividades de sustratos que representaban el 10% superior y el 2% superior de las actividades enzimáticas de todas las cepas cribadas (tabla 2). Basándose en su capacidad para usar o degradar una serie de sustratos relevantes asociados con la inclusión de DDG en los piensos, se seleccionaron nueve aislados como candidatos para uno o más productos microbianos de alimentación directa (DFM). Se determinaron los perfiles de PCR de RAPD y secuencias parciales de ADNr 16S de cada cepa. La determinación de género y presunta especie de cada una se hizo por amplificación del ADNr 16S usando un conjunto de cebadores 8F y 1541R. Los productos de la PCR purificados se secuenciaron desde los extremos tanto directos como inversos, y se generó una secuencia contigua usando un programa de ensamblaje CAP3. Las nueve cepas seleccionadas son: *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (Figuras 1 y 2), *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (Figuras 3 y 4), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (Figuras 5 y 6), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (Figuras 7 y 8), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (Figuras 9 y 10), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 (Figuras 11 y 12), *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (Figuras 13 y 14), *Bacillus subtilis* AGTP 944, (Figuras 15-18), y *Bacillus pumilus* KX11-1 (Figuras 19-21).

Tabla 1 - Componentes de los medios usados para ensayar las actividades enzimáticas ilustradas por las propiedades de uso de sustratos de bacilos de origen ambiental.

Ensayo en placa	Composición del medio	Requisitos de visualización extra
α-Amilasa	Agar nutritivo, 2% de almidón de maíz	Solución de tinción de yodo al 0,05%
Proteasa de soja	Agar nutritivo, 2% de proteína de soja purificada	Ninguno; medir la zona de transparencia en medio opaco
Celulasa	0,1% de sulfato amónico, 0,1% de fosfato potásico dibásico, 0,1% de extracto de levadura, 1,0% de polipeptona, 1,5% de agar, 0,75% de carboximetilcelulosa (CMC).	30 minutos tinción con colorante rojo Congo al 0,05%, seguido de lavado con NaCl 1 M
Esterasa/Lipasa	1,0% de polipeptona, 1,5% de agar, 0,5% de extracto de levadura, 1,5% de Tween 80, 1,5% de tributirina, 0,01% de colorante azul Victoria B (filtrado).	Ninguno; Medir la zona de transparencia en medio opaco

Ensayo en placa	Composición del medio	Requisitos de visualización extra
Zeinasa	Agar nutritivo, 2% de zeína purificada, solubilizada en metanol al 70%	Ninguno; Medir la zona de transparencia en medio opaco
Xilanasa	Agar nutritivo, 2% de xilano	Ninguno; Medir la zona de transparencia en medio opaco

Tabla 2. Resumen de la actividad enzimática de cepas candidatas a productos microbianos de alimentación directa.^a

Número de aislado ^b	CMCasa (Celulasa)	Esterasa	Amilasa de almidón de maíz	Proteasa de soja	Proteasa de zeína	Xilanasa
BS442	1,67	3,92 ¹	0,92	2,00	3,00	2,50
BS521	7,00 ¹	2,00 ²	1,00	1,75	3,69 ²	4,00
BS918	3,25	3,25 ¹	0,50	4,00 ¹	5,00 ¹	5,50
BS1013	6,50 ¹	2,00 ²	2,50 ²	2,75 ²	4,38 ²	4,00
BP1068	3,00	0,50	4,00 ¹	4,00 ¹	4,25 ²	6,00
BS1069	4,00 ²	0,50	2,00 ²	4,00 ¹	5,00 ¹	4,00
BS9444	6,5	2,25	3,25	0,50	4,50	3,5
KX11-1**	2,5	---	---	2,00	---	5
BS3BP5	3,25	2,582	2,00 ²	1,50	4,00 ¹	3,00

^a Los valores representan la zona de degradación del sustrato en milímetros (mm), indicada por la transparencia del borde que rodea el crecimiento de la colonia para cada cepa.

^b Designaciones para la cepa aislada, BS=*Bacillus subtilis*; BP=*Bacillus pumilus*.

1 Los valores representan el 2% superior de la actividad enzimática en la clase específica de las 4000 cepas cribadas.

2 Los valores representan el 10% superior de la actividad enzimática en la clase específica de las 4000 cepas cribadas,

** Cepa que no está dentro del alcance de la presente invención reivindicada.

Ejemplo 2

Comparación de la actividad enzimática de nuevas cepas de *Bacillus* y el producto microbiano de alimentación directa comercial de tres cepas de *Bacillus* Microsource® S.

- 5 Las tres cepas de *Bacillus* de Microsource® S (*B. subtilis* 27 (BS 27), *B. licheniformis* (que previamente se pensaba que era *B. amyloliquefaciens*) 842, y *B. licheniformis* 21 (BI 21)) se cogieron de depósitos individuales del congelador de la biblioteca y se incubaron en 0,5 ml de TSB a 32°C durante 24 horas en una incubadora con agitación orbital, con ajuste de la velocidad a 130 (Gyromax 737R). El cribado de alta productividad de estas cepas del producto se
- 10 llevó a cabo por cultivo en mancha por duplicado de 2 microlitros de cultivo líquido en 15,0 ml de diferentes tipos de medios de sustratos de interés en placas con rejilla de 100x100x15 mm. Las actividades de celulasa, proteasa de soja y esterasa/lipasa se determinaron basándose en el uso específico de sustratos por las cepas individuales. Los componentes de los medios usados para ensayar las propiedades de uso de sustratos de la actividad enzimática de las cepas derivadas de origen ambiental, se describen en la tabla 3. Las placas de ensayo se dejaron secar durante
- 15 30 minutos después de la aplicación del cultivo, y después se incubaron a 32°C durante 24 horas. Las actividades enzimáticas para cada cepa se determinaron midiendo la zona de degradación del sustrato en milímetros, indicada por la transparencia del borde alrededor del crecimiento de la colonia. Los valores medios de las placas por duplicado se registraron y se compararon con los valores obtenidos de las cepas nuevas de *Bacillus* identificadas en el ejemplo 1 (tabla 4). Solo una cepa de las tres cepas de *Bacillus* de Microsource® S demostró alguna actividad enzimática cuando se compararon con las nuevas cepas de *Bacillus* seleccionadas por su actividad de degradación
- 20 de sustratos; esto se ilustró mediante la actividad de la proteasa de soja de la cepa de *Bacillus subtilis* BS27 de Microsource® S.

Tabla 3 - Componentes de los medios usados para ensayar las actividades enzimáticas ilustradas por las propiedades de uso de sustratos de bacilos de origen ambiental

Ensayo en placa	Composición del medio	Requisitos de visualización extra
Proteasa de soja	Agar nutritivo, 2% de proteína de soja purificada	Ninguno; Medir la zona de transparencia en medio opaco
Celulasa	0,1% de sulfato amónico, 0,1% de fosfato potásico dibásico, 0,1% de extracto de levadura, 1,0% de polipeptona, 1,5% de agar, 0,75% de carboximetilcelulosa (CMC).	30 minutos tinción con colorante rojo Congo al 0,05%, seguido de lavado con NaCl 1 M
Esterasa/Lipasa	1,0% de polipeptona, 1,5% de agar, 0,5% de extracto de levadura, 1,5% de Tween 80, 1,5% de tributirina, 0,01% de colorante azul Victoria B (filtrado).	Ninguno; Medir la zona de transparencia en medio opaco

Tabla 4. Actividad enzimática de las cepas del producto de *Bacillus* de Microsource® S en comparación con las nuevas cepas de *Bacillus* seleccionadas por la mejor degradación del sustrato.^a

Nombre del aislado	CMCasa (Celulasa)	Esterasa	Proteasa de soja
Cepas del producto MicroSource® S			
BS27	0,00	0,60	2,50 ²
BL21	0,30	0,50	0,80
BL842	0,00	0,30	0,00
BS3BP5	3,25	2,58 ²	1,50
BS442	1,67	3,921	2,00
BS521	7,00 ¹	2,002	1,75
BS918	3,25	3,251	4,00 ¹
BS1013	6,50 ¹	2,00 ²	2,75 ²
BP1068	3,00	0,50	4,00 ¹
BS1069	4,00 ²	0,50	4,00 ¹
^a Los valores representan la zona de degradación del sustrato en milímetros (mm), indicado por la transparencia del borde que rodea el crecimiento de la colonia para cada cepa. 1 Los valores representan el 2% superior de la actividad enzimática en la clase específica de las 4000 cepas cribadas. 2 Los valores representan el 10% superior de la actividad enzimática en la clase específica de las 4000 cepas cribadas.			

5 Ejemplo 3

Ensayo de alimentación animal que demuestra mejor rendimiento productivo en respuesta a la cepa de *Bacillus subtilis* 3BP5 añadida a dietas de cerdo.

Se llevó a cabo un ensayo de alimentación de cerdos para evaluar los efectos de un aditivo de pienso microbiano de alimentación directa (DFM) basado en *Bacillus* en la ganancia de peso corporal, consumo de pienso e índice de conversión de los cerdos en fase de crecimiento-finalización. Aproximadamente 180 cerdos (Monsanto Choice Genetics GPK 35 hembras emparejadas con EB Ultra sires) se distribuyeron en tres bloques de peso por el peso corporal inicial y se encerraron en grupos de 5 cerdos/corral al completar el periodo de destete. Los cerdos se movieron a una instalación de destete a finalización, y se alojaron 5 cerdos/corral en corrales totalmente emparrillados (1,52 m x 3,05 m) equipados con un comedero de un solo agujero y bebederos con copa de destete a finalización. La temperatura ambiente mínima inicial se mantuvo a aproximadamente 25,6°C (78°F). Durante la fase de finalización, la temperatura mínima se redujo más a 21,1°C (70°F). El pienso y el agua estaban disponibles sin restricciones a lo largo del estudio.

Se asignó uno de dos tratamientos dietéticos a cada corral (18 corrales/tratamiento) dentro de cada bloque, y se administraron durante la fase 1 (22,7 a 40,8 kg (50 a 90 libras)), fase 2 (40,8 a 59,0 kg (90 a 130 libras)), fase 3 (59,0

5 a 81,6 kg (130 a 180 libras)), fase 4 (81,6 a 104,3 kg (180 a 230 libras)) y fase 5 (104,3 kg (230 libras) hasta
 10 comercialización a aproximadamente 122,5 kg (270 libras)). Los dos tratamientos dietéticos consistían en una dieta
 de control base que carecía de DFM 3BP5 y la dieta base con DFM 3BP5 en un estudio de cerdos de cinco fases de
 crecimiento- finalización. Las dietas se formularon para cumplir o superar los requisitos de NRC (1988) y consistían
 predominantemente en maíz, harina de soja y DDGS en cantidad de 47%, 18,6% y 30% de la dieta,
 respectivamente. Se añadió la cepa de *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 a la dieta en la cantidad de $7,3 \times 10^7$ UFC/kg
 de pienso y se suministraron aproximadamente 1×10^8 UFC/cabeza/día basado en el consumo medio diario de
 pienso (CMDP). Los datos recogidos eran ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso y pienso
 requerido por unidad de ganancia durante cada una de las cinco fases de crecimiento-finalización. Los cerdos se
 retiraron del estudio cuando el peso medio de los cerdos de todo el establo había alcanzado aproximadamente
 122,5 kg (270 libras).

Se analizaron los datos de rendimiento como un diseño de bloques completamente aleatorizado con el corral como
 la unidad experimental y bloques basados en el peso corporal inicial. Se llevó a cabo el análisis de varianza usando
 los procedimientos de GLM de SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

15 Los cerdos alimentados con dietas que contenían la cepa de *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 tenían mayor ganancia
 media diaria ($P < 0,01$) (GMD) y ganancia:pienso durante el periodo de crecimiento de la fase 1 y tenían tendencia
 ($P < 0,08$) a tener mayor GMD y ganancia:pienso en los periodos de fase 1 y fase 2 combinados en comparación
 con cerdos alimentados con la dieta de control (tabla 5). El aumento de la GMD durante el primero periodo de
 20 crecimiento dio como resultado que los cerdos alimentados con la cepa de *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 tenían
 mayor peso corporal ($P < 0,01$) al final del periodo de la fase 1 en comparación con cerdos alimentados con la dieta
 de control.

Tabla 5. Respuestas del rendimiento productivo de cerdos alimentados con *Bacillus subtilis* AGTP 3BP5 en
 comparación con cerdos alimentados con dietas de control.

Característica	Tratamiento		EE ¹	Valor de p
	Control	3BP5		
GMD, g				
Fase 1	704	766	10	< 0,01
Fase 2	1020	1017	19	0,92
Fase 1-2	861	890	11	0,08
Fase 3	1114	1103	18	0,68
Fase 1-3	942	958	8	0,15
Fase 4	983	959	28	0,55
Fase 1-4	952	958	9	0,67
Fase 5	881	858	19	0,39
Fase 1-5	939	939	8	0,97
CMDP, kg				
Fase 1	1,571	1,604	0,028	0,42
Fase 2	2,591	2,562	0,042	0,64
Fase 1-2	2,074	2,077	0,032	0,95
Fase 3	3,331	3,291	0,033	0,41
Fase 1-3	2,475	2,464	0,029	0,80
Fase 4	3,120	3,130	0,055	0,90
Fase 1-4	2,640	2,647	0,032	0,94
Fase 5	3,503	3,426	0,049	0,28
Fase 1-5	2,801	2,788	0,032	0,78

Ganancia:pienso				
Fase 1	0,445	0,477	0,008	< 0,01
Fase 2	0,393	0,396	0,006	0,67
Fase 1-2	0,413	0,428	0,005	0,07
Fase 3	0,333	0,336	0,007	0,75
Fase 1-3	0,379	0,388	0,005	0,14
Fase 4	0,314	0,306	0,005	0,30
Fase 1-4	0,359	0,363	0,003	0,32
Fase 5	0,252	0,250	0,005	0,77
Fase 1-5	0,334	0,337	0,002	0,45
Peso, kg				
Inicial	24,85	24,71	0,04	0,02
Fase 1	39,63	40,80	0,22	< 0,01
Fase 2	61,07	62,14	0,49	0,13
Fase 3	83,40	84,21	0,56	0,31
Fase 4	105,04	105,30	0,86	0,83
Fase 5	123,04	122,46	0,88	0,65
¹ EE = Error estándar				

Ejemplo 4

Ensayo de equilibrio de masas de alimentación animal y fosa de estiércol que demuestra los efectos de una combinación de cepas de *Bacillus subtilis* añadida a dietas de cerdos.

5 Se llevó a cabo un ensayo de alimentación de cerdos para evaluar los efectos de un producto microbiano de alimentación directa (DFM) basado en *Bacillus* administrado en la dieta de cerdos en crecimiento- finalización, en las respuestas del rendimiento productivo (ganancia media diaria (GMD), consumo medio diario de pienso (CMDP), y ganancia:pienso), rendimiento de la canal y mediciones de calidad, composición de nutrientes del estiércol, composición microbiana de la fosa de estiércol y emisiones de gases (amoníaco, metano y sulfuro de hidrógeno) de la fosa de estiércol. Un total de 720 cerdos (genotipo Yorkshire-Landrace x Duroc) se alojaron en 12 salas con 12 corrales/sala y 5 cerdos/corral. Cada sala contenía dos fosas de estiércol con capacidad para almacenar el estiércol de un periodo entero de destete a finalización. Cada fosa de estiércol está situada bajo 6 corrales con una pared bajo el pasillo central que divide las dos fosas en cada sala. Cada una de las doce salas estaba equipada para la vigilancia de las emisiones de gases de cada sala independientemente ventilada. Los cerdos se destetaron y se pusieron en corrales antes del inicio del estudio y comenzaron a recibir el pienso de ensayo experimental cuando habían alcanzado un peso corporal medio de 29,5 kg. Los cerdos se alimentaron durante cinco fases de alimentación que duraban tres semanas cada una y terminaron cuando los cerdos habían alcanzado un peso medio de sacrificio de 120 kg.

20 Se administraron dos tratamientos dietéticos a los cerdos en el ensayo, que consistían en una dieta de control y una dieta complementada con una combinación de cepas de *Bacillus* (cepas BS1013, BS918 y BS3BP5). Las dietas se formularon para cumplir o superar los requisitos de NRC (1988) y consistían predominantemente en maíz, harina de soja y DDGS en cantidad de 50%, 20% y 30% de la dieta, respectivamente. Las tres cepas en el DFM de combinación de *Bacillus* estaban representados por igual en el material de ensayo experimental que contenía $1,47 \times 10^8$ UFC del DFM por gramo de material. Se añadió el DFM combinación de *Bacillus* a la dieta en la cantidad de $7,3 \times 10^7$ UFC/kg de pienso y se suministraron aproximadamente 1×10^8 UFC/cabeza/día basado en el consumo medio diario de pienso.

30 Las mediciones de rendimiento del cerdo (ganancia media diaria (GMD), consumo medio diario de pienso (CMDP), ganancia:pienso) se determinaron al final de cada fase de alimentación. Estos datos eran representación de 72 repeticiones/tratamiento. Se tomaron muestras al vacío de las fosas de estiércol la semana 0 (inicialmente y antes de que los cerdos recibieran tratamiento), la semana 9 y la semana 15 y se realizó un análisis próximo de los nutrientes contenidos en el residuo de estiércol porcino (12 repeticiones/tratamiento). También se obtuvo una submuestra cada día para determinar el contenido de ácidos grasos volátiles y el análisis de comunidad microbiana

(12 repeticiones/tratamiento). Además, en la toma de muestra de la semana 15 al final del ensayo, las fosas se vaciaron en un contenedor de mezcla para homogeneizar el contenido entero de la fosa de estiércol, determinar el volumen de la fosa de estiércol y tomar muestras para el análisis de nutrientes. Se midieron las emisiones de gases en cada sala para determinar la producción de gases amoníaco, metano y sulfuro de hidrógeno (6 repeticiones/tratamiento). Al final del estudio, los cerdos se enviaron a una instalación de sacrificio comercial y se recogieron los datos de la canal tales como el porcentaje de rendimiento magro, porcentaje de canal e índice de yodo (72 repeticiones/tratamiento).

En relación ahora con la tabla 6, los datos de rendimiento preliminares del estudio indican que los cerdos alimentados con el DFM combinación de *Bacillus* tenían mayor ($P \leq 0,05$) GMD y ganancia:pienso durante la última fase del ensayo. Además, los cerdos alimentados con el DFM tenían tendencia ($P = 0,15$) a ganar 2,0 kg (4,4 lb) más al final del ensayo que los cerdos alimentados con la dieta de control. El análisis de datos sobre las características de la canal, nutrientes del estiércol y composición microbiana, y las emisiones de gases de las unidades de almacenamiento de estiércol, que incluyen, pero no se limitan a fosas de estiércol aún no se han completado, pero las expectativas son que el tratamiento con DFM aumentará el porcentaje de rendimiento magro y el porcentaje de canal, disminuirá los valores de yodo en la grasa, producirá menos nutrientes acumulados en el estiércol, cambiará las comunidades microbianas del estiércol a poblaciones favorables para la descomposición de sólidos y disminuirá las emisiones de gases amoníaco, metano y sulfuro de hidrógeno.

Tabla 6. Efecto de un DFM combinación de tres cepas de *Bacillus* administrado como un complemento dietético en las respuestas del rendimiento productivo de cerdos en crecimiento-finalización en comparación con cerdos alimentados con una dieta de control.*

ítem	Dieta		EEM ¹	Valor P
	CTL	DFM		
GMD, kg (lb)				
Fase 1 (sem. 1-3)	0,82 (1,81)	0,83 (1,82)	0,104	0,71
Fase 2 (sem. 3-6)	0,76 (1,67)	0,77 (1,7)	0,165	0,51
Fase 3 (sem. 6-9)	0,88 (1,93)	0,88 (1,95)	0,127	0,58
Fase 4 (sem. 9-12)	0,90 (1,98)	0,91 (2,01)	0,172	0,64
Fase 5 (sem.12-15)	0,85 (1,88)	0,9 (1,99)	0,190	0,054
CMDP, kg (lb),				
Fase 1 (sem. 1-3)	1,68 (3,71)	1,68 (3,7)	0,230	0,87
Fase 2 (sem. 3-6)	2,09 (4,61)	2,07 (4,56)	0,385	0,65
Fase 3 (sem. 6-9)	2,61 (5,75)	2,61 (5,75)	0,391	0,95
Fase 4 (sem. 9-12)	2,96 (6,52)	2,98 (6,58)	0,506	0,64
Fase 5 (sem. 12-15)	3,03 (6,68)	3,04 (6,71)	0,611	0,87
Ganancia:pienso				
Fase 1 (sem. 1-3)	0,493	0,495	0,023	0,742
Fase 2 (sem. 3-6)	0,362	0,378	0,035	0,127
Fase 3 (sem. 6-9)	0,343	0,337	0,025	0,369
Fase 4 (sem. 9-12)	0,305	0,307	0,024	0,780
Fase 5 (sem. 12-15)	0,282	0,298	0,021	0,011
Peso Corporal, kg (lb)				
Inicial	28,89 (63,7)	28,98 (63,9)	1,06	0,48
Semana 9	79,59 (175,5)	80,27 (177)	6,10	0,38
Semana 15	117,23 (258,5)	119,23 (262,9)	10,51	0,15

*Los datos son la media de 24 corrales/tratamiento.

¹ EEM = error estándar de la media

Ejemplo 5

Demostración de la eficacia de un tratamiento con aditivo de fosas de estiércol porcino basado en *Bacillus* para mejorar el almacenamiento, gestión y manipulación de los residuos de estiércol porcino.

- 5 Se llevará a cabo un estudio para evaluar la eficacia de un aditivo en fosas de estiércol porcino basado en *Bacillus* en la acumulación de sólidos, composición de nutrientes y características de formación de espuma del estiércol. Se identificarán múltiples sitios de producción que contengan al menos tres establos con unidades de almacenamiento y manipulación de estiércol separadas. Las fosas de estiércol en cada sitio se tratarán con un aditivo basado en *Bacillus* con dos dosis y una fosa de estiércol se dejará sin tratar. El tratamiento de fosa de dosis baja se añadirá a una fosa de estiércol en cada sitio de producción en una cantidad de 500 g de material de ensayo por 378541,18 litros (100.000 galones) de estiércol, formulado para contener 4×10^{10} UFC por gramo de material de ensayo. El tratamiento de fosa de dosis alta se añadirá a una fosa de estiércol diferente de la de la dosis baja en cada sitio de producción en una cantidad de 500 g de material de ensayo por 378541,18 litros (100.000 galones) de estiércol, formulado para contener 1×10^{11} UFC por gramo de material de ensayo. La tercera fosa de estiércol en cada sitio se dejará sin tratar como control.
- 10
- 15 Se obtendrán muestras de cada fosa de estiércol en cada sitio de producción en el ensayo inicialmente antes de cualquier tratamiento y periódicamente (aproximadamente una vez al mes) a lo largo de un periodo de tres a seis meses. Se recogerán los datos de las fosas de estiércol para evaluar la incidencia de formación de espuma y las muestras de estiércol se analizarán para evaluar la acumulación de sólidos y la composición de nutrientes. Las expectativas son que las fosas de estiércol porcino tratadas tendrán menos incidencia de formación de espuma, menos acumulación de sólidos y menos nitrógeno, azufre, fósforo, nitrógeno unido a fibra, proteínas totales, grasa y contenido de fibra, que las fosas de estiércol de control.
- 20

Ejemplo 6

Ensayo de alimentación de aves de corral que demuestra un mejor rendimiento productivo en respuesta a las combinaciones de cepas de *Bacillus* añadidas a las dietas de aves de corral.

- 25 Se llevarán a cabo ensayos de alimentación de aves de corral para evaluar los efectos de un aditivo de pienso microbiano de alimentación directa (DFM) basado en *Bacillus* en la ganancia de peso corporal, consumo de pienso, índice de conversión y la mortalidad de pavos, pollos de engorde y ponedoras. En estos estudios, se asignarán aleatoriamente aproximadamente 22 aves por repetición de tratamiento a los tratamientos dietéticos. Los tratamientos dietéticos pueden consistir en varias combinaciones de cepas de *Bacillus* administradas como un DFM y tratamientos experimentales de DFM combinados con enzimas, en comparación con un grupo de control relativo de aves. Los tratamientos con DFM de *Bacillus* se añadirán a la dieta con $1,5 \times 10^5$ UFC/g de pienso y se suministrarán aproximadamente de 1×10^7 a 5×10^7 UFC/cabeza/día basado en el consumo medio diario de pienso de varios sistemas de producción (pavos, pollos de engorde, ponedoras). Las dietas consistirán en dietas basadas en maíz-harina de soja-DDGS. La energía y todos los demás niveles de nutrientes se formularán para cumplir o superar los requisitos de las aves para ensayos. Las dietas se suministrarán durante un período de ensayo aproximado de 42 días y se suministrarán en tres fases de alimentación: iniciadora (d1-20) y crecimiento (d 21-38) y finalización (d38-42). Las dietas se conformarán en pelets (aproximadamente 75°C) y el pienso de inicio se desmenuzará.
- 30
- 35

- 40 Los datos de los grupos tratados se compararán con los de su grupo de control relevante usando las pruebas estadísticas adecuadas. Se analizarán el peso corporal, ganancia de peso corporal, consumo de pienso, FCR, FCE y mortalidad por análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de diferencias significativas mínimas.

- 45 Cuando se complete, se espera que los datos respalden la eficacia del(los) tratamiento(s) con DFM. Específicamente, se espera que el tratamiento con DFM aumente el porcentaje de rendimiento magro y porcentaje de canal, cambie las comunidades microbianas gastrointestinales a poblaciones favorables para el uso de nutrientes, y mejore la eficiencia del crecimiento de las aves, y mejore el peso de la caja de huevos.

Ejemplo 7

Efectos del producto microbiano de alimentación directa de *Bacillus* en el rendimiento productivo del cerdo, mediciones de la canal, características de las fosas de estiércol y emisiones de gases ambientales.

- 50 Se usó un total de 444 cerdos (200 cerdos castrados y 244 cerdas jóvenes) en un estudio en fase de crecimiento-finalización de 15 semanas para investigar el uso de complemento microbiano de alimentación directa de *Bacillus* en el rendimiento productivo, mediciones de la canal, características de la fosa de estiércol y emisiones de gases. Los cerdos se alojaron en un establo con control ambiental, que contenía 12 salas idénticas con 12 corrales por sala. Debajo de cada una de las 12 sales había dos fosas de estiércol con 6 corrales encima de cada fosa de estiércol. Antes de empezar el experimento, las fosas de estiércol se limpiaron completamente. Después las fosas de estiércol se cargaron con una pequeña cantidad de agua (2271,2 litros (~600 galones)).
- 55

Los cerdos asignados al ensayo se destetaron, se distribuyeron en bloques por peso corporal y sexo y se asignaron aleatoriamente a tratamientos dietéticos (control y DFM de *Bacillus*) con 4-5 cerdos por corral (2-3 establos y 2-3 cerdas jóvenes por corral). Antes del inicio de los tratamientos dietéticos, se suministró a los cerdos una dieta de ajuste durante dos semanas para sembrar las fosas con estiércol. Después se suministró a los cerdos una dieta de control o la dieta de control con complemento de DFM de *Bacillus*. El producto microbiano DFM de *Bacillus* consistía en proporciones iguales de cepas de *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) y AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) en una cantidad para garantizar $3,0 \times 10^8$ ufc/g de producto DFM, e incluido en una tasa de 0,454 kg/ton (1 lb/ton) en el pienso dando como resultado una concentración de $1,5 \times 10^5$ ufc/g en el pienso.

Los tratamientos dietéticos se mantuvieron durante todo el experimento, pero las dietas se ajustaron cada tres semanas para cumplir mejor las necesidades nutricionales de los cerdos, dando como resultado 5 fases dietéticas (3 fases de crecimiento, 2 fases de finalización) formuladas para cumplir o superar los requisitos de nutrientes de los cerdos en cada etapa de producción en cada una de las cinco fases (NRC, 1998). Las formulaciones de las dietas se basaban en maíz y harina de soja con niveles variables de granos secos de destilería con solubles (DDGS) basados en maíz a lo largo de las cinco fases. Específicamente, las dietas para las fases de crecimiento 1, 2 y 3 se formularon para contener 25% de DDGS, la dieta de la fase de finalización 4 contenía 20% de DDGS y la dieta de la segunda fase de finalización 5 contenía 10% de DDGS.

El peso corporal del cerdo y el consumo de pienso del corral se registraron cada tres semanas al final de cada fase. Se tomaron muestras de las fosas de estiércol al inicio y al final de cada una de las fases de crecimiento y finalización usando un dispositivo de toma de muestra de sondeo de vacío diseñado con una bomba de vacío conectada a dos matraces de vacío con tubos de plástico transparente con un extremo de toma de muestra de sondeo duro. Las muestras de sondeo de la fosa de estiércol se obtuvieron tomando muestras en cuatro sitios bajo cada corral en cada fosa del ensayo. Los sitios de toma de muestra de las fosas de estiércol con respecto al corral incluían: (1) debajo del centro del corral; (2) debajo del bebedero del corral; (3) debajo de la parte frontal del comedero del corral; y (4) debajo de la esquina del corral más alejada opuesta al comedero. Se analizó en los contenidos de estiércol el N total, N amónico, materia seca (MS), contenido de cenizas, Ca y P (AOAC 2007). A lo largo del experimento, se vigilaron las concentraciones de gases en la cámara de aire de la fosa y enfrente del extractor de pared usando un equipo de medición continua en tiempo real. Estos datos se combinaron con las tasas de ventilación para determinar las tasas de emisiones por sala por día para los gases amoníaco, metano y sulfuro de hidrógeno. Estos datos se expresaron como gramos de gas por kg (por libra) de ganancia de peso corporal del cerdo. Las concentraciones de metano y sulfato de hidrógeno también se midieron durante 10 días consecutivos (días 70 - 80 para CH₄, días 80 a 90 para H₂S) y se promediaron por sala para el análisis de la producción total de gases (n = 12).

Se analizó en las muestras de las fosas la composición de nutrientes (AOAC 2007) y ácidos grasos volátiles (AGV). Para la detección por cromatografía líquida a alta presión (HPLC) de ácidos grasos volátiles, se distribuyeron partes alícuotas de 10 ml de cada muestra en tubos Falcon de 15 ml y se almacenaron a -20°C hasta el análisis por HPLC. Después de descongelar, las muestras se centrifugaron a 16,1 rad durante 15 minutos. Se diluyó un mililitro (1 ml) de líquido sobrenadante en 9 ml de ácido fosfórico 16,8 mM en agua/acetonitrilo (98:2, v/v). El líquido sobrenadante diluido se agitó con vórtice durante 10 segundos y después se centrifugó a 16,1 rad durante 15 minutos. El líquido sobrenadante se filtró (0,22 µm) y se analizaron el ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido l-butírico, ácido l-valérico, ácido valérico, 4-metilvalerato usando un módulo de separación Waters 2695 (Waters Corp., Milford, MA) equipado con una columna de 300 x 7,8 mm Aminex HPX-87H (Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Se aplicó un método isocrático con un disolvente de la fase móvil que consistía en ácido fosfórico en agua 16,8 mM/acetonitrilo (98:2, v/v) con un caudal de 0,85 ml/min y una temperatura de columna de 65°C. Todos los analitos se detectaron con un detector PDA 2996 (Waters) a una absorción de 211 nm.

Los datos se analizaron usando el procedimiento del modelo lineal general de SAS para probar el tratamiento y diferencias de repeticiones. El corral era la unidad experimental para el rendimiento productivo y los datos de la canal, la fosa era la unidad experimental para los datos de excreción y de AGV, y la sala era la unidad experimental para los datos de emisión de gases.

50 Resultados

El peso medio de los cerdos era 29,3 kg (64,5 lb) al inicio del experimento y de 116,6 kg (257,1 lb) después de 15 semanas de alimentación. Los cerdos alimentados con la dieta que contenía el complemento DFM pesaban 1,8 kg (4 lb) más (P = 0,10) al final del experimento en comparación con los cerdos alimentados con la dieta de control (tabla 7). Esta respuesta era resultado del crecimiento más rápido cuando los cerdos se alimentaban con el complemento DFM en comparación con los cerdos de control (0,91 frente a 0,87 kg/día (2,01 frente a 1,93 lb/d), respectivamente; P < 0,03; tabla 8). El tratamiento dietético no afectaba al consumo medio diario de pienso (CMDP) (tabla 9). Esta falta de diferencia de respuesta entre los tratamientos para el consumo de pienso, junto con la mayor ganancia media diaria en cerdos tratados con DFM, daba como resultado un índice de conversión mejorado (P < 0,08) durante las dos fases de finalización (fase 4 y 5) y en el ensayo completo de 15 semanas cuando los cerdos se alimentaban con dieta complementada con DFM en comparación con cerdos alimentados con dieta de control. (tabla 10).

ES 2 702 230 T3

Tabla 7. Efectos del complemento microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* dietético en el peso corporal del cerdo

ítem	Dieta				EEM	Valor de p
	CTL		DFM			
<i>Peso Corporal, kg (lb)</i>						
Inicial	29,16	(64,3)	29,36	(64,73)	1,21	0,17
sem. 3	44,43	(97,96)	44,78	(98,74)	2,96	0,20
sem. 6	60,06	(132,44)	60,29	(132,95)	5,96	0,68
sem. 9	78,04	(172,07)	78,28	(172,6)	7,74	0,74
sem. 12	96,52	(212,82)	97,74	(215,51)	10,14	0,20
sem. 15	115,67	(255,05)	117,52	(259,13)	12,17	0,10

Tabla 8. Efectos del complemento microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* dietético en la ganancia media diaria (GMD).

ítem	Dieta				EEM	Valor de p
	CTL		DFM			
<i>GMD, kg (lb)</i>						
sem. 0-3	0,78	(1,72)	0,79	(1,74)	0,129	0,39
sem. 3-6	0,74	(1,64)	0,74	(1,63)	0,224	0,78
sem. 0-6	0,76	(1,68)	0,76	(1,68)	0,145	0,90
sem. 6-9	0,86	(1,89)	0,86	(1,89)	0,182	0,98
sem. 0-9	0,79	(1,75)	0,79	(1,75)	0,123	0,91
sem. 9-12	0,88	(1,94)	0,93	(2,04)	0,327	0,13
sem. 0-12	0,82	(1,8)	0,91	(2,01)	0,119	0,25
sem. 6-12	0,87	(1,91)	0,89	(1,97)	0,198	0,20
sem. 12-15	0,87	(1,92)	0,90	(1,98)	0,292	0,30
sem. 0-15	0,83	(1,82)	0,84	(1,86)	0,114	0,13
sem. 9-15	0,88	(1,93)	0,91	(2,01)	0,176	0,03

5 Tabla 9. Efectos del complemento microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* dietético en el consumo medio diario de pienso (CMDP).

ítem	Dieta				EEM	Valor de p
	CTL		DFM			
<i>CMDP kg (lb)</i>						
sem. 0-3	1,49	(3,28)	1,50	(3,31)	0,243	0,55
sem. 3-6	2,07	(4,56)	2,02	(4,46)	0,432	0,24
sem. 0-6	1,78	(3,93)	1,77	(3,9)	0,292	0,64
sem. 6-9	2,50	(5,51)	2,49	(5,49)	0,528	0,88
sem. 0-9	2,02	(4,46)	2,01	(4,44)	0,336	0,86
sem. 9-12	2,91	(6,41)	2,82	(6,21)	0,75	0,21
sem. 0-12	2,24	(4,94)	2,22	(4,89)	0,393	0,52
sem. 6-12	2,70	(5,96)	2,65	(5,85)	0,591	0,38
sem. 12-15	3,02	(6,65)	3,07	(6,78)	0,646	0,325
sem. 0-15	2,40	(5,29)	2,39	(5,28)	0,395	0,9
sem. 9-15	2,96	(6,53)	2,95	(6,5)	0,6	0,82

Tabla 10. Efectos del complemento microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* dietético en el índice de conversión (kg de ganancia de peso corporal por kg de pienso consumido).

Ítem	Dieta		EEM	Valor de p
	CTL	DFM		
Ganancia: alimentación				
semana 0-3	0,536	0,535	0,036	0,86
semana 3-6	0,360	0,368	0,039	0,32
semana 0-6	0,430	0,435	0,030	0,45
semana 6-9	0,345	0,347	0,032	0,80
semana 0-9	0,396	0,398	0,024	0,68
semana 9-12	0,306	0,337	0,066	0,03
semana 0-12	0,367	0,377	0,028	0,06
semana 6-12	0,324	0,340	0,040	0,05
semana 12-15	0,289	0,293	0,036	0,55
semana 0-15	0,347	0,355	0,022	0,08
semana 9-15	0,297	0,311	0,028	0,01

5 Los pesos de la canal en caliente eran 2,0 kg (4,5 lb) ($P < 0,01$) más pesadas para los cerdos alimentados con dietas complementadas con DFM en comparación con cerdos con alimentación de control (Tabla 11). Además, los valores de calidad de la canal tenían tendencia a ser mayores ($P = 0,15$) cuando se suministraba a los cerdos el complemento con DFM. El aumento observado en el peso de la canal por el complemento de DFM daba como resultado un valor de la canal de 0,39 dólares más en comparación con las canales de control.

Tabla 11. Efectos del complemento microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* dietético en las características de la canal.

ítem	Dieta		MSE	Valor de p
	CTL	DFM		
Características de la carcasa				
Profundidad de grasa, cm (pulgadas)	2,34 (0,92)	2,36 (0,93)	0,11	0,69
Profundidad de lomo, cm (pulgadas)	7,47 (2,94)	7,42 (2,92)	0,09	0,34
Magro, %	54,9	54,77	0,86	0,45
Peso de la canal en caliente, kg (lb)	91,93 (202,7)	93,97 (207,2)	7,84	0,01
Beneficio de calidad de la canal	5,41	5,70	0,96	0,15
Valor de la canal \$/kg (\$/cwt)	2,082 (94,44)	2,091 (94,83)	1,58	0,23

10 Los valores de nutrientes del estiércol medidos de las muestras obtenidas a lo largo del periodo del ensayo se dan en la tabla 12. La materia seca ($P = 0,20$), cenizas ($P = 0,11$) y nitrógeno amónico ($P = 0,15$) tenían tendencia a ser menores en las fosas de estiércol asociadas con cerdos alimentados con DFM de *Bacillus* en comparación con cerdos de control. El complemento DFM de bacilos disminuía la materia seca en 7%, cenizas en 8%, y nitrógeno amónico en 5% en el estiércol de cerdos tratados en comparación con el control. Las reducciones observadas en excreción de materia seca y cenizas se pueden atribuir a mejoras en el índice de conversión.

15

Tabla 12. Efectos del complemento microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* dietético en la acumulación de nutrientes en la fosa de estiércol (g/kg (g/lb) de ganancia de peso corporal) a lo largo del ensayo total.

ítem	Dieta		EEM	Valor de p
	CTL	DFM		
En conjunto				
MS	654,33 (296,8)	609,36 (276,4)	36,31	0,20
Cenizas	121,39 (55,06)	111,97 (50,79)	5,89	0,11

ítem	Dieta		EEM	Valor de p
	CTL	DFM		
En conjunto				
N total	42,44 (19,25)	41,84 (18,98)	2,82	0,83
N amónico	32,43 (14,71)	30,73 (13,94)	1,21	0,15
P	12,46 (5,65)	11,66 (5,29)	0,73	0,26
Ca	18,74 (8,50)	17,70 (8,03)	2,09	0,63

5 La falta de diferencia en la excreción de nitrógeno total en el estiércol entre los tratamientos sugiere que las reducciones observadas en el nitrógeno amónico del tratamiento con DFM es un resultado de cambios en la ecología y actividad microbiana en las fosas de estiércol asociadas con el tratamiento con DFM en comparación con el control. Cuando se expresa como gramos por kilogramo (g/libra) de peso corporal del cerdo, las emisiones de metano tendían a ser menores (P = 0,16; 17% de reducción) cuando los cerdos se alimentaban con dietas complementadas con DFM (Tabla 13). Las emisiones de sulfuro de hidrógeno gaseoso, expresadas como gramos por kilogramo (g/libra) de peso corporal no eran significativamente diferentes del control, pero disminuían en 10% cuando los cerdos se alimentaban con las dietas complementadas con DFM. Las emisiones de amoniaco eran numéricamente inferiores para los cerdos alimentados con DFM en todos los tiempos de medición. Las emisiones de gases metano y sulfuro de hidrógeno totales (gramos/día) se reducían (P = 0,08) en 14% y 19%, respectivamente, en salas que alojaban cerdos con complemento de DFM en comparación con los cerdos de control (Tabla 14).

Tabla 13. Efectos del complemento microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* dietético en las emisiones de gases ambientales (g/kg (g/lb) de ganancia de PC).

ítem	Dieta		EEM	Valor de p
	CTL	DFM		
En conjunto				
NH ₃	9,50 (4,31)	9,13 (4,14)	0,821	0,74
CO ₂	3,00 (1,36)	3,02 (1,37)	0,137	0,97
CH₄	17,79 (8,07)	14,82 (6,72)	1,43	0,16
H ₂ S	1,34 (0,61)	1,21 (0,55)	0,133	0,51

15 Tabla 14. Efectos del complemento DFM dietético en las emisiones medias de gases metano (CH₄) y sulfuro de hidrógeno (H₂S).¹

Las emisiones	Tratamiento dietético		EEM	Valor de p
	Control	DFM de ensayo		
Metano (CH ₄)	1072,8	922,6	47,1	0,086
El sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	95,3	77,3	7,8	0,149

¹ Datos en g/día; EEM = error estándar de la media,

20 Los ácidos grasos volátiles totales (AGV) se reducían (P = 0,01) en el estiércol de los cerdos alimentados con las dietas complementadas con DFM de *Bacillus* en comparación con el estiércol de los cerdos de control (Tabla 15). Específicamente, esta reducción era el resultado de una menor producción de 1-butilato (P = 0,04), 4-metil-valerato (P = 0,05) y propionato (P = 0,12) durante la fermentación microbiana anaeróbica en el estiércol. A la inversa, el complemento de DFM daba como resultado un aumento (P = 0,06) de la producción de butirato.

Tabla 15. Efectos del complemento DFM dietético en la composición de ácidos grasos volátiles (AGV) del estiércol. ¹

Ácido graso volátil (VFA)	Tratamiento dietético		EEM	Valor de p
	Control	DFM		
Acetato	15,46	15,09	0,74	0,724
Propionato	6,92	5,79	0,50	0,120
Butirato	2,89	4,06	0,42	0,062

Ácido graso volátil (VFA)	Tratamiento dietético		EEM	Valor de p
	Control	DFM		
I-Butirato	1,54	1,19	0,11	0,042
4-metil-valerato	16,29	11,66	1,61	0,053
AGV totales	45,71	40,18	1,52	0,017

¹ Datos en ppm de materia seca ponderada ganancia de peso corporal,

Los datos de este experimento indican que la alimentación de cerdos con dietas complementadas con DFM de *Bacillus* durante las fases de producción de crecimiento y finalización dan una mejor tasa de crecimiento, índice de conversión y peso final de la canal en caliente. El complemento con el DFM también puede reducir la materia seca, cenizas y N amónico en la fosa de estiércol. Además, las reducciones en las emisiones de metano y sulfuro de hidrógeno del estiércol porcino almacenado eran evidentes cuando las dietas de cerdos se complementaron con DFM de *Bacillus*.

Ejemplo 8

Efecto del producto microbiano de alimentación directa de *Bacillus* en la ecología microbiana en estiércol porcino almacenado.

Se obtuvieron muestras de fosas de estiércol del estudio de fases de crecimiento-finalización de 15 semanas descrito en el ejemplo 7. Se recogieron muestras de estiércol para el análisis microbiano al final del ensayo como se ha descrito previamente en el ejemplo 7, de cada una de las dos fosas individuales por sala y se analizaron individualmente dando como resultado un total de 24 observaciones. Las arqueas productoras de metano (Spence et al., 2008) y los grupos de bacterias de interés se contaron mediante el análisis de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) (Metzler-Zebeli et al., 2010, Yu et al., 2005). Los datos se analizaron usando ANOVA de una vía por el procedimiento Proc Mixed de SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC) con nivel de significación $\alpha = 0,10$. Se declararon tendencias para $0,20 \geq P > 0,10$.

La adición de DFM de *Bacillus* a las dietas porcinas producía cambios en las poblaciones microbianas en el estiércol porcino almacenado. El grupo de bacterias proteolíticas I de *Clostridium* se reducía ($P < 0,01$) en el estiércol almacenado resultante de cerdos alimentados con DFM en comparación con el estiércol de cerdos de control (tabla 16). La administración de DFM de *Bacillus* a los cerdos producía un aumento en el grupo fibrolítico XIVa de *Clostridium* ($P = 0,09$) asociado con la producción de butirato. Este aumento en el grupo XIVa de *Clostridium*, apoya el aumento observado en la producción de butirato asociada con el tratamiento con DFM, como se describe en la tabla 15 en el ejemplo 7. Las especies *Bacteroides* y *Prevotella*, que producen una amplia variedad de AGV, se reducían significativamente ($P = 0,08$) en el estiércol de cerdos con complemento de DFM. Los metanógenos tendían a disminuir ($P = 0,13$) en el estiércol almacenado de cerdos alimentados con el DFM de *Bacillus* en comparación con estiércol de cerdos de control, y las bacterias reductoras de sulfato disminuían numéricamente. Las reducciones observadas en estas arqueas y bacterias reductoras de sulfato apoyan las disminuciones observadas en la producción de gases metano y sulfuro de hidrógeno con el complemento de DFM descrito en la tabla 13 y la tabla 14 en el ejemplo 7.

Tabla 16. Efectos del complemento dietético microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* en poblaciones microbianas en estiércol porcino almacenado.¹

Grupo de microorganismos	Tratamiento dietético		EEM	Valor de p
	Control	DFM		
Metanógenos (Archaea)	0,181	0,103	0,03	0,132
<i>Bacteroides</i> / <i>Prevotella</i>	1,193	0,626	0,19	0,083
Grupo de <i>Clostridium</i> I	0,386	0,079	0,04	0,002
Grupo de <i>Clostridium</i> IV	2,551	1,200	0,62	0,176
Grupo de <i>Clostridium</i> XIVa	3,525	4,835	0,47	0,097
Bacterias reductoras de sulfato,	0,027	0,017	0,01	0,379

¹ Datos en Δ ct relativos a bacterias totales y ajustados para materia seca del estiércol (MS) y ponderados por la ganancia de peso corporal; EEM = error estándar de la media,

Ejemplo 9

El efecto del suministro de complemento microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* a cerdos criados en una instalación comercial de destete a finalización y dietas suministradas formuladas con un alto nivel de subproductos y niveles de energía limitados

- 5 Para determinar el rendimiento productivo de cerdos alimentados con dietas comerciales basadas en maíz-soja con cantidades crecientes de subproducto, se llevó a cabo un estudio de fases de destete a finalización. Se destetaron un total de 1024 cerdos aproximadamente a las 3 semanas de edad, se separaron por género y categoría de peso, se distribuyeron en 32 corrales en el ensayo y se alimentaron por fases durante 105 días. Los cerdos se pesaron cada dos semanas durante las tres fases iniciales de destete. Las dietas de la fase inicial contenían hasta 20% de granos de destilería de maíz y solubles (cDDGS). Los cerdos continuaron en dos fases de crecimiento y una fase de finalización que duraban 21 días cada una. Las dietas de las dos fases de crecimiento así como la de finalización contenían 35% de cDDGS y 15% de harinillas de trigo que sustituían al maíz en la dieta (tabla 17).

Tabla 17. Fases de alimentación y composición de la dieta.¹

Fase -->	1) inicial temprana	2) Inicial tardía	3) Crecimiento temprano	4) Crecimiento tardío	5) Finalización temprana
Duración (Días) -->	0 - 28	28 - 42	42 - 63	63 - 84	84 - 105
Ingrediente (%)					
Maíz	53,1	48,6	28,2	31,9	35,4
SBM (46,5% de PC)	25,0	27,2	18,2	14,5	11,3
Suero seco por atomización	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Harina de pescado de menhaden sel.	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0
cDDGS	0,0	20,0	35,0	35,0	35,0
Harinillas de trigo	0,0	0,0	15,0	15,0	15,0
Grasa	3,000	1,000	1,000	1,000	1,000
MCP (21% de P)	1,200	0,800	0,000	0,000	0,000
Caliza (CaCO ₂)	0,800	1,115	1,475	1,470	1,450
Sal	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
Premezcla de vitaminas	0,150	0,150	0,090	0,090	0,075
Premezcla de minerales	0,125	0,125	0,125	0,125	0,085
Lisina HCl	0,150	0,450	0,470	0,400	0,350
DL-metionina	0,050	0,075	0,000	0,000	0,000
L-treonina	0,250	0,100	0,055	0,020	0,000
Phyzyme 2500TPT	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
Óxido de zinc	0,350	0,000	0,000	0,000	0,000
Mecadox 2,5	1,000	0,500	0,000	0,000	0,000

¹ SBM, harina de soja; PC, proteína cruda; cDDGS, granos secos de destilería de maíz con solubles con un contenido de aceite de ~ 10%; Tratamiento incluido a expensas del maíz,

- 15 Las dietas se formularon para simular las dietas comerciales estándar con exceso de proteína cruda pero energía limitada. Excepto para las primeras 6 semanas el ensayo, no se suministraron promotores del crecimiento antibióticos. El tratamiento consistía en dieta de complemento microbiano de alimentación directa (DFM) comparado con la de control sin DFM. El producto microbiano de alimentación directa consistía en proporciones iguales de cepas de *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) y AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) en una cantidad para garantizar $3,0 \times 10^8$ ufc/g de producto DFM, incluido en una tasa de 0,454 kg/ton (1 lb/ton) en el pienso dando como resultado una concentración de $1,5 \times 10^5$ ufc/g en la dieta. El rendimiento productivo y las pérdidas se analizaron usando el procedimiento Proc Mixed de SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC) con nivel de significación $\alpha = 0,10$. Se declararon tendencias para $0,15 \geq P > 0,10$. Los datos se distribuyeron en bloques por género y categoría de peso y se equilibraron respecto al peso inicial.

- 25 La ganancia media diaria de los cerdos alimentados con el DFM era mayor ($P < 0,05$) desde el d 0 al 14 y el d 14 al 28 del ensayo en comparación con los cerdos de control (tabla 18), lo que daba como resultado un mayor ($P < 0,05$) peso corporal de los cerdos con complemento de DFM el d 14 y d 28 del estudio (tabla 19). Este aumento de la

ganancia de peso corporal presentada por los cerdos con complemento de DFM era un resultado de un mayor ($P < 0,10$) consumo medio diario de pienso durante los periodos del d 0 al 14 y del d 0 14 al 28 (tabla 20). El índice de conversión también mejoraba ($P = 0,03$) durante el periodo de las dos primeras semanas del ensayo (tabla 20b).

Tabla 18. Ganancia media diaria (gmd) a lo largo de la duración del estudio.

	Control	DFM	EEM	Valor de P
gmd0-14	0,419	0,474	0,012	0,003
gmd14-28	1,067	1,133	0,022	0,041
gmd28-42	1,414	1,370	0,022	0,169
gmd0-42	0,967	0,992	0,016	0,268
gmd42-63	1,798	1,837	0,016	0,097
gmd63-84	1,996	1,964	0,024	0,335
gmd42-84	1,897	1,900	0,012	0,857
gmd0-84	1,432	1,446	0,013	0,432
gmd84-105	1,994	2,045	0,016	0,027
gmd42-105	1,447	1,461	0,007	0,150
gmd0-105	1,287	1,305	0,009	0,143

¹ EEM = error estándar de la media.

- 5 Tabla 19. Peso corporal del cerdo (kg (lb)) y porcentaje de pérdida de salud (mortalidad y rechazados) a lo largo de la duración del estudio.

	Control		DFM		EEM ¹	Valor de P
d0	6,10	(13,46)	6,15	(13,57)	0,19	0,699
d14	8,79	(19,38)	9,17	(20,23)	0,29	0,051
d28	15,56	(34,32)	16,37	(36,09)	0,54	0,027
d42	24,54	(54,11)	25,07	(55,27)	0,79	0,308
d63	41,66	(91,87)	42,56	(93,84)	0,96	0,155
d84	60,68	(133,8)	61,26	(135,08)	1,19	0,447
d105	79,67	(175,67)	80,74	(178,03)	1,18	0,167
% mortalidad	2,95		1,37		0,61	0,076

¹ EEM = error estándar de la media,

Tabla 20. Consumo medio diario de pienso (cmdp) a lo largo de la duración del estudio.

	Control	DFM	EEM	Valor de P
cmdp0-14	0,624	0,671	0,013	0,017
cmdp14-28	1,634	1,726	0,038	0,102
cmdp28-42	2,544	2,510	0,045	0,600
cmdp0-42	1,601	1,636	0,028	0,385
cmdp42-63	3,747	3,873	0,049	0,077
cmdp63-84	5,061	5,044	0,053	0,823
cmdp42-84	4,404	4,459	0,043	0,373
cmdp0-84	3,002	3,047	0,032	0,322
cmdp84-105	6,191	6,099	0,048	0,180
cmdp42-105	3,750	3,754	0,028	0,912
cmdp0-105	3,034	3,048	0,026	0,691

¹ EEM = error estándar de la media,

Tabla 20b. Conversión de alimento (pienso:ganancia, pg) a lo largo de la duración del estudio.

	Control	DFM	EEM	Valor de P
fg0-14	1,499	1,424	0,024	0,038
fg14-28	1,533	1,524	0,021	0,769
fg28-42	1,801	1,831	0,019	0,255
fg0-42	1,611	1,593	0,010	0,235
fg42-63	2,082	2,108	0,022	0,408
fg63-84	2,539	2,571	0,032	0,486
fg42-84	2,311	2,340	0,018	0,258
fg0-84	1,961	1,966	0,011	0,721
fg84-105	3,107	2,982	0,031	0,008
fg42-105	1,932	1,915	0,013	0,369
fg0-105	1,825	1,808	0,010	0,222

¹ EEM = error estándar de la media,

5 El complemento microbiano de alimentación directa daba como resultado mayor ($P < 0,10$) GMD y CMDP durante la fase de crecimiento temprana (del d 42 al 63 del ensayo). Durante la fase de finalización del ensayo, la GMD era mayor ($P = 0,02$) del d 84 al 105 cuando se suministraba a los cerdos dietas complementadas con DFM en comparación con los cerdos de control, y tenían tendencia a ser mayores ($P = 0,14$) para todo el periodo de tiempo del d 0 al 105. La mejor respuesta de GMD con el tratamiento de DFM del d 84 al 105 y la falta de respuesta del CMDP, daba como resultado una conversión de alimento mejorada ($P < 0,01$) durante este periodo. Las mejoras en la GMD a partir del complemento de DFM a lo largo del ensayo dieron como resultado un cerdo aproximadamente 1,4 kg (3 libras) más pesado al final del estudio (d 105) en comparación con los cerdos de control (tabla 19).
10 Además, las pérdidas de salud debido a la mortalidad y rechazados como resultado de la gripe, infección por *Streptococcus suis*, etc. se redujeron ($P = 0,07$; Tabla 19).

Ejemplo 10

15 El efecto del suministro de complemento microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* a cerdos criados en una instalación comercial de destete a finalización y dietas suministradas formuladas con un alto nivel de subproductos y niveles de energía limitados en la eficiencia de la conversión de alimento.

20 Se evaluó el efecto de un producto microbiano de alimentación directa de *Bacillus* en la eficiencia del uso del pienso por los cerdos, que son criados en una instalación de destete a finalización. Se destetaron un total de 2160 cerdos aproximadamente a las 3 semanas de edad, se separaron por género, se equilibraron por peso inicial, y se distribuyeron en 68 corrales en dos sales en el mismo sitio en el ensayo. Los animales se alimentaron por fases durante 105 días. Los cerdos se pesaron cada dos semanas durante la fase inicial de destete que duraba hasta el día 42, después del destete. Las dietas de la fase inicial contenían hasta 20% de granos de destilería de maíz y solubles (cDDGS). Los cerdos continuaron en el ensayo a través de dos fases de crecimiento y una fase de finalización, cada una de 21. Las dietas de las fases de crecimiento así como la de finalización contenían 35% de cDDGS y 15% de harinillas de trigo que sustituían al maíz en la dieta (tabla 21). Las dietas se formularon para simular las dietas comerciales estándar con proteína cruda y energía limitadas.
25

Tabla 21. Fases de alimentación y composición de la dieta.¹

Fase -->	1) Inicial temprana	2) Inicial tardía	3) Crecimiento temprano	4) Crecimiento tardío	5) Finalización temprana
Duración (días) -->	0 - 28	28 - 42	42 - 63	63 - 84	84 - 105
Ingrediente (%)					
Maíz	46,5	49,6	36,7	39,6	41,5
SBM (46,5% de PC)	37,0	27,0	10,0	7,0	5,0
Suero seco por atomización	10,0	-	-	-	-
Plasma seco por atomización	2,2	-	-	-	-
cDDGS	-	20,0	35,0	35,0	35,0

ES 2 702 230 T3

Fase -->	1) Inicial temprana	2) Inicial tardía	3) Crecimiento temprano	4) Crecimiento tardío	5) Finalización temprana
Duración (días) -->	0 - 28	28 - 42	42 - 63	63 - 84	84 - 105
Ingrediente (%)					
Harinillas de trigo	-	-	15,0	15,0	15,0
Grasa	2,000	1,000	1,000	1,000	1,000
MCP (21% de P)	0,800	-	-	-	-
Caliza (CaCO ₂)	0,800	1,000	1,350	1,350	1,350
Sal	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
Premezcla de vitaminas	0,150	0,150	0,090	0,090	0,075
Premezcla de minerales	0,125	0,125	0,125	0,125	0,085
Lisina HCl	-	0,250	0,350	0,450	0,550
DL-metionina	0,080	0,060	0,020	0,010	0,030
L-treonina	-	0,100	0,020	0,060	0,100
Óxido de zinc	0,350	-	-	-	-
Mecadox 2,5	0,400	0,400	-	-	-
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

¹ SBM, harina de soja; PC, proteína cruda; cDDGS, granos de destilería secos de maíz con solubles con ~ 10% de aceite; Tratamiento incluido a expensas del maíz,

5 Excepto para las primeras 6 semanas del ensayo, no se suministraron promotores del crecimiento antibióticos. Los tratamientos consistían en dieta de complemento microbiano de alimentación directa (DFM) en comparación con la de control sin DFM. El producto microbiano de alimentación directa consistía en proporciones iguales de cepas de *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) y AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) en una cantidad para garantizar $3,0 \times 10^8$ ufc/g de producto DFM, incluido en una tasa de 0,454 kg/ton (1 lb/ton) en el pienso, dando como resultado una concentración de $1,5 \times 10^5$ ufc/g en la dieta. La conversión de alimento se analizó usando el procedimiento Proc Mixed de SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC) con nivel de significación $\alpha = 0,10$. Se declararon tendencias para $0,15 \geq P > 0,10$. Los datos se distribuyeron en bloques según la sala y el género para el análisis.

10 Era necesario menos pienso ($P = 0,02$) por libra de ganancia de peso corporal desde el d 0 al 14 del ensayo cuando los cerdos se alimentaban con dietas que contenían el complemento DFM de *Bacillus*, y esta respuesta de índice de conversión tendía ($P = 0,13$) a ser evidente a lo largo de toda la fase de destete desde el d 0 al 42 del estudio. (Tabla 22). El complemento microbiano de alimentación directa también mejoraba ($P = 0,08$) el índice de conversión durante la fase de finalización (d 84 al 105).

15 Tabla 22. Conversión de alimento (pienso:ganancia, fg) a lo largo de la duración del estudio.

	Control	DFM	EEM	Valor de p
pg0-14	1,599	1,455	0,045	0,027
pg14-28	1,360	1,389	0,015	0,191
pg28-42	1,674	1,656	0,011	0,267
pg0-42	1,537¹	1,520	0,008	0,134
pg42-63	2,020	2,015	0,009	0,707
pg63-84	2,311	2,336	0,016	0,267
pg42-84	2,177	2,187	0,009	0,445
pg0-84	1,960	1,957	0,007	0,797
pg84-105	2,740	2,677	0,025	0,081
pg42-105	2,376	2,361	0,010	0,294

¹ EEM = error estándar de la media,

Ejemplo 11

El efecto del suministro de complemento microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* en la respuesta del índice de conversión de dietas suministradas a cerdos de destete formuladas con niveles altos de subproductos fibrosos.

- 5 Un total de 480 cerdos (peso corporal inicial: aproximadamente 6,0 kg) se destetaron a los 21 días de edad y se encerraron 10 cerdos/corral en una instalación de cerdos de destete con control ambiental. Los cerdos se pusieron en el ensayo desde los 21 días de edad a 63 días de edad y se alimentaron con un programa de alimentación de dos fases con dietas formuladas basadas en maíz, harina de soya y 40% de DDGS de maíz (tabla 23) y para cumplir con los requisitos de nutrientes de los cerdos en cada una de las dos fases de producción (tabla 24).

10 Tabla 23. Composición de la dieta base de las dietas de cerdos de destete de la fase 1 y 2.

Dieta de destete:	NC - Destete 1	NC - Destete 2
Peso Corporal, kg (lb)	6,8 a 11,3 (15 a 25)	11,3 a 20,4 (25 a 45)
Ingrediente, % en la dieta		
Maíz, dentado amarillo	38,66	43,76
DDGS de maíz	20	20
Harina de soja, 46,5% de PC	27,2	27,2
Harinillas de trigo, <9,5% fi	5	5
Harina de pescado, menhaden	2	0
Suero de leche, en polvo	3	0
Grasa blanca	1	1
Fosfato dicálcico 18,5%	0,4	0,35
Caliza	1,08	1,16
Sal	0,3	0,3
Premezcla de vitaminas de destete NSNG	0,5	0,5
L-lisina HCl	0,53	0,48
DL-metionina	0,16	0,12
L-treonina	0,17	0,13
L-triptófano	0,01	0,01

Tabla 24. Composición calculada de dietas base, %.

	Fase 1 (6,8 a 11,3 kg (15 a 25 lb))	Fase 2 (11,3 a 20,4 kg (25 a 45 lb))
Materia seca %	89,73	89,45
ED - kcal/kg (kcal/lb)	3536,7 (1604,2)	3534,96 (1603,43)
EM - kcal/kg (kcal/lb)	3352,4 (1520,6)	3358,06 (1523,19)
EN - kcal/kg (kcal/lb)	2376,6 (1078)	2377,60 (1078,46)
Proteína cruda %	24,47	23,18
Lys%	1,45	1,31
Thr %	0,91	0,82
Met %	0,52	0,45
Met+Cys %	0,84	0,77
Trp %	0,24	0,22
Calcio %	0,74	0,64
Fos. % - total	0,63	0,55
Fos. % - disponible	0,33	0,25
Fos. % - digestible	0,32	0,25

5 Todas las dietas contenían fitasa (500 UTF/kg de pienso). Se asignó aleatoriamente uno de los tres tratamientos dietéticos a los corrales, de manera que cada tratamiento estaba representado por ocho corrales repetidos. Los tratamientos consistían en complemento microbiano de alimentación directa (DFM) en dos niveles de inclusión (0,227 y 0,454 kg/tonelada (0,5 y 1,0 lb/tonelada) de pienso) en comparación con una dieta de control sin el complemento de DFM (tabla 25).

10 El producto microbiano de alimentación directa consistía en proporciones iguales de cepas de *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) y AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) en una cantidad para garantizar $3,0 \times 10^8$ ufc/g de producto DFM, incluido en una tasa de 0,227 o 0,454 kg/ton (0,5 o 1,0 lb/ton) de pienso dando como resultado una concentración de $7,5 \times 10^4$ ufc/g o $1,5 \times 10^5$ ufc/g en la dieta, respectivamente. La ganancia de peso corporal de los cerdos y el consumo de pienso del corral se determinaron en los días 21 y 42 del ensayo para calcular el índice de conversión como ganancia:pienso. El índice de conversión también se puede calcular como pienso:ganancia.

Tabla 25. Tratamientos dietéticos y tasas de inclusión de DFM

Tratamiento	Dieta	Estado de procesamiento ¹	Tasa de inclusión de DFM, kg/ton (lb/ton)	Phyzyme XP, UTF/kg ²
T-1	Control	Machacado	0,0 (0,0)	500
T-2	Control + DFM	Machacado	0,227 (0,5)	500
T-3	Control + DFM	Machacado	0,454 (1,0)	500

¹ Las dietas se procesaron como pienso machacado, no en pelets.
² Todas las dietas contenían 500 UTF/kg de pienso de fitasa.

15 Los cerdos alimentados con las dietas tratadas con DFM de *Bacillus* tenían una mayor ganancia de peso corporal (P = 0,03) por unidad de consumo de pienso en comparación con los cerdos alimentados con la dieta de control durante la fase de destete temprana (d 0 a 21, post-destete; Tabla 26).

Tabla 26. Peso corporal e índice de conversión de cerdos de destete alimentados con dietadas basadas en alto contenido de fibra complementadas con DFM de *Bacillus* en dos niveles de inclusión en la dieta.

Fitasa, UTF/kg	500	500	500		
DFM de <i>Bacillus</i> , kg/ton (lb/ton)	0 (0)	0,227 (0,5)	0,454 (1,0)		
Dieta	1	3	4		
Peso corporal, kg				EEM	Valor de p
Inicial	6,79	6,79	6,79	0,021	0,378
día 21	11,60	11,92	11,93	0,135	0,270
día 42	26,0	26,7	26,5	0,38	0,482
Ganancia:Pienso					
día 0_21	0,656b	0,721a	0,729a	0,0192	0,039
día 21_42	0,655	0,661	0,641	0,0124	0,808
día 0_42	0,651	0,675	0,662	0,0106	0,286
N, Corrales*/Dieta	8	8	8		

*Cerdos por corral = 10

Ejemplo 12

20 Efecto de un producto microbiano de alimentación directa de *Bacillus* en la energía y la digestibilidad de nutrientes en cerdos en crecimiento alimentados con dietas que contienen 40% de DDGS de maíz.

25 Se llevó a cabo un estudio de digestibilidad en cerdos en crecimiento para medir los efectos de un producto microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* en la digestibilidad ileal y de tracto total de energía y nutrientes en dietas que contenían 40% de granos secos de destilería de maíz que incluyen solubles (DDGS). Veinticuatro cerdos (PC inicial: aproximadamente 25 kg) procedentes de los apareamientos de verracos G-Performer con hembras F-25 (Genetiporc, Alexandria, MN) se equiparon quirúrgicamente con una cánula T en el íleon distal. Después de las cirugías, se dejó que los cerdos se recuperaran 21 días. Durante este periodo se proporcionó una

dieta estándar basada en maíz y harina de soja sin restricciones. Tres semanas después de la cirugía, los cerdos se asignaron a dos tratamientos dietéticos que consistían en una dieta base de control y un DFM de *Bacillus*. Los cerdos se alojaron en corrales individuales (1,2 × 1,5 m) en una sala con control ambiental. Cada corral se equipó con un comedero y un bebedero de tetina y tenía suelos de cemento completamente emparrillados.

- 5 La dieta base experimental se formuló basada en maíz, harina de soja y 40% de DDGS de maíz (tabla 27). Los tratamientos dietéticos eran: (1) una dieta base sin DFM; o (2) la dieta base con 0,05% de DFM añadido a expensas del almidón de maíz. El producto microbiano de alimentación directa consistía en proporciones iguales de cepas de *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) y AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) en una cantidad para garantizar $3,0 \times 10^8$ ufc/g de producto DFM, incluido en una tasa de 0,454 kg/ton (1,0 lb/ton) en el pienso dando como resultado una concentración de $1,5 \times 10^5$ ufc/g en la dieta. Todas las dietas se formularon para cumplir o superar los requisitos de nutrientes para cerdos en crecimiento (NRC, 1998).

Tabla 27. Composición de la dieta base experimental¹

Ingrediente, %	
Maíz	32,60
DDGS	40,00
Harinillas de trigo	10,00
SBM, 48% de PC	14,00
Almidón de maíz	0,60
Caliza	1,30
Lisina HCl	0,40
Sal	0,40
Dióxido de titanio	0,40
Premezcla de vitaminas-minerales ³	0,30
Total	100,00
Composición calculada, %	
PC (N × 6,25)	21,9
EM, kcal / kg	3,295
Lys SID	1,19
FDA	8,7
FDN	14,9
Ca	0,64
P total	0,59
P digestible	0,29

¹ El tratamiento microbiano de alimentación directa se añadió en 0,05% de la dieta a expensas del almidón de maíz.

³ La premezcla de vitaminas-microminerales proporcionó las siguientes cantidades de vitaminas y minerales por kilogramo de dieta completa: Vitamina A, 10.990 UI; vitamina D₃, 1,648 UI; vitamina E, 55 UI; vitamina K, 4,4 mg; tiamina, 3,3 mg; riboflavina, 9,9 mg; piridoxina, 3,3 mg; vitamina B₁₂, 0,044 mg; ácido D-pantoténico, 33 mg; niacina, 55 mg; ácido fólico, 1,1 mg; biotina, 0,17 mg; Cu, 16 mg como sulfato de cobre; Fe, 165 mg como sulfato de hierro; I, 0,36 mg como yodato de potasio; Mn, 44 mg como sulfato de manganeso; Se, 0,3 mg como selenito de sodio; Zn, 165 mg como óxido de cinc.

- 15 Se usó dióxido de titanio como un marcador indigerible en todas las dietas. Las dietas se suministraron a los 12 cerdos, proporcionando 6 cerdos por dieta durante 17 días. Se dejó a los cerdos acceso sin restricciones a la ingestión de las dietas y agua durante todo el experimento. Para minimizar la contaminación cruzada de los corrales de control con DFM, primero se suministraba a los corrales alimentados con dietas sin DFM seguido de los corrales tratados con DFM. Después de suministrar cada tratamiento, los carros de suministro de pienso se limpiaban completamente. Los cerdos alimentados con dietas sin DFM también se pesaron y recogieron primero antes de los cerdos alimentados con las dietas que contenían DFM.

Las muestras fecales se recogieron el día 12 por toma de muestra instantánea y las muestras ileales se recogieron el día 13 y 14. Las muestras ileales se recogieron de forma continua durante 9 h empezando a las 08:00 cada día de recogida. Las cánulas se abrieron y se unieron bolsas de plástico de 225 ml al tambor de la cánula con abrazaderas de cables, lo que permitía que la digesta fluyera de la cánula a la bolsa. Las bolsas se cambiaron cada vez que se llenaban con digesta o al menos una vez cada 30 minutos. El pH en la digesta se midió en la primera bolsa recogida después de las 09:00, 11:00, 13:00 y 15:00 cada día de recogida. Después de la recogida ileal final, los cerdos se alimentaron con sus respectivas dietas experimentales durante 3 días adicionales. La comida de la mañana (a las 07:00) que se suministra al día siguiente de la última recogida ileal contenía un marcador verde. Durante las siguientes 36 h, la digesta ileal y las heces se puntuaron cada 30 min en todos los cerdos, y la primera vez que aparecía el marcador en cualquiera de estos sitios se recogió y se usó como una medida de la velocidad de paso para esta dieta particular.

Al concluir el experimento, las muestras se descongelaron y se mezclaron para el animal y la dieta, y se recogió una submuestra para el análisis químico. Todas las muestras se liofilizaron y trituraron antes del análisis. Se analizó también en todas las muestras la materia seca (MS), fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN) y lignina. Los valores para la digestibilidad ileal aparente (DIA) y del tracto total aparente (DTTA) de nutrientes se calcularon como se ha descrito previamente (Stein et al., 2007). La homogeneidad de las varianzas se confirmó y los valores atípicos se probaron usando el procedimiento Univariado (SAS Institute Inc., Cary, NC). No se detectaron valores atípicos. Los datos se analizaron usando el procedimiento MIXED. El modelo incluía el tratamiento dietético como efecto fijo mientras que el cerdo era el efecto aleatorio. Se calcularon las medias mínimo cuadráticas para cada variable independiente. El cerdo era la unidad experimental para todos los cálculos, y el nivel α usado para determinar la significación y las tendencias entre las medias era 0,05 y $\leq 0,10$, respectivamente.

El pH ileal era menor ($P = 0,03$) en cerdos alimentados con la dieta que contenía DFM de *Bacillus* en comparación con el pH ileal de los cerdos de control (tabla 28). El tratamiento dietético no afectaba a la velocidad de paso y pH fecal. Aunque no había efecto en la FDA y FDN, la adición de DFM de *Bacillus* a la dieta dio como resultado una mejor ($P < 0,03$) DIA (tabla 29) y DTTA (tabla 30) de la lignina en comparación con la dieta de control.

Estos datos indican que el DFM de bacilos disminuye el pH de la digesta ileal y mejora la digestibilidad de la lignina en dietas basadas en subproductos, muy fibrosas.

Tabla 28. Efecto de DFM de *Bacillus* en el pH y velocidad de paso de la digesta ileal y heces en cerdos en crecimiento alimentados con dietas de maíz-harina de soja que contienen 40% de DDGS¹

ítem	Control	DFM de <i>Bacillus</i>	EEM	Valor de p
<u>pH</u>				
Digesta ileal	6,78	6,64	0,04	0,03
Heces	6,05	6,14	0,08	0,48
<u>Velocidad de paso, h</u>				
Digesta ileal	5,29	4,82	0,25	0,19
Heces	30,67	29,29	1,03	0,36

Tabla 29. Efecto de DFM de *Bacillus* en la digestibilidad ileal aparente (DIA, %) de nutrientes fibrosos en cerdos en crecimiento alimentados con dietas de maíz-harina de soja que contienen 40% de DDGS¹

	Control	DFM de <i>Bacillus</i>	EEM	Valor de p
FDA	10,0	6,5	2,6	0,35
FDN	25,4	19,7	2,7	0,80
Lignina	30,9	37,0	1,8	0,02

¹ Los datos son las medias mínimo cuadráticas de 6 observaciones para todos los tratamientos.

Tabla 30. Efecto de DFM de *Bacillus* en la digestibilidad del tracto total aparente (DTTA, %) de nutrientes fibrosos en cerdos en crecimiento alimentados con dietas de maíz-harina de soja que contienen 40% de DDGS¹

	Control	DFM de <i>Bacillus</i>	EEM	Valor de p
FDA	32,4	32,8	2,5	0,92
FDN	42,2	39,3	2,3	0,39
Lignina	10,4	28,5	3,0	<0,001

¹ Los datos son las medias mínimo cuadráticas de 6 observaciones para todos los tratamientos.

Ejemplo de referencia 13

Efectos antiinflamatorios de cepas de *Bacillus* en una línea celular de macrófagos HD11 de pollo

Se usó la línea celular de macrófagos HD11 de pollo para determinar la respuesta inflamatoria a LPS y determinar el potencial de las cepas de *Bacillus* del producto microbiano de alimentación directa para aliviar la inflamación asociada con una infección bacteriana Gram negativa. Las cepas de *Bacillus* se cribaron en un ensayo de cultivo celular para determinar los cambios en las respuestas de la expresión de genes de citoquinas inflamatorias a LPS y cada una de las cepas de *Bacillus* (*Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), y *Bacillus subtilis* AGTP BS944 (NRRL B-50548).

Las células HD11 se incubaron: (1) solas (no estimuladas); (2) con LPS; (3) con cada cepa de *Bacillus* y (4) con LPS + cepa de *Bacillus*. El diseño del modelo de placa se ilustra en la figura 22.

Las células HD11 se cultivaron hasta confluencia y se sembraron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos con medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) sin antibióticos que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS; Atlanta Biologicals, Inc., Lawrenceville, GA). Una vez confluentes, se retiraron los medios y se administraron los tratamientos en medios sin antibióticos y después se incubaron durante 1 hora a 41°C. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en 380 µl de TRIzol (Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) durante 5 minutos. Las muestras se retiraron de las placas, se pusieron en tubos de microcentrifuga de 2 ml, se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80°C hasta el aislamiento del ARN. Para separar el ARN de la fase orgánica, se utilizaron tubos con Phase Lock Gel pesado de 2 ml (Five Prime, Inc., Gaithersburg, MD). El lavado del ARN se hizo usando el mini kit RNeasy (Qiagen, Inc., Valencia, CA) y la digestión con ADNasa se hizo con el kit de ADNasa sin ARNasa (Qiagen). El ADNc se sintetizó usando el ADNc SuperMix qScript (VWR, Radnor, PA) inmediatamente después del aislamiento del ARN.

Se usó la PCR en tiempo real para determinar la expresión génica de las células HD11 usando conjuntos de cebadores presentados en la tabla 31. Se usó β-actina como un gen de referencia. Se realizó ANOVA de una vía por el procedimiento Proc Mixed de SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Las medias se separaron por la prueba de Student-Newman-Keuls, nivel de significación α = 0,10.

Tabla 31. Conjuntos de cebadores específicos de pollos usados en el ensayo de cribado.

Nombre del cebador	Secuencia de cebadores	Producto de PCR (pb)
IL-1β	D: 5'-AGGTCAACATCGCCACCTAC-3' (SEQ ID NO.7) I: 5'-CAACGGGACGGTAATGAAAC-3' (SEQ ID NO.8)	196
IL-8	D: 5'-GCTCTGTCGCAAGGTAGGAC-3' (SEQ ID NO.9) I: 5'-GGCCATAAGTGCCTTTACGA-3' (SEQ ID NO. 10)	231
β-actina	D: 5'- ATGAAGCCCAGAGCAAAAAGA-3' (SEQ ID NO. 11) I: 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3' (SEQ ID NO. 12)	223

La exposición a lipopolisacáridos en la línea celular de macrófagos de pollo HD11 producía un aumento (P <0,01) en la expresión génica de las citoquinas inflamatorias, interleuquina (IL)-1β e IL-8, en comparación con las células HD11 no estimuladas (figura 23). Cuando se añadió la cepa AGTP BS1013 a las células HD11 con LPS en estado de esporas, esta cepa de *Bacillus* disminuyó (P <0,01) la expresión génica de las citoquinas inflamatorias, IL-1 β e IL-8, que resultaban de la administración de LPS solo y era más similar al perfil de expresión génica de las células HD11 no estimuladas. Además, la respuesta de las células de pollo a LPS en presencia de la cepa de *Bacillus* BS1013 vegetativa era numéricamente más baja, al igual que la cepa de *Bacillus* AGTP BS3BP5 en estado de esporas, y las células en esporas y vegetativas de la cepa de *Bacillus* AGTP BS944.

Estos datos demuestran la eficacia de las cepas de *Bacillus* de DFM para aliviar la inflamación asociada con una infección bacteriana, y su eficacia en las especies aviares. Las cepas de *Bacillus* de DFM se pueden usar para aliviar la inflamación de macrófagos. Además, las cepas de *Bacillus* de DFM se pueden usar para aliviar las infecciones bacterianas Gram negativas, y los efectos de estas infecciones bacterianas.

Ejemplo de referencia 14

Efectos antiinflamatorios de cepas de *Bacillus* en una línea celular epitelial intestinal de rata (IEC-6)

Se usó la línea celular epitelial intestinal de rata IEC-6 para determinar la respuesta inflamatoria a LPS y determinar el potencial de las cepas de *Bacillus* del producto microbiano de alimentación directa para aliviar la inflamación asociada con una infección bacteriana Gram negativa. Las cepas de *Bacillus* se cribaron en un ensayo de cultivo celular para determinar cambios en las respuestas de expresión génica de citoquinas inflamatorias a LPS y cada una de las cepas de *Bacillus* (*Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), y *Bacillus subtilis* AGTP BS944 (NRRL B-50548), *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544), *Bacillus subtilis* AGTP BS 442 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545), y *Bacillus subtilis* AGTP

BS918 (NRRL B-50508)). Se podían usar cepas de bacilos adicionales que incluyen, pero no se limitan a *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068, (NRRL B-50543) y *Bacillus pumilus* KX11-1 (NRRL B-50546).

Las células IEC-6 se incubaron: (1) solas (no estimuladas); (2) con LPS; (3) con cada cepa de *Bacillus* de DFM y (4) con LPS + cepa de *Bacillus*. El diseño del modelo de placa se ilustra en la figura 24.

5 Las células IEC-6 se cultivaron hasta confluencia y se sembraron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) que contenía 10% de FBS (Atlanta Biologicals, Inc., Lawrenceville, GA) y 1% de antibióticos-antimicóticos (Atlanta Biologicals). Una vez que las placas eran confluentes, las células IEC-6 se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los tratamientos se administraron en medios sin antibióticos y después se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en 380 µl de TRIzol (Invitrogen) durante 5 minutos.

15 Las muestras se retiraron de las placas, se colocaron en tubos de microcentrifuga de 2 ml, se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80°C hasta el aislamiento del ARN. Para separar el ARN de la fase orgánica, se usaron tubos con Phase Lock Gel pesado de 2 ml (Five Prime, Inc., Gaithersburg, MD). El lavado del ARN se hizo usando el mini kit RNeasy (Qiagen, Inc., Valencia, CA) y la digestión con ADNasa se hizo con el kit de ADNasa sin ARNasa (Qiagen). El ADNc se sintetizó usando el ADNc SuperMix qScript (VWR, Radnor, PA) inmediatamente después del aislamiento del ARN.

20 Se usó la PCR en tiempo real para determinar la expresión génica de las células IEC-6 usando conjuntos de cebadores presentados en la tabla 32. Se usó β-actina como un gen de referencia. Se realizó ANOVA de una vía por el procedimiento Proc Mixed de SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Las medias se separaron por la prueba de Student-Newman-Keuls, nivel de significación α = 0,10.

Tabla 32. Conjuntos de cebadores específicos de rata usados en el ensayo de cribado.

Nombre del cebador	Secuencia de cebadores	Producto de PCR (pb)
TNF-α	D: 5'-GGCAGCCTTGCCCTTGAAGAG-3' (SEQ ID NO. 13)	171
	I: 5'-GTAGCCCACGTCGTAGCAAACC-3' (SE ID NO. 14)	
β-actina	D: 5'-TGACGAGGCCAGAGCAAGA-3' (SEQ ID NO. 15)	331
	I: 5'-ATGGGCACAGTGTGGGTGAC-3' (SEQ ID NO. 16)	

25 La exposición a lipopolisacáridos en la línea celular epitelial intestinal de rata IEC-6 producía un aumento (P <0,01) en la expresión génica de la citoquina inflamatoria, TNF-α, en comparación con las células IEC-6 no estimuladas (figura 25). Las cepas de bacilos BS1013 y BS1069 disminuían (P <0,10) la expresión del gen de TNF-α que resultaba de la administración de LPS solo, cuando estaban en estados de esporas o vegetativos. Las cepas de bacilos BS3BP5, BS442 y BS521 también disminuían (P <0,10) la expresión del gen de TNF-α que resultaba de la administración de LPS solo, pero solo cuando estaban en forma de esporas. A la inversa, la cepa de bacilo BS918 disminuía (P <0,10) la expresión génica de TNF-α que resultaba de la administración de LPS solo, pero solo en su forma vegetativa.

30 Estos datos demuestran la eficacia de las cepas de bacilos de DFM para aliviar la inflamación asociada con una infección bacteriana, y su eficacia en las especies de mamíferos. Las cepas de bacilos de DFM se pueden usar para aliviar la inflamación de macrófagos. Además, las cepas de bacilos de DFM se pueden usar para aliviar las infecciones bacterianas Gram negativas, y los efectos de estas infecciones bacterianas.

35 Ejemplo 15

Eficacia de un producto DFM de *Bacillus* para reducir la formación de espuma en sistemas comerciales de almacenamiento de estiércol porcino de fosa profunda.

40 Los sistemas de fosas profundas de estiércol porcino son comunes en el medio oeste de los EE.UU. y tienen un alto potencial de formación de espuma. Se cree que esto es el resultado de la inclusión cada vez mayor de subproductos fibrosos en el pienso porcino y los cambios resultantes en la ecología microbiana y las características de fermentación en el estiércol almacenado. Se evaluó la eficacia de un producto DFM de tres cepas de *Bacillus* para determinar si su aplicación en fosas de estiércol porcino podía alterar positivamente el perfil de fermentación microbiana de las fosas de estiércol y proporcionar una herramienta para el control de la espuma en las fosas. Se seleccionaron cinco sitios de producción, cada uno con tres establos de crecimiento-finalización idénticos (1400 cabezas cada uno) sobre sistemas de fosas profundas individuales para la evaluación. Tradicionalmente, todos los sitios tenían un riesgo alto de producción de espuma basándose en los altos niveles de inclusión de granos secos de destilería que contienen solubles (DDGS) y otros ingredientes subproductos fibrosos en las dietas y en las incidencias históricas pasadas de formación de espuma.

Para cada una de las 3 fosas por sitio, se estableció una toma de muestra de valor inicial antes de iniciar el ensayo, usando un tubo de PVC de 2,54 cm (1') equipado con una válvula de bola para atrapar la muestra. Para cada toma de muestra, se midió la profundidad del líquido y la profundidad de la espuma y se calculó la relación líquido:espuma para ajustarse a los volúmenes variables de la fosa a lo largo de la duración del estudio, ya que los volúmenes de las fosas variaron enormemente después de la toma de muestras de 21 días. El producto ensayado consistía en proporciones iguales de las cepas AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) y AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) como para los ejemplos 9 y 10. Se pueden usar otras cepas de bacilos que incluyen, pero no se limitan a *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, y *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, y *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 y *Bacillus pumilus* KX11-1.

Se aplicaron directamente a la fosa de estiércol dos tasas de inclusión de producto de *Bacillus* y se realizaron los ensayos frente a las fosas de control no tratadas. El inoculante de la fosa de bacilos se aplicó con una tasa de 5,3 x 10⁴ ufc/ml de estiércol que es equivalente a la tasa de inoculación si se suministra al animal 1,5 x 10⁵ ufc/g de pienso y un aumento de dosis de 2,5 veces (2,5X) aplicados a la fosa de estiércol en una tasa de 1,3 x 10⁶ ufc/ml de estiércol. El producto de *Bacillus* se volvió a aplicar cada 60 días a lo largo de la duración completa del ensayo de 170 días. Los datos se analizaron usando ANOVA de una vía por el procedimiento Proc Mixed de SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC) con mediciones repetidas para la detección a lo largo del tiempo. Nivel de significación $\alpha = 0,10$, las medias se separaron mediante la prueba de diferencia de mínimos cuadrados (LSD).

No había diferencias en la profundidad de la espuma, profundidad del líquido o la relación espuma:líquido entre las fosas en los sitios identificados para el ensayo (tabla 33). Sin embargo, tres semanas después de las aplicaciones de tratamiento, la profundidad de la espuma disminuyó ($P = 0,03$) en las fosas tratadas con el inoculante de fosa de *Bacillus* en cualquiera de las tasas de aplicación en comparación con las fosas sin tratar. La profundidad del líquido no difería entre los tres tratamientos tres semanas después de la aplicación del inoculante de fosa de *Bacillus*, produciendo una disminución ($P = 0,01$) de la relación de espuma:líquido cuando se aplicó el inoculante de fosa de *Bacillus* en cualquier tasa de aplicación en comparación con las fosas sin tratar. La relación de espuma:líquido también se redujo ($P < 0,10$) con el inoculante de *Bacillus* en cualquier tasa de aplicación en comparación con las fosas de control, cuando los valores se promediaron en los tres puntos de toma de muestra en el transcurso del ensayo de 170 días (tabla 34). Los datos indican que la mayor tasa de inclusión del inoculante de bacilos daba como resultado una reducción más consistente de la espuma durante el transcurso del estudio (figura 26).

Estos datos indican que el uso de un inoculante de tres cepas de *Bacillus* aplicado directamente a las instalaciones de almacenamiento de estiércol porcino de fosa profunda controla la acumulación de espuma.

Tabla 33. Comparación de las características de la espuma entre el valor inicial y la toma de muestra de 21 días promediadas en los 5 sitios del ensayo.

Tratamiento de la fosa	Antes de la aplicación			Día 21 después de la 1ª aplicación		
	profundidad de la espuma (cm (pies))	profundidad del líquido (cm (pies))	espuma: líquido	profundidad de la espuma (cm (pies))	profundidad del líquido (cm (pies))	espuma: líquido
Control	12,50 (0,41)	59,14 (1,94)	0,21	35,36 (1,16) ^b	89,02 (2,92)	0,26 ^b
1,0x <i>Bacillus</i>	6,71 (0,22)	55,79 (1,83)	0,12	21,34 (0,60) ^a	87,49 (2,87)	0,14 ^a
2,5x <i>Bacillus</i>	5,18 (0,17)	63,41 (2,08)	0,09	18,29 (0,70) ^a	91,15 (2,99)	0,13 ^a
Valor de p	0,378	0,856	0,311	0,031	0,945	0,011
EEM ¹	0,08	0,09	0,04	0,10	0,14	0,02

^{a, b} Los promedios con superíndices diferentes eran significativamente diferentes ($P \leq 0,10$), las medias se separaron usando LSD; ¹EEM, error estándar de la media.

Tabla 34. Comparación de las características de la espuma promediadas de las 3 tomas de muestras en el periodo de ensayo de 170 días.

Tratamiento de fosa	Media Espuma:Líquido
Control	0,23 ^b
1,0x <i>Bacillus</i>	0,15 ^a
2,5x <i>Bacillus</i>	0,10 ^a
Valor de p	0,049
EEM ¹	0,03

^{a, b} Los promedios con superíndices diferentes eran significativamente diferentes ($P \leq 0,10$), las medias se separaron usando LSD; ¹EEM, error estándar de la media.

Ejemplo 16

La aplicación directa del producto de *Bacillus* en fosas de estiércol en sitios comerciales de crecimiento-finalización altera las características del estiércol.

5 Para comparar la eficacia de un producto de fosa de tres cepas de *Bacillus* que contiene las cepas AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) y AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) en proporciones iguales, con un producto comercial actual de tratamiento de residuos de estiércol porcino (MicroSource S®; DSM), el producto de tres cepas de *Bacillus* se aplicó directamente a las fosas de estiércol de tres sitios de producción comercial en el medio oeste de los EE.UU. que estaban suministrando actualmente MicroSource S®. Se pueden usar otras cepas de bacilos que incluyen, pero no se limitan a *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, y *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, y *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 y *Bacillus pumilus* KX11-1.

10 El producto de *Bacillus* se ensayó en tres sitios de producción durante un período de 60 días para determinar si podía mejorar las características de gestión del estiércol frente al efecto de la administración de MicroSource S® en el pienso porcino. Cada sitio consistía en dos salas idénticas con fosas de estiércol individuales y una capacidad para 2250 cerdos comerciales. Por sitio, se usó un establo como control no tratado mientras que otro establo recibía el tratamiento de fosa de *Bacillus*. Para las fosas tratadas, la tasa de inclusión del producto de *Bacillus* se basó en el volumen de estiércol, con una tasa de aplicación de $5,3 \times 10^4$ ufc/ml de estiércol. El volumen inicial de las fosas de estiércol porcino en el ensayo, se calculó que era 454.249,4 litros (120.000 galones) de estiércol, por lo tanto, se aplicó un total de $2,4 \times 10^{13}$ ufc de producto de *Bacillus* directamente a la fosa.

15 Se tomaron muestras de las fosas de control y tratamiento antes y 60 días después de la aplicación del producto de *Bacillus*. La toma de muestra en toda la profundidad de la fosa se llevó a cabo usando un tubo de PVC de 2,54 cm (1") equipado con una válvula de esfera para atrapar la muestra. El indicador del ensayo de las características del estiércol mejoradas se determinó que era el menor % de sólidos después de 60 días de tratamiento. Se llevó a cabo la prueba no paramétrica Jonckheere-Terpstra unilateral con estadísticas exactas y nivel de significación $\alpha = 0,10$ usando el software estadístico SPSS (v. 17.0, IBM Corp., Armonk, NY), para analizar la diferencia entre el % de sólidos antes y después de la aplicación del tratamiento probando las diferencias medias.

20 No había diferencia en el promedio de sólidos del estiércol entre ninguno de los sitios del ensayo, en los que se incluyó MicroSource S® como procedimiento operativo estándar en todos (tabla 35). Sin embargo, hubo una reducción de 24,3% ($P = 0,10$) en los sólidos en los 3 sitios vigilados cuando se añadió el inoculante de tres cepas *Bacillus* a la fosa de estiércol. Estos datos indican que la aplicación del inoculante de tres cepas de *Bacillus* mejora las características de gestión del estiércol, como lo indica la reducción en el porcentaje de sólidos por encima del producto comercial MicroSource S®.

Tabla 35. Reducción de sólidos después de 60 días tras la aplicación del producto de fosa de *Bacillus* a fosas de estiércol de tratamiento en comparación con fosas de estiércol de control en el mismo sitio de producción.

Sitio - Establo	Tratamiento	Sólidos (%)		% diferencia (antes frente a después)
		antes de la aplicación	60 días después de la aplicación	
1 - Norte	Control	9,58	10,02	+4,6
1 - Sur	<i>Bacillus</i>	10,21	5,70	-44,2
2 - Norte	Control	7,03	7,68	+9,3
2 - Sur	<i>Bacillus</i>	8,31	8,35	+0,5
3 - Norte	Control	8,44	7,27	-13,9
3 - Sur	<i>Bacillus</i>	7,26	5,14	-29,2
Promedio	Control			+/-0,0 ^a
	<i>Bacillus</i>			-24,3 ^b
<i>Valor de p</i> (EEM ¹)				0,100 (8,60)

¹ EEM, error estándar de la media,

Ejemplo 17

35 Comparación del efecto de un producto microbiano de alimentación directa de tres cepas de *Bacillus* y MicroSource S® en el rendimiento productivo de cerdos en crecimiento.

Se llevó a cabo un estudio para comparar la eficacia de un nuevo producto DFM de tres cepas de *Bacillus* y MicroSource S® (DSM) para mejorar el rendimiento productivo de cerdos en crecimiento. Un total de 144 cerdos (peso corporal inicial: aproximadamente 23 kg) se incluyeron en el ensayo y se encerraron en 36 corrales con cuatro

5 cerdos/corral en una instalación de cerdos en crecimiento con control ambiental. Se asignó un de tres tratamientos dietéticos a cada corral (12 repeticiones/tratamiento) y se suministraron durante las 6 semanas de duración del estudio. Los tratamientos consistían en una dieta base de control, un producto microbiano de alimentación directa (DFM) de tres cepas de *Bacillus* y MicroSource S® (DSM), que es un producto DFM comercial de tratamiento de residuos porcinos basado en *Bacillus*.

10 La dieta base se formuló para contener un 50% de subproducto (35% de DDGS y 15% de harinillas de trigo; tabla 36). Se añadió fitasa (500 UTF/kg) a todas las dietas. El producto DFM de *Bacillus* nuevo consistía en proporciones iguales de cepas de *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) y AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) en una cantidad para garantizar $3,0 \times 10^8$ ufc/g de producto DFM, incluido en una tasa de 0,113 kg/ton (0,25 lb/ton) en el pienso dando como resultado una concentración de $3,75 \times 10^4$ ufc/g en la dieta. Se pueden usar otras cepas de bacilos que incluyen, pero no se limitan a *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, y *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, y *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 y *Bacillus pumilus* KX11-1.

Tabla 36. Composiciones de las dietas base

Ingredientes, %	
Maíz, %	26,510
DDGS, %	35,00
Harinillas de trigo	15,00
SBM, 48%	19,00
HP DDG	0,00
Aceite de soja	1,00
Almidón de maíz	1,00
Caliza	1,25
DCP	0,00
Lisina HCL	0,45
DL-Met	0,04
L-treonina	0,03
L-triptófano	0,00
Sal	0,40
Mezcla vit-min	0,30
Fitasa	0,02
Total	100,00
Composición calculada, %	
EM, kcal/kg	3315
PC	23,20
Lys dig	1,17
Met dig	0,39
M+C dig	0,74
Thr dig	0,73
Tryp dig	0,20
Ca	0,63
P total	0,61
P dig	0,35

15 Se incluyó MicroSource S® en la dieta en 0,454 kg/ton (1 lb/ton) de pienso, dando como resultado $7,5 \times 10^4$ ufc/g en la dieta. Se determinaron la ganancia de peso corporal del cerdo y el consumo de pienso del corral el d 21 y d 42 del ensayo, y se calcularon la ganancia media diaria (GMD), consumo medio diario de pienso (CMDP) y ganancia:pienso (G:P).

5 Los cerdos alimentados con dietas complementadas con el nuevo producto DFM de *Bacillus* tuvieron una mayor GMD del d 0 al 21 del ensayo que los cerdos alimentados con dietas de control o dietas complementadas con el producto DFM comercial, Microsource S® (tabla 37). Este aumento en la ganancia diaria tendió a dar como resultado un mayor peso corporal ($P < 0,10$) en cerdos alimentados con el nuevo DFM de *Bacillus* en el d 21 del estudio en comparación con los otros dos tratamientos. Estos datos indican que el nuevo DFM de *Bacillus* mejora la ganancia de peso corporal en cerdos en crecimiento en comparación con un producto DFM basado en *Bacillus* comercial existente (MicroSource S®).

Tabla 37. Rendimiento productivo de cerdos alimentados con el nuevo producto DFM de *Bacillus* en comparación con MicroSource S®.

ítem	Dieta				Valor de <i>p</i>
	Control	DFM de <i>Bacillus</i>	Microsource S®	EEM	
<u>d 0-21</u>					
PC inicial, kg	23,89	23,87	23,77	1,04	0,6317
GMD, kg	0,77^b	0,82^a	0,77^b	0,02	0,0435
CMDP, kg	1,47	1,53	1,43	0,05	0,0640
G:P, kg/kg	0,53	0,54	0,54	0,02	0,1602
PC final, kg	40,09^d	41,09^c	39,94^d	1,19	0,0673
<u>d 21-42</u>					
GDM, kg	0,96	0,94	0,88	0,04	0,4593
CMDP, kg	1,45	1,38	1,23	0,12	0,5022
G:P, kg/kg	0,66	0,69	0,75	0,05	0,6712
PC final, kg	60,17	60,75	58,32	1,64	0,2348

^{a,b} Las medias sin superíndices comunes son diferentes, $P < 0,05$.

^{c,d} Las medias sin superíndices comunes son diferentes, $P < 0,10$.

10 Ejemplo 18

Identificación de las actividades enzimáticas de nuevas cepas de *Bacillus*.

15 Se llevaron a cabo ensayos in vitro para ensayar la actividad enzimática de nuevas cepas de *Bacillus* frente a sustratos de piensos fibrosos que se encuentran normalmente en los ingredientes de piensos usados para formular dietas para cerdos y aves de corral. El cribado de alta productividad de estas cepas de ensayo se llevó a cabo por cultivo en placa en mancha por duplicado de 2 microlitros de cultivo líquido en 15,0 ml de diferentes tipos de medios de sustratos de interés en placas con rejilla de 100x100x15 mm. Las actividades de celulasa, xilanasa y β -mananasa se determinaron basándose en el uso de sustrato específico por las cepas individuales.

20 Los componentes de los medios usados para ensayar las propiedades de uso de sustratos a partir de la actividad enzimática de las cepas de origen ambiental, se describen en la tabla 38. Las placas de ensayo se dejaron secar durante 30 minutos después de la aplicación del cultivo, y después se incubaron a 32°C durante 24 horas. Las actividades enzimáticas para cada cepa se determinaron midiendo la zona de degradación del sustrato en milímetros, indicado por la transparencia del borde alrededor del crecimiento de la colonia. Se registraron los valores medios de las placas por duplicado.

25 Tabla 38. Componentes de los medios usados para ensayar las actividades enzimáticas ilustradas por las propiedades de uso de sustratos de bacilos de origen ambiental

Ensayo en placa	Composición del medio	Requisitos de visualización extra
Celulasa	0,1% de sulfato amónico, 0,1% de fosfato potásico dibásico, 0,1% de extracto de levadura, 1,0% de polipeptona, 1,5% de agar, 0,75% de carboximetilcelulosa (CMC).	30 minutos tinción con colorante rojo Congo al 0,05%, seguido de lavado con NaCl 1 M
Xilanasa	Agar nutritivo, 2% de xilano	Ninguno; Medir la zona de transparencia en medio opaco
β -Mananasa	Agar nutritivo, 0,6% de goma de algarrobbilla	Solución de tinción de yodo al 0,05%

En la tabla 39 se dan las actividades enzimáticas de degradación fibrolítica de varias cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*. Todas las cepas presentaban actividad de degradación frente a al menos dos de los tres sustratos fibrosos evaluados. Estos datos indican que estas nuevas cepas de *Bacillus* tienen capacidad de degradación enzimática frente a celulosa, xilano y β-manosa.

5 Tabla 39. Actividades de celulasa, xilanasa y β-mananasa de cepas de *Bacillus*

Nombre del aislado	CMCase (celulasa)	Xilanasa	β-Mananasa
BS3BP5	3,3	3,0	N / A
BS442	1,8	2,5	2,0
BS521	6,0	4,0	2,0
BS918	4,0	5,5	3,3
BS1013	6,5	4,0	2,5
BP1068	3,0	6,0	4,5
BS1069	4,0	4,0	2,5
BS944	6,5	3,5	1,0
KXII-1**	2,5	5,0	N/A
** Cepa que no está dentro del alcance de la presente invención reivindicada.			

Ejemplo 19

Efecto de complementar con un producto microbiano de alimentación directa (DFM) de *Bacillus* el pienso en la carga bacteriana residual después del lavado en una instalación comercial de crecimiento-finalización.

10 Para determinar el rendimiento productivo de cerdos alimentados con dietas comerciales basadas en maíz-soja con cantidades crecientes de subproducto, se llevó a cabo un estudio de fases de crecimiento a finalización. Se destetaron un total de 1040 cerdos aproximadamente a las 3 semanas de edad y se destetaron usando una dieta estándar comercial de iniciación. Los animales se separaron por género, se distribuyeron en 40 corrales en el ensayo y se alimentaron por fases. Desde el día 42 en adelante, se incluyó un producto microbiano de alimentación

15 directa que consistía en proporciones iguales de cepas de *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) y AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) en una cantidad para garantizar 3,0 x 10⁸ ufc/g de producto DFM, en una tasa de 0,454 kg/ton (1 lb/ton) en el pienso dando como resultado una concentración de 1,5 x 10⁵ ufc/g en la dieta (tabla 40). Se pueden usar otras cepas de bacilos que incluyen, pero no se limitan a *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, y *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, y *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 y *Bacillus pumilus* KX11-1.

20 Tabla 40. Fases de alimentación y composición de la dieta.¹

Fase -->	3) Crecimiento temprano	4) Crecimiento tardío	5) Finalización temprana	6) Finalización media	7) Finalización tardía	8) Retirada
Duración (Días) -->	42-63	63 - 84	84 - 105	105-126	126 - 151	151+
Ingrediente (%)						
Maíz	28,2	31,9	35,4	37,4	41,0	71,5
SBM (46,5% de PC)	18,2	14,5	11,3	9,4	5,8	6,0
Suero secado por atomización	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Harina de pescado menh. sel.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
cDDGS	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	20,0
Harinillas de trigo	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	0,0
Grasa	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,050
MCP (21% de P)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,550
Caliza (CaCO ₂)	1,475	1,470	1,450	1,415	1,400	1,150
Sal	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,300

Fase -->	3) Crecimiento temprano	4) Crecimiento tardío	5) Finalización temprana	6) Finalización media	7) Finalización tardía	8) Retirada
Duración (Días) -->	42-63	63 - 84	84 - 105	105-126	126 - 151	151+
Ingrediente (%)						
Premezcla de vitaminas	0,090	0,090	0,075	0,150	0,150	0,150
Premezcla de minerales	0,125	0,125	0,085	0,150	0,150	0,150
Lisina HCl	0,470	0,400	0,350	0,200	0,200	0,150
DL-metionina	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
L-treonina	0,055	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
Phyzyme 2500TPT	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020

¹SBM, harina de soja; PC, proteína cruda; cDDGS, granos secos de destilería de maíz con solubles con un contenido de aceite de ~ 10%; Tratamiento incluido a expensas del maíz.

Después de descarga del animal, lavado y secado al aire durante 24 horas de la instalación, se determinó la carga bacteriana residual como indicador de la limpieza del corral. Las muestras se recogieron en la zona que se encontraba en la parte posterior de cada corral en la esquina más cercana al comedero, aproximadamente 30,5 cm (1 pie) desde el panel lateral y final (figura 27).

- 5 Un área de 103,2 cm² (16 pulgadas²) del suelo de la instalación se limpió con una torunda estéril prehumedecida (PocketSwab Plus, Charm Sciences, Lawrence, MA). Por el área de muestra se pasó 10 veces cada torunda y se analizó por triplicado. En los 15 segundos posteriores al procedimiento de limpieza con torunda, la torunda se puso en el lector de bioluminiscencia LUMT (Charm Sciences, Lawrence, MA). Los valores de unidades relativas de luz (URL) resultantes se registraron y promediaron por corral antes del análisis estadístico.
- 10 Los datos se analizaron usando el procedimiento NPAR1WAY de SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC) con nivel de significación $\alpha = 0,05$. Los datos indicaban una carga bacteriana significativamente reducida ($P < 0,05$) en corrales a los que se suministraban dietas que contenían DFM en comparación con dietas de control después de descargar, lavar y secar el corral (tabla 41).

15 Tabla 41. Comparación de unidades relativas de luz (URL) que indican la carga bacteriana residual en corrales comerciales a los que se suministran dietas de control o dietas con inclusión de producto microbiano de alimentación directa (DFM) después de lavado y secado al aire del establo.

Tratamiento	URL
Control	558,324 ^b
DFM	421,388 ^a
Valor de p	0,025
EEM ¹	39,231

^{a,b} Los promedios con superíndices diferentes eran significativamente diferentes ($P \leq 0,05$); ¹ EEM, error estándar de la media.

- 20 Aunque se han ilustrado y descrito realizaciones específicas en la presente memoria, los expertos en la técnica apreciarán que las realizaciones específicas mostradas se pueden sustituir por cualquier disposición que se calcule para lograr el mismo propósito. Esta solicitud se pretende que cubra cualesquiera adaptaciones o variaciones que funcionen de acuerdo con los principios de la invención como se describe. Por lo tanto, se pretende que esta invención esté limitada solo por las reivindicaciones.

Bibliografía

- Association of Analytical Chemists (AOAC) (2007). Official methods of analysis, 18th ed. AOAC, Washington, D.C.
- Liu K. 2011. Chemical composition of distillers grains, a review. *J. Agric. Food Chem* 59:1508-1526.
- Metzler-Zebeli, B. U., Hooda, S., Pieper, R., Zijlstra, R. T., Van Kessel, A. G., Mosenthin, R. y G. Gänzle (2010). Polysaccharides Modulate Bacterial Microbiota, Pathways for Butyrate Production, y Abundance of Pathogenic *Escherichia coli* in the Pig Gastrointestinal Tract; *J Appl Env Microbiol* 76(11), 3692-3701.
- NRC. 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Stein, H. H. y G. C. Shurson. 2009. The use and application of distillers dried grains with solubles in swine diets. *J. Anim. Sci.* 87:1292-1303.
- Stein, H. H., B. Seve, M. F. Fuller, P. J. Moughan, y C. F. M. de Lange. 2007. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *J. Anim. Sci.* 85:172-180.
- Spence, C., Whitehead, T. R. y M. A. Cotta (2008). Development and comparison of SYBR Green quantitative real-time PCR assays for detection and enumeration of sulfate reducing bacteria in stored swine manure. *J Appl Microbiol* 105, 2143-2152.
- Yegani M., y D. R. Korver. 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poult. Sci* 87:2052-2063.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J. y S. Hwang (2005). Group-Specific Primer and Probe Sets to Detect Methanogenic Communities Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Biotechnol Bioeng* 89, 670-679.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa de *Bacillus* aislada que tiene actividad enzimática, seleccionada del grupo que consiste en: *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 depositada como NRRL B-50510, *Bacillus subtilis* AGTP BS442 depositada como NRRL B-50542, *Bacillus subtilis* AGTP BS521 depositada como NRRL B-50545, *Bacillus subtilis* AGTP BS918 depositada como NRRL B-50508, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 depositada como NRRL B-50509, *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 depositada como NRRL B-50544, *Bacillus subtilis* AGTP 944 depositada como NRRL B-50548 y *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 depositada como NRRL B-50543.
2. Una composición que comprende líquido sobrenadante obtenido por centrifugación de uno o más cultivos de una o más cepas de la reivindicación 1.
- 10 3. Una composición que comprende dos o más cepas de la reivindicación 1.
4. La composición de la reivindicación 2, que comprende *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 depositada como NRRL B-50510, *Bacillus subtilis* AGTP BS944 depositada como NRRL B-50548, y *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 depositada como NRRL B-50509.
- 15 5. Una composición que comprende *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 depositada como NRRL B-50510, *Bacillus subtilis* AGTP BS918 depositada como NRRL B-50508, y *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 depositada como NRRL B-50509.
6. Un pienso para un animal, en donde el pienso está complementado con *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 depositada como NRRL B-50510, *Bacillus subtilis* AGTP BS918 depositada como NRRL B-50508, y *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 depositada como NRRL B-50509.
- 20 7. Uso de una cepa de la reivindicación 1, para administrar a un animal, en donde cuando la cepa se administra a un animal, la cepa proporciona una mejora no terapéutica en al menos uno los siguientes: peso corporal, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, índice de conversión, características de la canal, digestibilidad de nutrientes y problemas de residuos del estiércol en comparación con un animal de control.
- 25 8. Uso de una cepa de la reivindicación 1, para administrar a un animal, en donde cuando la cepa se administra a un animal, la cepa proporciona una mejora no terapéutica en al menos uno los siguientes: peso corporal, ganancia media diaria, consumo medio diario de pienso, índice de conversión, características de la canal, digestibilidad de nutrientes y problemas de residuos del estiércol, en al menos 2% en comparación con un animal de control.
9. Uso de una cepa de la reivindicación 7, en donde el animal es un ave de corral o cerdo.
- 30 10. La cepa de la reivindicación 1, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 depositada como NRRL B-50510.
11. La cepa de la reivindicación 1, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS442 depositada como NRRL B-50542.
12. La cepa de la reivindicación 1, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS521 depositada como NRRL B-50545.
- 35 13. La cepa de la reivindicación 1, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS918 depositada como NRRL B-50508.
14. La cepa de la reivindicación 1, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 depositada como NRRL B-50509.
- 40 15. La cepa de la reivindicación 1, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS 1068 depositada como NRRL B-50543.
16. La cepa de la reivindicación 1, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 depositada como NRRL B-50544.
17. La cepa de la reivindicación 1, en donde la cepa de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* AGTP 944 depositada como NRRL B-50548.

45

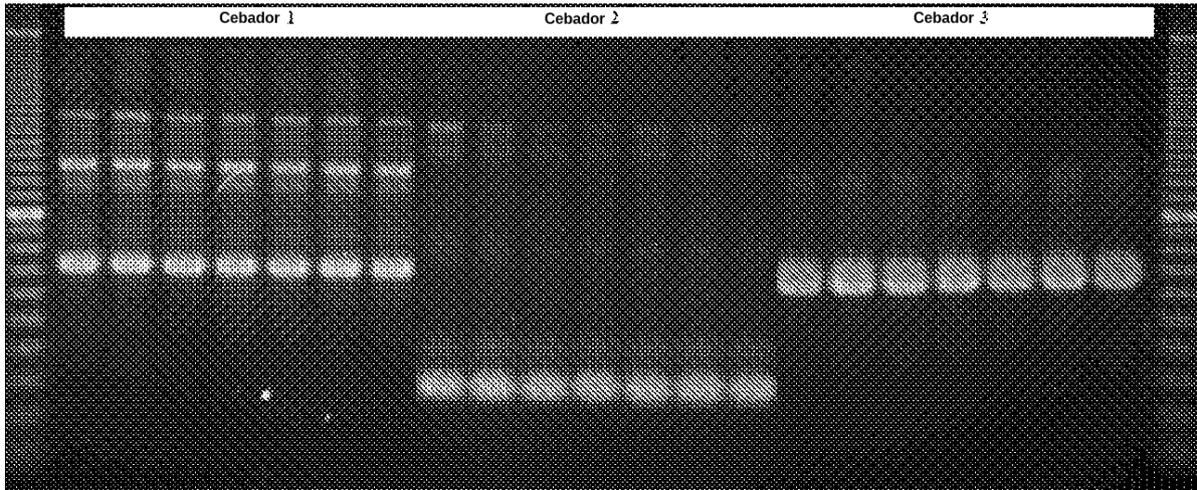


Figura 1

CTATACNTGCNAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGA
 TGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTC
 CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGT
 GGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
 CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
 ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG
 GAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT
 GGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCG
 GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTTG
 TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT
 GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTC
 CACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA
 ACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
 CAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGA
 CAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCA
 CAAATCTGTTCTCAGTTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCT
 AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
 TCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCG
 CCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGC
 GGTTGG

Figura 2

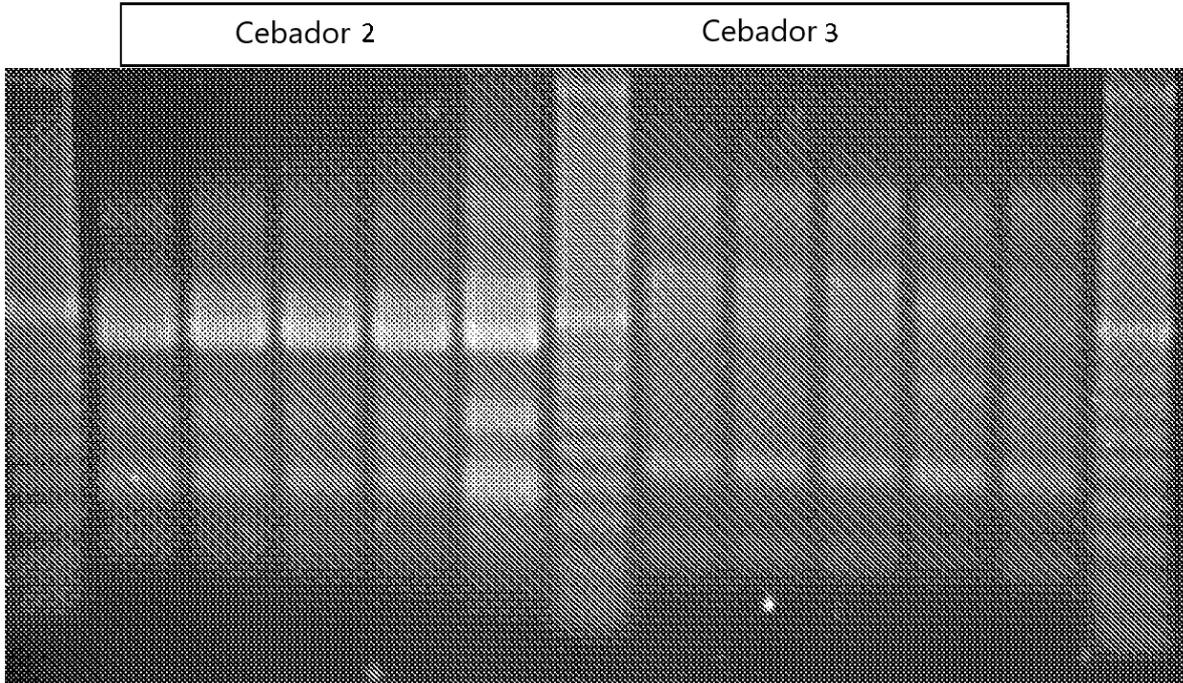


Figura 3

ACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTT
 AGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
 AAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCT
 TCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
 CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
 GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAG
 AACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC
 GTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGA
 GGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGC
 GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA
 CTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGC
 ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
 GCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
 TCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGG
 TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
 AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACA
 CGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCAATCCCACAAA
 TCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTA
 ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTAC
 ACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGA
 AGGTGGGACAGATGATTGGGGNGAAGTC

Figura 4

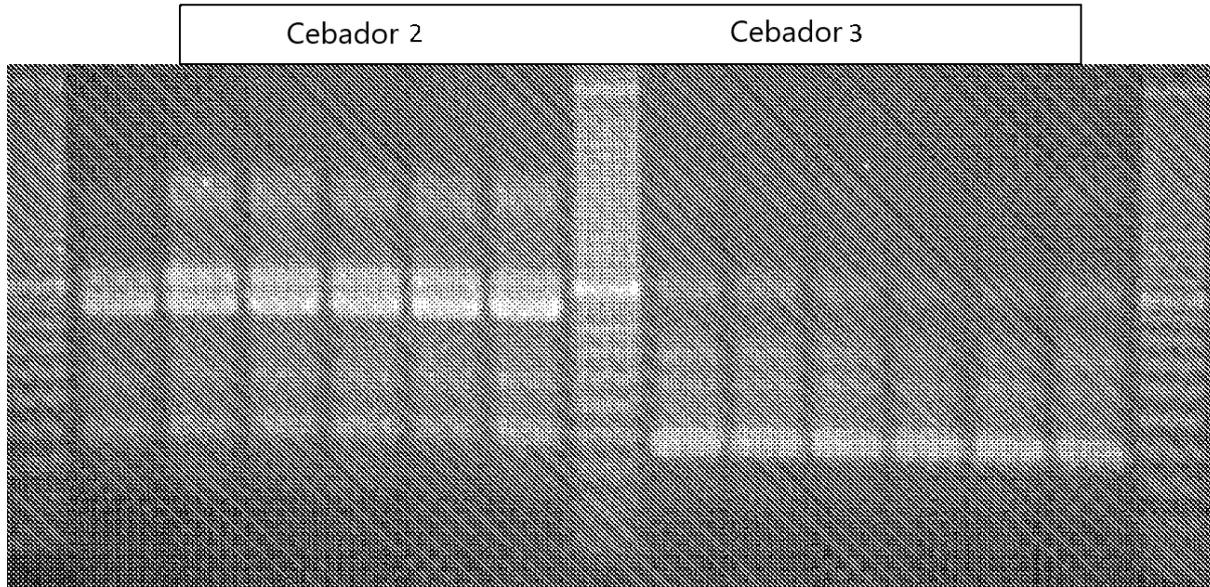


Figura 5

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGAT
 GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
 GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAAGGTG
 GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGGAATTAT
 TGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACC
 GGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTC
 TGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCT
 AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGA
 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA
 CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCCTAGAGATAGGACGTCCCCTCGGGGGCAGAGTG
 ACAGGTGGTGCATGGGTNGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTNGGGTTAAGTCCCAGCA
 ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACCTTAAGGTGACTGCC
 GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
 CTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATC
 CCACAAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATC
 GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGC
 CCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTATGGAGCCAG
 CCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGNGAAGT

Figura 6

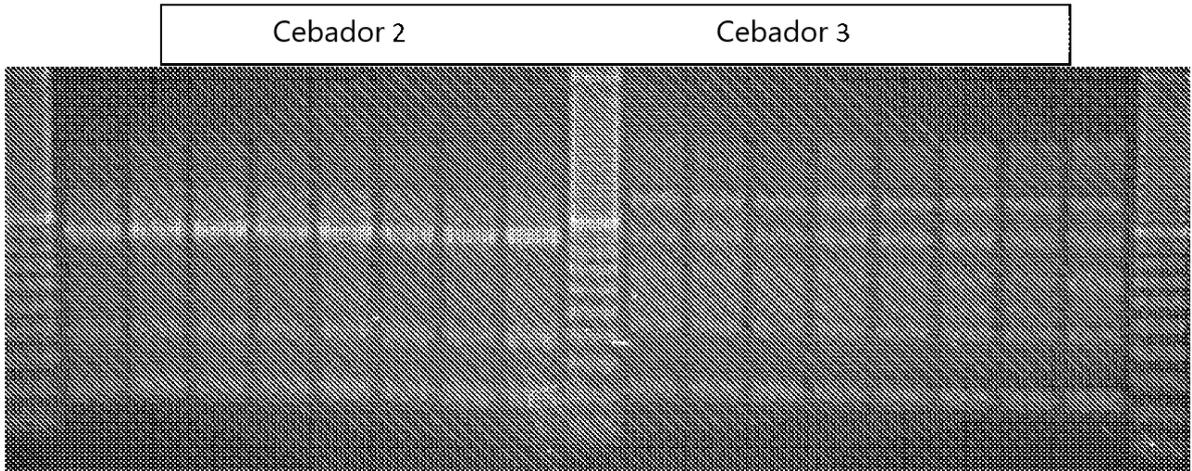


Figura 7

CNATACNTGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGAT
 GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
 GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTG
 GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCANCCCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCNGGAATTAT
 TGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACC
 GGGGAGGGTCATTGAAAACCTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGACTCTCTGGTC
 TGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC
 TAACGCANTTAAGCACTCCGCNCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAT
 TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
 TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGA
 GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
 AACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG
 GCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTTAAGCCAAT
 CCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAAT
 CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCG
 CCCGTACACCACGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCA
 GCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGNGAAGTC

Figura 8

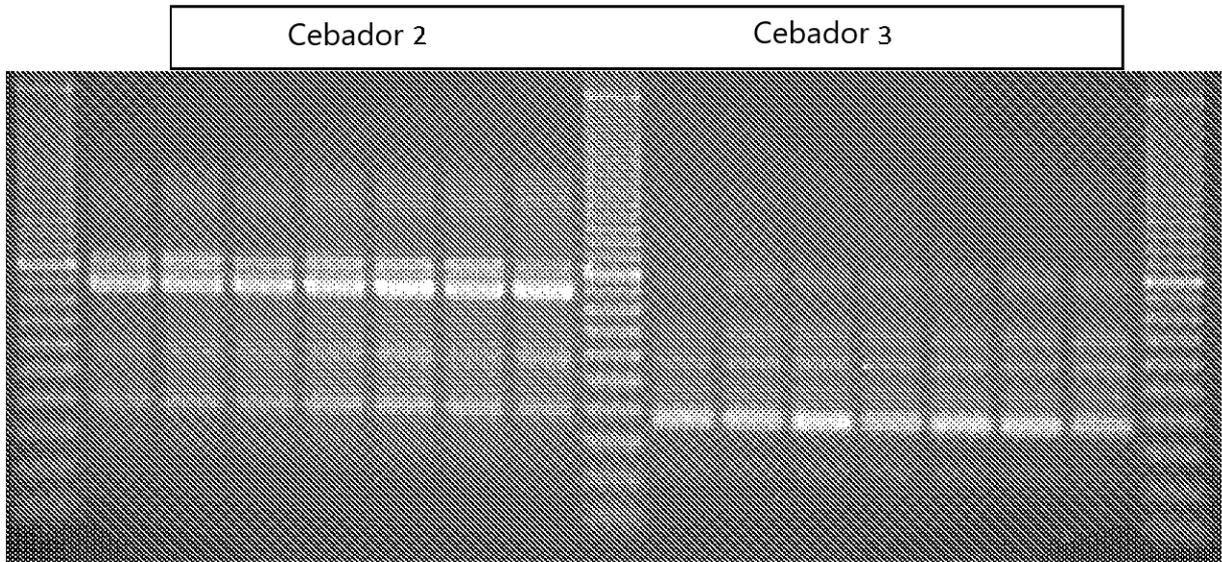


Figura 9

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGT
TAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGC
TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCTGAGTGAATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGGAATTATTGG
GCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGG
GAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAGTGC TAAGTGT TAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAAC
GCATTAAGCACTCCGCC TGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
GGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGNAAGAACCTTACC
AGGTC TTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGAC
AGGTGGTNGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACG
AGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCA
CAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
TCACACCAGGAGATTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCG
CCGAAGGTGGGACAGATGATNGGGGNGAAGTCG

Figura 10

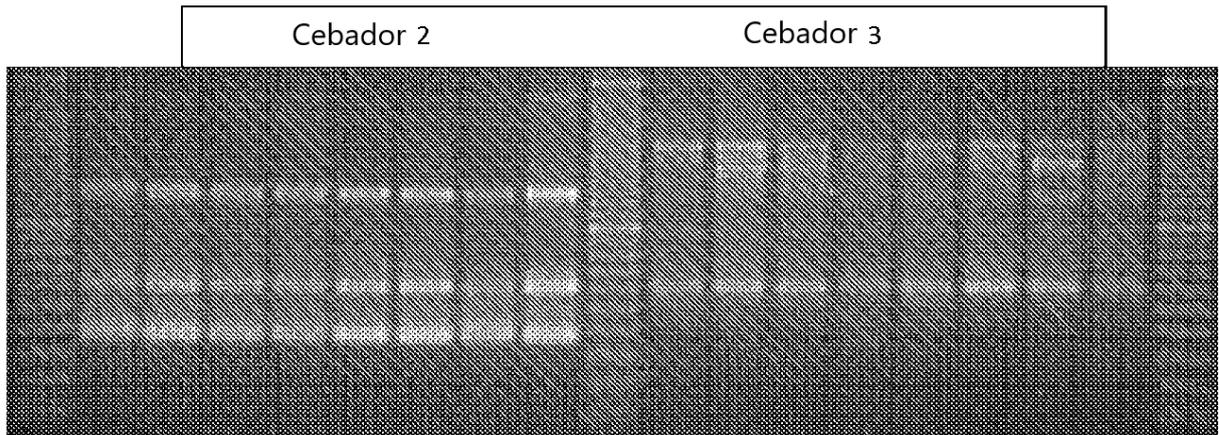


Figura 11

TATACNTGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGT
 TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
 GAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGT
 TTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTC
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTGTGTAGGGAA
 GAACAAGTGCAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTA
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCNGGAATTATTGGG
 CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGG
 AGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAG
 CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
 ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCAC
 GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG
 CATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGG
 GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAAAACCTTACCAG
 GTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAG
 GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCC GCAACGAG
 CGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
 CACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATA
 AATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAG
 TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTC
 ACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCNTTATGGAGCCAGCCGCC
 GAAGGTGGGGCAGATGATNGGGGNGAAGTC

Figura 12

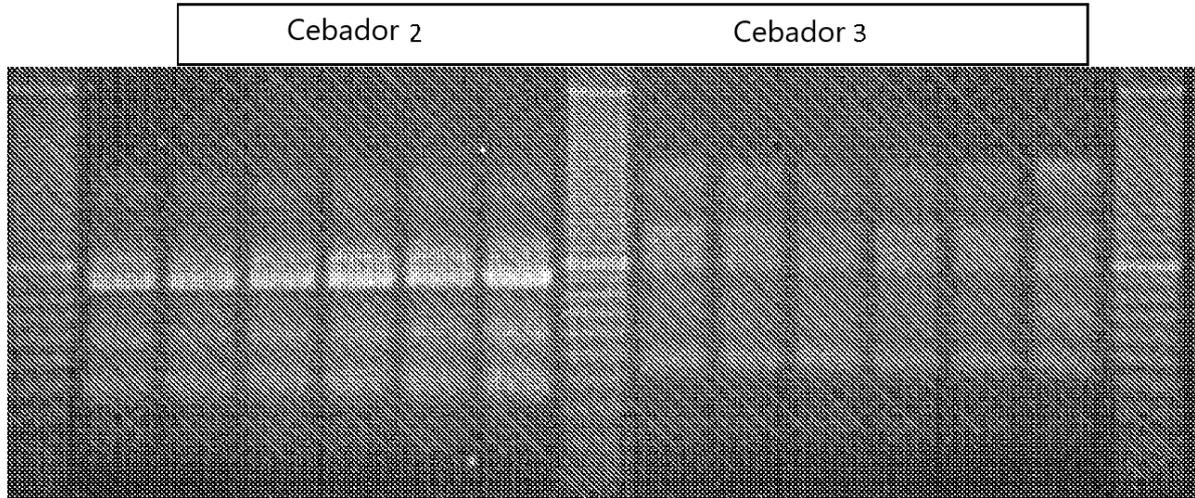


Figura 13

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATG
 TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
 GGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGG
 CTTCGGCTACCCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
 CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGC
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGGAATTATTG
 GCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGG
 GGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGT
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTG
 TAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
 ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAA
 CGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG
 GGGCCCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACC
 AGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCTCCCTTTCGGGGGCAGAGTGA
 CAGGTGGTNGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG
 GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
 TACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC
 CACAAATCTGTTCTCAGTTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCG
 CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGC
 CGCCGAAGGTGGGACAGATGANGGGGNNAAGT

Figura 14

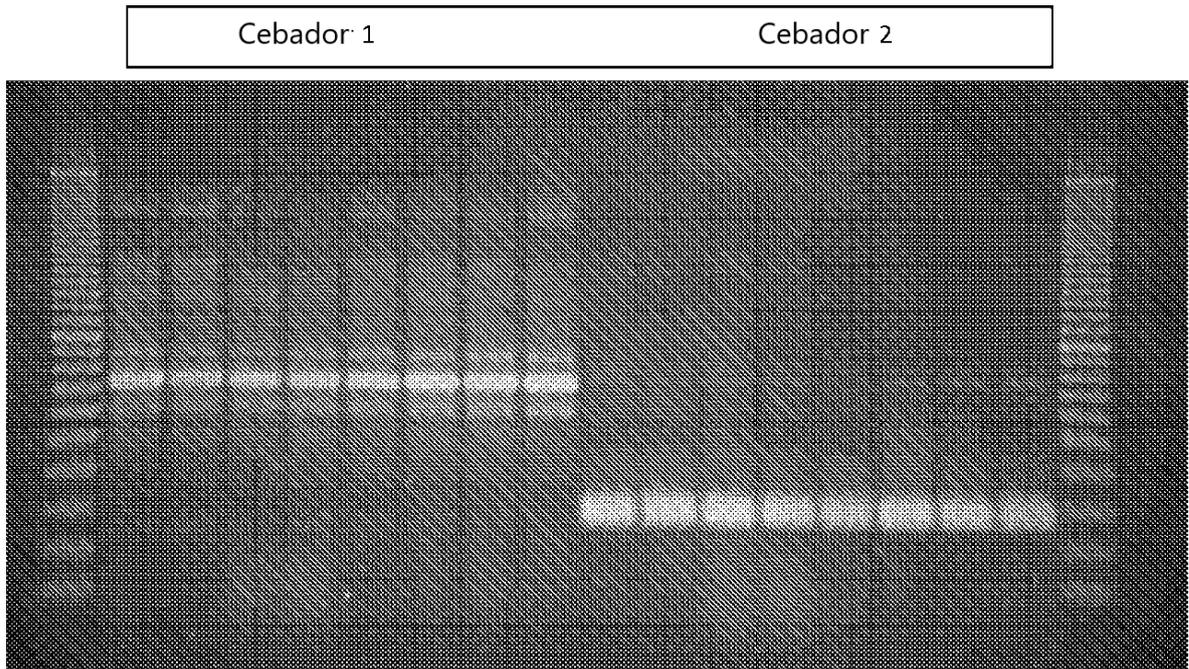


Figura 15

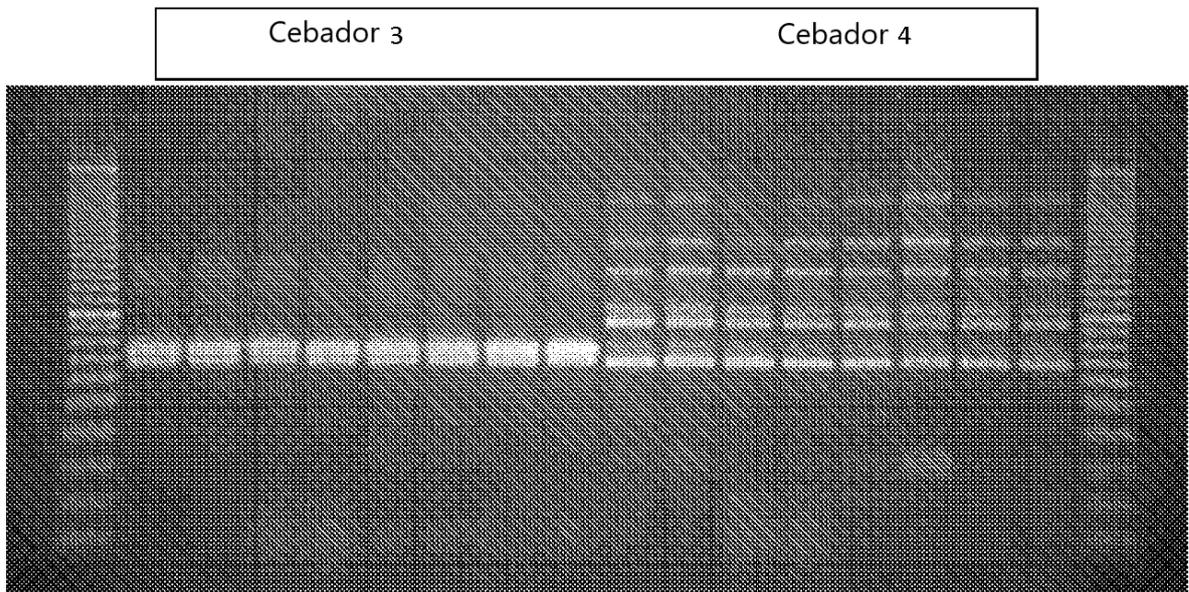


Figura 16

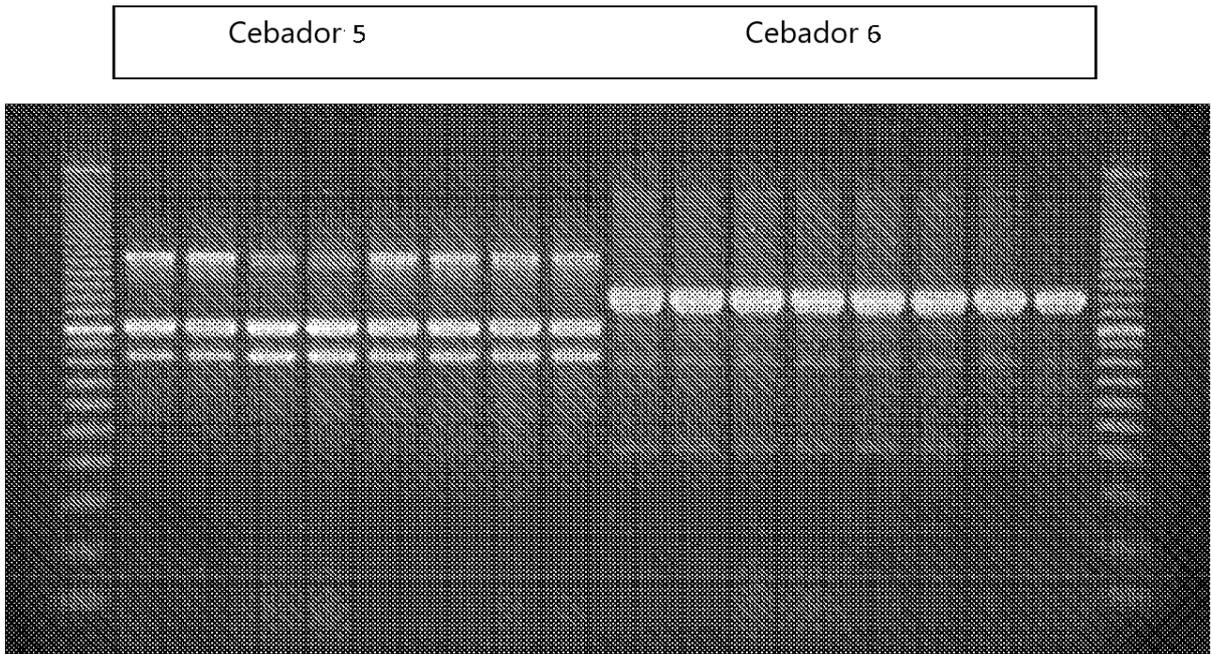


Figura 17

```

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCC TAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTG
CTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGT
GGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGT
TCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAAC CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA ACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACG TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCC
GCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGG
CAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GC
AACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACCTTAAGGTGACTGCCGGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTG
TTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGA
TCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCCCTCACACCACGAGAGTT
TGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTT TAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGAT
TGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTG
    
```

Figura 18

Cebador 1	Cebador 2	Cebador 3
-----------	-----------	-----------

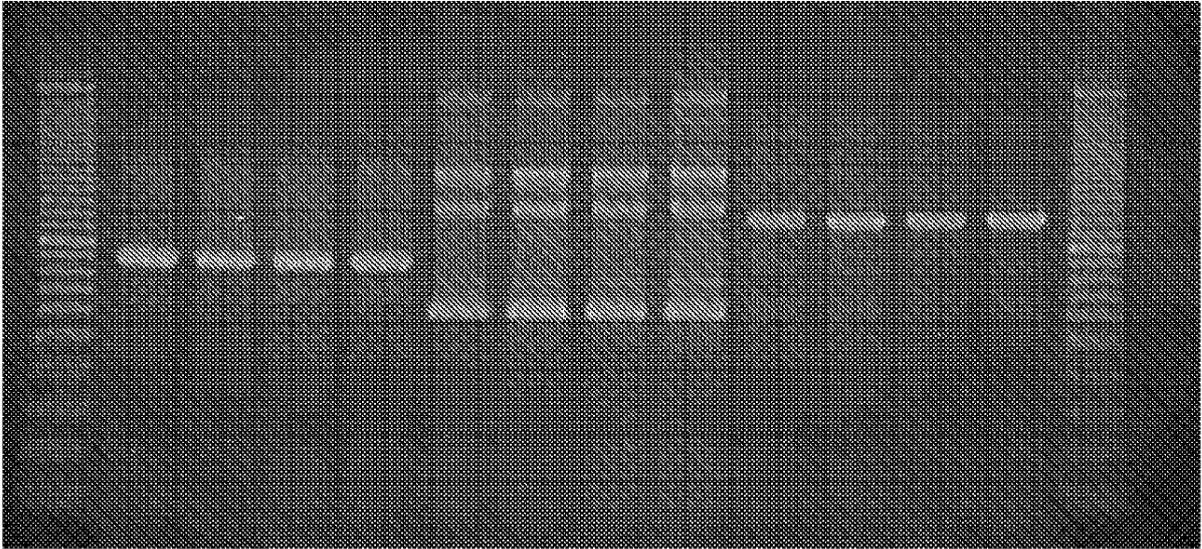


Figura 19

Cebador 4	Cebador 5	Cebador 6
-----------	-----------	-----------

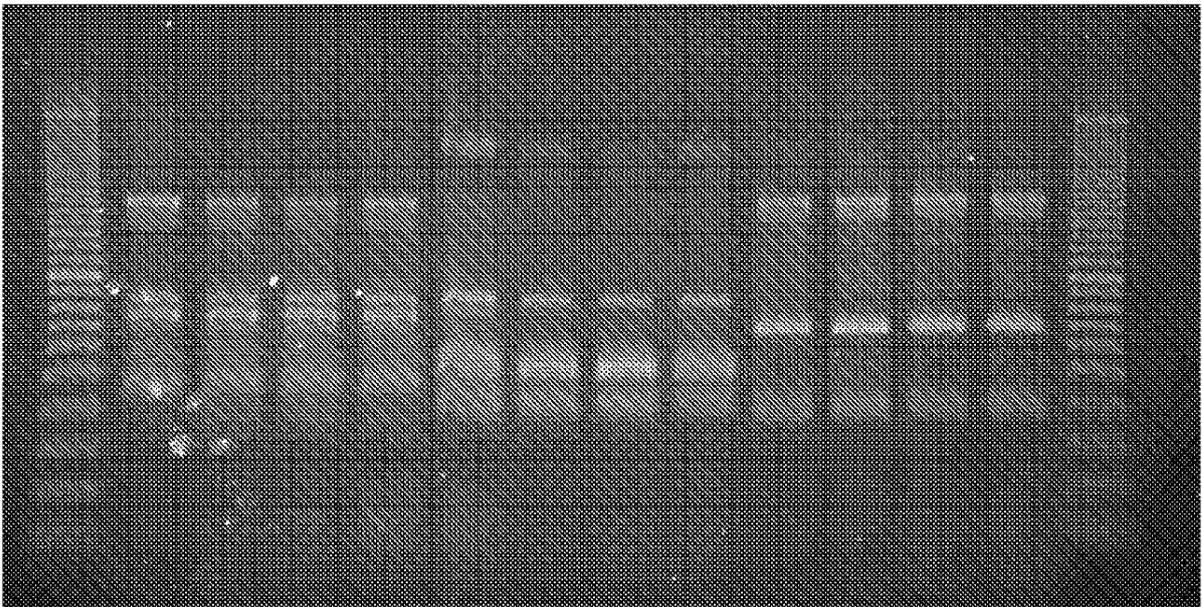


Figura 20

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCT
 CCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAAC
 TCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGG
 TTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACC
 AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
 CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAG
 TAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
 GGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTC
 TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAG
 TGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACC
 AGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCC
 CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT
 CAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
 GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAG
 AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC
 AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
 GCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTC
 TCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
 GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGC
 AACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGG
 GGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAG

Figura 21

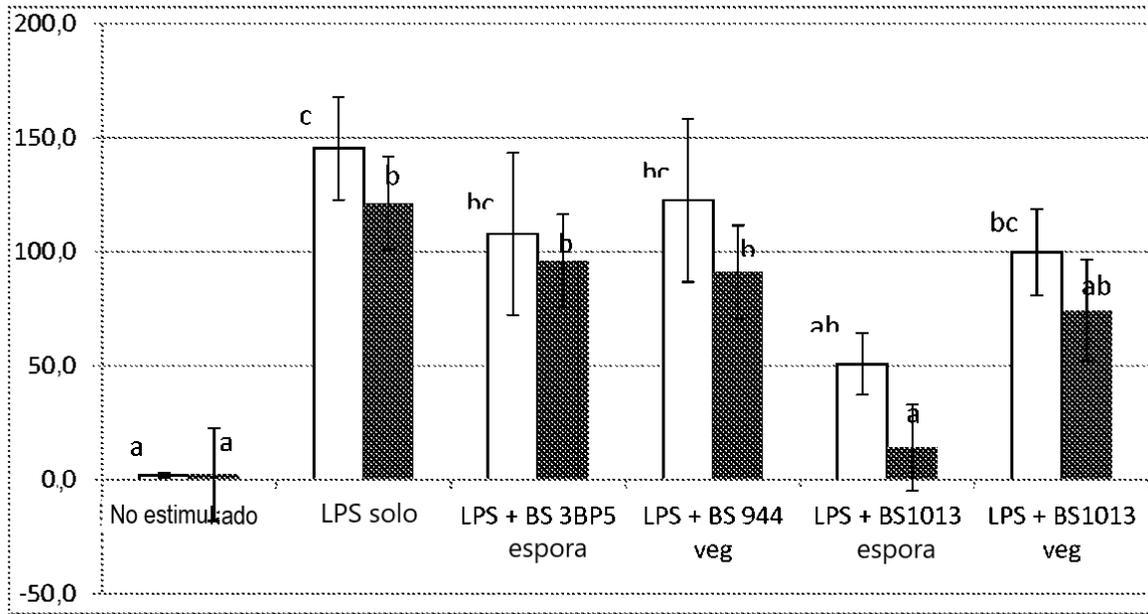


Figura 23

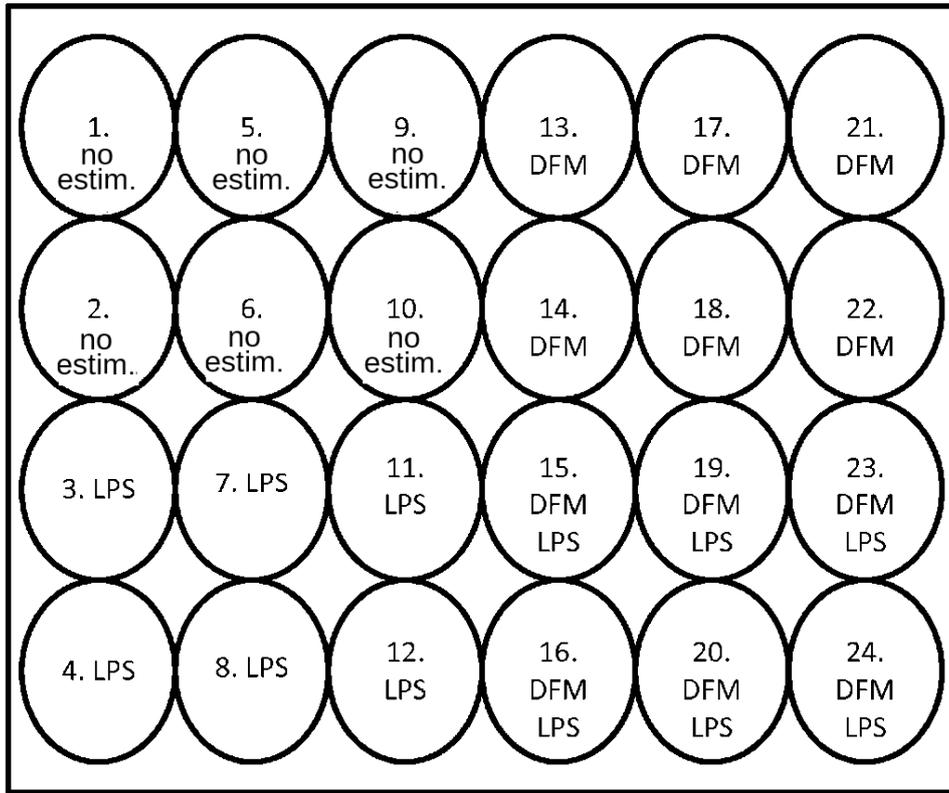


Figura 24

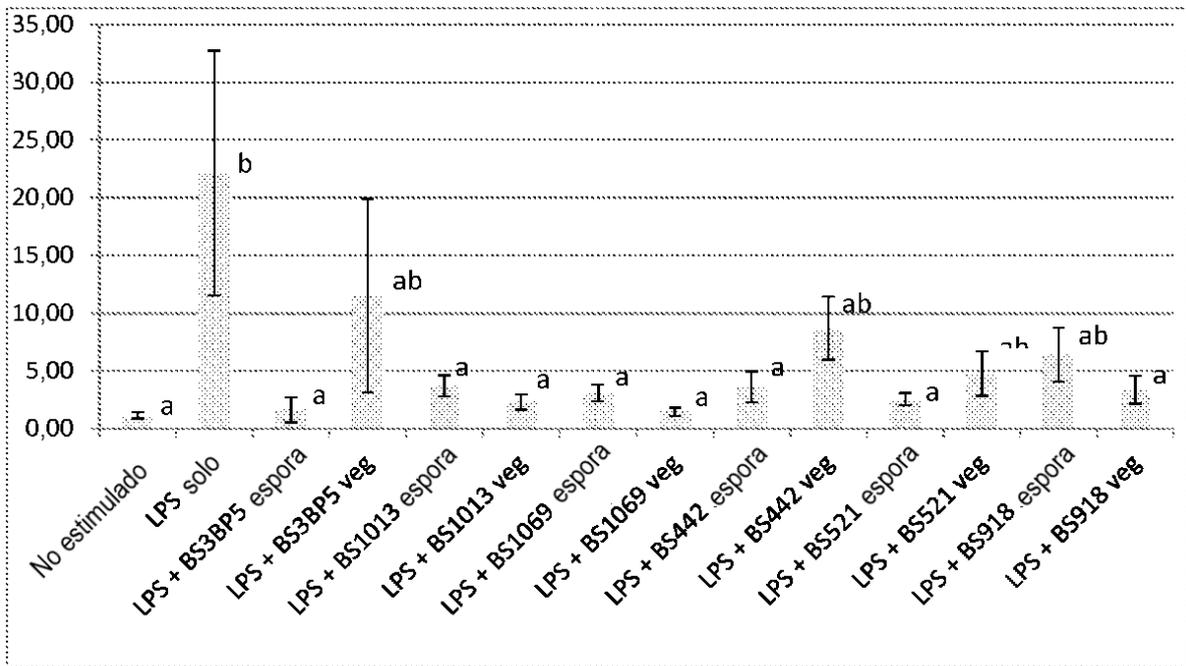


Figura 25

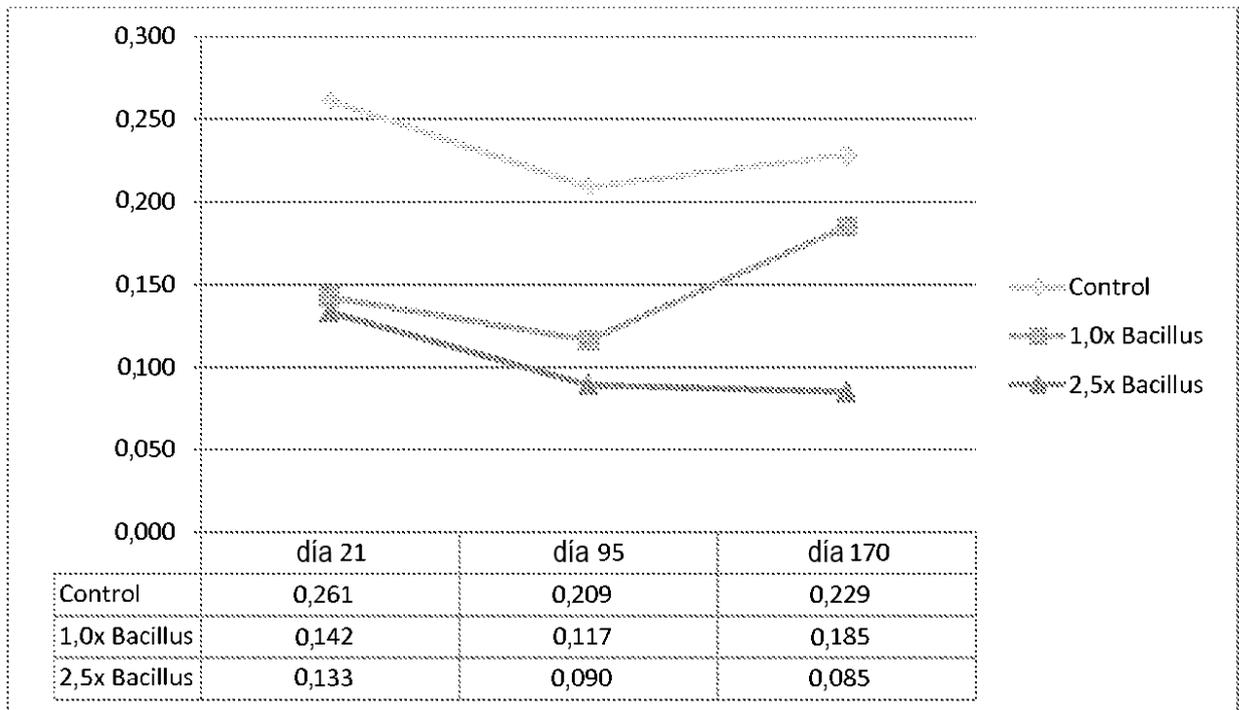


Figura 26

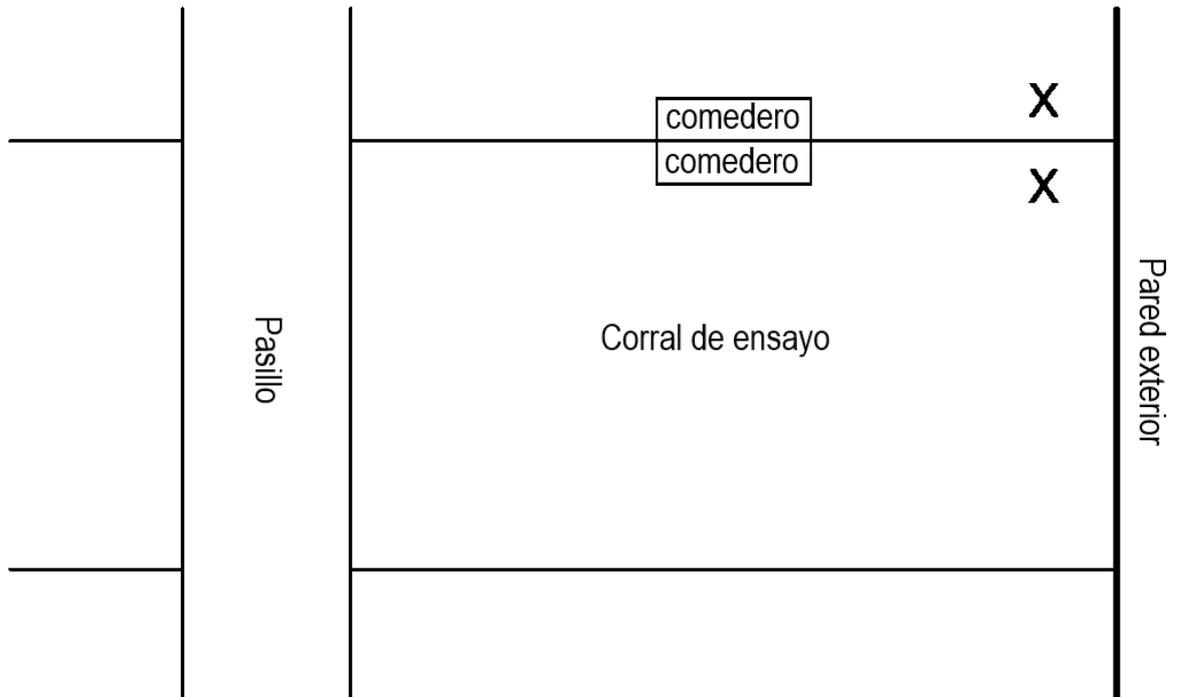


Figura 27