

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 901**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)  
**A61K 35/742** (2015.01)  
**A23K 50/30** (2006.01)  
**A23K 50/75** (2006.01)  
**A61K 38/43** (2006.01)  
**A23K 10/18** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2017 PCT/US2017/019941**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017 WO17151608**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2017 E 17760605 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 3422867**

54 Título: **Agentes microbianos de alimentación directa**

30 Prioridad:

**29.02.2016 US 201662301438 P**  
**19.07.2016 US 201662364271 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.12.2024**

73 Titular/es:

**MICROBIAL DISCOVERY GROUP, LLC (50.0%)**  
**5200 W. Ashland Way**  
**Franklin, Wisconsin 53132, US y**  
**UNITED ANIMAL HEALTH, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KING, MICHAEL R.;**  
**SON, SONA;**  
**LEISTIKOW, KYLE y**  
**AUGSPURGER, NATHAN ROBERT**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

Observaciones:

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

ES 2 991 901 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

Agentes microbianos de alimentación directa

**Referencia a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad bajo el artículo 35 U.S.C. § 119(e) con respecto a la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º de Serie 62/301.438, presentada el 29 de febrero de 2016 y la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º de Serie 62/364.271, presentada el 19 de julio de 2016.

**Campo de la divulgación**

La invención se refiere a agentes microbianos (*microbials*) de alimentación directa para su uso en la inhibición de *E. coli* en animales. Más particularmente, la invención se refiere a las cepas 101, 235, 77, 177 y 102 de *Bacillus* aisladas, y cepas que tienen todas las características de identificación de estas cepas, para su uso que comprende el uso mencionado anteriormente. La invención también se puede usar para el tratamiento de plantas y en el procesamiento de alimentos.

**15 Antecedentes y sumario de la invención**

El alcance de la presente invención se define a través de las reivindicaciones. Las realizaciones de la descripción relativas a los métodos de tratamiento no están cubiertas por las reivindicaciones. Cualquier realización o cláusula que se divulgue en la descripción, pero que no esté cubierta por las reivindicaciones, debe considerarse presentada únicamente con fines ilustrativos. La presente invención se refiere a composiciones de agentes microbianos de alimentación directa (Direct-Fed Microbial, DFM) y a métodos para la inhibición de *E. coli* en un animal. El tubo gastrointestinal de un animal se expone constantemente a una gran cantidad de bacterias, virus y protozoos que se encuentran en el pienso, el lecho y el medio ambiente. El tubo gastrointestinal tiene un sistema sofisticado para contrarrestar estos patógenos potenciales que consiste en líneas de defensa físicas, químicas e inmunitarias. Las bacterias beneficiosas son una parte importante de este sistema porque proporcionan a los animales bacterias que ayudan al establecimiento (o restablecimiento) de un perfil bacteriano normal, fortalecen el sistema inmunitaria del animal y ayudan a combatir enfermedades (por ejemplo, enfermedades causadas por *E. coli* en animales). Debido a la importancia de prevenir y tratar la enfermedad de *E. coli* en animales, tanto para la industria agrícola como para el suministro de alimentos humanos, se necesitan cepas microbianas de alimentación directa que inhiban *E. coli* en los animales, tales como animales agrícolas.

Los Solicitantes han desarrollado agentes microbianos de alimentación directa que dan como resultado la inhibición de *E. coli* en animales. Los agentes microbianos de alimentación directa y las composiciones que comprenden los agentes microbianos de alimentación directa descritos en el presente documento ofrecen un beneficio comercial al proporcionar la inhibición de *E. coli* en los animales, tales como animales agrícolas. Además, las composiciones de agentes microbianos de alimentación directa descritas en el presente documento dan como resultado una reducción o eliminación en el uso de antibióticos, lo que reduce el coste general de un pienso para animales.

Se proporcionan métodos y composiciones para inhibir *E. coli* en animales. En diversas realizaciones, el animal se puede seleccionar del grupo que consiste en una especie de aves de corral, una especie porcina, una especie bovina, una especie ovina, una especie equina y un animal de compañía. En la realización donde el animal es una especie de ave de corral, la especie de ave de corral puede ser un pollo de engorde. En la realización donde el animal es una especie porcina, la especie porcina se puede seleccionar del grupo que consiste en un cerdo en crecimiento-finalización, un cerdo de destete, una cerda y un cerdo reproductor.

En diversas realizaciones, las composiciones para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden ser un envase comercial, un aditivo para pienso para una composición de pienso para animales, un aditivo destinado al agua potable de un animal, o una composición de pienso para animales (por ejemplo, un pienso completo), cada uno de las cuales comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas.

En una realización de los métodos descritos en el presente documento, se proporciona un método para alimentar a un animal. El método comprende la etapa de administrar al animal una composición de pienso o agua potable que comprende una cantidad eficaz de un aditivo que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas, en donde la cepa de *Bacillus* causa la inhibición de *E. coli* en el animal.

En otra realización de los métodos descritos en el presente documento, se proporciona un método para controlar un efecto perjudicial de *E. coli*. El método comprende las etapas de administrar a un animal una composición de pienso

o agua potable que comprende una cantidad eficaz de un aditivo que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas, y controlar el efecto perjudicial de *E. coli* en el animal.

#### Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

Se proporcionan métodos y composiciones para inhibir *E. coli* en los animales, tales como animales agrícolas. En diversas realizaciones, las composiciones para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden ser un envase comercial, un aditivo para pienso para una composición de pienso para animales, un aditivo destinado al agua potable de un animal, o una composición de pienso para animales (por ejemplo, un pienso completo), cada uno de las cuales comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas.

En una realización de los métodos descritos en el presente documento, se proporciona un método para alimentar a un animal. El método comprende la etapa de administrar al animal una composición de pienso o agua potable que comprende una cantidad eficaz de un aditivo que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas, en donde la cepa de *Bacillus* causa la inhibición de *E. coli* en el animal.

En otra realización de los métodos descritos en el presente documento, se proporciona un método para controlar un efecto perjudicial de *E. coli*. El método comprende las etapas de administrar a un animal una composición de pienso o agua potable que comprende una cantidad eficaz de un aditivo que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas, y controlar el efecto perjudicial de *E. coli* en el animal.

En diversas realizaciones, el animal al que se le administra un aditivo para pienso, una composición de pienso o agua potable, como se describe en el presente documento, puede seleccionarse del grupo que consiste en una especie de aves de corral, una especie porcina, una especie bovina, una especie ovina, una especie equina y un animal de compañía. En la realización donde el animal es un animal de compañía, el animal de compañía puede ser, por ejemplo, una especie canina o una especie felina. En la realización donde el animal es una especie porcina, la especie porcina se puede seleccionar del grupo que consiste en un cerdo en crecimiento-finalización, un cerdo de destete, una cerda y un cerdo reproductor. En diversas realizaciones de ejemplo, el animal se puede seleccionar del grupo que consiste en un pollo (por ejemplo, un pollo de engorde o una gallina ponedora), un cerdo, un caballo, un poni, una vaca, un pavo, una cabra, una oveja, una codorniz, un faisán, un avestruz, un pato, un pez (por ejemplo, una tilapia, un siluro, una platija o un salmón), un crustáceo (por ejemplo, una gamba o un cangrejo) y combinaciones de los mismos. En otra realización, la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas, se pueden usar para tratar una planta para la salud de la planta y se pueden usar para tratar el suelo, la planta directamente o para regar la planta.

En cualquier realización descrita en el presente documento, las cepas se pueden administrar solas o en cualquier combinación, o pueden estar en forma de cualquier composición descrita en el presente documento de modo que las cepas estén solas o en cualquier combinación en la composición descrita en el presente documento. Las combinaciones de ejemplo incluyen un grupo de cepas de *Bacillus* aisladas que comprenden las cepas de *Bacillus* 101 (NRRL N.º B-67218), 102 (NRRL N.º B-67276), 235 (NRRL N.º B-67219), 77 (NRRL N.º B-67274) y 177 (NRRL N.º B-67275), y un grupo de cepas de *Bacillus* aisladas que comprenden las cepas de *Bacillus* 101 (NRRL N.º B-67218), 235 (NRRL N.º B-67219), 177 (NRRL N.º B-67275) y 102 (NRRL N.º B-67276).

En una realización, se proporciona un método para alimentar a un animal. El método comprende la etapa de administrar al animal una composición de pienso o agua potable que comprende una cantidad eficaz de un aditivo que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas.

En otra realización, se proporciona un método para alimentar a un animal. El método comprende la etapa de administrar al animal una composición de pienso o agua potable que comprende una cantidad eficaz de un aditivo que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas, en donde la cepa de *Bacillus* causa la inhibición de *E. coli* en el animal.

En una realización de la invención, se puede administrar una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus* para inhibir *E. coli* en el animal. Como se usa en el presente documento, "inhibir *E. coli*" puede significar reducir la enfermedad por *E. coli*, prevenir la enfermedad por *E. coli*, mantener el equilibrio microbiano normal en el animal, reducir la cantidad de *E. coli* perjudiciales en el animal, reducir la actividad de *E. coli* en el animal, o reducir los síntomas de la enfermedad por *E. coli* en el animal, o combinaciones de los mismos. Por "cantidad eficaz" se entiende una cantidad de la cepa de *Bacillus* (por ejemplo, la cepa 101, o 235, o 77, o 177, o 102) capaz de inhibir *E. coli* o capaz de controlar un efecto perjudicial de *E. coli*, como se describe más adelante, por cualquier mecanismo.

En las realizaciones descritas en el presente documento en donde las composiciones de la presente invención que comprenden las cepas 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus* se administran a un animal, las composiciones se administran preferentemente a animales por vía oral en una composición de pienso o en agua potable, pero se puede utilizar cualquier otro método eficaz de administración conocido por los expertos en la técnica. En una realización ilustrativa, las cepas 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus* se proporcionan en forma de un aditivo para la adición al agua potable de un animal.

En otra realización ilustrativa, las cepas 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus* se proporcionan en forma de un aditivo para la adición a una composición de pienso. La composición de pienso puede contener la cepa 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus* en una mezcla con una combinación de pienso para animales, incluyendo cualquier combinación de pienso para animales reconocida en la técnica o cualquier combinación de pienso para animales descrita en el presente documento. Como se usa en el presente documento, "composición de pienso" o "composición de pienso para animales" significa una composición de pienso que comprende la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus* en una mezcla con una combinación de pienso para animales y, opcionalmente, cualquier otro componente que pueda usarse en una composición de pienso, incluyendo otras cepas bacterianas, tales como otras cepas de *Bacillus* o cepas de *Lactobacillus*.

Cualquier combinación de pienso para animales, incluyendo las conocidas en la técnica y las descritas en el presente documento, puede usarse de acuerdo con los métodos y composiciones que se describen en esta solicitud de patente, tal como harina de colza, harina de semilla de algodón, harina de soja, harina de maíz, cebada, trigo, ensilaje y heno. En diversas realizaciones, la combinación de pienso para animales se puede complementar con la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus*, pero opcionalmente se pueden añadir otros ingredientes a la combinación de pienso para animales, incluyendo otras cepas bacterianas, tales como otras cepas de *Bacillus* o cepas de *Lactobacillus*.

En diversas realizaciones ilustrativas, los ingredientes opcionales de la combinación de pienso para animales incluyen azúcares y carbohidratos complejos tales como monosacáridos, disacáridos y polisacáridos hidrosolubles e insolubles en agua. Otros ingredientes opcionales incluyen granos de destilería secos con solubles, grasa (por ejemplo, grasa bruta), fósforo, bicarbonato de sodio, piedra caliza, sal, fitato, calcio, sodio, azufre, magnesio, potasio, cobre, hierro, manganeso, cinc, ceniza, aceite de pescado, un aceite derivado de harina de pescado, semillas crudas (por ejemplo, linaza), un antioxidante y almidón. En otra realización, pueden añadirse minerales en forma de una premezcla de minerales.

Los ingredientes de aminoácidos opcionales que pueden añadirse a la combinación de pienso para animales son arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, cisteína, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, tirosina etilo HCl, alanina, ácido aspártico, glutamato de sodio, glicina, prolina, serina, cisteína etilo HCl y análogos y sales de los mismos. Las vitaminas que pueden añadirse opcionalmente son tiamina HCl, riboflavina, piridoxina HCl, niacina, niacinamida, inositol, cloruro de colina, pantotenato de calcio, biotina, ácido fólico, ácido ascórbico y vitaminas A, B, K, D, E y similares. En otra realización, pueden añadirse vitaminas en forma de una premezcla de vitaminas. En otra realización más, pueden añadirse ingredientes proteicos a la combinación de pienso para animales e incluyen proteínas obtenidas de harina de carne, harina de huesos o harina de pescado, huevo líquido o en polvo, solubles de pescado, proteína cruda, y similares.

En otro aspecto ilustrativo, puede añadirse cualquier ingrediente de medicamento conocido en la técnica a la combinación de pienso para animales o a un aditivo para el agua potable del animal, tal como antibióticos. En diversas realizaciones, el antibiótico se selecciona del grupo que consiste en ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacino, clindamicina, tetraciclina, clortetraciclina, Denagard™, BMD™, Carbadox™, Stafac™, eritromicina, levofloxacino, trimetoprim/sulfametoxazol, trimetoprim, daptomicina, rifampicina, Tylan™, Pulmotil™, vancomicina y combinaciones de los mismos. En otra realización, la combinación de pienso para animales, la composición de pienso, el aditivo para pienso, o el aditivo para el agua potable del animal pueden no contener antibióticos.

En otra realización ilustrativa, pueden añadirse una o más enzimas a la combinación de pienso para animales. En diversas realizaciones, las enzimas que pueden añadirse incluyen una galactosidasa, una fitasa, una proteasa, una lipasa, una amilasa, una hemicelulasa, una arabinoxilanasasa, una xilanasasa, una celulasa, una NSPasa, combinaciones de las mismas y cualquier otra enzima que mejore la eficacia de la composición de pienso para la inhibición de *E. coli* o para controlar un efecto perjudicial de *E. coli*. En otra realización más, pueden añadirse levadura, hongos (por

ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) o micronutrientes al pienso para animales. Cualquiera de los ingredientes descritos anteriormente que sean adecuados para su adición a un aditivo para el agua potable del animal puede añadirse como un componente del aditivo para el agua potable del animal como se describe en el presente documento.

5 En diversas realizaciones ilustrativas, la cepa de *Bacillus* (por ejemplo, la cepa 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus*), o cualquier otra cepa bacteriana añadida además de la cepa 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus*, se pueden administrar en la composición de pienso a una dosis de aproximadamente  $1,0 \times 10^3$  UFC/gramo de la composición de pienso a aproximadamente  $5,0 \times 10^{12}$  UFC/gramo de la composición de pienso o a una dosis de aproximadamente  $1,0 \times 10^3$  UFC/gramo de la composición de pienso a aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  UFC/gramo de la composición de pienso. En otras realizaciones, la cepa de *Bacillus* (por ejemplo, la cepa 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus*) se administra en la composición de pienso a una dosis superior a aproximadamente  $1,0 \times 10^3$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,1 \times 10^3$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,25 \times 10^3$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,5 \times 10^3$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,75 \times 10^3$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,0 \times 10^4$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $2,0 \times 10^4$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $3,0 \times 10^4$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $4,0 \times 10^4$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $5,0 \times 10^4$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $6,0 \times 10^4$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $7,0 \times 10^4$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $8,0 \times 10^4$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,0 \times 10^9$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,0 \times 10^{10}$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,0 \times 10^{11}$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis superior a aproximadamente  $1,0 \times 10^{12}$  UFC/gramo de la composición de pienso. En otra realización más, la cepa de *Bacillus* (por ejemplo, la cepa 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus*) se administra en la composición de pienso a una dosis de aproximadamente  $7,3 \times 10^4$  UFC/gramo de la composición de pienso. En otra realización, la cepa de *Bacillus* (por ejemplo, la cepa 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus*), o cualquier otra cepa bacteriana añadida además de la cepa 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus*, se pueden administrar en la composición de pienso a una dosis de aproximadamente  $1,0 \times 10^2$  UFC/gramo de la composición de pienso a aproximadamente  $5,0 \times 10^{12}$  UFC/gramo de la composición de pienso o a una dosis de aproximadamente  $1,0 \times 10^2$  UFC/gramo de la composición de pienso a aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  UFC/gramo de la composición de pienso, o a una dosis superior a aproximadamente  $1,0 \times 10^2$  UFC/gramo de la composición de pienso.

En diversas realizaciones, la cepa de *Bacillus* (por ejemplo, la cepa 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus*) para su uso de acuerdo con los métodos y composiciones que se describen en el presente documento se puede seleccionar del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276). La cepa MDG 101 de *Bacillus* y la cepa MDG 235 de *Bacillus* se depositaron el 4 de enero de 2016 en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, USDA, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604-3999, y se les asignaron los números de acceso B-67218 y B-67219, respectivamente. La cepa MGL77 de *Bacillus*, la cepa MGL177 de *Bacillus* y la cepa MGL102 de *Bacillus* se depositaron el 7 de junio de 2016 en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, USDA, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604-3999, y se les asignaron los números de acceso B-67274, B-67275 y B-67276, respectivamente. Los depósitos se realizaron de conformidad con las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los efectos del procedimiento de patente. Las designaciones de la cepa NRRL son MDG 101, MDG 235, MGL77, MGL177 y MGL102 que son equivalentes a la cepa 101, 235, 77, 177 y 102 de *Bacillus*, respectivamente, como se menciona en la solicitud.

Cualquiera de estas cepas puede administrarse individualmente o en combinación en forma de una composición de pienso (por ejemplo, un pienso completo que comprende una combinación de pienso para animales) o agua potable para un animal. En una realización, se administran múltiples cepas en combinación en una única composición. En otra realización, se administran múltiples cepas en combinación en composiciones separadas. En una realización ilustrativa, cualquiera de estas cepas se aísla de un cerdo en crecimiento-finalización de alto rendimiento.

En otra realización, una o más de las cepas de *Bacillus* descritas en los párrafos anteriores (por ejemplo, la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus*) se pueden administrar al animal junto con otra cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en otra cepa de *Bacillus*, una cepa bacteriana de ácido láctico y combinaciones de las mismas. En otra realización más, una o más de las cepas de *Bacillus* descritas en los párrafos anteriores (por ejemplo, la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus*) se pueden administrar al animal junto con cualquier otra cepa bacteriana eficaz para inhibir *E. coli* en el animal.

Como se usa en el presente documento, "una cepa que tiene todas las características de identificación de" la cepa 101 de *Bacillus*, o la cepa 235 de *Bacillus*, o la cepa 77 de *Bacillus*, o la cepa 177 de *Bacillus*, o la cepa 102 de *Bacillus* puede ser una cepa mutante que tiene todas las características de identificación de la cepa 101 de *Bacillus*, o la cepa 235 de *Bacillus*, o la cepa 77 de *Bacillus*, o la cepa 177 de *Bacillus*, o la cepa 102 de *Bacillus* (por ejemplo, una huella de ADN basada en el análisis de ADN que corresponde a la huella de ADN de la cepa 101 de *Bacillus*, o la cepa 235 de *Bacillus*, o la cepa 77 de *Bacillus*, o la cepa 177 de *Bacillus*, o la cepa 102 de *Bacillus*, actividades enzimáticas que corresponden a la cepa 101 de *Bacillus*, o la cepa 235 de *Bacillus*, o la cepa 77 de *Bacillus*, o la cepa 177 de *Bacillus*, o la cepa 102 de *Bacillus*, actividad antimicrobiana que corresponde a la cepa 101 de *Bacillus*, o la cepa 235 de *Bacillus*, o la cepa 77 de *Bacillus*, la cepa 177 de *Bacillus* o la cepa 102 de *Bacillus*, perfiles de sensibilidad y tolerancia a antibióticos que corresponden a la cepa 101 de *Bacillus*, o la cepa 235 de *Bacillus*, o la cepa 77 de *Bacillus*, o la cepa 177 de *Bacillus*, o la cepa 102 de *Bacillus*, o combinaciones de las mismas). En realizaciones alternativas, la mutación puede ser una mutación natural o una mutación modificada por ingeniería genética. En otra realización, "una cepa que tiene todas las características de identificación de" la cepa 101 de *Bacillus*, o la cepa 235 de *Bacillus*, o la cepa 77 de *Bacillus*, o la cepa 177 de *Bacillus*, o la cepa 102 de *Bacillus* puede ser una cepa, por ejemplo, producida aislando uno o más plásmidos de la cepa 101 de *Bacillus*, o la cepa 235 de *Bacillus*, o la cepa 77 de *Bacillus*, o la cepa 177 de *Bacillus*, o la cepa 102 de *Bacillus* e introduciendo el uno o más plásmidos en otra bacteria, tal como otra cepa de *Bacillus*, siempre que el uno o más plásmidos contengan ADN que proporcione las características de identificación de la cepa 101 de *Bacillus*, o la cepa 235 de *Bacillus*, o la cepa 77 de *Bacillus*, o la cepa 177 de *Bacillus*, o la cepa 102 de *Bacillus* (por ejemplo, una huella de ADN basada en el análisis de ADN que corresponde a la huella de ADN de la cepa 101 de *Bacillus*, o la cepa 235 de *Bacillus*, o la cepa 77 de *Bacillus*, o la cepa 177 de *Bacillus*, o la cepa 102 de *Bacillus*).

La composición de pienso o el agua potable que comprende la cepa 101, y/o 235, y/o 77, y/o 177, y/o 102 de *Bacillus* pueden administrarse al animal durante cualquier período de tiempo que sea eficaz para inhibir *E. coli* o controlar un efecto perjudicial de *E. coli*, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en una realización, la composición de pienso o el agua potable pueden proporcionarse al animal diariamente. En una realización alternativa, la composición de pienso o el agua potable pueden administrarse al animal durante la lactancia y/o durante la gestación. Los períodos de tiempo para la administración de la composición de pienso o el agua potable descritos anteriormente son ejemplos no limitantes y debe apreciarse que puede usarse cualquier período de tiempo o programa de administración que se determine que es eficaz para inhibir *E. coli* o controlar un efecto perjudicial de *E. coli*, o combinaciones de los mismos.

Como se describe en el presente documento, una de las realizaciones del método es un método para alimentar a un animal administrando al animal una composición de pienso o agua potable que comprende una cantidad eficaz de un aditivo que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas, en donde la cepa de *Bacillus* controla un efecto perjudicial de *E. coli*. Cualquiera de las realizaciones aplicables descritas anteriormente puede aplicarse a esta realización.

En esta realización, "controlar un efecto perjudicial de *E. coli*" puede significar reducir la enfermedad por *E. coli*, prevenir la enfermedad por *E. coli*, mantener el equilibrio microbiano normal en el animal, reducir la cantidad de *E. coli* perjudiciales en el animal, reducir la actividad de *E. coli* en el animal, o reducir los síntomas de la enfermedad por *E. coli* en el animal, o combinaciones de los mismos. Por "cantidad eficaz" se entiende una cantidad de la cepa de *Bacillus* (por ejemplo, la cepa 101, o 235, o 77, o 177, o 102) capaz de controlar un efecto perjudicial de *E. coli*, como se ha descrito anteriormente, por cualquier mecanismo.

En realizaciones adicionales de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus*. En una realización, se proporciona un envase comercial que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas.

En otra realización, se proporciona un aditivo para pienso para un pienso para animales que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas.

En otra realización más, se proporciona un aditivo para el agua potable de un animal que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas.

En otro aspecto ilustrativo más de la invención, se proporciona una composición de pienso para animales que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-

67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas.

5 En otra realización, una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas se puede usar para mantener la salud de las plantas, en la acuicultura o para su uso en el procesamiento de alimentos.

10 En una realización, el aditivo para pienso para su adición a una combinación de pienso para animales para producir una composición completa de pienso se puede mezclar con la combinación de pienso para animales, por ejemplo, con un sistema automatizado de suministro de micronutrientes, o, por ejemplo, mediante pesaje manual y adición para lograr cualquiera de las dosis de la cepa 101 de *Bacillus*, la cepa 235 de *Bacillus*, la cepa 77 de *Bacillus*, la cepa 177 de *Bacillus* y la cepa 102 de *Bacillus* descritas en el presente documento, para su administración al animal en forma de una composición completa de pienso. La mezcla también se puede realizar mediante cualquier otro método  
15 adecuado conocido en la técnica para combinar agentes microbianos de alimentación directa con una combinación de pienso para animales para obtener una mezcla uniforme. En diversas realizaciones, la mezcla puede realizarse durante cualquier período de tiempo adecuado (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 minutos). En la realización donde la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus* están en forma de un aditivo para el agua potable del animal, la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus*  
20 pueden estar en forma de, por ejemplo, un polvo, un líquido, o gránulos, y se pueden mezclar con el agua potable usando cualquier método adecuado conocido en la técnica para lograr cualquiera de las dosis de la cepa 101 de *Bacillus*, la cepa 235 de *Bacillus*, la cepa 77 de *Bacillus*, la cepa 177 de *Bacillus* o la cepa 102 de *Bacillus* descritas en el presente documento, para su administración al animal en el agua potable del animal. La cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus* también  
25 pueden suministrarse directamente al animal por vía oral (es decir, mediante inserción oral) en forma de un polvo, un líquido o un gránulo.

30 En cualquiera de las realizaciones de composición descritas en el presente documento, la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus* pueden provocar un efecto seleccionado del grupo que consiste en inhibir *E. coli* o controlar un efecto perjudicial de *E. coli* en el animal. Estos efectos son ejemplos no limitativos de los tipos de efectos que pueden provocar la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus*.

35 En un aspecto ilustrativo, el aditivo para pienso, el aditivo para el agua potable del animal o la composición de pienso pueden estar en forma de un envase comercial. En otra realización ilustrativa, el aditivo para pienso o el aditivo para el agua potable del animal, o la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus* en el envase comercial pueden estar en forma de un concentrado (por ejemplo, de aproximadamente  $1 \times 10^8$  a aproximadamente  $5 \times 10^9$  UFC/g) o un superconcentrado (por ejemplo,  
40 de aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  a aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  UFC/g). En otra realización, el aditivo para pienso, la composición de pienso o el aditivo para el agua potable del animal, o la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus* en una composición en un envase comercial, pueden estar en forma seca (por ejemplo, un polvo), una forma granulada, una forma líquida, en forma de fertilizante de cobertura, o en forma de gel, o en cualquier otra forma adecuada.

45 En otra realización más, las cepas en forma de un envase comercial pueden estar, por ejemplo, en forma seca (por ejemplo, en polvo o en forma liofilizada), en forma granulada o en forma líquida.

50 En otra realización ilustrativa, el envase comercial, el aditivo para pienso, el aditivo para el agua potable del animal o la composición de pienso pueden comprender además un portador para la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus*. El portador se puede seleccionar del grupo que consiste en un salvado, cáscara de arroz, una sal, aceite mineral, una dextrina (por ejemplo, maltodextrina), suero lácteo, azúcar, piedra caliza, almidón seco, silicoaluminato de sodio, aceite vegetal y combinaciones de los mismos. En otra realización, el portador puede ser cualquier portador adecuado conocido en la  
55 técnica para un agente microbiano de alimentación directa. En otra realización, el envase comercial, el aditivo para pienso, el aditivo para el agua potable del animal o la composición de pienso pueden comprender además un aglutinante tal como arcilla, componentes de la pared celular de levadura, silicato de aluminio, glucano u otros aglutinantes conocidos. En otra realización, el envase comercial, el aditivo para pienso, el aditivo para el agua potable del animal o la composición de pienso pueden comprender además aglutinantes inorgánicos/orgánicos, aceites  
60 esenciales y/o ácidos orgánicos.

Incluso en otras realizaciones, el envase comercial, el aditivo para pienso, el aditivo para el agua potable del animal o la composición de pienso que comprende la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus* están en un recipiente para uso comercial. En diversas  
65 realizaciones, el recipiente puede ser, por ejemplo, una bolsa (por ejemplo, una bolsa de 9,07 kg (20 libras), una bolsa de 22,6 kg (50 libras), una bolsa de 0,05 l (2 onzas), una bolsa de 453,5 g (1 libra) o una bolsa de 1 kilogramo), una

bolsita, un tambor, una botella o una caja. En aspectos ilustrativos, el recipiente para el envase comercial, el aditivo para pienso, el aditivo para el agua potable del animal o la composición de pienso que comprende la cepa 101 de *Bacillus*, y/o la cepa 235 de *Bacillus*, y/o la cepa 77 de *Bacillus*, y/o la cepa 177 de *Bacillus*, y/o la cepa 102 de *Bacillus* pueden comprender plástico, metal, papel de aluminio, papel, fibra o cartón (por ejemplo, un balde de plástico, una bolsa de papel, una bolsa de aluminio, un bidón de fibra, etc.). El envase comercial, el aditivo para pienso, el aditivo para el agua potable del animal o la composición de pienso pueden comprender además instrucciones para el uso de una o más de las cepas de *Bacillus*.

Los siguientes ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos. Los ejemplos no son limitativos y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

#### EJEMPLO 1

##### Cribado de la actividad enzimática

Este ejemplo describe el uso de métodos de cribado de medios en placa para detectar la actividad enzimática en las cepas DFM 101 y 235. Se prepararon placas de medios de ensayo enzimático complementando agar de soja tríplico con entre el 0,5 % y el 1 % de diversos sustratos, incluyendo polisacáridos (almidón de maíz, carboximetilcelulosa o xilano), proteínas (caseína) y lípidos (tributirina). Las cepas de *Bacillus* de interés (incluyendo las cepas DFM 101 y 235) obtenidas a partir de cultivos frescos durante una noche se colocaron en placas (5 µl) y se incubaron a diversas temperaturas durante hasta 48 horas. En las placas de agar de proteínas y lípidos, las zonas de aclaramiento alrededor de las colonias productoras de enzimas fueron visibles sin tratamiento adicional. Las placas que contenían polisacáridos se tificaron con yodo de Gram durante 1 minuto para visualizar las zonas de aclaramiento. Se midió el diámetro de las ZOC y el diámetro de las colonias, pero se usaron puntuaciones de actividad de sí/no para fines de cribado. Se observó que ambas cepas DFM 101 y 235 eran positivas para la actividad de proteasa, amilasa y xilanasas después de 48 horas y se observaron fuertes positivos en agar tributirina (lipasa).

Las cepas de *Bacillus* descritas en el presente documento tienen actividad enzimática que incluye, pero sin limitación, amilasa, proteasa, xilanasas y lipasa.

#### EJEMPLO 2

##### Cribado antimicrobiano con el método de estrías cruzadas

Para los patógenos anaerobios facultativos ensayados (*E. coli*), se usó el siguiente protocolo. Las cepas de *Bacillus* de interés (101 y 235) se inocularon a partir de reservas de glicerol congeladas en una única estría lineal de 1 cm de ancho a lo largo del centro de placas de agar BHI modificadas. Las placas sembradas con *Bacillus* se inocularon de manera aerobia durante 24 horas a 37 °C, hasta que se observó una estría de crecimiento intensa. El organismo a ensayar para determinar su susceptibilidad, *E. coli*, se sembró en líneas perpendiculares a la estría de *Bacillus* (hasta 1 mm) en una cabina de seguridad biológica y se incubó a 37 °C durante 24 horas en condiciones aerobias. No se usaron más de 5 estrías cruzadas escalonadas por placa. Las placas se incubaron y a continuación se examinaron para determinar zonas de inhibición alrededor de la estría inicial de *Bacillus*, y se midió el ancho de cada zona de inhibición en milímetros. Las cepas MDG 101 y 235 inhibieron de manera constante *E. coli*. Hasta ahora, se han ensayado 58 cepas patógenas diferentes de *E. coli* para determinar su susceptibilidad a las cepas 101 y 43 cepas diferentes para determinar su susceptibilidad a 235. Estas cepas varían en numerosas características, incluidas la presencia y cantidad de toxinas, la morfología de las colonias en agar SMAC, la producción de hemolisina y la ubicación de especímenes en los EE. UU. La cepa 101 inhibió con éxito 46 de 58 aislados de *E. coli* cuando se cultivó tanto de manera aerobia como anaerobia, mientras que la cepa 235 inhibió con éxito 42 de 43 aislados de *E. coli* cuando se cultivó tanto de manera aerobia como anaerobia.

#### EJEMPLO 3

##### Crecimiento en cultivo de las cepas DFM 101 y 235

En el presente ejemplo, el crecimiento de las cepas DFM 101 y 235 se puede lograr mediante cultivo. A pequeña escala, se puede utilizar TSB o caldo nutritivo para cultivar las cepas DFM 101 y 235.

Puede producirse un medio de agar usando 23 gramos de agar nutritivo (BD 213000) y 1000 ml de agua DI, seguido de un tratamiento en autoclave a 121 °C. Puede producirse un medio de caldo usando 8,0 gramos de caldo nutritivo (BD 234000) y 1000 ml de agua DI, seguido de un tratamiento en autoclave a 121 °C.

Para cultivar la cepa DFM 101, se sembró un cultivo puro de la cepa DFM 101 en una placa de agar nutritivo y se dejó crecer durante 48 horas a 32 °C. Posteriormente, se inoculó una única colonia en medio de caldo nutritivo. La colonia única se incubó a 37 °C y a 230-240 rpm, durante 16 a 24 horas. Finalmente, el cultivo se sembró en una placa de agar nutritivo para verificar la morfología.

Para cultivar la cepa DFM 235, se sembró un cultivo puro de la cepa DFM 235 en una placa de agar nutritivo y se dejó crecer durante 48 horas a 32 °C. Posteriormente, se inoculó una única colonia en medio de caldo nutritivo. La colonia única se incubó a 37 °C y a 230-240 rpm, durante 16 a 24 horas. Finalmente, el cultivo se sembró en una placa de agar nutritivo para verificar la morfología.

5

EJEMPLO 4

Cribado antimicrobiano con el método de estrías cruzadas

- 10 Para la *E. coli* ensayada, se usó el protocolo descrito en el Ejemplo 2. Las cepas MGL 77, 177 y 102 inhibieron de forma consistente la *E. coli*. Hasta ahora, se han ensayado 15 cepas patógenas diferentes de *E. coli* para determinar su susceptibilidad a las cepas 77, 177 y 102. La cepa 77 inhibió con éxito 11 de 15 aislados de *E. coli* cuando se cultivó de manera aerobia, la cepa 177 inhibió con éxito 12 de 15 aislados de *E. coli* cuando se cultivó de manera aerobia, y la cepa 102 inhibió con éxito 15 de 15 aislados de *E. coli* cuando se cultivó de manera aerobia (véase la Tabla 1 a
- 15 continuación).

	<b>102</b>	<b>77</b>	<b>177</b>
<b>K 1.8 (Beta)</b>	+	+	+
<b>K 2.4 (beta)</b>	+	+	-
<b>K2.5 (beta)</b>	+	+	+
<b>J 2.5 (beta)</b>	+	+	+
<b>K1.7 (beta)</b>	+	+	+
<b>K1.9 (beta)</b>	+	-	+
<b>K1.10 (beta)</b>	+	-	-
<b>K2.8 (beta)</b>	+	+	+
<b>K1.8 (beta)</b>	+	+	+
<b>J 1.2 (beta)</b>	+	-	-
<b>1A (α)</b>	+	-	+
<b>1B (a)</b>	+	+	+
<b>1C (α)</b>	+	+	+
<b>1D (α)</b>	+	+	+
<b>1E (α)</b>	+	+	+

**Tabla 1**

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de pienso o agua potable que comprende una cantidad eficaz de un aditivo que comprende una cepa de *Bacillus* aislada seleccionada del grupo que consiste en la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), la cepa 77 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67274), la cepa 177 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67275), la cepa 102 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67276), y combinaciones de las mismas, para su uso en la prevención o reducción de la enfermedad por *E. coli* en un animal, en donde la cepa de *Bacillus* causa la inhibición de *E. coli* en el animal.
- 10 2. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el animal se selecciona del grupo que consiste en una especie de ave de corral, una especie porcina, una especie bovina, una especie ovina, una especie equina y un animal de compañía.
- 15 3. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la especie de ave de corral es un pollo de engorde.
- 20 4. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el animal es una especie porcina y la especie porcina se selecciona del grupo que consiste en un cerdo en crecimiento-finalización, un cerdo de destete, una cerda y un cerdo reproductor.
- 25 5. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cepa de *Bacillus* produce una enzima seleccionada del grupo que consiste en una  $\alpha$ -galactosidasa, una proteasa, una lipasa, una amilasa, una xilanasas, una celulasa, y combinaciones de las mismas.
- 30 6. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la etapa de administrar al animal otra cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en otra cepa de *Bacillus*, una cepa bacteriana de ácido láctico y combinaciones de las mismas.
- 35 7. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la cepa administrada es la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218).
- 40 8. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la cepa administrada es la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219).
- 45 9. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la cepa 101 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67218), y la cepa 235 de *Bacillus* (NRRL N.º B-67219), se administran en combinación en una única composición o en combinación en composiciones separadas.
- 50 10. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la cepa de *Bacillus* se administra en la composición de pienso a una dosis de aproximadamente  $1,0 \times 10^3$  UFC/gramo de la composición de pienso a aproximadamente  $5,0 \times 10^{12}$  UFC/gramo de la composición de pienso, a una dosis de aproximadamente  $1,0 \times 10^3$  UFC/gramo de la composición de pienso a aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  UFC/gramo de la composición de pienso, o una dosis superior a aproximadamente  $7,0 \times 10^4$  UFC/gramo de la composición de pienso.
- 55 11. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la cepa de *Bacillus* se aísla de un cerdo en crecimiento-finalización de alto rendimiento.
12. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además la etapa de administrar un antibiótico al animal.
13. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además la etapa de administrar al animal una enzima seleccionada del grupo que consiste en una galactosidasa, una proteasa, una lipasa, una amilasa, una hemicelulasa, una arabinoxilanasas, una xilanasas, una celulasa, una NSPasa, una fitasa, y combinaciones de las mismas.
14. La composición de pienso o agua potable para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la enzima es una NSPasa o una fitasa.