

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de febrero de 2014 (06.02.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/020226 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A23K 1/18 (2006.01) A61K 31/19 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01) A01K 61/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070573

(22) Fecha de presentación internacional:

1 de agosto de 2013 (01.08.2013)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201231256 1 de agosto de 2012 (01.08.2012) ES

(71) Solicitante: NOREL, S.A [ES/ES]; Jesús Aprendiz 19, 1ª A, E-28007 Madrid (ES).

(72) Inventor: PABLOS PÉREZ, Enrique; Norel, S.A, Jesús Aprendiz 19, 1ª A, E-28007 Madrid (ES).

(74) Mandatario: ILLESCAS TABOADA, Manuel; Manuel Illescas y Asociados, S.L. (MIA), Príncipe de Vergara 197, Oficina 1ªA, E-28002 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE,

AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: ADDITIVES FOR FEEDING AQUATIC ANIMALS, CONTAINING PROBIOTICS

(54) Título : ADITIVOS PARA ALIMENTACIÓN DE ANIMALES ACUÁTICOS QUE CONTIENEN PROBIÓTICOS

(57) Abstract: The invention relates to an additive for feeding aquatic animals, comprising the combination of two species pertaining to the genus *Bacillus*, said species being *B. amyloliquefaciens* and *B. cereus*, preferably the strains CECT 5940 of *B. amyloliquefaciens* and CECT 953 of *B. cereus*, in combination with an organic acid salt, preferably with the sodium salt of butanoic acid. The additives for feeding aquatic animals described in the present invention can also comprise other bacterial strains with a probiotic capacity, preferably pertaining to the species *Pediococcus acidilactici*.

(57) Resumen: En la presente invención se describe una aditivo para alimentación de animales acuáticos que comprende la combinación de dos especies pertenecientes al género *Bacillus*, siendo dichas especies *B. amyloliquefaciens* y *B. cereus*, preferentemente las cepas CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens* y CECT 953 de *B. cereus*, en combinación con una sal de un ácido orgánico, preferentemente con la sal sódica del ácido butírico. Los aditivos para alimentación de animales acuáticos descritos en la presente invención pueden comprender además otras cepas bacterianas con capacidad probiótica, preferentemente pertenecientes a la especie *Pediococcus acidilactici*.



WO 2014/020226 A1

ADITIVOS PARA ALIMENTACIÓN DE ANIMALES ACUÁTICOS QUE CONTIENEN PROBIÓTICOS.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5

La presente invención divulga aditivos para la alimentación de animales acuáticos, aditivos que contienen al menos un probiótico que, además, puede ir acompañado de al menos una sal de un ácido orgánico. Dichos aditivos son utilizados como promotores o estimulantes del crecimiento y mejoradores del estado sanitario del animal. Por tanto, la presente invención se engloba dentro del campo de la acuicultura y más específicamente dentro de la producción, alimentación y salud animal.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La acuicultura ha tenido en los últimos años adelantos significativos en la producción de una amplia variedad de organismos acuáticos tanto de consumo humano como de especies de ornamentación. Debido a las condiciones de cría, como por ejemplo las altas densidades de animales y a las variaciones en la calidad del agua, los organismos están sujetos a un estrés constante que se traduce en una elevada tasa de mortalidad, así como en bajas tasas de crecimiento y de eficiencia alimenticia, además de incrementarse la presencia e incidencia de enfermedades ocasionadas por patógenos oportunistas. La necesidad de una acuicultura sostenible y rentable ha impulsado la búsqueda de soluciones aceptables para optimizar la producción de una manera natural y respetuosa con el medio ambiente.

25

Para sobrellevar estos problemas se han utilizado suplementos y/o aditivos alimenticios que evitan la aparición de enfermedades y que además operan como promotores del crecimiento. Entre dichos suplementos se encuentran las hormonas, los antibióticos y algunas sales. Sin embargo, su uso inapropiado puede presentar efectos adversos en el animal o en el consumidor final, así como dar lugar a resistencia cruzada en los animales de cría, frente a bacterias patógenas, produciendo desequilibrios ambientales y pérdidas económicas de las explotaciones acuícolas. Por lo tanto, la tendencia en la actualidad en acuicultura, es la búsqueda de una dieta que no sólo cubra las necesidades alimenticias de los animales, sino que además refuerce su estado inmunológico y sanitario, en general y reduzca los problemas patológicos sin utilizar medicamentos, para así conseguir mejorar su producción, evitar problemas con la seguridad de los alimentos

30
35

obtenidos a partir de los animales de cría e incrementar los rendimientos económicos de las explotaciones. Para la consecución de estos objetivos, una de las vías de obtención ha sido el control de la flora intestinal de los animales de cría, utilizándose para ello los probióticos (Robertson, P.A.W. et al. *Aquaculture* 2000; 185: 235-243; Verschuere, L., G. et al. *Microbiological Molecular* 2000; 64: 655-671; Gullian, M. et al., *Aquaculture* 2004; 233: 1-14; Balcázar, J.L., et al. *Veterinary Microbiology* 2006; 114: 173-186; Gatesoupe, F.J. *Journal of Molecular Microbiological Biotechnology*. 2008;14: 107-114) que pueden definirse como microorganismos viables que administrados en la dieta promueven el bienestar de los organismos de cría por medio de la estimulación del sistema inmune, así como del establecimiento del balance microbiano intestinal en dichos animales de cría, mediante la exclusión de microorganismos potencialmente patógenos (Irianto, A. y B. *Journal of Fish Diseases* 2002; 25: 333-342; Irianto, A. y B. Austin. *Journal of Fish Diseases* 2003; 26: 59-62; Lara-Flores, M., et al. *Aquaculture* 2003; 216: 193-201.).

El uso de probióticos en la producción animal es una forma eficaz de control de la microflora intestinal de los animales de cría y ha demostrado ser, tanto un buen sustituto como un buen complemento, a los antibióticos promotores del crecimiento. Los probióticos son ampliamente utilizados en la cría de cerdos y aves, pero poco se ha hecho para incorporarlos en la acuicultura.

En este sentido, los animales acuáticos difieren de los animales terrestres en el nivel de interacción entre la microbiota intestinal y el ambiente que los rodea. Las bacterias presentes en el ambiente acuático influyen en la composición de la microflora del intestino de los animales acuáticos y viceversa. La composición de la comunidad bacteriana del tracto intestinal de los animales acuáticos es diferente a lo que se encuentra en los animales terrestres. En el ambiente marino predominan las bacterias Gram negativas y en menor proporción las Gram positivas; estas usualmente constituyen la mayoría de las bacterias que normalmente se presentan en la microflora asociada a los camarones silvestres y de cultivo. La gran mayoría de los microbios presentes en el ambiente marino (bacterias, virus, hongos o parásitos) son inocuos o son controlados exitosamente por los mecanismos internos de defensa de los organismos en cultivo. Las etapas tempranas del ciclo de vida de los organismos acuáticos suelen ser más susceptibles a los ataques de dichos agentes, sobre todo cuando se llevan cultivos larvarios en forma intensiva, que por efecto del estrés provocado por las altas densidades, reduce el potencial de defensa de los organismos. La ruptura del equilibrio dinámico de la flora intestinal es provocada por el estrés que se genera por las

condiciones intensivas de la producción animal, mencionadas previamente. Cuando descienden las concentraciones de bacterias beneficiosas, aparece la oportunidad para las bacterias menos deseables ó para que los patógenos potenciales se instalen y se multipliquen.

5

Existen diferentes especies bacterianas utilizadas como probióticos en acuicultura destacando, sobre todo, las bacterias acidolácticas, preferentemente pertenecientes al género *Lactobacillus* (Nikoskelainen, S.A. et al. *Fish Selfish Immunology* 2003; 15: 443-452; Balcázar, J.L. et al. *British Journal of Nutrition* 2007; 97: 522-527; Gatesoupe, F.J. *Journal of Molecular Microbiological Biotechnology*. 2008; 14: 107-114). Bacterias de dicho género forman parte de la flora microbiana natural que se encuentran acompañando a los camarones en todos sus estadios de vida y parte de dichas bacterias presentan potencial para usarse como probióticos en la acuicultura. Sin embargo, debido a que esta práctica aún es reciente en la acuicultura, son pocas las especies de microorganismos que se usan, por lo que en la actualidad es necesario continuar seleccionando cepas con características probióticas. Además, puede ser beneficioso para complementar el sistema inmune, particularmente en el tracto gastrointestinal de los animales acuáticos, utilizar, en combinación con los probióticos, otros ingredientes o aditivos que potencien el beneficio de dichos probióticos en la salud y producción en acuicultura.

Mientras que los probióticos son útiles para la promoción de la salud de un animal, a menudo son difíciles de almacenar, manejar y administrar a dichos animales, más cuando dicha administración se realiza disolviendo el aditivo, junto con el alimento habitual de los animales, en el medio acuático. En este sentido, la formulación de alimentos no solo tiene que completar los requerimientos de los animales, debe también producir un alimento muy estable en el agua porque los animales acuáticos se alimentan lenta y continuamente. Específicamente, el camarón detecta el alimento a distancia por quimiorrepción, por lo que dicho alimento debe ser además atrayente (que atraiga al animal) y palatable (que le guste el sabor), debiéndose además presentar una forma y composición uniforme. En este sentido, el uso de sustancias atrayentes permite que los alimentos sean localizados y consumidos más rápido por los animales. Estos compuestos son moléculas muy solubles en agua y son de bajo peso molecular; como: aminoácidos, compuestos cuaternarios de amonio, trimetilamina, betaina (trimetilglicina), nucleótidos, aminas biogénicas y ácidos orgánicos. De manera comercial se encuentran disponibles

35

en el mercado harinas solubles y aceites de pescado, moluscos ó crustáceos; que funcionan como excelentes atractantes.

Existe, por tanto, una necesidad de nuevos aditivos para la alimentación de animales acuáticos, que contengan probióticos capaces de reforzar el sistema inmune evitando así la invasión por patógenos oportunistas y dando lugar a un incremento en la longevidad de los animales criados en cautividad mediante técnicas de acuicultura. Otro de los objetivos, de los aditivos incorporados en la dieta de los animales acuáticos es conseguir un mayor aprovechamiento del alimento y una actividad incrementada de las enzimas digestivas que se traduzca en un incremento en el crecimiento de los animales de cría y por consiguiente redunde en los beneficios económicos para las explotaciones acuícolas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 Breve descripción de la invención

La presente invención describe un nuevo aditivo alimenticio para animales acuáticos que comprende al menos dos cepas bacterianas, preferentemente en forma de spora, pertenecientes al género *Bacillus* y que se selecciona de entre *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus cereus*.

La cepa bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 es una cepa bacteriana aislada por NOREL S.A., España depositada el 25 de Abril del 2001 en la Colección Española de Cultivos tipo sita en el Parque Científico de la Universidad de Valencia. Calle Catedrático Agustín Escardino, 9 de Paterna (Valencia) y, que se comercializa como el probiótico ECOBIOL.

El ECOBIOL es un probiótico en forma de esporas resistentes capaces de sobrevivir incluso al proceso de granulación y/o peletización del pienso. Una vez en el animal, donde la bacteria encuentra un medio adecuado para su desarrollo en términos de nutrientes temperatura y humedad, las esporas que componen el ECOBIOL germinan, pasando entonces la bacteria a producir todos los efectos beneficiosos para el animal. Dicho probiótico se caracteriza además porque presenta un mejor ratio de reproducción en comparación a otras esporas de *Bacillus spp* y además, es capaz de liberar compuestos químicos que tienen un efecto inhibidor en la población patógena.

La cepa bacteriana *Bacillus cereus* CECT 953 es una cepa bacteriana aislada por NOREL S.A., España depositada el 25 de Octubre de 1988 en la Colección Española de Cultivos tipo sita en el Parque Científico de la Universidad de Valencia. Calle Catedrático Agustín Escardino, 9 de Paterna (Valencia) y, que se comercializa como el probiótico

5 ESPORAFEED.

El ESPORAFEED es un probiótico en forma de esporas resistentes capaces de sobrevivir incluso al proceso de granulación de los piensos para alimentación animal. Dicho probiótico se caracteriza por resistir altas temperaturas de granulación, así como agentes

10 físicos y acidificantes. Además, ESPORAFEED produce enzimas que mejoran la digestibilidad de la dieta.

Los aditivos descritos en la presente invención se adicionan a la dieta de los animales acuáticos, preferentemente en aquéllos animales de cría mediante acuicultura y que se

15 seleccionan, entre otros, de entre cualquiera de la siguiente lista: crustáceos, moluscos, tilapia, dorada, lubina y salmónidos.

El aditivo de la invención actúa como promotor natural del crecimiento, al mostrar una mejora en el factor de conversión del alimento, un incremento en el crecimiento de los

20 animales y en la biomasa, así como un incremento en la supervivencia de los animales a los que se les administra dicho aditivo frente a los animales alimentados sin el aditivo.

El aditivo de la invención puede contener además otros ingredientes capaces de reforzar el sistema inmune y mejorar la digestibilidad del alimento dando lugar a un aumento en la

25 acción de los probióticos. Entre dichos ingredientes se encuentran las sales de los ácidos orgánicos, siendo preferida la sal sódica del ácido butírico.

Los ácidos orgánicos de cadena corta son capaces de reducir el pH a nivel intestinal lo que limita el desarrollo de patógenos y ayuda en la digestión de proteínas y, por otro lado,

30 presentan habilidad para entrar en las bacterias, específicamente en aquéllas patógenas y bloquear su metabolismo. Su acción bactericida se ejerce preferentemente entre los géneros: *Escherichia*, *Campylobacter*, *Clostridium* y *Salmonella*, entre otros. En la presente invención se utiliza el producto de Norel S.A. España comercializado con el nombre de GUSTOR BP-70, a partir de aquí y, a lo largo de toda la invención lo

35 llamaremos BP-70.

El BP-70 está formado por la sal sódica del ácido butírico protegida, frente a una digestión temprana, con una matriz de grasas vegetales, que protegen solo una parte del ingrediente activo y permiten la liberación lenta del producto, asegurando así su acción potenciadora del crecimiento y bactericida en todo el tracto digestivo del animal. Esta protección parcial asegura que una parte del butirato llegue a las partes más lejanas del tracto digestivo de los animales, ejerciendo así su acción. Por una parte, el butirato sódico desprotegido ejercerá su acción en las partes del tracto digestivo más próximas. Por otra, el butirato sódico protegido, va a ejercer su acción en las partes del tracto digestivo más distales, una vez la capa protectora que impide su acción, se haya hidrolizado a lo largo del proceso digestivo.

Los aditivos descritos en la presente invención favorecen además la actividad específica de las enzimas digestivas, preferentemente de las lipasas, proteasas, amilasas y quimiotripsinas, así como el factor de conversión alimenticia, lo que da lugar a un mayor aprovechamiento del alimento y en consecuencia a una mayor biomasa de los animales.

Las concentraciones de cada uno de los ingredientes que compren los aditivos de la invención, se incorporan en cantidades suficientes para conseguir las propiedades beneficiosas de los mismos, tales como mejorar el factor de conversión alimenticia, un mejor aprovechamiento del alimento, un incremento en su biomasa y un incremento en la longevidad de los individuos.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso de los aditivos de la invención como promotores del crecimiento de los animales acuáticos, así como promotor de la salud y el bienestar de los mismos, al dotar los aditivos de la invención a los animales alimentados con los mismos de un sistema inmune reforzado. En este sentido, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, white spot syndrome virus, en sus siglas en inglés) es el principal patógeno del camarón y los brotes matan en pocos días a la totalidad de las poblaciones de camarones, siendo por lo tanto el responsable de grandes pérdidas de producción/ganancias en esta industria a nivel mundial. Además de infectar a los camarones, el virus tiene una amplia gama de huéspedes, como por ejemplo, crustáceos como cangrejos, langostas espinosas, cangrejos de río, etc. que pueden ser infectados con gravedad variable dependiendo de la etapa vital del crustáceo y de la presencia de factores estresantes externos (temperatura, salinidad, enfermedades bacterianas, contaminantes, etc). Los signos clínicos de la "mancha blanca" incluyen una súbita reducción del consumo de alimentos, letargo, pérdida de cutícula, decoloración y la

presencia de manchas blancas de 0,5 a 2,0 mm de diámetro en la superficie interior del caparazón, apéndices y sobre la cutícula de los segmentos abdominales. Hasta ahora no existe ningún tratamiento efectivo para controlar la infección provocada por dicho virus, pero los animales acuáticos alimentados con los diferentes aditivos descritos aquí, al tener reforzado su sistema inmune gracias a los aditivos de la invención, no muestran signos de la enfermedad, por lo tanto, los aditivos de la invención son capaces de prevenir la infección por el virus de la mancha blanca.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método para promover el crecimiento de los animales acuáticos mediante la administración del aditivo descrito en la invención, dado que dicho aditivo es capaz de dar lugar a un mayor aprovechamiento del alimento consumido.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

A efectos de la presente invención se definen los siguientes términos:

El término "acuicultura" se refiere al conjunto de actividades técnicas y conocimientos de cultivo de especies acuáticas vegetales y animales. Es una importante actividad económica de producción de alimentos, materias primas de uso industrial y farmacéutico, y organismos vivos para repoblación u ornamentación. Los sistemas de cultivo pueden ser de agua dulce o agua de mar. Los cultivos más habituales corresponden a organismos planctónicos (microalgas y Artemia), macroalgas, moluscos, crustáceos y peces.

El término "aditivo dietético", "aditivo alimenticio", "aditivo para alimentación" o "suplemento dietético", a efectos de la presente invención se refiere a una composición destinada a ser ingerida junto con la dieta normal del animal. El aditivo descrito en la invención puede comprender al menos un probiótico, solo o en combinación con otros ingredientes, preferentemente, sales de ácidos orgánicos.

A efectos de la presente invención se denominan "promotores o estimulantes del crecimiento" a los aditivos que forman parte de la dieta animal y que cumplen con la función de mejorar el aumento de peso diario de los animales (GDP), así como el factor de conversión alimenticia. En la presente invención, los promotores o estimulantes del

crecimiento pueden ser administrados de diferentes maneras, ya sean inyectados, en implantes o como un aditivo en el alimento o piensos de los animales. Se prefiere la administración como un aditivo en el alimento o pienso. En la presente invención, el efecto sobre el crecimiento se mide como incremento de la biomasa.

5

A los efectos de la presente invención, el término ácido orgánico se refiere a compuestos que contienen en su fórmula uno o más grupos carboxílicos (-COOH), generadores de protones, que pueden tener además diferentes grupos funcionales tales como hidroxiácidos, cetoácidos, ácidos aromáticos, compuestos heterocíclicos, así como amidas y lactonas. Los ácidos orgánicos utilizados en la presente invención son preferentemente ácidos grasos volátiles, preferentemente de cadena corta y entre los que se pueden seleccionar: ácido butírico, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido láurico, ácido cúprico, ácido caprílico, ácido caproico, ácido acético, entre otros. Las proporciones en las que se encuentra el ácido orgánico en el aditivo para alimentación animal descrito en la presente invención, suelen variar entre un 30 y un 70% en peso de producto total húmedo, siendo la proporción preferida de un 50%.

10

15

En el contexto de la presente invención, "probiótico", se refiere a cualquier tipo de microorganismo viable aplicado a un huésped animal u hombre, y que afecta beneficiosamente al huésped, debido a sus efectos beneficiosos, en la salud o en el aumento de la resistencia a enfermedades, que éste pueda tener sobre su consumidor. Los probióticos pueden exhibir una o más de las características siguientes, no limitantes: no patógenos o no tóxicos para el huésped; están presentes como células viables, capaces de sobrevivir en el medio intestinal (por ejemplo, a bajo pH y a los ácidos y las secreciones gastrointestinales), adherencia a las células epiteliales, particularmente a las células epiteliales del tracto gastrointestinal, actividad microbicida o microbiostática o efecto hacia las bacterias patógenas; actividad anticancerígena; actividad de modulación inmune; actividad moduladora de la actividad hacia la flora endógena; mejoramiento de la salud del tracto urogenital; actividad antiséptica en o alrededor de las heridas; reducción de la diarrea; reducción de las reacciones alérgicas; reducción en la enterocolitis necrotizante neonatal; reducción en la enfermedad inflamatoria intestinal y reducción de la permeabilidad intestinal.

20

25

30

A efectos de la presente invención, el término "viable" se refiere a un microorganismo vivo capaz de reproducirse y/o de colonizar.

35

Tal como se utiliza en el presente documento, las formas singulares "un", "una", y "el" incluyen referencia plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Del mismo modo, las palabras "comprender" y "comprende" deben ser interpretados de manera inclusiva y no exclusiva, abarcando, recíprocamente, los términos "consistir" y "consiste".

Descripción de las figuras

Figura 1. Biomasa del camarón *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 0.85 g de peso, analizada cada 10 días, durante un periodo total de 60 días. Los camarones fueron alimentados con el alimento estándar al que se añadieron los diferentes aditivos de la invención a la concentración de 2g/Kg dieta estándar: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940 (primera columna-barra cuadrada), o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 (segunda columna-barra blanca), o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 (tercera columna-barra negra) o exclusivamente la dieta estándar (grupo control) (cuarta columna-barra rayada). En el eje X se muestra el tiempo expresado en días y en el eje Y la biomasa expresada en gramos. * $p < 0.05$ vs control.

Figura 2. Porcentaje de supervivencia de *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 0.85 g de peso, analizado cada 10 días, durante un periodo total de 60 días alimentando a los camarones con una dieta estándar a la que se añadieron los diferentes aditivos de la invención a la concentración de 2g/Kg dieta estándar: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940 (línea discontinua con rombo), o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 (línea continua con círculo), o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 (línea discontinua con triángulo) o exclusivamente la dieta estándar (línea continua con cuadrado). En el eje X se muestra el tiempo expresado en días y en el eje Y la supervivencia expresada en forma de porcentaje. * $p < 0.05$ vs control.

Figura 3. Factor de conversión alimenticia (gramos de alimento por gramo de biomasa cosechada) de *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 0.85 g de peso, al final de los 60 días del cultivo, alimentados con su dieta estándar más los aditivos descritos en la invención, ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940, o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70, o ECOBIOL SUPER que contiene la

combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 o exclusivamente la dieta estándar (grupo control).

Figura 4. Biomasa de *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 7.0 g de peso, analizada cada 10 días, durante un periodo total de 60 días. Los camarones fueron alimentados con el alimento estándar al que se añadieron los diferentes aditivos de la invención a la concentración de 2g/Kg de dieta estándar: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940 (primera columna-barra cuadriculada), o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 (segunda columna-barra blanca), o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 (tercera columna-barra negra) o exclusivamente la dieta estándar (grupo control) (cuarta columna-barra rayada). En el eje X se muestra el tiempo expresado en días y en el eje Y la biomasa expresada en gramos. * $p < 0.05$.

Figura 5. Porcentaje de supervivencia de *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 7.0 g de peso, analizado cada 10 días, durante un periodo total de 60 días alimentando a los camarones con una dieta estándar a la que se añadieron los diferentes aditivos de la invención a la concentración de 2g/Kg de dieta estándar: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940 (línea discontinua con rombo), o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 (línea continua con círculo), o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 (línea discontinua con triángulo) o exclusivamente la dieta estándar (grupo control) (línea continua con un aspa). En el eje X se muestra el tiempo expresado en días y en el eje Y la supervivencia expresada en forma de porcentaje.

Figura 6. Factor de conversión alimenticia (gramos de alimento por gramo de biomasa cosechada) de *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 7.0 g de peso, al final de los 60 días del cultivo, alimentados con su dieta estándar más los aditivos descritos en la invención, a la concentración de 2g/Kg de dieta estándar: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940, o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 o exclusivamente la dieta estándar (grupo control).

Figura 7. Respuesta de la actividad enzimática digestiva en los hepatopáncreas del camarón *Litopenaeus vannamei*, ante el estímulo de dietas conteniendo los diferentes tipos de probióticos: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940 (línea discontinua

con rombo), o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 (línea continua con círculo), o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 (línea discontinua con triángulo) o exclusivamente la dieta estándar (grupo control) (línea continua con cuadrado). A tiempo 0 los camarones aún no recibían el alimento; 1, 2, 3, 4 y 5h corresponden al tiempo después de que los camarones recibieron el alimento. (a)= Lipasas, (b)= Proteasas, (c) Amilasas y (d)= Quimiotripsinas. En el eje X se muestra el tiempo expresado en horas y en el eje Y se muestra la actividad enzimática específica expresada como U/mg proteína.

- 10 **Figura 8.** Estudio del crecimiento de la Tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (media±DE) alimentada con diferentes concentraciones del aditivo de la invención ECOBIOL que comprende el probiótico *B. amyloliquefaciens* CECT 5940. G1: grupo control alimentado con una dieta basal. G2 grupo alimentado con una dieta basal suplementada con el probiótico *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 a una concentración de esporas de 1×10^9 u.f.c/kg. G3 grupo alimentado con una dieta basal suplementada con el probiótico *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 a una concentración de esporas de 1×10^7 u.f.c/kg. **(A)** Las barras indican el peso corporal inicial (IBW), el peso corporal final después de 30 días (FBW1), el peso corporal final después de 60 días (FBW2), aumento de peso después de 30 días (WG1), y el aumento de peso después de 60 días (WG2). **(B)** La figura muestra la tasa de crecimiento específico (SGR) de cada uno de los grupos de estudio en los dos meses del estudio. **(C)** La figura muestra la relación de eficacia proteica (PER) para cada uno de los grupos de estudio.

- 25 **Figura 9.** Morfología intestinal de la Tilapia del Nilo *O. niloticus* después de 2 meses alimentados con el probiótico de la invención ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940).

- (A)** Fotografía de una sección transversal de la parte proximal del intestino teñidas con hematoxilina&Eosina (H&E) donde se muestra la altura de plegado (flechas dobles), las células secretoras de moco (cabezas de flecha) y los linfocitos intraepiteliales (IEL) (flechas). Barra de escala: 50 μ m. **(B)** La figura muestra la altura de las vellosidades (media $\pm$ DE) en las partes proximal, medio y distal del intestino. El asterisco (*) indica una altura de la vellosidad significativamente mayor en la parte proximal del intestino grueso respecto a otras partes del intestino, dentro del mismo grupo. G1: grupo control alimentado con una dieta basal. G2 grupo alimentado con una dieta basal suplementada con el probiótico *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 a una concentración de esporas de 1×10^9 u.f.c/kg. G3 grupo alimentado con una dieta basal suplementada con el probiótico

B. amyloliquefaciens CECT 5940 a una concentración de esporas de 1×10^7 u.f.c/kg. Una sección transversal de la parte distal del intestino manchado por la tinción de azul alcian mostró pocas células secretoras de moco (flecha) en el grupo de control (C) y numerosas células secretoras de moco en el grupo suplementado con el probiótico ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) (D). Barra de escala: 50 μ m. (E) La figura muestra el número de células secretoras de moco (media $\pm$ DE) en las partes proximal, media y distal del intestino. (F) Las barras indican el número de IEL (media $\pm$ DE) en las partes proximal, media y distal del intestino.

Figura 10. Parámetros hematológicos de la Tilapia del Nilo *O. niloticus* alimentados con el aditivo de la invención ECOBIOL que contiene el probiótico *B. amyloliquefaciens* CECT 5940), durante 2 meses.

(A) recuento de glóbulos rojos. (B) Contenido de Hemoglobina. (C) %PCV (Packed Cell Volume en sus siglas en inglés, Hematocrito). (D) Recuento de glóbulos blancos. (E) Nivel de glucosa. (F) Concentración de proteínas séricas (proteínas totales, albúmina y globulina). G1: grupo control alimentado con una dieta basal. G2 grupo alimentado con una dieta basal suplementada con el probiótico *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 a una concentración de esporas de 1×10^9 u.f.c/kg. G3 grupo alimentado con una dieta basal suplementada con el probiótico *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 a una concentración de esporas de 1×10^7 u.f.c/kg.

Figura 11. Constituyentes del cuerpo de la Tilapia del Nilo *O. niloticus* alimentados con diferentes concentraciones del aditivo ECOBIOL que contiene el probiótico *B. amyloliquefaciens* CECT 5940, durante 2 meses. Las barras indican el % de proteína cruda (A), % de lípidos crudos (B), contenido de ceniza (polvo o impurezas) (C) y % de humedad (D). G1: grupo control alimentado con una dieta basal. G2 grupo alimentado con una dieta basal suplementada con el probiótico *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 a una concentración de esporas de 1×10^9 u.f.c/kg. G3 grupo alimentado con una dieta basal suplementada con el probiótico *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 a una concentración de esporas de 1×10^7 u.f.c/kg.

Figura 12. Biomasa (expresada en Kg) de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* analizada a los 60 días de comenzar el tratamiento. El diseño experimental se explica en el Ejemplo 6. Cada uno de los tratamientos analizados comprende:

T1: 43% de harina de pescado (HP) y 25 % de torta de soya (TS)
T2: 29 % de HP y 50% de TS

T3: HP+ECOBIOLO

T4: TS+ECOBIOLO

T5: HP+BP-70

T6: TS+BP-70

5 T7: HP+ECOBIOLO+BP-70

T8: TS+ ECOBIOLO+BP-70

Figura 13. Longitud (expresada en cm) de la trucha arco iris *O.mykiss* analizada a los 60 días de comenzar el tratamiento. El diseño experimental se explica en el Ejemplo 6. Cada uno de los tratamientos analizados comprende:

T1: 43% de harina de pescado (HP) y 25 % de torta de soya (TS)

T2: 29 % de HP y 50% de TS

T3: HP+ECOBIOLO

T4: TS+ECOBIOLO

15 T5: HP+BP-70

T6: TS+BP-70

T7: HP+ECOBIOLO+BP-70

T8: TS+ ECOBIOLO+BP-70

20 **Figura 14.** Consumo de alimento (expresado en Kg) de la trucha arco iris *O.mykiss* analizada a los 60 días de comenzar el tratamiento. El diseño experimental se explica en el Ejemplo 6. Cada uno de los tratamientos analizados comprende:

T1: 43% de harina de pescado (HP) y 25 % de torta de soya (TS)

T2: 29 % de HP y 50% de TS

25 T3: HP+ECOBIOLO

T4: TS+ECOBIOLO

T5: HP+BP-70

T6: TS+BP-70

T7: HP+ECOBIOLO+BP-70

30 T8: TS+ ECOBIOLO+BP-70

Figura 15. Conversión del alimento (C.A.) de la trucha arco iris *O.mykiss* analizada a los 60 días de comenzar el tratamiento. El diseño experimental se explica en el Ejemplo 6. Cada uno de los tratamientos analizados comprende:

35 T1: 43% de harina de pescado (HP) y 25 % de torta de soya (TS)

T2: 29 % de HP y 50% de TS

T3: HP+ECOBIOIOL

T4: TS+ECOBIOIOL

T5: HP+BP-70

T6: TS+BP-70

5 T7: HP+ECOBIOIOL+BP-70

T8: TS+ ECOBIOIOL+BP-70

Figura 16. Supervivencia (expresada en forma de %) de la trucha arco iris *O.mykiss* analizada a los 60 días de comenzar el tratamiento. El diseño experimental se explica en el Ejemplo 6. Cada uno de los tratamientos analizados comprende:

T1: 43% de harina de pescado (HP) y 25 % de torta de soya (TS)

T2: 29 % de HP y 50% de TS

T3: HP+ECOBIOIOL

T4: TS+ECOBIOIOL

15 T5: HP+BP-70

T6: TS+BP-70

T7: HP+ECOBIOIOL+BP-70

T8: TS+ ECOBIOIOL+BP-70

20 Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un aditivo para alimentación de animales acuáticos que comprende la combinación de, al menos, dos especies pertenecientes al género *Bacillus*, seleccionadas de entre *B. amyloliquefaciens* y *Bacillus cereus*.

25

En una realización preferida, el aditivo de la invención comprende las cepas CECT 5940 de *Bacillus amyloliquefaciens* y la cepa CECT 953 de *Bacillus cereus*.

En otra realización preferida de la invención, el aditivo para alimentación de animales acuáticos puede comprender además otros probióticos seleccionados de entre cualquiera de los siguientes géneros: *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostrepococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* y *Lactobacillus*.

35

En realizaciones preferidas, los probióticos comprenden al menos una cepa adecuada o subespecie de entre: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus* y/o combinaciones de las mismas. En una realización más preferida de la invención la cepa se seleccionan del género *Pediococcus*,
5 preferentemente de la especie *Pediococcus acidilactici*, y en una realización más preferida, el probiótico más preferido es *Pediococcus acidilactici* cepa CNCM MA 18/5 M, depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur de París.

- 10 Los aditivos descritos en la presente invención incluyen probióticos en una cantidad adecuada para mejorar el sistema inmunológico, para aumentar los efectos beneficiosos de los probióticos y/o para incrementar la biomasa de los animales y/o extender la vida de los mismos. En general, los aditivos alimenticios comprenden aproximadamente de 10^5 a 10^{10} UFC/g de pienso para cada uno de los probióticos utilizados, siendo preferida una
15 concentración de aproximadamente 10^6 UFC/g de pienso, de cada uno de los probióticos utilizados.

- El experto en la técnica puede determinar la cantidad apropiada de los probióticos que se añada al aditivo de la invención. Dichos factores que pueden tenerse en cuenta son el
20 promedio de consumo de determinados tipos de composiciones de diferentes animales, si el animal que tiene la intención de ingerir los suplementos dietéticos tiene algún problema de salud en particular, el bienestar o las necesidades nutricionales, o sufre de una enfermedad o trastorno, la edad, sexo, tamaño o especie del animal. Las concentraciones de los probióticos para ser añadidos al aditivo de la invención pueden calcularse sobre la
25 base de los requerimientos de energía y nutrientes del animal.

En otra realización preferida de la invención el aditivo comprende además al menos una sal de un ácido orgánico.

- 30 En otra realización preferida, los ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: butírico, propiónico, fórmico, láctico, cítrico, láurico, cúprico, caprílico, caproico o acético.

- En otra realización más preferida de la invención, las sales de los ácidos orgánicos se
35 seleccionan de entre cualquiera de la lista: sódica, cálcica, cúprica o potásica. Las proporciones en las que se encuentra la sal del ácido orgánico en el aditivo para

alimentación animal descrito en la presente invención, suele variar entre un 30 y un 70% en peso del aditivo final húmedo, siendo la proporción preferida de un 60%.

En otra realización aún más preferida, la sal del ácido orgánico que comprende el aditivo de la invención es la sal sódica del ácido butírico (butirato sódico), aunque puede ser
5 utilizada cualquiera de las sales de los ácidos descritos previamente.

En otra realización preferida el aditivo de la invención se caracteriza por que comprende una combinación de los probióticos CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens* y CECT 953 de *B. cereus* junto con sal sódica del ácido butírico.

10

Los aditivos de la invención, pueden comprender adicionalmente también sustancias tales como: minerales, vitaminas, proteínas, aminoácidos, colorantes, conservantes, etc. Ejemplos no limitantes de minerales incluyen por ejemplo: calcio, fósforo, potasio, sodio, hierro, cloro, cobre, zinc, magnesio, manganeso, selenio, etc. Ejemplos no limitantes de
15 vitaminas incluyen por ejemplo: Vitamina A, diferentes tipos de Vitamina B (niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, biotina) Vitamina D y Vitamina K.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere al uso de los aditivos descritos en el presente documento en la cría de animales acuáticos, como promotores
20 del crecimiento de dichos animales, siendo capaces de favorecer el factor de conversión del alimento, así como la actividad específica de enzimas digestivas, preferentemente de lipasas, proteasas, amilasas y quimiotripsinas.

En una realización preferida de la invención, los aditivos descritos aquí se usan para
25 promover la salud y el bienestar de los animales acuáticos.

En otra realización preferida de la invención, los probióticos descritos aquí, preferentemente los probióticos seleccionados entre *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. licheniformis* y/o combinaciones de los mismos, se utilizan en la cría de
30 animales acuáticos.

En otra realización más preferida, los probióticos utilizados para la cría de animales acuáticos son preferentemente el probiótico CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens* y el probiótico CECT 953 de *B. cereus*.

35

En otra realización más preferida, los probióticos utilizados para la cría de animales acuáticos se caracterizan por que además puede incluir un probiótico adicional del género *Pediococcus*, preferentemente la especie *Pediococcus acidilactici* y más preferentemente la cepa CNCM MA 18/5 M, depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur de París.

En otra realización más preferida de la invención, los probióticos utilizados para la cría de animales acuáticos se caracterizan por que además comprenden al menos una sal de un ácido orgánico, encontrándose dicha sal del ácido orgánico preferentemente en una proporción de entre un 30-70% en peso húmedo, siendo más preferible una proporción del 60%.

En otra realización más preferida de la invención, los ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: butírico, propiónico, fórmico, láctico, cítrico, láurico, cúprico, caprílico, caproico o acético.

En otra realización más preferida de la invención, las sales de ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: sódica, cálcica, cúprica o potásica.

En otra realización más preferida aún de la invención, los probióticos utilizados para la cría de animales acuáticos se caracterizan por que la sal del ácido orgánico es la sal sódica del ácido butírico.

En otra realización más preferida de la invención, los probióticos utilizados para la cría de animales acuáticos comprenden una combinación de los probióticos CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens* y CECT 953 de *B. cereus* junto con sal sódica del ácido butírico.

En otra realización preferida de la presente invención, los probióticos utilizados para la cría de animales acuáticos, además también presentan la capacidad de modular la respuesta inmune y ejercer un efecto bactericida frente a microorganismos patógenos. Por otro lado, tal y como se demuestra en la presente invención, los probióticos descritos aquí presentan además, la capacidad de ejercer una acción biorremediadora, ayudando por tanto al mantenimiento del ambiente de las superficies en las que se localizan, preferentemente gracias a la secreción de exo-enzimas que descomponen la materia orgánica y disminuyen la DQO (demanda química de oxígeno) parámetro aceptado como indicador de calidad de agua.

En otra realización preferida de la invención, los animales acuáticos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: moluscos, crustáceos, tilapia, dorada, lubina y salmónidos, siendo preferidos los crustáceos, preferentemente los camarones.

- 5 Todos los porcentajes expresados aquí son en peso de la composición de aditivo en base a materia seca a menos que específicamente se indique lo contrario.

La invención no se limita a la metodología en particular, los protocolos y reactivos descritos en este documento, ya que pueden variar. Además, la terminología usada aquí
10 es para el propósito de describir las realizaciones particulares solamente y no está destinado a limitar el alcance de la presente invención.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos, científicos y cualquier acrónimo utilizado aquí tiene el mismo significado como se entiende comúnmente por un
15 experto medio en la técnica dentro del campo de la invención.

Los ejemplos que se describen a continuación tienen como objetivo ilustrar la presente invención, pero sin limitar el alcance de la misma.

- 20 **Ejemplo 1. Respuesta del crecimiento y supervivencia del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* alimentado con dieta estándar suplementada con los aditivos de la invención.**

Se utilizaron camarones de la especie *Litopenaeus vannamei*, seleccionados al azar, con
25 un peso promedio de 0.85 g. Dichos camarones fueron previamente aclimatados durante 72 horas en un tanque de 2500 litros de agua marina con 36.0 UPS (unidades prácticas de salinidad), aireación constante (>4.0 mg/l de oxígeno), temperatura controlada (30 a 34°C) y pH de 7.5 a 8.0. Los camarones se cultivaron en acuarios de 10 L, con agua marina y conservando las variables de calidad mencionadas anteriormente. Los ensayos
30 se llevaron a cabo con un total de 8 camarones por acuario con seis replicaciones para cada uno de los aditivos alimenticios utilizados en la presente invención. El experimento tuvo una duración de 60 días, con biometrías cada 10 diez días con el fin de evaluar las tasas de crecimiento, supervivencia y biomasa. La biomasa se refiere a la suma de los pesos individuales de los camarones presentes en cada uno de los tratamientos con los
35 diferentes aditivos dietéticos.

Para la elaboración de las dietas se utilizó un alimento/pienso comercial utilizado comúnmente para la alimentación de los camarones con un 35% de proteína el cual fue molido y tamizado a 200 micras. Los diferentes probióticos fueron agregados en forma de aditivo a la dieta estándar a razón de 2g/Kg de alimento. Una vez incorporado el aditivo a la dieta estándar, la mezcla fue homogenizada y pasada por un molino para carnes y finalmente por un horno de secado a 40°C durante 12 horas. El alimento fue colocado en comederos; el alimento no consumido posterior a las dos horas fue retirado y posteriormente pesado para su análisis. Las cuatro dietas analizadas que contenían los suplementos dietéticos o aditivos descritos en la presente invención se describen en la

Tabla 1.

Tabla 1. Los camarones se alimentaron tres veces al día ad libitum de acuerdo con el siguiente programa de alimentación.

Grupo	Dieta	Suplemento dietético	Dosis / Vía
1	ECOBIOIOL	CECT 5940	Saciedad/Oral
2	ECOBIOIOL PLUS	CECT 5940+BP-70	Saciedad/Oral
3	ECOBIOIOL SÚPER	CECT 5940+CECT 953+BP-70	Saciedad/Oral
4	Control	Dieta estándar	Saciedad/Oral

Por consiguiente, cuando en la presente descripción se habla de alimento en los ensayos llevados a cabo, este término comprende tanto la dieta estándar suministrada a los controles, formada por el alimento comercial arriba indicado, como la mezcla de éste con los diferentes aditivos de la invención.

Como se ha indicado previamente a lo largo del presente documento, el probiótico ECOBIOIOL comprende la bacteria *B. amyloliquefaciens* cepa CECT 5940, el probiótico ECOBIOIOL PLUS que contiene la bacteria *B. amyloliquefaciens* cepa CECT 5940 junto con la sal sódica del ácido butírico BP70. Como se ha mencionado previamente, la sal sódica del ácido butírico, específicamente la composición de Norel, S.A. llamada BP-70 está formada, por un 70% en peso húmedo de butirato sódico y un 30% en peso húmedo de grasas vegetales. El 30% de la grasa vegetal protege aproximadamente el 43% del butirato sódico total, así por tanto, el producto BP-70 se puede decir que está formado por un 30% de butirato sódico protegido y por un 40% de butirato sódico sin proteger. El

probiótico ECOBIOL SUPER contiene la combinación de las bacterias *B. amyloliquefaciens* cepa CECT 5940, junto *B. cereus* cepa 953 y junto con BP-70.

El alimento fue agregado a saciedad tres veces al día utilizando comederos. El factor de conversión alimenticia (FCA), fue calculado en gramos de alimento por gramo de biomasa extraída; utilizando los valores del alimento agregado diariamente, el no consumido y la biomasa de camarón obtenida al final de los 60 días del experimento. El crecimiento y la supervivencia de los camarones fueron evaluadas cada 10 días registrando el peso promedio y el número de camarones respectivamente.

Los resultados de crecimiento y supervivencia muestran, como se puede observar en las **Figuras 1 y 2** respectivamente, que los camarones alimentados con la dieta suplementada con el aditivo ECOBIOL SUPER generó diferencias significativas ($p < 0.05$) de peso y supervivencia ya a partir de los 40 días del experimento, con respecto a la dieta control. Como además se puede observar en la **Figura 1**, los camarones alimentados con los aditivos ECOBIOL, ECOBIOL PLUS y ECOBIOS SUPER, a los 60 días de tratamiento, muestran un incremento significativo ($p < 0.05$) en su biomasa respecto al grupo control.

Para demostrar si el peso inicial del animal influye en la respuesta al crecimiento y la supervivencia de los camarones alimentados con los diferentes aditivos dietéticos descritos en la invención, se diseñó un experimento con camarones, seleccionados al azar, con un peso promedio de 7.0 g. Como se puede observar en la **Figura 4**, ya a partir del día 30 de tratamiento, los camarones alimentados con la dieta ECOBIOL SUPER presentaron un incremento significativo en su biomasa con respecto a los camarones alimentados con la dieta control ($p < 0.05$). Por otro lado, tal y como puede observarse en la **Figura 5** los camarones alimentados con las dietas conteniendo los aditivos de la invención, mostraron un mayor porcentaje de supervivencia respecto a los animales alimentados exclusivamente con la dieta estándar, grupo control y un mejor factor de conversión del alimento (**Figura 6**).

El aprovechamiento del alimento, analizado como factor de conversión alimenticia, fue mejor en las dietas que contenían los aditivos de la invención (**Figuras 3 y 6**), lo que indica que los animales tienen mayor disponibilidad de nutrientes para el crecimiento y para la obtención de energía. Esto a largo plazo, se refleja en lograr animales más sanos y con tallas más adecuadas para la comercialización, en un menor tiempo.

Por lo tanto, los datos mostrados en la presente invención, ponen de manifiesto que los aditivos descritos funcionan como promotores del crecimiento en animales acuáticos, preferentemente crustáceos, con resultados superiores a los obtenidos con la dieta estándar, sin incluir aditivos.

5

Ejemplo 2. Actividad enzimática digestiva del camarón blanco *L. vannamei* alimentado con los diferentes aditivos descritos en la invención.

La expresión y actividad de enzimas digestivas es afectada por una serie de factores limitantes como por ejemplo: parámetros físico-químicos del agua (pH, oxígeno, salinidad y temperatura), edad y tamaño del camarón, cambios ontogénicos, ayuno, ingredientes de la dieta, nivel y fuente proteica, nivel y tipo de aglutinantes, aditivos promotores de crecimiento, cantidad y frecuencia de alimentación, ciclos circadianos, ciclo de muda e incluso el agua de cultivo.

15

Para determinar la respuesta de actividad enzimática digestiva ante el estímulo de los diferentes aditivos dietéticos utilizados en la presente invención: ECOBIOL, ECOBIOL PLUS y ECOBIOL SÚPER, se utilizaron camarones juveniles de *L. vannamei*, con un peso promedio de 6 g, los cuales fueron mantenidos en ayuno por 12 horas y previamente seleccionados en estadios de intermuda. La intermuda se conoce como la secuencia de transformaciones comprendidas entre dos mudas (eliminación del antiguo exoesqueleto y la formación de un tegumento nuevo y generalmente de mayor tamaño), en cuyo período se cumple un ciclo completo de modificaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, responsables del crecimiento. Las mediciones de dicha actividad enzimática se realizaron en intervalos de una hora, durante un tiempo de 5 horas.

25

La actividad y producción de enzimas digestivas en el hepatopáncreas de los crustáceos se encuentra controlada principalmente por hormonas. El hepatopáncreas, a diferencia del intestino y estómago, presenta una mayor actividad enzimática, sugiriendo la importancia de dicho órgano en la síntesis y secreción de enzimas digestivas.

30

Para el análisis de la actividad enzimática digestiva se determinó la actividad proteasa, lipasa, amilasa y quimiotripsinasa, en los extractos enzimáticos preparados mediante la metodología propuesta por Galgani F. (Galgani, F. *PhD. Thesis Université d'Aix-Marseille* // Etude des proteases digestives de crevettes peneides (Crustacea Decapoda) France. 1983) en los hepatopáncreas extraídos de los camarones, a los intervalos indicados

35

previamente y que estaban almacenados, para dicho análisis, a una temperatura de -48°C. Además se determinó, mediante el método de Bradford la concentración de proteínas presentes en dichos extractos enzimáticos.

- 5 Para obtener los datos de actividad proteasa presente en los extractos enzimáticos se siguió el método descrito por Hernández C.M. (Hernández, C.M. Crustacean protease characterization biochemical and molecular consideration. *Comprehensive summary Ph D Thesis*. 1983. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S. México.), usando como sustrato la azocaseína. La actividad lipasa presente en los
- 10 extractos se determinó de acuerdo a Versaw W.K. et al. (Versaw, W.K. et al. *Journal of Food Science*. 1989; 54: 1557-1558), usando como sustrato el R-naftil caprilato. La determinación de la actividad amilasa se realizó de acuerdo a Vega-Villasante et al., (Vega-Villasante, F. et al. *Bulletin of Marine Science*, 1999; 65:1-9), usando como sustrato almidón al 1 % en TRIS-HCL (50 mM, pH 8.0). La actividad quimiotripsina fue
- 15 evaluada de acuerdo a Delmar E.G. et al. (Delmar E.G. et al. *Anal Biochem*. 1979; 99:316-320. La actividad específica de cada enzima está representada en unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg).

- Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que, la adición de los aditivos descritos
- 20 en la invención a la dieta del camarón *L. vannamei*, incrementaron la actividad enzimática digestiva, presentando una mayor expresión de las enzimas digestivas analizadas (**Figura 7**) respecto a los camarones alimentados con la dieta control. Los camarones que recibieron el aditivo ECOBIOL SÚPER mostraron una mayor evidencia en la actividad específica de las enzimas lipasas y quimiotripsina (lípidos y proteínas).

- 25 Se concluye que los aditivos descritos en la presente invención utilizados en las dietas para animales acuáticos, preferentemente crustáceos y particularmente, la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+butirato sódico (BP-70), favorecen la actividad específica de las enzimas digestivas y el factor de conversión en el alimento de los
- 30 crustáceos lo cual sugiere un mayor aprovechamiento del alimento, así como un incremento en su biomasa y supervivencia, respecto a animales alimentados con una dieta control, no suplementada con los aditivos de la invención.

Ejemplo 3. Estudio *in vitro* de la capacidad de liberación de bacteriocinas del aditivo de la invención *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 y análisis de su actividad biocida frente a organismos patógenos.

5 Las bacteriocinas son péptidos microbianos de reducido tamaño y que son liberadas extracelularmente. Dichos péptidos tienen un efecto bactericida o bacteriostático sobre otras especies bacterianas. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de producción de bacteriocinas del aditivo de la invención, *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 (ECOBIOL).

10

Para analizar la capacidad de producción de bacteriocinas por parte del aditivo de la invención *B. amyloliquefaciens* CECT 5940, dichas cepas son crecidas en un matraz con 50 ml de medio TSB (Bioser) durante 24 horas y con él se inoculan 2 matraces con 50 ml de medio TSB en proporción 1:100 que se mantienen en agitación a 200 rpm y 30°C durante 48 horas.

15

De estos matraces se toman muestras a las 7, 24 y 48 horas de cultivo. Se eliminan las células de los cultivos por centrifugación durante 20 minutos a 4000 rpm. De los sobrenadantes de las distintas muestras recogidas una parte fue neutralizada a pH 6.2 con HCl 5M y la otra se mantuvo con el pH original de la muestra tomada y que se muestra en la Tabla 2, con el fin de simular las condiciones fisiológicas en el intestino proximal y distal. Ambas fracciones fueron esterilizadas a través de un filtro de 0.22 µm. Estas preparaciones fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

20

25 La actividad biocida de los sobrenadantes previamente mencionados, se determinó por el método de difusión en placas (Cintas, L.M. et al. (1995). *Applied & Environmental Microbiology*. 61: 2643-2648), sembradas con microorganismos patógenos de diferentes géneros. Cabe mencionar que todos los microorganismos utilizados en la presente invención, bien se disponía de muestras de los mismos o se han obtenidos de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), sita en el Parque Científico de la Universidad de Valencia. Calle Catedrático Agustín Escardino, 9 de Paterna (Valencia).

30

35

3.1 Actividad biocida del aditivo de la invención ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) frente a organismos del género *Clostridium* Spp.

Todas las cepas de *Clostridia* se cultivaron en medio de agar-clostridium a una concentración aproximada de 10^6 UFC/placa. A excepción de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940, que se cultivó a 30 °C, el resto de las cepas se incubaron a 37 °C en ausencia de oxígeno, en el interior de frascos de anaerobiosis.

Las siguientes cepas de *Clostridium* se utilizaron como indicadores de la existencia de bacteriocinas.

Clostridium butyricum CECT 361T

Clostridium perfringens CECT 376T

Clostridium perfringens CECT 486

Clostridium perfringens CECT 820

Clostridium perfringens CECT 821

Clostridium perfringens CECT 822

Clostridium histolyticum CECT 4109T

50 µl de cada sobrenadante del cultivo de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 (ECOBIOL) se depositaron en los pocillos (6mm de diámetro) de placas de Nutrient Agar (BioKar, pH 7 ± 0.2) suplementado con 3% v/v de NaCl, previamente sembradas con 200 µL de un cultivo que se había mantenido en crecimiento toda la noche de los microorganismos patógenos a ensayar frente a los que se pretende probar la producción de bacteriocinas. Como control se emplea el medio TSB.

Tras 2 horas a 4°C para permitir la difusión del producto en el medio, las placas se incuban a las temperaturas correspondientes para cada uno de los microorganismos patógenos, para permitir el crecimiento del organismo diana. Tras 24 horas, se determina la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento. Todos los muestreos se realizaron por duplicado, tanto en la recogida de sobrenadantes, como en la siembra de placas.

La actividad biocida de los sobrenadantes de cultivos de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 contra diferentes cepas bacterianas del género *Clostridium* patógenas, se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Efecto biocida *in vitro* de los sobrenadantes aislados de cultivos de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 frente a diferentes cepas bacterianas del género *Clostridium*.

Patógeno	Sobrenadante 7 h	Sobrenadante 24 h		Sobrenadante 48 h	
	pH 6.2	pH 6.2	pH 8.32	pH 6.2	pH 9.03
<i>C. butyricum</i> CECT 361T	--	+	+	--	--
<i>C. perfringens</i> CECT 376T	++	+++	+++	+	+
<i>C. perfringens</i> CECT 486	++	+++	+++	+	++
<i>C. perfringens</i> CECT 820	+++	++++	++++	+++	+++
<i>C. perfringens</i> CECT 821	++	+++	+++	+	--
<i>C. perfringens</i> CECT 822	+++	++++	++++	+++	+++
<i>C. histolyticum</i> CECT 4109T	++	+++	+++	++	++

5 +: Inhibición del crecimiento; -: no inhibición del crecimiento;

Los datos mostrados en la **Tabla 2** se explican como sigue: (cm de halo de inhibición)

+: 1 cm de halo de inhibición

++: 1,5 cm de halo de inhibición

10 +++: 1,8 cm de halo de inhibición

++++: 2,2 cm de halo de inhibición

-: Ausencia de halo de inhibición

15 Los sobrenadantes aislados de cultivos de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 inhibieron el crecimiento de la mayoría de cepas del género *Clostridium* analizadas (**Tabla 2**). En este sentido, los resultados mostrados en la **Tabla 2** ponen de manifiesto que *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 muestra una gran capacidad para liberar bacteriocinas durante las primeras 24 horas.

Es conveniente comentar que, las cepas de la especie *Clostridium butyricum* CECT 361T presentan un crecimiento poco homogéneo en relación al resto de las cepas, por lo que resulta difícil la determinación de su halo de inhibición.

5 3.2. Actividad biocida del aditivo de la invención ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) frente a organismos patógenos hemolíticos y enterotóxicos.

La concentración de bacterias patógenas 10^6 UFC/placa se inoculó con el medio adecuado. Varias muescas de un tamaño de 6 mm de diámetro se hicieron en las placas
10 de cultivos de los microorganismos patógenos y el sobrenadante de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 se introdujo en cada uno (50 µl). Las placas se incubaron a 4 °C durante 2 horas para dejar que los diferentes componentes del sobrenadante difundan hacia el medio de cultivo de la placa. Después de eso, todas las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se procedió a determinar el halo de inhibición para así poner de
15 manifiesto el efecto bactericida.

Las cepas patógenas evaluadas fueron:

- Enterococcus faecalis* CECT 4176
- 20 *Enterococcus gallinarum* CECT 970
- Escherichia coli* CECT 352
- Escherichia coli* CECT 434
- Escherichia coli* CECT 504
- Escherichia coli* CECT 728
- 25 *Escherichia coli* CECT 735
- Escherichia coli* CECT 742
- Escherichia coli* CECT 816
- Escherichia coli* CECT 4076
- Escherichia coli* CECT 4267
- 30 *Escherichia coli* CECT 4782
- Escherichia coli* CECT 4783
- Staphylococcus aureus* CECT 957
- Yersinia enterocolitica* CECT 754

- 35 Todas las cepas de *E. coli* se seleccionaron de acuerdo con el fenotipo (O:147 H:7). El resto son cepas patógenas conocidas según la CECT (Colección Española de Cultivos

Tipo), excepto *Enterococcus*, las cuales fueron seleccionadas como cepas bacterianas ácido lácticas (LAB).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3**.

5

Tabla 3. Efecto bactericida *in vitro* del aditivo de la invención ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) frente a diferentes bacterias patógenas.

Patógeno	Medio de cultivo	Halos de inhibición	
		pH 8.5	pH 6.20
<i>E. faecalis</i> CECT 4176	MRS	-	-
<i>E. gallinarum</i> CECT 970	MRS	-	-
<i>E. faecium</i> CECT 4515	MRS	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> CECT 5940	TSB	-	-
<i>E. coli</i> CECT 352	NB	+	+
<i>E. coli</i> CECT 504	NB	+	+
<i>E. coli</i> CECT 728	NB	+	+
<i>E. coli</i> CECT 735	NB	+	+
<i>E. coli</i> CECT 742	NB	+	+
<i>E. coli</i> CECT 816	NB	+	+
<i>E. coli</i> CECT 4076	NB	+	+
<i>E. coli</i> CECT 4267	NB	+	+
<i>E. coli</i> CECT 4782	TSB	+	+
<i>E. coli</i> CECT 4783	TSB	+	+
<i>S. aureus</i> CECT 957	NB	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> CECT 754	NB	+	+

10

Los resultados ponen de manifiesto que las cepas de *E. coli* patógenas, además de *Yersinia*, se inhiben con el sobrenadante del aditivo ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940).

15

Está plenamente demostrado que las cepas patógenas ven inhibido su crecimiento por las bacteriocinas incluso a pH elevado, teniendo por tanto las bacteriocinas un amplio espectro de acción.

Las bacteriocinas no mostraron interacciones positivas con LAB, los efectos sólo son acusados por las bacterias patógenas.

5 3.3 Actividad biocida del aditivo de la invención ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) frente a organismos patógenos del género *Vibrio*.

Las bacterias del género *Vibrio* son bacterias Gram-negativas encontradas comúnmente en estuarios y aguas marinas, por lo general en climas templados y tropicales. Algunas especies, como por ejemplo, la especie *V. parahaemolyticus*, pueden causar
10 gastroenteritis en humanos. Huéspedes naturales de *V. parahemolyticus* incluyen cangrejos, camarones, tortugas, ostras, langostas y peces. La especie *V. gastroenteritis* es a menudo asociada con la infección en camarones.

Estudio recientes han relacionado al patógeno *V. parahemolyticus* con la EMS también
15 conocida como AHPNS (acute hepatopancreatic necrosis síndrome) patología causante de altas mortalidades de los camarones que ha producido ya pérdidas del orden de 1.000 millones de dólares en el sudeste de Asia. Un estudio realizado por Donald Lightner (Universidad de Arizona) ha encontrado que esta bacteria infectada por un fago produce una toxina que afecta al órgano digestivo del camarón, el hepatopáncreas produciendo la
20 muerte de la práctica totalidad de los animales cultivados a edades muy tempranas.

Para demostrar el efecto bactericida del aditivo de la invención ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) sobre las bacterias del género *Vibrio*, particularmente sobre las especies *V. parahaemolyticus* CECT 511 y *V. harveyi* CECT 525, se utilizó la
25 técnica del halo de inhibición. Brevemente, después del cultivo del aditivo que comprende *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 (ECOBIOL), extractos libres de células de *B. amyloliquefaciens* se obtuvieron por centrifugación y se usaron para probar el efecto bactericida de dicho sobrenadante sobre las cepas de *Vibrio* arriba mencionadas, mediante la técnica de halo de inhibición.

30 Las dos cepas fueron crecidas en medio Nutrient Broth (Biokar) suplementado con un 3% v/v de NaCl, e incubadas en agitador orbital a las temperaturas recomendadas en cada caso por la CECT durante 16 horas.

35 Los resultados ponen de manifiesto que los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940), según se ha descrito previamente,

mostraron halos de inhibición alrededor de las trazas realizadas sobre cultivos de la especie patógena *V. parahemolyticus* CECT 511, pero no, frente a los cultivos de *V. harveyi* CECT 525. Además, los resultados indican que la cepa *V. parahaemolyticus* CECT 511, que presenta halo para todos los sobrenadantes recogidos, dichos halos de inhibición son más evidentes tras 24 horas de incubación. Por lo tanto, el sobrenadante de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 (ECOBIOL) contiene algún compuesto, tipo bacteriocina, que inhibe el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511. Los números que aparecen en la Tabla 4 indican el diámetro del halo de inhibición en milímetros correspondientes a cada uno de los sobrenadantes ensayados (ha de tenerse en cuenta que el pocillo en el que se aplica la muestra tiene un diámetro de 6 mm que se incluye también en el tamaño del halo).

La capacidad demostrada de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 para inhibir el crecimiento de este patógeno, podría ayudar frente al control de la EMS.

Tabla 4. Efecto bactericida *in vitro* de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 (ECOBIOL) frente a las bacterias patógenas *V. parahaemolyticus*

	Halo de Inhibición (mm)			
	<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 511		<i>V. harveyi</i> CECT 525	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2
Control	-	-	-	-
7 h (pH 6.4)	9	11	-	-
24 h (pH 8.6)	11	13	-	-
24 h (pH 6.2)	11	12	-	-
48 h (pH 8.6)	9	9	-	-
48 h (pH 6.2)	9	8	-	-

3.4 Actividad biocida del aditivo ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) frente a organismos patógenos de las especies *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*.

B. amyloliquefaciens CECT 5940 se incubó en medio TSA, que se ajustó a los pH de 5 y 8, con el fin de simular las condiciones fisiológicas en el intestino proximal y distal. Además, se evaluaron dos diferentes condiciones de salinidad (0,5 y 3%). Los ensayos

de actividad (halo de inhibición) se llevaron a cabo en MHA-1 (Mueller-Hilton agar a 1% de NaCl), en el que se inocularon los agentes patógenos y se colocaron los discos empapados con el probiótico. Los resultados se expresaron como inhibición (+) o falta de inhibición (-).

5

Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 5. Efecto bactericida *in vitro* de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 (ECOBIOL) frente a las bacterias patógenas *A.salmonicida* y *Y.ruckeri*.

10

Patógeno	Condiciones del cultivo			
	pH		NaCl (%)	
	5	8	0.5	3
<i>A.salmonicida</i>	+	+	-	+
<i>Y.ruckeri</i>	+	+	-	+

Los resultados (**Tabla 5**) ponen de manifiesto que a pH 5 y 8, así como en condiciones de alta salinidad, *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 (ECOBIOL) presenta actividad inhibidora frente a bacterias patógenas que afectan al salmón y la trucha (*A. salmonicida* y *Y. ruckeri*).

15

Ejemplo 4. Capacidad de producción de ácidos orgánicos por *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 en condiciones de anaerobiosis.

20

El objetivo del presente ejemplo es evaluar la capacidad de producción de ácido láctico del aditivo de la invención ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) en condiciones de anaerobiosis autogeneradas. Una vez que *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 llega al intestino y comienza a crecer, la producción de ácido láctico excretado al lumen del intestino provoca una acidificación del medio que resulta en un crecimiento preferencial de la flora acidófila, teniendo ésta un efecto beneficioso sobre la salud intestinal. El crecimiento preferencial de este tipo de microorganismos desplaza a las bacterias patógenas mediante el conocido mecanismo de exclusión competitiva. Por todo lo anterior el estado sanitario del animal experimenta un fortalecimiento.

25

30

Las condiciones de crecimiento y de cultivo de las cepas de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 ya se han descrito a lo largo del presente documento. La composición del medio experimental es la siguiente:

Semillas de soja micronizada 4%

5 Jarabe de glucosa 1% (equivalente a 5,1 g/L de azúcares reductores)

Extracto de levadura 1%

La composición del medio descrito arriba imita la proporción de proteínas y carbohidratos en el lumen intestinal de los animales.

10

Cultivos experimentales se llevaron a cabo en botellas de 200 ml cerradas, para evitar la transferencia de oxígeno al medio de cultivo. El oxígeno disuelto inicialmente en el medio de cultivo, medido por sonda, era de aproximadamente un 0%, ya que fue eliminado en el proceso de esterilización anterior a la inoculación. Trazas de oxígeno disponible también se eliminaron en las primeras fases de crecimiento de microorganismos, por lo tanto, se crearon las condiciones de anaerobiosis autogenerados (igual que el lumen intestinal de los animales). Las condiciones de cultivo fueron: cultivos estáticos a 37 °C durante 24 horas.

15

20 Los siguientes parámetros fueron evaluados en las muestras obtenidas a lo largo de la fermentación:

1. CFU/ml: De acuerdo con la técnica de dilución de suero y posterior recuento de colonias en el medio de cultivo adecuado de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940.

25

2. La producción de ácido láctico: Los métodos utilizados fueron espectofotométricos, y la determinación de la presencia de NADH a una absorbancia de A340 en muestras de extracto de fermentación centrifugados y libre de células, con los sistemas enzimáticos Boehringer Mannheim.

30

3. Producción de ácido acético: El método utilizado fue espectofotométrico y la determinación de la presencia de NADH a A340 en muestras de extractos de fermentación centrifugados y libre de células, con sistemas enzimáticos Boehringer Mannheim.

4. Reductor de consumo de azúcares: El método utilizado fue colorimétrico, con el DNS reactiva, para establecer la cantidad residual de azúcares reductores en medios de cultivo de fermentación centrifugados.

35

Para el cálculo de la tasa de producción de ácido se utilizaron fórmulas apropiadas:

Rendimiento (Y) = gramos de ácido/gramos de azúcar reductor consumido

Tasa de producción de ácido (R) = gramos de ácido/ 10^9 UFC biomasa x hora

5

Los resultados pusieron de manifiesto la producción de ácido por parte de las cepas de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 en las condiciones de anaerobiosis autogenerados.

Tabla 6. Producción de ácido por parte de cultivos de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 en condiciones de anaerobiosis.

10

Parámetro	Y (g/g)	R
Ácido D-Láctico	-	-
Ácido L-Láctico	0.95	1.80
Ácido Acético	0.01	0.01

La mayor parte de la producción de ácido por el metabolismo fermentativo de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 da lugar a ácido L-láctico, pero también es capaz de producir ácido acético. La capacidad de conversión de ácidos regulados por el pH intestinal es muy alta. Se puede lograr la misma masa de ácidos que las bacterias asimiladoras de azúcares. Tales ácidos se pueden utilizar como controladores de pH en el intestino (bio-control de patógenos) y/o como fuente de carbono y energía disponible. Además, el azúcar no convertido en ácido es utilizado como biomasa para el crecimiento de los microorganismos. Esta demostrada capacidad de producción de ácido láctico, ejerce un efecto de modulación de la flora bacteriana intestinal, beneficiando el crecimiento de las especies favorables e inhibiendo el crecimiento de patógenos que pudieran crecer produciendo infecciones.

25

Ejemplo 5. Respuesta del crecimiento, morfología intestinal, hematología y composición corporal de la Tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus* (L.)) alimentada con dieta estándar suplementada con los aditivos de la invención.

30

En el presente ejemplo se evalúa el uso del aditivo de la invención ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) como probiótico en la tilapia del Nilo. Un total de 120 *O. niloticus* (L.) alevines (peso promedio de 9.4 ± 0.3 g) se dividieron en 3 grupos (20

peces/grupo) por duplicado. El grupo denominado G1 fue alimentado con una dieta basal como el grupo de control; mientras que los grupos denominados G2 y G3 fueron alimentados con la dieta basal a la que se le añadió el aditivo ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) en los niveles finales a una concentración de esporas del mismo de 1×10^9 y 1×10^7 u.f.c./kg, respectivamente.

Después de 30 días de alimentación, el grupo G2 mostró aumentos significativos en el peso corporal final (FBW, final body weight en sus siglas en inglés) (**Figura 8**), en el aumento de peso (WG, weight gain, en sus siglas en inglés) (**Figura 8**) y la tasa de crecimiento específico (SGR, specific growth rate, en sus siglas en inglés) (**Figura 8**) en comparación con los grupos G1 y G3. Al final del período de alimentación, los grupos G2 y G3 tuvieron aumentos significativos en FBW, WG, SGR (**Figura 8A y B**) y en la relación de eficacia proteínica (PER, protein efficacy ratio, en sus siglas en inglés) en comparación con el grupo control (G1) (**Figura 8C**).

Además, el uso de una mayor concentración de probiótico en la dieta de los animales aumentó la altura de las vellosidades intestinales, especialmente en la parte proximal del intestino. Así, el grupo G2, presentó un número significativamente mayor de células secretoras de moco (células caliciformes), en las partes proximal y distal del intestino, que los grupos G3 o G1 (**Figura 9A-E**).

Los resultados obtenidos, también pusieron de manifiesto que los animales del grupo G2 presentaban una mayor concentración significativa de linfocitos intra-epiteliales (IEL, intra-epithelial lymphocytes, en sus siglas en inglés) en el intestino en comparación con el grupo control G1, en todas las partes de los intestinos, mientras que el grupo G3 presentaba significativamente más IELs que el grupo control G1, pero sólo en la parte distal del intestino (**Figura 9F**).

La adición a la dieta de la tilapia del Nilo del aditivo ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) no tuvo efectos nocivos sobre el recuento total de eritrocitos ni sobre los niveles de glucosa, pero sí que incrementó el contenido de hemoglobina, los valores del hematocrito y el recuento total de leucocitos (**Figura 10**).

La adición de alta concentración de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 en la dieta de la tilapia del Nilo (grupo G2) produjo mejores efectos que una menor concentración de dicho aditivo (grupo G3) sobre la concentración total de proteínas en suero y sobre los niveles

de globulina. El contenido de proteínas en todo el cuerpo de los animales incluidos en los grupos G2 y G3 fueron superiores a los niveles de proteínas encontrados en el grupo control (G1). La mayor concentración de grasa se registró en el grupo G2, seguido del grupo G3 y a continuación el grupo G1 (**Figura 11**).

5

En otros experimentos realizados en tilapias cultivadas en presencia de la cepa patógena *A. hydrofila*, se observó que los animales que recibieron el aditivo de la invención ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) en la dieta presentaron mayor actividad lisozima (enzima con actividad antibacteriana) en sangre ($p < 0.05$) y un incremento numérico en el recuento de glóbulos blancos. Estos parámetros indican una mejor predisposición a resistir infecciones.

10

Estos resultados ponen de manifiesto, por tanto, que la adición del aditivo ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) a la dieta de la tilapia del Nilo (*O. niloticus*), muestra un efecto beneficioso sobre dichos animales, tanto en la potenciación de su crecimiento, como de su sistema inmune (inmunoestimulador).

15

Ejemplo 6. Evaluación del aditivo de la invención ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) y de Gustor BP-70 como promotores de crecimiento en dietas con harina de pescado o torta de soya para alevines de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

20

El objetivo del presente ejemplo es evaluar la adición a una dieta de alevines de trucha arco iris (*O. mykiss*), dos promotores de crecimiento, ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) y Gustor BP-70, solos o combinados, en el nivel de 0.1%, en dietas a base de harina de pescado o de torta de soya, sobre el comportamiento productivo, tomando en cuenta los parámetros de crecimiento (ganancia de peso y talla), conversión de alimento y supervivencia de dichos animales.

25

Se utilizaron las facilidades de las instalaciones del Centro de Producción Piscícola de Vinchos, situado en el distrito de Canchayllo, perteneciente a la SAIS "Tupac Amaru", en el departamento de Junín (Perú). La elaboración de las dietas experimentales se realizó en la Planta de Alimentos Balanceados del Programa de Investigación y Proyección Social en Alimentos, Facultad de Zootecnia, de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima, Perú), durante los meses de marzo, abril y mayo del 2012, con una duración de 60

35

días.

Se instalaron 170000 alevines de trucha arco iris en 30 estanques de 5 x 0.60 metros (unidades experimentales), con capacidad para 5000 peces cada uno. Se realizaron tres ingresos, en periodos de 15 días (réplicas); el primero con peces con peso promedio de 2.2 g y 6.0 cm de talla; a los 15 días se instalaron peces con un peso promedio 0.15 g y 2.25 cm de talla y a los siguientes 15 días, peces con un peso promedio de 0.08 g y 1.90 cm de talla.

Se formularon dos dietas comerciales, una de ellas a base a harina de pescado (43%) y otra a base a torta de soya (50%), se utilizó la programación lineal a mínimo coste, según las recomendaciones del NRC (1993). A cada dieta experimental se le añadieron 0.1% de ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) o BP-70 o la mezcla de ambos, dando lugar a 8 tratamientos. Cada uno de los tratamientos comprende:

T1: 43% de harina de pescado (HP) y 25 % de torta de soya (TS)

T2: 29 % de HP y 50% de TS

T3: HP+ECOBIOL

T4: TS+ECOBIOL

T5: HP+BP-70

T6: TS+BP-70

T7: HP+ECOBIOL+BP-70

T8: TS+ ECOBIOL+BP-70

Los datos de los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico, considerando el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), con la finalidad de expresar las diferencias entre los tratamientos, mediante el análisis de variancia (ANVA) y diferencias de los promedios en los parámetros evaluados utilizando la prueba estadística de DUNCAN .

En la Tabla 7 se muestra la composición del alimento utilizado y su valor nutritivo.

Tabla 7. Fórmulas usadas en las dietas experimentales y su valor nutritivo.

Ingredientes (%)	Dieta Basal Harina de Pescado	Dieta Basal Torta de Soya
Harina de pescado prime	43.00	29.00
Harinilla de trigo	30.10	15.10
Torta de soya, 47	25.00	50.00
Aceite vegetal	1.00	3.00
Aceite semi refinado de pescado		1.92
Sal	0.58	0.66
Premezcla de vitaminas y minerales	0.30	0.30
Antioxidante	0.02	0.02
Total	100.00	100.00
Valor Nutricional Calculado		
Proteína total, %	45.27	45.00
Fibra, %	2.81	2.78
Grasa, %	7.84	9.60
ED. Truchas, Mcal/kg	3.70	3.70
Lisina, %	3.20	3.15
Metionina, %	1.08	0.95
Cistina, %	0.51	0.59
Arginina, %	2.87	3.11
Histidina, %	1.12	1.14
Leucina, %	3.40	3.45
Isoleucina, %	2.10	2.10
Fenilalanina, %	2.02	2.14
Tirosina, %	1.53	1.60
Treonina, %	1.85	1.85
Triptófano, %	0.55	0.59
Valina, %	2.37	2.41
Met+Cist, %	1.59	1.53
Fen-tir, %	3.53	3.72
Ac Gr n-3, %	1.79	1.97

Ingredientes (%)	Dieta Basal Harina de Pescado	Dieta Basal Torta de Soya
Ac Gr n-6, %	0.62	1.61
Fósforo total, %	1.49	1.17
Calcio, %	1.71	1.24
Sodio, %	0.70	0.60
Potasio, %	1.26	1.50
Cloro, %	0.75	0.72
Colina, ppm	2957.75	2846.29
Prot Dig, %	41.80	42.43

6.1 Resultados del peso y de la talla de *O. mykiss* alimentados con las dietas descritas en la Tabla 7 junto con los aditivos de la invención.

5

Los resultados de los parámetros de comportamiento productivo, cuyos valores corresponden al promedio de tres replicas, se muestra en las **Figuras 12 a 16**. Los peces alimentados con las dietas conteniendo mayor porcentaje de harina de pescado como fuente principal de proteína, mostraron mayor crecimiento en peso y talla comparado con aquellos que recibieron las dietas conteniendo torta de soya, en un 5.34 y 4.77%, respectivamente; experimentando mayor diferencia los peces de menor tamaño.

10

La adición de los aditivos ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) o BP-70 o la mezcla de ambos a las dietas con harina de pescado o torta de soya, no mejoraron estadísticamente la ganancia de peso y la talla (**Figuras 12 y 13**). Sin embargo, se observa una tendencia numérica a un mayor incremento de la talla con las dietas basadas en torta de soya con la adición de ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) o BP-70. Por otro lado, la adición de ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) a la dieta con torta de soya generó mayor crecimiento del peso y de la talla en los peces más pequeños, un 10 y un 16% respectivamente en relación a la dieta control sin ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) (**Figuras 12 y 13**).

15

20

6.2. Resultados del consumo de alimento y de la conversión alimenticia de *O.mykiss* alimentados con las dietas descritas en la Tabla 7 junto con los aditivos de la invención.

Los resultados indican que no existen diferencias estadísticas en el consumo de alimentos. Sin embargo, los peces alimentados con las dietas conteniendo harina de pescado, mostraron tendencia a mayor consumo de alimento (**Figura 14**).

En relación a la conversión alimenticia, los peces que recibieron las dietas conteniendo harina de pescado, mostraron mejor conversión del alimento por unidad de ganancia de peso, siendo estadísticamente diferente a los peces que recibieron las dietas con torta de soya. La adición de ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) a la dieta a base de torta de soya, mejoró significativamente la utilización del alimento en el crecimiento de los peces, siendo más eficientes en un 4%, comparado con los peces que recibieron la dieta control de torta de soya (**Figura 15**). Similar comportamiento se observa en los peces de diferentes tamaños (réplicas).

6.3. Resultados de supervivencia de *O.mykiss* alimentados con las dietas descritas en la Tabla 7 junto con los aditivos de la invención.

Los peces que recibieron BP-70 en la dieta a base de torta de soya, lograron menor mortalidad (2.6%), estadísticamente significativa comparado con aquellos que recibieron las dietas con harina de pescado (4 %), con o sin la adición de BP-70 o ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) a la dieta con torta de soya (3.6%). La supervivencia de los peces fue muy similar en todos los tratamientos (**Figura 16**).

Los resultados obtenidos en el presente ejemplo, ponen de manifiesto que las dietas conteniendo harina de pescado produjeron mayor crecimiento en peso y talla de los alevines de truchas en relación a la dieta con torta de soya. Además, la adición de ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) o BP-70 a las dietas conteniendo harina de pescado o torta de soya no mejoraron el crecimiento en relación al peso, aunque si se muestra una tendencia a un mayor crecimiento en talla en dietas con torta de soya.

La adición del aditivo ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) a la dieta conteniendo torta de soya mejoró estadísticamente la conversión alimenticia, mientras que la adición de BP-70 a la dieta conteniendo torta de soya, redujo significativamente la mortalidad, logrando mayor supervivencia de los animales.

Con los resultados mostrados, parece evidente la utilización de dietas a base a torta de soya como fuente de proteína más la adición de ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) para reducir el coste de alimentación debido a un ahorro económico por la mayor eficiencia en las dietas para truchas.

5

Ejemplo 7. Uso de ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) como agente de biorremediación.

La calidad del agua y la gestión de la calidad del suelo es considerado como uno de los aspectos más importantes de la acuicultura en estanques. Si bien los parámetros de calidad del agua, tales como oxígeno disuelto, pH, o las concentraciones de amoníaco afectan a funciones esenciales del cuerpo, el estado del fondo de los estanques y el intercambio de sustancias entre el suelo y el agua afecta en gran medida la calidad del agua. La acumulación de residuos aumentará la demanda de oxígeno por parte de las bacterias con el fin de realizar su metabolismo y degradar la materia orgánica, favoreciendo el desarrollo de zonas anaeróbicas. Estos sedimentos anóxicos se pondrán en contacto con la columna de agua rica en oxígeno, produciendo una alteración de las condiciones ambientales adecuadas para un desarrollo saludable de los organismos que habitan en dichos estanques. Además, el amoníaco puede difundirse en la columna de agua no sólo como resultado de las excreciones de los peces, sino también después de la descomposición microbiana de la materia orgánica. En condiciones de alta temperatura y pH, la acumulación de amoníaco puede causar efectos sub-letales como retraso del crecimiento o la propensión a las enfermedades. Por lo tanto, es de importancia clave para mantener el fondo del estanque en condiciones aeróbicas y evitar que la materia orgánica y los limos se acumulen. En este sentido, *Bacillus* spp. son considerados como agentes de biorremediación, concepto que se refiere a la utilización de microorganismos que ayudan en el mantenimiento del ambiente del estanque adecuado gracias a la secreción de exo-enzimas que descomponen la materia orgánica.

La finalidad del presente ejemplo es evaluar la capacidad *in vitro* de ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) como agente de biorremediación.

En primer lugar se evaluó la demanda química de oxígeno (DQO), que se define como una medida de la capacidad del agua para consumir oxígeno durante la descomposición de la materia orgánica y la oxidación de los productos químicos inorgánicos, tales como el amoníaco y el nitrito.

El agua se obtiene de un criadero de peces y se añadió en bandejas (300 cm²). La profundidad alcanzada por la capa de agua y lodo fue de 5 cm. ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens*) y otras bacterias probióticas se añadieron en las bandejas de tratamiento y se evaluaron por duplicado de la siguiente manera:

5

Tratamiento	
Control	500 ml agua
Tratamiento 1	500 ml de agua + <i>B. amyloliquefaciens</i> (ECOBIOL)
Tratamiento 2	500 ml de agua + <i>B. cereus</i>
Tratamiento 3	500 ml de agua + <i>B. licheniformes</i>

Dos valores de DQO se determinaron: 1) soluble y 2) total.

Las medidas de DQO solubles en el sobrenadante se realizaron después de transcurridos
10 15 min de sedimentación tras la homogeneización de los medios, mientras que las medidas de DQO totales se realizaron inmediatamente después de la homogeneización. Las mediciones se llevaron a cabo en el día 0 (inicial), el día 3 y el día 7. La temperatura se mantuvo a 25 °C.

Los resultados revelaron que la DQO total se redujo progresivamente en los grupos de
15 tratamiento, sobre todo en los tratados con ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940). Además, la capa de agua y lodo se redujo a 4 cm de profundidad. Esto indica unos niveles más bajos de residuos, y por consiguiente, mejores condiciones ambientales, debido a la acción biorremediadora del tratamiento con ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens*
20 CECT 5940) (Ver **Tabla 8**).

De acuerdo con los resultados mostrados, el uso de ECOBIOL (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) como agente de biorremediación puede ayudar a mantener el ambiente del
25 estanque adecuado favoreciendo así el crecimiento saludable de los organismos que viven en él.

Tabla 8. Resultados de la demanda química de oxígeno (DQO) analizados a lo largo del tratamiento.

DQO mgO ₂ /L	Inicial		3 días		7 días		Variación
	Soluble	Total	Soluble	Total	Soluble	Total	
Control	89.0	1677.5	<30	1848.5	<30	1873.5	+10.43%
ECOBIOOL	89.5	2145.5	<30	1602.0	<30	1559.0	-37.25%
<i>B. cereus</i>	86	2694.0	<30	2143.5	<30	2057.5	-30.85%
<i>B. licheniformis</i>	95.5	1692.5	<30	1678.5	<30	1653.5	-2.35%

REIVINDICACIONES

1. Uso de *Bacillus amyloliquefaciens*, en la cría de animales acuáticos.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza la cepa CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens*.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza además al menos la especie *Bacillus cereus*.
- 10 4. Uso según la reivindicación 3 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza la cepa CECT 953 de *B. cereus*.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza además al menos la especie *Pediacoccus acidilactici*.
- 15 6. Uso según la reivindicación 5 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza la cepa CNCM MA 18/5 M de *P. acidilactici*.
- 20 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza además al menos otras especies seleccionadas de entre cualquiera de las siguientes: *B. subtilis* y *B. licheniformis*.
- 25 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza además al menos una sal de un ácido orgánico.
9. Uso según la reivindicación 8 caracterizado por que la sal del ácido orgánico se encuentra preferentemente en una proporción de entre un 30-70% en peso húmedo, siendo más preferible una proporción del 60%.
- 30 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 caracterizado por que los ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: butírico, propiónico, fórmico, láctico, cítrico, láurico, cúprico, caprílico, caproico o acético.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 caracterizado por que las sales de ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: sódica, cálcica, cúprica o potásica.
- 5 12. Uso según las reivindicaciones 8 a 11 caracterizado por que la sal del ácido orgánico es la sal sódica del ácido butírico.
13. Uso según las reivindicaciones 8 a 12 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza una combinación de las cepas CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens* y CECT 953 de *B. cereus* junto con sal sódica del ácido butírico.
- 10 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 caracterizado por que además, es capaz de modular la respuesta inmune y ejercer un efecto bactericida frente a microorganismos patógenos.
- 15 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 donde los animales acuáticos son preferentemente moluscos, crustáceos, tilapia, dorada, lubina y salmónidos.
16. Aditivo para alimentación de animales acuáticos que comprende la combinación de, al menos, dos especies pertenecientes al género *Bacillus*, seleccionadas de entre: *B. amyloliquefaciens* y *B. cereus*.
- 20 17. Aditivo según la reivindicación 16 caracterizado por que comprende la combinación de, al menos, la cepa CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens* y la cepa CECT 953 de *B. cereus*.
- 25 18. Aditivo según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17 caracterizado por que además puede comprender la especie, *P. acidilactici*.
- 30 19. Aditivo según la reivindicación 18 caracterizado por que comprende la cepa CNCM MA 18/5 M de *P. acidilactici*.
20. Aditivo según las reivindicaciones 16 a 19 caracterizado por que además comprende al menos una sal de un ácido orgánico.

21. Aditivo según la reivindicación 20 caracterizado porque la sal del ácido orgánico se encuentra preferentemente en una proporción de entre un 30-70% en peso húmedo, siendo más preferible una proporción del 60%.
- 5 22. Aditivo según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21 caracterizado por que los ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: butírico, propiónico, fórmico, láctico, cítrico, láurico, cúprico, caprílico, caproico o acético.
- 10 23. Aditivo según las reivindicaciones 20 a 22 caracterizado por que las sales de ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: sódica, cálcica, cúprica o potásica.
- 15 24. Aditivo según las reivindicaciones 20 a 23 caracterizado por que la sal del ácido orgánico es la sal sódica del ácido butírico.
- 25 25. Aditivo según las reivindicaciones 16 a 24 caracterizado por que comprende una combinación de las cepas CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens* y CECT 953 de *B. cereus* junto con sal sódica del ácido butírico.
- 20 26. Aditivo según las reivindicaciones 16 a 25 caracterizado por que los animales acuáticos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: moluscos, crustáceos, tilapia, dorada, lubina y salmónidos.
- 25 27. Uso de los aditivos de las reivindicaciones 16 a 26 en la cría de animales acuáticos.
28. Uso de los aditivos según la reivindicación 27 caracterizados por que además actúan como moduladores de la respuesta inmune.
- 30 29. Uso de los aditivos según la reivindicación 27 caracterizados por que además presentan acción bactericidas frente a microorganismos patógenos.
- 35 30. Uso de los aditivos según la reivindicación 27 caracterizados por que además presentan acción biorremediadora.

31. Uso de los aditivos según las reivindicaciones 27 a 30 caracterizado por que los animales acuáticos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: moluscos, crustáceos, tilapia, dorada, lubina y salmónidos.

FIGURA 1

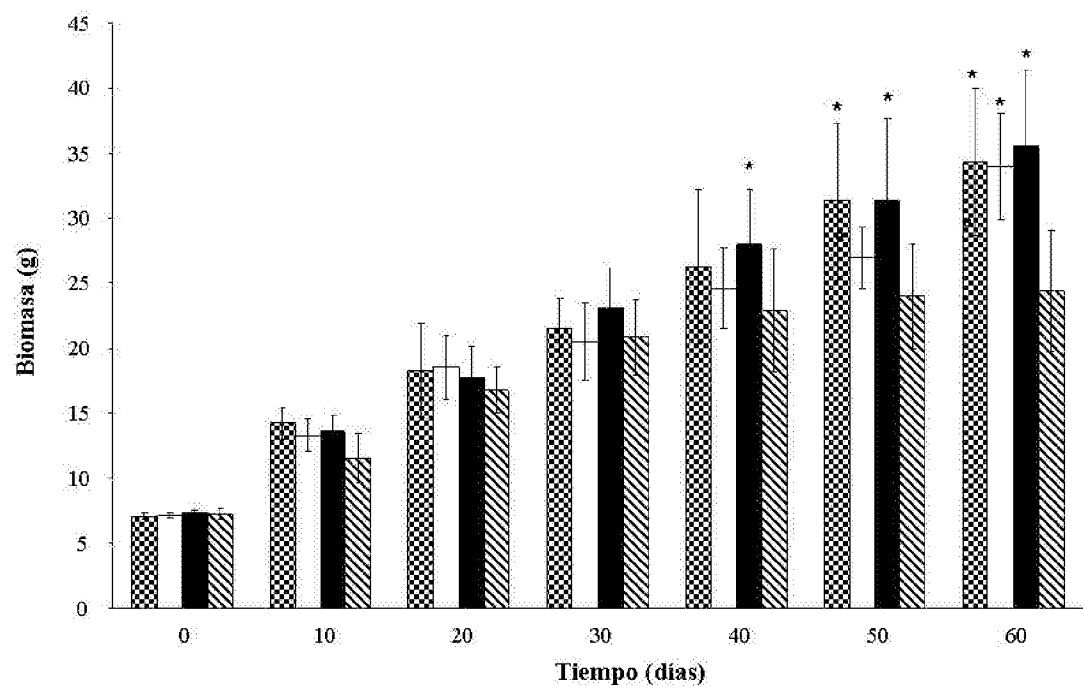


FIGURA 2

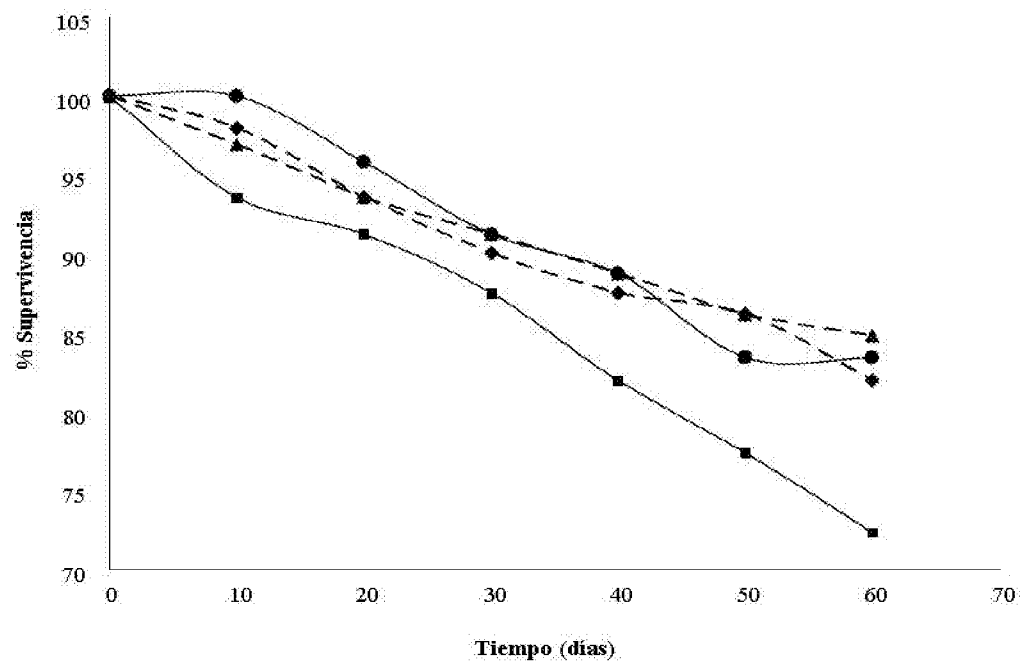


FIGURA 3

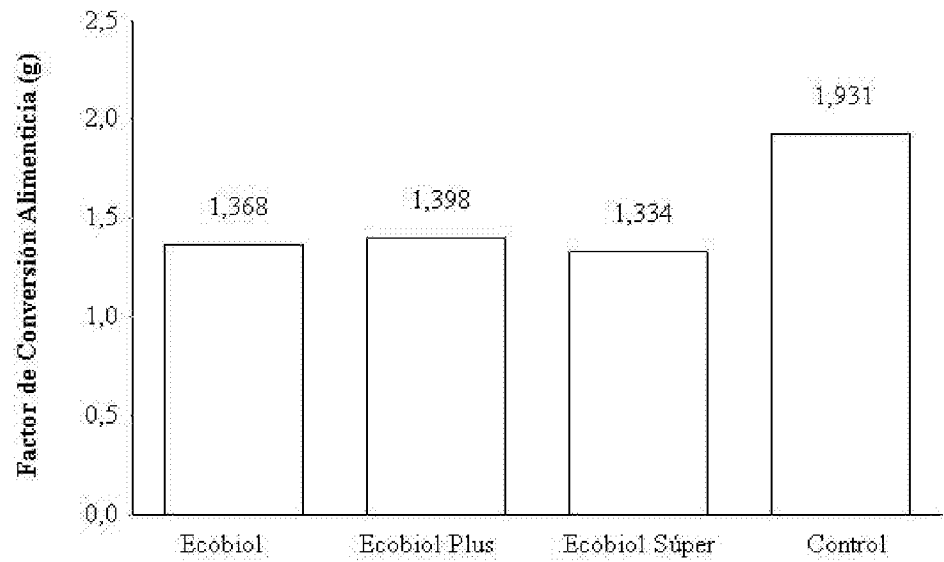


FIGURA 4

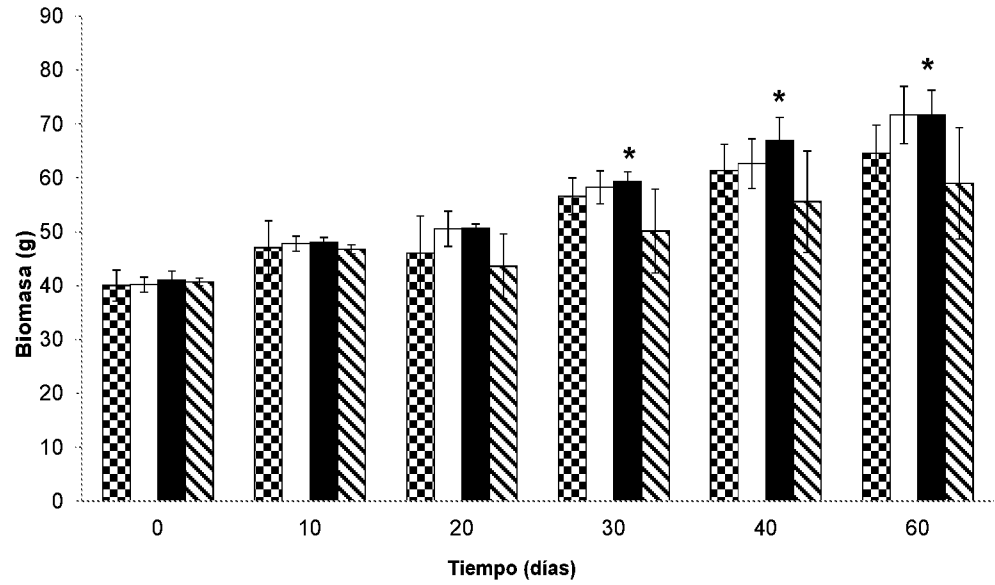


FIGURA 5

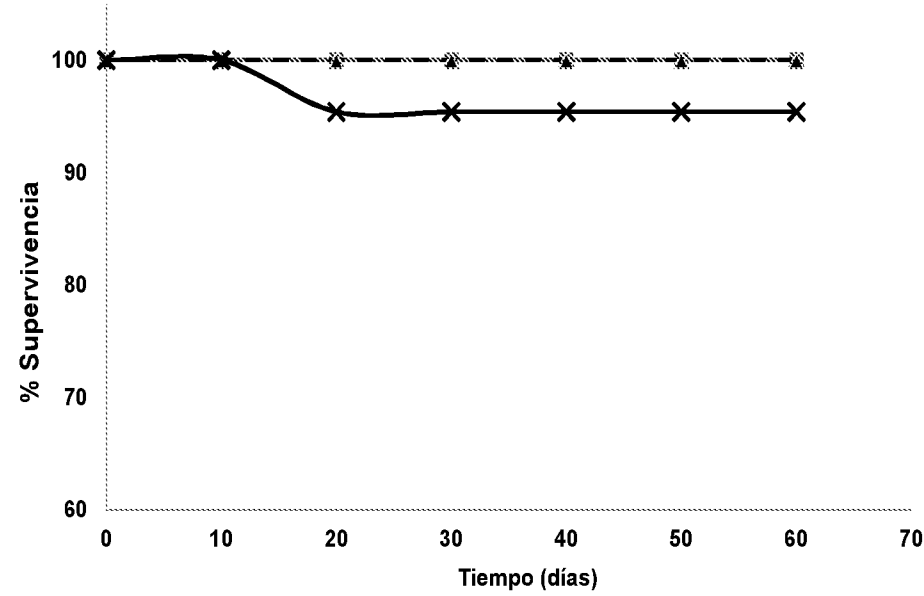


FIGURA 6

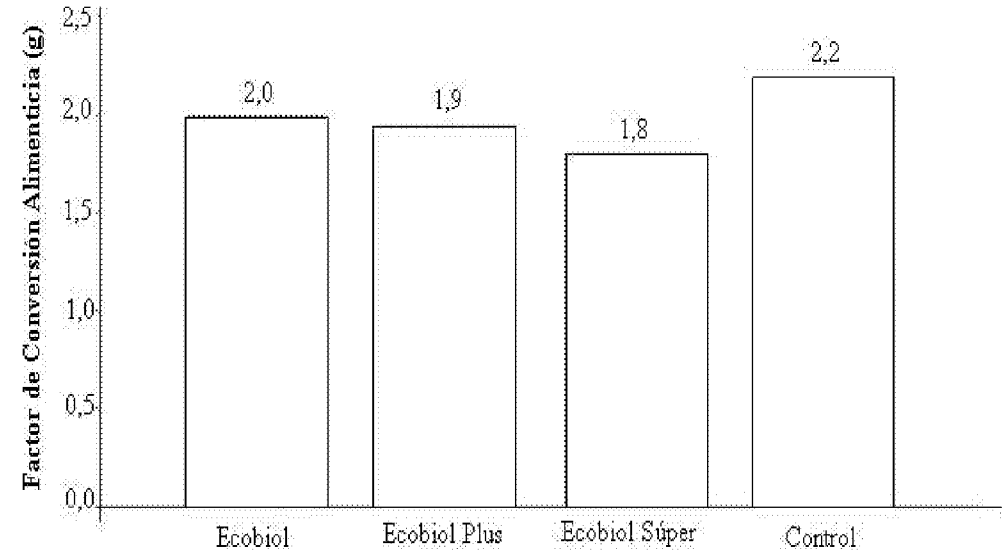


FIGURA 7

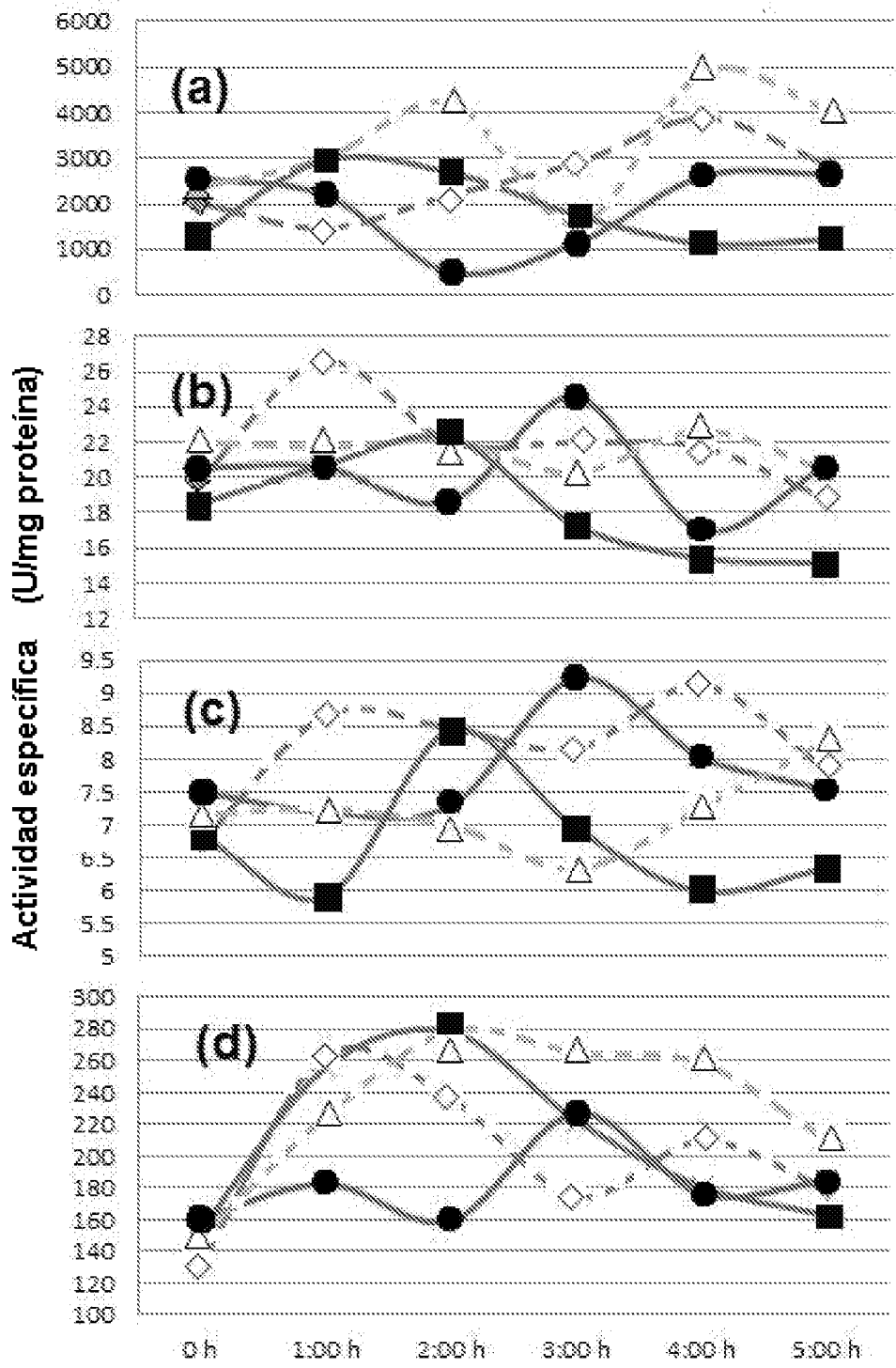


FIGURA 8

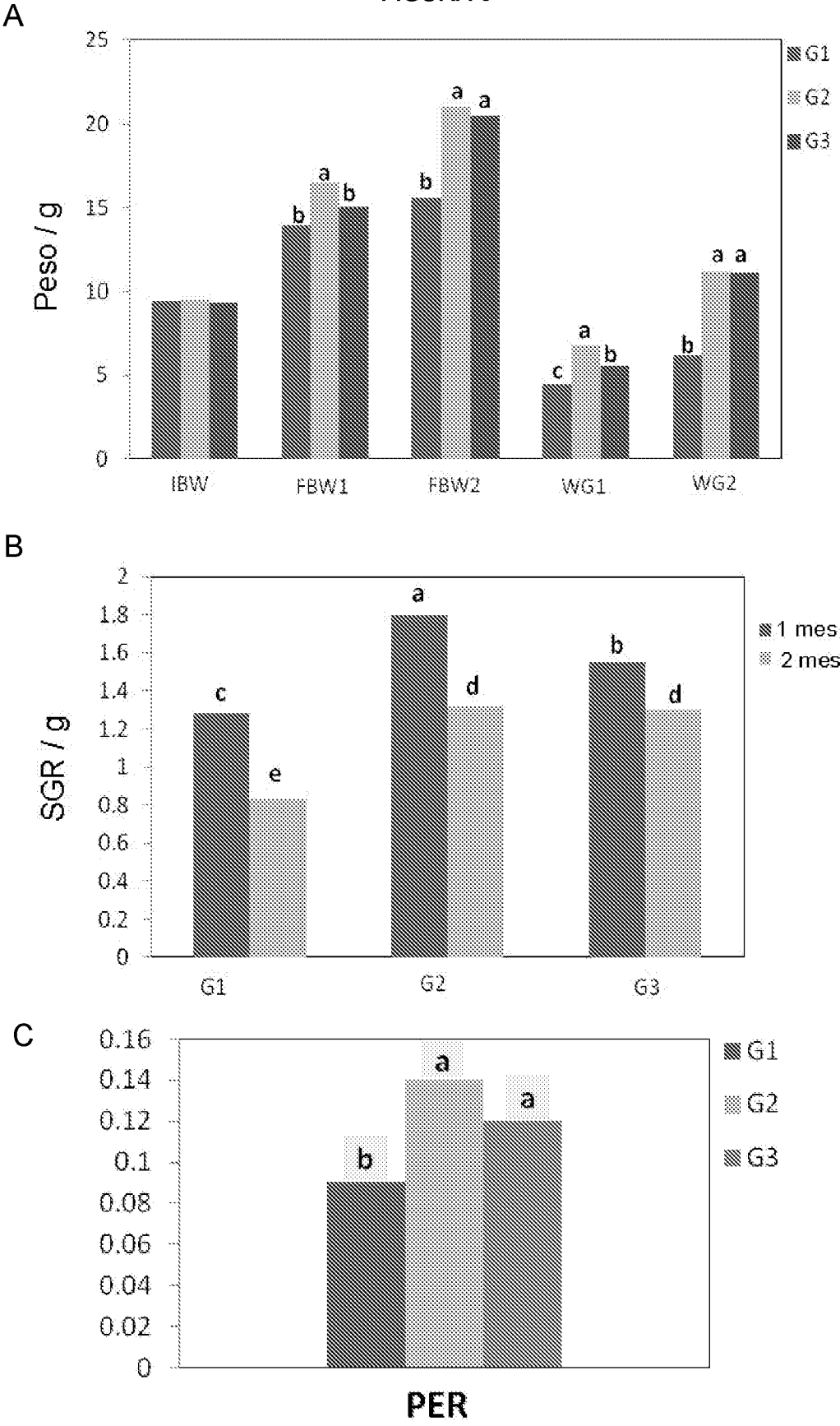


FIGURA 9

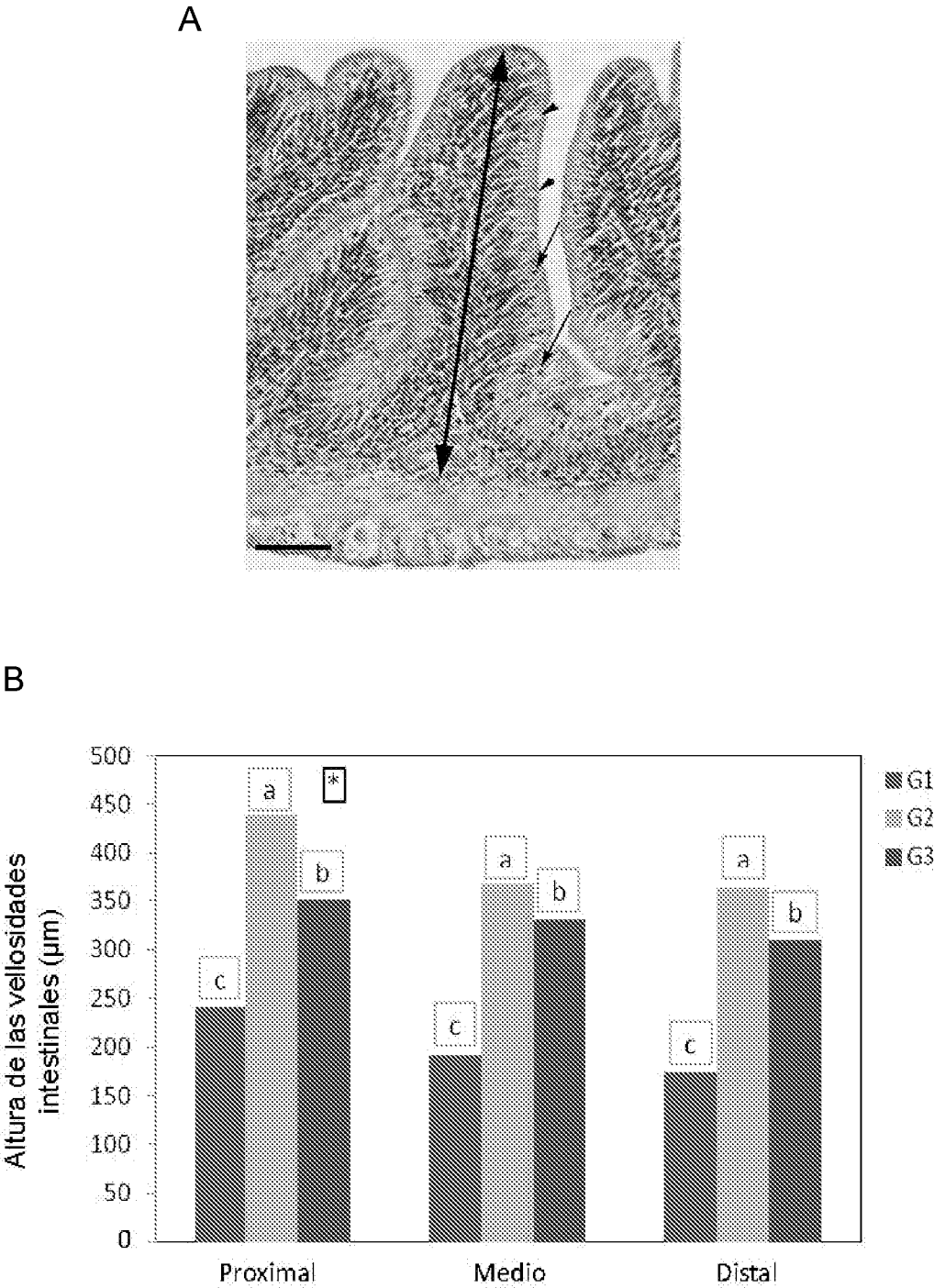
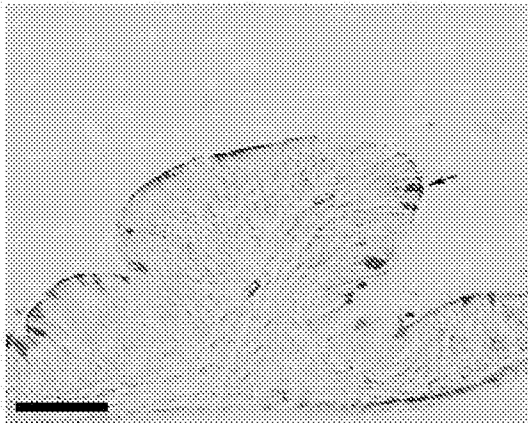
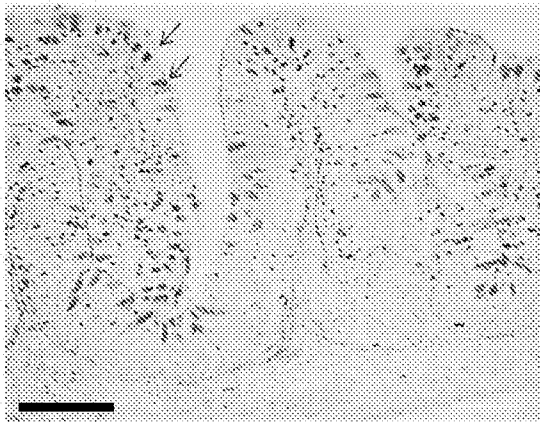


FIGURA 9 (cont.)

C



D



E

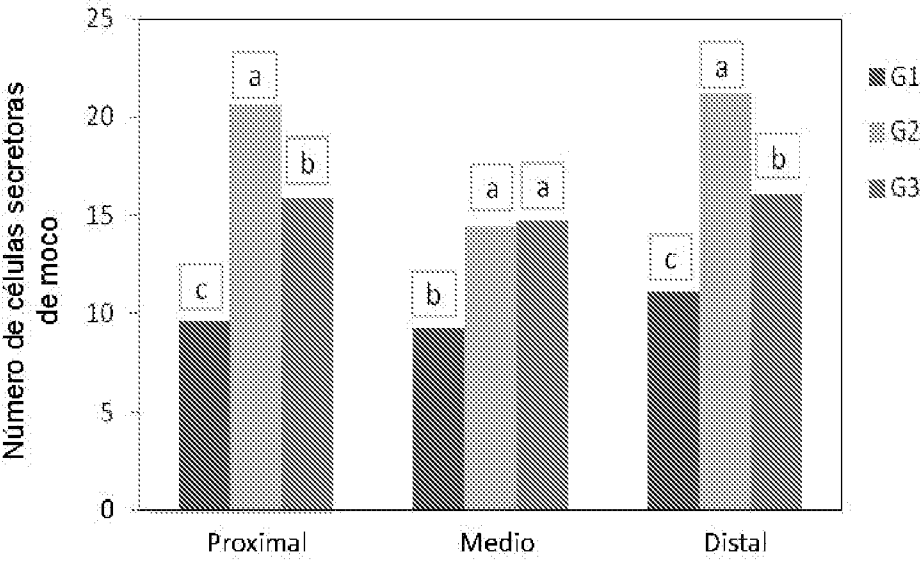


FIGURA 9 (cont.)

F

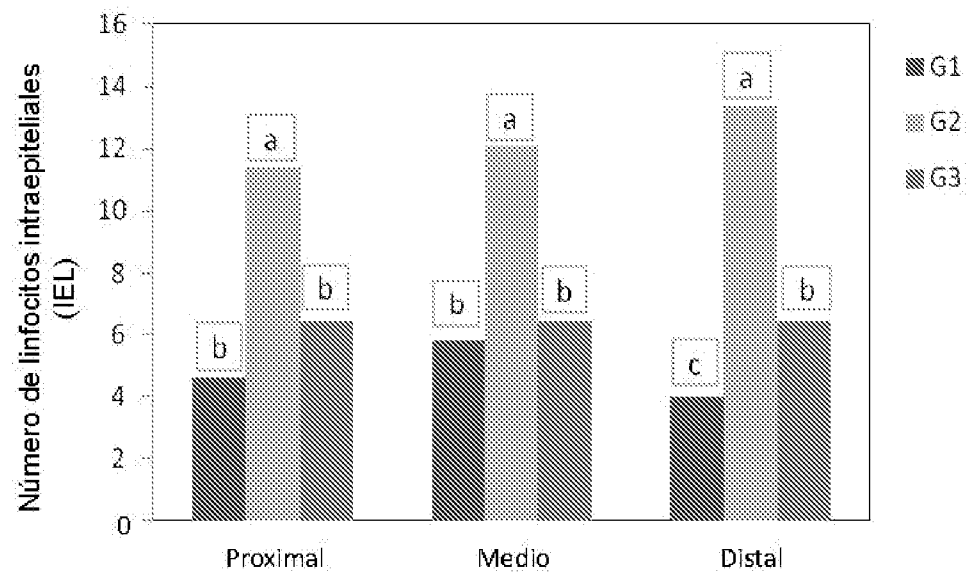


FIGURA 10

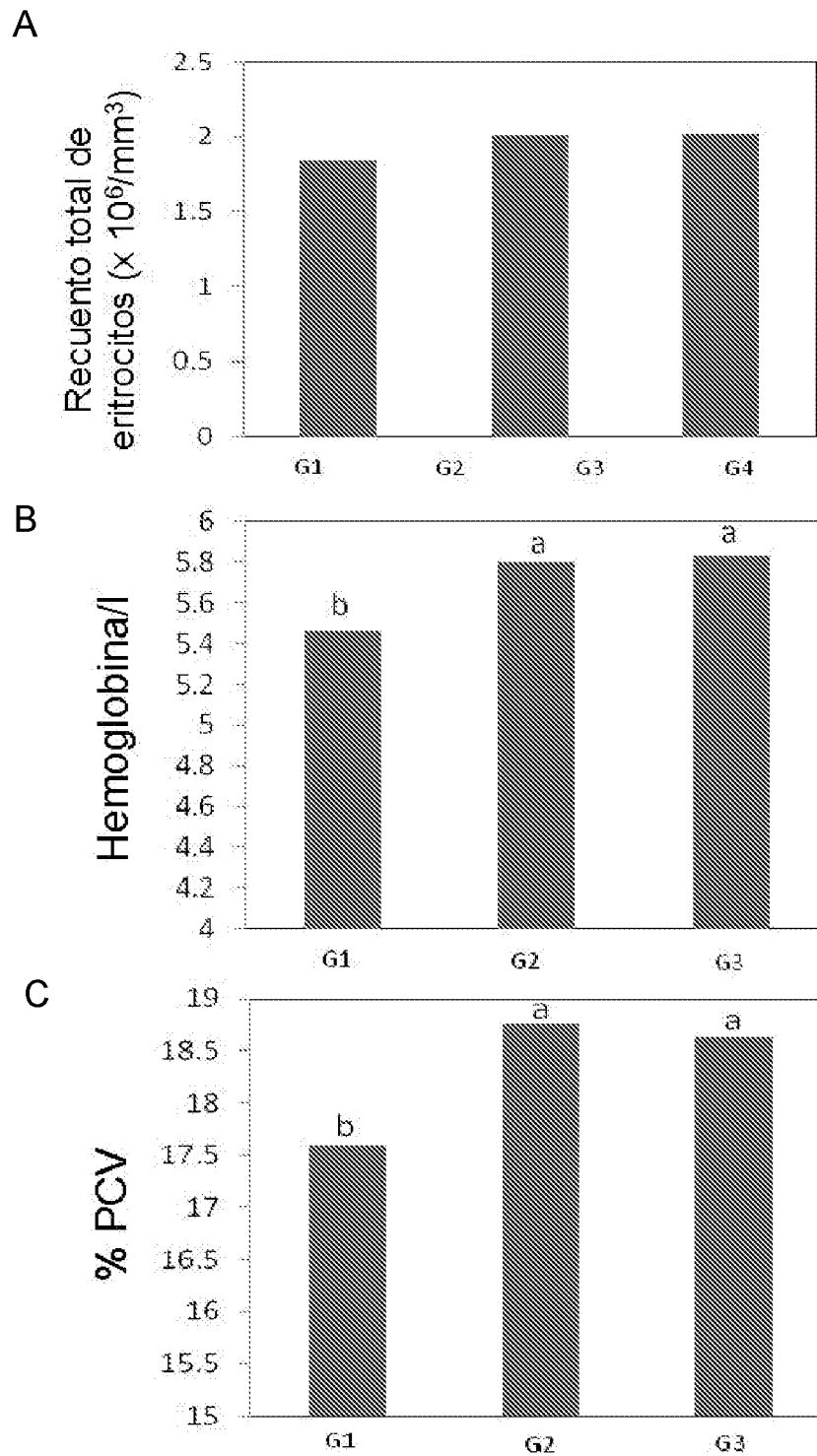
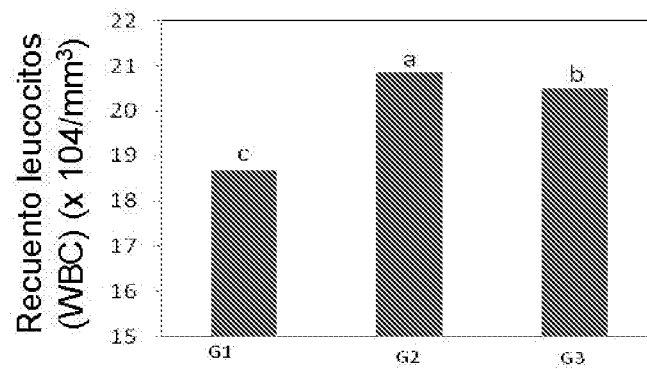
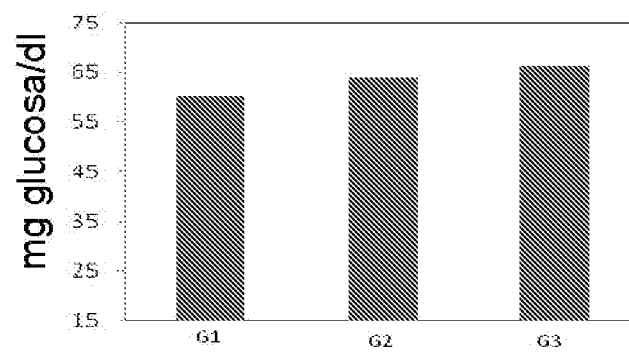


FIGURA 10 (cont.)

D



E



F

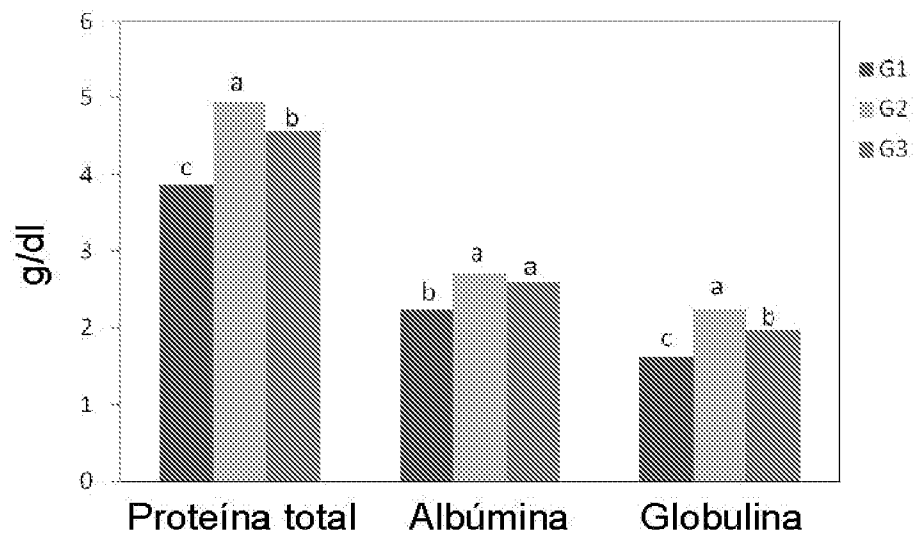


FIGURA 11

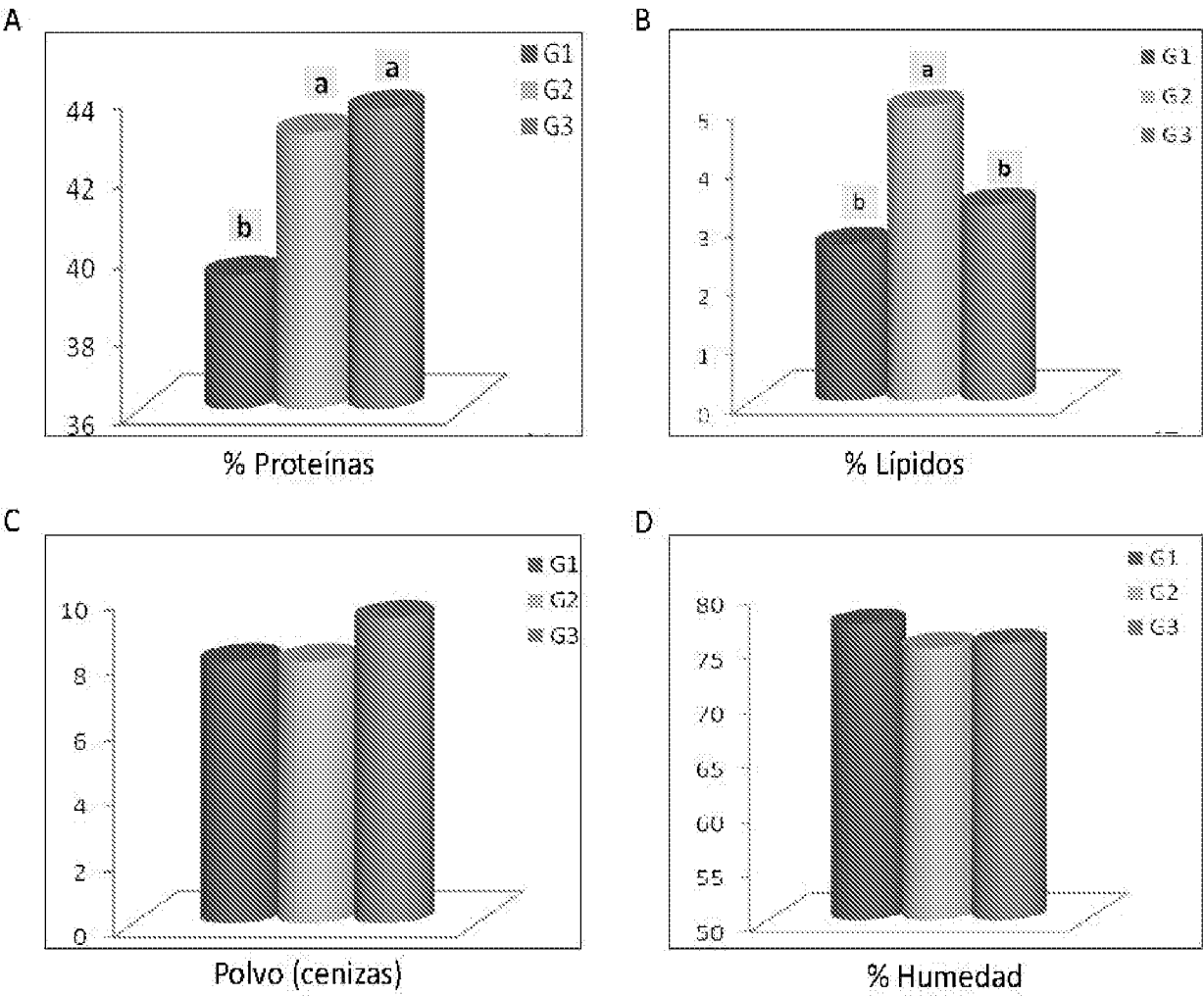


FIGURA 12

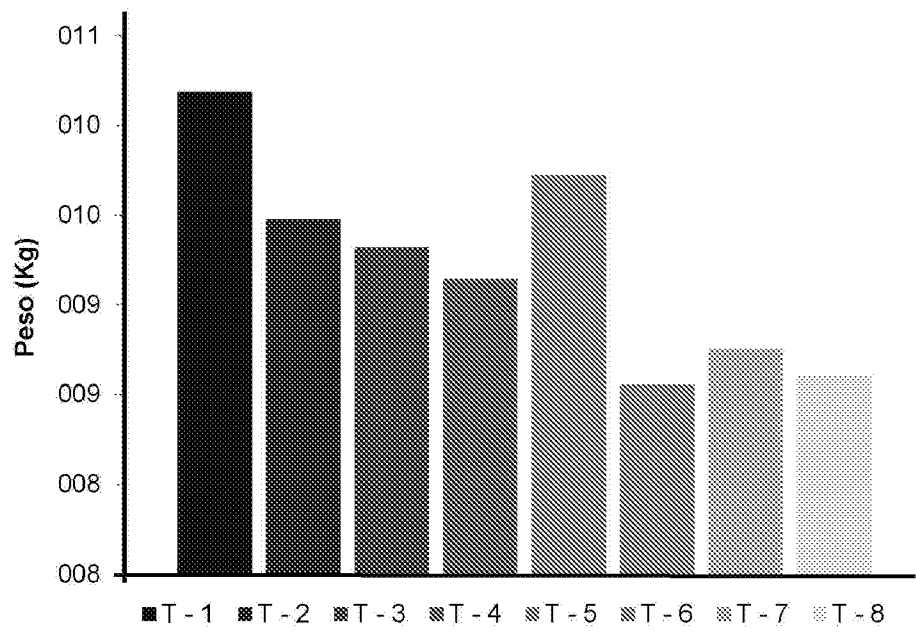


FIGURA 13

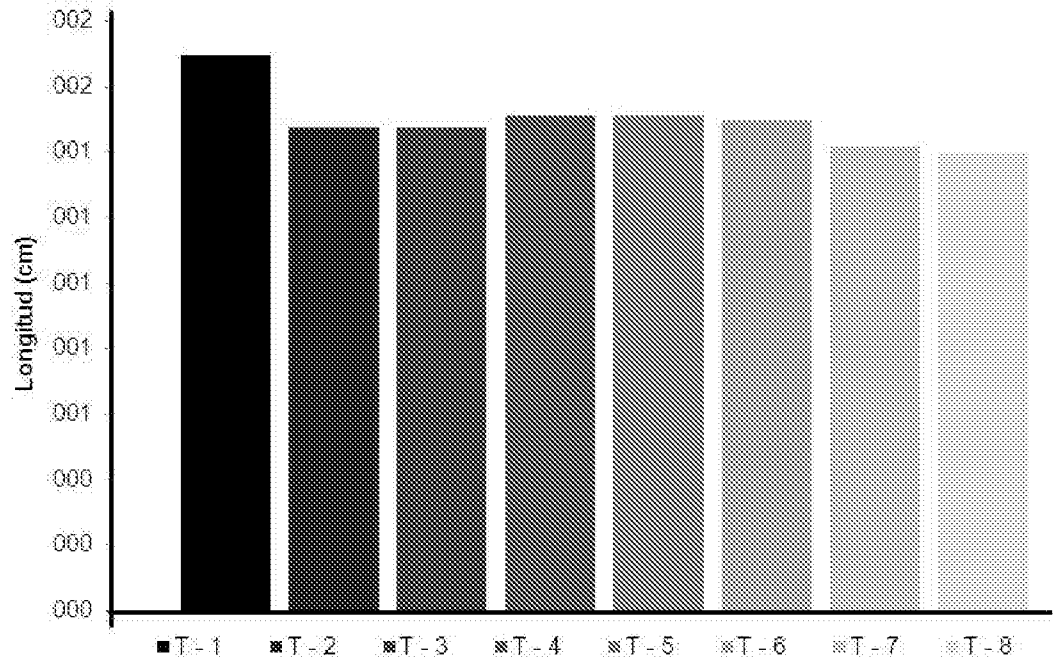


FIGURA 14

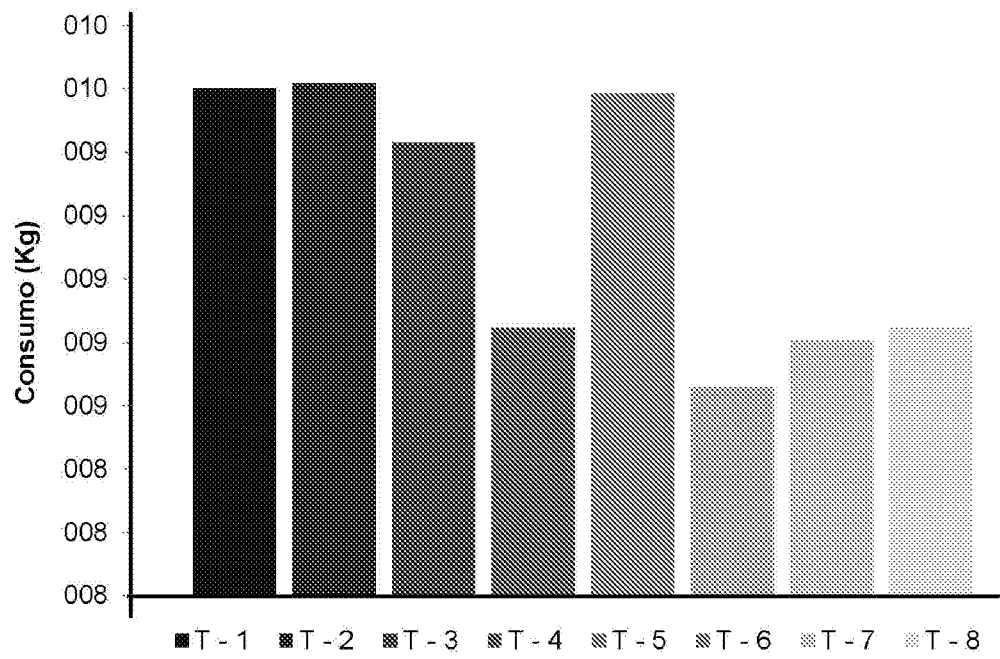


FIGURA 15

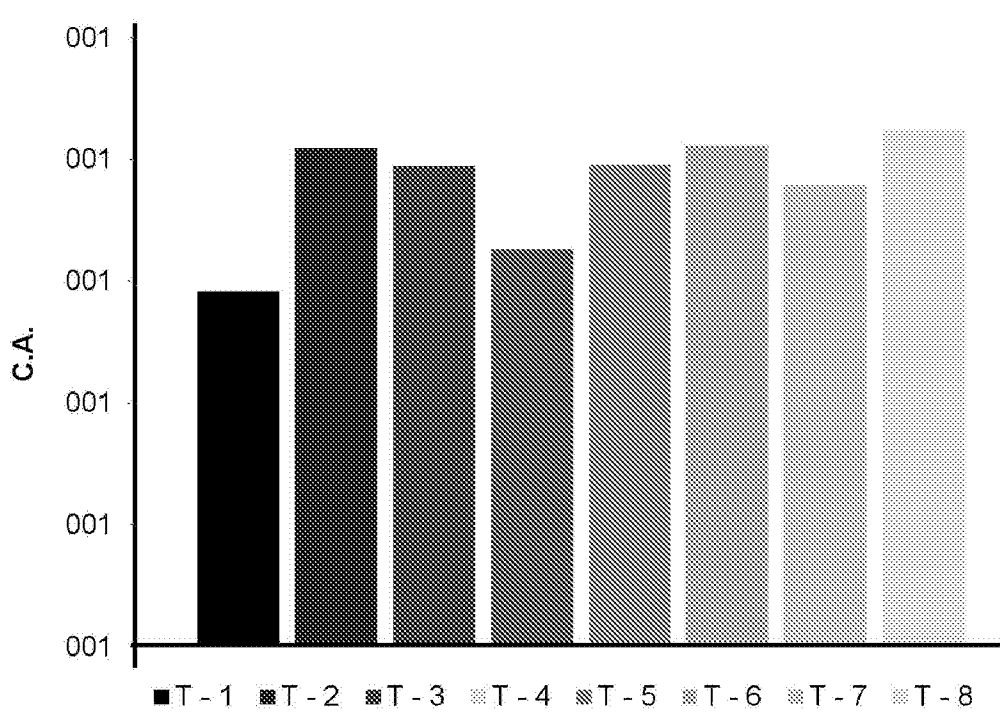
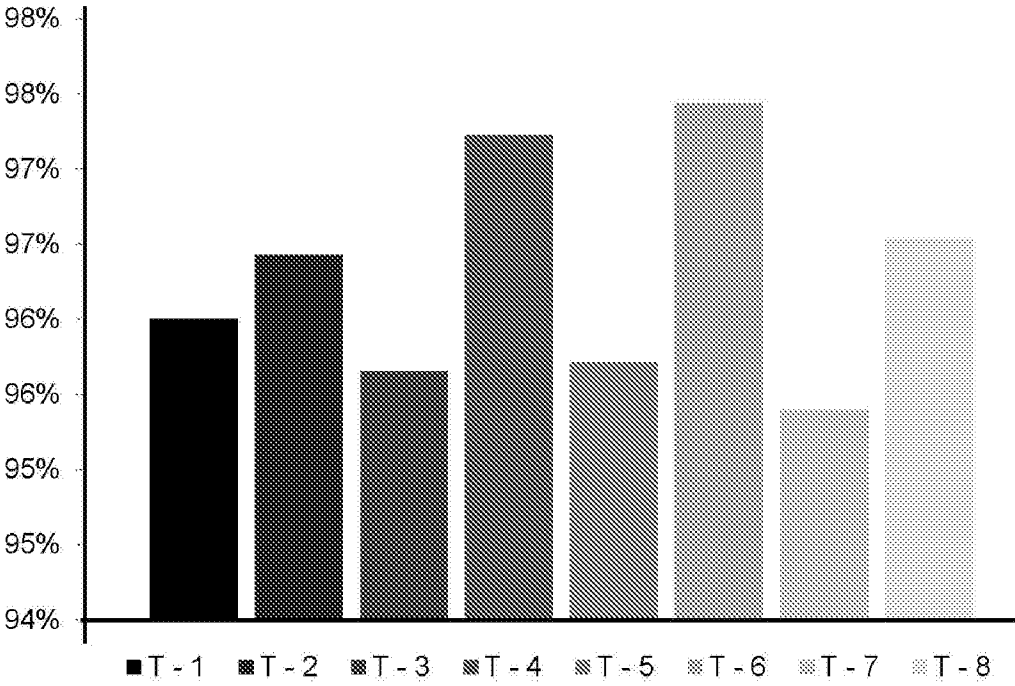


FIGURA 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070573

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23K, A61K, A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, INTERNET, BD-TXT, BIOSIS, MEDLINE, HCAPLUS.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NUEZ-ORTIZ, W. Ecobiol Aqua. A unique and highly effective single strain probiotic. International Aquafeed. November-December 2011. Retrieved of Internet [on line] [retrieved on 24/10/2013] http://www.docstoc.com/?docId=103806272&download=1	1, 2, 14,15
Y		3-12, 16-24, 26-31
Y	US 2006228337 A1 (INSTITUTE FRANCAIS DE RECHERCHE POUR LA EXPLOTATION DE LA MER.) 12/10/2006, paragraphs 14-17, 36, 37, 40, 41, 44.	3, 5-7, 16, 18, 19, 26-31
Y	ESPORAFEED. NOREL. 16/09/2011. Retrieved of Internet [on line] [retrieved on 24/10/2013] http://www.norel.es/eng/espofeed_acui.htm	3, 4, 16, 17, 26-31
Y	NUEZ-ORTIZ W. GUSTOR AQUA. An effective solution to optimise health status and nutrient utilisation. International Aquafeed. May-June 2011. Retrieved from Internet [on line] [retrieved the 24/10/2013] http://www.docstoc.com/?docId=83646636&download=1	8-12, 16, 20-24, 26-31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24/10/2013

Date of mailing of the international search report
(30/10/2013)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
A. Polo Diez

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495524

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070573

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101773209 A (ZHEJIANG KESHENG FEED YE) 14/07/2010, Abstract from DataBase WPI. Retrieved from EPOQUE. [on line] [retrieved the 24/10/2013]	1, 7, 15
X	JP 2010051247 A (KYUSHU MEDICAL KK) 11/03/2010, Abstract from DataBase EPODOC. Retrieved from EPOQUE. [on line] [retrieved on 24/10/2013]	1, 14, 15
X	KR 20090030661 A (YANG SUNG CHANG) 25/03/2009, Abstract from DataBase WPI. Retrieved of EPOQUE. Retrieved from Internet [on line] [retrieved on 24/10/2013]	1,7, 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2013/070573

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR20090030661 A	25.03.2009	KR100908928B B1	23.07.2009
-----	-----	-----	-----
JP2010051247 A	11.03.2010	NONE	
-----	-----	-----	-----
CN103045498 A	17.04.2013	NONE	
-----	-----	-----	-----
US2006228337 A1	12.10.2006	NO20060370 A	17.03.2006
		WO2005000327 A2	06.01.2005
		WO2005000327 A3	22.09.2005
		ES2279439T T3	16.08.2007
		EP1656150 A2	17.05.2006
		EP1656150 B1	20.12.2006
		DK1656150T T3	10.04.2007
		DE602004003832T	09.08.2007
		T2	06.01.2005
		CA2530631 A1	15.01.2007
		AT348627T T	31.12.2004
		FR2856597 A1	04.11.2005
		FR2856597 B1	
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070573

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23K1/18 (2006.01)

A61K35/74 (2006.01)

A61K31/19 (2006.01)

A01K61/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2013/070573

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A23K, A61K, A01K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, INTERNET, BD-TXT, BIOSIS, MEDLINE, HCAPLUS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	NUEZ-ORTIZ, W. Ecobiol Aqua. A unique and highly effective single strain probiotic. International Aquafeed. November-December 2011. Recuperado de Internet [en línea][recuperado el 24/10/2013] http://www.docstoc.com/?docId=103806272&download=1	1, 2, 14,15
Y		3-12, 16-24, 26-31
Y	US 2006228337 A1 (INSTITUTE FRANCAIS DE RECHERCHE POUR LA EXPLOTATION DE LA MER.) 12/10/2006, párrafos 14-17, 36, 37, 40, 41, 44.	3, 5-7, 16, 18, 19, 26-31
Y	ESPORAFEED. NOREL. 16/09/2011. Recuperado de Internet [en línea][recuperado el 24/10/2013] http://www.norel.es/eng/espofafeed_acui.htm	3, 4, 16, 17, 26-31
Y	NUEZ-ORTIZ W. GUSTOR AQUA. An effective solution to optimise health status and nutrient utilisation. International Aquafeed. Mayo-Junio 2011. Recuperado de Internet [en línea][recuperado el 24/10/2013] http://www.docstoc.com/?docId=83646636&download=1	8-12, 16, 20-24, 26-31

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
24/10/2013

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
30 de octubre de 2013 (30/10/2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Polo Diez
Nº de teléfono 91 3495524

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070573

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	CN 101773209 A (ZHEJIANG KESHENG FEED YE) 14/07/2010, Resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE. [en línea] [recuperado el 24/10/2013]	1, 7, 15
X	JP 2010051247 A (KYUSHU MEDICAL KK) 11/03/2010, Resumen de la base de datos EPODOC. Recuperado de EPOQUE. [en línea] [recuperado el 24/10/2013]	1, 14, 15
X	KR 20090030661 A (YANG SUNG CHANG) 25/03/2009, Resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE. Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 24/10/2013]	1, 7, 15

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070573

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
KR20090030661 A	25.03.2009	KR100908928B B1	23.07.2009
-----	-----	-----	-----
JP2010051247 A	11.03.2010	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
CN103045498 A	17.04.2013	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
US2006228337 A1	12.10.2006	NO20060370 A	17.03.2006
		WO2005000327 A2	06.01.2005
		WO2005000327 A3	22.09.2005
		ES2279439T T3	16.08.2007
		EP1656150 A2	17.05.2006
		EP1656150 B1	20.12.2006
		DK1656150T T3	10.04.2007
		DE602004003832T	09.08.2007
		T2	06.01.2005
		CA2530631 A1	15.01.2007
		AT348627T T	31.12.2004
		FR2856597 A1	04.11.2005
-----	-----	FR2856597 B1	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A23K1/18 (2006.01)

A61K35/74 (2006.01)

A61K31/19 (2006.01)

A01K61/00 (2006.01)