



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 996**

51 Int. Cl.:

**A23K 1/16** (2006.01)

**A23K 1/18** (2006.01)

**A61K 35/74** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98923091 .7**

86 Fecha de presentación : **02.06.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **0987957**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2000**

54

Título: **Método para administrar una composición de microorganismos viables a aves de corral.**

30

Prioridad: **03.06.1997 JP 9-145372**

73

Titular/es: **Calpis Co., Ltd.**  
**4-1, Ebisu-Minami 2-chome**  
**Shibuya-ku, Tokyo 150-0022, JP**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2007**

72

Inventor/es: **Maruta, Kiyoshi y**  
**Miyazaki, Hiroshi**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2007**

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 271 996 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para administrar una composición de microorganismos viables a aves de corral.

5 **Campo industrial**

La presente invención se refiere a un método de administración de composiciones de microorganismos viables a aves de corral a las que se administra composiciones de microorganismos viables útiles para el crecimiento de las aves, con lo que las aves reciben una alimentación con una alta productividad mientras se reduce las cantidades de medicamentos, tales como antibióticos, agentes antibacterianos y similares, o no se administran medicamentos.

**Técnicas antecedentes**

En la alimentación de las aves de corral, tales como pollos tomateros y similares, se lleva a cabo en general una crianza intensiva de 40 a 60 aves por 1 tubo (aproximadamente 3,3 m<sup>2</sup>) en una granja avícola con el fin de reducir los costes de producción. Además, las aves de corral se alimentan para conseguir un rápido crecimiento, una ganancia diaria en peso corporal de 40 a 55 g diarios como media, de manera que las aves se pueden enviar para la venta en aproximadamente 2 meses después de la incubación. En estas condiciones, el ave está siempre bajo un enorme stress, y frecuentemente enferma y las enfermedades se extienden entre las aves de corral. Cuando el pienso se echa al suelo, dado que las aves pican el alimento y similar, que se mezcla con los excrementos del suelo, las bacterias tóxicas se extienden muy fácilmente a todas las aves que se encuentran en el recinto de alimentación. Además, en una instalación de alimentación abierta, o incluso en algunos casos en una instalación de alimentación sin ventanas, se pueden extender bacterias tóxicas por el recinto de alimentación. Además, por ejemplo, aunque se desinfecte el corral de pollos cada vez que los pollos se llevan a vender, dado que animales pequeños tales como ratas y similares de las áreas circundantes no quedan afectados por este tratamiento, estos animales portan bacterias tales como *salmonella* y similares que transmiten a las aves del corral cuando de nuevo se colocan polluelos en la instalación de alimentación.

Con el fin de mantener una elevada productividad, evitando al mismo tiempo una reducción de la tasa de crecimiento y similar durante el período de alimentación, así como para prevenir la contaminación de las aves de corral con bacterias tóxicas bajo estas condiciones, se administran por lo general a las aves diversos medicamentos, tales como antibióticos, agentes antibacterianos y similares.

Sin embargo, dado que existe la posibilidad de que queden medicamentos residuales en la carne y huevos, y también por el peligro de generar cepas bacterianas resistentes a los medicamentos (como ha sido publicado en muchos casos), ha ido aumentando entre los usuarios la demanda de productos de granja de ganado libres de fármacos, que estén producidos sin utilizar medicamentos.

Por otra parte, en condiciones naturales, sin utilizar una crianza intensiva de un gran número de aves, no puede esperarse una elevada productividad. Sin embargo, es posible la crianza de aves de corral, tales como pollos y similares, sin utilizar medicamentos tales como antibióticos, agentes antibacterianos y similares. Existe ahora una gran demanda de carne de pollo y huevos criados en condiciones naturales, es decir, los llamados pollos de corral naturales, debido a la seguridad y buen sabor, y se venden en el mercado a alto precio.

Como consecuencia, se ha dirigido el interés hacia el desarrollo de un método de alimentación en la crianza de las aves de corral, tales como pollos y similares, que no dé lugar a contaminación con bacterias tóxicas, al mismo tiempo que se mantiene una alta productividad, por un método de alimentación libre de fármacos (alimentación en la que no se usan medicamentos tales como antibióticos, agentes antibacterianos y similares, durante parte o durante todo el período de alimentación, de manera que los medicamentos no permanezcan en las aves al menos en el momento de su envío para la venta).

Cuando la crianza intensiva convencional de un gran número de aves se lleva a cabo evitando simplemente la administración de medicamentos, las aves quedan fácilmente infectadas con bacterias tóxicas. Por tanto, no es posible mantener la productividad a un nivel comercialmente aceptable sin que haya contaminación con bacterias tóxicas.

Como un medio para reducir la infección de las aves con bacterias tóxicas sin depender de medicamentos, tales como antibióticos, agentes antibacterianos y similares, ha sido propuesto el de administrar microorganismos y similares útiles para el crecimiento de varios tipos de aves de corral. Se sabe que bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, bacterias de ácido láctico que pertenecen al género *Lactobacillus*, bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* y similares son microorganismos útiles para aditivos a los piensos o como diversas preparaciones CE (exclusión competitiva). Algunos de estos microorganismos están disponibles comercialmente como preparaciones de microorganismos viables de aditivos de piensos para aves. Sin embargo, aunque están reconocidos los efectos en alguna medida, estos no son suficientes. En particular no se ha informado de ningún medio que permita llevar a cabo una alimentación de aves libre de fármacos en una crianza intensiva de un gran número de aves de corral y con un nivel comercialmente aceptable, para proporcionar estas preparaciones de microorganismos viables.

Por ejemplo, la Patente japonesa registrada No. 2528055 y JP-B-3-79988 (el término "JP-B" tal como aquí se usa significa "publicación de Patente japonesa examinada") describen que la ganancia en peso corporal y las relaciones de conversión del alimento en animales pueden mejorar y que pueden obtenerse efectos tales como acción de control de

la función intestinal y similares, por administración de una preparación de microorganismos viables que comprenden *Bacillus subtilis* a los animales. Es posible llevar a cabo una alimentación libre de fármacos aplicando el medio a, por ejemplo, pollos tomateros, pero solamente en ciertas regiones limitadas donde estos pollos no se producen a gran escala. Sin embargo, en muchas regiones donde se lleva a cabo la alimentación de los pollos con frecuencia, dado que se infectan frecuentemente con bacterias tóxicas que se extienden fácilmente a través de las instalaciones de alimentación como se ha descrito antes, es extremadamente difícil llevar a cabo una alimentación comercial libre de fármacos de los pollos tomateros empleando este medio. Además, incluso si la alimentación libre de fármacos de los pollos tomateros utilizando este medio fuera posible, la velocidad de ganancia del peso corporal de las aves es más baja que con una alimentación utilizando medicamentos. Como resultado de ello, no se obtiene la alta productividad de la alimentación con fármaco aplicado.

Además, las preparaciones de microorganismos viables actualmente en el mercado tienen problemas, tales como la reducción del número viable durante las etapas de distribución, la pobre capacidad de colonización después de la formación de flora bacteriana intestinal, la necesidad de una administración continuada de las preparaciones de microorganismos viables durante un período de tiempo prolongado, y similares. En particular, la necesidad de una administración continuada de las preparaciones de microorganismos viables durante un período de tiempo prolongado, debido a la pobre capacidad de colonización después de la formación de flora bacteriana intestinal, es actualmente un obstáculo serio para el uso práctico desde el punto de vista económico.

## 20 Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para la administración de composiciones de microorganismos viables a aves de corral, de manera que la alimentación libre de fármacos de las aves se puede llevar a cabo mientras se mantiene una buena productividad.

Para resolver los problemas antes mencionados, los autores de la presente invención han llevado a cabo un análisis de selección de las bacterias útiles de una amplia gama de fuentes naturales y han encontrado que determinadas bacterias de ácido láctico aisladas del tracto intestinal de un pollo pueden colonizar fácilmente el tracto intestinal de pollos recién nacidos enseguida de la incubación. Además, los autores de la presente invención han encontrado que, en particular, una bacteria de ácido láctico de heterofermentación aislada del íleon de un pollo y una bacteria de ácido láctico de homofermentación aislada del cecum de un pollo pueden colonizar fácilmente el tracto intestinal de los polluelos recién nacidos y tener varios efectos, tales como inhibición del crecimiento de bacterias tóxicas, prevención de diarrea, potenciación del crecimiento, mejora de la tasa de crianza, mejora de las relaciones de conversión del alimento y similares. Además, los autores de la presente invención han encontrado que las bacterias de ácido láctico pueden colonizar el tracto intestinal de los polluelos recién nacidos enseguida tras el nacimiento por simple pulverización de una suspensión de microorganismos viables de estas bacterias de ácido láctico del género *Lactobacillus* solamente una vez a los polluelos recién nacidos dentro de los cuatro días después de la incubación.

Además, los autores de la presente invención han encontrado que, cuando se utilizan bacterias de ácido láctico cuya colonización tiene lugar en combinación con la administración de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* durante el período desde el estadio de cría recién nacida al estadio de ave madura en la alimentación libre de fármacos de las aves de corral, la ganancia de peso corporal en la etapa de alimentación inicial puede ser mejorada y se puede obtener una tasa de crianza suficiente en comparación con la sola administración de microorganismos viables de *Bacillus subtilis*, de manera que puede realizarse una alimentación libre de fármaco de las aves de corral en crianza intensiva de un gran número de aves con alta productividad comercialmente rentable. La presente invención se ha llevado a cabo sobre la base de estos hallazgos.

Según esto, la presente invención se refiere a un método para la administración de microorganismos viables a las aves de corral que comprende:

50 administrar a las aves de corral una primera composición que comprende bacterias viables pertenecientes a *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus johnsonii*, en el estadio de crías recién nacidas.

Además, la presente invención se refiere a un método para la administración de composiciones de microorganismos viables para aves de corral, que comprende:

60 administración de una composición de microorganismos viables para aves de corral que comprende bacterias de ácido láctico viables pertenecientes a *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus johnsonii* en el estadio de crías recién nacidas; y

administración de una composición de microorganismos viables para aves de corral que comprende un microorganismo viable que pertenece a *Bacillus subtilis*.

## 65 El mejor modo de llevar a cabo la invención

El método de la presente invención para administrar composiciones de microorganismos viables para aves de corral, incluye la administración de una composición de microorganismos viables para aves de corral que comprende bacterias de ácido láctico viables que pertenecen a *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus johnsonii* (que se citará de

## ES 2 271 996 T3

aquí en adelante como una “composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico”) a crías recién nacidas.

Las bacterias de ácido láctico antes descritas pertenecientes al género *Lactobacillus* son bacterias anaerobias facultativas. Se pueden utilizar eficazmente no solamente las aisladas del tracto intestinal de las aves de corral sino también otras cepas aisladas de una fuente natural. Entre los ejemplos preferidos de la cepa que pertenece a *Lactobacillus reuteri* se incluyen *Lactobacillus reuteri* CP-720 (No. de Depósito FERM BP-6332), *Lactobacillus reuteri* CP-722 (No. de Depósito FERM BP-6334) y similares. Un ejemplo preferido de cepa perteneciente a *Lactobacillus johnsonii* incluye *Lactobacillus johnsonii* CP-721 (No. de Depósito FERM BP-6333) y similares. Estas tres cepas han sido depositadas en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (dirección 1-3 Higashi 1 chome, Taukuba-shi, Ibaraki-kan 305-8566, Japón) el 27 de abril de 1998. Se conocen otras cepas de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus johnsonii*, tales como las descritas en “ATCC Bacteria and Bacteriophages”, 19ª edición, 1996, páginas 195 y 197, incorporado aquí como referencia.

Las propiedades bacteriológicas de *Lactobacillus reuteri* CP-720 y CP-722 y *Lactobacillus johnsonii* CP-721 se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

| Propiedad bacteriológica              | CP-720                | CP-721                | CP-722            |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| (Propiedad morfológica)               |                       |                       |                   |
| 1) Forma de las células               | varilla               | varilla               | varilla           |
| 2) Presencia y movilidad              | ninguna               | ninguna               | ninguna           |
| 3) Presencia de esporas               | ninguna               | ninguna               | ninguna           |
| 4) Teñido Gram                        | positivo              | positivo              | positivo          |
| (Propiedad fisiológica)               |                       |                       |                   |
| 1) Catalasa                           | -                     | -                     | -                 |
| 2) Formación de indol                 | -                     | -                     | -                 |
| 3) Comportamiento frente a oxígeno    | anaerobio facultativo | anaerobio facultativo | anaerobio facult. |
| 4) Crecimiento a 15°C                 | -                     | -                     | -                 |
| 5) Crecimiento a 45°C                 | +                     | +                     | +                 |
| 6) Rotación óptica de ácido láctico   | DL                    | DL                    | DL                |
| 7) Generación de gas                  | +                     | -                     | +                 |
| 8) Formación de ácido desde sacáridos |                       |                       |                   |
| glucosa                               | +                     | +                     | +                 |
| lactosa                               | +                     | +                     | +                 |
| manosa                                | -                     | -                     | -                 |
| fructosa                              | +                     | +                     | +                 |
| galactosa                             | +                     | +                     | +                 |
| sacarosa                              | +                     | +                     | +                 |
| arabinosa                             | +                     | -                     | +                 |
| maltosa                               | +                     | +                     | +                 |
| celobiosa                             | -                     | +                     | -                 |
| ramnosa                               | ±                     | -                     | ±                 |
| xilosa                                | +                     | -                     | +                 |
| trehalosa                             | ±                     | -                     | ±                 |
| melibiosa                             | +                     | +                     | +                 |
| rafinosa                              | +                     | +                     | +                 |
| manita                                | -                     | -                     | -                 |
| sorbita                               | -                     | -                     | -                 |
| esculina                              | -                     | +                     | -                 |
| salicina                              | -                     | +                     | -                 |
| almidón                               | +                     | +                     | +                 |

## ES 2 271 996 T3

La composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico puede contener además bacterias de ácido láctico de heterofermentación pertenecientes al género *Lactobacillus* distinto a *Lactobacillus reuteri* tales como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* y similares, así como bacterias de ácido láctico de homofermentación pertenecientes al género *Lactobacillus* distintas a los *Lactobacillus johnsonii*, tales como *Lactobacillus gasserri*, *Lactobacillus crispatus* y similares, pertenecientes al grupo de *Lactobacillus acidophilus*. Se conocen muchas cepas diferentes de muchos géneros diferentes de *Lactobacillus*, tales como las descritas en "ATCC Bacteria and Bacteriophages" 19ª edición, 1996, páginas 192-199, que se incorpora aquí como referencia.

Entre los ejemplos del medio preferido que puede utilizarse para cultivar los microorganismos viables de bacterias de ácido láctico se incluye un medio de leche, tal como leche de vaca, leche de cabra, leche de yegua y similares, leches desnatadas de aquellas y un medio para bacterias de ácido láctico, tal como medio BL, medio de caldo de hígado Briggs, medio MRS, medio GAM, medio TTY y similares.

Las bacterias de ácido láctico se pueden cultivar a 25 a 45°C, más preferiblemente 30 a 40°C, y durante 6 a 30 horas, más preferiblemente 10 a 24 horas. El caldo de cultivo así obtenido se puede utilizar directamente como composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico, almacenándolo como tal a aproximadamente 5°C hasta su uso. Alternativamente, los microorganismos pueden recuperarse por centrifugación, mezclarse con un agente protector y después liofilizarse al vacío. El polvo de bacterias resultante se puede almacenar en una cámara fría y oscura y usarse como composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico por suspensión, mezclado o disolución del polvo cuando se utiliza. El polvo de los microorganismos secos preparado de esta manera es más preferido debido a que resiste largos períodos de almacenamiento.

La composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico puede contener un vehículo y diluyente. El vehículo y el diluyente no están limitados en particular, y se seleccionan entre vehículos y diluyentes farmacéutica o nutricionalmente aceptables. Además, la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico puede contener un pienso para ave de corral (ración).

En la presente invención, los microorganismos pertenecientes a *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus johnsonii* pueden someterse a un tratamiento de mutación apropiado, tal como exposición a luz ultravioleta, rayos X o radiación, y a un tratamiento químico con un compuesto mutágeno (por ejemplo nitroso guanidina, colorante de acridina). También se pueden preparar mutantes por inserción, supresión o sustitución de nucleótidos, así como por mutación espontánea. Los términos *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus johnsonii* incluyen estos mutantes.

El término "estadio de crías recién nacidas" significa el periodo inmediato a la incubación de las crías (por ejemplo polluelo, pavipollo, pichón o similar), específicamente un período de 0 a aproximadamente 4 días después de la incubación. El tiempo de administración de la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico no está particularmente limitado en tanto que sea dentro de la etapa de crías recién nacidas; sin embargo, se prefiere administrar la composición dentro de los 4 días después de la incubación, más preferiblemente dentro de los 2 días después de la incubación, un período antes de la colonización de la flora bacteriana intestinal en el tracto intestinal de la cría recién nacida. El número de veces de la administración no está particularmente limitado; sin embargo, se pueden tener generalmente suficientes efectos por una sola administración. Los efectos obtenidos se hacen más estables y seguros a medida que aumenta el número de veces de administración. Sin embargo, tres o más veces de administración no resulta económica, y los efectos así obtenidos son casi los mismos que con dos veces de administración.

Aunque no está limitada en particular, la administración de la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico se puede llevar a cabo por administración oral. Específicamente, la composición se puede administrar oralmente por su adición al agua de bebida o similar y dejar que las crías la ingieran libremente, o se puede pulverizar desde una posición por encima de las crías empleando un pulverizador o similar. El método de administración por pulverización es el preferido debido al hábito de las crías de gorjear mientras abren sus picos hacia arriba, de manera que la composición de microorganismos viables que tiene una alta concentración se puede administrar oralmente en la etapa de crías recién nacidas de manera fácil y segura.

Al llevar a cabo la administración, la densidad total de bacterias de ácido láctico en la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico es preferiblemente de  $10^6$  a  $10^{10}$  microorganismos viables por gramo, más preferiblemente  $10^7$  a  $10^9$  microorganismos viables por gramo. Además, la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico se administra preferiblemente en una cantidad de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^{10}$  microorganismos viables por cría, más preferiblemente  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  de microorganismos viables por cría.

En el método de la presente invención, la composición de microorganismos viables para aves de corral comprende un microorganismo viable perteneciente a *Bacillus subtilis* (citada en adelante como "composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis*") se administra en adición a la administración de la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico antes descrita.

Entre los ejemplos preferidos de la cepa de *Bacillus subtilis* se incluyen *Bacillus subtilis* C-3102 (No. de Depósito FERM BP-1096) que ha sido depositada en el Instituto de Biociencia y Tecnología humana (antiguo nombre: Instituto de Investigación de Fermentaciones), Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología (Dirección: 1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi (antigua dirección: Yatabe-machi, Tsukuba gun), Ibaraki-ken 305-8566 (antiguo código en vigor:305), Japón) el 28 de junio, 1986, y similares. Las propiedades bacteriológicas de *Bacillus subtilis* C-3102 están ya descri-

## ES 2 271 996 T3

tas en la Patente japonesa registrada No. 2528055, JP-B-3-79988 y Patente estadounidense Re. 34.837. Se conocen muchas cepas diferentes de *Bacillus subtilis*, tales como las descritas en "ATCC Bacteria and Bacteriophages", 19ª edición, 1996, páginas 57-63, que se incorpora aquí como referencia.

5 Al cultivar *Bacillus subtilis* C-3102, se puede utilizar como medio de cultivo un medio acuoso o sólido que contiene materiales, tales como fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sustancias inorgánicas y similares, que se utilizan por lo general en el cultivo de microorganismos como medio de cultivo. Entre los ejemplos de fuentes de carbono se incluyen aquellas que pueden asimilarse, tales como glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, melazas y similares. Entre los ejemplos de fuentes de nitrógeno se incluyen peptona, extracto de carne, hidrolizado de caseína, sulfato de amonio y similares. Según el caso lo demande, se pueden añadir además, como componentes inorgánicos, sales de magnesio, potasio, sodio, calcio, hierro, manganeso y similares, vitaminas, amino ácidos, agentes antiespuma, agentes tensioactivos y similares. El cultivo se lleva a cabo preferiblemente aerobiamente. El pH de partida del medio es, preferiblemente 5 a 9, más preferiblemente 6 a 8; la temperatura de cultivo es, preferiblemente 20 a 50°C, más preferiblemente 35 a 40°C; y el período de cultivo es, preferiblemente de 12 horas a 7 días.

15 La mezcla de cultivo obtenida de esta manera se puede utilizar como la composición de microorganismo viable de *Bacillus subtilis* como tal o como su producto concentrado o como células aisladas del mismo, directamente o después de añadir aditivos tales como cargas y similares. Las cargas no están limitadas en particular, y entre sus ejemplos se incluyen carbonato de calcio, salvado de arroz desengrasado, sémola de maíz, harina de maíz, salvado de trigo, leche en polvo desnatada y similares.

20 La composición de microorganismo viable de *Bacillus subtilis* puede contener un vehículo o diluyente. El vehículo y diluyente no están limitados en particular, y se seleccionan entre vehículos y diluyentes farmacéutica o nutricionalmente aceptables. Además, la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* puede contener un pienso de ave.

25 En la presente invención, el microorganismo perteneciente a *Bacillus subtilis* puede ser sometido a un tratamiento apropiado de mutación, tal como exposición a luz ultravioleta, rayos X o radiación, y un tratamiento químico con un compuesto mutágeno (por ejemplo, nitrosoguanidina, colorante de acridina). Los mutantes se pueden preparar también por inserción, supresión o sustitución de nucleótidos, así como mutación espontánea. El término *Bacillus subtilis* incluye estos mutantes.

30 El tiempo de administración de la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* no está limitado en particular; sin embargo, para obtener una colonización apropiada de flora bacteriana intestinal, es preferible administrar la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* después de la administración de la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico antes descrita. Asimismo, en el caso de un método de alimentación en que no se administren antibióticos, agentes antibacterianos y similares durante un período de tiempo entre el estadio de crías recién nacidas y la etapa de terminación, es preferible administrar la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* durante este período. En el caso de la alimentación de pollos tomateros, por ejemplo, se puede administrar durante un período opcional entre el estadio de crías recién nacidas y la etapa de terminación; sin embargo cuando se lleva a cabo una alimentación libre de fármacos solamente durante el estadio de más crecimiento y la etapa de terminación de manera que los medicamentos no permanecen en el cuerpo del pollo tomatero en el momento de envío de los pollos para su venta, la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* se puede administrar durante el estadio de más crecimiento y la etapa de terminación.

45 La administración de la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* se puede llevar a cabo por ingestión oral después de su adición al pienso, agua de bebida o similar.

50 Por ejemplo, cuando la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* que contiene *Bacillus subtilis* C-3102 se mezcla con pienso al llevar a cabo la administración, se prefiere que el pienso tenga una densidad de microorganismos de  $10^5$  a  $10^8$  microorganismos viables por gramo en la forma de esporas y/o células vegetales.

55 El método de la presente invención para administración de las composiciones de microorganismos viables para aves de corral puede aplicarse no solo a pollos tomateros a los que se alimenta en régimen de crianza intensiva con un gran número de aves sino también a pollos tomateros a los que se alimenta en otras condiciones y a otras aves domésticas tales como patos, gansos, codornices, patos silvestres, avestruces y similares, así como a pájaros de compañía y similares.

60 Cuando las composiciones de microorganismos viables para aves de corral se administran por el método antes descrito, se puede formar una flora bacteriana intestinal en la que predominan en los intestinos las bacterias útiles para el crecimiento de las aves, de manera que las aves crecen sanas. Se puede obtener varios efectos, tales como inhibición del crecimiento de bacterias tóxicas, prevención de diarreas, potenciación del crecimiento, mejora de las relaciones de conversión del alimento y similares, y se hace posible la alimentación libre de fármaco de los pollos tomateros. Además, dado que las bacterias útiles dominan la flora bacteriana intestinal, el ave de corral crece con buena salud, por lo que se pueden obtener de ella deliciosos huevos, carne y similares en el caso de aves comestibles debido a la calidad notablemente mejorada de los productos. Además, la carne, huevos y similares son seguros y no están contaminados con bacterias tóxicas que envenenan el alimento.

## Ejemplos

Habiendo descrito en términos generales esta invención, se puede comprender aún mejor con referencia a determinados ejemplos específicos que se dan aquí con propósitos ilustrativos solamente y que no han de entenderse como limitativos a menos que se especifique otra cosa.

### Ejemplo 1 de Producción

Se disolvió una porción de 4,5 g de leche desnatada en 50 g de agua, se pasteurizó a 100°C durante 10 minutos y después se enfrió a temperatura ambiente. Se inoculó una lazada de *Lactobacillus reuteri* CP-720 en la solución así preparada y se cultivó estáticamente durante 24 horas a 37°C para obtener un primer iniciador (bacterias de ácido láctico:  $1 \times 10^9$  microorganismos viables por gramo). A continuación se inocularon 15 g del primer iniciador en 500 g de leche desnatada (contenido de sólidos, 9% en peso) que había sido pasteurizado a 90°C y se cultivó durante 20 horas a 37°C para obtener un segundo iniciador. El segundo iniciador contenía  $2 \times 10^8$  microorganismos viables por gramo.

Se colocó en un fermentador de cubeta, un medio preparado por disolución de 200 g de peptona de caseína, 200 g de extracto de levadura, 100 g de citrato de sodio, y 200 g de glucosa en 20 kg de agua y ajuste del pH del medio a 7,0 con solución de hidróxido sódico 1 N, se pasteurizó a 95°C durante 15 minutos y se enfrió entonces a temperatura ambiente. Se inocularon después 3 partes en peso del segundo iniciador antes descrito en 100 partes en peso del medio y se cultivó estáticamente durante 20 horas a 37°C.

El caldo de cultivo así obtenido se centrifugó para recuperar los microorganismos que se liofilizaron subsiguientemente utilizando, como medio de dispersión, 1 kg de solución que contenía 10% en peso de leche desnatada y 1% en peso de glutamato de sodio, que había sido pasteurizado a 90°C previamente, obteniendo así 146 g de polvo de microorganismos viables de *Lactobacillus reuteri* CP-720. El polvo de microorganismos viables contenía  $7 \times 10^{10}$  microorganismos viables por gramo.

### Ejemplo 2 de Producción

Un medio, preparado por disolución de 200 g de peptona de buey, 60 g de peptona de soja, 100 g de extracto de levadura, 100 g de acetato de sodio, 40 g de fosfato de dipotasio, 60 g de citrato de diamonio y 400 g de glucosa en 20 kg de agua y ajustando el pH del medio a 7,0 con solución de hidróxido de sodio 1 N, se colocó en un fermentador de cubeta, se pasteurizó a 95°C durante 15 minutos y se enfrió después a temperatura ambiente. Se inocularon después 500 g de un segundo iniciador de *Lactobacillus johnsonii* CP-721 que había sido previamente pre-cultivado por el mismo procedimiento que el Ejemplo 1 de Producción en el medio para realizar un cultivo estacionario de 18 horas a 35°C.

El caldo de cultivo así obtenido se centrifugó para recoger los microorganismos que se liofilizaron subsiguientemente utilizando como medio de dispersión una solución que contenía 10% en peso de leche desnatada y 1% en peso de glutamato de sodio, que había sido pasteurizado a 90°C previamente, obteniendo con ello 141 g de polvo de microorganismos viables de *Lactobacillus johnsonii* CP-721. El polvo de microorganismos contenía  $6,5 \times 10^{10}$  microorganismos viables por gramo.

### Ejemplo 3 de Producción

Un segundo iniciador de *Lactobacillus reuteri* CP-722 preparado por el mismo procedimiento del Ejemplo de Producción 1 se inoculó en un medio preparado y pasteurizado de la misma manera que la descrita en el Ejemplo 1 de Producción que tenía la misma composición y pesos de los componentes, y se cultivó estáticamente durante 20 horas a 37°C. El caldo de cultivo así obtenido se centrifugó para recuperar las células que fueron subsiguientemente liofilizadas, utilizando como medio de dispersión, una solución que contenía 10% en peso de leche desnatada y 1% en peso de glutamato de sodio, que había sido pasteurizada a 95°C previamente, obteniéndose con ello 151 g de polvo de microorganismos viables de *Lactobacillus reuteri* CP-722. El polvo de microorganismos viables contenía  $6,8 \times 10^{10}$  microorganismos viables por gramo.

### Ejemplo 4 de Producción

Los polvos de microorganismos viables obtenidos en los Ejemplos de Producción 1 a 3 se combinaron en porciones de 1 parte y se mezclaron cuidadosamente con 7 partes de dextrina para obtener una composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico para aves de corral que contenía tres cepas de *Lactobacillus*. La composición de microorganismos viables contenía  $2,0 \times 10^{10}$  microorganismos viables por gramo.

### Ejemplo de Producción 5

Un medio, preparado por disolución de 200 g de peptona de soja, 10 g de fosfato de dipotasio y 200 g de melazas en 10 kg de agua y ajuste del pH del medio a 7,5 con solución de hidróxido de sodio 1 N, se colocó en un fermentador de cubeta, se pasteurizó a 95°C durante 60 minutos y se enfrió entonces a 37°C. Se inocularon después 100 g de caldo de cultivo de *Bacillus subtilis* C-3102, que habían sido pre-cultivados por anticipado, en el medio y se agitó aerobiamente

## ES 2 271 996 T3

durante 40 horas a 37°C. El caldo de cultivo así obtenido se centrifugó para recuperar el microorganismo que se mezcló subsiguientemente con el mismo peso de leche desnatada y se liofilizó al vacío, obteniéndose con ello 750 g de la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* para aves de corral. La composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* para aves de corral contenía  $1,2 \times 10^{10}$  microorganismos viables por gramo.

### 5 Ejemplo 1

*Ensayo de campo I del efecto (ensayo sin fármacos en la etapa de mayor crecimiento y etapa de después)*

10 El ensayo se llevó a cabo utilizando Chunky (Nombre de marca, estirpe comercial). Se les proporcionó por pulverización a los polluelos (0 días después de incubación), colocados en una jaula de pollos, 12 g de la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico para aves de corral preparada en el Ejemplo 4 de Producción 4 (número total de bacterias de ácido láctico:  $2,0 \times 10^{10}$  microorganismos viables por gramo) que habían sido suspendidos uniformemente en 4 kg de agua pura. Como pienso de provisión se utilizaron "Pienso de pre-iniciación para pollos (Hina Ezuke)" para uso como pienso iniciador (que contenía antibiótico) y "AT de iniciación (Zenki AT)" para uso el estadio de iniciación (que contenía antibiótico) en la etapa de alimentación de comienzo (de 0 a 5 días después de incubación) y estadio de de iniciación (de 5 a 21 días después de la incubación), respectivamente. Se empleó "Brogoal A" (que no contenía antibióticos) para uso en la etapa de terminación y que había sido mezclado con  $9 \times 10^5$  células/gramo de la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* para aves de corral preparada en el Ejemplo 5 de Producción, durante el período del estadio de mayor crecimiento (de 21 días a 43 días tras la incubación) a la etapa de terminación (de 43 días a 1 día de envío para venta) (todos estos artículos de piensos comerciales estaban fabricados por Chubu Shiryo). Se llevó a cabo otro manejo del pienso de acuerdo con el método de alimentación de los pollos que es el realizado convencionalmente en las granjas de aves de corral. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 2.

### 25 Ejemplo 1 Comparativo

La alimentación se llevó a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto en que no se realizó administración de la composición de microorganismos viables de bacterias lácticas, se utilizó un "Producto del mayor crecimiento AT (Kohki AT)" para uso en el estadio de mayor crecimiento (que contenía antibióticos) (fabricado por Chubu Shiryo, Co.) como pienso en el estadio de mayor crecimiento en lugar del "Brogoal A" para uso de terminación, y no se proporcionó la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* a lo largo de las etapas completas. Los resultados se muestran en la Tabla 2. En relación con esto, el "producto del mayor crecimiento AT (Kohki AT)" es un artículo de un pienso que tiene la misma composición que el "Brogoal A" excepto en los antibióticos.

TABLA 2

|   | Ejemplo 1   | Ejemplo 1 | Relación |
|---|-------------|-----------|----------|
|   | Comparativo |           |          |
| El número de pollos de la partida               | 8.250       | 8,250     | 100      |
| Peso corporal de pollos (g/pollo)               | 41,9        | 38,4      | 92       |
| Número de aves enviadas para venta              | 7.721       | 7.830     | 101      |
| Edad cuando se envían (días)                    | 54          | 55        | 102      |
| Número de pollos por tsubo (3,3m <sup>2</sup> ) | 68,9        | 58,9      | 100      |
| Peso corporal medio (kg/aves)                   | 2.766       | 2.797     | 101      |
| Tasa de crianza (% *)                           | 93,59       | 94,91     | 101      |
| Relación de conversión del alimento**           | 2,061       | 2,055     | 100      |
| Puntuación de la producción***                  | 233         | 235       | 101      |
| Ganancia de peso corporal (g/dia.pollo)         | 51,22       | 50,86     | 99       |

\* Tasa de crianza (el número de aves enviadas para venta y el número de aves de la partida) x 100

\*\* Relación de conversión del alimento: cantidad total del pienso ingerido durante la alimentación (g)/total de ganancia de peso corporal (g) x 100

\*\*\* Puntuación de la producción: (peso corporal medio x tasa de crianza/relación de conversión del alimento x edad en días cuando se envían para venta) x 100

## ES 2 271 996 T3

El valor de la ganancia media de peso corporal en el Ejemplo 1 fue menor que el del Ejemplo 1 Comparativo en un factor de aproximadamente 1%, que se supuso debido a la calidad de los polluelos ensayados. Es decir, el peso corporal de los polluelos era el normal (41,9 g/pollo) en el Ejemplo Comparativo 1 pero era más cercano al de los polluelos jóvenes (38,4 g/pollo) del Ejemplo 1, de manera que su crecimiento se hizo inferior. Dado que otros resultados del Ejemplo 1 eran superiores a los del Ejemplo Comparativo 1, la productividad quedaba mejorada.

### Ejemplo 2

*Ensayo de campo II del efecto (ensayo sin fármaco en la etapa de iniciación y después de la etapa de iniciación)*

El ensayo se llevó a cabo utilizando Chunky (nombre de marca, estirpe comercial). Los polluelos (el día 0 después de la incubación), colocados en una jaula para pollos, recibieron, por pulverizado, 12 g de la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico para aves preparada en el Ejemplo 4 de Producción (número total de bacterias de ácido láctico;  $2,0 \times 10^{10}$  microorganismos viables por gramo) que había sido suspendida uniformemente en 4 kg de agua pura. Como pienso de provisión, se utilizó el "Chick Prestarter Feed" para uso como pienso iniciador en la etapa de alimentación de comienzo (de 0 a 5 días tras la incubación). El "AT de iniciación (Zenki AT)" para uso en la etapa iniciación del que se habían eliminado los antibióticos y el "Brogoal A" para uso de terminación, que había sido mezclado con  $9 \times 10^5$  microorganismos viables por gramo de la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* para aves preparada en el Ejemplo 5 de Producción, se utilizaron en la etapa de iniciación (de 5 a 21 días después de la incubación) y durante el período de la etapa de mayor crecimiento (de 21 días a 43 días después de la incubación) a la etapa de terminación (de 43 días a la etapa de envío para venta), respectivamente. Se llevó a cabo otro manejo de la alimentación siguiendo el método de alimentación de pollos llevado a cabo convencionalmente en las granjas avícolas. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 3.

### Ejemplo 2 Comparativo

Se llevó a cabo la alimentación de la misma manera que la descrita en el Ejemplo 2, excepto en que el "AT de iniciación (Zenki AT)" para utilizarlo en la etapa inicial y el "AT de mayor crecimiento (Kohki AT)" para etapa de mayor crecimiento se utilizaron en la etapa inicial y en la etapa de mayor crecimiento respectivamente, y no se proporcionó la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* a lo largo de las etapas completas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

|   | Ejemplo 2<br>Comparativo | Ejemplo 2 | Relación |
|---|--------------------------|-----------|----------|
| El número de pollos de la partida               | 8.300                    | 8,300     | 100      |
| Peso corporal de pollos (g/pollo)               | 43,6                     | 43,6      | 100      |
| Edad cuando se envían para la venta (días)      | 54                       | 55        | 102      |
| Número de pollos por tsubo (3,3m <sup>2</sup> ) | 59,3                     | 59,3      | 100      |
| Peso corporal medio (kg/aves)                   | 2.886                    | 2.838     | 98       |
| Tasa de crianza (% *)                           | 95,7                     | 97,0      | 101      |
| Relación de conversión del alimento**           | 2.007                    | 2.048     | 102      |
| Puntuación de la producción***                  | 255                      | 244       | 96       |
| Ganancia de peso corporal (g/día.pollo)         | 53,4                     | 51,6      | 97       |

Dado que se utilizó pienso libre de fármaco en estadio de iniciación y después de la iniciación en el Ejemplo 2, mientras que en el Ejemplo 2 Comparativo se utilizó el pienso que contenía fármaco, la ganancia de peso corporal en el primer caso era ligeramente inferior al valor de 51,6 g/día.pollo, pero la tasa de crianza era del 97%, lo cual es un dato excelente y la puntuación de producción era 244, mostrándose así resultados de una producción económica.

## ES 2 271 996 T3

### Ejemplo 3

#### *Ensayo III de campo del efecto (ensayo sin fármaco)*

5 El ensayo se llevó a cabo utilizando Chunky (nombre de marca, estirpe comercial). Se les proporcionó por pulverización a los polluelos (día 0 después de la incubación), colocados en una jaula para pollos, 40 g de la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico para aves de corral preparada en el Ejemplo 4 de Producción (número total de bacterias de ácido láctico:  $2 \times 10^{10}$  microorganismos viables por gramo) que habían sido suspendidos uniformemente en 4 kg de agua pura. Como alimentación de provisión se emplearon el "AT de iniciación (Zenki AT)",  
10 de donde se habían eliminado los antibióticos, para la etapa de iniciación y el "Brogoal A" para uso de terminación, que había sido mezclado con  $9 \times 10^5$  microorganismos viables por gramo de la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* para aves de corral preparado en el Ejemplo 5 de Producción, durante el periodo desde el estadio de alimentación del comienzo a la etapa de iniciación (de 0 a 21 días después de la incubación) y durante el período de la etapa de mayor crecimiento a la etapa de terminación (desde los 21 días al día del envío para venta),  
15 respectivamente. Se realizó otro manejo de la alimentación de acuerdo con el método de alimentación convencional de pollos en las granjas avícolas. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 4.

### Ejemplo 3 Comparativo

20 Se llevó a cabo la alimentación de la misma manera que la descrita en el Ejemplo 3, excepto en que se utilizó "AT de iniciación (Zenki AT)" para uso en el estado de iniciación, "El AT de mayor crecimiento (Kohki AT)" para la estadio de mayor crecimiento y el "Brogoal A" para uso de terminación, respectivamente, como pienso durante el período desde el estadio de alimentación del comienzo a la etapa de iniciación, en la etapa de mayor crecimiento (de 21 a 43 días después de la incubación) y en la etapa de terminación (de 43 días al día de envío para la venta),  
25 respectivamente y no se proporcionó la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* a lo largo de las etapas completas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

|   | Ejemplo 3<br>Comparativo | Ejemplo 3 | Relación |
|---|--------------------------|-----------|----------|
| 35 El número de pollos de la partida            | 7.220                    | 7.220     | 100      |
| Peso corporal de pollos (g/pollo)               | 41,5                     | 44,9      | 108      |
| 40 Edad cuando se envían para la venta (días)   | 54                       | 55        | 102      |
| Número de pollos por tsubo (3,3m <sup>2</sup> ) | 51,6                     | 51,6      | 100      |
| Peso corporal medio (kg/aves)                   | 2.768                    | 2.805     | 102      |
| 45 Tasa de crianza (% *)                        | 97,1                     | 97,0      | 100      |
| Relación de conversión del alimento**           | 2.017                    | 2.020     | 100      |
| Puntuación de la producción***                  | 247                      | 245       | 99       |
| 50 Ganancia de peso corporal (g/dia.pollo)      | 51,3                     | 51,0      | 99       |

55 El ensayo del Ejemplo 3 no se llevó a cabo al mismo tiempo que el ensayo del Ejemplo 3 Comparativo sino después de completarse la alimentación del Ejemplo 3 Comparativo, y, dado que hubo un golpe de frío durante el período de alimentación del Ejemplo 3, el crecimiento final y la tasa de crianza en el Ejemplo 3 Comparativo fueron influenciados por la ola de frío. Sin embargo, aunque la alimentación se llevó a cabo sin administración de antibióticos y agentes antibacterianos a través del período completo, los resultados de producción del Ejemplo 3 eran idénticos a los del Ejemplo 3 Comparativo.

60 Además, no se realizaron los ensayos comparativos correspondientes a los Ejemplos 1 a 3 con una alimentación llevada a cabo sin fármacos y sin administrar la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico para aves y la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* para aves de corral, porque no se puede obtener un crecimiento normal en estas condiciones.

65

## ES 2 271 996 T3

### Ejemplo 4

En el Ejemplo 3 y Ejemplo 3 Comparativo, se recogieron excrementos recientes de los pollos el día antes de su envío para venta y, se emplearon los excrementos de tres aves como muestra, se midieron el grupo de bacterias coliformes y bacterias del género *Salmonella* en los excrementos. Los resultados se muestran en la Tabla 5. En este caso, el serotipo de cada bacteria del género *Salmonella* era 07.

TABLA 5

|  |                    | Pollos del Ejemplo Comparativo 3 | Pollos del Ejemplo 3 |
|--|--------------------|----------------------------------|----------------------|
| Número de bacterias por 1 g de excrementos (valor logarítmico) | Enterobactereáceos | 7,32 ± 0,53                      | 6,93 ± 0,52 **       |
|  | <i>Salmonella</i>  | 3,54 ± 0,80                      | 3,07 ± 0,69          |
| Casos de <i>Salmonella</i> detectados/total casos              |                    | 18/29                            | 9/30 *               |

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

En comparación con el Ejemplo Comparativo 3, el grupo de coliformes decreció significativamente en el Ejemplo 3, y la relación de detección de bacterias del género *Salmonella* se redujo también significativamente.

### Ejemplo 5

Se hizo una comparación sobre la sensación al paladar de la carne de los pollos criados en el Ejemplo 3 y Ejemplo 3 Comparativo. Dado que no se puede llevar a cabo un ensayo sensorial preciso cuando la propia carne está sometida a ensayo debido a varios factores de tratamiento, se preparó una sopa de pollo completo y se sometió a ensayo sensorial. Se utilizó en el ensayo la parte comestible que queda después de sacrificio, sangrado y subsiguiente eliminación de plumas, cabezas, patas y órganos (gutting III), como pollo completo y se mezcló una parte en peso de la muestra con 4 partes en peso de agua y un 1,8% de sal y se hirvió durante 2 horas. Después de filtrar la mezcla a través de algodón blanqueador, se preparó el filtrado (sopa) y se ajustó la concentración de la sopa a tres veces el peso del pollo. Las muestras de sopa así obtenidas se sometieron a ensayo sensorial en el que 38 panelistas pudieron seleccionar la muestra de sabor más delicioso. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6

|                                 | Número de panelistas seleccionadores | Relación de selección |
|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Pollo del Ejemplo 3             | 33                                   | 0,868 **              |
| Pollo del Ejemplo 3 Comparativo | 5                                    | 0,132                 |

\*\*  $p < 0,01$

En comparación con el pollo del Ejemplo 3 Comparativo, el pollo del Ejemplo 3 fue seleccionado por la sensación que producía al paladar por un gran número de panelistas, confirmando así la naturaleza deliciosa del pollo producido con un alimento libre de fármacos.

En una evaluación del sabor llevada a cabo al mismo tiempo en conexión con esto, se obtuvieron buenas evaluaciones para la sopa de pollo del Ejemplo 3, estadísticamente significativas con un nivel de significación de 1%, sobre cada uno de los puntos: (1) preferencia, (2) riqueza del sabor y (3) sabor adecuado.

## ES 2 271 996 T3

### Ejemplo 1 de referencia

*Ensayo completamente libre de fármaco, solamente composición de microorganismos viables de Bacillus subtilis para aves de corral*

5 El ensayo se llevó a cabo utilizando aves Chunky de un distrito donde se alimentaba a los pollos tomateros en gran número. Como pienso de provisión se utilizaron “Migas de iniciación Gold para pollos tomateros (Broiler Gold Zenki Crumble)” de las que se habían eliminado los antibióticos y “Producto para última etapa para pollos (Broiler Shiage)” (que no contenía antibióticos ni similares) (ambos fabricados por Shikoku Haigo Shiryō, Co.), cada uno de  
10 los cuales había sido mezclado con  $1 \times 10^6$  microorganismos viables por gramo de composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* para aves de corral preparada en el Ejemplo 5 de Producción y enriquecida con vitaminas y minerales, durante el período desde la etapa de alimentación de comienzo a la etapa de iniciación (de 0 a 21 días después de la incubación) y durante el período de la etapa de mayor crecimiento a la etapa de acabado (de 21 días después de la incubación al día del envío para venta), respectivamente. Se llevó a cabo otro manejo del alimento de  
15 acuerdo con el método convencional de alimentación de pollos llevado a cabo en granjas avícolas. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 7.

### Ejemplo 4 Comparativo

20 La alimentación se llevó a cabo de la misma manera que en Ejemplo 1 de referencia, excepto en que se utilizaron “Migas de iniciación Gold para pollos” “(Broiler Gold Zenki Crumble)” (que contenía antibióticos), “Broiler S” que contenía antibióticos y “Broiler Finisher (Broiler Shiage)” cada uno de ellos fabricado por Shikoku Haigo Shiryō, Co.) como pienso durante el período de la etapa de alimentación de comienzo a la etapa de iniciación, en la etapa de mayor crecimiento (de 21 a 32 días después de la incubación al día del envío para venta), y en la etapa de terminación (de  
25 32 días después de la incubación al día de envío para venta), respectivamente, y no se proporcionó la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis*. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7

|  | Ejemplo 4   | Ejemplo 4 | Relación |
|--|-------------|-----------|----------|
|  | Comparativo |           |          |
| 35 El número de pollos de la partida           | 6.800       | 6.800     | 100      |
| El número de pollos enviados para la venta     | 6.571       | 6.662     | 101      |
| 40 Tasa de crianza (%)                         | 96,6        | 98,0      | 101      |
| Edad cuando se envían los pollos para la venta | 39,6        | 41,0      | 104      |
| 45 Peso corporal medio (kg/aves)               | 1,71        | 1,58      | 92       |
| Relación de conversión del alimento**          | 2,03        | 2,22      | 109      |
| 50 Puntuación de la producción***              | 205         | 170       | 83       |

Se obtuvo una tasa de crianza más alta en el Ejemplo 1 de Referencia que en el Ejemplo 4 Comparativo, pero la ganancia en peso corporal en la etapa de iniciación de la alimentación se retrasó y el retraso dejó una huella hasta el final, de manera que la ganancia del peso corporal fue baja a través del período de alimentación como resultado de  
55 ello y no se alcanzó un nivel comercialmente aceptable.

Tampoco se realizó el ensayo de crianza libre de fármaco proporcionando solamente la composición de microorganismos viables de bacterias de ácido láctico para aves de corral sin administración de la composición de microorganismos viables de *Bacillus subtilis* para aves de corral, debido a que este ensayo solo puede llevarse a cabo en un  
60 lugar donde no exista contaminación ambiental tal como en una instalación experimental en condiciones sanitarias completas pero no en el campo de granjas avícolas de explotación intensiva.

### Aplicabilidad industrial

65 Dado que la administración de una composición de microorganismos viables para aves de corral que comprende bacterias de ácido láctico específicas viables se lleva a cabo en una etapa específica en combinación con la administración de una composición de microorganismos viables para aves de corral que comprende *Bacillus subtilis* viables, el método de la presente invención para la administración de las composiciones de microorganismos viables para aves

## ES 2 271 996 T3

puede ejercer varios efectos, tales como inhibición del crecimiento de bacterias tóxicas, prevención de diarreas, potenciación del crecimiento, mejora de las relaciones de conversión del alimento y similares, haciendo posible también la alimentación libre de fármacos para los pollos con alta productividad y, particularmente en el caso de pollos comestibles, producción de huevos y carne deliciosos y seguros con alta productividad. Por consiguiente, el método de la presente invención para la administración de composiciones de microorganismos viables para aves es útil para la alimentación de aves comestibles, tales como pollos, particularmente pollos tomateros, y similares.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una composición de microorganismos viables para la preparación de una composición farmacéutica para inhibición del crecimiento de bacterias tóxicas, prevención de diarrea y/o potenciación del crecimiento de aves de corral, donde se administra a las aves una primera composición que comprende bacterias viables pertenecientes a *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus johnsonii* en la etapa de crias recién nacidas y donde se administra a las citadas aves una segunda composición que comprende un microorganismo viable perteneciente a *Bacillus subtilis*.
- 10 2. Una utilización según la reivindicación 1, donde la citada primera composición se administra dentro de los cuatro días de haber sido incubadas las aves
3. La utilización según la reivindicación 1, donde la citada primera composición se administra dentro de los 2 días después de la incubación de la citadas aves.
- 15 4. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el citado *Bacillus reuteri* es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en
- 20 (a) *Lactobacillus reuteri* CP-720, No. de Depósito FERM BP-6332, y un mutante del mismo,
- (b) *Lactobacillus reuteri* CP-722, No. de Depósito FERM BP-6334, y un mutante del mismo.
5. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el citado *Lactobacillus johnsonii* es *Lactobacillus johnsonii* CP-721, No. de Depósito FERM BP-6333, o un mutante del mismo.
- 25 6. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la citada primera composición y/o la citada segunda composición comprende además un vehículo o diluyente.
7. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la citada primera composición y/o la citada segunda composición comprende además un pienso para aves de corral.
- 30 8. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la citada primera composición y/o la citada segunda composición se administra por vía oral.
- 35 9. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la citada primera composición se administra por pulverización.
10. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la citada primera composición comprende de  $10^6$  a  $10^{10}$  de las citadas bacterias por gramo.
- 40 11. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde se administran a las aves de corral  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^{10}$  de las citadas.
12. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la citada primera composición se administra solo una vez o dos veces.
- 45 13. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde el citado *Bacillus subtilis* es *Bacillus subtilis* C-3102, No. de Depósito FERM BP-1096, o un mutante del mismo.
- 50 14. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la citada segunda composición comprende de  $10^5$  a  $10^8$  del citado *Bacillus subtilis* viable por gramo.
15. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la citada segunda composición se administra tras la administración de la citada primera composición.
- 55 16. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde la citada ave es un pollo, pato, ganso, codorniz, pato salvaje, avestruz o ave de compañía.
- 60
- 65