

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 061**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)
C12N 1/22 (2006.01)
A23K 50/75 (2006.01)
A23K 10/30 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)
A61K 36/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2019** **PCT/US2019/067600**
87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2020** **WO20132318**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2019** **E 19901280 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023** **EP 3897188**

54 Título: **Ingrediente alimentario de algas para controlar los efectos de coccidiosis y enteritis
necrótica en aves de corral**

30 Prioridad:

21.12.2018 US 201862783667 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.06.2024

73 Titular/es:

**ZIVO BIOSCIENCE, INC. (100.0%)
2804 Orchard Lake Road, Suite 202
Keego Harbor, MI 48320, US**

72 Inventor/es:

**DAHL, ANDREW A.;
STEFFEK, AMY E. y
PFUND, WILLIAM P.**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 972 061 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

Ingrediente alimentario de algas para controlar los efectos de coccidiosis y enteritis necrótica en aves de corral

5 Campo de la invención

La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas y generalmente se refiere a la salud de los animales de granja y específicamente a un ingrediente alimentario derivado de algas usado para mejorar las tasas de conversión alimenticia y las tasas de crecimiento en las aves de corral cuando la salud de las aves de corral se expone a diversas condiciones.

Antecedentes de la invención

La coccidiosis es una enfermedad parasitaria que afecta a los intestinos de los animales de granja, en particular, las aves de corral. El parásito, del género *Eimeria*, afecta el crecimiento animal y la eficiencia alimenticia, conduciendo finalmente a la muerte de los animales infectados. Las especies de *Eimeria* que se cree que infectan a las aves de corral incluyen *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*, y *E. maxima*. La infección comienza con la ingestión de oocistos, que experimentan excistación para liberar miles de esporozoítos en la luz del intestino. Para los pollos, se cree que este proceso se produce tanto enzimáticamente como a través de la abrasión mecánica de la pared del oocisto en la molleja del pollo. Una infección por coccidiosis es solo un factor, entre otros factores tales como estrés por calor, restricción de alimento, varias infecciones bacterianas, y contaminantes de alimentos, que pueden debilitar la calidad de las uniones estrechas entre las células epiteliales en el revestimiento del tracto intestinal del animal y causar lo que se conoce como "intestino con fugas". Los costes para la industria avícola en Estados Unidos asociados con la coccidiosis justamente exceden los 1500 millones de dólares anuales.

Aparte de la buena cría de animales, el único control práctico de la coccidiosis es usar fármacos anticoccidiales, tales como sulfonamidas, ionóforos y toltrazuril. Sin embargo, la vacunación es costosa, y recientemente se ha observado cierta resistencia a los antibióticos, (véase, p. ej., N. Roth, et al., "The Application of Antibiotics in Broiler Production and the Resulting Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*: A Global Overview", *Poultry Science*, 0:1-14, (2018)).

La enteritis necrótica es otra enfermedad común en aves de corral. La enteritis necrótica está causada por una infección por *Clostridium perfringens*, caracterizada por necrosis grave de los intestinos. *C. perfringens* es una bacteria gram-positiva, capaz de producir hasta 17 toxinas diferentes. Los animales infectados mueren muy rápidamente, por ejemplo, en 24 horas, haciendo que el tratamiento de la enfermedad, una vez manifestada, sea poco práctico. Típicamente, la enteritis necrótica se previene de forma profiláctica con antibióticos tales como dihidrato de oxitetraciclina (OTC), clorhidrato de doxiciclina, amoxicilina y similares. Aunque no están totalmente relacionadas con la coccidiosis, las dos enfermedades aparecen juntas, y presentan un enorme desafío para la industria avícola. El control simultáneo de las dos enfermedades ha dado como resultado un uso extensivo de antibióticos como profilácticos en la industria avícola.

En vista de la prohibición europea del uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la alimentación animal, se necesitan alternativas a los antibióticos en la prevención de la enteritis necrótica. Con este fin, se ha informado de algunas investigaciones sobre el uso de probióticos, plantas, aceites esenciales y enzimas para la prevención de la enteritis necrótica en pollos (véase, p. ej., D. L. Caly, et al., "Alternatives to Antibiotics to Prevent Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Microbiological's Perspective," *Front. Microbiol.*, 6, 1336, (2015)).

A pesar de esta investigación en coccidiostáticos naturales y alternativas a los antibióticos para prevenir la enteritis necrótica, sigue existiendo la necesidad de descubrir nuevos ingredientes alimentarios naturales para su uso en la industria avícola. Idealmente, lo que todavía se necesita es un ingrediente alimentario natural capaz de mantener buenas tasas de conversión alimenticia y tasas de crecimiento para aves expuestas a estos patógenos comunes u otros factores de estrés tales como restricción alimenticia, estrés térmico y contaminantes alimenticios.

En el documento WO 2017/142906 se describe el soporte nutricional para animales mediante la administración de un suplemento derivado de algas. Levine, et al., (2018) *Poult. Sci.* 97(10): 3494-3500, describen la evaluación de los efectos de alimento de algas secas que contienen β -1,3-glucano en pollos de engorde expuestos a *Eimeria*.

Sumario de la invención

La invención proporciona una composición para alimento para aves de corral que incluye una biomasa de algas que comprende una especie de algas *Klebsormidium* para su uso en un método para mitigar los síntomas relacionados con coccidiosis o enteritis necrótica en aves de corral, como se expone en las reivindicaciones

adjuntas.

Se ha descubierto ahora que una biomasa de algas se puede usar en alimentos para aves de corral como un ingrediente alimentario natural para mantener o mejorar las tasas de conversión alimenticia y las tasas de crecimiento en aves de corral que están expuestas a coccidiosis y enteritis necrótica. Se explica en el presente documento un uso novedoso y no obvio de una biomasa de algas para mantener la salud de las aves de corral en presencia de coccidiosis y enteritis necrótica.

Se demostró que la alimentación de aves de corral enriquecida con biomasa de algas revierte los efectos perjudiciales causados por exposiciones a patógenos en pollos. En particular, se mantuvieron buenas tasas de conversión alimenticia en aves expuestas a los patógenos comunes de *Eimeria* y *Clostridium*. Las puntuaciones de las lesiones mejoraron significativamente con respecto a lo observado en las aves de control expuestas a patógenos. Además, la mejora en las puntuaciones de las lesiones observadas usando la biomasa de algas como ingrediente nutricional en el alimento fue comparable a las puntuaciones de las lesiones observadas con el aditivo antibiótico Coban® (monensina, USP) de Elanco. Por lo tanto, la biomasa de algas explicada en el presente documento aumenta la alimentación de las aves de corral para el mantenimiento y mejora de la salud de las aves de corral.

Una biomasa de algas puede mantener o mejorar las tasas de conversión alimenticia y las tasas de crecimiento en aves de corral desafiadas por diversas prácticas agrícolas y condiciones ambientales tales como, por ejemplo, restricción de alimento, estrés térmico, contaminantes ambientales y contaminantes de alimentos. Por ejemplo, una composición para alimento para aves de corral que comprende una biomasa de algas obtenida de al menos una especie de alga *Klebsormidium* puede reducir los síntomas de infecciones patógenas, prácticas agrícolas o tensiones ambientales, en donde los síntomas incluyen pérdida de peso, tasa de conversión alimenticia (FCR, por sus siglas en inglés) elevada/anormal, tasas de mortalidad elevadas/anormales y lesiones intestinales.

En todas las realizaciones de la invención, la biomasa de algas comprende algas del género *Klebsormidium*. La biomasa de algas puede obtenerse procesando el material biológico del depósito de NCMA PATENTE n.º 201602001. Por ejemplo, se puede obtener una biomasa de algas que comprende una especie de algas *Klebsormidium* cultivando los microorganismos en el depósito NCMA PATENTE n.º 201602001 a una masa procesable de material vegetal y separando líquido del material vegetal para obtener la biomasa de algas.

Se explica en el presente documento una biomasa de algas para su uso como un ingrediente nutricional en alimento para aves de corral que comprende al menos una especie de *Klebsormidium*, pero no forma parte de la presente invención. La biomasa de algas puede comprender una especie de *Klebsormidium* seleccionada del grupo que consiste en *K. acidophilum*, *K. bilatum*, *K. crenulatum*, *K. dissectum*, *K. drouetii*, *K. elegans*, *K. flaccidum*, *K. fluitans*, *K. fragile*, *K. klebsii*, *K. lamellosum*, *K. montanum*, *K. mucosum*, *K. nitens*, *K. pseudostichococcus*, *K. scopulinum*, *K. sterile*, *K. subtile*, *K. subtilissimum*, *K. tribonematoideum*, y mezclas de estos.

Se explica en el presente documento una biomasa de algas para su uso como un ingrediente nutricional en alimento para aves de corral que comprende una especie de *Klebsormidium* seleccionada del grupo que consiste en *Klebsormidium nitens*, *Klebsormidium flaccidum*, y mezclas de estos, pero no forma parte de la presente invención. Por ejemplo, una biomasa de algas para su uso como un ingrediente nutricional en alimento para aves de corral puede comprender *Klebsormidium nitens* o *Klebsormidium flaccidum*. En ciertos ejemplos, una biomasa de algas para su uso como un ingrediente nutricional en alimento para aves de corral puede comprender *Klebsormidium flaccidum*.

Se puede obtener una biomasa de algas para su uso como un ingrediente nutricional en el alimento para aves de corral cultivando algas de agua dulce para obtener material vegetal, separando el material vegetal del líquido, opcionalmente presionando mecánicamente el exceso de agua del material celular, y luego secando el material vegetal para obtener una biomasa de algas secas. El proceso de secado puede consistir en cualquier combinación de secado ambiental, secado al aire, secado por pulverización, secado por congelación o secado por calentamiento.

Puede obtenerse una biomasa de algas secas desnatando o bombeando superficialmente material de algas desde un estanque de pistas de rodadura que consiste en algas *Klebsormidium* cultivadas continuamente, drenando el líquido de las algas para obtener una biomasa de algas húmedas, y luego secando por pulverización la biomasa de algas húmedas para obtener la biomasa de algas secas.

En diversas realizaciones, una biomasa de algas secas puede incorporarse en el alimento para aves de corral como un ingrediente nutricional a concentraciones de aproximadamente el 0,01 % en peso (0,2 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento) a aproximadamente el 1,0 % en peso (20 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento), basado en el peso total de la composición de alimento para aves de corral.

Por ejemplo, una biomasa de algas secas puede incorporarse en el alimento para aves de corral como un ingrediente nutricional a concentraciones de aproximadamente el 0,025 % en peso (0,5 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento) a aproximadamente el 0,55 % en peso (11 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento), basado en el peso total de la composición del alimento para aves de corral.

Por ejemplo, una biomasa de algas secas puede incorporarse en el alimento para aves de corral como un ingrediente nutricional a concentraciones de aproximadamente el 0,10 % en peso (2,0 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento) a aproximadamente el 0,20 % en peso (4,0 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento), basado en el peso total de la composición de alimento para aves de corral.

Por ejemplo, una biomasa de algas secas puede incorporarse en el alimento para aves de corral como un ingrediente nutricional a concentraciones de aproximadamente el 0,125 % en peso (2,5 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento) a aproximadamente el 0,175 % en peso (3,5 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento), basado en el peso total de la composición de alimentación de aves de corral.

El resto del alimento para aves de corral que no es biomasa de algas puede comprender una mezcla de ingredientes adecuados para su uso en aves de corral u otro alimento para animales. Por ejemplo, la porción que no es de algas del alimento para aves de corral del presente documento puede comprender cereales, proteínas, grasas y aceites. En varios ejemplos, un alimento para aves de corral puede comprender una base de maíz-soja o una base de trigo-soja, tal como se determina por país de origen.

La alimentación de aves de corral enriquecida con biomasa de algas explicada en el presente documento puede estar en la forma física de un alimento de masa seca o un alimento granulado, en donde el alimento granulado puede triturarse para proporcionar fragmentos de material para alimentar aves jóvenes, u otra forma física de alimentación animal adecuada para su uso en la industria avícola. El alimento de masa seca puede convertirse en el alimento granulado por extrusión del alimento de masa a través de una matriz adecuada.

La invención proporciona una composición de alimento para aves de corral para su uso en un método para mitigar los síntomas de coccidiosis o enteritis necrótica en aves de corral, la composición de alimento para aves de corral incluye una biomasa de algas que comprende una especie de algas *Klebsormidium*. En varias realizaciones, un alimento para aves de corral comprende *Klebsormidium nitens* o *Klebsormidium flaccidum*. Los síntomas exhibidos en las aves de corral que lo necesitan incluyen al menos uno de tasa de conversión alimenticia elevada, tasa de crecimiento reducida, tasas de mortalidad incrementadas y lesiones intestinales incrementadas.

En varias realizaciones, el alimento para aves de corral para mitigar los síntomas de coccidiosis o enteritis necrótica en aves de corral comprende (a) una biomasa de algas derivada de al menos una especie de algas *Klebsormidium*; y (b) al menos uno de un cereal, una proteína, una grasa y un aceite. En varias realizaciones, el alimento para aves de corral comprende *Klebsormidium nitens* o *Klebsormidium flaccidum*. Los síntomas exhibidos en las aves de corral que lo necesitan incluyen al menos uno de tasa de conversión alimenticia elevada, tasa de crecimiento reducida, tasas de mortalidad incrementadas y lesiones intestinales incrementadas.

Se explica en el presente documento un método para producir un alimento para aves de corral mejorado con algas, pero no forma parte de la presente invención. El método comprende: (a) cultivar al menos una especie de alga *Klebsormidium* para obtener una biomasa de algas; (b) opcionalmente retirar agua de la biomasa de algas y opcionalmente secar la biomasa de algas; y (c) combinar la biomasa de algas en una alimentación de aves de corral para proporcionar el alimento para aves de corral mejorado con algas. Por ejemplo, el cultivo de al menos una especie de alga *Klebsormidium* comprende un estanque de pistas de rodadura continuamente cultivado que consiste en *Klebsormidium nitens* o *Klebsormidium flaccidum*. Por ejemplo, la etapa de secado puede comprender secado por pulverización.

Descripción detallada de la invención

Una biomasa de algas, derivada de una sola especie de algas o de múltiples especies de algas, cuando se incorpora en alimentos para aves de corral como ingrediente alimentario nutricional y se alimenta a animales de aves de corral, promueve la salud general en las aves de corral al mejorar las tasas de conversión alimenticia y las tasas de crecimiento en animales expuestos a coccidiosis y/o enteritis necrótica. En varios ejemplos, una alimentación de aves de corral enriquecida con biomasa de algas revierte los efectos perjudiciales en los animales causados por los patógenos *Eimeria* y *Clostridium*. Un alimento para aves de corral enriquecido con un ingrediente alimentario nutricional derivado de algas puede mitigar los síntomas causados por tensiones en animales de aves de corral, tales como restricción de alimento, estrés térmico, bacterias u otras formas de infección, contaminantes del alimento, o contaminantes ambientales.

Todas las realizaciones de la invención implican al menos una especie de alga *Klebsormidium*. La biomasa de

algas puede obtenerse cultivando material biológico a partir del depósito de NCMA n.º de PATENTE 201602001 y separando el material vegetal. La biomasa de algas se puede obtener cosechando material de algas de estanques abiertos, por ejemplo, pistas de rodadura, diseñadas para cultivar una especie de alga *Klebsormidium*.

5

En general, se ha demostrado que una biomasa de algas, cuando se incorpora como un ingrediente nutricional en el alimento para aves de corral, mantiene buenas tasas de conversión alimenticia (FCR) para aves expuestas a los patógenos *Eimeria* y *Clostridium*.

10

En varios estudios, una biomasa de algas como se explica en el presente documento reduce la FCR global en todos los niveles de inclusión de la biomasa de algas en la alimentación, en comparación con un grupo expuesto a patógenos. Las aves alimentadas con el ingrediente de biomasa de algas tenían FCR similar a la del grupo de control no expuestos de las aves. El porcentaje de mortalidad por enteritis necrótica se redujo significativamente en las aves alimentadas con la biomasa de algas. La mortalidad en un grupo expuesto no medicado fue del 25 % frente al 5 % en un grupo de aves expuestas a patógenos alimentadas con un alimento para aves de corral que tenía el ingrediente de biomasa de algas con una incorporación del 0,551 % en peso.

15

En otros estudios, la FCR global se redujo en el grupo alimentado con biomasa de algas en comparación con el grupo de control expuesto. Las aves alimentadas con la alimentación enriquecida con biomasa de algas tenían FCR similar a la de un grupo de tratamiento con salinomicina (es decir, medicada). Las aves alimentadas con la alimentación enriquecida con biomasa de algas tuvieron una reducción significativa en la puntuación de la lesión frente al grupo de control de animales expuestos a patógenos.

20

Definiciones y abreviaturas

25

El término "aves de corral" se usa en el presente documento para referirse a todas las aves de corral domesticadas usadas para el consumo humano o no humano de animales, incluyendo, por ejemplo, pollos, gallinas, gallos, pavos, patos, codornices y gansos.

30

El término "alimento para aves de corral" se usa en el presente documento para referirse a alimento comercial para animales usado en la cría de aves de corral, que es típicamente a base de maíz/soja en los Estados Unidos y a base de trigo en otras partes del mundo tales como Europa. Una alimentación de aves de corral en el presente documento, que se aumentará con una biomasa de algas, puede ser un "alimento de iniciación" para su uso durante aproximadamente las dos primeras semanas de crecimiento, un "alimento para criadores" para su uso durante aproximadamente las dos semanas siguientes de crecimiento, o un "alimento para terminadores" para su uso durante aproximadamente dos semanas adicionales de crecimiento a partir de entonces. Estas tres alimentaciones tienden a variar en concentraciones de proteína para ser apropiadas para aves de corral en una de estas tres fases de crecimiento.

35

40

En lo que se refiere a la alimentación de aves de corral, el término "masa" se refiere a un alimento en polvo, que es esencialmente seco y que tiene la apariencia de una harina de maíz fina. Esta forma física de alimento seco, que no está húmeda y no debe confundirse con "papilla", se usa para alimentar pollitos de 1-2 días que son demasiado jóvenes para manejar alimento granulado. Además, la alimentación de masa es fácilmente convertible en alimento granulado simplemente por extrusión a través de una matriz de pequeño orificio y permitiendo que los "gusanos" extruidos se rompan en gránulos. El alimento en gránulos puede fragmentarse para alimentar a aves jóvenes incapaces de comer gránulos.

45

El término "biomasa de algas" se usa en el presente documento para referirse generalmente a material celular (por ejemplo, células de algas completas) derivado de algas naturales o modificadas genéticamente ("algas GMO"). Por ejemplo, una biomasa de algas puede comprender algas secas o desecadas de otro modo de una o más especies de algas. Una biomasa de algas secas puede comprender opcionalmente algas desecadas en polvo o en bolitas de una o más especies de algas. Una biomasa de algas ejemplar puede derivarse de un cultivo de algas que comprenda una especie de *Klebsormidium* de algas separando y secando el material celular y opcionalmente formado bolitas, pulverizando o moliendo el material celular obtenido al secarse. Se puede obtener una biomasa de algas procesando el material biológico del depósito de NCMA PATENTE n.º 201602001, tal como, por ejemplo, cultivando los microorganismos en tanques o canales abiertos para producir una cantidad procesable de material vegetal, drenando y/o comprimiendo el material vegetal para retirar componentes líquidos, y luego secando el material celular restante mediante cualquier método conveniente, tal como secado por pulverización o secado por congelación, para obtener la biomasa de algas secas que se puede usar como un ingrediente nutricional de alimentación de aves de corral.

50

55

60

El término "NM, sin CP" se usa en el presente documento para indicar un grupo no medicado de aves (es decir, sin antibióticos) que no fueron expuestas a *C. perfringens* (denominado *C. perfringens* (-)), y que estaban sanas.

65

El término "NM, sin CP" se usa en el presente documento para indicar un grupo no medicado de aves (es decir,

sin antibióticos) que no fueron expuestas a *C. perfringens* (indicado *C. perfringens* (+)), y que estaban sanas. En ningún caso “CP” indica que *C. perfringens* formaba parte del alimento para aves de corral. El término CP indica que las aves se expusieron a *C. perfringens* para inducir la enfermedad.

5 El término “Producto Z 0,039 %, CP” se usa en el presente documento para indicar una alimentación para aves de corral enriquecida con el ingrediente de biomasa de algas a la concentración del 0,039 % en peso, basado en el peso total del alimento, y un grupo de aves expuestas a *C. perfringens* (es decir, *C. perfringens* (+)) para inducir la enfermedad.

10 El término “Producto Z 0,077 %, CP” se usa en el presente documento para indicar una alimentación para aves de corral enriquecida con el ingrediente de biomasa de algas a la concentración del 0,077 % en peso, basado en el peso total del alimento, y un grupo de aves expuestas a *C. perfringens* (es decir, *C. perfringens* (+)) para inducir la enfermedad.

15 El término “Producto Z 0,551 %, CP” se usa en el presente documento para indicar una alimentación para aves de corral enriquecida con el ingrediente de biomasa de algas a la concentración del 0,551 % en peso, basado en el peso total del alimento, y un grupo de aves expuestas a *C. perfringens* (es decir, *C. perfringens* (+)) para inducir la enfermedad.

20 El acrónimo “DDT” se usa en el presente documento para indicar “día de tratamiento”, que es el número de días desde el inicio de un estudio cuando se administra una composición de alimentación deseada a un animal de aves de corral. Los DDT en el presente documento pueden ser 0, 12, 14, 21 o 28 días, por ejemplo.

25 El acrónimo “FCR” se usa en el presente documento para indicar “tasa de conversión alimenticia” o “relación de conversión alimenticia”, que es la tasa a la que la ingesta alimenticia se convierte en ganancia de peso en el animal. Por ejemplo, los pollos de engorde de hoy pesan aproximadamente 2,27 kg – 0,23 kg (5-1/2 libras) a los 39 días, con una relación de conversión de alimentación normal en peso vivo de aproximadamente 1,6. Los animales enfermos muestran una relación de conversión alimenticia más alta, lo que significa que el animal necesita consumir más alimento para ganar peso, (es decir, el animal es menos eficiente).

30 El acrónimo “GIT” se usa en el presente documento para indicar la vía gastrointestinal de un animal de aves de corral.

35 El término “no aditivo, no infectado” se usa en el presente documento para indicar la dieta normal, y animales no infectados.

El término “no aditivo, infectado” se usa en el presente documento para indicar la dieta normal, y animales infectados.

40 El término “salinomicina, 60 g/t” se usa en el presente documento para indicar una dieta normal, animales infectados, tratados con antibiótico.

El término “Producto Z, 0,551 %” se usa en el presente documento para indicar un producto de alimentación de aves de corral que contiene el 0,551 % en peso de biomasa de algas, basado en el peso total del alimento.

45 La biomasa de algas

Una biomasa de algas puede comprender células de algas completas de uno o más cultivos de algas cultivadas en agua destilada o agua dulce suplementadas con diversos nutrientes. Un depósito de material biológico que se puede usar para obtener una biomasa de algas para su uso como un ingrediente nutricional en la alimentación de aves de corral se depositó originalmente en el Provasoli-Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota - Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, (NCMA, 60 Bigelow Drive, East Boothbay, Maine 04544 U.S.A.) el 6 de octubre de 2006, se convirtió en un depósito realizado bajo las disposiciones del Tratado de Budapest el 12 de febrero de 2016, y se le asignó por la Autoridad Depositaria Internacional la PATENTE de adhesión n.º 201602001. Este depósito está a disposición del público tras la concesión de una patente que lo describe. Este depósito se realizó de acuerdo con 37 C.F.R. § 1.808 y MPEP § 2410.01 y, por tanto, el acceso al depósito estará disponible durante la tramitación de esta solicitud haciendo referencia al depósito a uno determinado por el Comisionado para tener derecho a ello bajo 37 C.F.R. § 1.14 y 35 U.S.C. § 122 y, con una excepción, que todas las restricciones impuestas por el depositante sobre la disponibilidad del material biológico depositado al público se retiren irrevocablemente al conceder la patente.

Un método para producir una biomasa de algas para uso como un ingrediente nutricional en alimento para aves de corral para mantener o mejorar las tasas de conversión alimenticia y las tasas de crecimiento en animales expuestos a coccidiosis y/o enteritis necrótica comprende obtener una muestra del material biológico del depósito de NCMA PATENTE n.º 201602001, cultivar el material para obtener cantidades procesables de material vegetal, y separar el sólido de los componentes líquidos para obtener la biomasa de algas y un

sobrenadante, respectivamente. La biomasa de algas se puede secar luego antes de su uso como ingrediente alimentario para aves de corral, tal como mediante secado por pulverización.

La biomasa de algas puede luego formularse en una composición de alimentación de aves de corral que comprende la biomasa de algas como un ingrediente, tal como, por ejemplo, combinando la biomasa de algas con ingredientes de alimentación de aves de corral distintos de algas típicos tales como cereales, proteínas, grasas y aceites. El material combinado resultante puede luego alimentar a animales tal cual, por ejemplo, en forma de una masa. En otras realizaciones, el material combinado resultante puede ser granulado usando maquinaria de granulado como una extrusora. Estos aspectos se analizan en detalle en lo sucesivo.

En ciertos ejemplos, se obtiene una biomasa de algas a partir de una especie de *Klebsormidium* de algas comprimiendo el líquido de la especie de *Klebsormidium* de algas y desecando además el material vegetal sólido restante para producir la biomasa de algas. Asimismo, una muestra de un cultivo obtenido a partir del material biológico del depósito de NCMA PATENTE n.º 201602001 puede comprimirse físicamente para exprimir el sobrenadante del material celular y luego secarse para producir una biomasa de algas de acuerdo con la presente explicación.

Una biomasa de algas para su uso como un ingrediente en un alimento para aves de corral de acuerdo con la invención incluye una especie de algas del género *Klebsormidium*. *Klebsormidium* es un género de algas verdes charófitas filamentosas de 20 especies conocidas, incluyendo *K. acidophilum*, *K. bilatum*, *K. crenulatum*, *K. dissectum*, *K. drouetii*, *K. elegans*, *K. flaccidum*, *K. fluitans*, *K. fragile*, *K. klebsii*, *K. lamellosum*, *K. montanum*, *K. mucosum*, *K. nitens*, *K. pseudostichococcus*, *K. scopulinum*, *K. sterile*, *K. subtile*, *K. subtilissimum*, y *K. tribonematoideum*. En diversas realizaciones, una biomasa de algas comprende cualquier especie actualmente conocida, o aún por descubrir, de algas *Klebsormidium*.

Por ejemplo, la biomasa de algas puede comprender una especie de algas seleccionada del grupo que consiste en *K. acidophilum*, *K. bilatum*, *K. crenulatum*, *K. dissectum*, *K. drouetii*, *K. elegans*, *K. flaccidum*, *K. fluitans*, *K. fragile*, *K. klebsii*, *K. lamellosum*, *K. montanum*, *K. mucosum*, *K. nitens*, *K. pseudostichococcus*, *K. scopulinum*, *K. sterile*, *K. subtile*, *K. subtilissimum*, *K. tribonematoideum*, y mezclas de estos.

Asimismo, una biomasa de algas puede comprender una especie de algas seleccionada del grupo que consiste en *Klebsormidium nitens*, *Klebsormidium flaccidum* y mezclas de estos. En diversas realizaciones, una biomasa de algas puede comprender *Klebsormidium nitens*. También, una biomasa de algas puede comprender *Klebsormidium flaccidum*.

Alimentación de aves de corral enriquecida con el ingrediente de biomasa de algas

La biomasa de algas descrita anteriormente se puede incorporar en una composición de alimentación de aves de corral a concentraciones de aproximadamente el 0,01 % en peso a aproximadamente el 1,0 % en peso, basado en el peso total de la composición de alimentación de aves de corral ([0,09 kg a 9,0 kg] 0,2 a 20 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento). Por ejemplo, se puede incorporar una biomasa de algas secas a concentraciones de aproximadamente el 0,025 % en peso a aproximadamente el 0,55 % en peso, basado en el peso total de la composición de alimentación de aves de corral ([0,23 kg a 4,98 kg] 0,5 a 11 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento). Por ejemplo, una biomasa de algas secas puede incorporarse a concentraciones de aproximadamente el 0,10 % en peso a aproximadamente el 0,20 % en peso, basado en el peso total de la composición de alimento para aves de corral ([0,90 kg a 1,81 kg] 2,0 a 4,0 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento). Por ejemplo, una biomasa de algas secas puede incorporarse a concentraciones de aproximadamente el 0,125 % en peso a aproximadamente el 0,175 % en peso, basado en el peso total de la composición de alimento para aves de corral ([1,13 kg a 1,59 kg] 2,5 a 3,5 libras de biomasa de algas secas / tonelada de alimento). En ciertos ejemplos, la cantidad incorporada de biomasa de algas secas en el alimento para aves de corral es de aproximadamente 4,98 kg (11 libras) / tonelada de alimento. En ciertos ejemplos, la cantidad incorporada de biomasa de algas secas en el alimento para aves de corral es de aproximadamente 1,58 kg (3,5 libras) / tonelada de alimento. Las concentraciones de incorporación ejemplares se detallan en la sección de Definiciones y abreviaturas anterior, y en los Ejemplos siguientes.

Los otros ingredientes en el alimento para aves de corral, es decir, los ingredientes que no son algas, pueden comprender ingredientes típicamente usados para alimento para animales en la industria avícola del país de interés, tal como los EE. UU. Los ingredientes que no son algas pueden seleccionarse del grupo de ingredientes de alimento que consiste en cereales, grasas, aceites, proteínas, y mezclas de estos. Los cereales pueden comprender cualquier asociación de cebada, maíz, sorgo o trigo, y similares, o subproductos de cereales tales como cáscaras de grano, salvado, germen, gluten, harina de gluten, intermediario, tamizajes de grano, tamizajes mixtos, grañones, productos no clasificados, granos de maíz, germinados de malta de cebada, pulido de arroz, harinillas de trigo, y molido de trigo. Las grasas y aceites pueden comprender cualquier asociación de sebo, manteca de cerdo, grasa blanca, grasa de ave, grasa animal, grasa amarilla y grasa vegetal. Las fuentes de proteína pueden incluir canola, harina de pescado, guisantes, harina de carne y hueso,

soja y algunos de los subproductos de cereales enumerados anteriormente. Otros ejemplos no limitantes de alimento para aves de corral que se pueden usar como el material base para el alimento enriquecido de biomasa de algas explicado en el presente documento pueden encontrarse en diversas revistas, tales como, "Animal Feed Science and Technology", coeditores V. Mlambo, B. Mullan y A. K. Patra, editor de Elsevier, y "Journal of Applied Animal Nutrition", editorial de la Universidad de Cambridge.

Pueden formularse opcionalmente alimentos específicos para aves de corral para enriquecimiento con una biomasa de algas para alimentar aves de corral, tales como pollos de engorde, en fases de crecimiento particulares, a saber, iniciador, criador o finalizador. Así, un alimento para aves de corral suplementado con un ingrediente nutricional de biomasa de algas puede ser apropiado para una dieta de iniciación, una dieta de cultivo o una dieta de finalización.

Ejemplos

En general, se diseñaron estudios para comparar la alimentación de aves de corral enriquecida con biomasa de algas para controlar la alimentación de aves de corral que no tiene el ingrediente de biomasa de algas, y para alimentar suplementado con el aditivo antibiótico Coban®. Los estudios incluyeron grupos de animales que se expusieron a patógenos para inducir la enfermedad junto con grupos de control que no se expusieron a patógenos. El alimento para aves de corral, con o sin el ingrediente de biomasa de algas o el aditivo antibiótico estaba en forma de una masa o gránulos, o fragmentos derivados de gránulos. Los criterios de valoración medidos fueron ganancia de peso, tasa de conversión alimenticia (FCR), mortalidad y puntuaciones de lesiones intestinales. Estos criterios de valoración forman parte de los síntomas observados en aves de corral con coccidiosis o enteritis necrótica.

Los resultados generalmente mostraron que, como se esperaba, la exposición al patógeno causó los síntomas perjudiciales de disminución de ganancia de peso, aumento de FCR, aumento de la mortalidad y aumento del número de lesiones intestinales en comparación con el grupo de control sin exposición. Sin embargo, al incluir la biomasa de algas como un ingrediente en la alimentación de aves de corral, se invirtieron los síntomas perjudiciales causados por la exposición al patógeno en los criterios de valoración primarios. En particular.

1. La ganancia de peso y la FCR para las aves alimentadas con el alimento enriquecido con biomasa de algas fueron comparables a los del control sin exposición.
2. La mortalidad de las aves alimentadas con el alimento enriquecido con biomasa de algas fue comparable a la del control sin exposición.
3. Las puntuaciones de las lesiones fueron significativamente mejoradas para las aves alimentadas con el alimento enriquecido con biomasa de algas con respecto a lo observado en las aves expuestas a patógenos que no recibieron ningún aditivo alimentario, pero no tan bajas como las puntuaciones iniciales.
4. La mejora en las puntuaciones de las lesiones fue comparable a la observada con el aditivo antibiótico Coban®.

La conclusión general es que la biomasa de algas, cuando se usa como un ingrediente natural para la alimentación de aves de corral, se realizó al menos tan bien como el antibiótico comercial para proteger a una manada de los efectos perjudiciales de los patógenos. La alimentación de aves de corral enriquecida con biomasa de algas proporcionó el control de los síntomas relacionados con la coccidiosis y la enteritis necrótica en aves de corral.

Ejemplo 1. Preparación de una biomasa de algas (cultivo único a cultivo pequeño)

Se usó una muestra del depósito de NCMA PATENTE n.º 201602001 para cultivar algas axénicamente en una placa de petri de agar mBBM. Se recogió una única colonia de la placa y se cultivó en medio mBBM en un matraz de agitación durante un mes para lograr una densidad adecuada para la inoculación de frascos de Roux. El inóculo de algas cultivado en frascos de Roux se dividió progresivamente para producir la densidad de inoculación mínima requerida para el crecimiento del reactor de panel. La biomasa de algas cultivada en reactores se colocó en una bolsa filtrante de 25 µm para retirar el sobrenadante usando flujo por gravedad. El sobrenadante en exceso se retiró con la compresión manual de la bolsa filtrante hasta que la consistencia de la biomasa de algas fue la de una pasta espesa. La biomasa de algas se esparció luego en una capa de 12,5 cm (1/2 pulgada) sobre una bandeja de acero inoxidable y se colocó a -80 °C hasta que se congeló. La bandeja se movió luego a un liofilizador equipado al vacío, y el material se mantuvo a una temperatura de -50 °C a -60 °C durante varios días hasta que la concentración de humedad se redujo a aproximadamente del 5 % al 10 % en peso. La biomasa de algas liofilizada se almacenó en un refrigerador a 4 °C o en un congelador a -20 °C hasta su uso.

Ejemplo 2. Preparación de una biomasa de algas (aumento de escala de un cultivo pequeño)

Se cultivan monocultivos de un alga filamentosa de *Klebsormidium* en paneles planos de 120 L y 240 L con una trayectoria de luz de 10,2 cm (4 pulgadas), (3-9) mM NO₃ en medio mBBM, y mezclado de CO₂/aire o

dentro de estanques exteriores, cubiertos, filtrados con HEPA usando luz natural. La recolección consiste en extraer el líquido y las algas que están contenidas en el líquido y separar el líquido de la biomasa de algas. De manera típica hay aproximadamente 1,4 gramos de algas por litro de agua. Después de la recolección, la biomasa se coloca en un bolsa filtrante de 25 µm para retirar el agua usando flujo por gravedad. El exceso de agua se retira con compresión manual dando como resultado una pasta húmeda que es aproximadamente el 15 % de sólidos y el 85 % de agua. El aspecto de la biomasa es el de una pasta espesa de color verde brillante. En promedio, aproximadamente (8-10) kg de peso húmedo produce aproximadamente 1 kg de biomasa de algas en forma de una pasta. Este material se esparce luego sobre bandejas de acero inoxidable en una capa de 10 cm (1/2") y se coloca en un congelador a -80 °C hasta que se congela o se prepara para su procesamiento adicional. La biomasa secada por congelación se consigue colocando la bandeja en un liofilizador equipado con una bomba de vacío y se ajusta a una temperatura de -50 °C a -60 °C durante varios días hasta que la concentración de humedad se redujo al (5-10) %. Biomasa de algas liofilizada se almacenó en un refrigerador a 4 °C o en un congelador a -20 °C hasta su uso. El material de biomasa de algas liofilizado producido de acuerdo con este método efectivamente no tiene agua y está en la forma de un polvo verde oscuro o una torta quebradiza. Este material resultante se mezcla luego con otros ingredientes alimenticios a las concentraciones deseadas para formar la alimentación de aves de corral enriquecida con biomasa de algas^{0,55}. El alimento combinado en la forma de un alimento de masa puede luego granularse a través de un extrusor para obtener alimento granulado.

Ejemplo 3. Preparación de una biomasa de algas mediante cultivo continuo en estanques de pistas de rodadura

Alternativamente, las microalgas filamentosas de agua dulce, verdes, derivadas de *K. flaccidum* se cultivan constantemente en canales al aire libre, parcialmente al aire libre y/o cubiertos de invernadero expuestos a la luz solar natural. Los estanques de pistas de rodadura tienen típicamente de 20 cm a 30 cm de profundidad. Las pistas de rodadura se inoculan con las algas *Klebsormidium*, junto con micronutrientes y macronutrientes adecuados para las especies de algas. El CO₂ puede añadirse a los estanques como un gas que burbujea, o en una forma seca tal como carbonato de calcio. Cuando la densidad de las algas alcanza de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,0 gramo de algas por litro, las algas se recolectan cada seis a ocho días. La recolección consistió en el desnatado de las algas con bombas de superficie o desnatadoras, enjuague de las algas con agua potable y luego centrifugación de las algas para separar la biomasa del sobrenadante, extracción de una suspensión líquida de algas y separación del líquido del material vegetal para obtener la biomasa de algas. Las algas aisladas, húmedas, pueden congelarse a -25 °C hasta que se necesite para la producción, o secarse en la biomasa de algas para su uso en la alimentación de aves de corral mediante secado por pulverización. Si se congela, el material previamente congelado se puede descongelar, enjuagar con agua potable y luego secar por pulverización. Las algas recolectadas también pueden ser alimentadas por gravedad sobre tamices de separación, y luego enjuagadas para retirar minerales, etc. El secado por pulverización se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente 370 °C a aproximadamente 620 °C para obtener biomasa de algas secas para su uso en la alimentación de aves de corral. Para este propósito, se usa un minisecador de pulverización BUCHI B-290 u otro secador de pulverización adecuado. El objetivo de concentración de humedad para la biomasa de algas secada por pulverización es menor que aproximadamente el 10 % en peso, y en varias realizaciones, menor que aproximadamente el 5 % en peso de humedad residual. El polvo verde brillante obtenido de esta manera tiene al menos seis meses de estabilidad en condiciones ambientales (25 °C y el 60 % de humedad relativa). Este material resultante se mezcla luego con otros ingredientes alimenticios a las concentraciones deseadas para formar la alimentación de aves de corral enriquecida con biomasa de algas. El alimento combinado en la forma de un alimento de masa puede luego granularse a través de un extrusor para obtener alimento granulado.

Ejemplo 4. Eficacia comparativa de la alimentación enriquecida con biomasa de algas administrada para el control de la enteritis necrótica (NE) causada por *Clostridium perfringens* en pollos de engorde. Diseño experimental

El estudio consistía en 40 jaulas que comenzaba con 9 pollos en cada jaula. Las alimentaciones se replicaron en 8 bloques de 5 jaulas cada uno. En este ejemplo, "Producto Z" se refiere a alimento para aves de corral que contiene el ingrediente de biomasa de algas en el 0,039 % en peso, el 0,077 % en peso o el 0,551 % en peso, como se indica, basado en el peso total del alimento para aves de corral.

En la Tabla 1 siguiente se resumen los grupos de alimentación.

TABLA 1: Grupos de alimentación

		Exposición coccidial	<i>Clostridium perfringens</i>	Jaulas grupo	por
1	No medicado	DDT 14	No	8	
2	No medicado	DDT 14	DDT 19, 20 y 21	8	

		Exposición coccidial	<i>Clostridium perfringens</i>	Jaulas grupo por
3	Producto Z tasa de inclusión de alimento 0,039 % en peso	DDT 14	DDT 19, 20 y 21	8
4	Producto Z tasa de inclusión de alimento 0,077 % en peso	DDT 14	DDT 19, 20 y 21	8
5	Producto Z tasa de inclusión de alimento 0,551 % en peso	DDT 14	DDT 19, 20 y 21	8

Materiales y métodos:

A. Alimentos

Se obtuvo una composición de alimento de pollo comercial sin medicación compuesta con piensos comúnmente usados en la industria avícola de Estados Unidos, tales como cereales y proteínas. La alimentación fue representativa de las alimentaciones comerciales de Estados Unidos y los análisis calculados cumplieron o excedieron los requisitos de alimentación de pollos de engorde NRC. A partir de este alimento comercial para aves de corral se prepararon alimentaciones experimentales enriquecidas con la biomasa de algas. Los diversos alimentos se mezclaron para asegurar una distribución uniforme de biomasa de algas en el alimento en masa. El mezclador se lavó entre lotes para evitar la contaminación cruzada entre lotes. La alimentación se transfirió a los edificios respectivos y se distribuyó entre jaulas que pertenecían al mismo grupo de alimentación. Esta ración en forma de masa se alimentó a las aves de corral durante todo el estudio.

B. Animales

Se obtuvieron pollitos de pollo macho de engorde de la cepa Cobb 500 de Cobb-Vantress, Cleveland, GA, y solo se usaron pollos de apariencia sana en el estudio.

C. Alojamiento

A su llegada, los pollos se criaron en jaulas de baterías Petersime. En la colocación, las aves se alimentaron con las diversas alimentaciones. Las baterías Petersime estaban en un edificio aislado que tenía un piso de concreto y una estructura superior de metal. El espacio alimentador/agua por ave era de 9 pájaros por 24 alimentadores de 8,9 cm (3,5 pulgadas) por canal de agua. Se proporcionaron temperatura e iluminación uniformes.

Procedimientos

A. Asignación de aves y aleatorización de jaulas

Las jaulas se bloquearon por la ubicación en la batería. El estudio comenzó cuando las aves se colocaron (día de eclosión, es decir, DDT 0) en cuyo momento se asignaron a las jaulas experimentales. No se reemplazaron aves durante el estudio.

B. Pesos de jaula

Todas las aves se pesaron en el DDT 0, 14, 21 y 28. La alimentación se pesó en el DDT 0 y la alimentación restante se pesó en el DDT 14, 21 y 28.

C. Inducción de enfermedades

En el DDT 14, todas las aves se inoculaban por vía oral con ~5000 oocistos de *E. maxima*. A partir del DDT 19, todas las aves, excepto el grupo de alimentación 1, recibieron un cultivo en caldo de *C. perfringens* ~10⁸ ufc/ml. Se administró a las aves un cultivo de caldo fresco una vez al día durante 3 días (en los DDT 19, 20 y 21).

D. Puntuación de enteritis necrótica en lesión intestinal

En el DDT 21, se seleccionaron, se sacrificaron, se pesaron y se examinaron tres aves de cada jaula para determinar el grado de presencia de lesiones de enteritis necrótica. La puntuación se basó en una puntuación de 0 a 3, siendo 0 normal y 3 la más grave.

E. Recogida del tracto intestinal

En el DDT 28, se seleccionó, se sacrificó, se pesó un ave de cada jaula y se recogió toda la porción del GIT. Las muestras se envasaron individualmente y se enviaron el mismo día durante la noche en hielo a Agro BioSciences, Attn: Evan Hutchison, 10437 Innovation Dr., Wauwatosa, WI 53226.

F. Sección transversal del intestino

En el DDT 28, se seleccionó un ave de cada jaula, se sacrificó, y se cortó y se congeló una pequeña sección transversal del intestino. Las secciones transversales se almacenaron en un congelador.

Gestión

1. Se comprobó exhaustivamente la instalación para asegurarse de que todas las jaulas tuvieran agua y de que se dispusiera de alimento en todas las jaulas. El intervalo de temperatura de construcción se mantuvo a una temperatura apropiada para la edad de las aves.
2. Se proporcionó iluminación uniforme y continua mediante lámparas fluorescentes colgadas verticalmente a lo largo de la pared.
3. Se suministraron alimentos y agua *ad libitum*, observando que la tasa de inclusión de la biomasa de algas era fija.
4. Las jaulas se comprobaron dos veces al día. Las observaciones incluidas fueron la disponibilidad de alimento y agua, control de temperatura, y cualquier condición inusual. Las aves se observaron estrechamente para detectar cualquier reacción anormal.
5. Cuando se retiraron las aves muertas de las jaulas, se registraron el número de jaula, la fecha, el peso de las aves, el sexo y la causa probable de la muerte.

Análisis de datos

Se calcularon los medios para la ganancia de peso en jaula, el consumo de alimento, la tasa de conversión alimenticia, las puntuaciones de lesión de NE y el porcentaje de mortalidad de NE.

Resultados y conclusiones

En la Tabla 2 siguiente se muestran los resultados del estudio. La conclusión es que la FCR global se redujo para todas las alimentaciones de concentración de inclusión de producto de biomasa de algas en comparación con el grupo expuesto. Las aves alimentadas con el producto de biomasa de algas tenían una FCR similar a la del grupo de control no expuesto. El porcentaje de mortalidad por enteritis necrótica se redujo significativamente en aves alimentadas con la biomasa de algas.

TABLA 2: Resultados del estudio

	Ingesta de alimento		Conversión de alimento		Ganancia de peso	
Grupo	D0-21	D14-21	DO-21	D14-21	D0-21	D14-21
1. NM, no CP	7,053a	3,971a	1,516b	1,440b	0,532a	0,319a
2. NM, CP	7,297a	3,654a	1,725a	1,745a	0,477b	0,240c
3. Producto Z 0,039 %, CP	7,213a	3,840a	1,561b	1,586b	0,527a	0,279b
4. Producto Z 0,077 %, CP	6,820a	3,651a	1,557b	1,594ab	0,510ab	0,283bc
5. Producto Z 0,551 %, CP	6,985a	3,815a	1,510b	1,537b	0,526a	0,268b
	Ingesta de alimento		Conversión de alimento		Ganancia de peso	
Grupo	D0-28	D14-28	D0-28	D14-28	D0-28	D14-28
1. NM, no CP	9,570a	6,488a	1,540b	1,501c	0,777a	0,564a
2. NM, CP	9,113a	5,470c	1,753a	1,787a	0,731a	0,494a
3. Producto Z 0,039 %, CP	9,320a	5,948abc	1,609b	1,656b	0,794a	0,546a
4. Producto Z 0,077 %, CP	9,005a	5,837bc	1,588b	1,637b	0,762a	0,520a
5. Producto Z 0,551 %, CP	9,553a	6,384ab	1,589b	1,646b	0,765a	0,522a
	NE (0-3)	% NE				

Grupo	Puntuación	Mortalidad				
1. NM, no CP	0,0b	0d				
2. NM, CP	1,1a	25a				
3. Producto Z 0,039 %, CP	0,8a	13b				
4. Producto Z 0,077 %, CP	0,9a	9bc				
5. Producto Z 0,551 %, CP	0,9a	5cd				

Ejemplo 5: Eficacia antiocidial comparativa del ingrediente de biomasa de algas frente a salinomicina en pollos de engorde

- 5 En este ejemplo, "Producto Z" se refiere a la alimentación de aves de corral que incluye el ingrediente de biomasa de algas en el nivel de porcentaje en peso mostrado.

Animales diana

- 10 Pollos de engorde

Grupos de prueba

- 15 1. Sin aditivo, sin Cocci.
2. Sin Aditivo, Cocci.
3. Salinomicina 60 g/t, Cocci.
4. Producto Z 0,551 %, Cocci.

Diseño experimental

- 20 Las jaulas se bloquearon por ubicación en la batería con un tamaño de bloque igual para los grupos (8 jaulas por bloque). El estudio comenzó cuando las aves se colocaron (día de eclosión, es decir, DDT 0) en cuyo momento se asignaron a las jaulas experimentales. Solo se seleccionaron aves sanas (10 aves/jaula).

- 25 Materiales y métodos:

A. Alojamiento

- 30 A su llegada, los pollos se criaron en jaulas de baterías Petersime. En la colocación, las aves se alimentaron con las diversas alimentaciones. Las baterías Petersime estaban en un edificio aislado que tenía un piso de concreto y una estructura superior de metal. El espacio de suelo por animal era de 0,047 metros cuadrados (0,51 pies cuadrados) por ave. El espacio de alimentador por ave era de 10 aves por 24 alimentadores de 8,9 cm (3,5 pulgadas). Se proporcionaron temperatura e iluminación uniformes.

- 35 B. Alimentos

- 40 Se obtuvo una composición de alimento de pollo comercial sin medicación compuesta con piensos comúnmente usados en la industria avícola de Estados Unidos, tales como cereales y proteínas. La dieta era un alimento completamente vegetal sin antibióticos, ácidos orgánicos, enzimas NSP, o alimento microbiano directo. Esta alimentación en forma de masa se alimentó *ad libitum* desde la fecha de llegada del pollo hasta el día 28 del estudio. A partir de este alimento comercial para aves de corral se prepararon alimentaciones experimentales enriquecidas con la biomasa de algas. Los alimentos se combinaron para asegurar una distribución uniforme de biomasa de algas en el alimento en masa.

- 45 C. Animales

- 50 El día de la eclosión se obtuvieron pollitos de pollo de engorde macho de la cepa Cobb X Cobb de Cobb-Vantress, Cleveland, GA. Se seleccionaron al azar grupos de diez pollos, se pesaron en grupo y se colocaron en jaulas. No se reemplazaron aves durante el estudio.

D. Pesos del DDT 0, 14, 20 y 28

- 55 Todas las aves se pesaron por jaula en el DDT 0, 14, 20 y 28. La alimentación se pesó en el DDT 0 y la alimentación restante se pesó en el DDT 14, 20 y 28.

E. Inoculación de oocistos

Se describieron procedimientos de inoculación de oocistos coccidiales. El día 14 del estudio todas las aves excepto T1 recibieron por vía oral un inóculo mixto coccidial de *E. acervulina*, *E. maxima*, y *E. tenella* diluido a un volumen de 1 ml (p.o.). La concentración de inóculo intentó producir una exposición moderada.

5 F. Puntuación de lesión cecal/intestinal de coccidia

En el DDT 20, se seleccionaron, se sacrificaron, se pesaron y se examinaron cinco aves de cada jaula para determinar el grado de presencia de lesiones de coccidia. Si estaban presentes menos de cinco aves en el momento de la puntuación, se puntuaron todas las aves restantes dentro de la jaula. El método Johnson y Reid, 1970 de puntuación de lesiones de coccidiosis se usó para puntuar las regiones infectadas del intestino. La puntuación se basó en una puntuación de 0 a 4, siendo 0 normal y 4 la más grave.

G. Oocistos por gramo de materia fecal

15 El día 19 (día 5 después de la exposición) se limpiaron los recipientes de todas las jaulas. Se recogieron heces mezcladas del día 20 (día 6 pc) de cada jaula. Cada muestra se examinó en cuanto al número de oocistos por gramo de material fecal mediante flotación fecal.

Gestión

- 20 1. Se comprobó exhaustivamente la instalación para asegurarse de que todas las jaulas tuvieran agua y de que se dispusiera de alimento en todas las jaulas. El intervalo de temperatura de construcción se mantuvo a una temperatura apropiada para la edad de las aves.
- 25 2. Se proporcionó iluminación uniforme y continua mediante lámparas fluorescentes colgadas verticalmente a lo largo de la pared.
3. Se suministraron alimentos y agua *ad libitum*, observando que la tasa de inclusión de la biomasa de algas era fija.
4. Las jaulas se comprobaron dos veces al día. Las observaciones incluidas fueron la disponibilidad de alimento y agua, control de temperatura, y cualquier condición inusual. Las aves se observaron estrechamente para detectar cualquier reacción anormal.
- 30 5. Cuando se retiraron las aves muertas de las jaulas, se registraron el número de jaula, la fecha, el peso de las aves, el sexo y la causa probable de la muerte.

Análisis de datos

35 Se calcularon las medias para la ganancia de peso en jaula, el consumo de alimento, la tasa de conversión alimenticia, puntuaciones de lesión, opg y mortalidad.

Resultados y conclusiones

40 Los resultados aparecen en la TABLA 3 a continuación. La FCR global se redujo en el grupo alimentado con producto de biomasa de algas en comparación con el grupo de control expuesto. Las aves alimentadas con el producto de biomasa de algas tenían FCR similar a la del grupo de tratamiento de salinomicina (medicada), lo que indica que la biomasa de algas se puede usar como un reemplazo de ingrediente natural para el antibiótico.

45

TABLA 3: Resultados del estudio

	Alimentación		Peso	
Día 14	Ingesta	FCR	Ganancia	
1. Sin aditivo, no infectado	2,310a	1,155a	0,217a	
2. Sin aditivo, infectado	2,461a	1,142a	0,230a	
3. Salinomicina, 60 g/t	2,384a	1,156a	0,218a	
4. Producto Z, 0,551 %	2,709a	1,150a	0,246a	
	Alimentación		Peso	
Día 0-20	Ingesta	FCR	Ganancia	
1. Sin aditivo, no infectado	5,487a	1,497c	0,401a	
2. Sin aditivo, infectado	4,595b	1,768a	0,287c	
3. Salinomicina, 60 g/t	5,433a	1,597bc	0,360b	
4. Producto Z, 0,551 %	4,845ab	1,647ab	0,307c	

	Alimentación		Peso	
	Alimentación		Peso	
Día 14-20	Ingesta	FCR	Ganancia	
1. Sin aditivo, no infectado	3,177a	1,502c	0,227a	
2. Sin aditivo, infectado	2,134a	2,235a	0,100c	
3. Salinomicina, 60 g/t	3,049a	1,744b	0,185b	
4. Producto Z, 0,551 %	2,137a	2,112a	0,104c	
	Alimentación		Peso	
Día 0-28	Ingesta	FCR	Ganancia	
1. Sin aditivo, no infectado	5,482a	1,554c	0,481a	
2. Sin aditivo, infectado	5,690a	2,086a	0,289c	
3. Salinomicina, 60 g/t	5,918a	1,625bc	0,376b	
4. Producto Z, 0,551 %	5,520a	1,766b	0,343bc	
	Alimentación		Peso	
Día 14-28	Ingesta	FCR	Ganancia	
1. Sin aditivo, no infectado	3,172ab	1,612c	0,306a	
2. Sin aditivo, infectado	3,229ab	3,132a	0,102c	
3. Salinomicina, 60 g/t	3,534a	1,766c	0,202b	
4. Producto Z, 0,551 %	2,812b	2,380b	0,140c	
	<i>Eimeria</i>	<i>Eimeria</i>	<i>Eimeria</i>	
Puntuaciones de lesión	<i>acervulina</i>	<i>maxima</i>	<i>tenella</i>	Promedio
1. Sin aditivo, no infectado	0,0d	0,0d	0,0d	0,0d
2. Sin aditivo, infectado	3,0a	2,5a	2,8a	2,8a
3. Salinomicina, 60 g/t	2,1c	0,9c	0,7c	1,3c
4. Producto Z, 0,551 %	2,6b	2,0b	2,3b	2,3b
	<i>Eimeria</i>	<i>Eimeria</i>	<i>Eimeria</i>	Total
OPG	<i>acervulina</i>	<i>tenella</i>	<i>maxima</i>	Promedio
1. Sin aditivo, no infectado	0c	0c	0b	0b
2. Sin aditivo, infectado	57112a	23153a	2701a	82966a
3. Salinomicina, 60 g/t	4511c	4727c	484b	9722b
4. Producto Z, 0,551 %	46840a	20835a	2159a	69835a

Ejemplo 6. Prueba de Cocci

Animales diana

5

Pollos de engorde

Grupos de prueba

10

1. Sin aditivo, sin Cocci.
2. Sin aditivo, Cocci.
3. Salinomicina 60g/t, Cocci.
4. Biomasa de algas, 0,23 kg (0,5 lb) / tonelada, Cocci
5. Biomasa de algas, 0,91 kg (2,0 lb) / tonelada, Cocci

6. Biomasa de algas, 1,59 kg (3,5 lb) / tonelada, Cocci
7. Biomasa de algas 2,27 kg (5,0 libras) / tonelada, Cocci

Diseño experimental

Cada grupo se replicó 10 veces. Las jaulas se bloquearon por ubicación en la batería con un tamaño de bloque igual al de los grupos (7 jaulas por bloque). El estudio comenzó cuando las aves se colocaron (día de eclosión, es decir, DDT 0) en cuyo momento se asignaron a las jaulas experimentales. Solo se seleccionaron aves sanas (10 aves/jaula).

Materiales y métodos:

A. Alojamiento

A su llegada, los pollos se criaron en jaulas de baterías Petersime. En la colocación, las aves se alimentaron con las diversas alimentaciones. Las baterías Petersime estaban en un edificio aislado que tenía un piso de concreto y una estructura superior de metal. El espacio de suelo por animal era de 0,047 metros cuadrados (0,51 pies cuadrados) por ave. El espacio de alimentador por ave era de 10 aves por 24 alimentadores de 8,9 cm (3,5 pulgadas). Se proporcionaron temperatura e iluminación uniformes.

B. Alimentos

Se obtuvo una composición de alimento de pollo comercial sin medicación compuesta con piensos comúnmente usados en la industria avícola de Estados Unidos, tales como cereales y proteínas. La dieta era un alimento completamente vegetal sin antibióticos, ácidos orgánicos, enzimas NSP, o alimento microbiano directo. Esta alimentación en forma de masa se alimentó *ad libitum* desde la fecha de llegada del pollo hasta el día 28 del estudio. A partir de este alimento comercial para aves de corral se prepararon alimentaciones experimentales enriquecidas con la biomasa de algas. Los alimentos se combinaron para asegurar una distribución uniforme de biomasa de algas en el alimento en masa.

C. Animales

El día de la eclosión se obtuvieron pollitos de pollo de engorde macho de la cepa Cobb 500 de Cobb-Vantress, Cleveland, GA. Se seleccionaron al azar grupos de diez pollos, se pesaron en grupo y se colocaron en jaulas. Se documentaron el número y la disposición de todas las aves no usadas para la asignación. No se reemplazaron aves durante el estudio.

D. Pesos del DDT 0, 14, 20 y 28

Todas las aves se pesaron por jaula en el DDT 0, 14, 20 y 28. La alimentación se pesó en el DDT 0 y la alimentación restante se pesó en el DDT 14, 20 y 28.

E. Inoculación de oocistos

El día 14 del estudio todas las aves excepto T1 recibieron por vía oral un inóculo mixto coccidial de *E. acervulina*, *E. maxima*, y *E. tenella* diluido a un volumen de 1 ml (p.o.). La concentración de inóculo intentó producir una exposición moderada.

F. Puntuación de lesión cecal/intestinal de coccidia

En el DDT 20, se seleccionaron, se sacrificaron, se pesaron y se examinaron cinco aves de cada jaula para determinar el grado de presencia de lesiones de coccidia. Si estaban presentes menos de cinco aves en el momento de la puntuación, se puntuaron todas las aves restantes dentro de la jaula. El método Johnson y Reid, 1970 de puntuación de lesiones de coccidiosis se usó para puntuar las regiones infectadas del intestino. La puntuación se basó en una puntuación de 0 a 4, siendo 0 normal y 4 la más grave.

G. Oocistos por gramo de materia fecal

El día 19 (día 5 después de la exposición) se limpiaron los recipientes de todas las jaulas. Se recogieron heces mezcladas del día 20 (día 6 pc) de cada jaula. Cada muestra se examinó en cuanto al número de oocistos por gramo de material fecal mediante flotación fecal.

Gestión

1. Se comprobó exhaustivamente la instalación para asegurarse de que todas las jaulas tuvieran agua y de que se dispusiera de alimento en todas las jaulas. El intervalo de temperatura de construcción se

mantuvo a una temperatura apropiada para la edad de las aves.

2. Se proporcionó iluminación uniforme y continua mediante lámparas fluorescentes colgadas verticalmente a lo largo de la pared.

5 3. Se suministraron alimento y agua *ad libitum*, observando que la tasa de inclusión de la biomasa de algas era fija.

4. Las jaulas se comprobaron dos veces al día. Las observaciones incluidas fueron la disponibilidad de alimento y agua, control de temperatura, y cualquier condición inusual. Las aves se observaron estrechamente para detectar cualquier reacción anormal.

10 5. Cuando se retiraron las aves muertas de las jaulas, se registraron el número de jaula, la fecha, el peso de las aves, el sexo y la causa probable de la muerte.

Análisis de datos

15 Se calcularon las medias para ganancia de peso en jaula, consumo de alimento, tasa de conversión alimenticia, puntuaciones de lesión, opg y mortalidad.

Resultados y conclusiones

20 Los resultados aparecen en la TABLA 4 a continuación. La ganancia de peso corporal total se incrementó cuando la biomasa de algas se alimentó a una concentración de 0,9 kg y 1,6 kg (2,0 y 3,5 libras) de biomasa de algas / tonelada de alimento terminado en comparación con la del grupo infectado sin aditivo alimentario. Las aves alimentadas con la biomasa de algas a concentraciones de 0,9 kg y 1,6 kg (2,0 y 3,5 libras) de biomasa de algas / tonelada de alimento terminado tenían una FCR similar a la del grupo de control de salinomicina. La puntuación de la lesión de coccidiosis se redujo en todos los grupos alimentados con biomasa de algas en comparación con el grupo infectado sin aditivo alimentario. Cuando la biomasa de algas se alimentó por encima de la concentración de 0,23 kg (0,5 libras) de biomasa de algas / tonelada de alimento terminado, *Eimeria tenella* OPG se redujo en comparación con el grupo infectado sin aditivo alimentario.

TABLA 4: Resultados del estudio

30

	Alimentación		Peso	
Día 14	Ingesta	FCR	Ganancia	
1. Sin aditivo, no infectado	3,511a	1,426abc	0,248ab	
2. Sin aditivo, infectado	3,519a	1,454ab	0,245 ab	
3. Salinomicina, 0,45 kg (1,0 lb) / t	3,436ab	1,491a	0,232b	
4. Biomasa de algas, 0,23 kg (0,5 lb) / tonelada	3,249bc	1,361bcd	0,239ab	
5. Biomasa de algas, 0,91 kg (2,0 lb) / tonelada	3,429ab	1,401abcd	0,245ab	
6. Biomasa de algas, 1,59 kg (3,5 lb) / tonelada	3,373ab	1,323cd	0,256a	
7. Biomasa de algas, 2,27 kg (5,0 lb) / tonelada	3,118c	1,291d	0,242ab	
	Alimentación		Peso	
Día 0-20	Ingesta	FCR	Ganancia	
1. Sin aditivo, no infectado	7,602a	1,693c	0,452a	
2. Sin aditivo, infectado	7,098b	1,952a	0,368b	
3. Salinomicina, 0,45 kg (1,0 lb) / t	7,064b	1,876ab	0,382b	
4. Biomasa de algas, 0,23 kg (0,5 lb) / tonelada	6,653d	1,868ab	0,363b	
5. Biomasa de algas, 0,91 kg (2,0 lb) / tonelada	7,125b	1,875ab	0,381b	
6. Biomasa de algas, 1,59 kg (3,5 lb) / tonelada	7,020bc	1,783bc	0,394b	
7. Biomasa de algas, 2,27 kg (5,0 lb) / tonelada	6,683cd	1,832abc	0,369b	
	Alimentación		Peso	
Día 14-20	Ingesta	FCR	Ganancia	
1. Sin aditivo, no infectado	4,092a	1,610c	0,256a	
2. Sin aditivo, infectado	3,579bc	2,060a	0,175c	
3. Salinomicina, 0,45 kg (1,0 lb) / t	3,628b	1,839b	0,201b	

	Alimentación		Peso	
4. Biomasa de algas, 0,23 kg (0,5 lb) / tonelada	3,404c	2,028a	0,176c	
5. Biomasa de algas, 0,91 kg (2,0 lb) / tonelada	3,646b	1,940ab	0,188bc	
6. Biomasa de algas, 1,59 kg (3,5 lb) / tonelada	3,647b	1,917ab	0,190bc	
7. Biomasa de algas, 2,27 kg (5,0 lb) / tonelada	3,565bc	2,040a	0,179c	
	Alimentación		Peso	
Día 0-28	Ingesta	FCR	Ganancia	
1. Sin aditivo, no infectado	10,452a	1,606b	0,881a	
2. Sin aditivo, infectado	9,855bc	1,890a	0,666c	
3. Salinomicina, 0,45 kg (1,0 lb) / t	9,852bc	1,832a	0,718bc	
4. Biomasa de algas, 0,23 kg (0,5 lb) / tonelada	9,219d	1,836a	0,662c	
5. Biomasa de algas, 0,91 kg (2,0 lb) / tonelada	9,930b	1,819a	0,739b	
6. Biomasa de algas, 1,59 kg (3,5 lb) / tonelada	9,802bc	1,767a	0,755b	
7. Biomasa de algas, 2,27 kg (5,0 lb) / tonelada	9,516cd	1,793a	0,721bc	
	Alimentación		Peso	
Día 14-28	Ingesta	FCR	Ganancia	
1. Sin aditivo, no infectado	6,941a	1,522b	0,685a	
2. Sin aditivo, infectado	6,336b	1,913a	0,473c	
3. Salinomicina, 0,45 kg (1,0 lb) / t	6,416b	1,789a	0,537b	
4. Biomasa de algas, 0,23 kg (0,5 lb) / tonelada	5,970c	1,901a	0,474c	
5. Biomasa de algas, 0,91 kg (2,0 lb) / tonelada	6,450b	1,823a	0,547b	
6. Biomasa de algas, 1,59 kg (3,5 lb) / tonelada	6,429b	1,834a	0,551b	
7. Biomasa de algas, 2,27 kg (5,0 lb) / tonelada	6,398b	1,879a	0,531b	
	<i>Eimeria</i>	<i>Eimeria</i>	<i>Eimeria</i>	
Puntuaciones de lesión	<i>acervulina</i>	<i>maxima</i>	<i>tenella</i>	Promedio
1. Sin aditivo, no infectado	0,Od	0,0c	0,Od	0,Od
2. Sin aditivo, infectado	2,9a	2,2a	1,7a	2,3a
3. Salinomicina, 0,45 kg (1,0 lb) / t	1,7c	1,7b	1,1b	1,5c
4. Biomasa de algas, 0,23 kg (0,5 lb) / tonelada	2,5b	1,7b	1,1b	1,8b
5. Biomasa de algas, 0,91 kg (2,0 lb) / tonelada	2,5b	1,6b	1,1b	1,7b
6. Biomasa de algas, 1,59 kg (3,5 lb) / tonelada	2,4b	1,7b	0,9bc	1,7bc
7. Biomasa de algas, 2,27 kg (5,0 lb) / tonelada	2,5b	1,6b	0,8c	1,6bc
	<i>Eimeria</i>	<i>Eimeria</i>	<i>Eimeria</i>	Total
OPG	<i>acervulina</i>	<i>maxima</i>	<i>tenella</i>	Promedio
1. Sin aditivo, no infectado	0c	0b	0c	0c
2. Sin aditivo, infectado	297202a	2835a	3469a	303.505a
3. Salinomicina, 0,45 kg (1,0 lb) / t	30802c	2608a	1768b	35.178c
4. Biomasa de algas, 0,23 kg (0,5 lb) / tonelada	186387ab	2348a	2555ab	191.289ab
5. Biomasa de algas, 0,91 kg (2,0 lb) / tonelada	147013b	2828a	1521bc	151.362b
6. Biomasa de algas, 1,59 kg (3,5 lb) / tonelada	91693bc	2168a	1454bc	953.14 bc
7. Biomasa de algas, 2,27 kg (5,0 lb) / tonelada	30802c	2601a	1708b	35.111c

REIVINDICACIONES

1. Una composición alimenticia para aves de corral que incluye una biomasa de algas que comprende una especie de alga *Klebsormidium* para su uso en un método para mitigar los síntomas relacionados con la coccidiosis o la enteritis necrótica en aves de corral.
2. La composición alimenticia para aves de corral para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la especie de alga *Klebsormidium* se selecciona del grupo que consiste en *K. acidophilum*, *K. bilatum*, *K. crenulatum*, *K. dissectum*, *K. drouetii*, *K. elegans*, *K. flaccidum*, *K. fluitans*, *K. fragile*, *K. klebsii*, *K. lamellosum*, *K. montanum*, *K. mucosum*, *K. nitens*, *K. pseudostichococcus*, *K. scopulinum*, *K. sterile*, *K. subtile*, *K. subtilissimum*, *K. tribonematoideum*, y mezclas de estos.
3. La composición alimenticia para aves de corral para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la especie de alga *Klebsormidium* se selecciona del grupo que consiste en *Klebsormidium nitens*, *Klebsormidium flaccidum*, y mezclas de estos.
4. La composición alimenticia para aves de corral para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la biomasa de algas se obtiene mediante desnatado de algas de un estanque de pistas de rodadura de algas *Klebsormidium* cultivadas continuamente, drenaje de líquido de las algas y secado por pulverización para obtener la biomasa de algas.
5. La composición alimenticia para aves de corral para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la biomasa de algas está presente en la composición alimenticia para aves de corral a una concentración de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 1,0 % en peso, basado en el peso total de la composición.
6. La composición alimenticia para aves de corral para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición alimenticia para aves de corral comprende además al menos uno de un cereal, una proteína, una grasa y un aceite.
7. La composición alimenticia para aves de corral para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición alimenticia para aves de corral está en la forma física de un alimento en masa o un alimento granulado.
8. La composición alimenticia para aves de corral para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los síntomas incluyen al menos uno de tasa de conversión alimenticia elevada, tasa de crecimiento reducida, tasas de mortalidad incrementadas y lesiones intestinales incrementadas.