

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 558**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12N 1/04 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2018** **PCT/US2018/016321**
87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2018** **WO18144653**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2018** **E 18748726 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024** **EP 3577213**

54 Título: **Células microbianas, métodos de producción de las mismas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

31.01.2017 US 201762452804 P
31.01.2017 US 201762452816 P
24.05.2017 US 201762510723 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2024

73 Titular/es:

**KANSAS STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (50.0%)**
2005 Research Park Circle, Suite 105
Manhattan, KS 66502, US y
AXIOTA U.S., INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

DROUILLARD, JAMES SCOTT;
APERCE, CELINE CAROLINE;
HERREN, GINA RAE;
ELLERMAN, TARA JO;
SCALETTI, CIANA MARIE;
VAN JORDAN, KATHERINE;
LATTIMER, JAMES MORRIS;
BEYER, SCOTT;
UWITUZE, SOLANGE;
DOUTHIT, TERESA LEA y
GUNKEL, CHRISTINA DENISE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 986 558 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

Células microbianas, métodos de producción de las mismas y usos de las mismas

5 ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

Campo de la invención

La presente invención se refiere a células de *Megasphaera elsdenii*, a métodos de producción de células de *M. elsdenii*, a aditivos para piensos y a composiciones que comprenden las células, y a usos que implican la administración de las células a animales, que incluyen, por ejemplo, para mejorar el rendimiento del crecimiento y/o la salud. La presente invención también se refiere a células microbianas, que incluyen, pero no se limitan a, bacterias aerobias, bacterias anaerobias y células de levadura, y a métodos de producción de células microbianas, aditivos para piensos y composiciones que comprenden las células microbianas, y a usos que implican la administración de las células microbianas a animales, que incluyen, por ejemplo, para mejorar el rendimiento del crecimiento y/o la salud.

Antecedentes

Megasphaera elsdenii (es decir, *M. elsdenii*) es un diplococo gramnegativo inmóvil que utiliza lactato como fuente de carbono preferida y puede ayudar a prevenir la acidosis, que es un trastorno digestivo común que afecta a millones de cabezas de ganado vacuno y lechero cada año.

Cuando el ganado vacuno y otros rumiantes ingieren grandes cantidades de alimentos amiláceos (por ejemplo, granos de cereal) o azúcares simples, microorganismos oportunistas en el estómago pueden fermentar rápidamente estos compuestos en ácido láctico. El ácido láctico es un potente ácido orgánico y puede conducir a acidosis láctica, que puede alterar la actividad digestiva normal y provocar un gran daño al revestimiento del tubo digestivo en los rumiantes. Los animales afectados tienen un rendimiento inferior al óptimo. Y la forma más aguda de la acidosis láctica puede provocar un daño irreversible a los aparatos digestivo y respiratorio de un animal, así como elevadas tasas de mortalidad.

M. elsdenii puede ayudar a controlar la acidosis láctica por la capacidad de las bacterias de convertir el ácido láctico en ácidos grasos volátiles (AGV; por ejemplo, butirato, propionato y acetato), que son compuestos orgánicos inocuos. Pero, las poblaciones de *M. elsdenii* en el tubo gastrointestinal de rumiantes están frecuentemente a niveles demasiado bajos como para prevenir el riesgo de la acidosis. Por consiguiente, se desarrolló un cultivo líquido de células vivas de una cepa de *M. elsdenii*, Lactipro®, para aumentar la tasa de colonización de *M. elsdenii* en el tubo gastrointestinal de rumiantes. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.550.139. Sin embargo, existen limitaciones prácticas que han limitado el uso de productos que contienen *M. elsdenii*, que incluyen la dificultad de mantener productos de *M. elsdenii* en condiciones anaerobias requeridas por el organismo y la dificultad de transportar los productos de *M. elsdenii* desde la instalación de producción hasta el sitio de uso final en 14 días, tiempo después del cual disminuye significativamente la viabilidad de *M. elsdenii* en el producto.

Aunque la patente de EE. UU. n.º 4.138.498 trata, en general, la posible liofilización de *M. elsdenii*, no proporciona ningún método de producción de *M. elsdenii* liofilizado que pueda usar a escala comercial para vencer las limitaciones comerciales existentes. Además, al menos un grupo informó recientemente que la liofilización de microorganismos, que incluyen anaerobios tales como *M. elsdenii*, no es comercialmente práctica. Véase, por ejemplo, el documento de patente WO 2017/015022. Teather et al. describen métodos de mantenimiento de cepas de laboratorio de bacterias estrictamente anaerobias del rumen y Khan et al. describen el uso de antioxidantes para mantener las bacterias intestinales humanas altamente sensibles al oxígeno *Faecalibacterium prausnitzii* vivas en el aire ambiente.

Por lo tanto, existe una necesidad de células de *Megasphaera*, tales como células de *Megasphaera elsdenii*, que incluyen métodos de producción de las mismas, que vengzan las limitaciones existentes. También existe la necesidad de otras células microbianas, tales como *Bifidobacterium*, tales como *B. breve*, *Lactobacillus*, tales como *L. plantarum*, *Bifidobacterium*, tales como *B. animalis subsp. lactis*, *Pediococcus*, tales como *P. acidilactici*, *Lactobacillus*, tales como *L. casei*, *Bacillus*, tales como *B. subtilis*, *Saccharomyces*, tales como *S. boulardii* y *S. cerevisiae*, que incluyen métodos de producción de las mismas, que vencen las limitaciones existentes.

BREVE SUMARIO DE LA DIVULGACIÓN

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de producción de células de *Megasphaera elsdenii* liofilizadas, que comprende:

(a) preparar un cultivo líquido en condiciones anaerobias que comprende células de *M. elsdenii* y un medio de crecimiento que comprende al menos dos fuentes de carbono seleccionadas del grupo que consiste en: caseína, lactato, dextrosa, fructosa, fructano, glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, acetato, glicerol, manitol, sacarosa, xilosa, melaza, fucosa, glucosamina, dextrano, una grasa, un aceite, glicerol, acetato sódico, arabinosa, proteína de soja, proteína soluble, rafinosa, amilosa, almidón, y combinaciones de los mismos, en donde el volumen de cultivo líquido

es entre aproximadamente 2 litros y aproximadamente 75.000 litros, (b) extraer las células en condiciones anaerobias, (c) añadir al menos un crioprotector a las células extraídas, (d) congelar las células, (e) liofilizar las células, y (f) en donde aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{12} UFC/g de células de *M. elsdenii* son viables después de la liofilización.

En una realización, las al menos dos fuentes de carbono consisten en aproximadamente 50-90 % de una primera fuente de carbono y aproximadamente 10-50 % de una segunda fuente de carbono, en donde la segunda fuente de carbono es diferente de la primera fuente de carbono, y en donde el 100 % de las al menos dos fuentes de carbono consiste en la primera fuente de carbono y la segunda fuente de carbono.

En una realización, la extracción comprende al menos una técnica seleccionada del grupo que consiste en: centrifugación, filtración, diálisis, ósmosis inversa y combinaciones de los mismos, opcionalmente en donde la filtración comprende filtración de flujo tangencial, y/o en donde el cultivo comprende un líquido, y en donde la extracción comprende retirar aproximadamente del 60 % a aproximadamente el 100 % del líquido, en donde la extracción de las células en condiciones anaerobias ocurre antes de que el cultivo entre en la fase estacionaria y/o en donde la congelación es a una temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -210 °C.

En una realización, la congelación comprende poner en contacto un recipiente que comprende las células de *M. elsdenii* con nitrógeno líquido, y/o en donde la congelación comprende poner en contacto las células con nitrógeno líquido, y/o en donde la congelación es a una temperatura de aproximadamente -196 °C y produce sedimentos congelados que comprenden las células, y en donde el diámetro de los sedimentos congelados es aproximadamente 0,0254 mm (0,001 pulgadas) a aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas), y/o en donde el pH del cultivo de *M. elsdenii* antes de la extracción es entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 7,0.

En una realización, aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{12} UFC/g de las células de *M. elsdenii* liofilizadas son viables después del almacenamiento a una temperatura de aproximadamente 25 °C durante al menos 2 semanas, o en donde aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{12} UFC/g de las células de *M. elsdenii* liofilizadas son viables después del almacenamiento a aproximadamente 4 °C durante más de 1 mes.

En una realización, el al menos un crioprotector se proporciona presente en una cantidad de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 % (p/v) del cultivo.

En una realización, el volumen de cultivo líquido es al menos aproximadamente 50 litros.

En una realización, las células en el cultivo consisten en células de *M. elsdenii*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

La **FIG. 1** muestra el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de cultivos líquidos de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* durante un periodo de 28 días en términos de rendimiento de células de *M. elsdenii* en unidades formadoras de colonias por mililitro ("UFC/ml") en escala logarítmica ("log10").

La **FIG. 2** muestra la viabilidad de cultivos líquidos de NCIMB 41125 de *M. elsdenii* después de 0, 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento a temperatura ambiente en términos de rendimiento de células de *M. elsdenii* en UFC/ml en escala de log10.

La **FIG. 3** muestra un esquema de un sistema de filtración de flujo tangencial ("FFT").

La **FIG. 4** muestra el rendimiento de células de *M. elsdenii* en UFC/ml de concentrado en el eje y en escala de log10 después del procesamiento a través del sistema de FFT. El eje x indica una reducción de volumen del 70 %, 80 % o 90 % por el sistema. "Diana" se refiere a la recuperación teórica de células de *M. elsdenii* después del procesamiento de FFT. "Conc." se refiere a la recuperación real de células de *M. elsdenii* en el concentrado, que es el volumen de células concentradas que quedan después de las reducciones de volumen indicadas.

La **FIG. 5** muestra la pérdida de células tras la congelación de células a -80 °C o en nitrógeno líquido (NLiq) y la liofilización de células usando un ciclo lento (38 horas a 135 mTorr) o rápido (18,5 horas a 250 mTorr). Las células fueron de concentrados después del 70 %, 80 % o 90 % de reducción de volumen con FFT de cultivos que tienen 8 % de maltodextrina/15 % de leche desnatada (M/LD) u 8 % de trehalosa/15 % de leche desnatada (T/LD) como crioprotectores.

La **FIG. 6** muestra el rendimiento de células de NCIMB 41125 de *M. elsdenii* después de un ayuno inicial (nitrógeno líquido) o congelación lenta (-20 °C) seguido de liofilización (en presencia de 15 % de maltodextrina y 0 % o 7,5 % de trehalosa).

La **FIG. 7** muestra la pérdida de células observada en células de NCIMB 41125 de *M. elsdenii* congeladas con o sin 4 % de trehalosa o 7,5 % de leche desnatada a -80 °C o en nitrógeno líquido (NLiq).

La **FIG. 8** muestra la pérdida de células observada en muestras liofilizadas obtenidas del concentrado de 90 % de reducción de volumen, mezcladas con 8 % de trehalosa/15 % de leche desnatada (T/LD) u 8 % de maltodextrina/15 % de leche desnatada (M/LD), congeladas a -80 °C o en nitrógeno líquido (NLiq), y liofilizadas usando el ciclo rápido y conservadas a temperatura ambiente o 4 °C en condiciones anaerobias durante hasta 24 semanas.

La **FIG. 9** muestra la pérdida de células observada en muestras liofilizadas obtenidas del concentrado de 90 % de reducción de volumen, mezcladas con 8 % de trehalosa/15 % de leche desnatada (T/LD) u 8 % de maltodextrina/15 % de leche desnatada (M/LD), congeladas a -80 °C o en nitrógeno líquido (NLiq), y liofilizadas usando el ciclo rápido y conservadas a temperatura ambiente o 4 °C en condiciones anaerobias durante 24 semanas. Las barras sin un superíndice común son estadísticamente diferentes, $P < 0,02$.

La **FIG. 10** muestra curvas de crecimiento realizadas en producto no liofilizado o liofilizado rehidratado obtenido del concentrado de 90 % de reducción de volumen, mezcladas con 8 % de trehalosa/15 % de leche desnatada (T/LD) u 8 % de maltodextrina/15 % de leche desnatada (M/LD), congeladas en nitrógeno líquido (NLiq) y liofilizadas usando el ciclo rápido después de 12, 16, 20 o 24 semanas de almacenamiento en condiciones anaerobias a 4 o 25 °C. La densidad óptica (DO) se muestra a 600 nanómetros (nm) como se mide desde 0 horas hasta 20 horas. Líneas amarillas = no liofilizado, líneas rojas = T/LD, líneas azules = M/LD, líneas de puntos = conservadas a 4 °C y líneas sólidas = conservadas a 25 °C.

La **FIG. 11** muestra *M. elsdenii* en UFC por gramo ("UFC/g") en escala de log10 de viales liofilizados conservados a 4 °C durante hasta 11 meses. Cada punto de datos corresponde al rendimiento promedio de 3 viales de 2 series de liofilización diferentes (6 viales en total).

La **FIG. 12** muestra la concentración de *M. elsdenii* (UFC/cabeza/día) en producto liofilizado administrado diariamente como un tratamiento de cobertura (es decir, un tratamiento añadido a un pienso animal mezclando el tratamiento en el pienso o poniendo el tratamiento encima del pienso). La semana de muestreo se muestra en el eje x, efecto de muestreo, $P < 0,0001$. La línea horizontal sólida representa la concentración diana de *M. elsdenii* (UFC/cabeza/día) a administrar diariamente.

La **FIG. 13** muestra la concentración de *M. elsdenii* en maíz molido cubierto con producto liofilizado y expuesto durante 0 a 4 horas a condiciones atmosféricas en el laboratorio a temperatura ambiente sin exposición directa al sol (dentro) o fuera a temperaturas diarias promedio de hasta 95 °F con exposición directa al sol (fuera). Efecto combinado del tiempo de exposición y las condiciones de almacenamiento, $P = 0,0007$; efecto del tiempo de exposición, $P < 0,0001$; efecto de las condiciones de almacenamiento, $P < 0,0001$.

La **FIG. 14** muestra la concentración de endotoxinas (UE/ml) en muestras de líquido del rumen (medido como un indicador de la lisis bacteriana en el rumen) obtenidas 26 horas después de la primera alimentación para cada grupo: Grupo de control (no recibió *M. elsdenii*), grupo no liofilizado (recibió 50 ml de cultivo líquido de *M. elsdenii* que contiene 10^{10} UFC de *M. elsdenii*), grupo rehidratado (recibió cultivo liofilizado que se rehidrató inmediatamente antes de la administración, que contiene 10^{10} UFC de *M. elsdenii*) y grupo de cobertura (recibió cultivo liofilizado que se rehidrató inmediatamente antes de la administración, que contiene 10^{10} UFC de *M. elsdenii*, y también recibió producto de *M. elsdenii* liofilizado incorporado como una cobertura que contiene 10^8 UFC de *M. elsdenii*). Efecto de tratamiento, $P = 0,3462$.

La **FIG. 15** muestra el pH ruminal medido en intervalos de 1 hora para cada grupo: Grupo de control (no recibió *M. elsdenii*), grupo no liofilizado (recibió 50 ml de cultivo líquido de *M. elsdenii* que contenía 10^{10} UFC de *M. elsdenii*), grupo rehidratado (recibió cultivo liofilizado que se rehidrató inmediatamente antes de la administración, que contenía 10^{10} UFC de *M. elsdenii*) y grupo de cobertura (recibió cultivo liofilizado que se rehidrató inmediatamente antes de la administración, que contenía 10^{10} UFC de *M. elsdenii*, y recibió producto de *M. elsdenii* liofilizado incorporado como una cobertura diaria que contenía 10^8 UFC de *M. elsdenii*). Efecto combinado del tratamiento y el día, $P < 0,001$, efecto del tratamiento, $P < 0,001$, efecto del día, $P < 0,001$. Error estándar de la media (EEM) = 0,041.

La **FIG. 16** muestra los cambios en la densidad óptica a 600 nm de un medio de lactato semidefinido inoculado con líquido ruminal para cada grupo: Grupo de control (no recibió *M. elsdenii*), grupo no liofilizado (recibió 50 ml de cultivo líquido de *M. elsdenii* que contenía 10^{10} UFC de *M. elsdenii*), grupo rehidratado (recibió cultivo liofilizado que se rehidrató inmediatamente antes de la administración, que contenía 10^{10} UFC de *M. elsdenii*) y grupo de cobertura (recibió cultivo liofilizado que se rehidrató inmediatamente antes de la administración, que contenía 10^{10} UFC de *M. elsdenii*, y también recibió producto de *M. elsdenii* liofilizado incorporado como un abonado en cobertura diario que contenía 10^8 UFC de *M. elsdenii*). Efecto combinado del tratamiento y el tiempo, $P < 0,02$; efecto del tratamiento, $P < 0,01$; efecto del tiempo, $P < 0,01$. EEM = 0,04.

La **FIG. 17** muestra los cambios en la concentración de L-lactato (mM) de un medio de lactato semidefinido inoculado con microbios ruminales mixtos para cada grupo: Grupo de control (no recibió *M. elsdenii*), grupo no liofilizado (recibió 50 ml de cultivo líquido de *M. elsdenii* que contenía 10^{10} UFC de *M. elsdenii*), grupo rehidratado (recibió cultivo liofilizado que se rehidrató inmediatamente antes de la administración, que contenía 10^{10} UFC de *M. elsdenii*) y grupo de cobertura (recibió cultivo liofilizado que se rehidrató inmediatamente antes de la administración, que contenía 10^{10} UFC de *M. elsdenii*, y también recibió producto liofilizado de *M. elsdenii* incorporado como una cobertura que contenía 10^8 UFC de *M. elsdenii*). ^{a,b,c} barras con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes entre sí, $P < 0,05$.

La **FIG. 18** muestra la actividad de fitasa en células de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii*. El eje x muestra de células tomadas de cultivos de células de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* desde el inicio del cultivo ("0" horas) y en intervalos de 2 horas a partir de aquí, es decir, "2", "4", "6" y "8" horas después del inicio del cultivo. La actividad de fitasa se muestra en el eje y como la cantidad de fósforo inorgánico liberado de los sedimentos de células de las muestras en micromoles por minuto (" μ moles de P liberado/min"). La actividad de fitasa en células cultivadas en medios que contienen fosfato inorgánico (KH_2PO_4) se muestra en gris claro, mientras que la actividad de fitasa en células cultivadas en medios que contiene fitasa se muestra en gris oscuro.

La **FIG. 19** muestra el efecto de *Megasphaera elsdenii* en la concentración de *Salmonella* en muestras cecales de pollitos de engorde de 15 días. El eje x indica el tratamiento sin *Megasphaera elsdenii* ("Control"), acceso libre a voluntad a bebederos que contienen *Megasphaera elsdenii* líquido ("A voluntad"), *Megasphaera elsdenii* liofilizado diario ("Liofilizado"), o una sonda nasogástrica oral de *Megasphaera elsdenii* líquido en el día 0. El eje y indica la concentración de *Salmonella* en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) en la escala de log10 para los grupos de tratamiento.

La **FIG. 20** muestra la prevalencia de *Salmonella* en muestras cecales de pollitos de engorde de 15 días. El eje x muestra los grupos de tratamiento. El eje y indica el porcentaje de muestras cecales que fueron positivas para *Salmonella*.

La **FIG. 21** muestra la relación entre la relación entre pienso y aumento de peso (eje y) en pollitos de engorde de 18 días no tratados con *Megasphaera* ("Control") o tratados con *Megasphaera elsdenii* liofilizado ("Liofilizado"). La relación entre pienso y aumento de peso es una relación entre el pienso total consumido y el peso total ganado.

La **FIG. 22** muestra el pH en muestras cecales de caballos no tratados con *Megasphaera elsdenii* ("Control"), una poción oral de *Megasphaera elsdenii* ("Poción") en el día 1 de cada periodo de 7 días de tratamiento, o *Megasphaera elsdenii* liofilizado diario ("Liofilizado").

La **FIG. 23** muestra el crecimiento de cepas de *M. elsdenii* (NCIMB 41125, ATCC 25940, NCIMB 702261, NCIMB 702262 y NCIMB 702410) en medios semidefinidos que contienen 70 % de lactato y 30 % de glucosa.

La **FIG. 24** muestra el crecimiento de cepas de *M. elsdenii* (NCIMB 41125, ATCC 25940, NCIMB 702261, NCIMB 702262 y NCIMB 702410) en medios semidefinidos que contienen 60 % de lactato y 40 % de glucosa.

La **FIG. 25** muestra el crecimiento de cepas de *M. elsdenii* (NCIMB 41125, ATCC 25940, NCIMB 702261, NCIMB 702262 y NCIMB 702410) en medios semidefinidos que contienen 40 % de lactato y 60 % de glucosa.

La **FIG. 26** muestra la estabilidad de *M. elsdenii* liofilizado encapsulado usando el método 2 y conservado a temperatura ambiente en un entorno aerobio.

La **FIG. 27** muestra la estabilidad de liofilizado *M. elsdenii* encapsulado usando el método 3 y conservado a temperatura ambiente en un entorno aerobio.

La **FIG. 28** muestra la concentración de NCIMB 41125 de *M. elsdenii* (log10 UFC/bolsa) en producto liofilizado conservado en una bolsa de Mylar con (M.e. + maltodextrina) o sin maltodextrina (M.e.) a 40 o 75 °F.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a células de *Megasphaera elsdenii*, a métodos de producción de células de *M. elsdenii*, a aditivos para piensos y a composiciones que comprenden las células, y a usos que implican la administración de las células a animales, que incluyen, por ejemplo, para mejorar el rendimiento del crecimiento y/o la salud, como se muestra en las reivindicaciones adjuntas.

Terminología

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente solicitud que incluye las definiciones. A menos que se requiera de otro modo por el contexto, términos en singular deben incluir pluralidades y términos en plural deben incluir el singular.

En la medida en que se utilicen encabezamientos de sección, no se deben interpretar como necesariamente limitativos.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, que incluye mezclas de los mismos. Los términos "un", "una", "el", "la", "uno o más" y "al menos uno", por ejemplo, se pueden usar indistintamente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se usa para modificar una cantidad relacionada con la invención, se refiere a la variación en la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, mediante pruebas rutinarias y manipulación; mediante error involuntario en dichas pruebas y manipulación; mediante diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes empleados en la invención; y similares. Si se modifica o no por el término "aproximadamente", las reivindicaciones incluyen equivalentes de las cantidades citadas. En algunas realizaciones, el término "aproximadamente" significa más o menos el 10 % del valor numérico informado.

En toda la presente solicitud, diversas realizaciones de la presente invención se pueden presentar en un formato de intervalo. Se debe entender que la descripción en el formato de intervalo es simplemente por comodidad y brevedad y no se debe interpretar como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los posibles subintervalos, así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo, tal como desde 1 hasta 6, ha desvelado específicamente subintervalos, tales como desde 1 hasta 2, desde 1 hasta 3, desde 1 hasta 4, desde 1 hasta 5, desde 2 hasta 3, desde 2 hasta 4, desde 2 hasta 5, desde 2 hasta 6, desde 3 hasta 4, desde 3 hasta 5, desde 3 hasta 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la anchura del intervalo.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados son intercambiables y significan "que incluye, pero no se limita a". Se entiende que donde se describen aspectos en el presente documento con el vocabulario "que comprende", también se proporcionan otros aspectos análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

El término "que consiste en" significa "que incluye y limitado a".

El término "que consiste esencialmente en" significa el material especificado de una composición, o las etapas especificadas de un método, y los materiales o etapas adicionales que afectan materialmente las características básicas del material o método.

El término "y/o" donde se usa en el presente documento se debe considerar como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por lo tanto, el término "y/o", como se usa en una frase, tal como "A y/o B" en el presente documento, pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Asimismo, el término "y/o" como se usa en una frase, tal como "A, B y/o C", pretende englobar cada uno de los siguientes aspectos: A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Los términos "cultivo", "para cultivar" y "cultivar", como se usan en el presente documento, significan incubar las células en condiciones *in vitro* que permiten el crecimiento o división celular o mantener células en un estado vivo. El término "un cultivo" también se puede usar en el presente documento para referirse a células incubadas en condiciones *in vitro* (por ejemplo, células incubadas en un medio de crecimiento líquido).

El término "probiótico", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más microorganismos vivos (bacterias y/o levadura) y puede o puede no incluir otros ingredientes, que cuando se administran en cantidades adecuadas, pueden conferir un beneficio a la salud, digestivo y/o al rendimiento en el animal o sujeto.

El término "producto microbiano de alimentación directa", como se usa en el presente documento, se refiere a un producto que contiene uno o más microorganismos vivos (bacterias y/o levadura) y puede o puede no incluir otros ingredientes, que se pueden administrar al animal o sujeto en mezclas de piensos, bolos y/o pastas orales, y cuando se administran en cantidades adecuadas puede conferir beneficio a la salud en el animal o sujeto.

El término "aditivo para piensos", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más ingredientes, productos o sustancias (por ejemplo, células), usados solos o juntos, en nutrición (por ejemplo, para mejorar la calidad de un alimento (por ejemplo, un pienso para animales), para mejorar el rendimiento de un animal y la salud, y/o para

potenciar la digestibilidad de un alimento o materiales dentro de un alimento. Un aditivo para piensos puede ser, por ejemplo, un probiótico.

5 Los términos "medio de crecimiento" y "medio de cultivo", como se usan en el presente documento, se refieren a una composición sólida (por ejemplo, agar), semisólida (por ejemplo, agar) o líquida (por ejemplo, caldo) que contiene componentes para soportar el crecimiento de células.

10 Los términos "extracción" y "extraer", como se usan en el presente documento, se refieren a la recogida de células de un cultivo, por ejemplo, recoger células en medios de crecimiento del cultivo, recoger células retirando una cantidad de los medios de crecimiento de las células (por ejemplo, concentrando las células en un cultivo líquido o separando las células del medio de crecimiento), o deteniendo el cultivo de las células. Los términos incluyen recoger o retirar un volumen de líquido que comprende las células de un cultivo líquido, que incluye un volumen en el que se han concentrado las células.

15 El término "aislado", como se usa en el presente documento, no refleja necesariamente el grado al que se ha purificado un aislado, sino que indica el aislamiento o la separación de una forma nativa o entorno nativo. Un aislado puede incluir, pero no se limita a, un microorganismo aislado, una biomasa aislada o un cultivo aislado.

20 El término "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que logra un resultado deseado.

25 Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad clínicamente eficaz" se refiere a una cantidad, que logra un resultado terapéutico deseado, que incluye, por ejemplo, una cantidad si se usa sola o en combinación con otros componentes. Un resultado terapéutico puede ser, por ejemplo, reducción de los síntomas, prolongación de la supervivencia, mejora de la movilidad, y similares. Un resultado terapéutico no necesitar ser una "cura".

30 Como se usa en el presente documento, "excipiente" se refiere a un componente, o mezcla de componentes, que se usa para proporcionar características deseables a un aditivo para piensos, alimento, o composición como se desvela en el presente documento. Un excipiente de la presente invención se puede describir como un excipiente "farmacéuticamente aceptable" cuando se añade a una composición farmacéutica, lo que significa que el excipiente es un compuesto, material, composición, sal y/o forma farmacéutica que es, dentro del alcance de criterio médico sensato, adecuado para entrar en contacto con los tejidos de animales (es decir, seres humanos y animales no humanos) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otras complicaciones problemáticas con respecto a la duración deseada del contacto proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

40 Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico y las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) una condición fisiológica no deseada, enfermedad, o trastorno, como a la obtención de resultados beneficiosos o fisiológicos deseadas (por ejemplo, resultados clínicos, médicos y/o veterinarios). Para los fines de la presente invención, resultados beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio o eliminación de los síntomas o signos asociados a una afección, enfermedad o trastorno; reducción del grado de una afección, enfermedad o trastorno; estabilización de una afección, enfermedad o trastorno (es decir, donde la afección, enfermedad o trastorno no empeora); retraso en la aparición o progresión de la afección, enfermedad o trastorno; mejora de la afección, enfermedad o trastorno; remisión (tanto parcial como total y tanto detectable como indetectable) de la afección, enfermedad o trastorno; o refuerzo o mejora de una afección, enfermedad o trastorno. El tratamiento incluye provocar una respuesta fisiológicamente significativa sin excesivos efectos secundarios. El tratamiento también incluye prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento.

50 Como se usa en el presente documento, los términos "previenen" y "prevenir" se refieren a retrasar parcial o completamente la aparición de una infección, enfermedad, trastorno y/o afección; retrasar parcial o completamente la aparición de uno o más signos, síntomas, características o manifestaciones (por ejemplo, signos, síntomas, características o manifestaciones clínicas o fisiológicas) de una infección, enfermedad, trastorno y/o afección particular; retrasar parcial o completamente la progresión de una infección, una enfermedad, trastorno y/o afección particular; y/o disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada a la infección, la enfermedad, el trastorno y/o la afección.

60 Como se usa en el presente documento, el término "rendimiento" se refiere a la cantidad de células vivas, o viables, que incluye la cantidad en un volumen particular (por ejemplo, unidades formadoras de colonias por mililitro ("UFC/ml")) o en un peso particular (por ejemplo, UFC por gramo ("UFC/g")).

65 Como se usa en el presente documento, el término "viable" se refiere a un organismo u organismos vivos (por ejemplo, una célula microbiana que está viva o células microbianas que están vivas). "Viabilidad" se refiere a la capacidad de vivir, especialmente en ciertas condiciones.

Como se usa en el presente documento, "purificar", "purificado" y "purificación" significa hacer sustancialmente puro o claro de componentes no deseados, contaminación de material, mezcla o imperfección.

Los términos "invención" y "divulgación" se pueden usar indistintamente cuando se describen o usan, por ejemplo, en las expresiones "la presente invención" o "la presente divulgación".

Los términos "animal" o "sujeto" se refieren a cualquier organismo que pertenezca al reino Animalia e incluye, sin limitación, animales acuáticos y animales terrestres, tales como peces; peces comerciales; peces ornamentales; larvas de peces; bivalvos; moluscos; crustáceas; marisco; camarones; larvas de camarón; artemia; rotíferos; camarón de salmuera; alimentadores filtradores; anfibios; reptiles; mamíferos; humanos; animales no humanos; animales domésticos; animales de granja; animales de zoológico; animales de deporte; reproductores; animales de carreras; animales de exhibición; animales clásicos; animales raros o en peligro de extinción; animales de compañía; mascotas, tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones o caballos; primates como monos (por ejemplo, cebus, de la India, verdes africanos, patas, cangrejeros y cercopitecos), simios, orangutanes, babuinos, gibones y chimpancés; cánidos, tales como perros y lobos; félidos, tales como gatos, leones y tigres; équidos, tales como caballos, ponis, burros, mulas y cebras; animales de producción, tales como vacas, búfalos, bóvidos, cerdos, aves de corral y ovejas; ungulados, tales como ciervos y jirafas; aviares (es decir, aves); aves de corral como pollos, gansos, patos, codornices, pavos, palomas, emús, avestruces y cualquier otra ave usada como alimento de producción o de granja, incluidos los pollos de engorde, las reproductoras de pollos de engorde y las ponedoras; roedores, tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; etc. Un pienso para animales incluye, pero no se limita a, un pienso para acuicultura, un pienso para animales domésticos, incluido un pienso para mascotas, un pienso para animales de zoológico, un pienso para animales de trabajo, un pienso para ganado y combinaciones de los mismos. Un alimento incluye pienso para animales y alimentos para humanos.

Megasphaera elsdenii

En la invención descrita en el presente documento se pueden usar células de *Megasphaera elsdenii* de cualquier cepa o cualquier combinación de cepas.

Se pueden seleccionar cepa o cepas de *M. elsdenii* de una colección de cultivos madre (por ejemplo, Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC®"), Colección Nacional de Bacterias Industriales, Alimentarias y Marinas ("NCIMB"), Colección Nacional de Cultivos Tipo ("NCTC"), colección de cultivos del Servicio Estadounidense para Investigación ("ARC") (es decir, "NRRL"), colección de cultivos del Instituto Nacional de Salud Animal (NIAH)), o puede ser una cepa que ha sido aislada de una fuente natural (por ejemplo, del tubo gastrointestinal de un rumiante).

Ejemplos de cepas de *M. elsdenii* que se pueden seleccionar de una colección de cultivos incluyen, pero no se limitan a, las cepas listadas por los números de depósito en la **Tabla 1**. También se indican designaciones alternativas de los números de depósito.

Tabla 1. Ejemplos de cepas de *M. elsdenii* y fuente de cada cepa.

Número de depósito	Designaciones alternativas	Fuente de la cepa
ATCC® 25940	NCIMB 8927; BE2-2083	Rumen de oveja
ATCC® 17752	B159; NCIMB 702409; NCDO2409	N/A
ATCC® 17753	T81; NCIMB 702410; NCDO2410	N/A
NCIMB 702261	A17-2; A12-2; NCDO2261	Heces adultas humanas
NCIMB 702262	S17-3; NCDO2262	Heces de cerdo joven
NCIMB 702264	LC1	N/A
NCIMB 702331	LC1; NCDO2263; NCDO2264; NCDO2331;	N/A
NCIMB 41125		Rumen de vaca lechera
NCIMB 41787		Rumen de vaca lechera
NCIMB 41788		Rumen de vaca lechera
NRRL 18624		Rumen de bovino
NIAH 1102		N/A

En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* son de una cepa que tiene un número de depósito seleccionado del grupo que consiste en: ATCC® 25940, ATCC® 17752, ATCC® 17753, NCIMB 702261, NCIMB 702262,

NCIMB 702264, NCIMB 702331, NCIMB 702409, NCIMB 702410, NCIMB 41125, NCIMB 41787, NCIMB 41788, NRRL 18624, NIAH 1102, y combinaciones de los mismos, que incluyen cualquiera de las designaciones alternativas en la Tabla 1.

5 En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* son una cepa aislada de un rumiante (por ejemplo, una vaca). Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.550.139.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* son de una cepa aislada de un no rumiante (por ejemplo, un humano).

10 En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* son de una cepa seleccionada para la utilización de lactato (por ejemplo, una cepa que utiliza lactato en presencia de azúcares), resistencia a antibióticos ionóforos, tasa de crecimiento relativamente alta, capacidad para producir predominantemente acetato, capacidad para proliferar a valores de pH inferior a 5,0 y de tan solo 4,5, producción de ácidos grasos volátiles (AGV), actividad de fitasa y combinaciones de los mismos. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.550.139.

15 En algunas realizaciones de la divulgación, una cepa seleccionada para la utilización de lactato utiliza lactato como fuente de carbono preferida en presencia de un hidrato de carbono soluble (por ejemplo, glucosa y/o maltosa). La utilización de lactato se puede determinar, por ejemplo, basándose en el crecimiento en un medio que contiene lactato y que carece de hidratos de carbono solubles en comparación con el mismo medio complementado con hidratos de carbono solubles.

20 En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* son de una cepa con una elevada tasa de crecimiento en comparación con otras cepas. Las tasas de crecimiento de diferentes cepas se pueden determinar, por ejemplo, cultivando las células en un medio líquido y monitorizando el aumento en la densidad óptica con el tiempo.

25 En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* son de una cepa capaz de producir AGV, que se pueden determinar, por ejemplo, por cromatografía de gases. En algunas realizaciones de la divulgación, el AGV es un ácido graso de 6 carbonos que es capaz de inhibir el crecimiento de *Salmonella* y/o *Campylobacter*. En algunas realizaciones de la divulgación, el AGV es ácido caproico. En algunas realizaciones de la divulgación, la *Salmonella* es *Salmonella enterica* y/o *Salmonella bongori*. En algunas realizaciones de la divulgación, el serotipo de la *Salmonella* es *Salmonella typhimurium* y/o *entitidis*. En algunas realizaciones de la divulgación, el *Campylobacter* es *Campylobacter jejuni* o *Campylobacter coli*.

35 En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* son de una cepa con actividad de fitasa.

40 En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* son de la cepa NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii*. Esta cepa de *Megasphaera elsdenii* tiene una elevada tasa de crecimiento específico (0,94 generaciones/hora), es capaz de crecer en un intervalo de pH de 4,5 a 6,5 o más, usa D- y L-lactato como su sustrato preferido, pero también tiene la capacidad de utilizar glucosa y otros hidratos de carbono, y tolera ionóforos.

45 En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* son de la cepa NCIMB 41787 de *Megasphaera elsdenii*. En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* son de la cepa NCIMB 41788 de *Megasphaera elsdenii*.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* son de la cepa ATCC® 25940 de *Megasphaera elsdenii*.

50 En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* derivan de una cepa seleccionada de una colección de cultivos madre o aislada de una fuente natural. Las células que "derivan" de una cepa pueden ser un derivado natural o artificial tal como, por ejemplo, un subaislado, un mutante, variante, o cepa recombinante.

Preparación de un cultivo que comprende células anaerobias, aerobias y/o de levadura

55 *M. elsdenii* es una bacteria anaerobia que se debe cultivar en condiciones anaerobias rigurosas para obtener el máximo rendimiento y viabilidad.

En algunas realizaciones, un cultivo comprende células de *M. elsdenii* y un medio de crecimiento.

60 En algunas realizaciones, el cultivo comprende una o más cepas de células de *M. elsdenii*. En algunas realizaciones, el cultivo comprende una única cepa de células de *M. elsdenii*. En algunas realizaciones, el cultivo consiste en una o más cepas de células de *M. elsdenii* (es decir, las células en el cultivo consisten en células de *M. elsdenii*, por ejemplo, una o más cepas de células de *M. elsdenii*). En algunas realizaciones, el cultivo consiste en una única cepa de células de *M. elsdenii*.

65 En algunas realizaciones de la divulgación, un cultivo comprende células de *Megasphaera* y un medio de crecimiento.

En algunas realizaciones de la divulgación, un cultivo comprende células bacterianas anaerobias y un medio de crecimiento. En algunas realizaciones de la divulgación, el cultivo comprende células de *Bifidobacterium*, tales como *B. breve*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. plantarum*, células de *Bifidobacterium*, tales como *B. animalis* subsp. *lactis*, células de *Pediococcus*, tales como *P. acidilactici*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. casei* y un medio de crecimiento.

En algunas realizaciones de la divulgación, un cultivo comprende células bacterianas aerobias y un medio de crecimiento. En algunas realizaciones de la divulgación, un cultivo comprende células de *Bacillus*, tales como *B. subtilis* y un medio de crecimiento.

En algunas realizaciones de la divulgación, un cultivo comprende células de levadura y un medio de crecimiento. En algunas realizaciones de la divulgación, un cultivo comprende células de *Saccharomyces*, tales como *S. boulardii* y *S. cerevisiae*.

Se pueden usar diversos parámetros de fermentación para inocular, cultivar y extraer células microbianas, que incluyen la fermentación continua (es decir, cultivo continuo) o la fermentación discontinua (es decir, cultivo discontinuo). Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.550.139.

Los medios de crecimiento para las células microbianas pueden ser un sólido, semisólido o líquido. Un medio puede contener nutrientes que proporcionan elementos esenciales y factores específicos que permiten el crecimiento. Se conocen bien en la técnica una variedad de medios y variaciones microbiológicos. Los medios se pueden añadir a un cultivo en cualquier momento, que incluye al comienzo del cultivo, durante el cultivo, o intermitentemente/continuamente.

Ejemplos de medios de crecimiento incluyen, pero no se limitan a: (1) medios semidefinidos, que contienen peptona, 3 g/l; levadura, 3 g/l; disolución de vitamina, 2 ml/l; disolución de minerales, 25 ml/l; carmín de índigo (0,5 %), 1 g/l; 12,5 % de L-cisteína, 2 g/l; 12,5 % de sulfuro de sodio, 2 g/l; y complementado con cualquiera de lactato de Na (lactato semidefinido, SDL), glucosa (glucosa semidefinida, SDG) o maltosa (maltosa semidefinida, SDM); (2) medio de agar clostridial reforzado modificado/caldo (prerreducido), que contiene peptona, 10 g/l; extracto bovino, 10 g/l; extracto de levadura, 3 g/l; dextrosa 5 g/l; NaCl, 5 g/l; almidón soluble, 1 g/l; HCl de L-cisteína, 0,5 g/l; acetato sódico, 3 g/l; y resazurina (0,025 %), 4 ml/l; (3) agar con triptona y soja/caldo con sangre ovina desfibrinada; (4) medio semidefinido sin líquido de rumen, que contiene lactato de Na (70 %), 10 g/l; peptona, 2 g/l; KH_2PO_4 1 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,06 g/l; vitaminas (clorhidrato de piridoxol, 4 mg/l; piridoxamina, 4 mg/l; riboflavina, 4 mg/l; cloruro de tiaminio, 4 mg/l; nicotinamida, 4 mg/l; D-pantotenato de Ca, 4 mg/l; ácido 4-aminobenzoico, 0,2 mg/l, biotina, 0,2 mg/l, ácido fólico, 0,1 mg/l y cianocobalamina, 0,02 mg/l); $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/l; cisteína, 0,25 g/l; antiespumante, 0,07 ml/l y monensina, 10 mg/l; y que se prepara añadiendo el lactato de Na y la disolución de minerales a un frasco de reserva y esterilizando en autoclave durante 60 minutos; disolviendo la peptona en 300 ml de H_2O destilada y esterilizando en autoclave por separado; esterilización en filtro de la disolución de vitamina y dos agentes reductores de antemano; tras la esterilización en autoclave, gasificar el frasco de reserva con gas anaerobio durante la noche; añadir los otros constituyentes por separado después del enfriamiento; y ajustar el pH al valor deseado con HCl 5 N; y (5) incubar el medio de lactato de líquido del rumen ("IRFL"), que contiene 400 ml de líquido del rumen clarificado e incubado de ovejas alimentadas con alfalfa, 371 ml de agua destilada, 2 g de peptona, 15 g de agar, 100 ml de disolución al 10 % (p/v) de D,L-lactato de sodio, 100 ml de disolución al 0,04 % (p/v) de púrpura de bromocresol y 25 ml de disolución de minerales que contiene 40 g/l de KH_2PO_4 ; 120 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 8 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 2,4 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, donde se usa ácido láctico (90 % p/v) para ajustar el pH a 5,5 antes de esterilizar en autoclave a 121 °C durante 25 minutos, a continuación se enfría en un baño de agua a 50 °C mientras se gasifica con una mezcla de gases anaerobia, seguido de la adición de dos mililitros de cada uno de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (12,5 % p/v) y cisteína.HCl.H₂O (12,5 % p/v).

En algunas realizaciones de la divulgación, el cultivo comprende un medio de crecimiento que comprende al menos una fuente de carbono. En algunas realizaciones de la divulgación, la al menos una fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en: caseína, almidón (por ejemplo, almidón gelatinizado y/o almidón soluble), lactato (es decir, ácido láctico), dextrosa, fructosa, fructano, glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, acetato, glicerol, manitol, sorbitol, sacarosa, xilosa, melaza, fucosa, glucosamina, dextrano, una grasa, un aceite, glicerol, acetato sódico, arabinosa, proteína de soja, proteína soluble, rafinosa, amilosa, almidón, triptona, extracto de levadura y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones de la divulgación, el cultivo comprende un medio de crecimiento que comprende al menos dos fuentes de carbono. En algunas realizaciones, las al menos dos fuentes de carbono se seleccionan del grupo que consiste en: caseína, almidón (por ejemplo, almidón gelatinizado y/o almidón soluble), lactato (es decir, ácido láctico), dextrosa, fructosa, fructano, glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, acetato, glicerol, manitol, sorbitol, sacarosa, xilosa, melaza, fucosa, glucosamina, dextrano, una grasa, un aceite, glicerol, acetato sódico, arabinosa, proteína de soja, proteína soluble, rafinosa, amilosa, almidón, triptona, extracto de levadura y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones de la divulgación, las al menos dos fuentes de carbono consisten en aproximadamente el 1-99 % de una primera fuente de carbono (por ejemplo, cualquier fuente de carbono descrita en el presente documento) y aproximadamente 1-99 % de una segunda fuente de carbono (por ejemplo, cualquier fuente de carbono descrita en el presente documento que es diferente de la primera fuente de carbono), en donde el 100 % de las al menos dos fuentes de carbono consisten en la primera fuente de carbono y la segunda fuente de carbono. En algunas realizaciones, las al menos dos fuentes de carbono consisten en aproximadamente el 50-60 % de la primera fuente de carbono y aproximadamente el 40-50 % de la segunda fuente de carbono, aproximadamente el 50-70 % de la primera fuente de carbono y aproximadamente el 30-50 % de la segunda fuente de carbono, aproximadamente el 50-80 % de la primera fuente de carbono y aproximadamente el 20-50 % de la segunda fuente de carbono, o aproximadamente el 50-90 % de la primera fuente de carbono y aproximadamente el 10-50 % de la segunda fuente de carbono. En otras realizaciones, las al menos dos fuentes de carbono consisten en aproximadamente el 65-75 % de la primera fuente de carbono y aproximadamente el 25-35 % de la segunda fuente de carbono. En algunas realizaciones, la primera fuente de carbono es lactato.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* se cultivan a aproximadamente 39 °C a aproximadamente 40 °C, at aproximadamente 35 °C, a aproximadamente 36 °C, a aproximadamente 37 °C, a aproximadamente 38 °C, a aproximadamente 39 °C, o a aproximadamente 40 °C.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células microbianas se cultivan a aproximadamente 15 °C a aproximadamente 45 °C, a aproximadamente 20 °C a 40 °C, 25 °C a 35 °C, 30 °C a 39 °C. En algunas realizaciones de la divulgación, las células microbianas se cultivan a aproximadamente 30 °C, aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, at aproximadamente 36 °C, a aproximadamente 37 °C, a aproximadamente 38 °C, a aproximadamente 39 °C, o a aproximadamente 40 °C.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células microbianas se enfrían a aproximadamente 18 °C a aproximadamente 25 °C para el almacenamiento.

En algunas realizaciones de la divulgación, el pH del cultivo que comprende las células de *M. elsdenii* (por ejemplo, durante el cultivo y/o en el momento de la extracción) es entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,0, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,5, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,0, entre aproximadamente 4,6 y aproximadamente 6,9, entre aproximadamente 4,7 y aproximadamente 6,8, entre aproximadamente 4,8 y aproximadamente 6,7, entre aproximadamente 4,9 y aproximadamente 6,6, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,5, entre aproximadamente 5,1 y aproximadamente 6,9, entre aproximadamente 5,2 y aproximadamente 6,8, entre aproximadamente 5,3 y aproximadamente 6,7, entre aproximadamente 5,4 y aproximadamente 6,6, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 5,1 y aproximadamente 6,4, entre aproximadamente 5,2 y aproximadamente 6,3, entre aproximadamente 5,3 y aproximadamente 6,2, entre aproximadamente 5,4 y aproximadamente 6,1, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,1, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,2, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,3, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,4, entre aproximadamente 5,1 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 5,2 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 5,3 y aproximadamente 6,5, o entre aproximadamente 5,4 y aproximadamente 6,5.

En algunas realizaciones de la divulgación, el pH del cultivo que comprende las células microbianas (por ejemplo, durante el cultivo y/o en el momento de la extracción) es entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 9,0, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 8,5, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0.

Para cultivar las células microbianas, se pueden usar fermentadores de diferentes tamaños y diseños que mantienen las condiciones anaerobias. Un fermentador puede ser capaz, por ejemplo, de fermentar volúmenes de cultivo suficientes para la producción comercial de células de *M. elsdenii*. En algunas realizaciones de la divulgación, el volumen de cultivo es aproximadamente 2 litros, aproximadamente 10 litros, aproximadamente 50 litros, aproximadamente 100 litros, aproximadamente 150 litros, aproximadamente 200 litros, aproximadamente 250 litros, aproximadamente 300 litros, aproximadamente 350 litros, aproximadamente 400 litros, aproximadamente 450 litros, aproximadamente 500 litros, aproximadamente 600 litros, aproximadamente 800 litros, aproximadamente 1.000 litros, aproximadamente 1.200 litros, aproximadamente 1.500 litros, aproximadamente 1.800 litros, aproximadamente 2.000 litros, aproximadamente 2.200 litros, aproximadamente 2.500 litros, aproximadamente 2.750 litros, aproximadamente 3.000 litros, aproximadamente 4.000 litros, aproximadamente 5.000 litros, aproximadamente 6.000 litros, aproximadamente 7.000 litros, aproximadamente 8.000 litros, aproximadamente 9.000 litros, aproximadamente 10.000 litros, al menos aproximadamente 20.000 litros, al menos aproximadamente 50.000 litros, o al menos aproximadamente 75.000 litros. En algunas realizaciones de la divulgación, el volumen de fermentación es aproximadamente 2 litros a aproximadamente 75.000 litros, aproximadamente 250 litros a aproximadamente 750 litros,

aproximadamente 300 litros a aproximadamente 800 litros, aproximadamente 350 litros a aproximadamente 850 litros, aproximadamente 400 litros a aproximadamente 900 litros, aproximadamente 450 litros a aproximadamente 950 litros, aproximadamente 500 litros a aproximadamente 1.000 litros, aproximadamente 750 litros a aproximadamente 1.250 litros, aproximadamente 1.000 litros a aproximadamente 2.000 litros, aproximadamente 2.000 litros a aproximadamente 4.000 litros, aproximadamente 4.000 litros a aproximadamente 8.000 litros, aproximadamente 5.000 litros a aproximadamente 10.000 litros, aproximadamente 50 litros a aproximadamente 75.000 litros, aproximadamente 50 litros a aproximadamente 50.000 litros, aproximadamente 50 litros a aproximadamente 25.000 litros, aproximadamente 50 litros a aproximadamente 20.000 litros, aproximadamente 50 litros a aproximadamente 15.000 litros, aproximadamente 50 litros a aproximadamente 10.000 litros, aproximadamente 100 litros a aproximadamente 10.000 litros, aproximadamente 100 litros a aproximadamente 5.000 litros, aproximadamente 100 litros a aproximadamente 4.000 litros, aproximadamente 100 litros a aproximadamente 3.000 litros, aproximadamente 100 litros a aproximadamente 2.900 litros, aproximadamente 100 litros a aproximadamente 2.850 litros, aproximadamente 100 litros a aproximadamente 2.800 litros, aproximadamente 100 litros a aproximadamente 2.750 litros, aproximadamente 2 litros, aproximadamente 10 litros, aproximadamente 50 litros, aproximadamente 100 litros, aproximadamente 200 litros, aproximadamente 500 litros, aproximadamente 1.000 litros, aproximadamente 1.500 litros, aproximadamente 10.000 litros, aproximadamente 20.000 litros, aproximadamente 50.000 litros, o aproximadamente 75.000 litros.

En algunas realizaciones de la divulgación, un cultivo que comprende células de *M. elsdenii* también comprende otro microorganismo (es decir, una célula microbiana que no es una célula de *M. elsdenii*). En algunas realizaciones de la divulgación, un cultivo comprende células de *M. elsdenii* y otro microorganismo que es un anaerobio estricto. En algunas realizaciones de la divulgación, el cultivo comprende células de *M. elsdenii* y otro microorganismo seleccionado del grupo que consiste en: *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Candida*, *Clostridium*, *Pediococcus*, *Aspergillus* y *Saccharomyces*.

Células aerobias, anaerobias y de levaduras liofilizadas

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método de producción de células de *Megasphaera elsdenii* liofilizadas.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células de *M. elsdenii* liofilizadas.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células de *M. elsdenii* liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de producción de células de *Megasphaera* liofilizadas.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células de *Megasphaera* liofilizadas.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células de *Megasphaera* liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de producción de células bacterianas anaerobias liofilizadas.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de producción de células de *Bifidobacterium* liofilizadas, tales como *B. breve*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. plantarum*, células de *Bifidobacterium*, tales como *B. animalis* subsp. *lactis*, células de *Pediococcus*, tales como *P. acidilactici*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. casei*.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células bacterianas anaerobias liofilizadas.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células de *Bifidobacterium* liofilizadas, tales como *B. breve*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. plantarum*, células de *Bifidobacterium*, tales como *B. animalis* subsp. *lactis*, células de *Pediococcus*, tales como *P. acidilactici*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. casei*.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a bacterias anaerobias liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células de *Bifidobacterium* liofilizadas, tales como *B. breve*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. plantarum*, células de *Bifidobacterium*, tales como *B. animalis* subsp. *lactis*, células de *Pediococcus*, tales como *P. acidilactici*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. casei* producido por un método desvelado en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de producción de células bacterianas aerobias liofilizadas.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de producción de células de *Bacillus* liofilizadas, tales como *B. subtilis*.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células bacterianas aerobias liofilizadas.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células de *Bacillus* liofilizadas, tales como *B. subtilis*.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células bacterianas aerobias liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células de *Bacillus* liofilizadas, tales como *B. subtilis* producidas por un método desvelado en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de producción de células de levadura liofilizadas.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de producción de células de *Saccharomyces* liofilizadas, tales como *S. boulardii* y *S. cerevisiae*.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células de levadura liofilizadas.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a liofilizado *Saccharomyces*, tales como *S. boulardii* y *S. cerevisiae*.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células de levadura liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a células de *Saccharomyces* liofilizadas, tales como *S. boulardii* y *S. cerevisiae* producidas por un método desvelado en el presente documento.

En otro aspecto, un método de producción de células de *M. elsdenii* liofilizadas comprende: preparar un cultivo que comprende células de *M. elsdenii* y un medio de crecimiento; extraer las células; congelar las células; y liofilizar las células, en donde se producen las células de *M. elsdenii* liofilizadas. En algunas realizaciones, el método se realiza en el orden de preparar el cultivo, luego extraer las células (es decir, extraer las células cultivadas), luego congelar las células (es decir, congelar las células recogidas) y luego liofilizar las células (es decir, liofilizar las células congeladas).

En algunas realizaciones, el método se realiza en condiciones anaerobias. En algunas realizaciones, el método comprende preparar el cultivo, extraer las células, congelar las células, liofilizar las células, o combinaciones de los mismos, en condiciones anaerobias.

El método puede comprender cualquiera de los métodos de preparación de un cultivo como se describe en el presente documento. Un cultivo del método también puede comprender cualquiera de las propiedades de un cultivo descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, las células en el cultivo comprenden células de *M. elsdenii*. En algunas realizaciones, las células en el cultivo consisten en células de *M. elsdenii*.

En algunas realizaciones, el medio de crecimiento comprende al menos dos fuentes de carbono seleccionadas del grupo que consiste en: caseína, lactato (es decir, ácido láctico), dextrosa, fructosa, fructano, glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, acetato, glicerol, manitol, sacarosa, xilosa, melaza, fucosa, glucosamina, dextrano, una grasa, un aceite, glicerol, acetato sódico, arabinosa, proteína de soja, proteína soluble, rafinosa, amilosa, almidón, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende extraer las células 12 horas después de que el cultivo haya terminado su fase de crecimiento exponencial y antes de que el cultivo haya empezado su fase de crecimiento estacionario. El cultivo se puede enfriar hasta temperatura ambiente para detener el crecimiento en el momento de la extracción.

En algunas realizaciones de la divulgación, el cultivo comprende un líquido, y el método comprende extraer las células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células de *M. elsdenii* concentradas) con un porcentaje del líquido. En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende extraer las células con aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 35 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 25 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 15 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 2 %, o aproximadamente 1 % del líquido. En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende extraer las células con menos de aproximadamente 40 %, menos de aproximadamente 35 %, menos de

aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 25 %, menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 9 %, menos de aproximadamente 8 %, menos de aproximadamente 7 %, menos de aproximadamente 6 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 4 %, menos de aproximadamente 3 %, menos de aproximadamente 2 %, o menos de aproximadamente 1 % del líquido.

En algunas realizaciones, el cultivo comprende un líquido, y el método comprende extraer las células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células de *M. elsdenii* concentradas) retirando un porcentaje del líquido. En algunas realizaciones de la divulgación, la extracción de las células comprende retirar aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 % del líquido, aproximadamente 55 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 60 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 65 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 70 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 75 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 85 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 %, o aproximadamente 95 % a aproximadamente 100 % del líquido. En algunas realizaciones de la divulgación, la extracción de las células comprende retirar al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o al menos aproximadamente 100 % del líquido.

En algunas realizaciones, el método comprende extraer las células de *M. elsdenii* concentrando las células. En algunas realizaciones, la extracción de las células comprende concentrar las células por al menos una técnica seleccionada del grupo que consiste en: centrifugación, filtración, diálisis, ósmosis inversa, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones de la divulgación, la filtración comprende filtración en arcilla. En algunas realizaciones, la filtración comprende filtración de flujo tangencial, también conocida como filtración de flujo cruzado.

En algunas realizaciones de la divulgación, el pH del cultivo que comprende las células de *M. elsdenii* en el momento de la extracción es entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,0, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,5, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,0, entre aproximadamente 4,6 y aproximadamente 6,9, entre aproximadamente 4,7 y aproximadamente 6,8, entre aproximadamente 4,8 y aproximadamente 6,7, entre aproximadamente 4,9 y aproximadamente 6,6, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,5, entre aproximadamente 5,1 y aproximadamente 6,9, entre aproximadamente 5,2 y aproximadamente 6,8, entre aproximadamente 5,3 y aproximadamente 6,7, entre aproximadamente 5,4 y aproximadamente 6,6, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 5,1 y aproximadamente 6,4, entre aproximadamente 5,2 y aproximadamente 6,3, entre aproximadamente 5,3 y aproximadamente 6,2, entre aproximadamente 5,4 y aproximadamente 6,1, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,1, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,2, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,3, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,4, entre aproximadamente 5,1 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 5,2 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 5,3 y aproximadamente 6,5, o entre aproximadamente 5,4 y aproximadamente 6,5.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende inocular medios de crecimiento en un fermentador con un inóculo que comprende células de *M. elsdenii* para preparar un cultivo, e incubar el cultivo a una temperatura de aproximadamente 39 °C hasta que el pH del cultivo sea aproximadamente 6,0. En algunas realizaciones de la divulgación, el inóculo que comprende células de *M. elsdenii* es un cultivo en matraz de células de *M. elsdenii* o una porción de las mismas. En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende inocular medios de crecimiento en un fermentador con una relación entre inóculo y medio de 1/50 a 1/4.000. En algunas realizaciones de la divulgación, la relación entre inóculo y medio es 1/100.

En algunas realizaciones, el cultivo comprende además al menos un crioprotector. En algunas realizaciones de la divulgación, el al menos un crioprotector se selecciona del grupo que consiste en: fructosa, glucosa, sacarosa, leche en polvo, leche de inicio, leche desnatada, trehalosa, maltodextrina, betaína, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones de la divulgación, el al menos un crioprotector está presente en una cantidad de aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 % (p/v) del cultivo, aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % (p/v) del cultivo, aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 % (p/v) del cultivo, aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % (p/v) del cultivo, aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % (p/v) del cultivo, aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % (p/v) del cultivo, aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 % (p/v) del cultivo, aproximadamente 15 % a aproximadamente 25 % (p/v) del cultivo, aproximadamente 20 % a aproximadamente 30 % (p/v) del cultivo, aproximadamente 30 % a aproximadamente 40 % (p/v) del cultivo, aproximadamente 40 % a aproximadamente 50 % (p/v) del cultivo, aproximadamente 60 % a aproximadamente 70 %

(p/v) del cultivo, aproximadamente 70 % a aproximadamente 80 % (p/v) del cultivo. En algunas realizaciones de la divulgación, el crioprotector se añade añadiendo crioprotector en polvo directamente a las células de *M. elsdenii* concentradas. En algunas realizaciones de la divulgación, el crioprotector se añade añadiendo una disolución de crioprotector directamente a las células de *M. elsdenii* concentradas en una relación de 1/1, en una relación de 1/5, o en una relación de 1/10.

En algunas realizaciones de la divulgación, la congelación de las células comprende situar las células en un congelador o poner en contacto las células con nieve carbónica, nitrógeno líquido, o una combinación de los mismos. La congelación de las células incluye la congelación de las células mientras que están en el interior de un recipiente. El contacto de las células incluye poner en contacto un recipiente que comprende las células con un medio para la congelación de las células. Un medio para la congelación de las células incluye, pero no se limita a, un congelador, un baño de acetona-nieve carbónica, nitrógeno líquido, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende la congelación de las células a una temperatura de aproximadamente -20 °C a aproximadamente -210 °C. En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende la congelación de las células a una temperatura de aproximadamente -20 °C a aproximadamente -80 °C. En algunas realizaciones, el método comprende la congelación de las células a una temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -210 °C. En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende la congelación de las células a una temperatura de aproximadamente -20 °C a aproximadamente -196 °C. En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende la congelación de las células a una temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -196 °C. En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende la congelación de las células a una temperatura de aproximadamente -20 °C. En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende la congelación de las células a una temperatura de aproximadamente -80 °C. En algunas realizaciones, el método comprende la congelación de las células a una temperatura de aproximadamente -196 °C. En algunas realizaciones, el método comprende la congelación de las células poniendo en contacto las células con nitrógeno líquido.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende la congelación de las células en condiciones anaerobias.

En algunas realizaciones, la congelación produce sedimentos congelados que comprenden las células. Por ejemplo, la congelación se puede lograr usando un ultracongelador (por ejemplo, modelo 250-S01 Crygran, IFQ Inc.).

En algunas realizaciones de la divulgación, el diámetro de los sedimentos congelados es aproximadamente 0,0254 mm (0,001 pulgadas) a aproximadamente 25,4 mm (1,0 pulgada), aproximadamente 0,254 mm (0,01 pulgadas) a aproximadamente 25,4 mm (1,0 pulgada), aproximadamente 2,54 mm (0,1 pulgadas) a aproximadamente 25,4 mm (1,0 pulgada), aproximadamente 5,08 mm (0,2 pulgadas) a aproximadamente 25,4 mm (1,0 pulgada), aproximadamente 7,62 mm (0,3 pulgadas) a aproximadamente 25,4 mm (1,0 pulgada), aproximadamente 10,16 mm (0,4 pulgadas) a aproximadamente 25,4 mm (1,0 pulgada), aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas) a aproximadamente 25,4 mm (1,0 pulgada), aproximadamente 15,24 mm (0,6 pulgadas) a aproximadamente 25,4 mm (1,0 pulgada), aproximadamente 17,78 mm (0,7 pulgadas) a aproximadamente 25,4 mm (1,0 pulgada), aproximadamente 20,32 mm (0,8 pulgadas) a aproximadamente 25,4 mm (1,0 pulgada), aproximadamente 22,86 mm (0,9 pulgadas) a aproximadamente 25,4 mm (1,0 pulgada), aproximadamente 0,0254 mm (0,001 pulgadas) a aproximadamente 22,86 mm (0,9 pulgadas), aproximadamente 0,254 mm (0,01 pulgadas) a aproximadamente 22,86 mm (0,9 pulgadas), aproximadamente 2,54 mm (0,1 pulgadas) a aproximadamente 22,86 mm (0,9 pulgadas), aproximadamente 5,08 mm (0,2 pulgadas) a aproximadamente 22,86 mm (0,9 pulgadas), aproximadamente 7,62 mm (0,3 pulgadas) a aproximadamente 22,86 mm (0,9 pulgadas), aproximadamente 10,16 mm (0,4 pulgadas) a aproximadamente 22,86 mm (0,9 pulgadas), aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas) a aproximadamente 22,86 mm (0,9 pulgadas), aproximadamente 15,24 mm (0,6 pulgadas) a aproximadamente 22,86 mm (0,9 pulgadas), aproximadamente 17,78 mm (0,7 pulgadas) a aproximadamente 22,86 mm (0,9 pulgadas), aproximadamente 20,32 mm (0,8 pulgadas) a aproximadamente 22,86 mm (0,9 pulgadas), aproximadamente 0,0254 mm (0,001 pulgadas) a aproximadamente 20,32 mm (0,8 pulgadas), aproximadamente 0,254 mm (0,01 pulgadas) a aproximadamente 20,32 mm (0,8 pulgadas), aproximadamente 2,54 mm (0,1 pulgadas) a aproximadamente 20,32 mm (0,8 pulgadas), aproximadamente 5,08 mm (0,2 pulgadas) a aproximadamente 20,32 mm (0,8 pulgadas), aproximadamente 7,62 mm (0,3 pulgadas) a aproximadamente 20,32 mm (0,8 pulgadas), aproximadamente 10,16 mm (0,4 pulgadas) a aproximadamente 20,32 mm (0,8 pulgadas), aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas) a aproximadamente 20,32 mm (0,8 pulgadas), aproximadamente 15,24 mm (0,6 pulgadas) a aproximadamente 20,32 mm (0,8 pulgadas), aproximadamente 17,78 mm (0,7 pulgadas) a aproximadamente 20,32 mm (0,8 pulgadas), aproximadamente 0,0254 mm (0,001 pulgadas) a aproximadamente 17,78 mm (0,7 pulgadas), aproximadamente 0,254 mm (0,01 pulgadas) a aproximadamente 17,78 mm (0,7 pulgadas), aproximadamente 2,54 mm (0,1 pulgadas) a aproximadamente 17,78 mm (0,7 pulgadas), aproximadamente 5,08 mm (0,2 pulgadas) a aproximadamente 17,78 mm (0,7 pulgadas), aproximadamente 7,62 mm (0,3 pulgadas) a aproximadamente 17,78 mm (0,7 pulgadas), aproximadamente 10,16 mm (0,4 pulgadas) a aproximadamente 17,78 mm (0,7 pulgadas), aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas) a aproximadamente 17,78 mm (0,7 pulgadas), aproximadamente 15,24 mm (0,6 pulgadas) a aproximadamente 17,78 mm (0,7 pulgadas), aproximadamente 0,0254 mm (0,001 pulgadas) a aproximadamente 15,24 mm (0,6 pulgadas), aproximadamente 0,254 mm (0,01 pulgadas) a aproximadamente 15,24 mm (0,6 pulgadas), aproximadamente 2,54

mm (0,1 pulgadas) a aproximadamente 15,24 mm (0,6 pulgadas), aproximadamente 5,08 mm (0,2 pulgadas) a aproximadamente 15,24 mm (0,6 pulgadas), aproximadamente 7,62 mm (0,3 pulgadas) a aproximadamente 15,24 mm (0,6 pulgadas), aproximadamente 10,16 mm (0,4 pulgadas) a aproximadamente 15,24 mm (0,6 pulgadas), aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas) a aproximadamente 15,24 mm (0,6 pulgadas), aproximadamente 0,0254 mm (0,001 pulgadas) a aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas), aproximadamente 0,254 mm (0,01 pulgadas) a aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas), aproximadamente 1,27 mm (0,05 pulgadas), a aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas), aproximadamente 2,54 mm (0,1 pulgadas) a aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas), aproximadamente 3,81 mm (0,15 pulgadas) a aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas), aproximadamente 5,08 mm (0,2 pulgadas) a aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas), aproximadamente 7,62 mm (0,3 pulgadas) a aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas), o aproximadamente 10,16 mm (0,4 pulgadas) a aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas). En algunas realizaciones, el diámetro de los sedimentos congelados es aproximadamente 0,0254 mm (0,001 pulgadas) a aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas).

Las células de *M. elsdenii* congeladas se pueden almacenar congeladas (por ejemplo, inferior a 0 °C) antes de la liofilización o pueden liofilizarse inmediatamente. En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* congeladas se almacenan a una temperatura inferior a aproximadamente 0 °C, inferior a aproximadamente -10 °C, inferior a aproximadamente -20 °C, inferior a aproximadamente -50 °C, inferior a aproximadamente -80 °C, o inferior a aproximadamente -196 °C. En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* congeladas se almacenan a una temperatura de aproximadamente -20 °C, aproximadamente -30 °C, aproximadamente -40 °C, aproximadamente -50 °C, aproximadamente -60 °C, aproximadamente -70 °C, aproximadamente -80 °C, aproximadamente -90 °C, aproximadamente -100 °C, aproximadamente -150 °C, aproximadamente -196 °C, o aproximadamente -210 °C.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* congeladas se liofilizan. En algunas realizaciones, las células de *M. elsdenii* congeladas se liofilizan. La liofilización implica, por ejemplo, la retirada de líquido de las células congeladas.

En algunas realizaciones de la divulgación, la liofilización las células de *M. elsdenii* comprende colocar las células congeladas en un liofilizador. En algunas realizaciones de la divulgación, la liofilización comprende someter las células congeladas a presión reducida, y calentar gradualmente las células hasta temperatura ambiente.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende la liofilización de las células en condiciones anaerobias.

En algunas realizaciones de la divulgación, *M. elsdenii* liofilizado se produce a escala comercial.

En algunas realizaciones de la divulgación, aproximadamente 1×10^3 a 1×10^{12} UFC/g de células de *M. elsdenii* liofilizadas se producen por un método desvelado en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, aproximadamente 1×10^3 a 1×10^{12} UFC/g de células de *M. elsdenii* son viables después de la liofilización.

En un aspecto, un método de producción de células de *Megasphaera elsdenii* liofilizadas según la presente divulgación comprende: (a) preparar un cultivo en condiciones anaerobias que comprende células de *M. elsdenii* y un medio de crecimiento que comprende al menos dos fuentes de carbono seleccionadas del grupo que consiste en: caseína, lactato (es decir, ácido láctico), dextrosa, fructosa, fructano, glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, acetato, glicerol, manitol, sorbitol, sacarosa, xilosa, melaza, fucosa, glucosamina, dextrano, una grasa, un aceite, glicerol, acetato sódico, arabinosa, proteína de soja, proteína soluble, rafinosa, amilosa, almidón, triptona, extracto de levadura y combinaciones de los mismos, (b) extraer las células en condiciones anaerobias, (c) congelar las células, y (d) liofilizar las células, en donde se producen aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{12} UFC/g de células de *M. elsdenii* liofilizadas.

En otro aspecto de la divulgación, un método de producción de células de *Megasphaera elsdenii* liofilizadas según la presente divulgación comprende: (a) preparar un cultivo que comprende células de *M. elsdenii* y un medio de crecimiento, (b) extraer las células en condiciones anaerobias en las 12 horas después de que el cultivo haya terminado su fase de crecimiento exponencial y antes de que el cultivo haya empezado su fase de crecimiento estacionario, (c) congelar las células, y (d) liofilizar las células, en donde se producen células de *M. elsdenii* liofilizadas.

En otro aspecto de la divulgación, un método de producción de células de *Megasphaera elsdenii* liofilizadas según la presente divulgación comprende: (a) preparar un cultivo que comprende células de *M. elsdenii* y un medio de crecimiento, (b) extraer las células, (c) congelar las células a una temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -210 °C en 5 horas desde la extracción, y (d) liofilizar las células, en donde se producen células de *M. elsdenii* liofilizadas.

En algunas realizaciones de la divulgación, la cantidad de células de *M. elsdenii* liofilizadas producida por un método desvelado en el presente documento y/o la cantidad de células de *M. elsdenii* que son viables después de la liofilización es aproximadamente 1×10^3 UFC/g a aproximadamente 1×10^{12} UFC/g aproximadamente 1×10^3 UFC/g a

aproximadamente 1×10^{10} UFC/g, aproximadamente 1×10^9 UFC/g a aproximadamente 1×10^{11} UFC/g, o aproximadamente 1×10^{10} UFC/g a aproximadamente 1×10^{12} UFC/g de células de *M. elsdenii* liofilizadas son viables después del almacenamiento a una temperatura de aproximadamente 25 °C durante al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 8 meses, al menos aproximadamente 10 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 15 meses, al menos aproximadamente 18 meses, o al menos aproximadamente 24 meses.

Aditivos para piensos, composiciones y kits

En un aspecto de la divulgación, un aditivo para piensos comprende células de *M. elsdenii* como se desvela en el presente documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de *M. elsdenii* liofilizadas como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de *M. elsdenii* liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento.

En un aspecto de la divulgación, un aditivo para piensos comprende células de *Megasphaera* liofilizadas como se desvela en el presente documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de *Megasphaera* liofilizadas como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de *Megasphaera* liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento.

En un aspecto de la divulgación, un aditivo para piensos comprende células bacterianas anaerobias como se desvela en el presente documento. En otro aspecto de la divulgación, un aditivo para piensos comprende células de *Bifidobacterium*, tales como *B. breve*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. plantarum*, células de *Bifidobacterium*, tales como *B. animalis* subsp. *lactis*, células de *Pediococcus*, tales como *P. acidilactici*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. casei*.

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células bacterianas anaerobias liofilizadas como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células bacterianas anaerobias liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de *Bifidobacterium* liofilizadas, tales como *B. breve*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. plantarum*, células de *Bifidobacterium*, tales como *B. animalis* subsp. *lactis*, células de *Pediococcus*, tales como *P. acidilactici*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. casei*. En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de *Bifidobacterium* liofilizadas, tales como *B. breve*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. plantarum*, células de *Bifidobacterium*, tales como *B. animalis* subsp. *lactis*, células de *Pediococcus*, tales como *P. acidilactici*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. casei* producidas por un método desvelado en el presente documento.

En un aspecto de la divulgación, un aditivo para piensos comprende células bacterianas aerobias como se desvela en el presente documento. En otro aspecto, un aditivo para piensos comprende células de *Bacillus*, tales como *B. subtilis*.

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células bacterianas aerobias liofilizadas como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células bacterianas aerobias liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de *Bacillus* liofilizadas, tales como *B. subtilis*. En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de *Bacillus* liofilizadas, tales como *B. subtilis* producidas por un método desvelado en el presente documento.

En un aspecto de la divulgación, un aditivo para piensos comprende células de levadura como se desvela en el presente documento. En otro aspecto, un aditivo para piensos comprende células de *Sacaromyces*, tales como *S. boulardii* y *S. cerevisiae*.

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de levadura liofilizadas como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de levadura liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de *Sacaromyces* liofilizadas, tales como *S. boulardii* y *S. cerevisiae*. En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende células de *Sacaromyces* liofilizadas, tales como *S. boulardii* y *S. cerevisiae* producidas por un método desvelado en el presente documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos es un sólido (es decir, "un aditivo para piensos sólido") o un líquido (es decir, "un aditivo para piensos líquido"). En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos es un semisólido o un gel (es decir, "un aditivo para piensos semisólido o en gel"). Un aditivo para piensos en gel puede contener un secuestrante de oxígeno (por ejemplo, ácido ascórbico).

5

En algunas realizaciones de la divulgación, un aditivo para piensos sólido es un polvo (por ejemplo, un polvo fluido), gránulo (es decir, un granulado), partícula (es decir, material particulado), pella, torta, concentrado soluble en agua, pasta, bolo, comprimido, polvo, un componente de los mismos, o combinaciones de los mismos.

10 En algunas realizaciones de la divulgación, un aditivo para piensos líquido es una disolución (por ejemplo, una disolución acuosa, orgánica, o acuosa-orgánica), suspensión, emulsión, poción, espray, inyectable, bebida (por ejemplo, un sustituto de la leche), un componente de los mismos, o combinaciones de los mismos.

15 En algunas realizaciones de la divulgación, un aditivo para piensos en gel es un organogel. En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos en gel es un gel oral (es decir, un gel para administración por vía oral).

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos es para su uso como una cobertura (es decir, para añadir a la superficie de un alimento o mezclar con un alimento (por ejemplo, un pienso para animales)). En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos es para administración como un líquido.

20

En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* liofilizadas como se desvelan en el presente documento se pueden usar como un aditivo para piensos líquido mediante rehidratación, disolución, solubilización y/o suspensión de las células liofilizadas en un líquido.

25 En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende un vehículo (es decir, uno o más vehículos).

Ejemplos de vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, materiales vegetales (es decir, plantas completas o partes de planta (por ejemplo, semillas, tallos, hojas, flores y/o raíces, por ejemplo), que incluyen plantas o partes de planta secadas o procesadas), granos secados (por ejemplo, granos secos de destilería), alfalfa, harina de maíz, harina de cítricos, residuos de fermentación, conchas de ostra machacadas, arcilla de Attapulugus, moyuelos de trigo, solubles de melaza, harina de mazorcas de maíz, sustancias vegetales comestibles, harina de soja descascarillada tostada, afrecho de soja, micelios antibióticos, vermiculita, sémola de soja, suero de leche, maltodextrina, sacarosa, dextrosa, caliza (carbonato cálcico), cáscaras de arroz, cultivo de levadura, almidón seco, aluminato de sílice sódica, agua, disoluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácido graso, ésteres de ácidos grasos petrotrales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, y similares, y combinaciones de los mismos.

40 En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos comprende un excipiente (es decir, uno o más excipientes) que incluyen, pero no se limitan a, celulosa microcristalina; lactosa; citrato de sodio; carbonato cálcico; fosfato de calcio dibásico y glicina; disgregantes tales como almidón, glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos; aglutinantes de la granulación, tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga; agentes de carga, tales como maltodextrina; secuestrantes de la humedad, tales como dióxido de silicio; secuestrantes de oxígeno, tales como ácido ascórbico; y/o agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

50 En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos es un gránulo que comprende: un núcleo que comprende las células de *M. elsdenii* y/o aditivo para piensos, y un recubrimiento sobre el núcleo. En algunas realizaciones, el recubrimiento es una sal de barrera hidratada. El recubrimiento de sal puede proporcionar termotolerancia mejorada, estabilidad durante el almacenamiento mejorada, y protección contra otros componentes en los gránulos que pueden tener de otro modo un efecto adverso (por ejemplo, sobre la estabilidad) de las células de *M. elsdenii* y/o aditivo para piensos.

55

En algunas realizaciones de la divulgación, *M. elsdenii* liofilizado se mezcla con una formulación seca de aditivos que incluyen, pero no se limitan a, sustratos de crecimiento, enzimas, azúcares, hidratos de carbono, extractos y microingredientes promotores del crecimiento. Los azúcares pueden incluir, pero no se limitan a, lactosa, maltosa, dextrosa, maltodextrina, glucosa, fructosa, manosa, tagatosa, sorbosa, rafinosa, amilosa, almidón y galactosa. Los azúcares pueden variar del 50-95 %, ya sea individual o en combinación. Los extractos pueden incluir, pero no se limitan a, levadura o solubles de la fermentación de levadura seca que varían desde el 5-50 %. Los sustratos de crecimiento pueden incluir, pero no se limitan a, tripticasa, que varía desde el 5-25 %; lactato de sodio, que varía desde el 5-30 %; y Tween 80, que varía desde el 1-5 %. Los hidratos de carbono pueden incluir, pero no se limitan a, manitol, sorbitol, adonitol y arabitól. Los hidratos de carbono pueden variar del 5-50 % individualmente o en combinación. Los microingredientes pueden incluir, pero no se limitan a, carbonato cálcico, que varía desde 0,5-5,0 %; cloruro de calcio,

65

que varía desde 0,5-5,0 %; difosfato de potasio, que varía desde 0,5-5,0 %; fosfato de calcio, que varía desde 0,5-5,0 %; proteinato de manganeso, que varía desde 0,25-1,00 %; y manganeso, que varía desde 0,25-1,00 %.

En algunas realizaciones de la divulgación, un aditivo para piensos de *M. elsdenii* se prepara mezclando (por ejemplo, con una mezcladora) células de *M. elsdenii*, que incluyen un cultivo que comprende las células y/o células liofilizadas, con cualquier componente adicional del aditivo para piensos (por ejemplo, un vehículo y/o un excipiente). En algunas realizaciones de la divulgación, los componentes se mezclan para obtener una mezcla uniforme.

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos es un aditivo para piensos para animales de cobertura que comprende células de *M. elsdenii* como se desvela en el presente documento (por ejemplo, células liofilizadas) y un vehículo. En algunas realizaciones, el vehículo se selecciona del grupo que consiste en: suero de la leche, maltodextrina, sacarosa, dextrosa, caliza (es decir, carbonato cálcico), cáscaras de arroz, cultivo de levadura, almidón secado y aluminato de sílice sódica, leche, agua, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones de la divulgación, el aditivo para piensos para animales es una poción, espray o suplemento de un sustituto de la leche que comprende células de *M. elsdenii* como se desvela en el presente documento (por ejemplo, células liofilizadas) y un vehículo soluble en agua. En algunas realizaciones de la divulgación, el vehículo se selecciona del grupo que consiste en: suero de la leche, maltodextrina, sacarosa, dextrosa, almidón secado, aluminato de sílice sódica, leche, agua, y combinaciones de los mismos.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un alimento (por ejemplo, un pienso para animales) que comprende células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas como se desvela en el presente documento, por ejemplo, células liofilizadas producidas por un método como se desvela en el presente documento) y/o un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento. Un producto alimenticio es cualquier alimento para consumo animal (es decir, animales no humanos o seres humanos), e incluye composiciones tanto sólidas como líquidas. Los alimentos incluyen, pero no se limitan a, alimentos comunes; productos líquidos, que incluyen aguas, leches, bebidas, bebidas terapéuticas y bebidas nutricionales; alimentos funcionales; suplementos; nutracéuticos; leche de inicio (es decir, que incluye lactantes no humanos y humanos), que incluyen fórmulas para bebés prematuros; alimentos para animales gestantes o lactantes; alimentos para animales adultos; y alimentos geriátricos. En algunas realizaciones, el alimento incluye un líquido (por ejemplo, una bebida, por ejemplo, agua, leche o un sustituto de la leche) que comprende el aditivo para piensos.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas). En algunas realizaciones de la divulgación, la composición comprende células de *M. elsdenii* liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) como se desvela en el presente documento pueden ser además modificadas o procesadas química o físicamente basándose en los requisitos de la composición por cualquier técnica conocida.

Una composición de la divulgación descrita en el presente documento puede incluir uno o más excipientes. En algunas realizaciones de la divulgación, el excipiente puede ser, pero no se limita a, un agente alcalino, un estabilizador, un antioxidante, un agente de adhesión, un agente separador, un agente de recubrimiento, un componente de fase exterior, un componente de liberación controlada, un disolvente, un tensioactivo, un humectante, un agente de tamponamiento, una carga, un emoliente, o combinaciones de los mismos. Excipientes además de los tratados en el presente documento pueden incluir excipientes enumerados en, aunque no se limitan a, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.^a ed. (2005). La inclusión de un excipiente en una clasificación particular en el presente documento (por ejemplo, "disolvente") está prevista para ilustrar en vez de limitar la función del excipiente. Un excipiente particular puede entrar dentro de múltiples clasificaciones.

En algunas realizaciones de la divulgación, la composición es una composición farmacéutica (por ejemplo, para el tratamiento de animales no humanos o seres humanos). En algunas realizaciones de la divulgación, la composición es un alimento médico (por ejemplo, un alimento veterinario). Un alimento médico incluye un alimento que está en una composición para ser consumida o administrada externamente bajo la supervisión de un médico (por ejemplo, un veterinario) y que está prevista para la gestión dietética específica de una afección, para la que se han establecido requisitos nutricionales distintivos, basados en principios científicos reconocidos, mediante una evaluación médica. En algunas realizaciones de la divulgación, la composición farmacéutica comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el término "farmacéuticamente aceptable" significa autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o listado en la Farmacopea Estadounidense, u otra farmacopea internacional generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Para administración por vía oral de una composición, las células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) o el aditivo para piensos se pueden combinar con excipientes bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos pueden permitir, por ejemplo, que las células de *M. elsdenii* o aditivo para piensos se formulen como comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para ingestión oral por un sujeto que se va a tratar. En algunas realizaciones de la divulgación, la composición es un

comprimido, píldora, comprimido oblongo o cápsula. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cargas, tales como azúcares, que incluyen, pero no se limitan a, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparados de celulosa, tales como, pero no se limitan a, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como, pero no se limitan a, la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Las composiciones que se pueden usar por vía oral incluyen, pero no se limitan a, cápsulas hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. En algunas realizaciones de la divulgación, la forma farmacéutica es una forma farmacéutica vegetariana, en la que la forma farmacéutica no está formada y no contiene componentes de una fuente animal. En algunas realizaciones de la divulgación, la forma farmacéutica vegetariana es una cápsula vegetariana.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a una cápsula que comprende células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) y/o un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, la cápsula es una cápsula de gelatina. En algunas realizaciones de la divulgación, la cápsula comprende células de *M. elsdenii* liofilizadas producidas por un método como se desvela en el presente documento o un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, la cápsula es degradable. En algunas realizaciones de la divulgación, la cápsula es una cápsula de gelatina degradable.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición liofilizada encapsulada que comprende células bacterianas anaerobias, en donde el polvo liofilizado se encapsula dispensando el polvo liofilizado en el aceite calentado. En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición liofilizada encapsulada que comprende células de *M. elsdenii*, en donde el polvo liofilizado se encapsula dispensando el polvo liofilizado en aceite calentado.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a kits o envases que comprenden células de *M. elsdenii*, aditivos para piensos, alimentos y/o composiciones desveladas en el presente documento. Los kits o envases pueden incluir unidades de un aditivo para piensos, composición alimenticia, o combinaciones de los mismos (por ejemplo, una o más unidades). En algunas realizaciones de la divulgación, el kit comprende células liofilizadas producidas por un método desvelado en el presente documento, un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento, o una cápsula como se desvela en el presente documento.

Métodos de administración de células bacterianas anaerobias, células bacterianas aerobias y/o células de levadura a animales

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de administración de células bacterianas anaerobias a un animal. En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de administración de células de *Bifidobacterium*, tales como *B. breve*, células de *Lactobacillus*, tales como *L. plantarum*, células de *Bifidobacterium*, tales como *B. animalis* subsp. *lactis*, células de *Pediococcus*, tales como *P. acidilactici*, células de *Lactobacillus*, tales como células de *L. casei* a un animal.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de administración de células bacterianas aerobias a un animal. En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de administración de células de *Bacillus*, tales como células de *B. subtilis*, a un animal.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de administración de células de levadura a un animal. En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de administración de células de *Saccharomyces*, tales como células de *S. boulardii* y *S. cerevisiae*, a un animal.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende administrar al animal células de *M. elsdenii*, un aditivo para piensos, un alimento, o una composición (por ejemplo, una cápsula) como se describe en el presente documento.

La administración puede ser por cualquier vía compatible, que incluye, por ejemplo, por vía oral (es decir, un líquido o sólido ingerible, una poción oral, un aditivo para piensos, un alimento, una composición, o una cápsula), pulverizando sobre el cuerpo (es decir, por pulverización de niebla), y/o inyección.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende administrar un sólido, un líquido, o un gel que comprende las células de *M. elsdenii*.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende administrar un aditivo para piensos sólido que comprende las células. En algunas realizaciones, el aditivo para piensos sólido es un polvo (por ejemplo, un polvo fluido), gránulo (es decir, un granulado), partícula (es decir, material particulado), pella, torta, concentrado soluble en agua, pasta, bolo, comprimido, polvo, un componente de los mismos, o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende administrar un aditivo para piensos líquido que comprende las células. En algunas realizaciones, el método comprende administrar las células en un líquido. En algunas realizaciones, el líquido es una disolución (por ejemplo, una disolución acuosa, orgánica, o acuosa-orgánica), suspensión, emulsión, poción, espray, inyectable, bebida (por ejemplo, un sustituto de la leche), un componente de los mismos, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones de la divulgación, el líquido se administra por vía oral o pulverizando el animal con el líquido.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende combinar las células de *M. elsdenii* o el aditivo para piensos que comprende las células con otro aditivo para piensos para animales para formar un suplemento o premezcla para añadir a un pienso para animales. En algunas realizaciones de la divulgación, el otro aditivo para piensos comprende células distintas de *M. elsdenii*.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) se pueden añadir al aditivo para piensos como un líquido (por ejemplo, en un caldo o equivalente de caldo, que incluye, por ejemplo, células liofilizadas rehidratadas), pasta celular reconstituida, o como células liofilizadas (por ejemplo, secadas por congelación). Los microorganismos, que incluyen *M. elsdenii* liofilizado, también se pueden encapsular antes de la adición al aditivo para piensos. Las formas farmacéuticas (por ejemplo, poción de volumen predeterminado o cápsulas) también se pueden formar y, si se desea, los microorganismos se pueden añadir directamente al pienso para animales, como rociando un caldo líquido y/o células liofilizadas sobre el pienso o la mezcla en el pienso.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende rehidratar un aditivo para piensos sólido (por ejemplo, un polvo, granulado, partícula, pella, torta, células liofilizadas, o combinaciones de los mismos) para producir un líquido para administración.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende aplicar células de *M. elsdenii* a un pienso para animales mediante un sistema de administración que rehidrata un aditivo para piensos sólido o células liofilizadas, que incluye de lote en lote. Por ejemplo, un polvo liofilizado se puede transportar de una tolva de polivinilo a un sistema de lavado, que diluye el polvo y lo pulveriza sobre el pienso a mezclar.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende aplicar células de *M. elsdenii* al pienso para animales usando un dispositivo dosificador volumétrico con un recipiente de almacenamiento. Por ejemplo, se pueden almacenar células liofilizadas (por ejemplo, un polvo que comprende las células) en el recipiente de almacenamiento y descargar en un baño de agua o acuoso justo antes de ser pulverizado sobre un pienso para animales.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento o prevención de una afección o trastorno asociado a la producción de ácido láctico en el tubo gastrointestinal de un animal, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) como se describe en el presente documento, células liofilizadas de *M. elsdenii* producidas por un método como se desvela en el presente documento, un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento, o una composición (por ejemplo, una cápsula) como se desvela en el presente documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, la afección o trastorno es acidosis. En algunas realizaciones de la divulgación, la afección o trastorno es acidosis ruminal. En algunas realizaciones de la divulgación, la afección o trastorno es enfermedad respiratoria. En algunas realizaciones de la divulgación, la afección o trastorno es laminitis. En algunas realizaciones de la divulgación, la afección o trastorno es una infección. En algunas realizaciones de la divulgación, la infección es con *Salmonella* o *Campylobacter*. En algunas realizaciones de la divulgación, la *Salmonella* es *Salmonella enterica* y/o *Salmonella bongori*. En algunas realizaciones de la divulgación, el serotipo de la *Salmonella* es *Salmonella typhimurium* y/o *enteritidis*. En algunas realizaciones de la divulgación, el *Campylobacter* es *Campylobacter jejuni* o *Campylobacter coli*.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de prevención o disminución del crecimiento de un microorganismo oportunista en el tubo gastrointestinal de un animal, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) como se desvela en el presente documento, células liofilizadas de *M. elsdenii* producidas por un método como se desvela en el presente documento, un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento, o una composición como se desvela en el presente documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, el microorganismo oportunista es patógeno. En algunas realizaciones de la divulgación, el microorganismo oportunista es *Salmonella* o *Campylobacter*. En algunas realizaciones de la divulgación, la *Salmonella* es *Salmonella enterica* y/o *Salmonella bongori*. En algunas realizaciones de la divulgación, el serotipo de la *Salmonella* es *Salmonella typhimurium* y/o *enteritidis*. En algunas realizaciones de la divulgación, el *Campylobacter* es *Campylobacter jejuni* o *Campylobacter coli*.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de mejora de la biodisponibilidad del fósforo derivado de planta en la dieta de un animal, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) como se desvela en el presente documento, células liofilizadas de *M. elsdenii*

producidas por un método como se desvela en el presente documento, un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento, o una composición como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* comprenden una actividad de fitasa. En algunas realizaciones, el método reduce el residuo de fósforo medioambiental resultante de la administración de una dieta al animal en ausencia de células de *M. elsdenii*.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de mejora del rendimiento del crecimiento en un animal, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) como se desvela en el presente documento, células liofilizadas de *M. elsdenii* producidas por un método como se desvela en el presente documento, un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento, o una composición como se desvela en el presente documento. En alguna realización de la divulgación, el rendimiento del crecimiento mejorado en el animal es una mejora en: consumo de pienso, aumento de peso promedio diario, relación de conversión de pienso, aumento de peso de la canal, producción de leche en un animal productor de leche, producción de huevos en aves de corral, mineralización ósea, o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de acidificación del tubo gastrointestinal inferior de un animal, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) como se desvela en el presente documento, células liofilizadas de *M. elsdenii* producidas por un método como se desvela en el presente documento, un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento, o una composición como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, el tubo gastrointestinal inferior es el ciego de un animal de corral.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) como se desvelan en el presente documento, las células liofilizadas de *M. elsdenii* producidas por un método como se desvelan en el presente documento, un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento, o una composición como se desvela en el presente documento, se administra antes de, concomitantemente con, o después de alimentar el animal con un alimento.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además mezclar las células liofilizadas de *M. elsdenii* como se desvela en el presente documento, las células liofilizadas producidas por un método como se desvela en el presente documento, o un aditivo para piensos sólido como se desvela en el presente documento con un líquido antes de la administración.

En algunas realizaciones de la divulgación, un líquido se administra por vía oral (por ejemplo, una poción oral) o pulverizando (por ejemplo, pulverización de niebla) el animal con el líquido.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende una administración única de células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) como se desvela en el presente documento, células liofilizadas de *M. elsdenii* producidas por un método como se desvela en el presente documento, un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento, o una composición como se desvela en el presente documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende una administración diaria de células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) como se desvela en el presente documento, células liofilizadas de *M. elsdenii* producidas por un método como se desvela en el presente documento, un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento, o una composición como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, la administración es al menos una vez al día, al menos dos veces al día, al menos tres veces al día, o más de tres veces al día. En algunas realizaciones de la divulgación, la administración es a voluntad (por ejemplo, autoadministración bebiendo un líquido disponible o comiendo un alimento disponible que comprende las células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas), las células liofilizadas de *M. elsdenii* producidas por un método como se desvela en el presente documento, el aditivo para piensos, o la composición).

En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende más de una administración en un solo día de células de *M. elsdenii* (por ejemplo, células liofilizadas) como se desvela en el presente documento, células liofilizadas de *M. elsdenii* producidas por un método como se desvela en el presente documento, un aditivo para piensos como se desvela en el presente documento, o una composición como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, la administración es dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más administraciones en un solo día. En algunas realizaciones, el método comprende más de una administración en un solo día seguido por uno o más días sin administración. En algunas realizaciones de la divulgación, el uno o más días sin administración es uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis días, una semana, dos semanas, tres semanas, o cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, o seis meses sin administración.

En algunas realizaciones de la divulgación, el animal es un rumiante. En algunas realizaciones de la divulgación, el rumiante puede ser, pero no se limita a, ganado vacuno, búfalo, ovejas, cabras, ciervos, renos, alces, jirafas, yaks y alces. En alguna realización de la divulgación, el rumiante se selecciona del grupo que consiste en: ganado vacuno, búfalo, ovejas, cabras, ciervos y renos.

En algunas realizaciones de la divulgación, el animal es un no rumiante. En algunas realizaciones de la divulgación, el no rumiante puede ser, pero no se limita a, equinos, aves de corral, cerdos, perros y gatos. En algunas realizaciones de la divulgación, el no rumiante se selecciona del grupo que consiste en: equinos, aves de corral y cerdos.

5 En algunas realizaciones de la divulgación, el animal es un animal de zoológico.

En algunas realizaciones de la divulgación, el animal es un animal de corral. En algunas realizaciones de la divulgación, el animal de corral es un aviar (es decir, ave) que se usa como un animal de producción que incluye, pero no se limita a, un pollo, ganso, pato, codorniz, pavo, paloma, emú o avestruz. En algunas realizaciones de la divulgación, el animal de corral se selecciona del grupo que consiste en: un pollo, un ganso, un pato, una codorniz, un pavo o una paloma. En algunas realizaciones de la divulgación, el animal de corral se selecciona del grupo que consiste en: un pollo de engorde, una reproductora de pollos de engorde y una ponedora. En algunas realizaciones, el animal de corral es un pollo.

15 En algunas realizaciones de la divulgación, el animal es un equino. En algunas realizaciones de la divulgación, el equino es un caballo, un pony, un burro o una mula.

EJEMPLOS

20 Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención en un modo no limitativo.

EJEMPLO 1

25 **Efecto de la temperatura sobre el rendimiento de cultivos líquidos de *M. elsdenii***

Se probaron temperaturas de almacenamiento de 4 °C, 20 °C y 39 °C para evaluar la viabilidad de células en cultivos líquidos de NCIMB 41125 de *M. elsdenii* (Lactipro®) después de 0, 7, 14, 21 y 28 días. Los resultados revelaron que el almacenamiento del producto a 4 °C mejoró significativamente ($P < 0,001$) la viabilidad del cultivo en comparación con el almacenamiento a 20 °C o 39 °C, independientemente del día de muestreo. Después de 28 días, el producto conservado a 4 °C tuvo $3,98 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) en comparación con $1,26 \times 10^6$ y $6,3 \times 10^5$ UFC/ml para el producto conservado a 20 °C o 39 °C, respectivamente ($P < 0,01$; FIG. 1). Por lo tanto, los resultados muestran que una disminución de la temperatura de almacenamiento mejora la viabilidad de cultivos líquidos de NCIMB 41125 de *M. elsdenii*.

35 Datos adicionales de un estudio separado muestran que el rendimiento de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* en un cultivo líquido (Lactipro advance®) disminuye después de 0, 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento a temperatura ambiente (FIG. 2).

40 **EJEMPLO 2**

Uso de filtración de flujo tangencial para concentrar cultivos de *M. elsdenii*

45 Se investigó la filtración de flujo tangencial (FFT) como un método para concentrar grandes volúmenes de cultivo a alto rendimiento.

Se integró un sistema de FFT a escala piloto (véase la FIG. 3) en la línea de producción para *M. elsdenii* y se probó en series de producción de 500 litros (l) para evaluar el sistema a escala piloto a los niveles de reducción de volumen del 70 %, 80 % y 90 %. Se usó un módulo de FFT con una membrana RC de 100 kDa (altura de canal de 0,875 mm). Se realizaron tres series de producción para cada nivel de reducción para un total de nueve series. Se recogieron muestras para cada serie y se analizaron para pH, densidad óptica (DO), presencia o ausencia de contaminantes aerobios, osmolaridad, perfil de ácidos grasos volátiles, concentración de *M. elsdenii* y características de crecimiento. Las muestras se recogieron de los nueve cultivos de *M. elsdenii* ("No liofilizados") antes del inicio de la filtración, del permeado ("Permeado"), que es el volumen retirado por el sistema, y del concentrado ("Concentrado"), que es el volumen de cultivo concentrado de *M. elsdenii* que comprende las células que quedan después de las reducciones de volumen.

Las muestras de permeado recogidas al principio, en el medio y al final del proceso de concentración tuvieron lecturas de DO coherentes en los niveles de reducción de volumen, todos por debajo de 0,045 (datos no mostrados). La cantidad de *M. elsdenii* recuperada en el permeado aumentó durante el transcurso del proceso de concentración ($P = 0,0006$), pero fue todavía despreciable (inferior a 3×10^4 UFC/ml) en comparación con la cantidad de células recogidas en el concentrado ($< 0,002$ %). Los niveles de reducción de volumen no tuvieron un efecto sobre la concentración de *M. elsdenii* recuperada en el permeado ($P > 0,9$; Tabla 2).

65

Tabla 2. Rendimiento promedio de *M. elsdenii* en muestras recogidas durante las nueve series de producción realizadas para evaluar el sistema de FFT a escala piloto al 70 %, 80 % y 90 % de reducciones de volumen

Muestras	UFC/ml, log10			Error estándar	Efecto del trt., valor de <i>p</i>
	70 %	80 %	90 %		
Permeado	1,19	1,07	1,12	0,40	0,958
Concentrado	8,99	9,04	9,25	0,03	<0,0001

El rendimiento de *M. elsdenii* en el concentrado no fue diferente en las bolsas recogidas al principio, en el medio y al final de cada proceso de envasado ($P = 0,6088$; datos no mostrados). El rendimiento del concentrado se vio afectado por los niveles de reducción de volumen ($P < 0,0001$; **Tabla 2** y **FIG. 4**). El concentrado de 90 % de reducción de volumen tuvo un rendimiento mayor que el concentrado de 70 % y 80 % de reducción de volumen ($P < 0,0001$). Pero el concentrado de 70 % y 80 % no fueron diferentes entre sí ($P > 0,09$).

El proceso de filtración no afectó la capacidad de las células de *M. elsdenii* de crecer cuando se inocularon de nuevo en medio SDL-20 (**Tabla 3**). Las pendientes de la fase exponencial no se vieron afectadas por el nivel de reducción del volumen ($P > 0,3$), pero se vieron afectadas por el tipo de muestra: "Concentrado" frente a "No liofilizados" ($P < 0,001$). El periodo de latencia se vio afectado tanto por el nivel de reducción de volumen como por el tipo de muestra ($P < 0,001$). El periodo de latencia para el concentrado disminuyó al aumentar la reducción de volumen, que fue representativa de la mayor concentración de células.

Tabla 3. Comparación de la pendiente y el periodo de latencia entre *M. elsdenii* inicial (prefiltración = No liofilizados) y concentrado (posfiltración) recogido durante las diferentes series de FFT de reducción de volumen

	Tipo de muestra						Efectos, valores de <i>p</i>		
	No liofilizado			Concentrado			Tipo de muestra	Red. vol.	Interacción
	70%	80%	90%	70%	80%	90%			
Pendiente	0,39	0,36	0,37	0,44	0,42	0,43	<0,001	0,329	0,979
Periodo de latencia, h	1,42 ^a	1,10 ^b	1,07 ^b	0,32 ^c	0,29 ^c	0,24 ^c	0,001	<0,001	<0,001

EJEMPLO 3

Parámetros de congelación y liofilización para *M. elsdenii*

A. Congelación y liofilización de concentrados

Se usaron los concentrados obtenidos mediante FFT para probar los protocolos de congelación, inclusión de crioprotector, y diversos parámetros de liofilización.

Los concentrados se transfirieron a botellas de suero desgasificadas estériles y se mezclaron asépticamente con las diferentes formulaciones de crioprotector (p/v): sin crioprotector (Ctrl), leche desnatada (LD), trehalosa (T) y betaína. Los concentrados mezclados con el crioprotector apropiado se muestrearon para determinar la concentración de *M. elsdenii* previa a la liofilización (es decir, recuento de viabilidad). Las mezclas se transfirieron a viales de 10 ml (4 ml/viales) y se ultracongelaron en nitrógeno líquido o se congelaron lentamente a -80 °C durante la noche. Los viales se transfirieron al liofilizador para liofilizarse usando o un ciclo lento o uno rápido. Una vez se completó la liofilización, se determinó la supervivencia de las bacterias resuspendiendo el producto liofilizado en la cámara anaerobia con diluyente anaerobio, lo que permitió que se rehidrata durante 40 minutos a temperatura ambiente, y luego sembrando en agar SDL20.

La pérdida de células se calculó restando la concentración de *M. elsdenii* recuperado después de la liofilización de la concentración inicial de *M. elsdenii* medida en el concentrado correspondiente mezclado con crioprotectores o no. Se usó el software SAS® para calcular los datos de pérdida de células analizando las interacciones entre los niveles de reducción de volumen (70 %, 80 % o 90 %), ciclo de liofilización (Lento frente a Rápido), método de congelación (-80 °C frente a Nitrógeno líquido), crioprotectores (Ninguno, Betaína, Trehalosa, Leche desnatada, Maltodextrina, Trehalosa/Leche desnatada (T/LD) y Maltodextrina/Leche desnatada (M/LD)).

La pérdida de células observada en el tratamiento de control (sin crioprotectores) independientemente de otros criterios fue 5 log (UFC/ml) o superior. Asimismo, la pérdida de células observada en el tratamiento con betaína independientemente de otros criterios fue 3,96 log UFC/ml o superior. El límite aceptable de pérdida de células se fijó en 1,6 log UFC/ml. Los concentrados mezclados con T/LD o M/LD estuvieron todos por debajo de ese umbral independientemente del ciclo de liofilización o el método de congelación usado, con la excepción de T/LD congelado a -80 °C y liofilizado usando el ciclo lento o rápido (**FIG. 5**).

B. Efectos de las condiciones de liofilización sobre el almacenamiento

Se concentró 10x NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* usando un dispositivo de filtración, y se realizaron ensayos de liofilización que probaban diferentes características: congelación inicial rápida o lenta (nitrógeno líquido frente a -20 °C), con o sin trehalosa (0 %, 4 %, 7,5 % y 10 %), y ciclos de liofilización suave o rápida (38 h a 2×10^{-6} Torr frente a 16,5 h a 135×10^{-6} Torr). Todos los procesos liofilizados probados produjeron productos capaces de retener la viabilidad suficiente para iniciar el crecimiento del cultivo después de la rehidratación, incluso después del almacenamiento prolongado de 4 a 12 meses a temperatura ambiente. Sin embargo, se observaron diferencias en la viabilidad bacteriana dependiendo de las características de liofilización usadas (**FIG. 6**). Las etapas de congelación lenta, incorporación de 7,5 % de trehalosa, y de liofilización suave que mantienen la actividad final del agua por encima de 0,04 se asociaron a mayor supervivencia de *Megasphaera elsdenii*.

C. Efectos de los crioprotectores sobre la viabilidad de *M. elsdenii* liofilizado

Se resuspendieron concentrados centrifugados de células de NCIMB 41125 de *M. elsdenii* en leche de inicio antes de la liofilización, dando como resultado solo una disminución de 1 log en la viabilidad celular cuando las células se rehidrataron posteriormente. La adición de 4 % de trehalosa y 7,5 % de leche desnatada al concentrado de *M. elsdenii* se probó antes de la congelación lenta a -80 °C o la ultracongelación en nitrógeno líquido para determinar la pérdida de células encontrada durante el proceso de congelación inicial. Como se muestra en la **FIG. 7**, la ultracongelación con 4 % de trehalosa o 7,5 % de leche desnatada dio la mayor recuperación de células viables (reducción de 0,79 log en la cifra de células viables). El producto sin adición de crioprotectores, independientemente de la técnica de congelación usada, perdió entre 2,34 y 1,95 log UFC/ml de *Megasphaera elsdenii*.

EJEMPLO 4

Efectos de las condiciones de almacenamiento sobre el rendimiento y la estabilidad de *M. elsdenii* liofilizado

Para determinar el efecto de los protocolos de liofilización y las condiciones de almacenamiento sobre las características de crecimiento y la estabilidad en almacén de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii*, se mezcló el concentrado obtenido a partir del 90 % de reducción de volumen con 8 % de trehalosa/15 % de leche desnatada (T/LD) u 8 % de maltodextrina/15 % de leche desnatada (M/LD), se congeló a -80 °C o en nitrógeno líquido (NLiq) y se liofilizó usando el ciclo rápido. Entonces se probaron las muestras de concentrado para las características de crecimiento bacteriano y la supervivencia celular durante el almacenamiento a 4 °C o 25 °C en condiciones aerobias o anaerobias durante 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 semanas usando el análisis de la curva de crecimiento y la técnica de siembra por extensión. Brevemente, se muestrearon los productos conservados, se diluyeron en series y se sembraron en una placa de SDL-agar. Además, se inoculó medio de crecimiento (SDL) (1:100) con los productos liofilizados rehidratados y se registró la densidad óptica (DO, 600 nm) hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria. El experimento se repitió en 3 días diferentes y todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Las muestras liofilizadas rehidratadas se diluyeron para realizar curvas de crecimiento debido a que, sin diluir, la absorbancia estuvo por encima del límite debido a la presencia de leche desnatada. Para facilitar la comparación de curvas de crecimiento, se realizó la misma dilución en las muestras No liofilizadas usadas como control.

RESULTADOS: Se liofilizaron las muestras y se conservaron a temperatura ambiente o 4 °C en condiciones aerobias o anaerobias durante 6 meses. Las muestras conservadas en condiciones aerobias independientemente del tratamiento se descompusieron rápidamente con una pérdida de células adicional en comparación con su homólogo anaerobio, que varía desde 0,4 hasta 3,2 log después de solo 2 semanas de almacenamiento. Basándose en los resultados y para mejorar la claridad de la figura, solo se presenta en la **FIG. 8** la pérdida de células observada en productos liofilizados conservados anaeróticamente. Durante el almacenamiento en condiciones anaerobias, las muestras conservadas a temperatura ambiente se descompusieron más rápido que sus homólogos conservados a 4 °C, con la excepción de las muestras de T/LD congeladas en nitrógeno líquido. Las muestras de T/LD congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a temperatura ambiente después de la liofilización no perdieron estadísticamente más células que sus homólogos conservados a 4 °C durante el periodo de almacenamiento de 16 semanas ($P > 0,1$). Sin embargo, las diferencias entre muestras llegaron a ser significativas entre el almacenamiento a temperatura ambiente y a 4 °C después de 20 semanas de almacenamiento ($P = 0,0002$), con una diferencia de 0,84 log después de 20 semanas y una diferencia de 0,89 log después de 24 semanas de almacenamiento. Todas las muestras de M/LD se descompusieron más rápido que sus homólogos de T/LD. Después de 24 semanas de almacenamiento (**FIG. 9**), la pérdida de células en las muestras de T/LD congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a 4 °C en condiciones anaerobias fue significativamente inferior a cualquiera de los otros tratamientos ($P < 0,02$). Las muestras de T/LD congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a 4 °C en condiciones anaerobias tuvieron una pérdida de 2,16 log en

comparación con la concentración de *M. elsdenii* observada antes de la liofilización, resultando una pérdida de 0,82 log del periodo de almacenamiento de 24 semanas. En cada día de muestreo, se realizó un experimento de curva de crecimiento para comparar el crecimiento característico de los productos liofilizados con el producto no liofilizado. La **FIG. 10** muestra las curvas de crecimiento realizadas en muestras congeladas en nitrógeno líquido, liofilizadas con el ciclo rápido (18,5 horas a 250 mTorr) y conservadas anaeróbicamente a 4 °C o temperatura ambiente. Las muestras no liofilizadas usadas para cada curva de crecimiento fueron "frescas" (no más de 2 días de edad). El producto liofilizado conservado a 4 °C tuvo un tiempo de latencia más corto que el producto liofilizado conservado a temperatura ambiente, que está de acuerdo con la diferencia en la concentración de *M. elsdenii* observada en estas muestras (**Tabla 4**). Después de 16 semanas de almacenamiento, las muestras de T/LD independientemente de la temperatura de almacenamiento tuvieron un periodo de latencia más corto que las muestras de M/LD.

Tabla 4. Periodo de latencia observado en muestra no liofilizada o liofilizada rehidratada obtenida a partir del concentrado de 90 % de reducción de volumen, mezclado con 8 % de trehalosa/15 % de leche desnatada (T/LD) u 8 % de maltodextrina/15 % de leche desnatada (M/LD), congelado en nitrógeno líquido (NLiq), y liofilizado usando el ciclo rápido después de 12, 16, 20 o 24 semanas de almacenamiento en condiciones anaerobias a 4 o 25 °C

	Periodo de latencia (hora) después de X semanas de almacenamiento					
	12	16	20	24	Promedio	Desv. est.
Lactipro	2,50	2,75	3,75	1,75	2,69	0,72
M/LD conservado a 25 °C	8,50	9,00	10,00	11,75	9,81	1,24
T/LD conservado a 25 °C	6,50	6,75	7,25	8,00	7,13	0,57
M/LD conservado a 4 °C	5,75	8,25	8,00	8,75	7,69	1,15
T/LD conservado a 4 °C	4,25	5,25	5,00	4,75	4,81	0,37

Las pendientes para no liofilizado y el tratamiento con MSM conservado a 25 °C durante 12 semanas y el tratamiento con MSM conservado a 20 °C durante 16 semanas fueron anormalmente bajas (**Tabla 5**). Después de 20 y 24 semanas de almacenamiento, las pendientes de fase exponencial de muestras liofilizadas no fueron numéricamente diferentes del control no liofilizado.

Tabla 5. Pendientes de fase exponencial observadas en muestra no liofilizada o liofilizada rehidratada obtenida de concentrado de 90 % de reducción de volumen, mezclada con 8 % de trehalosa/15 % de leche desnatada (T/LD) u 8 % de maltodextrina/15 % de leche desnatada (M/LD), congelada en nitrógeno líquido (NLiq) y liofilizada usando el ciclo rápido después de 12, 16, 20 o 24 semanas de almacenamiento en condiciones anaerobias a 4 o 25 °C

	Pendientes de fase exponencial después de X semanas de almacenamiento					
	12	16	20	24	Promedio	Desv. est.
Lactipro	0,22	0,31	0,34	0,31	0,30	0,04
M/LD conservado a 25 °C	0,24	0,18	0,33	0,29	0,26	0,05
T/LD conservado a 25 °C	0,31	0,30	0,34	0,32	0,32	0,02
M/LD conservado a 4 °C	0,30	0,33	0,30	0,30	0,31	0,01
T/LD conservado a 4 °C	0,32	0,31	0,33	0,32	0,32	0,01

EJEMPLO 5

Eficacia y seguridad de *M. elsdenii* liofilizado en ganado vacuno

A. Preparación de producto liofilizado y estabilidad en almacén.

Se prepararon viales usados en este ensayo como un cultivo de *M. elsdenii* rehidratado por adelantado (para tratamientos Rehidratado y Cobertura) 56 días antes del comienzo del experimento y se conservaron en el frigorífico a 4 °C a la espera de su uso. Cada vial contuvo el equivalente de 5 ml de producto liofilizado. Los viales se liofilizaron en 6 series de liofilización diferentes. Para cada serie, se rehidrataron 3 viales después de la liofilización y se rehidrataron 3 viales adicionales el día del estudio para determinar la concentración de *M. elsdenii* por vial (**Tabla 6**). Cada uno de los animales del grupo Rehidratado y Cobertura recibió el contenido de un vial en el momento del empapado, equivalente a $1,84 \times 10^{10}$ UFC de *M. elsdenii*.

Tabla 6. Concentración de *M. elsdenii* después de la liofilización y en el día del estudio después de 56 días de almacenamiento a 4 °C

Serie de liofilización de viales	UFC por vial	
	Después de la liofilización	El día del estudio
Serie n.º 1	2,37E+10	1,70E+10
Serie n.º 2	2,37E+10	1,97E+10
Serie n.º 3	3,31E+10	1,86E+10
Serie n.º 4	3,41E+10	1,81E+10
Serie n.º 5	1,98E+10	1,57E+10
Serie n.º 6	2,34E+10	2,14E+10
Promedio	2,63E+10	1,84E+10

Después del inicio del experimento, se mantuvieron viales adicionales de la Serie n.º 5 y n.º 6 a 4 °C y cada mes se rehidrataron 3 viales de cada serie de estas series (**FIG. 11**).

La concentración de *M. elsdenii* en los viales cambió desde $4,96 \times 10^{10}$ UFC/g hasta $4,17 \times 10^{10}$ UFC/g durante el almacenamiento de 11 meses a 4 °C, lo que representa solo una pérdida de 0,07 log en el rendimiento.

Se prepararon productos usados en este ensayo como cultivo de *M. elsdenii* diario aplicado en superficie (tratamiento de Cobertura) aproximadamente 30 días antes del inicio del experimento y se conservaron en el congelador en bolsas de Polyfoil. Los productos de cobertura se liofilizaron en 6 series de liofilización diferentes, se envasaron en 15 bolsas de Polyfoil individuales (1 bolsa/día sobre el pienso), se lavaron con nitrógeno, se sellaron y conservaron a -80 °C hasta su uso. Para cada serie de liofilización, se hidrataron 3 envases después de la liofilización. La concentración promedio de *M. elsdenii* fue 4×10^{10} UFC/envase. Se rehidrataron tres envases adicionales al principio de cada semana y se usaron para determinar la concentración de *M. elsdenii* administrada a los animales diariamente añadiendo disolución de rehidratación de las células de *M. elsdenii*, lo que permitió que las células se asentaran durante 40 minutos, diluyendo las células, y sembrando las células (**FIG. 12**). El análisis estadístico mostró un aumento en la concentración de células con el tiempo. Todo el producto se preparó 30 días antes de empezar el estudio, y el producto usado como cobertura tuvo aproximadamente 80 días al final del estudio. Los animales recibieron en promedio $2,19 \times 10^8$ UFC de *M. elsdenii* diariamente ($2,45 \times 10^{10}$ UFC/envase).

B. Estudio en ganado vacuno

Se cerró el paso a cabestros (n = 462; peso corporal inicial 408,2 kg (900 lb)) por peso y se asignaron aleatoriamente a uno de los cuatro tratamientos, que consistían en: un **grupo de Control** que no recibió *Megasphaera elsdenii* (17 rediles; 7 cabezas/redil); un **grupo No liofilizado** que recibió 50 ml de producto de *M. elsdenii* que contenía 2×10^8 UFC/ml (10^{10} UFC de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii*) por adelantado (16 rediles; 7 cabezas/redil); un **grupo Rehidratado** que recibió un cultivo liofilizado que se rehidrató inmediatamente antes de la administración (10^{10} UFC de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii*) por adelantado (16 rediles; 7 cabezas/redil); y un **grupo de Cobertura** que recibió un cultivo liofilizado que se rehidrató inmediatamente antes de la administración (10^{10} UFC de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii*) por adelantado y un producto liofilizado que se incorporó en la dieta como un recubrimiento diario durante la duración del estudio (10^8 UFC de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* diariamente; 17 rediles; 7 cabezas/redil). Los grupos No liofilizado, Rehidratado y de Cobertura de cabestros se pusieron en un programa intensivo de 10 días después de recibir su poción por adelantado de *Megasphaera elsdenii*, mientras que el grupo de control se puso en un programa intensivo de 21 días. El líquido ruminal se extrajo mediante rumenocentesis 26 horas después de que se alimentara la primera ración. Las muestras de líquido ruminal se analizaron para pH, concentraciones de ácidos grasos volátiles, niveles de endotoxinas y capacidad para la utilización de ácido láctico en un ensayo de desaparición *in vitro*. Para el ensayo de desaparición de lactato, se inocularon diez tubos de 10 ml que contenían medio lactato semidefinido con 0,1 ml de líquido ruminal. La densidad óptica se midió por duplicado cada 6 horas durante un periodo de 24 horas para evaluar la capacidad de crecimiento con ácido láctico como sustrato primario. Los tubos se colocaron en el congelador inmediatamente después de observar la densidad óptica para la posterior determinación de la concentración de ácido láctico. Se equipó un cabestro por redil con un bolo continuo de baja frecuencia para el seguimiento de mediciones de pH durante el estudio de 56 días. Los cabestros se pesaron en el día 0, 28 y 56 para determinar el aumento de peso promedio diario, el consumo de materia seca y la eficiencia del pienso.

Para evaluar *M. elsdenii* viable ingerido por los animales, se cubrieron productos liofilizados sobre maíz molido esterilizado en platillos de aluminio y se recogieron muestras después de 0, 1, 2 y 4 horas de exposición a atmósfera ambiente en el laboratorio o fuera en el sol. Este experimento se repitió 4 veces durante el transcurso de los meses de julio y agosto de 2016 (**FIG. 13**). El análisis estadístico reveló un tiempo de exposición por interacción de condiciones de almacenamiento ($P = 0,0007$), un efecto del tiempo de exposición ($P < 0,0001$) y un efecto de las condiciones de almacenamiento ($P < 0,0001$). La concentración de *M. elsdenii* en producto liofilizado mezclado con maíz molido y expuesto a la atmósfera en el laboratorio disminuyó numéricamente durante la exposición de 4 horas, pero no fueron significativamente diferentes de su concentración inicial. La concentración de *M. elsdenii* en las muestras expuestas a condiciones exteriores disminuyó mucho más rápido. Después de 1 hora de exposición, solo el 6,4 % de *M. elsdenii* inicialmente presente se recuperó. La concentración de *M. elsdenii* en las muestras expuestas a condiciones exteriores fue significativamente diferente de la concentración inicial y de sus homólogos mantenidos a temperatura ambiente después de 2 y 4 horas de exposición. Las concentraciones de *M. elsdenii* en estas muestras fueron muy variables de un experimento al otro, como se muestra por la gran desviación estándar. Esto podría ser atribuible a diferencias en las condiciones exteriores (calor y humedad), pero también por diferencias en el producto liofilizado usado que puede haber sido más o menos resistente al calor y la humedad. Durante el estudio animal, el producto liofilizado se mezcló con maíz molido justo antes de la alimentación y a continuación se recubrió rápidamente a medida que el pienso se colocó en la cama. Los animales se abalanzaron sobre el maíz molido y, por consiguiente, el producto liofilizado fue probablemente ingerido en menos de 1 hora desde la mezcla. Suponiendo que el producto fue ingerido en una hora, los animales deben haber recibido aproximadamente $1,4 \times 10^7$ UFC/cabeza/día de células viables (6,4 % de la concentración promedio en el producto con cobertura $2,2 \times 10^8$ UFC/cabeza/día).

El aumento acelerado de los cabestros tratados con *M. elsdenii* produjo un peso corporal similar a los 28 días ($P = 0,53$; **Tabla 7**), aumento de peso promedio diario ($P = 0,71$) y eficiencia de alimentación ($P = 0,69$). El tratamiento de Cobertura tuvo menos consumo de materia seca que el control ($P = 0,05$). El rendimiento del lote de pienso con respecto a los primeros 56 días de alimentación produjo resultados similares entre tratamientos ($P > 0,10$). Con el control recibiendo un periodo intensivo de 21 días consecutivo, estas similitudes entre tratamientos indican que se pueden implementar programas intensivos acelerados usando cualquiera de las tres formas de tratamientos de *M. elsdenii* sin afectar adversamente la salud del ganado vacuno o el rendimiento del lote de pienso.

El pH del líquido ruminal (extraído 26 horas después de alimentar la primera dieta) fue similar entre tratamientos ($P > 0,10$; **Tabla 8**). Hubo una diferencia en la concentración de AGV totales con el tratamiento de Cobertura que es significativamente superior a los otros tratamientos ($P < 0,01$). El tratamiento con Cobertura tuvo mayor concentración de acetato que el tratamiento Rehidratado ($P = 0,02$). Aunque hubo una diferencia significativa en la concentración de acetato, la relación acetato:propionato fue similar entre tratamientos ($P = 0,96$). Otros AGV fueron similares entre tratamientos ($P > 0,18$).

La concentración de endotoxinas en el líquido ruminal (extraído 26 horas después de alimentar la primera dieta) fue similar entre tratamientos ($P = 0,3462$; **FIG. 14**). Los niveles de endotoxinas se midieron como un indicador de lisis bacteriana en el rumen. Se ha informado que los animales que padecen acidosis tienen niveles de endotoxina superiores a 150.000 UE/ml. Los niveles de endotoxina medidos en este estudio estuvieron todos por debajo del umbral independientemente del tratamiento.

Un cabestro en cada uno de los 32 rediles se equipó con una sonda ruminal permanente de pH (8 cabestros/tratamiento) que informó de mediciones del pH ruminal cada hora durante el estudio de 56 días (**FIG. 15**). Las mediciones del pH ruminal promedio para cada tratamiento se informan en intervalos de 1 hora en **FIG. 15**. Se detectó una interacción de tratamiento por día ($P < 0,01$) para el pH ruminal. También hubo efectos del tratamiento ($P < 0,01$) y el día de alimentación ($P < 0,01$) en el pH ruminal. El aumento acelerado de los tratamientos de *M. elsdenii* no provocó que el pH ruminal promedio disminuyera a un estado de acidosis clínica. A medida que aumentan los días con pienso, los tratamientos liofilizados (Rehidratado y Cobertura) mantienen un mayor pH ruminal que el de los tratamientos de Control y No liofilizado.

Tabla 7. Rendimiento de lotes de pienso

Artículo	Control	No liofilizado	Rehidratado	Cobertura	EEM	Valor de <i>p</i>
Peso corporal inicial, lb	409,14 (902)	407,33 (898)	408,23 (900)	408,23 (900)	5,53 (12,2)	0,31 (0,69)
Días 1-28						
Aumento de peso promedio diario, kg (lb)	2,54 (5,59)	2,49 (5,49)	2,41 (5,32)	2,44 (5,38)	0,08 (0,18)	0,32 (0,71)
Consumo de materia seca, kg (lb) ¹	9,95 (21,94) ^a	9,76 (21,53) ^{a,b}	9,66 (21,30) ^{a,b}	9,37 (20,66) ^b	0,18 (0,39)	0,02 (0,05)
Aumento de peso: pienso	0,2559	0,2596	0,2489	0,2594	0,007	0,69

Artículo	Control	No liofilizado	Rehidratado	Cobertura	EEM	Valor de <i>p</i>
Peso corporal inicial, lb	409,14 (902)	407,33 (898)	408,23 (900)	408,23 (900)	5,53 (12,2)	0,31 (0,69)
Días 1-28						
Peso corporal del día 28, kg (lb)	480,35 (1059)	477,55 (1053)	476,19 (1050)	476,64 (1051)	5,94 (13,1)	0,24 (0,53)
Días 1-56						
Aumento de peso promedio diario, kg (lb)	2,14 (4,71)	2,15 (4,74)	2,12 (4,67)	2,09 (4,61)	0,05 (0,10)	0,37 (0,81)
Consumo de materia seca, kg (lb)	10,36 (22,84)	10,53 (23,22)	10,32 (22,75)	10,45 (23,05)	0,16 (0,35)	0,29 (0,64)
Aumento de peso: pienso	0,2076	0,2047	0,2061	0,2006	0,006	0,76
Peso corporal del día 56, kg (lb)	534,24 (1178)	533,79 (1177)	532,88 (1175)	531,07 (1171)	5,76 (12,7)	0,34 (0,75)

¹ Medias dentro de una fila sin una letra en superíndice común son diferentes, $P < 0,05$

5 **Tabla 8.** Características del líquido ruminal 26 horas después de las dietas iniciales de alimentación

Artículo	Control	No liofilizado	Rehidratado	Cobertura	EEM	Valor de <i>p</i>
pH	6,21	6,03	6,13	6,00	0,13	0,33
Volatilidad del ácido graso, mM ¹						
Total	86,3 ^a	88,1 ^a	81,1 ^a	93,5 ^b	3,97	<0,01
Acetato	54,1 ^{a,b}	54,9 ^{a,b}	50,8 ^a	58,4 ^b	2,40	0,02
Propionato	20,4	21,2	19,6	22,6	1,47	0,18
Butirato	10,3	10,6	9,4	10,8	0,73	0,44
Isobutirato	0,24	0,15	0,09	0,21	0,08	0,20
Valerato	0,58	0,67	0,64	0,64	0,10	0,93
Isovalerato	0,67	0,61	0,50	0,66	0,11	0,23
Caproato	0,00	0,05	0,00	0,02	0,02	0,28
Acetato: propionato	2,74	2,67	2,68	2,72	0,11	0,96

¹ Medias dentro de una fila sin una letra en superíndice común son diferentes, $P < 0,01$

- 10 Se observaron mediciones de densidad óptica en intervalos de 6 horas durante un periodo de 24 horas para determinar las curvas de crecimiento de microbios ruminales mixtos inoculados en un medio lactato semidefinido, estos datos se presentan en la **FIG. 16**. Hubo una interacción entre el tratamiento y el tiempo detectado ($P < 0,02$). También se encontraron efectos individuales del tratamiento ($P < 0,01$) y el tiempo ($P < 0,01$). No se detectaron diferencias entre tratamientos hasta la hora 12, cuando el liofilizado Rehidratado fue superior al liofilizado diariamente ($P < 0,02$) y el control ($P = 0,007$). En la hora 24, no hubo diferencias entre los tratamientos de *M. elsdenii* ($P > 0,10$), pero el tratamiento de control tuvo significativamente menos crecimiento microbiano que todos los tratamientos de *M. elsdenii* ($P < 0,01$).

- 20 La **FIG. 17** ilustra la desaparición de L-lactato de medio lactato semidefinido inoculado con microbios ruminales mezclados y se incubaron durante 0, 6, 12, 18 o 24 horas. Se detectó una interacción entre tratamiento y tiempo ($P = 0,007$) junto con los efectos del tratamiento ($P = 0,01$) y el tiempo de incubación ($P < 0,0001$). El tratamiento No liofilizado contuvo menos L-lactato que otros tratamientos en la hora 0 ($P = 0,04$). Las concentraciones de L-lactato fueron análogas entre tratamientos durante los puntos de tiempos de 6, 12 y 18 horas ($P > 0,10$). Similar a los resultados de la densidad óptica mencionada anteriormente, los microbios ruminales de los cabestros de control utilizaron menos lactato ($P < 0,003$) que los tratamientos de *M. elsdenii* conjuntamente a las 24 horas de incubación

mientras que no se detectaron diferencias entre tratamientos de *M. elsdenii* ($P > 0,10$). Estos datos ilustran que los microbios ruminales de cabestros tratados con *M. elsdenii* crecieron más eficientemente en un medio lactato semidefinido que los de cabestros de control, lo que indica mayor capacidad de utilización de ácido láctico en estos tratamientos. Además, los tratamientos de *Megasphaera* fueron similares con respecto a la capacidad de utilización de ácido L-láctico.

Se midieron las concentraciones de AGV en las muestras usadas para los ensayos de densidad óptica y de desaparición de lactato y se presentan en la **Tabla 9**. Se detectó una interacción de tratamiento por hora para las concentraciones de AGV total ($P = 0,002$), acetato ($P = 0,0002$), isobutirato ($P = 0,04$), butirato ($P < 0,0001$), isovalerato ($P = 0,0007$) y valerato ($P < 0,0001$), así como para la relación acetato: propionato ($P = 0,02$). Se encontraron efectos del tiempo para AGV total y todos los AGV individuales ($P < 0,0001$). Se encontraron diferencias entre tratamientos para isobutirato ($P = 0,02$), butirato ($P = 0,0004$) y valerato ($P = 0,001$). Las concentraciones de isobutirato fueron más bajas en la hora 18 para los grupos de tratamiento No liofilizados y de Cobertura ($P < 0,005$ y $P < 0,004$ respectivamente) cuando se comparó con el Control y Rehidratado. En el punto de tiempo de 24 horas, Recubierto tuvo menos isobutirato ($P = 0,002$) que los tratamientos No liofilizado y Rehidratado, pero fue similar al control ($P > 0,10$). Las concentraciones de butirato de las muestras Rehidratadas fueron superiores a las de Cobertura ($P = 0,02$) después de 18 horas de incubación. El tratamiento de Control produjo menos butirato en 24 horas que los tratamientos de *M. elsdenii* ($P < 0,0001$). Las diferencias en butirato también se detectaron entre los tratamientos de *Megasphaera* en este momento con las muestras de No liofilizado que contienen mayor concentración que el tratamiento Rehidratado ($P = 0,01$). La hora 18 reveló menor concentración de valerato para Rehidratado cuando se comparó con otros tratamientos ($P = 0,01$). Se hicieron observaciones similares para la concentración de valerato y butirato a las 24 horas de incubación. Los controles contuvieron menos valerato que todos los tratamientos de *M. elsdenii* ($P < 0,0001$), mientras que las concentraciones fueron mayores en muestras No liofilizadas que en Rehidratadas ($P = 0,03$). No se detectó efecto principal del tratamiento para otros AGV ($P > 0,05$). Se midieron concentraciones despreciables de isocaproato, caproato y heptanoato. Se encontró una interacción tratamiento \times tiempo ($P = 0,02$) para la relación acetato: propionato, así como un efecto del tiempo ($P > 0,0001$), pero fue similar entre tratamientos ($P = 0,57$).

Tabla 9. Cambios en el perfil de AGV de un medio lactato semidefinido inoculado con microbios ruminales mixtos

Artículo	Tratamientos				EEM	Valores de p		
	Control	No liofilizado	Rehidratado	Cobertura		Trt	Hora	Trt \times hora
AGV totales, mM						0,36	<0,0001	0,002
0 h ¹	3,61	3,35	3,52	3,55	5,16			
6 h ¹	6,41	7,17	7,79	6,62	5,16			
12 h ²	7,64	8,58	17,27	7,80	5,16			
18 h ³	63,01	49,48	56,45	53,73	5,16			
24 h ⁴	46,23	78,35	67,22	74,77	5,16			
Acetato, mM						0,98	<0,0001	0,0002
0 h ¹	3,07	3,02	3,07	2,92	2,15			
6 h ^{1,2}	4,92	5,56	5,78	5,13	2,15			
12 h ²	5,77	6,31	9,17	6,27	2,15			
18 h ³	33,47	21,96	22,75	23,97	2,15			
24 h ⁴	17,25	25,43	22,82	26,05	2,15			
Propionato, mM						0,24	<0,0001	0,08
0 h ¹	0,01	0	0	0	2,44			
6 h ^{1,2}	1,21	1,29	1,69	1,21	2,44			
12 h ²	1,69	2,00	6,45	1,47	2,44			
18 h ³	23,29	20,84	23,53	24,00	2,44			
24 h ⁴	20,85	33,61	28,77	32,58	2,44			
Isobutirato, mM						0,02	<0,0001	0,04

Artículo	Tratamientos				EEM	Valores de <i>p</i>		
	Control	No liofilizado	Rehidratado	Cobertura		Trt	Hora	Trt x hora
0 h ¹	0,03	Despreciable	Despreciable	Despreciable	0,03			
6 h ¹	0,01	Despreciable	Despreciable	Despreciable	0,03			
12 h ¹	Despreciable	Despreciable	0,02	0,00	0,03			
18 h ²	0,14 ^a	0,01 ^b	0,15 ^a	0,01 ^b	0,03			
24 h ³	0,15 ^{a,b}	0,22 ^a	0,22 ^a	0,08 ^b	0,03			
Butirato, mM						0,0004	<0,0001	<0,0001
0 h ¹	0,08	0,06	0,08	0,09	0,52			
6 h ¹	0,15	0,20	0,19	0,16	0,52			
12 h ¹	0,18	0,25	0,90	0,16	0,52			
18 h ²	2,71 ^{a,b}	3,24 ^{a,b}	4,36 ^a	2,75 ^b	0,52			
24 h ³	3,46 ^a	8,80 ^b	7,06 ^c	7,46 ^{b,c}	0,52			
Isovalerato, mM						0,9	<0,0001	0,0007
0 h ¹	0,07	0,01	0,01	0,03	0,10			
6 h ¹	0,03	0,01	0,02	0,03	0,10			
12 h ¹	Despreciable	Despreciable	0,11	Despreciable	0,10			
18 h ²	0,52	0,29	0,75	0,26	0,10			
24 h ³	0,72	1,24	1,06	0,93	0,10			
Valerato, mM						0,001	<0,0001	<0,0001
0 h ¹	0,14	0,10	0,16	0,17	0,54			
6 h ¹	0,05	0,07	0,08	0,06	0,54			
12 h ¹	Despreciable	0,03	0,63	Despreciable	0,54			
18 h ²	2,63 ^a	2,91 ^a	4,63 ^b	2,53 ^a	0,54			
24 h ³	3,75 ^a	8,12 ^b	7,23 ^c	7,56 ^{b,c}	0,54			
Isocaproato, mM						0,26	<0,0001	.09
0 h ¹	0,10	0,07	0,09	0,12	0,02			
12 h ³	Despreciable	Despreciable	Despreciable	Despreciable	0,02			
18 h ⁴	0,25	0,20	0,21	0,20	0,02			
24 h ⁵	0,03	0,01	despreciable	0,01	0,02			
Caproato, mM						0,07	<0,0001	0,003
0 h	0,09	0,09	0,11	0,14	0,02			
6 h	Despreciable	Despreciable	Despreciable	Despreciable	0,02			
12 h	Despreciable	0,02	Despreciable	Despreciable	0,02			
18 h	Despreciable	0,14	0,08	Despreciable	0,02			
24 h	0,02	0,11	0,07	0,10	0,02			
Heptanoato, mM						0,09	<0,0001	0,01
0 h	0,02	0,06	0,00	0,02	0,01			
6 h	Despreciable	Despreciable	Despreciable	Despreciable				

Artículo	Tratamientos				EEM	Valores de <i>p</i>		
	Control	No liofilizado	Rehidratado	Cobertura		Trt	Hora	Trt × hora
12 h	Despreciable	Despreciable	Despreciable	Despreciable				
18 h	Despreciable	Despreciable	Despreciable	Despreciable				
24 h	Despreciable	Despreciable	Despreciable	Despreciable				
A:P						0,57	<0,0001	0,02
0 h ¹	0,06	Despreciable	Despreciable	Despreciable	0,18			
6 h ^{1,2}	4,01	4,44	4,24	4,00	0,18			
12 h ²	3,98	4,60	4,17	4,60	0,18			
18 h ³	2,14	1,91	1,77	1,91	0,18			
24 h ⁴	1,12	0,82	0,91	0,91	0,18			
1,2,3,4 Momentos de tiempo sin un número de superíndice común son diferentes, $P<0,01$								
a,b,c Medias dentro de una fila sin una letra de superíndice son diferentes, $P<0,05$								

EJEMPLO 6

5 Actividad de fitasa de *Megasphaera elsdenii*

Se evaluó la actividad *in vitro* de fitasa de células de *M. elsdenii*.

Se cultivaron células de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* en condiciones anaerobias como se describe en el presente documento en medio de lactato semidefinido que contiene o fosfato inorgánico (KH₂PO₄) o fitato como una fuente de fósforo. En intervalos de 2 horas desde el inicio del cultivo (0 horas) hasta las 8 horas, se retiraron muestras de 1 mililitro (ml) del cultivo y se centrifugaron para formar un sedimento de células. A continuación, se determinó la actividad de fitasa en los sedimentos celulares usando el método de azul de molibdato. Véase Yanke et al., Microbiol. 144: 1565-1573 (1998). Brevemente, se cuantificó el fosfato inorgánico liberado por escisión enzimática en 30 minutos desde la incubación a 37 °C a pH 5,0 mediante espectrofotometría a 700 nanómetros (nm) y en comparación con una curva patrón. La actividad de fitasa se determinó como la cantidad de fósforo inorgánico liberado del sedimento celular por min en las condiciones de prueba.

La FIG. 18 muestra que el crecimiento de las células de *Megasphaera elsdenii* en presencia o ausencia de fitato produjo una actividad de fitasa significativa, que confirma que: (1) células de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* producen fitasa, (2) la producción de fitasa no es inhibida por la presencia de fósforo en los medios, y (3) la producción de fitasa por *Megasphaera elsdenii* parece ser mayor en presencia de fitato en los medios.

EJEMPLO 7

25

Efecto de la concentración y prevalencia de *Megasphaera elsdenii* sobre *Salmonella*

Se asignó aleatoriamente pollitos de engorde de un día (n=384) a cuatro grupos de tratamiento diferentes: 1) un grupo de control no recibió *Megasphaera*, 2) un grupo a voluntad que tiene acceso libre a bebederos que contienen NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* líquido, 3) un grupo liofilizado que recibe diariamente NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* liofilizado en su pienso, y 4) un grupo de sonda nasogástrica oral que recibe NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* líquido en el día 0.

Cada uno de los cuatro tratamientos se representó por 16 jaulas que contenían 6 aves cada una. Se registraron los pesos de los animales, el consumo de pienso y la conversión de pienso durante el periodo de ensayo de 15 días. Después de un periodo de alimentación de 15 días, se seleccionaron aleatoriamente 2 animales por jaula, se sacrificaron y se recuperaron los ciegos para determinar la prevalencia de *Salmonella*. Brevemente, se recuperaron los ciegos, se dispusieron en bolsas Ziploc y se conservaron sobre hielo. A continuación, se lavaron los ciegos con 70 % de etanol y se masajearon manualmente para extraer el contenido. Se diluyó sucesivamente un mililitro de contenido recuperado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se dispuso sobre agar verde brillante (BGA). Las placas de BGA se incubaron 24 h a 37 °C. Se contaron las presuntas colonias de *Salmonella* (colonias rosas) y se confirmaron como *Salmonella* usando la prueba de látex de *Salmonella* Oxoid FT0203 (Oxoid-Thermo Scientific, Hampshire, GB). Además, se añadió un mililitro de muestra de contenido del ciego a 9 ml de Rappaport-Vassiliadis (RV) para el enriquecimiento selectivo. Si no se observó crecimiento de *Salmonella* detectable en placas BGA, el

enriquecimiento de RV se sembró en placas BGA, se incubaron durante 24 h a 37 °C y se evaluaron para la presencia de *Salmonella*. A las muestras sin crecimiento con siembra directa, pero crecimiento positivo con enriquecimiento RV, se les dio una cifra arbitraria de 9 (1 por debajo del límite de detección teórico) y a las muestras sin crecimiento en siembra directa o enriquecimiento RV se les dio una cifra de 0.

Los resultados indicaron que las aves que recibieron material liofilizado tuvieron menor concentración cecal de *Salmonella* en el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) por una diferencia de -1 log en comparación con el grupo de control. Véase la **FIG. 19**. La prevalencia de *Salmonella* en muestras del grupo liofilizado también disminuyó el 13 % cuando se comparó con el grupo de control. Véase la **FIG. 20**.

EJEMPLO 8

Efecto de *Megasphaera elsdenii* sobre el rendimiento del crecimiento y las características cecales de pollos de engorde

A. Diseño experimental y tratamientos

Se realizaron veinticuatro duplicados de tres tratamientos en un diseño de bloques completos aleatorizados usando machos de un día usando pollitos de engorde Cobb 500 que tenían un día de edad al comienzo del tratamiento (Cobb-Vantress en Siloam Springs, Arkansas). Los tratamientos fueron la cepa de NCIMB 41125 de *M. elsdenii* (MS-Biotec, Wamego, Kansas) administrada como una sonda nasogástrica oral o una niebla aerosolizada aplicada a la superficie corporal de las aves, y un control (sin *M. elsdenii*). Las aves se alojaron en 72 gallineros, conteniendo cada gallinero 35 aves al inicio del experimento (2.520 aves en total).

Antes de la administración de *M. elsdenii*, se agitaron vigorosamente bolsas de aluminio de 5 l de cultivo fresco para homogeneizar los contenidos. Se usó tubo de Tygon para conectar un dispositivo dosificador accionado manualmente a la bolsa. El depósito del dispositivo dosificador se llenó repetidamente y se dispensó varias veces para evacuar el aire. El contenido se consideró libre de aire ambiente cuando el cultivo, que contenía un indicador de oxígeno, retuvo su color normal.

Los pollitos se asignaron a grupos de 35, y se registró el peso de cada grupo. Los grupos de aves se procesaron por bloque, siendo asignados tratamientos experimentales aleatoriamente dentro de cada bloque.

Se administró a veinticuatro gallineros (35 aves/gallinero; 840 aves en total) por sonda nasogástrica oral 0,2 ml de un cultivo fresco que contenía $1,97 \times 10^9$ UFC/ml de la cepa NCIMB 41125 de *M. elsdenii* usando una jeringa de autollenado Scorex Classic 173,05005 (Ecublens, Suiza). Los técnicos sujetaron a las aves usando el pulgar y el dedo índice para mantener el pico abierto mientras que el contenido de la jeringa se descargaba directamente en las cavidades orales de las aves.

Se administró a veinticuatro gallineros (35 aves/gallinero; 840 aves en total) por niebla aerosolizada un cultivo fresco que contenía $1,97 \times 10^9$ UFC/ml de la cepa NCIMB 41125 de *M. elsdenii* aplicada por un dispositivo de empapado neumático equipado con una punta atomizadora. Las aves se colocaron en una cubeta de plástico (50 cm × 35 cm × 40 cm) y el cultivo se aplicó a sus superficies corporales como una niebla atomizada a un volumen de 60 ml por gallinero (~1,7 ml/ave).

Veinticuatro gallineros (35 aves/gallinero; 840 aves en total) no tuvieron contacto con *M. elsdenii* y sirvieron de controles. Para prevenir la contaminación cruzada con las aves tratadas, las aves de control fueron manipuladas solo por el personal designado que no tuvo contacto con las aves tratadas y se colocaron en cajas de transporte designadas para ser pesadas y transferidas a los gallineros. En un caso, las aves fueron mal contadas y el gallinero 51 recibió 33 aves en vez de 35 aves debido a un error del técnico.

B. Alimentación y agua

Se ofreció agua fresca a voluntad a través de bebederos (6 bebederos/gallinero) suspendidos de una línea de suministro de agua. La altura del bebedero se ajustó durante todo el ensayo para acomodar el crecimiento de las aves. La **Tabla 10**, a continuación, muestra las dietas usadas en el experimento. Todas las dietas se alimentaron en comederos por gravedad suspendidos en el centro del gallinero. El pienso se añadió según se necesitara para garantizar el acceso a voluntad durante toda la duración del estudio. Se dispusieron cinco kg de dieta de iniciación en los comederos por gravedad antes de la colocación de las aves en los gallineros.

Tabla 10. Composiciones de las dietas

Ingrediente	Fase alimentaria [†]		
	Iniciación	Engorde	Terminación
Maíz molido	55,26	59,74	65,06
Harina de soja <u>descascarillada</u>	37,15	32,60	27,90
Aceite de soja	3,10	3,35	3,10
Caliza molida	1,45	1,40	1,25
Sal	0,37	0,37	0,37
<u>Biofos</u> , 21 %	1,7	1,6	1,4
Bicarbonato sódico	0,22	0,19	0,17
Premezcla <u>Nutrablend</u> poultry VTM	0,25	0,25	0,25
Clorhidrato de L-lisina	0,33	0,30	0,17
L-Metionina	0,13	0,15	0,28
L-Treonina	0,04	0,05	0,07
[†] Las dietas se peletizaron a través de una boquilla de 3 mm, se enfriaron, se desmenuzaron y se dispensaron en sacos de papel para su almacenamiento hasta la alimentación.			

La dieta de iniciación se retiró de los gallineros el día 16 del estudio. Se pesó el pienso residual, se retiró de cada comedero y se dispuso en cubos numerados que se correspondieron con el número de gallinero. Los comederos se volvieron a llenar con la dieta de engorde. Este proceso se repitió en el día 30 del estudio, sustituyendo esta vez la dieta de engorde con la dieta de terminación. En el día 36 se terminó el experimento, y la dieta de terminación residual se pesó y se registró para cada gallinero.

Se calculó el consumo de pienso total por gallinero para cada fase (iniciación, engorde y terminación) como: Pienso añadido – pienso recuperado

El consumo por ave por día se calculó como: Pienso total consumido ÷ [cifra de cabezas diarias en el gallinero × días totales con pienso]

C. Pesos de aves

Se registraron los pesos de los gallineros al final de cada periodo de alimentación (Iniciación, Engorde, Terminación). Al final del periodo de iniciación (día 16), todas las aves en cada gallinero se dispusieron en una cuba (50 cm × 35 cm × 40 cm) y se pesaron. El peso de la cuba se restó del peso total para determinar el peso de las aves en el gallinero. Al final del periodo de engorde (día 30), todas las aves en cada gallinero se colocaron en 2 cubas de igual peso (cada una de 103 cm × 55 cm × 41 cm), se pesaron, y los pesos se sumaron juntos. El peso de cada cuba (medido antes de que las aves se pusieran en ellas) se restó del peso total para determinar el peso de las aves en el gallinero. Al final del periodo de terminación (día 36), todas las aves en cada gallinero se colocaron en 2 cubas de igual peso (cada una de 103 cm × 55 cm × 41 cm) y se pesaron. Esta vez, la balanza se taró con las cubas. El peso de las aves en cada cuba se sumó entonces para determinar el peso total del gallinero. La balanza se volvió a tarar entre gallineros para tener en cuenta la acumulación fecal. En cada uno de los periodos de pesada, la verificación de la cifra de cabezas se realizó a medida que las aves se colocaron en las cubas.

D. Procedimientos de muestreo

Cada semana (días 7, 14, 21, 28 y 35), se seleccionaron aleatoriamente de 1 a 3 aves de cada gallinero y se sacrificaron por dislocación cervical. Se recogieron los contenidos cecales (0,5 g) y se mezclaron con agua desionizada (2 ml) en un vial de centelleo de HDPE de 20 ml (Fisher Sci.; 03-337-23B) usando una mezcladora vortical. Se usó un medidor de pH portátil (medidor de pH portátil Orion 3-star de Thermo Scientific, Waltham, MA) para determinar el pH. Se añadieron cuatro partes de la mezcla cecal a 1 parte de disolución al 25 % p/v de ácido meta-fosfórico y se homogeneizaron usando una mezcladora de vórtice. La muestra se transfirió entonces a 2 tubos de microcentrifugadora de 1 ml y se congelaron a -18 °C hasta esperar el análisis de ácidos grasos volátiles (AGV).

En los días 7 y 21, los contenidos cecales se dividieron en 2 alícuotas. Una alícuota se usó para el análisis de AGV y se preparó como se ha explicado anteriormente. La otra (0,5 g) se colocó directamente en un vial de centelleo de HDPE de 20 ml separado (Fisher Sci.; 03-337-23B) y se congeló (-80 °C) para la cuantificación de números bacterianos usando PCR cuantitativa en tiempo real.

E. Análisis de pH cecal y ácidos grasos volátiles

Se descongelaron muestras cecales previamente diluidas y acidificadas, se homogeneizaron usando una mezcladora de vórtice y se centrifugaron a $24 \times g$ durante 18 min. El sobrenadante acuoso se transfirió a viales de cromatografía de gases. Los ácidos grasos volátiles se midieron usando un cromatógrafo de gases Agilent 7890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipado con una columna capilar DB-WAX (espesor de película de $30 \text{ m} \times 0,53 \text{ mm} \times 0,5 \text{ mm}$; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y detector de ionización de llama. Se usó helio como gas portador a un caudal de 22 cm/s, con una inyección dividida de 1 μl y un flujo dividido de 50:1. La temperatura inicial del horno fue 80°C y la temperatura aumentó a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ a 220°C . Las temperaturas de entrada y de los detectores fueron 250°C . Los ácidos grasos volátiles se cuantificaron por comparación con patrones conocidos (Supelco Volatile Fatty Acid Standard Mix; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que contenían acetato, propionato, isobutirato, butirato, isovalerato, valerato, isocaproato, caproato y heptanoato.

F. Mediciones de la canal

Las aves fueron sacrificadas a las 5 semanas de edad para determinar las mediciones de la canal. Se retiró el pienso aproximadamente 4 h antes del sacrificio. Se seleccionaron cinco aves de tamaño promedio de cada gallinero y se dispusieron en cajas de captura para el transporte al área de procesamiento. Las 5 aves se pesaron por gallinero para determinar el peso vivo justo antes del sacrificio por aturdimiento y desangrado. Se dejó correr la sangre de las aves durante 2 min y a continuación se colocaron en un escaldador rotatorio a 63°C durante aproximadamente 30 s. Las aves se transfirieron a una desplumadora mecánica de tambor rotatorio durante 30 s para la retirada de plumas. Se retiraron las patas, la cabeza y los jarretes y se evisceraron las canales mediante una incisión alrededor de la cloaca. A continuación, las canales se pesaron por gallinero para determinar el rendimiento de canal caliente.

G. Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el procedimiento mixto del software SAS® Versión 9.4. El modelo incluyó el efecto fijo del tratamiento, el efecto aleatorio del bloque y el gallinero como la unidad experimental. La significancia se declaró en $P < 0,05$. Las diferencias entre las medias por mínimos cuadrados se determinaron usando la opción PDif del software SAS®.

H. Resultados

Los pollos de engorde mostraron un consumo de pienso, eficiencia del pienso y aumento de peso promedio diario similares a través de los tratamientos. Los pesos y las mortalidades de las aves no se vieron afectadas por el tratamiento. Sin embargo, el rendimiento de la cobertura fue menos para las aves que recibieron *M. elsdenii* como una sonda nasogástrica oral en comparación con las aves de control o las aves que recibieron *M. elsdenii* como niebla aerosolizada.

El pH cecal fue menos en las aves que recibieron *M. elsdenii* por niebla o aplicación oral, en comparación con el de las aves de control ($P < 0,01$; **Tabla 11**).

Tabla 11. Efecto de *Megasphaera elsdenii* sobre el pH cecal y las concentraciones de AGV

Artículo*	Día	Control ¹	Niebla ²	Oral ³	EEM	Valor de p	
						Tratamiento ⁷	Contraste ⁷⁷
pH					0,103	T, D	0,01
	7	6,87 ^{A a}	6,85 ^{A ac}	6,81 ^{A a}			
	14	6,67 ^{A b}	6,25 ^{B b}	6,11 ^{B b}			
	21	6,15 ^{A a}	6,12 ^{A b}	6,25 ^{A b}			
	28	6,83 ^{A ab}	6,81 ^{A a}	6,67 ^{A ac}			
	35	7,26 ^{A c}	7,10 ^{A c}	7,15 ^{A d}			
Acetato					3,604	D, I	0,91
	7	53,53 ^{A a}	58,66 ^{A a}	58,42 ^{A a}			
	14	61,79 ^{A a}	66,20 ^{AB a}	74,00 ^{B b}			
	21	61,48 ^{A b}	47,66 ^{B b}	46,4 ^{B c}			
	28	40,42 ^{A bc}	38,83 ^{A b}	42,36 ^{A cd}			
	35	39,13 ^{A bc}	41,83 ^{A b}	36,22 ^{A d}			

ES 2 986 558 T3

Artículo*	Día	Control ¹	Niebla ²	Oral ³	EEM	Valor de p	
						Tratamiento ⁷	Contraste ⁷⁷
Propionato					0,608	D, I	0,51
	7	1,82 ^{A a}	1,48 ^{A a}	1,52 ^{A a}			
	14	2,35 ^{A ab}	2,10 ^{A a}	2,69 ^{A ab}			
	21	6,36 ^{A c}	4,01 ^{B b}	3,63 ^{B bc}			
	28	3,73 ^{A bd}	4,08 ^{A b}	4,21 ^{A c}			
	35	4,58 ^{A d}	5,88 ^{A c}	5,96 ^{A d}			
Acetato:propionato		A	B a	B a	2,168	T, D, I	0,003
	7	31,96 ^a	41,33	42,03			
	14	29,80 ^{A a}	40,44 ^{B a}	33,69 ^{A b}			
	21	12,36 ^{A c}	13,62 ^{A bcd}	13,57 ^{A c}			
	28	13,25 ^{A c}	12,96 ^{A cd}	14,30 ^{A c}			
	35	9,81 ^{A c}	8,33 ^{A d}	7,80 ^{A d}			
Butirato					1,094	D, I	0,73
	7	5,60 ^{A a}	5,54 ^{A a}	5,73 ^{A a}			
	14	9,45 ^{A b}	10,95 ^{AB b}	13,40 ^{B b}			
	21	17,79 ^{A c}	11,77 ^{B b}	13,45 ^{B b}			
	28	6,67 ^{A ab}	7,02 ^{A ac}	7,35 ^{A ac}			
	35	8,15 ^{A b}	9,70 ^{A ab}	8,40 ^{A ac}			
Isobutirato					0,055	D	0,04
	7	0,39 ^{A a}	0,36 ^{A a}	0,34 ^{A a}			
	14	0,37 ^{A a}	0,35 ^{A a}	0,45 ^{A a}			
	21	0,38 ^{A a}	0,17 ^{B b}	0,15 ^{B b}			
	28	0,05 ^{A b}	0,00 ^{A c}	0,00 ^{A b}			
	35	0,37 ^{A a}	0,37 ^{A ad}	0,34 ^{A a}			
Valerato			A		0,078	D	0,89
	7	0,29 ^{A a}	0,31 ^a	0,29 ^{A a}			
	14	0,68 ^{A bc}	0,71 ^{A b}	0,90 ^{B b}			
	21	1,13 ^{A c}	0,91 ^{B b}	0,96 ^{AB b}			
	28	0,32 ^{A ac}	0,28 ^{A c}	0,34 ^{A a}			
	35	0,63 ^{A b}	0,79 ^{A b}	0,68 ^{A c}			
Isovalerato					0,0592	D	0,96
	7	0,317 ^{A a}	0,292 ^{A a}	0,314 ^{A a}			
	14	0,375 ^{A a}	0,357 ^{A ab}	0,505 ^{A b}			
	21	0,419 ^{A a}	0,396 ^{AB b}	0,257 ^{AB a}			
	28	0,038 ^{A b}	0,040 ^{A c}	0,050 ^{A c}			
	35	0,325 ^{A a}	0,396 ^{A ab}	0,355 ^{A ab}			
Caproato					0,0208	T, D, I	0,13
	7	0,150 ^{A a}	0,16 8 ^{A a}	0,144 ^{A a}			
	14	0,150 ^{A a}	0,161 ^{A a}	0,292 ^{B b}			

Artículo*	Día	Control ¹	Niebla ²	Oral ³	EEM	Valor de p	
						Tratamiento [†]	Contraste ^{††}
	21	0,000 ^{A bc}	0,000 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
	28	0,000 ^{A c}	0,000 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
	35	0,000 ^{A c}	0,000 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
Isocaproato					0,0148	D	0,79
	7	0,125 ^{A a}	0,116 ^{A a}	0,142 ^{A a}			
	14	0,085 ^{A b}	0,101 ^{A a}	0,078 ^{A b}			
	21	0,000 ^{A c}	0,001 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
	28	0,000 ^{A c}	0,001 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
	35	0,000 ^{A c}	0,001 ^{A b}	0,001 ^{A c}			
Heptanoato					0,0239	D	0,88
	7	0,177 ^{A a}	0,186 ^{A a}	0,146 ^A			
	14	0,104 ^{A b}	0,082 ^{B b}	0,103 ^{AB}			
	21	0,000 ^{A c}	0,002 ^{A c}	0,003 ^A			
	28	0,000 ^{A c}	0,001 ^{A c}	0,003 ^A			
	35	0,000 ^{A c}	0,001 ^{A c}	0,053 ^A			
AGV totales	7	62,40 ^{A a}	67,10 ^{A a}	67,01 ^{A a}	4,806	D, I	0,79
	14	75,34 ^{A b}	81,00 ^{AB b}	92,39 ^{B b}			
	21	87,57 ^{A b}	64,90 ^{B a}	64,82 ^{B ad}			
	28	51,23 ^{A a}	50,25 ^{A c}	54,29 ^{A ac}			
	35	53,18 ^{A a}	58,98 ^{A c}	51,97 ^{A d}			

* Concentración de AGV informada en mM

¹ Las aves de control no tuvieron contacto con *M. elsdenii*

² Aves que recibieron *M. elsdenii* como niebla aerosolizada aplicada a su superficie corporal a una tasa de ~1,7 ml/ave

³ Las aves recibieron 0,2 ml de *M. elsdenii* como una sonda nasogástrica oral

[†] T = Efecto del tratamiento; D = Efecto del día de muestreo; I = Interacción entre el tratamiento y el día de muestreo; $P < 0,05$

^{††} Contraste '*M. elsdenii* frente a Control'

A, B Medias dentro de una fila sin un superíndice común son diferentes a $P < 0,05$

a, b Medias dentro de una columna sin un superíndice común son diferentes a $P < 0,05$

Los pH cecales medios para los tratamientos de control, con niebla aerosolizada y sonda nasogástrica oral fueron 6,76, 6,63 y 6,60, respectivamente. Se detectó una interacción del tratamiento por día para concentraciones cecales de acetato ($P < 0,01$), propionato ($P = 0,03$), butirato ($P < 0,01$), relación acetato: propionato ($P = 0,01$; relación A: P), caproato ($P = 0,002$) y AGV totales ($P < 0,01$) (Tabla 4). El acetato aumentó desde el día 7 hasta el 14, alcanzando un máximo en el día 14. Los contenidos cecales de las aves que recibieron *M. elsdenii* como sonda nasogástrica oral contuvieron mayores concentraciones de acetato, butirato y caproato que las de las aves de control en el día 14 ($P < 0,01$). En el día 21, la concentración de acetato disminuyó a través de todos los tratamientos; sin embargo, la concentración de acetato en los ciegos fue mayor en las aves de control cuando se comparó con las aves tratadas con niebla aerosolizada o sonda nasogástrica oral ($P < 0,01$). Las concentraciones de propionato y butirato también fueron mayores en contenidos cecales de aves de control que los de aves tratadas con *M. elsdenii* en el día 21 ($P < 0,01$). La concentración de propionato alcanzó un máximo en el día 21 en todos los tratamientos y siguió siendo

elevada hasta el día 35, pero no se diferenciaron a través de los tratamientos desde el día 28 hasta el día 35 ($P > 0,05$). La relación A: P fue mayor en los contenidos cecales de aves tratadas con *M. elsdenii* en comparación con controles en el día 7 ($P < 0,01$), con una relación A:P de 31,96, 41,33 y 42,03 para el control, niebla aerosolizada y sonda nasogástrica oral, respectivamente. En el día 14, la relación cecal A: P de aves tratadas con una niebla aerosolizada de *M. elsdenii* (40,44 mM) fue superior a la de aves de control (29,80 mM) o las que recibieron una sonda nasogástrica oral de *M. elsdenii* (33,69; $P < 0,03$). La relación cecal A: P no fue diferente a través de los tratamientos en el día 21 a 35 ($P > 0,05$). Las concentraciones de isobutirato, valerato, isovalerato, isocaproato y heptanoato en los contenidos cecales no se vieron afectadas mediante el tratamiento ($P > 0,10$). La concentración cecal de AGV totales fue mayor en aves alimentadas por sonda nasogástrica oral en comparación con aves de control en el día 14 ($P < 0,001$). Sin embargo, la concentración de AGV totales fue menos ($P < 0,05$) en los contenidos cecales de aves que recibieron *M. elsdenii* como una niebla aerosolizada o una sonda nasogástrica oral (64,90 mM y 64,82 mM, respectivamente) que la de controles (87,57 mM) en el día 21. Las concentraciones cecales de AGV totales fueron similares a través de los tratamientos para los días 7, 28 y 35 ($P > 0,30$).

EJEMPLO 9

Efecto de *Megasphaera elsdenii* sobre el rendimiento del crecimiento de pollos de engorde

A. Diseño experimental y tratamientos - Estudio 1

Se realizaron dieciocho repeticiones de seis tratamientos, bloqueados por batería y por nivel, usando pollitos de engorde Cobb 500 (Cobb-Vantress en Siloam Springs, Arkansas) que tuvieron un día de edad al comienzo de tratamiento. Los tratamientos fueron un control (sin probiótico), Lactipro *Advance*[®] (cultivo líquido no liofilizado de cepa NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii*, MS Biotec, Wamego, Kansas) administrado como una sonda nasogástrica oral, cultivo de cepa KS 249 de *Megasphaera elsdenii* administrada como una sonda nasogástrica oral, cepa ATCC[®] 25940 de *Megasphaera elsdenii* administrada como una sonda nasogástrica oral, Lactipro *Advance*[®] (cultivo líquido no liofilizado de la cepa NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii*, MS Biotec, Wamego, Kansas) aplicado a la superficie corporal de las aves como un aerosol, y cepa NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* liofilizada (MS Biotec, Wamego, Kansas). Las aves se alojaron en 108 gallineros, y cada gallinero contuvo 8 aves al inicio del experimento (1.152 aves en total).

Las aves se contaron en grupos de 8, y se registró el peso de cada grupo. Los grupos de aves se procesaron como bloques, y los tratamientos experimentales se asignaron aleatoriamente a los gallineros dentro de cada bloque.

Se administró a dieciocho gallineros (8 aves/gallinero; 144 aves en total) por vía oral (sonda nasogástrica) 0,2 ml de Lactipro *Advance*[®] que contenía $1,97 \times 10^9$ UFC/ml de cultivo líquido no liofilizado de la cepa NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii*. Se administró a dieciocho gallineros (8 aves/gallinero; 144 aves en total) por vía oral (sonda nasogástrica) 0,2 ml de un cultivo fresco que contenía una concentración desconocida de cepa KS 249 de *Megasphaera elsdenii*. Los intentos por evaluar las UFC/ml para esta cepa no fueron satisfactorios. Se administró a dieciocho gallineros (8 aves/gallinero; 144 aves en total) por vía oral (sonda nasogástrica) 0,2 ml de un cultivo fresco que contenía $1,06 \times 10^9$ UFC/ml de cepa ATCC[®] 25940 de *Megasphaera elsdenii*. Las aves administradas con todos los tratamientos orales se sujetaron en la palma de la mano de un técnico, el pico se mantuvo abierto usando el pulgar y el dedo índice, y el cultivo se descargó directamente en la cavidad bucal usando una pipeta repetidora de referencia Eppendorf[®] (Hamburgo, Alemania).

Se nebulizaron dieciocho gallineros (8 aves/gallinero; 144 aves en total) con 15 ml por gallinero de Lactipro *Advance*[®] que contenía $1,97 \times 10^9$ UFC/ml de cepa NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* (~1,88 ml/ave). Las aves se colocaron en una cuba de plástico (50 cm de largo \times 35 cm de ancho, \times 40 cm de profundidad), y el cultivo se aplicó a la superficie corporal de las aves como una niebla atomizada usando un dispositivo de empapado neumático equipado con una punta atomizadora. Las aves nebulizadas fueron manejadas por personal designado y se colocaron en cajas de transporte designadas para pesar, aplicar y transferir a gallineros para minimizar la contaminación cruzada.

Dieciocho gallineros (8 aves/gallinero; 144 aves en total) recibieron un recubrimiento (mezcla de dieta y *Megasphaera elsdenii* liofilizado) que contenía $1,18 \times 10^7$ UFC/g de la cepa NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* a una tasa de un cuarto de cucharadita por ave. El tratamiento se añadió directamente en los comederos del abrevadero cada día a las 13:00 h a partir del día 10 del estudio.

Los dieciocho gallineros restantes (8 aves/gallinero; total de 144 aves) sirvieron de controles y no tuvieron contacto con el producto probiótico. Las aves de control fueron manejadas por personal designado y se colocaron en cajas de transporte designadas para pesar y transferir a gallineros para minimizar la contaminación cruzada por aves tratadas.

B. Diseño experimental y tratamientos - Estudio 2

Se realizaron dieciocho repeticiones de dos tratamientos, bloqueados por batería y por nivel, usando pollitos de engorde Cobb 500 de un día (Cobb-Vantress en Siloam Springs, Arkansas). Los tratamientos fueron un control (sin

probiótico) o cepa NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* liofilizada (MS Biotec, Wamego, Kansas). Las aves se alojaron en 108 gallineros, y cada gallinero contuvo 8 aves al inicio del experimento (1.152 aves en total).

Las aves se contaron en grupos de 8, y se registró el peso de cada grupo. Los grupos de aves se procesaron como bloques, y los tratamientos experimentales se asignaron aleatoriamente a los corrales dentro de cada bloque. Dieciocho gallineros (8 aves/gallinero; 144 aves en total) recibieron un recubrimiento (mezcla de dieta y *Megasphaera elsdenii* liofilizado) que contenía $1,18 \times 10^7$ UFC/g de la cepa NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* a una tasa de un cuarto de cucharadita por ave. El tratamiento se añadió directamente en comederos de abrevadero cada día a las 13:00 horas a partir del día 10 del estudio.

Los dieciocho gallineros restantes (8 aves/gallinero; total de 144 aves) sirvieron de controles y no tuvieron contacto con el producto probiótico. Las aves de control fueron manejadas por personal designado y se colocaron en cajas de transporte designadas para pesar y transferir a gallineros para minimizar la contaminación cruzada por aves tratadas.

C. Alimentación y agua - Estudios 1 y 2

El agua fresca estuvo disponible a voluntad. Antes de poner las aves en los gallineros, se colocaron 9,5 kg de una dieta de iniciación común (Tabla 12) en comederos de abrevadero junto a cada gallinero.

Tabla 12. Composición de la dieta experimental†

Ingrediente	
Maíz molido	55,26
Harina de soja (47 % de PC)	37,15
Aceite de soja	3,10
Caliza molida	1,45
Biofos 21 %	1,70
Sal	0,37
Bicarbonato sódico	0,22
Premezcla vitamínica para aves de corral	0,25
Clorhidrato de L-lisina	0,33
L-Metionina	0,13
L-Treonina	0,04
†Las dietas se peletizaron a través de una boquilla de 3 mm, se enfriaron y se desmenuzaron	

El pienso se repuso según se necesitara para garantizar el acceso a voluntad durante todo el estudio. Tras la terminación (día 18) del experimento, el pienso sin consumir se retiró de cada comedero, se pesó y se registró. El pienso total consumido por corral se calculó como la diferencia entre las cantidades añadidas y recuperadas de los comederos. Se calculó el consumo de pienso diario por ave como: Pienso total consumido ÷ [cifra de cabezas diarias en el gallinero × días totales con pienso]

D. Pesos de aves - Estudios 1 y 2

Al concluir el estudio, todas las aves en el gallinero se colocaron en una cuba (50 cm de largo × 35 cm de ancho, × 40 cm de profundidad) y se pesaron. El peso de la cuba se tomó antes de que las aves se pusieran en ella y se restó del peso total para determinar el peso de las aves en el corral. También se realizó la verificación de la cifra de cabezas en este momento.

E. Análisis estadístico - Estudios 1 y 2

Los datos se analizaron usando el procedimiento mixto de SAS® software 9.4. El modelo incluyó el efecto fijo del tratamiento, el efecto aleatorio del bloque y el gallinero como la unidad experimental. La significancia se declaró en $P < 0,05$. Las diferencias entre las medias por mínimos cuadrados se determinaron usando la opción PDif del software SAS®.

F. Resultados - Estudios 1 y 2

Para el Estudio 1, los pollos de engorde en todos los grupos de tratamiento mostraron consumo de pienso diario, aumento de peso promedio diario, aumento de peso:pienso y mortalidad similares.

Sin embargo, como se muestra en la **Tabla 13**, el Estudio 2 mostró que el aumento de peso promedio diario ($P = 0,02$) y el aumento de peso:pienso ($P = 0,04$) fueron ambos mayores en aves recibieron *Megasphaera elsdenii* liofilizado cuando se comparó con las aves de control. Véase también la FIG. 21, que muestra la relación pienso:aumento de peso. El consumo de pienso y la mortalidad no fueron diferentes entre los grupos de tratamiento.

Tabla 13. Efecto de *Megasphaera elsdenii* sobre el rendimiento de pollos de engorde (Estudio 2)

Artículo	Control [†]	Liofilizado [‡]	EEM ²	Valor de p ^{‡‡}
N.º de gallineros	18	18	-	-
ADG ¹ , g	27,6 ^a	29,0 ^b	0,43	0,02
Consumo de pienso, g/d	36,2	36,5	0,54	0,70
Aumento de peso:pienso	0,76 ^a	0,80 ^b	0,01	0,04
Mortalidad, %	2,08	0,69	0,93	0,31

¹ Aumento de peso diario promedio

²Error estándar de la media

[†] Tratamiento de control, sin probiótico

[‡] Se administró *Megasphaera elsdenii* liofilizado diariamente en forma de una cobertura

^{‡‡} Valor de p para la prueba de la F del modelo global

^{a, b} Medias dentro de una fila con diferentes superíndices son diferentes en $P < 0,05$

EJEMPLO 10

Efecto de *Megasphaera elsdenii* sobre la fermentación cecal equina

A. Diseño experimental y tratamientos

Se usaron ocho caballos Cuarto de Milla, 4 yeguas y 4 crías (peso corporal promedio = 540 kg; EEM = 75 kg), previamente equipados con cánulas cecales (Beard et al., JAS 89(8): 2425-2429 (2011)) en un cuadrado latino incompleto de 3×3 (tratamiento \times caballo) replicado en 3 periodos de tratamiento. Cada periodo de tratamiento se separó por un periodo de lavado de 28 días. Los tratamientos fueron (1) un control negativo (sin *M. elsdenii*; Control), (2) 50 ml de cultivo recién preparado que contenía $1,97 \times 10^9$ UFC/ml de cepa NCIMB 41125 de *M. elsdenii* (Lactipro Advance®, MS Biotec, Wamego, Kansas) administrada por poción oral (Poción), y (3) 0,40 g de un cultivo liofilizado que contenía $7,02 \times 10^8$ UFC/ml de cepa NCIMB 41125 de *M. elsdenii* (MS Biotec, Wamego, Kansas) administrada por 2 golosinas para caballos basadas en melaza (Liofilizado). Los caballos se asignaron aleatoriamente a tratamientos (Tabla 14).

Tabla 14. Asignaciones de tratamiento

ID de caballo	Periodo 1 TRT	Periodo 2 TRT	Periodo 3 TRT
0	Liofilizado ³	Control ¹	Poción ²
1	Control	Poción	Liofilizado
2	Poción	Liofilizado	Control
3	Control	Poción	Liofilizado
4	Poción	Control	Liofilizado
6	Poción	Liofilizado	Control
7	Liofilizado	Poción	Control
10	Liofilizado	Control	Poción

ID de caballo	Periodo 1 TRT	Periodo 2 TRT	Periodo 3 TRT
¹ Control - no tratado con <i>M. elsdenii</i>			
² Poción - los caballos recibieron 50 ml de <i>M. elsdenii</i> como una sonda nasogástrica oral ($1,97 \times 10^9$ UFC/ml) al inicio de cada periodo de tratamiento			
³ Liofilizado - los caballos recibieron <i>M. elsdenii</i> diariamente como un polvo liofilizado que promediaba $7,02 \times 10^8$ UFC/ml en 2 golosinas basadas en melaza			

Los caballos se alojaron en compartimentos individuales ($3,05 \times 3,66$ m) dentro de un único establo y se acomodaron con virutas de pino. Los caballos fueron asignados aleatoriamente a diferentes compartimentos durante cada periodo de tratamiento para tener en cuenta cualquier posible variación en la ventilación o la temperatura basándose en la ubicación del establo. Los caballos caminaron diariamente para hacer ejercicio durante periodos de tratamiento.

Los caballos que recibieron la poción oral se administraron justo antes de la alimentación en el día 1 de cada periodo de tratamiento con 50 ml de cultivo recién preparado que contenía $1,97 \times 10^9$ UFC/ml de cepa NCIMB 41125 de *M. elsdenii* usando un dispositivo dosificador accionado manualmente (rociador automático variable de 60 ml MKIII, NJ Phillips, NSW, Australia). Antes de la administración del cultivo probiótico, se agitó vigorosamente una bolsa de 5 l de cultivo recién preparado para homogeneizar los contenidos. Se unió un dispositivo dosificador accionado manualmente a la bolsa usando una tubería Tygon y se llenó el depósito. Se desecharon aproximadamente 100 a 200 ml de cultivo en un recipiente para residuos para garantizar que tanto la tubería como el dispositivo carecían de oxígeno.

A los caballos en el grupo de tratamiento probiótico liofilizado se les ofreció 2 golosinas basadas en maíz y melaza que contenían el producto liofilizado antes de la alimentación por la mañana cada día. Se liofilizó la cepa NCIMB 41125 de *M. elsdenii* antes del estudio y se envasó en envases sellados a vacío que contenía cada uno aproximadamente 0,40 g de la bacteria liofilizada con un promedio de $7,02 \times 10^8$ UFC/ml de *M. elsdenii*. Se sembró cada día una muestra para garantizar la consistente viabilidad bacteriana a través de cada periodo de tratamiento. Si el caballo rechazó la golosina, el producto liofilizado se administró a mano como un bolo.

Los caballos no fueron expuestos al probiótico durante el periodo en el que sirvieron de controles.

B. Alimentación y agua

Durante los periodos de tratamiento, los caballos se alimentaron dos veces al día con heno y concentrado dividido igualmente entre las dos alimentaciones. Cada caballo se alimentó con 1 % de su peso corporal en base fresca con heno de bromo por día (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis de nutrientes dietéticos

Componentes			
Base de materia seca (MS), %	Heno de bromo 1 ^a	Heno de bromo 2 ^b	Concentrado ^c
DM	90,5	92	87,9
Proteína cruda (PC)	8,2	8,4	14,5
Fibra en detergente ácido (FDA)	39,2	42,2	8,1
Fibra en detergente neutro con amilasa (FDNa)	63,9	68,9	15,8
Grasa cruda	2,5	2,1	--
Almidón	1,6	0,8	--
Ceniza	7,27	6,93	--
Energía digestible (ED) Mcal/kg	2,05	0,87	1,6
Calcio	0,38	0,3	.87
Fósforo	0,15	0,22	.74
Magnesio	0,17	0,16	.17
Potasio	1,50	1,74	.88

Componentes			
Base de materia seca (MS), %	Heno de bromo 1 ^a	Heno de bromo 2 ^b	Concentrado ^c
^a Alimentado a una tasa de 1 % de peso corporal en base fresca/día durante periodos de tratamiento			
^b a voluntad durante el lavado			
^c Alimentado en cantidades crecientes de 0,2 % de peso corporal en base fresca/día hasta un máximo de 1 % de peso corporal en base fresca durante periodos de tratamiento			

Cada caballo se le subió hasta el 1 % de su peso corporal en concentrado texturizado (análisis en la **Tabla 15**, anteriormente, composición en la **Tabla 16**, a continuación) a una tasa del 0,2 % de su peso corporal por día en el día 1 hasta el día 5 y luego se mantuvo al 1 % de PC de AF en grano durante del día 5 hasta el día 7. Todos los rechazos se pesaron y registraron. Los establos estaban equipados con bebederos automáticos para ofrecer agua fresca a voluntad. Los bebederos se limpiaron y comprobaron múltiples veces al día para su correcta función.

Tabla 16. Composición del concentrado experimental^a

Ingrediente, % de dieta	Nivel de inclusión
Maíz	20,00
Avena	61,67
Melaza	10,00
Harina de soja, 48 %	5,22
Caliza	1,25%
Sal	0,50%
Mono Calcio	1,02%
Vit A 30.000	0,01%
Vit D 30.000	0,00%
Vit E 20.000	0,25%
Sulfato de Cu	0,01%
Óxido de Zn	0,01%
Seleniuro de Na	0,06%
^a Alimentado durante periodos de tratamiento en cantidades crecientes del 0,2 % de peso corporal en base fresca/día hasta un máximo de 1 % de peso corporal en base fresca	

Durante los periodos de lavado, los caballos se alojaron en un corral seco y se mantuvieron en una dieta con heno de bromo a voluntad (Tabla **). Los caballos se pesaron al finalizar cada periodo de lavado para garantizar el cálculo preciso de la cantidad de pienso ofrecida durante los periodos de tratamiento.

C. Procedimientos de muestreo

Se recogieron muestras cecales mediante cánulas cecales cada 4 horas durante cada periodo de tratamiento de 7 días. Los caballos se alimentaron a las 10:00 horas y las 22:00 horas cada día y las muestras se recogieron a las 4, 8 y 12 horas después de la alimentación antes de la siguiente alimentación. En el día 0 de cada periodo de tratamiento, las muestras se recogieron antes de la administración o alimentación para establecer valores basales de pH, AGV y poblaciones de *M. elsdenii* en el intestino distal.

Las muestras se recogieron quitando las tapas de las cánulas y capturando el contenido cecal a medida que salían de las cánulas. El líquido cecal se coló a través de cuatro capas de estopilla, y a continuación se puso en un vaso de muestras de 100 ml. Si no se recogió una muestra suficiente mediante flujo de gravedad, se usó una bomba de mano para extraer contenidos cecales. A las 10:00 horas en los días 0, 1, 3 y 7, se recogieron muestras cecales adicionales para análisis por PCR. Durante el primer periodo de tratamiento, se recogieron muestras sin filtrar en viales de centelleo de HDPE de 20 ml (Fischer Sci.; 03-337-23B). Estas muestras sin filtrar supusieron un reto en la separación de muestras para la extracción de ADN, por lo que durante los 2 periodos de tratamiento restante se recogió líquido

cecal filtrado en tubos cónicos de centrifugadora Falcon de 50 ml (Corning Inc. 352070; Corning, NY) y se congeló inmediatamente a -80 °C a la espera del análisis por PCR. Los técnicos se cambiaron los guantes entre cada caballo.

D. Análisis de pH cecal y ácidos grasos volátiles

El pH del líquido cecal filtrado se midió inmediatamente después de la recogida usando un medidor de pH portátil (medidor de pH portátil Orion 3 Star de Thermo Scientific, Waltham, MA; sonda Accumet). Después de registrar el pH, la muestra se transfirió en alícuotas de 1 ml a 2 tubos de microcentrifugadora y se mezcló con 0,25 ml de ácido meta-fosfórico al 25 % para la desproteinización. Las muestras se congelaron a -18 °C durante al menos 24 horas antes del análisis de AGV.

Las muestras cecales acidificadas y congeladas se descongelaron y homogeneizaron usando una mezcladora de vórtice y se centrifugaron a 24 × g durante 18 minutos. A continuación, se transfirió el sobrenadante acuoso a viales de cromatografía de gases. Los ácidos grasos volátiles se midieron usando un cromatógrafo de gases Agilent 7890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipado con una columna capilar DB-WAX (espesor de película 10 mm × 0,10 mm × 0,1 mm; columnas Agilent y J&W, Santa Clara, CA) y detector de ionización de llama. Se usó hidrógeno como gas portador a un caudal de 46 cm/segundo, con una inyección dividida de 1 µl y un flujo dividido 50:1. La temperatura inicial del horno fue 70 °C y la temperatura aumentó en 15 °C/minuto hasta 130 °C; a continuación, aumento a 60 °C/minuto hasta 220°C y se mantuvo durante 2 minutos. Las temperaturas de entrada y del detector fueron 260 °C y 300 °C respectivamente. Los ácidos grasos volátiles se cuantificaron comparando con patrones conocidos (mezcla estándar de ácidos grasos volátiles Supelco; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que contenían acetato, propionato, isobutirato, butirato, isovalerato, valerato, isocaproato, caproato y heptanoato.

E. Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el procedimiento Glimmix del software SAS® Versión 9.4. El modelo incluyó el efecto fijo del tratamiento y los efectos aleatorios del caballo, periodo y la interacción de tratamiento por periodo. El caballo sirvió de unidad experimental. El tratamiento por hora dentro del efecto del día no fue significativo para ningún parámetro y, por lo tanto, se excluyó del modelo. La significancia se declaró en $P < 0,05$, y se consideró que una tendencia era $0,05 < P < 0,10$. Las diferencias entre las medias por mínimos cuadrados se determinaron usando la opción PDif del software SAS®.

F. Resultados

El pH cecal tendió a ser mayor en caballos tratados con *M. elsdenii* en comparación con controles a medida que aumentó la inclusión de grano en la dieta. Véase la **FIG. 22**. El pH cecal de caballos administrados con *M. elsdenii* como una poción oral se elevó por encima de los controles en el día 5 (7,00 y 7,19 respectivamente; $P = 0,09$), el primer día en el que se alimentó la asignación completa de grano. En el día 7, los caballos que recibieron *M. elsdenii* como una golosina liofilizada tendieron a tener un mayor pH cecal (7,19) que los controles (6,99; $P = 0,09$).

La Tabla 17 muestra el perfil de AGV de los grupos de tratamiento.

Tabla 17. Efecto de *M. elsdenii* sobre el perfil de AGV cecales equinos

Artículo*	Día	Control ¹	Poción ²	Liofilizado ³	EEM	Tratamiento ⁷	Contraste ⁷⁷
Acetato					5,928	D	0,55
	0	47,02 ^{A, a}	43,03 ^{A, ab}	45,73 ^{A, a}			
	5	43,72 ^{A, a}	40,88 ^{A, b}	40,08 ^{A, a}			
	6	39,41 ^{A, b}	38,53 ^{A, ab}	35,54 ^{A, b}			
	7	38,36 ^{A, b}	36,63 ^{A, a}	36,39 ^{A, b}			
Propionato					3,078	D	0,54
	0	14,86 ^{A, a}	14,12 ^{A, acd}	15,81 ^{A, abc}			
	5	19,22 ^{A, ab}	18,80 ^{A, bc}	18,25 ^{A, b}			
	6	17,84 ^{A, abc}	17,67 ^{A, c}	15,08 ^{A, c}			
	7	16,78 ^{A, c}	15,24 ^{A, d}	14,54 ^{A, c}			
Acetato: propionato					0,252	D	0,55
	0	3,50 ^{A, a}	3,36 ^{A, a}	3,47 ^{A, a}			

Artículo*	Día	Control ¹	Poción ²	Liofilizado ³	EEM	Valor de p	
						Tratamiento ⁷	Contraste ⁷⁷
	5	2,37 ^{A, b}	2,32 ^{A, b}	2,32 ^{A, b}			
	6	2,33 ^{A, b}	2,29 ^{A, b}	2,46 ^{A, b}			
	7	2,41 ^{A, b}	2,60 ^{A, c}	2,83 ^{B, c}			
Butirato					0,900	D	0,45
	0	5,10 ^{A, a}	4,26 ^{A, ab}	4,58 ^{A, ab}			
	5	4,70 ^{A, a}	4,18 ^{A, a}	4,22 ^{A, b}			
	6	4,15 ^{A, a}	3,67 ^{A, ab}	3,81 ^{A, ab}			
	7	3,53 ^{A, b}	3,36 ^{A, b}	3,57 ^{A, a}			
Isobutirato					0,051	I	0,25
	0	-0,01 ^{A, a}	-0,01 ^{AB, ab}	0,12 ^{B, a}			
	5	0,01 ^{A, a}	0,02 ^{A, b}	0,07 ^{A, a}			
	6	0,00 ^{A, a}	0,05 ^{A, ab}	0,03 ^{A, b}			
	7	0,00 ^{A, a}	0,05 ^{A, a}	0,04 ^{A, b}			
Valerato					0,096	I	0,31
	0	0,16 ^{A, a}	0,04 ^{A, a}	0,10 ^{A, ab}			
	5	0,14 ^{A, a}	0,05 ^{B, a}	0,08 ^{A, b}			
	6	0,12 ^{A, a}	0,07 ^{A, a}	0,13 ^{A, ab}			
	7	0,04 ^{A, b}	0,07 ^{A, a}	0,15 ^{B, a}			
Caproato					0,0120	--	0,57
	0	0,000	0,000	0,007			
	5	0,000	0,000	0,000			
	6	0,000	0,000	0,007			
	7	0,000	0,000	0,015			
AGV totales					9,487	D	0,54
	0	67,14 ^{A, ab}	61,46 ^{A, ab}	66,44 ^{A, a}			
	5	67,82 ^{A, b}	63,97 ^{A, b}	62,73 ^{A, a}			
	6	61,53 ^{A, a}	60,06 ^{A, ab}	54,60 ^{A, b}			
	7	58,73 ^{A, a}	55,43 ^{A, a}	54,69 ^{A, b}			
* Concentración de AGV informada en mM							
¹ Control - no tratado con <i>M. elsdenii</i>							
² Poción - los caballos recibieron 50 ml de <i>M. elsdenii</i> como una sonda nasogástrica ovalada ($1,97 \times 10^9$ UFC/ml) al inicio de cada periodo de tratamiento							
³ Liofilizado - los caballos recibieron <i>M. elsdenii</i> diariamente como un polvo liofilizado que promediaba $7,02 \times 10^8$ UFC/ml en 2 golosinas basadas en melaza							
⁷ T = Efecto del tratamiento; D = Efecto del día de muestreo; I = Interacción entre el tratamiento y el día de muestreo; $P < 0,05$							
⁷⁷ Contraste ' <i>M. elsdenii</i> frente a Control'							
A, B Medias dentro de una fila sin un superíndice común son diferentes a $P < 0,05$							
a, b Medias dentro de una columna sin un superíndice común son diferentes a $P < 0,05$							

La suplementación de *M. elsdenii* no tuvo efecto sobre las concentraciones de acetato o propionato en el ciego ($P > 0,10$; Tabla **). Sin embargo, se detectó una interacción de tratamiento por día en la relación acetato: propionato (A:P) ($P < 0,05$). La relación cecal A:P fue mayor en el día 7 en caballos que recibieron *M. elsdenii* liofilizado (2,83) que en caballos que no recibieron *M. elsdenii* (2,41), o los que recibieron *M. elsdenii* como una porción oral (2,60; $P < 0,05$). El valerato cecal fue mayor en el día 7 en caballos que recibieron *M. elsdenii* liofilizado (0,15 mM) que en los animales de control (0,04 mM), o los que recibieron una porción oral de *M. elsdenii* (0,07 mM; $P < 0,02$). El valerato cecal fue menos en caballos tratados con poción en el día 5 que en los animales de control ($P < 0,01$); sin embargo, fue similar al de los caballos tratados con *M. elsdenii* liofilizado ($P > 0,10$). Las concentraciones de heptanoato e isocaproato fueron despreciables, y no se detectó efecto del tratamiento o de la interacción; por lo tanto, estos AGV se excluyeron de la Tabla **.

El pH cecal y los productos de fermentación fueron los más afectados por la suplementación con *M. elsdenii* desde el día 5 hasta el día 7, los días en los que se consumió la cantidad máxima de grano.

EJEMPLO 11

Evaluación de la aplicación del cultivo líquido de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* (Lactipro®) en pollos de engorde

Se realizó un estudio piloto de rendimiento de pollos de engorde en la Diversified Research Corporation de Virginia para evaluar los efectos de NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii* nebulizado o administrado por sonda nasogástrica sobre el rendimiento del crecimiento de pollitos de engorde.

Pollitos de engorde de un día ($n=720$) vacunados por pulverización con Coccivac-B en el día 0 fueron asignados aleatoriamente a 6 tratamientos diferentes: (1) un grupo de control negativo que no recibió *Megasphaera* (nCON), (2) un grupo de nebulización que recibió NCIMB 41125 de *M. elsdenii* en el día 0 por niebla (1-2 ml/ave) cuando estaban en sus cajas de incubación (d0 Niebla), (3) un grupo de sonda nasogástrica en el día 7 que recibió 2 ml de NCIMB 41125 de *M. elsdenii* en el día 7 por sonda nasogástrica oral después de un ayuno de pienso de 2 h y un ayuno de agua de 1 h (d7 SONDA), (4) un grupo de sonda nasogástrica en el día 14 que recibió 5 ml de NCIMB 41125 de *M. elsdenii* en el día 14 por sonda nasogástrica oral después de un ayuno de pienso de 2 h y un ayuno de agua de 1 h (d14 SONDA), (5) un grupo de sonda nasogástrica en el día 21 que recibió 10 ml de NCIMB 41125 de *M. elsdenii* en el día 21 por sonda nasogástrica oral después de un ayuno de pienso de 2 h y un ayuno de agua de 1 h (d21 SONDA), y 6) un grupo de control positivo (pCON) que no recibió *Megasphaera* pero recibió piensos de iniciación y de engorde tratados con BMD (50 g/t) y pienso de terminación tratado con Stafac (20 g/t).

Cada tratamiento estuvo representado por 4 jaulas que contenían 30 aves cada una. Las dietas proporcionadas a las aves fueron como sigue: pienso de iniciación a partir del día 0-18, pienso de engorde a partir del día 18-35 y pienso de terminación a partir del día 35-39. Se registraron los pesos de los animales, el consumo de pienso y la conversión de pienso durante el periodo de ensayo de 39 días.

Tabla 18: Rendimiento de pollos de engorde medido después de 25 y 39 días con pienso.

	nCON	pCON	d0 Niebla	d7 SONDA	d14 SONDA	d21 SONDA
Peso vivo día 25, kg (lb)	1,038 (2,288) ^a	1,038 (2,288) ^a	1,015 (2,237) ^{ab}	0,980 (2,160) ^b	1,003 (2,212) ^{ab}	0,992 (2,188) ^b
FCR, día 1-25	1,531 ^a	1,516 ^a	1,430 ^b	1,555 ^a	1,531 ^a	1,571 ^a
Mortalidad día 25, %	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,83 ^{ab}	0,00 ^a	1,67 ^b
Peso vivo día 39, kg (lb)	4,713 ^a	5,100 ^a	4,886 ^a	4,880 ^a	5,121 ^a	4,907 ^a
FCR, día 1-39	0,823 (1,814) ^b	0,796 (1,754) ^{ab}	0,789 (1,739) ^{ab}	0,803 (1,771) ^{ab}	0,778 (1,715) ^{ab}	0,759 (1,674) ^a
Mortalidad día 39, %	0,017 ^a	0,00 ^a	0,83 ^a	1,67 ^a	1,67 ^a	3,33 ^a

^{a, b} Medias dentro de una fila con superíndice diferente son diferentes a $P < 0,05$.

Los resultados se presentan en la **Tabla 18**. La mortalidad global no fue diferente a través de los tratamientos (**Tabla 18**). La conversión de pienso para el grupo d0 Niebla fue significativamente menor que todos los otros tratamientos en el día 25 con una mejora del 5,3 % con respecto a pCON y una mejora del 6,5 % con respecto a nCON. Después de 39 días con pienso, la conversión de pienso de los grupos tratados con *Megasphaera elsdenii* no fue significativamente

diferente de la de pCON, pero tendió a ser numéricamente menor, con excepción de d7 SONDA. La conversión de pienso para el grupo d21 SONDA fue significativamente menor que la de nCON con una mejora del 7,7 % en la conversión de pienso.

5 EJEMPLO 12

Crecimiento de diferentes cepas de *M. elsdenii* sobre medios de crecimiento semidefinidos complementados con dos fuentes de carbono

10 A. Diseño experimental

Se usaron las siguientes cepas bacterianas en este ejemplo: (1) NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii*, (2) ATCC 25940 de *Megasphaera elsdenii*, (3) NCIMB 702261 de *Megasphaera elsdenii*, (4) NCIMB 702262 de *Megasphaera elsdenii* y (5) NCIMB 702410 de *Megasphaera elsdenii*.

Todas las cepas se cultivaron en botellas de suero con medio de crecimiento de lactato semidefinido. Los cultivos resultantes se usaron a continuación para inocular placas de 96 pocillos que contenían medio de crecimiento semidefinido complementado con dos fuentes de carbono: lactato de Na y glucosa que consistían en 60 % de lactato y 40 % de glucosa, 70 % de lactato y 30 % de glucosa, o 40 % de lactato y 60 % de glucosa.

A continuación, se incubaron placas de 96 pocillos a 39 °C en condiciones anaerobias y la densidad óptica (600 nm) se registró automáticamente en intervalos de 15 minutos.

25 B. Análisis de las características de crecimiento de cepas de *M. elsdenii* sobre diversos medios de dos carbonos

Se representaron las curvas de crecimiento resultantes de los diferentes medios semidefinidos y con las diferentes cepas de *M. elsdenii*, leyéndose el tiempo de incubación en el eje x y la densidad óptica en el eje y, para comparar las características de crecimiento (FIG. 23-25).

Todas las cepas de *M. elsdenii* probadas en este experimento presentaron características de crecimiento similares cuando se cultivaron en medios semidefinidos que consistían en 60 % de lactato y 40 % de glucosa, 70 % de lactato y 30 % de glucosa, o 40 % de lactato y 60 % de glucosa.

35 EJEMPLO 13

Crecimiento de diferentes cepas de *M. elsdenii* sobre medios de crecimiento semidefinidos complementados con dos fuentes de carbono, seguido por liofilización de las células

40 A. Diseño experimental

Se usaron las siguientes cepas bacterianas en este ejemplo: (1) NCIMB 41125 de *Megasphaera elsdenii*, (2) ATCC 25940 de *Megasphaera elsdenii*, (3) NCIMB 702261 de *Megasphaera elsdenii*, (4) NCIMB 702262 de *Megasphaera elsdenii* y (5) NCIMB 702410 de *Megasphaera elsdenii*.

Todas las cepas se cultivaron en botellas de suero con medio de crecimiento de lactato semidefinido. Los cultivos resultantes se usaron a continuación para inocular recipientes fermentadores de 5 l que contenían medio de crecimiento semidefinido complementado con dos fuentes de carbono: lactato de Na y glucosa que consistían en 60 % de lactato y 40 % de glucosa, o 70 % de lactato y 30 % de glucosa.

Se recogió una muestra de los cultivos después de 8, 10, 12, 14 y 16 horas de crecimiento, se enfrió hasta temperatura ambiente y las células se recogieron aséptica y anaeróticamente retirando el 99 % del líquido. Los concentrados se mezclaron con una disolución de crioprotector (sacarosa) en una relación 1/5, en condiciones asépticas y anaerobias, para obtener una concentración final de sacarosa de 5 % p/v. La mezcla se muestreó para determinar la concentración de *M. elsdenii* prelioofilización (es decir, recuento de viabilidad).

Se transfirieron alícuotas de la mezcla resultante a viales de 10 ml (4 ml/vial) y se ultracongelaron en nitrógeno líquido. Los viales se transfirieron al liofilizador para ser liofilizados siguiendo un ciclo rápido. Una vez se completó la liofilización, la supervivencia de las bacterias se determinó resuspendiendo el producto liofilizado en la cámara anaerobia con diluyente anaerobio, lo que permitió que se rehidratara durante 40 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se sembró sobre un agar de lactato semidefinido (es decir, recuento de viabilidad).

La pérdida de células se calculó restando la concentración de *M. elsdenii* recuperada después de la liofilización a partir de la concentración inicial (prelioofilización) de *M. elsdenii*.

B. Comparación de la pérdida de células después de la liofilización de diferentes cepas de *M. elsdenii* cultivadas en diversos medios semidefinidos, recogidas y liofilizadas en diversos momentos durante el crecimiento.

Todas las cepas de *M. elsdenii* probadas en este experimento produjeron células viables después de la liofilización. El límite de pérdida de células aceptable se estableció en 1,6 log UFC/ml. Las pérdidas de células encontradas durante la liofilización de células cultivadas en medio semidefinido que contenía 70 % de lactato y 30 % de glucosa (**Tabla 19**), independientemente de la cepa o el tiempo de recogida, estuvieron todas por debajo del límite aceptable y oscilaron desde 0,3 hasta 1,3 log.

Tabla 19: Pérdida de células (log UFC/ml) observada después de la liofilización en cepas de *M. elsdenii* cultivadas en medio semidefinido que consistía en 70 % de lactato y 30 % de glucosa, recogidas y liofilizadas después de 8, 10, 12, 14 o 16 horas de incubación.

Cepa	Tiempo de recogida, horas				
	8	10	12	14	16
NCIMB 41125	-	0,41	0,46	0,60	0,42
ATCC 25940	0,61	0,56	0,64	0,80	0,61
NCIMB 702261	0,76	0,85	1,09	0,81	1,29
NCIMB 702262	0,65	0,98	1,01	0,96	0,99
NCIMB 702410	0,81	0,83	1,00	1,02	1,20

Las pérdidas de células encontradas durante la liofilización de células cultivadas en medios semidefinidos que contienen 60 % de lactato y 40 % de glucosa (**Tabla 20**) estuvieron más afectadas por el tiempo de recolección, pero todas las cepas aún produjeron una pérdida de células que estuvo por debajo del límite aceptable para al menos tres de los tiempos de recogida. La optimización del tiempo de recogida previo a la liofilización puede dar como resultado una mejora adicional de la recuperación después de la liofilización.

Tabla 20: Pérdida de células (log UFC/ml) observada después de la liofilización en cepas de *M. elsdenii* cultivadas en medio semidefinido que consistía en 60 % de lactato y 40 % de glucosa, recogidas y liofilizadas después de 8, 10, 12, 14 o 16 horas de incubación.

Cepa	Tiempo de recogida, horas				
	8	10	12	14	16
NCIMB 41125	0,34	0,28	0,34	0,37	0,33
ATCC 25940	0,72	1,46	2,01	1,80	1,47
NCIMB 02261	0,74	1,26	1,28	1,48	1,45
NCIMB 02262	0,58	1,19	1,74	1,32	1,80
NCIMB 02410	-	0,70	1,12	1,37	1,19

En general, el método descrito en el presente documento produjo producto liofilizado que contenía células viables independientemente de la cepa de *Megasphaera elsdenii* usada.

EJEMPLO 14

Encapsulación de *M. elsdenii* liofilizado y determinación de la estabilidad del mismo

Se mezclaron asepticamente concentrados de NCIMB 41125 de *M. elsdenii* obtenidos a través de FFT con disolución de crioprotector (sacarosa) en una relación 1/5 para obtener una concentración final de 5 % de sacarosa (p/v). La mezcla se ultracongeló en nitrógeno líquido y se transfirió al liofilizador para ser liofilizado usando un ciclo rápido. Una vez la liofilización estuvo completa, la supervivencia de las bacterias se determinó resuspendiendo el producto liofilizado en la cámara anaerobia con diluyente anaerobio, lo que permitió rehidratarlo durante 40 minutos a temperatura ambiente, y luego sembrando en agar de lactado semidefinido.

El polvo de *M. elsdenii* liofilizado resultante se mezcló a continuación con un vehículo (agente de carga) y se encapsuló dispersando el polvo en destilado de aceite de palma calentado o ácido esteárico. A continuación, la mezcla se enfrió rápidamente y el producto resultante se muestreó para determinar la supervivencia de las bacterias. Las muestras se resuspendieron en la cámara anaerobia con diluyente anaerobio, se mezclaron durante 15 segundos, y se dejó que se rehidrataran durante 40 minutos a temperatura ambiente antes de sembrarse en agar de lactato semidefinido. Este experimento se repitió tres veces usando diferente temperatura de calentamiento y diferente tipo de aceite (método 1, 2 y 3). El método 1 usa una temperatura de calentamiento de 110 °C y un destilado de aceite de palma como material de encapsulación. El método 2 usa una temperatura de calentamiento de 52 °C y una mezcla de mono- y diglicéridos de ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico como material de encapsulación. El método 3 usa una temperatura de calentamiento de 65 °C y una mezcla de mono- y diglicéridos de ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico como material de encapsulación.

El porcentaje de pérdida se calculó restando la concentración de *M. elsdenii* recuperado después de la encapsulación de la concentración recuperada después de la liofilización y dividiéndolo por la concentración recuperada después de la liofilización.

Se recogieron muestras adicionales del producto encapsulado, usando el método 2 y el método 3, y se conservaron a temperatura ambiente en condiciones aerobias durante un periodo de 4 meses para evaluar la estabilidad del producto. Las muestras se resuspendieron en la cámara anaerobia con diluyente anaerobio, se mezclaron durante 15 segundos, y se dejó que se rehidrataran durante 40 minutos a temperatura ambiente antes de sembrarse sobre agar de lactato semidefinido. Las FIG. 26 y 27 muestran que la estabilidad de *M. elsdenii* liofilizado encapsulado usando el método 2 o 3 solo perdió aproximadamente 1 log UFC/g.

Tabla 21: Porcentaje de pérdida observada después de la encapsulación de *M. elsdenii* liofilizado usando el método 1, 2 o 3.

	Porcentaje de pérdida de la encapsulación
Método 1	83,4 %
Método 2	24,5 %
Método 3	32,1 %

El método 2 y 3 usado para encapsular *M. elsdenii* liofilizado produjo una recuperación celular superior al 67,9 % (Tabla 21).

Además, las muestras liofilizadas encapsuladas siguiendo el método 2 o el método 3 produjeron una reducción de 1 log en la viabilidad celular durante el almacenamiento a temperatura ambiente en condiciones normales de oxígeno y humedad durante hasta 4 meses.

La encapsulación de *M. elsdenii* liofilizado siguiendo el método 2 y 3 proporcionó una protección adicional a las bacterias del oxígeno y la humedad. Este proceso permitiría conservar *M. elsdenii* liofilizado encapsulado a temperatura ambiente sin envasado específico y permitiría la adición del producto en el pienso.

EJEMPLO 15

Estabilidad en almacén de *M. elsdenii* liofilizado producido a escala piloto.

A. Diseño experimental

Se usó un lote de 600 litros de medio semidefinido que consistía en 70 % de lactato y 30 % de glucosa en este experimento para cultivar NCIMB 41125 de *M. elsdenii*. Después de 14 horas de incubación a 39 °C, el cultivo resultante se enfrió hasta temperatura ambiente y las células se recogieron usando un sistema de filtración de flujo tangencial como se describe en el Ejemplo 2. El noventa y nueve por ciento del volumen líquido se retiró del cultivo y se concentró; a continuación, se resuspendió en una disolución de crioprotector de sacarosa en una relación 1:5 para obtener una concentración final de sacarosa del 5 % p/v.

La mezcla se congeló a continuación en nitrógeno líquido, las pellas congeladas se transfirieron al liofilizador y se liofilizaron tras un ciclo rápido. Una vez se completó la liofilización, el polvo liofilizado se recogió y se envasó (Tabla 22) en condiciones anaerobias en bolsa de Mylar solo ("M.e.") o con maltodextrina como agente de carga ("M.e. + maltodextrina").

Tabla 22: Relleno de bolsa de Mylar

	Polvo liofilizado	Maltodextrina	Peso total en la bolsa
M.e.	0,15 g	-	0,15 g
M.e. + Maltodextrina	0,15 g	2,34 g	2,50 g

Se determinó la concentración de *M. elsdenii* en el producto liofilizado (3 muestras por tratamiento) resuspendiendo el producto liofilizado en la cámara anaerobia con diluyente anaerobio, lo que permitió rehidratarlo durante 40 minutos a temperatura ambiente, y luego sembrarlo sobre agar de lactato semidefinido (es decir, recuento de viabilidad). La concentración de *M. elsdenii* se expresó como UFC/bolsa y se transformó logarítmicamente.

B. Estudio de estabilidad en almacén

Bolsas Mylar que contenían los diferentes tratamientos se almacenaron a temperatura ambiente (75 °F; 25 °C) o a 40 °F (4 °C). Se obtuvieron muestras adicionales después de 0,5, 1, 2, 3, 4 y 6 meses de almacenamiento y se procesaron de la misma forma que se describe previamente (3 muestras por tratamiento por momento de tiempo) para determinar la estabilidad en almacén del producto. La concentración de *M. elsdenii* se expresó como UFC/bolsa y se transformó logarítmicamente.

Los datos de estabilidad en almacén se presentan en la Fig. 28. La concentración de *M. elsdenii* con el tiempo se vio afectada por la temperatura de almacenamiento. Después de 6 meses de almacenamiento, las muestras conservadas a 40 °F (4,4 °C) fueron estables independientemente de la presencia o ausencia de maltodextrina, mientras que las muestras conservadas a 75 °F (23,9 °C) perdieron aproximadamente 1,6 log para el tratamiento "M.e." y aproximadamente 0,8 log para el tratamiento "M.e. + Maltodextrina".

EJEMPLO 16

Crecimiento celular microbiano, medio, temperatura y pH

Las bacterias anaerobias se pueden dividir en tres categorías, (1) anaerobias estrictas; (2) anaerobias aerotolerantes; y (3) anaerobias facultativas. Las anaerobias estrictas son bacterias que no sobreviven en concentraciones atmosféricas normales de oxígeno. Algunas anaerobias estrictas pueden sobrevivir en hasta 8 % de oxígeno, mientras que otras no pueden sobrevivir a menos que la concentración de oxígeno sea inferior al 0,5 %. Las anaerobias aerotolerantes pueden sobrevivir en presencia de oxígeno, pero no utilizan el oxígeno para el crecimiento. Las anaerobias facultativas son capaces de usar oxígeno para la respiración aerobia, pero también pueden usar respiración anaerobia si no está presente oxígeno.

Similarmente, las bacterias aerobias se pueden dividir en dos categorías: (1) aerobias estrictas; y (2) microaerófilas. Las aerobias estrictas requieren oxígeno para realizar la respiración celular y pueden sobrevivir en concentraciones atmosféricas normales de oxígeno. Las microaerófilas requieren oxígeno para el crecimiento celular, pero son dañadas por concentraciones atmosféricas normales de oxígeno.

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares que se clasifican como un miembro del reino de los hongos. Las levaduras pueden ser aerobias estrictas o anaerobias facultativas.

Megasphaera, tal como *M. elsdenii* y *Bifidobacterium*, tal como *B. breve*, son especies representativas de anaerobios estrictos. *Lactobacillus*, tales como *L. plantarum* y *Bifidobacterium*, tal como *B. animalis* subsp. *lactis*, son especies representativas de anaerobios aerotolerantes. *Pediococcus*, tales como *P. acidilactici* y *Lactobacillus*, tales como *L. casei* son especies representativas de anaerobios facultativos. *Bacillus*, tales como *B. subtilis*, es una especie representativa de un aerobio estricto. *Saccharomyces*, tal como *S. boulardii* y *S. cerevisiae*, son especies representativas de levadura.

Se cultivan bacterias aerobias, bacterias anaerobias y levadura en un medio que comprende al menos una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en: caseína, lactato, dextrosa, fructosa, fructano, glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, acetato, glicerol, manitol, sorbitol, sacarosa, xilosa, melaza, fucosa, glucosamina, dextrano, una grasa, un aceite, acetato sódico, arabinosa, proteína de soja, proteína soluble, rafinosa, amilosa, almidón, triptona, extracto de levadura y combinaciones de los mismos. Por tanto, las bacterias aerobias, las bacterias anaerobias y la levadura se cultivan en un medio que comprende al menos dos fuentes de carbono seleccionadas del grupo que consiste en: caseína, lactato, dextrosa, fructosa, fructano, glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, acetato, glicerol, manitol, sorbitol, sacarosa, xilosa, melaza, fucosa, glucosamina, dextrano, una grasa, un aceite, acetato sódico, arabinosa, proteína de soja, proteína soluble, rafinosa, amilosa, almidón, triptona, extracto de levadura y combinaciones de los mismos. Las bacterias anaerobias se cultivan en condiciones anaerobias o con condiciones que requieren oxígeno para facilitar el crecimiento de células bacterianas anaerobias, y las bacterias aerobias y las levaduras se cultivan en condiciones apropiadas de oxígeno con un medio que comprende al menos dos fuentes de carbono de por encima y a una temperatura entre 15 °C y 45 °C para *L. plantarum* y 20 °C a 45 °C para *B. breve*, *B.*

animalis subsp. *lactis*, *P. acidilactici*, *L. casei*, *S. boulardii*, y *B. subtilis*. La temperatura óptima para estas cepas es 37 °C, excepto por *S. cerevisiae*, que prefiere 30 °C. El pH del medio es entre 4,0 y 9, más específicamente entre pH 4,0 y 4,5, 4,5 y 5,5, 5,5 y 6,5, 6,5 y 7,5, 7,5 y 8,5, o 8,5 y 9,0. Los microbios se cultivan hasta que haya terminado la fase de crecimiento exponencial, es decir, al menos 1 hora a 6 horas, 6 horas a 12 horas, 12 horas a 24 horas, 24 horas a 36 horas, 36 horas a 48 horas, 48 horas a 72 horas, 72 horas a 96 horas, o 96 horas a 120 horas.

Una vez los medios contienen al menos 1×10^3 UFC/g, los microbios se recogen en condiciones apropiadas y los microbios se liofilizan y/o encapsulan para su uso en formulaciones de pienso para animales.

EJEMPLO 17

Uso de filtración de flujo tangencial para la concentración de cultivos de bacterias aerobias, bacterias anaerobias y levadura

Los métodos presentados en el Ejemplo 2 se usan en este ejemplo con las bacterias aerobias, bacterias anaerobias y levaduras desveladas en el Ejemplo 16 y usando el medio apropiado para permitir el crecimiento celular microbiano óptimo. Similar a *Megasphaera elsdenii*, usando filtración de flujo tangencial en bacterias aerobias (*Bacillus subtilis*), las bacterias anaerobias (*Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus casei*) y levaduras (*Saccharomyces boulardii* y *cerevisiae*) dan resultados similares con respecto a la cantidad de microbios viables recuperados en el permeado y concentrado durante el transcurso del proceso de concentración. Además, el proceso de filtración no tiene un efecto sobre la supervivencia microbiana o sobre la capacidad del microbio para crecer después de ser filtrado. Por lo tanto, los microbios se cultivan en un caldo líquido, se filtran y se preparan para su congelación, liofilización y/o encapsulación.

EJEMPLO 18

Parámetros de congelación y liofilización para bacterias aerobias, bacterias anaerobias y levadura

Para determinar el efecto de los diversos parámetros de congelación y liofilización sobre diferentes tipos de bacterias aerobias, bacterias anaerobias y levadura, se realiza un ejemplo según el Ejemplo 17. Similar al Ejemplo 3, el límite de pérdida de células aceptable se fija en 1,6 log UFC/ml.

Se resuspenden concentrados de *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces boulardii*, and *Saccharomyces cerevisiae* en disoluciones de crioprotector que no contienen crioprotector, lecha desnatada, trehalosa, sacarosa, o una combinación de los mismos antes de la liofilización. Cada mezcla se transfiere a continuación a viales y se congela lentamente a -80 °C o se ultracongela en nitrógeno líquido, antes de colocarse en el liofilizador para ser liofilizada usando o un ciclo rápido o lento.

Todos los concentrados no mezclados con crioprotector tienen pérdida de células superior a los concentrados mezclados con disoluciones de crioprotector y pérdida de células superior al umbral independientemente del ciclo de liofilización o el método de congelación.

Además, todos los procesos de liofilizado que se prueban dan como resultado productos que son capaces de retener una viabilidad suficiente para iniciar el crecimiento del cultivo después de la rehidratación, incluso después de un almacenamiento prolongado de 4 a 12 meses a temperatura ambiente o al menos 4 °C.

EJEMPLO 19

Efectos de las condiciones de almacenamiento sobre el rendimiento y la estabilidad de bacterias aerobias liofilizadas, bacterias anaerobias y levadura

Los métodos de prueba para las características de supervivencia celular y crecimiento microbiano presentadas en el Ejemplo 4 se usan en este ejemplo con bacterias aerobias, bacterias anaerobias y levaduras desveladas en el Ejemplo 16 y usando el medio apropiado para permitir el crecimiento celular microbiano óptimo.

Para determinar el efecto de los protocolos de liofilización y las condiciones de almacenamiento sobre las características de crecimiento y la estabilidad en almacén de *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces boulardii* y *Saccharomyces cerevisiae*, se produjeron cultivos liofilizados como en el Ejemplo 18; a continuación se prueban para las características de crecimiento microbiano y supervivencia celular durante el almacenamiento a 4 °C o 25 °C en condiciones aerobias o anaerobias durante 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 semanas usando el análisis de las curvas de crecimiento y la técnica de siembra por extensión.

Las muestras de bacterias anaerobias liofilizadas que se almacenan en condiciones aerobias, independientemente del tratamiento, se descomponen más rápidamente con pérdida de células adicional en comparación con su homólogo conservado anaerobio.

- 5 Las muestras que se almacenan a 25 °C se descomponen más rápidamente que su homólogo conservado a 4 °C.

10 Las muestras que se congelan en nitrógeno líquido y se conservan a 25 °C después de la liofilización no pierden más células que sus homólogos conservados a 4 °C durante el periodo de almacenamiento de 16 semanas; sin embargo, las diferencias entre muestras son significativas entre el almacenamiento de 25 °C y 4 °C después de 20 y/o 24 semanas de almacenamiento.

15 En cada día de muestreo, se realiza un experimento de curva de crecimiento para comparar las características de crecimiento del producto liofilizado con el producto no liofilizado. Las muestras no liofilizadas que se usan para cada curva de crecimiento son "frescas" (no más de 2 días de edad). Los productos liofilizados conservados a 4 °C tienen un periodo de latencia más corto que los productos liofilizados conservados a 25 °C. Después de 16 semanas de almacenamiento, todas las muestras de bacterias anaerobias que contienen un crioprotector, congeladas en nitrógeno líquido, liofilizadas y conservadas en condiciones anaerobias que son revividas, son viables otra vez. Similarmente, todas las muestras de bacterias aerobias y levadura que contienen un crioprotector, congeladas en nitrógeno líquido y liofilizadas que son revividas, también son viables otra vez.

20 EJEMPLO 20

Efectos de las condiciones de almacenamiento sobre el rendimiento y la estabilidad de bacterias aerobias y anaerobias encapsuladas liofilizadas y levaduras

25 Los concentrados de congelación y liofilización de diversas bacterias aerobias, bacterias anaerobias y levaduras se realizan como se describen en los Ejemplos 16-19. Después de la liofilización, las bacterias anaerobias se mezclan con un vehículo (agente de carga) y se encapsulan dispersando el polvo liofilizado en aceite calentado como se describe en el Ejemplo 14. La mezcla se enfría entonces rápidamente y el producto resultante se muestrea para
30 determinar la supervivencia de los microbios. Las muestras microbianas anaerobias se resuspenden en la cámara anaerobia con diluyente anaerobio, se mezclan durante 15 segundos, y se deja que se rehidraten durante 40 minutos a temperatura ambiente antes ser sembradas en agar de lactato semidefinido. Las muestras microbianas aerobias se resuspenden en las concentraciones atmosféricas normales de oxígeno con un diluyente, se mezclan durante 15 segundos y se deja que se rehidraten durante 40 minutos a temperatura ambiente antes sembrarse sobre agar de
35 lactato semidefinido. Este experimento se repite tres veces usando diferentes temperaturas de calentamiento y diferentes tipos de aceites (método 1, 2 y 3). El método 1 usa una temperatura de calentamiento de 110 °C y un destilado de aceite de palma como material de encapsulación. El método 2 usa una temperatura de calentamiento de 52 °C y una mezcla de mono- y diglicéridos de ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico como material de encapsulación. El método 3 usa una temperatura de calentamiento de 65 °C y una mezcla de mono- y diglicéridos de ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico como material de encapsulación.
40

45 El porcentaje de pérdida de células de la encapsulación es inferior al 40 % usando el método 2 o 3. Después de la encapsulación de las diversas bacterias aerobias, bacterias anaerobias y levaduras, los microbios encapsulados que se almacenan a temperatura ambiente en condiciones normales de oxígeno atmosférico solo tienen una ligera reducción en la viabilidad celular durante el transcurso del almacenamiento (por ejemplo, disminución de 0,5 a 2 log en la viabilidad celular).

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de células de *Megasphaera elsdenii* liofilizadas, que comprende:

- 5 (a) preparar un cultivo líquido en condiciones anaerobias que comprende células de *M. elsdenii* y un medio de crecimiento que comprende al menos dos fuentes de carbono seleccionadas del grupo que consiste en: caseína, lactato, dextrosa, fructosa, fructano, glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, acetato, glicerol, manitol, sacarosa, xilosa, melaza, fucosa, glucosamina, dextrano, una grasa, un aceite, glicerol, acetato sódico, arabinosa, proteína de soja, proteína soluble, rafinosa, amilosa, almidón, y combinaciones de los mismos, en donde el volumen de cultivo líquido
10 es entre aproximadamente 2 litros y aproximadamente 75.000 litros,
(b) extraer las células en condiciones anaerobias,
(c) añadir al menos un crioprotector a las células extraídas,
(d) congelar las células,
(e) liofilizar las células, y
15 (f) en donde aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{12} UFC/g de células de *M. elsdenii* son viables después de la liofilización.

2. El método de la reivindicación 1, en donde las al menos dos fuentes de carbono consisten en aproximadamente 50-90 % de una primera fuente de carbono y aproximadamente 10-50 % de una segunda fuente de carbono, en donde la
20 segunda fuente de carbono es diferente de la primera fuente de carbono, y en donde el 100 % de las al menos dos fuentes de carbono consiste en la primera fuente de carbono y la segunda fuente de carbono.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la extracción comprende al menos una técnica seleccionada del grupo que consiste en: centrifugación, filtración, diálisis, ósmosis inversa, y combinaciones de las mismas,
25 opcionalmente

en donde la filtración comprende filtración de flujo tangencial, y/o
en donde el cultivo comprende un líquido, y en donde la extracción comprende retirar aproximadamente del 60 % a
30 aproximadamente el 100 % del líquido, en donde la extracción de las células en condiciones anaerobias ocurre antes de que el cultivo entre en la fase estacionaria y/o en donde la congelación es a una temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -210 °C.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la congelación comprende poner en contacto un
35 recipiente que comprende las células de *M. elsdenii* con nitrógeno líquido, y/o en donde la congelación comprende poner en contacto las células con nitrógeno líquido, y/o
en donde la congelación es a una temperatura de aproximadamente -196 °C y produce sedimentos congelados que comprenden las células, y en donde el diámetro de los sedimentos congelados es aproximadamente de 0,0254 mm (0,001 pulgadas) a aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas), y/o en donde el pH del cultivo de *M. elsdenii* antes de la extracción es entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 7,0.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{12} UFC/g de las células liofilizadas de *M. elsdenii* son viables después del almacenamiento a una temperatura de aproximadamente 25 °C durante al menos 2 semanas, o en donde aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{12} UFC/g de las células de *M. elsdenii* liofilizadas son viables después del almacenamiento a aproximadamente
45 4 °C durante más de 1 mes.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el al menos un crioprotector está presente en una cantidad de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 % (p/v) del cultivo.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el volumen de cultivo líquido es al menos aproximadamente 50 litros.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde las células en el cultivo consisten en células de
55 *M. elsdenii*.

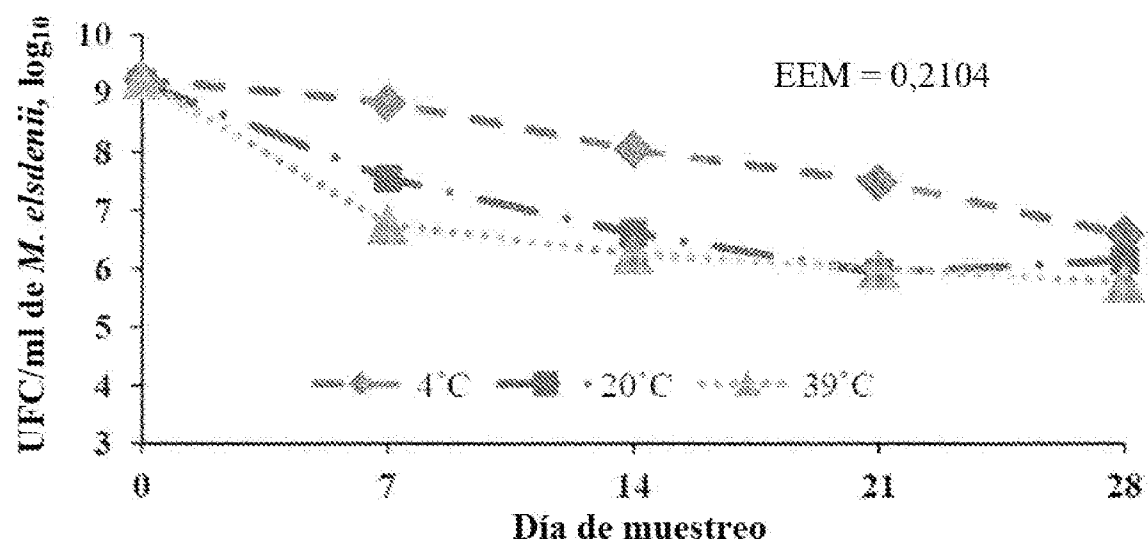


FIG. 1

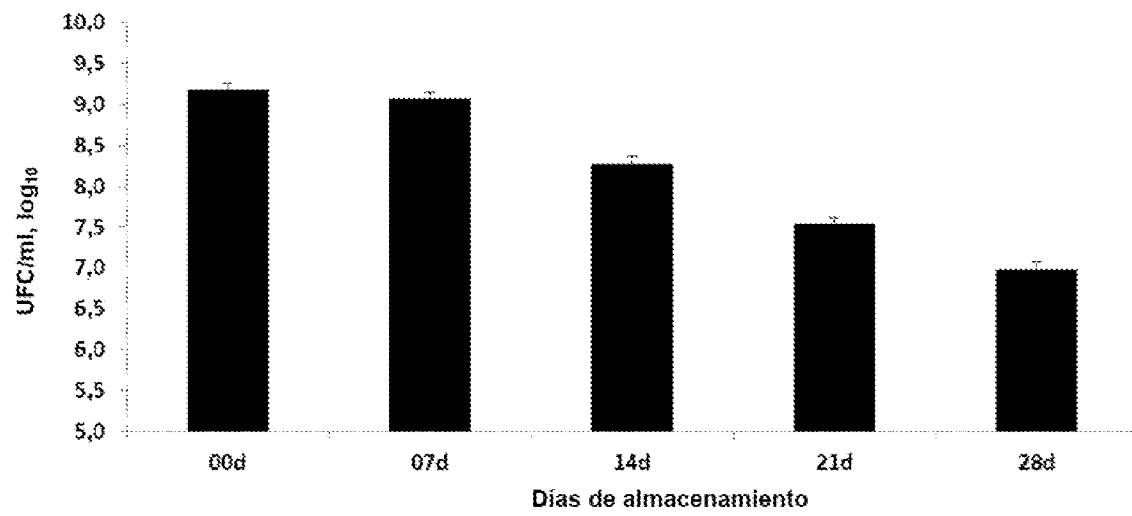


FIG. 2

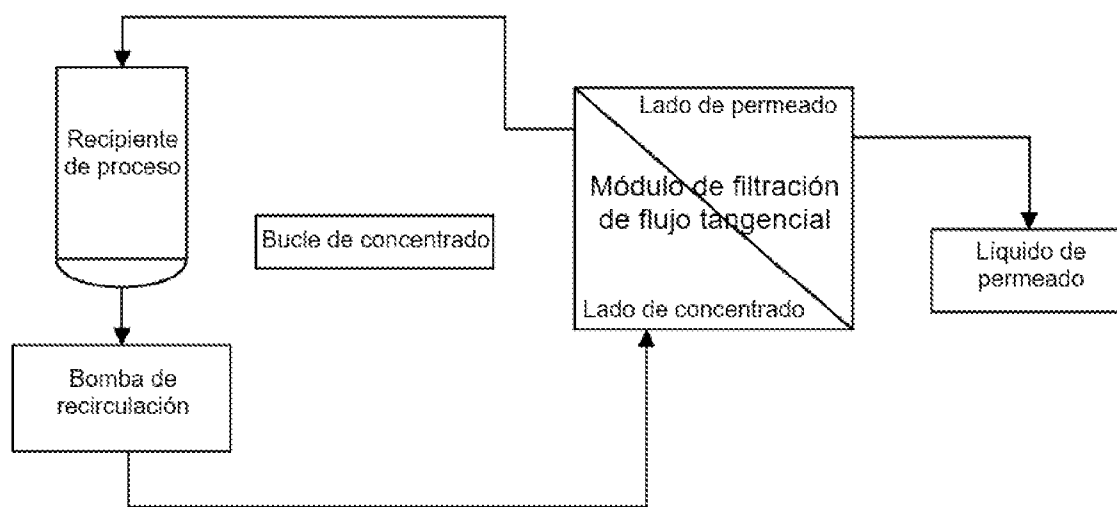


FIG. 3

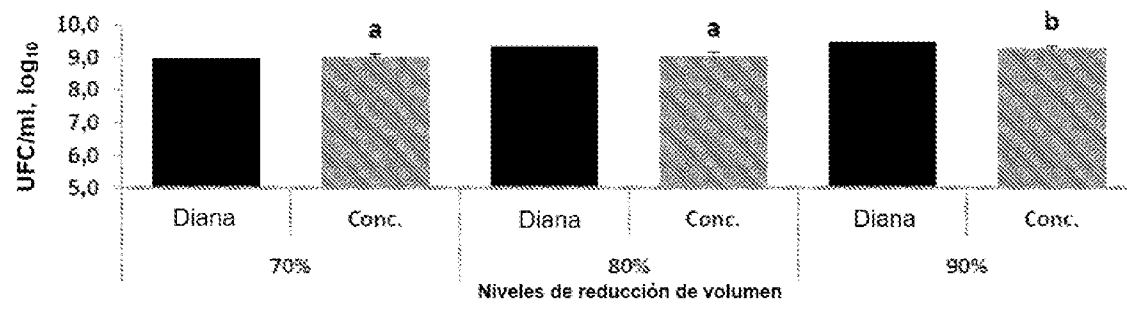


FIG. 4

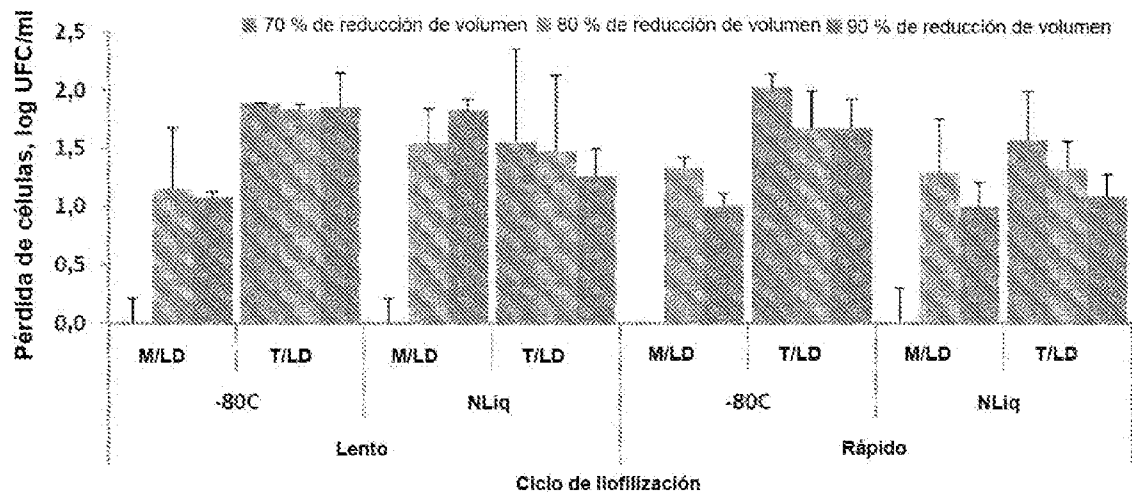


FIG. 5

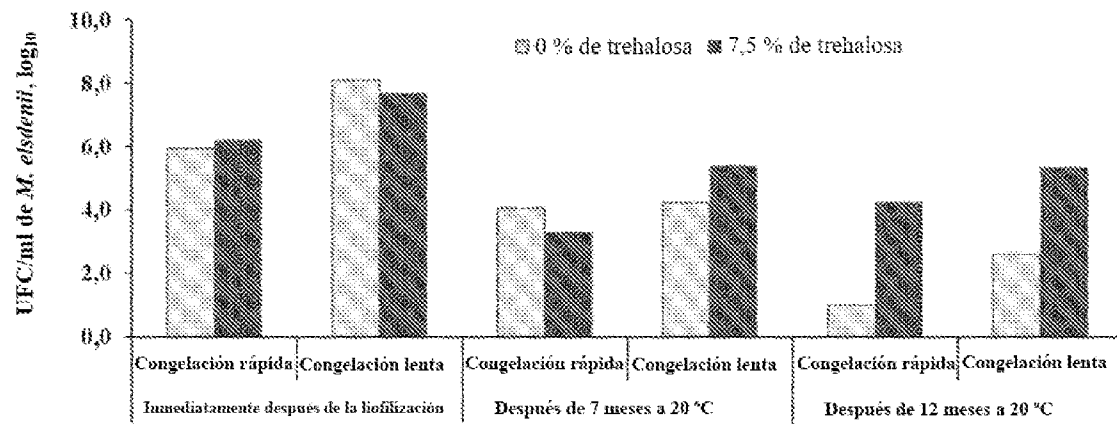


FIG. 6

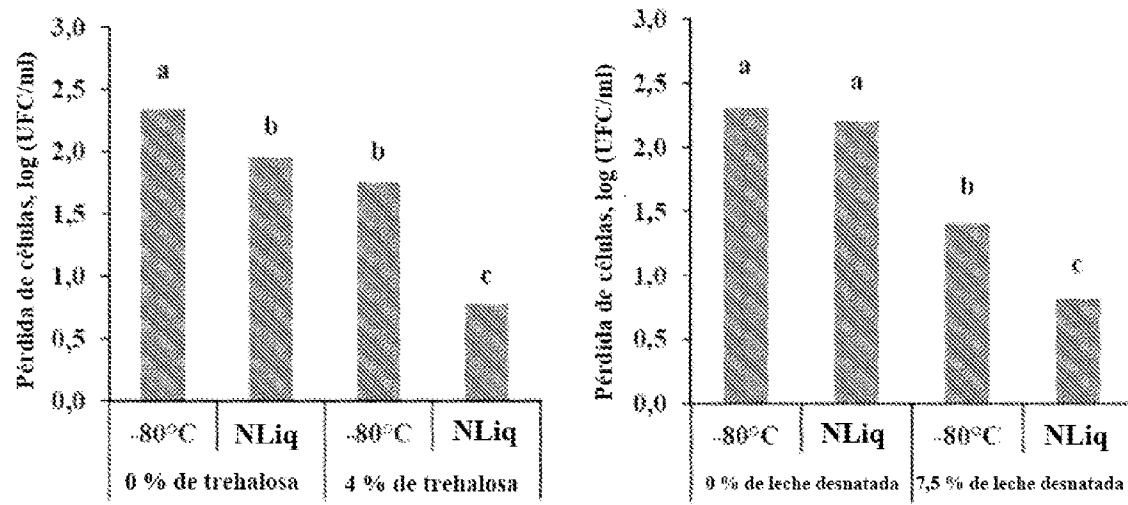


FIG. 7

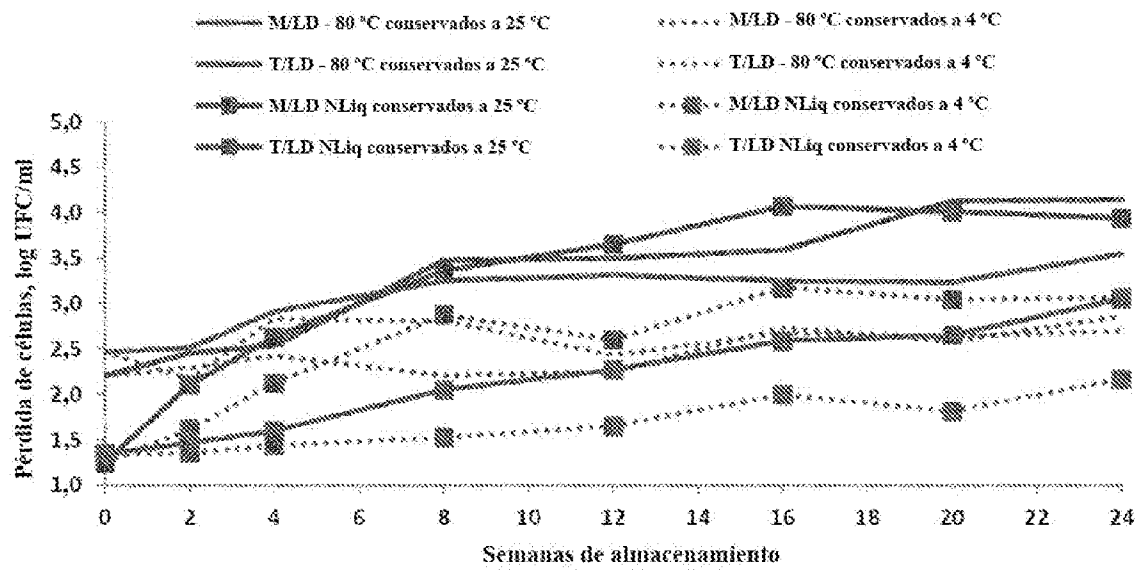


FIG. 8

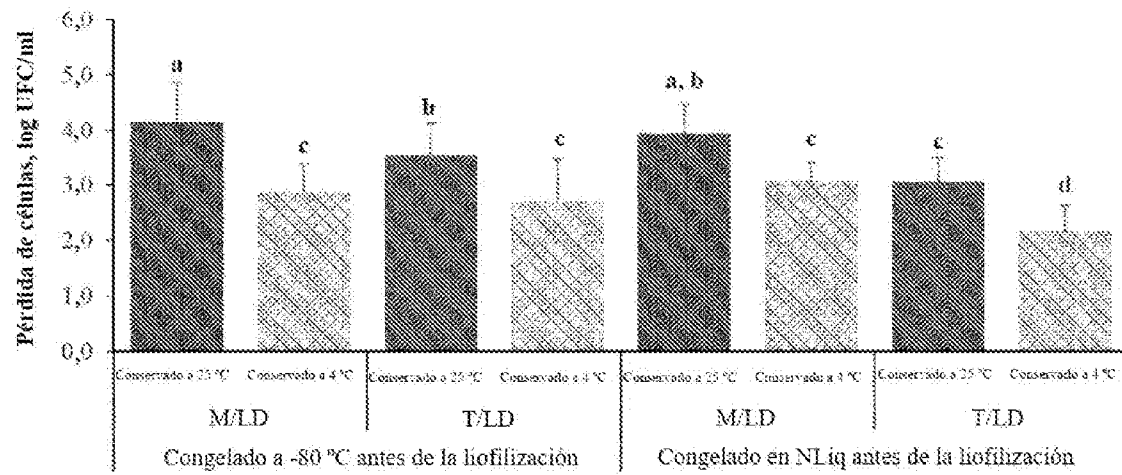


FIG. 9

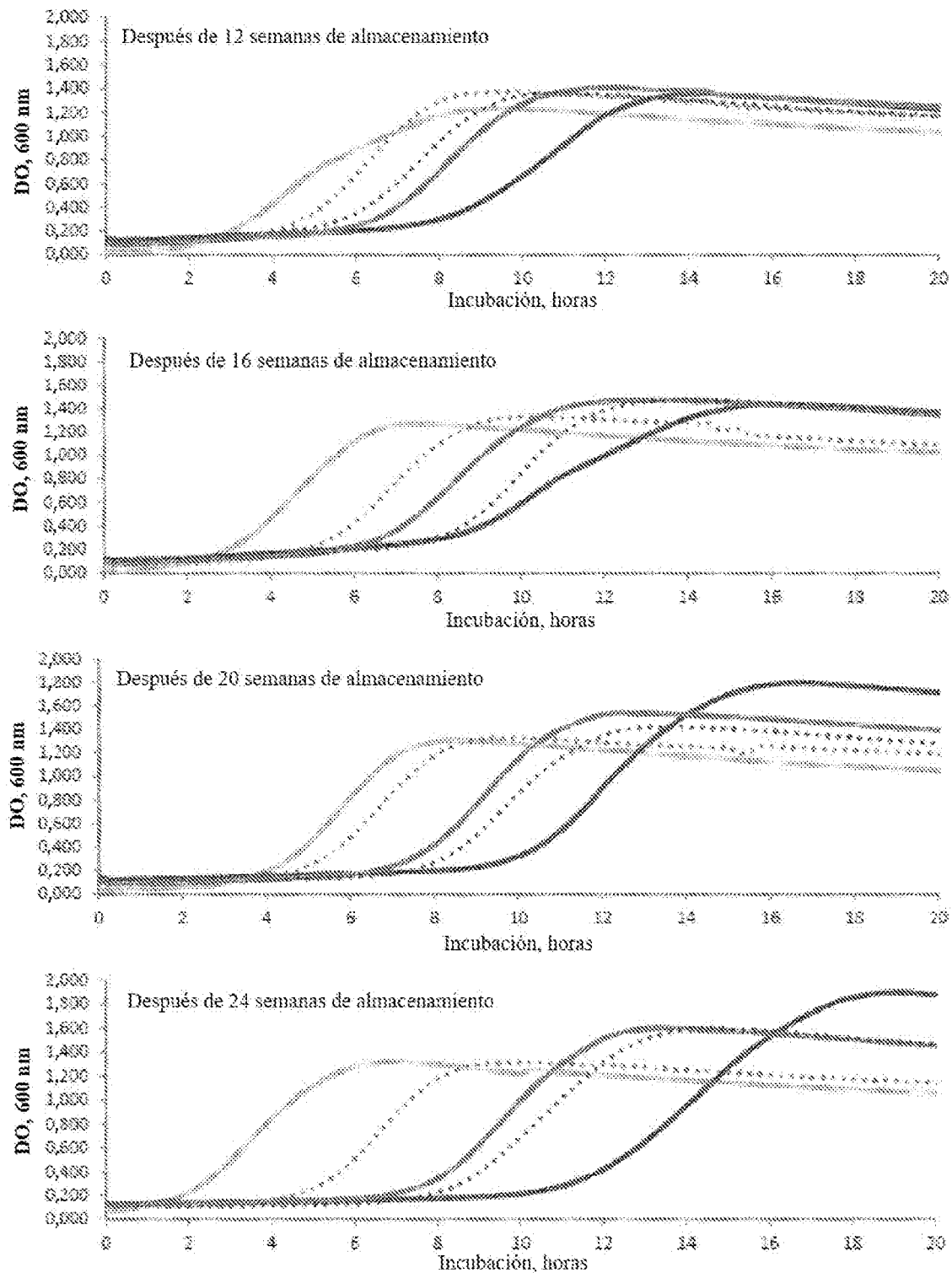


FIG. 10

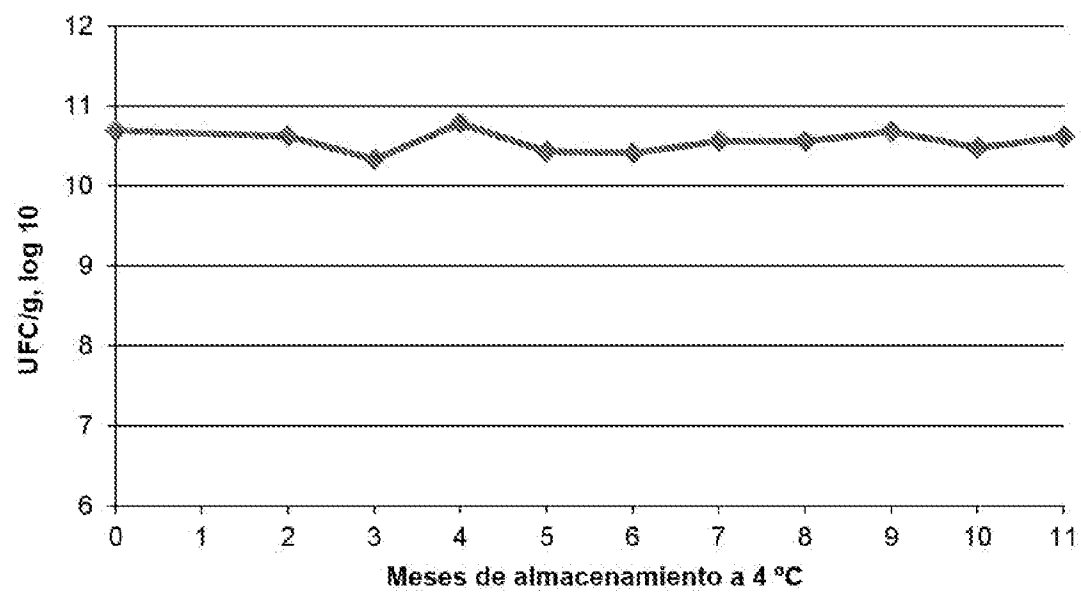


FIG. 11

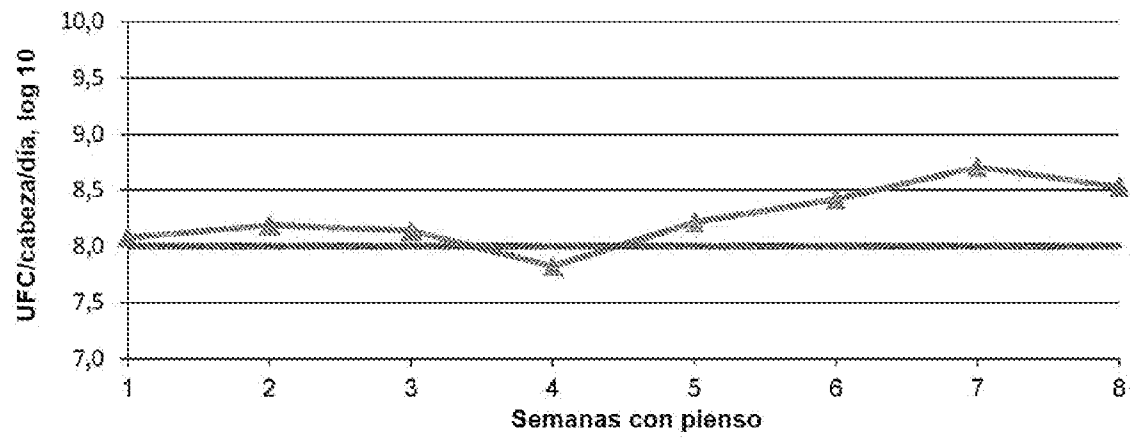


FIG. 12

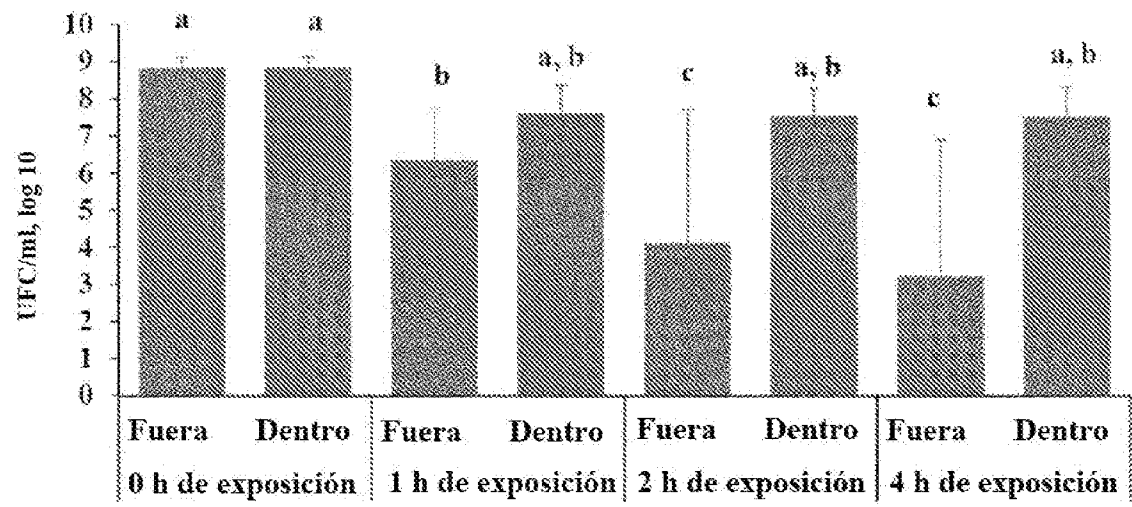


FIG. 13

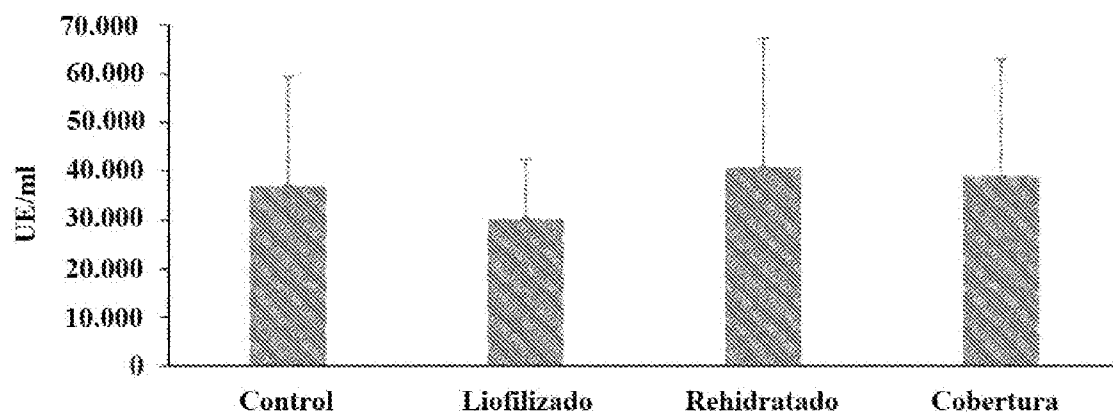


FIG. 14

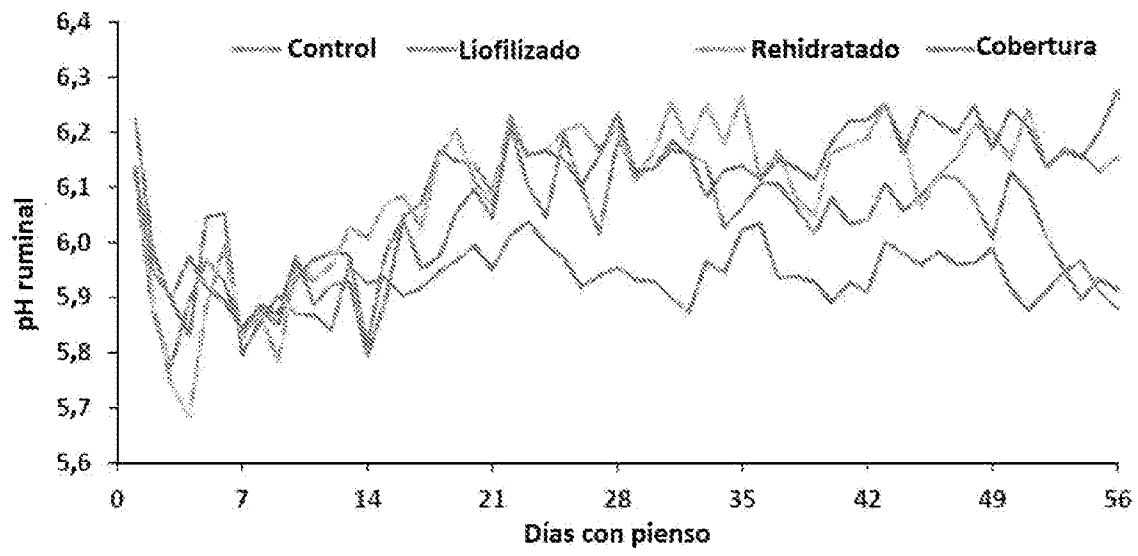


FIG. 15

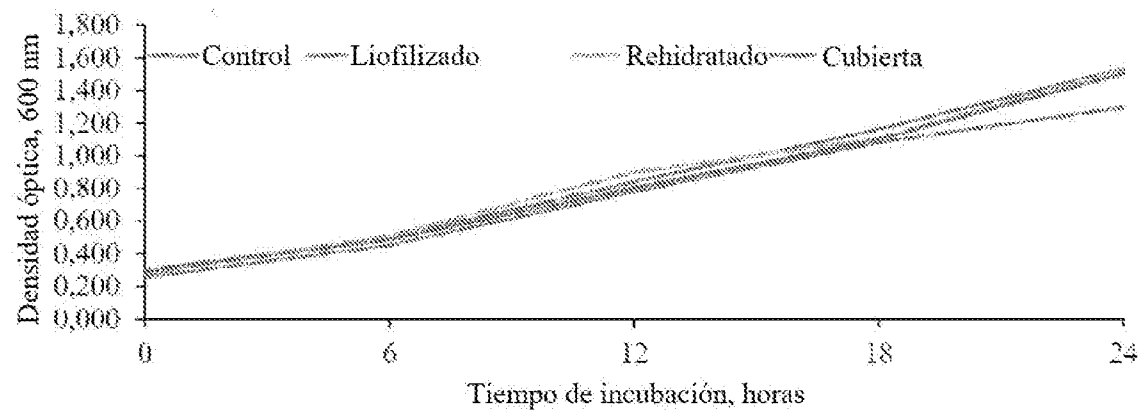


FIG. 16

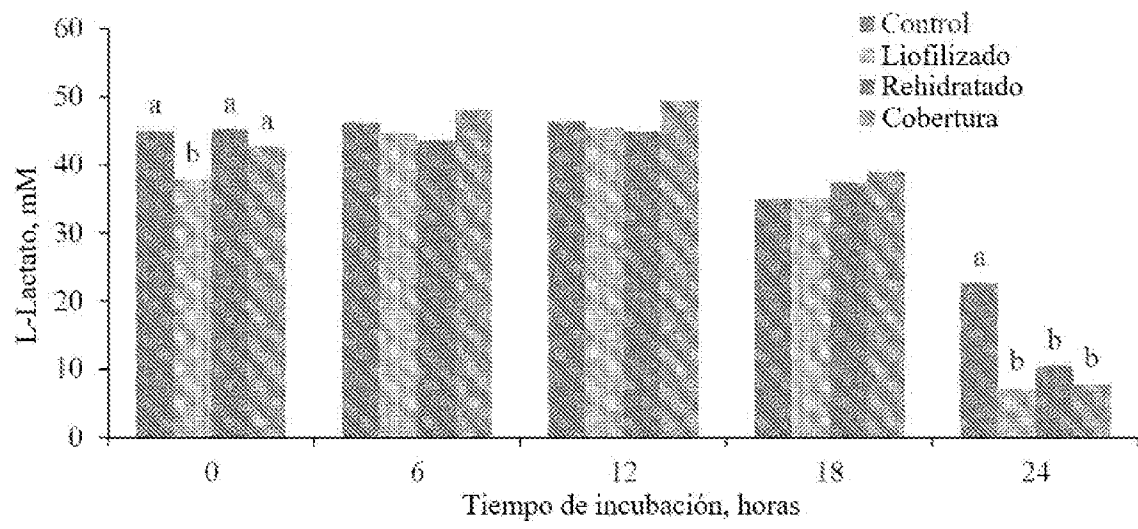


FIG. 17

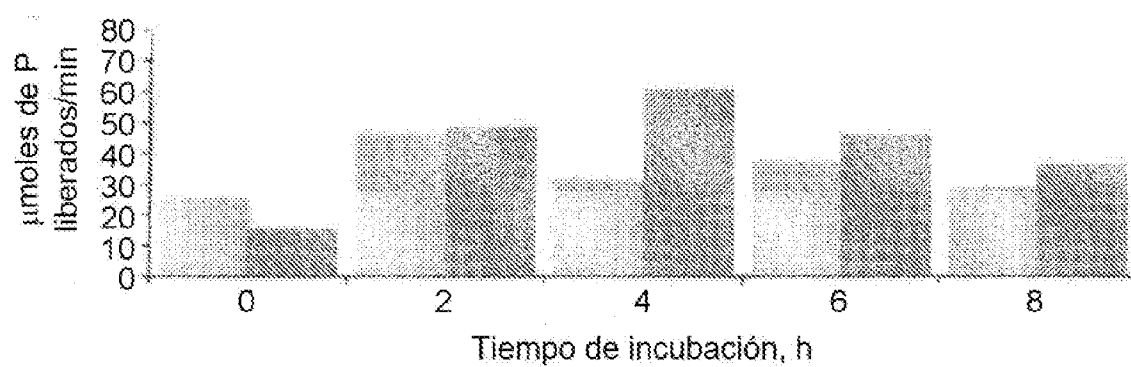


FIG. 18

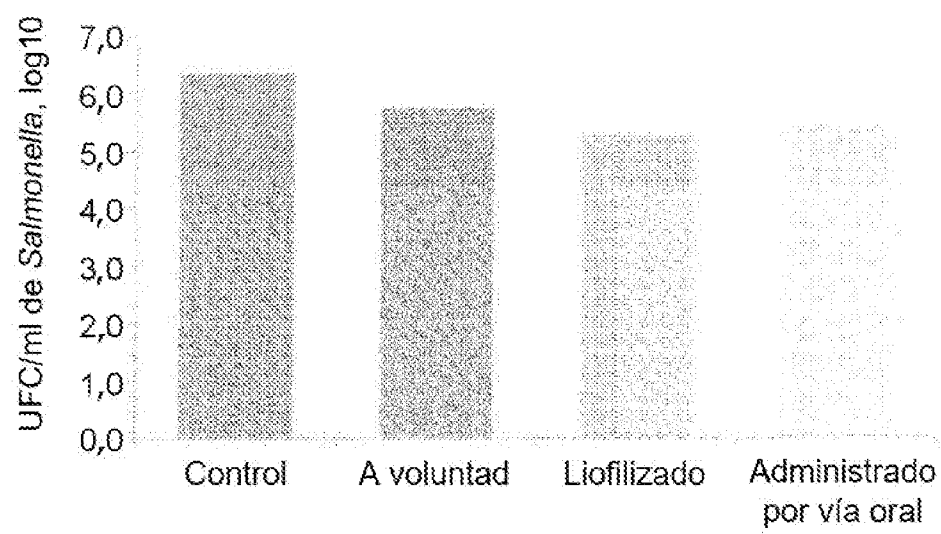


FIG. 19

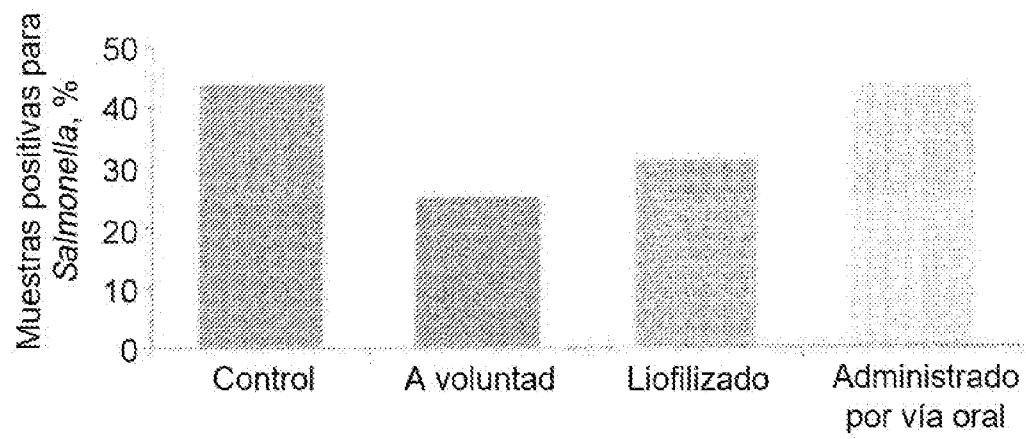


FIG. 20

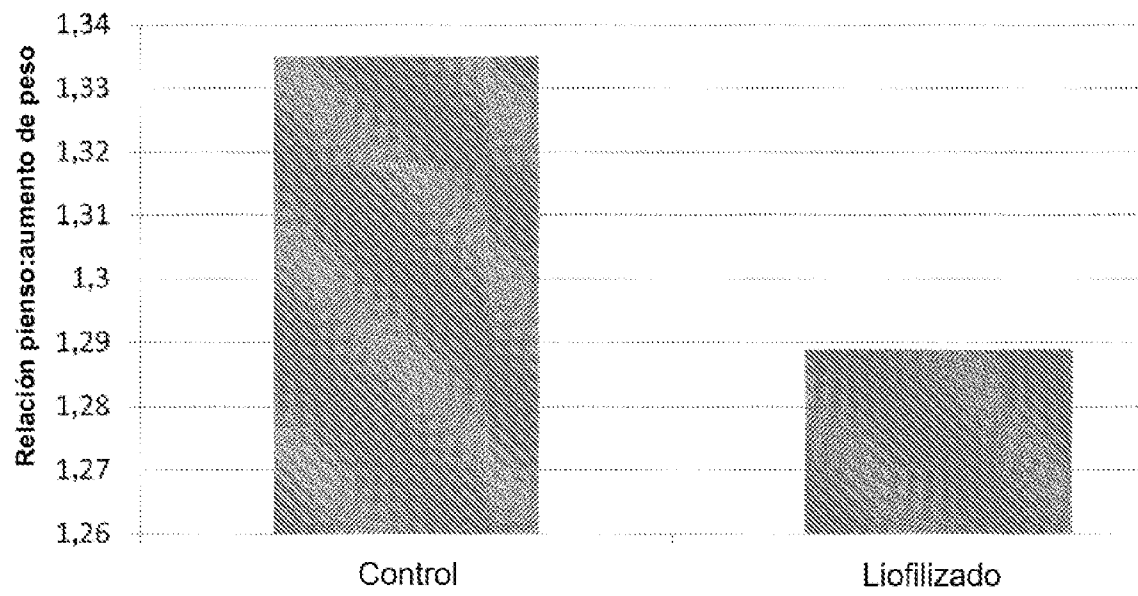


FIG. 21

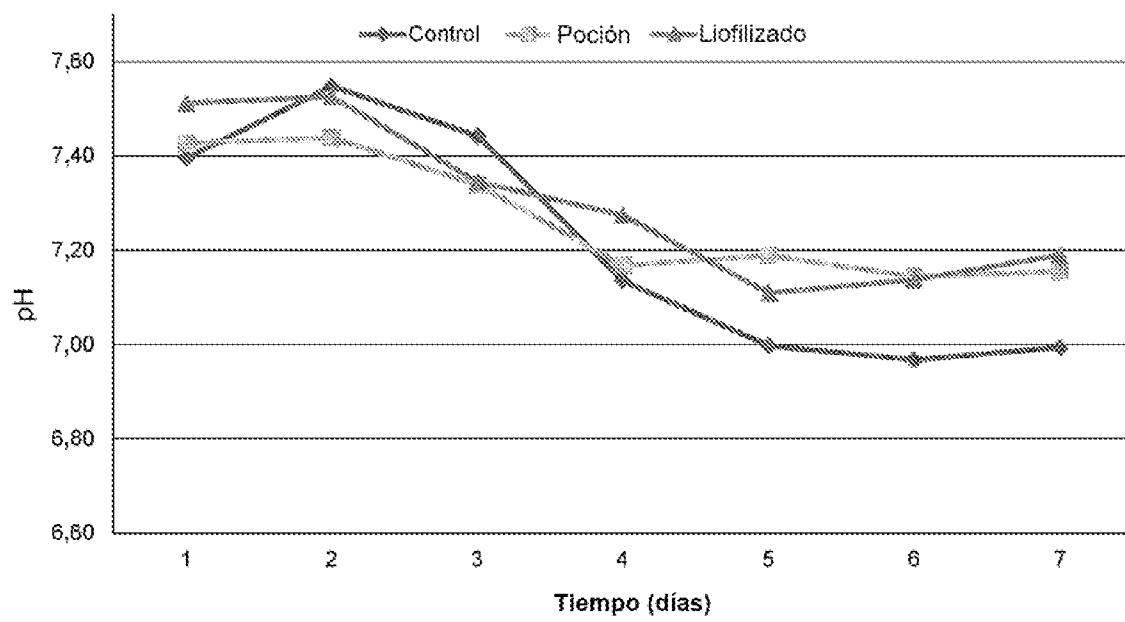


FIG. 22

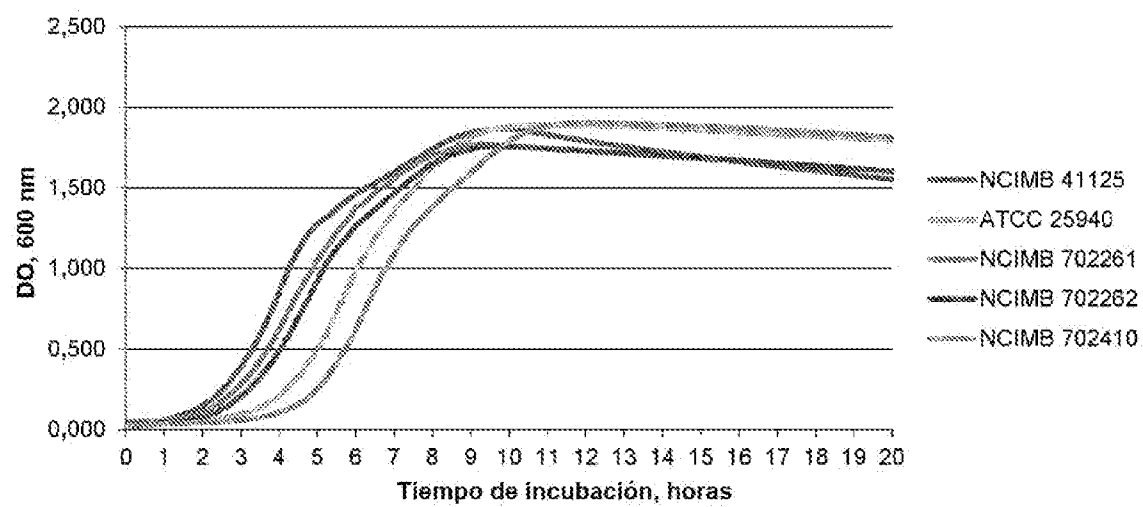


FIG. 23

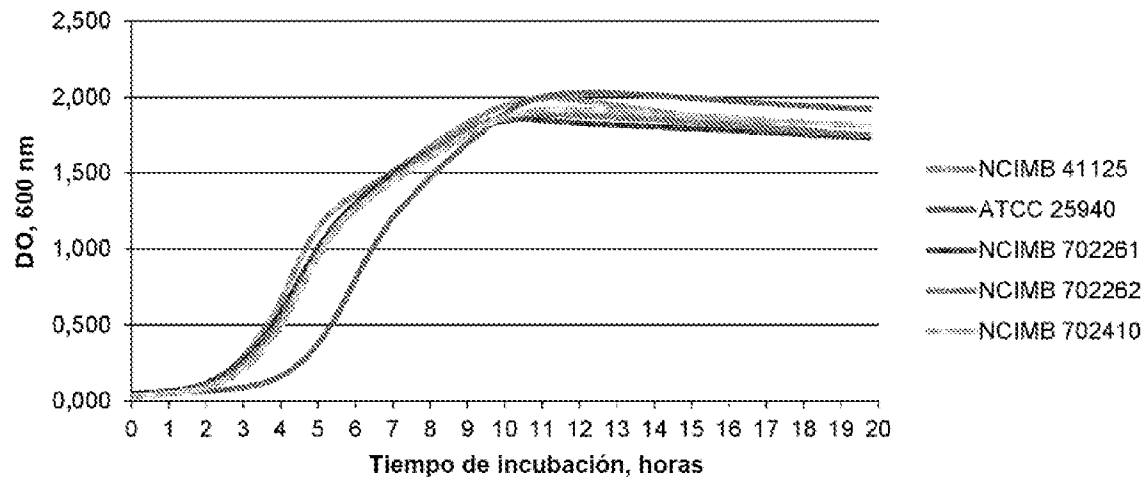


FIG. 24

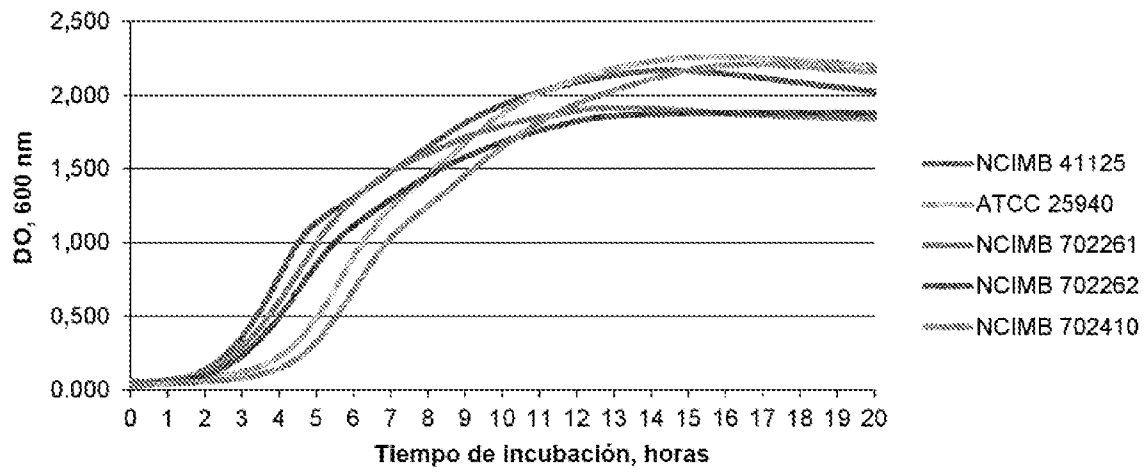


FIG. 25

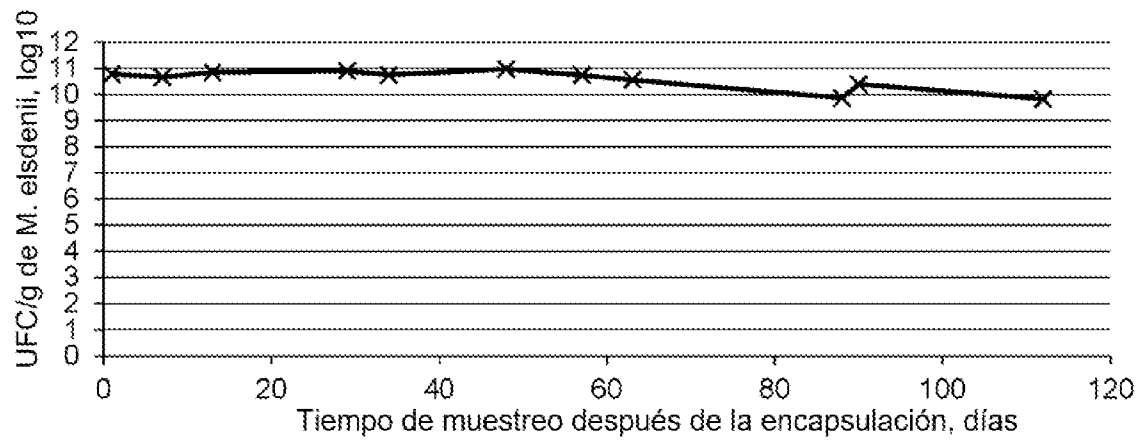


FIG. 26

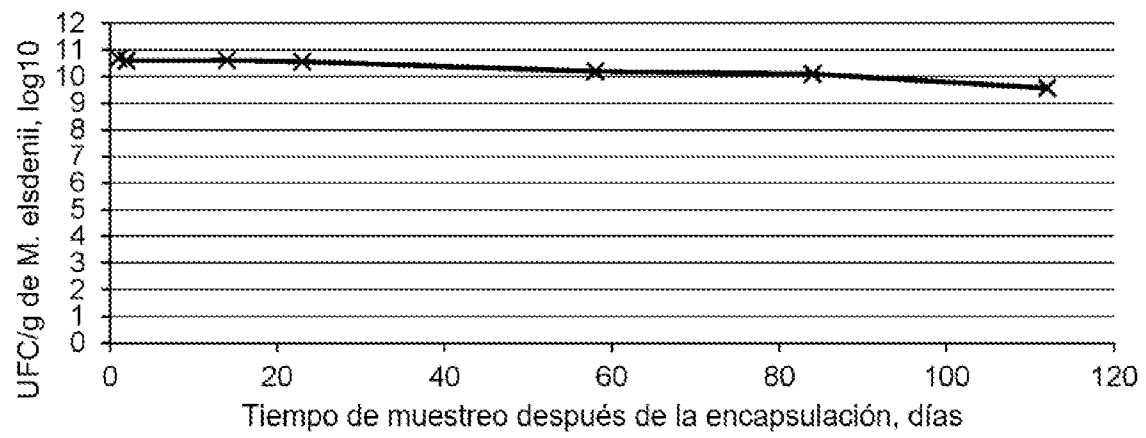


FIG. 27

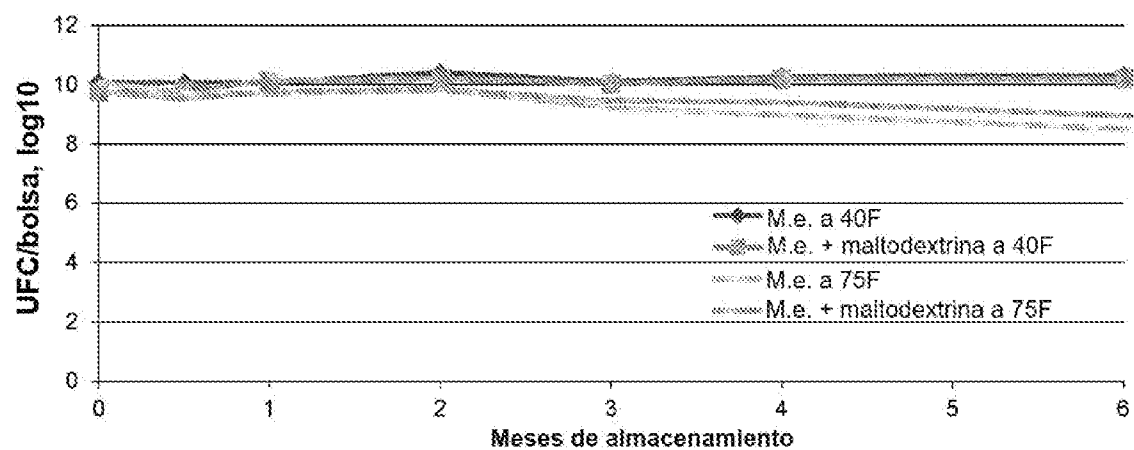


FIG. 28