

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 164**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/742** (2015.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12R 1/225** (2006.01)  
**C12R 1/125** (2006.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**A01K 45/00** (2006.01)  
**A61K 35/744** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2017 PCT/US2017/014888**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17132230**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2017 E 17704363 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.05.2021 EP 3407903**

54 Título: **Método para reducir la floración microbiana en cultivos de aves**

30 Prioridad:

**25.01.2016 US 201662286759 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.12.2021**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (50.0%)**  
**Krogshøjvej 36**  
**2880 Bagsvaerd, DK y**  
**BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF**  
**ARKANSAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WOLFENDEN, ROSS;**  
**LUM, JACOB;**  
**HARGIS, BILLY;**  
**BIELKE, LISA y**  
**GRAHAM, LUCAS**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 883 164 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para reducir la floración microbiana en cultivos de aves

5 Referencia a un depósito de material biológico

[0001] Esta solicitud contiene una referencia a un depósito de material biológico. Para obtener la información completa, consulte el ejemplo 1.

10 Referencia al listado de secuencias

[0002] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador. Índice de la lista de secuencias:

15 La SEC ID N.º: 1 es ADNr 16S de *Pediococcus acidilactici* FM18 depositado como NRRL B-50964.  
 La SEC ID N.º: 2 es ADNr 16S de *Pediococcus acidilactici* TY036 depositado como NRRL B-50959.  
 La SEC ID N.º: 3 es ADNr 16S de *Enterococcus faecium* MFF109 depositado como NRRL B-50960.  
 La SEC ID N.º: 4 es ADNr 16S de *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositado como NRRL B-50914.  
 La SEC ID N.º: 5 es ADNr 16S de *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositado como NRRL B-50910.  
 La SEC ID N.º: 6 es ADNr 16S de *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositado como NRRL B-50908.

20 CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La invención se refiere a bacterias formadoras de esporas y bacterias del ácido láctico para su aplicación en los gabinetes incubación de aves de corral para alterar la floración microbiana hacia una microbiota más beneficiosa, afectando positivamente los parámetros de rendimiento como la mortalidad, el aumento de peso corporal y/o la tasa de conversión alimenticia en toda la producción avícola.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

30 [0004] Las incubadoras de aves de corral modernas se han expandido en tamaño y escala debido a la mayor demanda de los consumidores. Un aumento en la producción de la incubadora requiere un aumento en las operaciones relacionadas, como el movimiento de personal y vehículos y el uso casi continuo de las instalaciones de la incubadora. Para asegurar la producción de polluelos sanos y libres de enfermedades, se deben respetar los máximos estándares sanitarios, especialmente con respecto a los huevos y cualquier equipo que entre en contacto con los huevos. Un área de la incubadora que requiere un cuidado especial son los gabinetes de incubación, donde los polluelos nacerán y estarán expuestos a las primeras bacterias que colonizan el intestino genuo.

40 [0005] A menudo, las bacterias presentes en un gabinete de incubación pueden no ser beneficiosas para los polluelos recién nacidos e incluso pueden ser perjudiciales, como *Salmonella*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, entre otras. El clima cálido y húmedo de los gabinetes de incubación favorece el crecimiento de estos organismos, por lo que es de suma importancia reducir la contaminación y prevenir las "floraciones microbianas". Además, el tracto gastrointestinal (TGI) de las aves de corral depende de las bacterias intestinales saludables para estimular el desarrollo intestinal e inmunológico. Cuanto antes se expongan las aves de corral recién nacidas a estas bacterias "buenas", es menos probable que sean colonizadas por bacterias patógenas y antes comenzará a desarrollarse su TGI.

50 [0006] Tradicionalmente, el saneamiento de la incubadora se ha logrado mediante el uso de productos químicos antimicrobianos, principalmente formaldehído fumigado para reducir los patógenos de la incubadora. Al llegar a la incubadora, los huevos a veces se desinfectan para eliminar los microbios transferidos desde la gallina y el material fecal. Esto no elimina todas las bacterias, que continuarán creciendo en el ambiente cálido y húmedo de las incubadoras y pueden florecer después de transferirse a los gabinetes de incubación. Esto también puede reducir la incubabilidad de los huevos. Es común fumigar los gabinetes de incubación con formaldehído para evitar esta floración, aunque el formaldehído puede causar algunos efectos nocivos a los pollos en sí, ya que es un irritante conocido y es un peligro para la seguridad del personal de la incubadora. Las altas concentraciones de formaldehído pueden causar irritación de las membranas mucosas tanto en aves como en humanos y desencadenar síntomas similares al asma y es cancerígeno en humanos. Numerosos países se han movilizado para prohibir o reducir drásticamente el límite de exposición a corto plazo al formaldehído, por lo que se han probado varias alternativas en los últimos años. Además, el manejo del formaldehído requiere una amplia formación en seguridad y un equipo especializado para aplicarlo de manera segura.

60 [0007] Se han propuesto varias alternativas químicas al formaldehído, como el amonio cuaternario y el glutaraldehído. Aunque es más seguro y no cancerígeno, el glutaraldehído todavía se considera un irritante y es tóxico y, por lo tanto, el límite máximo de exposición se establece en 0.05 ppm. Si bien son más seguras, estas alternativas químicas no han sido tan efectivas para controlar la "floración" bacteriana dentro de las incubadoras.

65 [0008] Con una preocupación creciente por la seguridad de los empleados y el impulso de los consumidores para

eliminar los productos químicos de la cadena alimentaria, ha habido una creciente investigación sobre soluciones biológicas para el saneamiento y el control microbiano en la industria agrícola. El formaldehído y otros desinfectantes químicos tampoco abordan la necesidad de exposición a bacterias comensales útiles.

5 [0009] Para lograr esto, se han aplicado formulaciones de bacterias probióticas después de la eclosión. Por lo general, estas se han aplicado en la incubadora durante el procesamiento de los polluelos o poco después de su alojamiento en la granja avícola.

10 [0010] Promsopone et al. (J. Food Protection 61 (2): 176-180 (1998)) describen el uso de anticuerpos específicos de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* y *S. typhimurium* para reducir *S. typhimurium* en los pollos de engorde. En la solicitud PCT WO 2012/110777, se describe una composición de aditivo alimentario que comprende un microbio alimentado directamente en combinación con una proteasa y una fitasa para mejorar la tasa de conversión alimenticia (TCA), la tasa de crecimiento y las bacterias beneficiosas en el tracto gastrointestinal de un individuo. La solicitud de patente coreana KR20150117184 describe composiciones de aditivos alimentarios que comprenden una cepa de *Lactobacillus plantarum*, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* para evitar bacterias dañinas cuando se alimenta al ganado.

20 [0011] Sin embargo, el tiempo desde la eclosión hasta la primera exposición a estas bacterias probióticas puede llegar hasta las 48 horas después de la eclosión, dependiendo del tiempo real de eclosión de un polluelo determinado y de cuándo se aplica el probiótico después de la eclosión. Dado que los pollos de engorde solo viven un promedio de 42 días, 48 horas es un periodo de tiempo significativo antes de que se les proporcionen microorganismos beneficiosos. Además, como las bacterias patógenas son relativamente más comunes en la incubadora y en su entorno, es más probable que los polluelos se expongan a los patógenos antes que a los comensales.

25 [0012] Por tanto, existe la necesidad de una formulación como, *p. ej.*, una formulación probiótica, que controla la floración bacteriana en la incubadora sin tener los inconvenientes del formaldehído y otros desinfectantes químicos.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

30 [0013] La invención se refiere a un método para mejorar uno o varios parámetros de rendimiento de aves de corral que comprende el paso de administrar uno o varios probióticos que comprenden una o varias cepas de *Bacillus* y una o varias cepas de bacterias del ácido láctico en el gabinete de incubación de aves de corral, donde una o varias bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste en

- 35 i) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964 o un mutante de la misma,
- 40 ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959 o un mutante de la misma, y
- 45 iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960 o un mutante de la misma,

50 donde se reduce el nivel de bacterias patógenas y donde se incuban menos del 90 % de los huevos cuando se administran uno o varios probióticos en el gabinete de incubación de aves de corral. La invención se refiere además a una composición que comprende una o varias cepas de *Bacillus* y una o varias cepas de bacterias del ácido láctico que además comprenden un coadyuvante de flujo de silicato, donde la bacteria o bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste en

- 55 i) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964 o un mutante de la misma,
- 60 ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959 o un mutante de la misma, y
- iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960 o un mutante de la misma, y en el que uno o varios *Bacillus* se seleccionan del grupo que consiste en
- I) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositada como NRRL con número de depósito B-50914, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositada como NRRL con número de depósito B-50914 o un mutante de la misma,

ii) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositada como NRRL con número de depósito B-50910, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositada como NRRL con número de depósito B-50910 o un mutante de la misma, y

5 ii) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositada como NRRL con número de depósito B-50908, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositada como NRRL con número de depósito B-50908 o un mutante de la misma.

Los aislados bacterianos se han depositado en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, EE. UU., con los números de acceso identificados anteriormente.

10

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014]

15 La FIG. 1 ilustra la cantidad de bacterias generales presentes en la incubadora después de la administración de la formulación bacteriana en el experimento 1.

La FIG. 2 ilustra la cantidad de bacterias de ácido láctico presentes en la incubadora después de la administración de la formulación bacteriana en el experimento 1.

20 La FIG. 3 ilustra la cantidad de bacterias gramnegativas/coliformes presentes en la incubadora después de la administración de la formulación bacteriana en el experimento 1.

La FIG. 4 ilustra la evaluación de bacterias generales y combinaciones de aislados bacterianos de ácido láctico en la reducción de patógenos de las aves de corral en un ensayo *in vitro* de recubrimiento.

La FIG. 5 ilustra la cantidad de bacterias de ácido láctico presentes en la incubadora después de la administración de la formulación bacteriana en el experimento 2.

25 La FIG. 6 ilustra la cantidad de bacterias gramnegativas/coliformes presentes en la incubadora después de la administración de la formulación bacteriana en el experimento 2.

La FIG. 7 ilustra el impacto de la formulación bacteriana en el peso corporal a los 7 días y la mortalidad en el experimento 3 de pollos de engorde.

30 La FIG. 8 ilustra el impacto de la formulación bacteriana en el peso corporal y la viabilidad de los pollos de engorde a la venta en un experimento de entorno comercial 3.

La FIG. 9 ilustra el impacto de la formulación bacteriana en la conversión alimenticia de pollos de engorde a la venta en un experimento de entorno comercial 3.

## DEFINICIONES

35

[0015] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece la divulgación. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o en las pruebas del tema de la presente divulgación, se describen los métodos y materiales preferidos. Para los propósitos de la presente divulgación, los siguientes términos se definen a continuación.

40

[0016] Los artículos "un" y "uno" se utilizan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" se refiere a un elemento o más de un elemento.

45

[0017] El término "aproximadamente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta en un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

50

[0018] A lo largo de esta divulgación, a menos que el contexto requiera lo contrario, las palabras "comprende", "comprenden" y "comprendiendo" se entenderá que implica la inclusión de un paso o elemento o grupo de pasos o elementos establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro paso o elemento o grupo de pasos o elementos.

55

[0019] El término "que consiste en" significa que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. El término "que consiste esencialmente en" significa que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren ni contribuyen a la actividad o acción especificada en la descripción de los elementos enumerados. Por tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no dependiendo de si afectan o no materialmente a la actividad o acción de los elementos enumerados.

60

[0020] Los términos "administrando" o "administrar" incluyen proporcionar una formulación probiótica de la divulgación a un animal, preferiblemente por administración oral.

65

[0021] Una cantidad "disminuida" o "reducida" suele ser una cantidad "estadísticamente significativa" y puede incluir una disminución 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 250, 500, 1000 o más veces menor, incluyendo todos los números enteros y puntos decimales intermedios y superiores a 1 (*p. ej.*, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9), que la cantidad producida por un animal en ausencia de una formulación probiótica. Una disminución puede incluir una disminución de al menos un logaritmo ( $\text{Log}_{10}$ ) o más, menor que la cantidad producida por un animal en ausencia de una formulación probiótica. Una cantidad disminuida o reducida puede incluir una disminución que sea al menos aproximadamente 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces o 30 veces menor que la cantidad producida por un animal en ausencia de una formulación probiótica.

[0022] Una "disminución" en una respuesta puede ser "estadísticamente significativa" en comparación con la respuesta producida por un animal en ausencia de una formulación probiótica, y puede incluir un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de disminución, incluyendo todos los números enteros intermedios.

[0023] Una cantidad "aumentada" suele ser una cantidad "estadísticamente significativa" y puede incluir un aumento 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 250, 500, 1000 o más veces mayor, incluyendo todos los números enteros y puntos decimales intermedios y superiores a 1 (*p. ej.*, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9), que la cantidad producida por un animal en ausencia de una formulación probiótica. Un aumento puede incluir un aumento de al menos un logaritmo ( $\text{Log}_{10}$ ) o más, menor que la cantidad producida por un animal en ausencia de una formulación probiótica. Una cantidad aumentada puede incluir un aumento que sea al menos aproximadamente 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces o 30 veces mayor que la cantidad producida por un animal en ausencia de una formulación probiótica.

[0024] Un "aumento" en una respuesta puede ser "estadísticamente significativo" en comparación con la respuesta producida por un animal en ausencia de una formulación probiótica, y puede incluir un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de aumento, incluyendo todos los números enteros intermedios.

[0025] El término "aislado" se refiere a un material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un aislado bacteriano aislado puede referirse a un aislado bacteriano que ha sido purificado o retirado de componentes naturales o no naturales que están presentes en su entorno natural.

[0026] El término "modificar" incluye "disminuir" uno o varios parámetros o indicaciones cuantificables, opcionalmente en una cantidad definida y/o estadísticamente significativa. Por "disminuir" o "disminuyendo", "reducir" o "reduciendo", nos referimos generalmente a la capacidad de una formulación probiótica para producir una respuesta fisiológica menor en un animal en relación con la respuesta provocada por una formulación de control. Las respuestas físicas relevantes serán evidentes para los expertos en la técnica. Una cantidad "disminuida" o "reducida" suele ser una cantidad "estadísticamente significativa" y puede incluir una disminución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más veces menor (*p. ej.*, 100, 500, 1000 veces), incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre 1 y por encima de 1 (*p. ej.*, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9), que la cantidad producida por un animal en ausencia de una formulación probiótica. Una disminución puede incluir una disminución de al menos un logaritmo ( $\text{Log}_{10}$ ) o más, menor que la cantidad producida por un animal en ausencia de una formulación probiótica. Una cantidad disminuida o reducida puede incluir una disminución que sea al menos aproximadamente 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces o 30 veces menor que la cantidad producida por un animal en ausencia de una formulación probiótica.

[0027] Tal como se usan en el presente documento, los términos "cuantificar", "cuantificación" u otras palabras relacionadas se refieren a determinar la cantidad, masa o concentración en una unidad de volumen de un parámetro o indicación.

[0028] Tal como se usa en este documento, el término "aves de corral" se refiere a aves domesticadas. Las aves de corral incluyen aves silvestres, aves acuáticas y aves de caza. Los ejemplos de aves de corral incluyen, entre otros, pollos, pollos de engorde, ponedoras, gallos, pavos, patos, gansos, gallinas de Guinea, pavo real, codorniz, paloma, pichón y faisán, preferiblemente pollos, pollos de engorde, ponedoras y pavos. .

[0029] La mortalidad se define como el porcentaje de aves que mueren o son sacrificadas antes de la cosecha. La disminución de la mortalidad es un signo de buena salud de la parvada y baja incidencia de enfermedades.

[0030] Peso corporal/aumento de peso corporal significa que la tasa de crecimiento aumenta cuando se mejora la salud general del animal (se gastan menos recursos en estrés o enfermedad), la TGI funciona de manera más optimizada, se ponen a disposición del animal más nutrientes y/o aumenta la ingesta de alimento.

[0031] El índice de conversión de alimento es la métrica para la conversión de alimento en peso corporal (consumo de alimento/peso corporal). Las mejoras en la conversión alimenticia se atribuyen a una mejor absorción de nutrientes por parte del animal. Esto puede significar que el animal es más capaz de absorber nutrientes debido a

5

1) un cambio en la capacidad de absorción del animal 2) más nutrientes disponibles en la TGI del animal. Con esta métrica, una cantidad/ración más baja es mejor que una cantidad más alta.

[0032] "Eclosión" se refiere a la rotura de la cáscara por la cual un polluelo sale del huevo. 10 % de eclosión significa, por lo tanto, que el 10 % de los huevos tienen cáscaras rotas por las que han emergido los pollos, el 20 % de eclosiones significa que el 20 % de los huevos tienen cáscaras rotas por las que han emergido los pollos, etc.

10

[0033] "Picoteado" se refiere un huevo en el que el polluelo ha roto la cáscara en un intento de eclosionar. A veces, los polluelos mueren poco después de perforar el caparazón. Un 10 % de picoteado significa que el 10 % de los huevos tienen cáscaras rotas por los picoteos de los polluelos, un 20 % de picoteado significa que el 20 % de los huevos tienen cáscaras rotas por los picoteos de los polluelos.

15

[0034] El término "probiótico" se usa en el presente documento para referirse a microorganismos vivos para la administración a humanos o animales con el fin de obtener beneficios asociados para humanos y animales.

20

[0035] Los términos "floración bacteriana" y "floración microbiana" se usan indistintamente en este documento y se entienden como un aumento en el nivel de bacterias patógenas, por ejemplo, un aumento rápido en el nivel de bacterias patógenas debido a un ambiente cálido y húmedo.

25

[0036] Las bacterias coliformes son conocidas por los expertos en la técnica y son bacterias gramnegativas no formadoras de esporas y móviles o inmóviles que pueden fermentar lactosa con la producción de ácido y gas cuando se incuban a 35-37 °C. Su presencia se utiliza para indicar que pueden estar presentes otros organismos patógenos de origen fecal. Los ejemplos de bacterias coliformes incluyen, entre otros, bacterias de los géneros: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Escherichia*.

30

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

##### Método para mejorar los parámetros de rendimiento de las aves de corral

35

[0037] En un aspecto, la invención se refiere a un método para mejorar uno o varios parámetros de rendimiento de aves de corral que comprende el paso de administrar uno o varios probióticos que comprenden una o varias cepas de *Bacillus* y una o varias cepas de bacterias del ácido láctico en el gabinete de incubación de aves de corral, donde una o varias bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste en

40

iii) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964 o un mutante de la misma,

45

ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959 o un mutante de la misma, y

iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960 o un mutante de la misma,

50

donde se reduce el nivel de bacterias patógenas y donde se incuban menos del 90 % de los huevos cuando se administran uno o varios probióticos en el gabinete de incubación de aves de corral.

55

[0038] En una realización preferida, la administración se realiza rociando el probiótico o probióticos en el gabinete de incubación de aves de corral. El sistema de ventilación garantizará preferiblemente una buena distribución en el gabinete de incubación de aves de corral. En una realización aún más preferida, el probiótico o los probióticos son una formulación en polvo, por ejemplo, una formulación en polvo seco. La formulación de polvo seco asegurará una buena distribución en el gabinete de incubación de aves de corral. La aplicación de uno o varios probióticos se realiza preferiblemente mediante un rociado en seco directamente en el gabinete de incubación y la circulación del probiótico o los probióticos por el sistema de ventilación en el gabinete. Una realización se refiere a la aplicación de rociado en seco, *p. ej.*, mediante un sistema neumático. El probiótico o los probióticos están preferiblemente en forma de esporas.

60

65

[0039] En una realización preferida del método, uno o varios probióticos comprenden una o varias cepas de *Bacillus*, *p. ej.*, en forma de esporas. En otra realización preferida, uno o varios probióticos comprenden una o varias cepas de bacterias del ácido láctico, *p. ej.*, en forma de esporas. En una realización específica, uno o varios

probióticos comprenden una o varias cepas de *Bacillus*, *p. ej.*, en forma de esporas) y una o varias cepas de bacterias del ácido láctico (*p. ej.*, en forma de esporas).

[0040] Por tanto, el inventor ha descubierto que una o varias cepas de *Bacillus* y/o una o varias cepas de bacterias del ácido láctico, cuando se proporcionan como probiótico, tienen un efecto positivo sobre la floración bacteriana hacia una microbiota y/o parámetros de rendimiento más beneficiosos en las aves de corral. El inventor descubrió además sorprendentemente que la cepa o cepas de *Bacillus* se pueden combinar con una o varias cepas de bacterias del ácido láctico en un probiótico que tiene un efecto positivo sobre la floración bacteriana hacia una microbiota y/o parámetros de rendimiento más beneficiosos en las aves de corral.

[0041] El método también se refiere a una realización en la que uno o varios probióticos comprenden uno o más *Bacillus* seleccionados del grupo que consiste en

- i) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositada como NRRL con número de depósito B-50914, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositada como NRRL con número de depósito B-50914 o un mutante de la misma,
- ii) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositada como NRRL con número de depósito B-50910, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositada como NRRL con número de depósito B-50910 o un mutante de la misma, y
- iii) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositada como NRRL con número de depósito B-50908, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositada como NRRL con número de depósito B-50908 o un mutante de la misma.

[0042] Otra realización del método se refiere a uno o varios probióticos que comprenden una o varias bacterias del ácido láctico seleccionadas del grupo que consiste en

- i) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositado como NRRL con número de depósito B-50964,
- ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositado como NRRL con número de depósito B-50959, y
- iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositado como NRRL con número de depósito B-50960.

[0043] El método según la presente invención también se refiere a una realización en la que uno o varios probióticos comprenden uno o más *Bacillus* seleccionados del grupo que consiste en

- i) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositado como NRRL con número de depósito B-50914,
- ii) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositado como NRRL con número de depósito B-50910, y
- iii) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositado como NRRL con número de depósito B-50908.

[0044] En una realización específica, el método se refiere a uno o varios probióticos que comprenden una o varias bacterias del ácido láctico seleccionadas del grupo que consiste en

- i) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositado como NRRL con número de depósito B-50964,
- ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositado como NRRL con número de depósito B-50959, y
- iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositado como NRRL con número de depósito B-50960; y uno o varios probióticos que comprenden uno o varios *Bacillus* seleccionados del grupo que consiste en
  - i) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositado como NRRL con número de depósito B-50914,
  - ii) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositado como NRRL con número de depósito B-50910, y
  - iii) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositado como NRRL con número de depósito B-50908.

[0045] En otra realización específica, el método se refiere a uno o varios probióticos que comprenden una o varias bacterias del ácido láctico seleccionadas del grupo que consiste en

- i) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositado como NRRL con número de depósito B-50964, y
- ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositado como NRRL con número de depósito B-50959; y uno o varios probióticos que comprenden uno o varios *Bacillus* seleccionados del grupo que consiste en
  - i) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositado como NRRL con número de depósito B-50914,
  - ii) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositado como NRRL con número de depósito B-50910, y
  - iii) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositado como NRRL con número de depósito B-50908.

[0046] En otra realización del método, uno o varios probióticos comprenden una secuencia de ADNr 16S seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 1;

(a) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 2;

(c) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 3;

(d) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 4;

(e) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 5; y

(f) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 6.

[0047] En una realización, el método descrito anteriormente da como resultado la mejora de uno o varios parámetros de rendimiento seleccionados del grupo que consiste en aumento de peso corporal, tasa de crecimiento, tasa de conversión alimenticia y salud general o cualquier combinación de los mismos. Además, el método puede resultar en un aumento de bacterias intestinales saludables que estimulan el desarrollo intestinal y/o inmunológico en las aves de corral. En una realización, el método da como resultado un aumento en el nivel de bacterias del ácido láctico y/o *Bacillus*. En una realización, el método da como resultado un aumento en el nivel de bacterias del ácido láctico y/o *Bacillus* en la incubadora. En una realización, el método da como resultado un aumento en el nivel de bacterias del ácido láctico y/o *Bacillus* en el TGI del polluelo. En una realización, el método da como resultado un aumento en el nivel de bacterias del ácido láctico y/o *Bacillus* en la incubadora y en el TGI del polluelo.

[0048] En otra realización del método, la administración da como resultado que se modifique o controle la proliferación bacteriana en el gabinete de incubación de aves de corral. Esto puede significar que se reduce el nivel de bacterias patógenas. Las bacterias patógenas a este respecto pueden seleccionarse en una realización del grupo que consiste en bacterias coliformes, *Salmonella*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*. Preferiblemente, el método da como resultado el cambio de la microbiota ambiental de las aves de corral a una de las bacterias probióticas más beneficiosas. En una realización del método, la administración da como resultado una disminución de las bacterias patógenas que se seleccionan del grupo que consiste en bacterias coliformes, *Salmonella*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*. En una realización del método, la administración da como resultado una disminución de las bacterias patógenas que se seleccionan del grupo que consiste en bacterias coliformes, *Salmonella* y *E. coli*.

[0049] En una realización adicional del método, la administración da como resultado que se reduzca el nivel de bacterias coliformes en la incubadora. En una realización adicional del método, la administración da como resultado que se reduzca el nivel de bacterias coliformes en el gabinete de incubación. En otra realización más del método, la administración da como resultado que el nivel de bacterias coliformes en la incubadora se reduzca al menos un 25 %, por ejemplo, al menos un 30 % o al menos un 40 %. En otra realización más del método, la administración da como resultado que el nivel de bacterias coliformes en el gabinete de incubación se reduzca al menos un 25 %, por ejemplo, al menos un 30 % o al menos un 40 %. En otra realización más del método, la administración da como resultado que el nivel de bacterias coliformes en la incubadora se reduzca al menos un 50%. En otra realización más del método, la administración da como resultado que el nivel de bacterias coliformes en el gabinete de incubación se reduzca al menos un 50%. En una realización adicional del método, la administración da como resultado que el nivel de bacterias coliformes en la incubadora se reduzca al menos 1 log. En una realización adicional del método, la administración da como resultado que el nivel de bacterias coliformes en el gabinete de incubación se reduzca al menos 1 log. En una realización adicional del método, la administración da como resultado que el nivel de bacterias coliformes en la incubadora se reduzca al menos 2 logaritmos. En una realización adicional del método, la administración da como resultado que el nivel de bacterias coliformes en el gabinete de incubación se reduzca al menos 2 logaritmos.

[0050] En una realización preferida, el método se refiere al tratamiento de pollos y/o pavos. En una realización, el método se refiere al tratamiento de pollos de engorde y/o ponedoras.

[0051] En una realización preferida, el método se refiere a la administración de uno o más probióticos en el gabinete de incubación de aves de corral antes de la eclosión. Alternativamente, el método se relaciona con la administración de uno o más probióticos en el gabinete de incubación de aves de corral después de la eclosión,

por ejemplo, en las 24 horas posteriores a la eclosión, en las 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1 hora después de la eclosión. En una realización, algunos huevos se incuban y otros no. Preferiblemente, menos del 90 % eclosionan, por ejemplo, menos del 80 %, del 70 %, del 60 %, del 50 %, del 40 %, del 30 %, del 20 %, del 10 %, del 5 % o menos del 1 % eclosionan cuando el probiótico o los probióticos se administran en el gabinete de incubación de aves de corral.

[0052] La administración se puede repetir una o varias veces, por ejemplo, antes y/o después de la eclosión 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 repeticiones. Alternativamente, la administración puede ser continua a lo largo del tiempo en el gabinete de incubación.

[0053] En una realización preferida del método, uno o varios probióticos tienen una o varias propiedades seleccionadas del grupo que consiste en

- i) formar esporas de alta calidad de manera robusta en fermentación en estado sólido a escala comercial,
- ii) crecer de manera robusta en fermentación sumergida y mantener la estabilidad después de la liofilización,
- iii) germinar y colonizar con éxito el tracto gastrointestinal de las aves de corral,
- iv) mejorar los parámetros de rendimiento de las aves de corral (como la mortalidad, el aumento de peso corporal (APC) y/o la tasa de conversión alimenticia (TCA))
- v) mejorar los parámetros de rendimiento de aves de corral de los polluelos jóvenes (como, p. ej., mejora del peso corporal y/o uniformidad de los polluelos medidos en los días 7 a 10),
- vi) inhibir los patógenos comunes de las aves de corral en estudios *in vitro* e *in vivo* y
- vii) mantener la viabilidad en el entorno del gabinete de incubación.

[0054] En otra realización preferida del método, uno o varios probióticos son capaces de reducir la incidencia de bacterias gramnegativas en el entorno del gabinete de incubación y/o disminuir la mortalidad al final de la vida, y/o mejorar la conversión alimenticia, y/o aumentar el aumento de peso corporal en aves de corral.

[0055] La aplicación de bacterias probióticas en los gabinetes de incubación proporciona preferiblemente colonizadores pioneros en el intestino antes de que el polluelo pueda exponerse a bacterias patógenas o no beneficiosas, que pueden tener efectos perjudiciales de por vida.

[0056] El método de aplicación proporciona preferiblemente un tratamiento uniforme a todos los polluelos en el gabinete de incubación, probablemente mejorando la uniformidad de la parvada.

[0057] La aplicación por rociado en seco elimina los problemas de almacenamiento (vida útil) y aplicación que pueden acompañar a una aplicación de rociado húmedo. Se ha demostrado que los aislados y la preparación utilizados son estables en el entorno del gabinete de incubación durante el periodo de tiempo necesario.

#### Composiciones

[0058] En un aspecto preferido, la invención se refiere a una composición que comprende una o varias cepas de *Bacillus* y una o varias cepas de bacterias del ácido láctico, donde una o varias bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste en

- i) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964 o un mutante de la misma,
- ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959 o un mutante de la misma, y
- iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960 o un mutante de la misma.

[0059] En una realización preferida con respecto a la composición, los *Bacillus* se seleccionan del grupo que consiste en

- i) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositada como NRRL con número de depósito B-50914, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositada como NRRL con número de depósito B-50914 o un mutante de la misma,
- ii) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositada como NRRL con número de depósito B-50910, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositada como NRRL con número de depósito B-50910 o un mutante de la misma, y
- iii) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositada como NRRL con número de depósito B-50908, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositada como NRRL con número de depósito B-50908 o un mutante de la misma.

[0060] En una realización específica con respecto a la composición, una o varias bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste en

- 5 I) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositado como NRRL con número de depósito B-50964,  
 ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositado como NRRL con número de depósito B-50959, y  
 iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositado como NRRL con número de depósito B-50960.

[0061] En otra realización específica con respecto a la composición, los *Bacillus* se seleccionan del grupo que consiste en

- 10 I) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositado como NRRL con número de depósito B-50914,  
 ii) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositado como NRRL con número de depósito B-50910, y  
 15 iii) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositado como NRRL con número de depósito B-50908.

[0062] Una realización específica con respecto a la composición comprende una o varias bacterias del ácido láctico que se seleccionan del grupo que consiste en

- 20 I) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositado como NRRL con número de depósito B-50964,  
 ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositado como NRRL con número de depósito B-50959, y  
 iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositado como NRRL con número de depósito B-50960; y uno o varios  
*Bacillus* seleccionados del grupo que consiste en  
 I) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositado como NRRL con número de depósito B-50914,  
 25 ii) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositado como NRRL con número de depósito B-50910, y  
 iii) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositado como NRRL con número de depósito B-50908.

[0063] En una realización preferida con respecto a la composición una o varias cepas de *Bacillus* y una o varias cepas de bacterias del ácido láctico comprenden una secuencia de ADNr 16S seleccionada del grupo que consiste en:

- 30 (a) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 1;  
 35 (a) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 2;  
 (c) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 3;  
 40 (d) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 4;  
 45 (e) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 5; y  
 50 (f) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7 %, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 6.

[0064] En una de realización preferida las cepas de *Bacillus* y/o las cepas de bacterias del ácido láctico según la invención o la composición según la invención tienen una o varias propiedades seleccionadas del grupo que consiste en

- 60 i) formar esporas de alta calidad de manera robusta en fermentación en estado sólido a escala comercial,  
 ii) crecer de manera robusta en fermentación sumergida y mantener la estabilidad después de la liofilización,  
 iii) germinar y colonizar con éxito el tracto gastrointestinal de las aves de corral,  
 iv) mejorar los parámetros de rendimiento de las aves de corral (como mortalidad, APC, TCA)  
 v) inhibir los patógenos comunes de las aves de corral en estudios *in vitro* e *in vivo* y  
 65 vi) mantener la viabilidad en el entorno del gabinete de incubación.

[0065] En otra realización preferida las cepas de *Bacillus* y/o las cepas de bacterias del ácido láctico según la invención o la composición según la invención son capaces de reducir la incidencia de bacterias gramnegativas en el entorno del gabinete de incubación y/o disminuir la mortalidad al final de la vida, y/o mejorar conversión alimenticia y/o aumentar el peso corporal en aves de corral.

[0066] En una realización específica, la composición comprende un portador, por ejemplo, un portador que comprende o consiste en: a) copos de salvado de trigo y/o b) carbonato de calcio y/o c) un agente antiaglomerante/de flujo.

[0067] Los aislados de *Bacillus* (B2, NP122, AM0904) se aislaron de aves de corral y muestras ambientales y se evaluaron para determinar su capacidad para crecer y esporular de manera robusta en un sistema de fermentación en estado sólido. También se evaluó su capacidad para germinar dentro del tracto gastrointestinal del pollo, formar biopelículas e inhibir patógenos comunes relacionados con las aves de corral y los alimentos mediante experimentación *in vitro* e *in vivo*.

[0068] Los aislados de *Pediococcus* (PVG-18, TY036) se aislaron de muestras de aves de corral y se evaluó su capacidad para crecer en un sistema de fermentación sumergido y mantener la estabilidad después de la liofilización. También fueron evaluados por su capacidad para inhibir patógenos comunes de las aves de corral mediante experimentación *in vitro* e *in vivo*. Estos fueron seleccionados para la supresión de patógenos en aves de corral recién nacidas y para la estimulación temprana del TGI, respectivamente.

[0069] Preferiblemente, el probiótico está aislado.

## EJEMPLOS

Identificación, caracterización y depósito del material biológico

[0070] Los siguientes materiales biológicos se depositaron bajo los términos del Tratado de Budapest en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, EE. UU., y recibieron los siguientes números de acceso:

Identificación	Número de acceso	Fecha de depósito
<i>Pediococcus acidilactici</i> TY036	NRRL B-50959	1 de abril de 2014
<i>Pediococcus acidilactici</i> FM18	NRRL B-50964	1 de abril de 2014
<i>Enterococcus faecium</i> MFF109	NRRL B-50960	1 de abril de 2014
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AM 0904	NRRL B-50914	7 de marzo de 2014
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NP122	NRRL B-50910	7 de marzo de 2014
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B2	NRRL B-50908	7 de marzo de 2014

[0071] Las cepas se han depositado en condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente para alguien que las leyes de patentes extranjeras determinen que tiene derecho a ello. Los depósitos representan un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada. Los depósitos están disponibles según lo requieren las leyes de patentes extranjeras en países en los que se presentan contrapartidas de la solicitud en cuestión o su progenie. Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención en cuestión en derogación de los derechos de patente otorgados por acción gubernamental.

### Descripción del material biológico

[0072] *Pediococcus acidilactici* TY036 fue aislado a partir de aves de corral en los EE. UU. por Pacific Vet Group USA Inc. en 2013. *Pediococcus acidilactici* FM18 fue aislado a partir de aves de corral en los EE. UU. por la Universidad de Arkansas en 2003. *Enterococcus faecium* MFF109 fue aislado a partir de aves de corral en los EE. UU. por Pacific Vet Group USA Inc. en 2013. *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 fue aislado a partir de aves de corral en los EE. UU. por la Universidad de Arkansas en 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 fue aislado a partir de aves de corral en los EE. UU. por la Universidad de Arkansas en 2008. *Bacillus amyloliquefaciens* B2 fue aislado a partir de aves de corral en los EE. UU. por la Universidad de Arkansas en 2009.

### **Ejemplo 1: Cribado de aislados bacterianos probióticos**

[0073] Las cepas bacterianas candidatas se analizaron previamente para determinar su potencial probiótico. Previamente se había demostrado que los *Bacillus* podían crecer de forma rápida y robusta en medios mínimos.

Estas cepas también han demostrado la capacidad de inhibir patógenos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha demostrado previamente que el aislado bacteriano de ácido láctico FM18 inhibe la *Salmonella* y la *Clostridium perfringens* tanto *in vitro* como *in vivo*. Previamente se había demostrado que las cepas de bacterias del ácido láctico TY036 y MFF109 estimulan el desarrollo intestinal temprano en aves de corral recién nacidas.

*Prueba in vitro contra patógenos comunes de las aves de corral.*

[0074] Los aislados de *Bacillus* (AM0904, NP122 y B2) se incubaron en placas de agar con *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella heidelberg*, *Salmonella kentucky*, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* y se determinó la zona de inhibición.

[0075] Los aislados de bacterias del ácido láctico (FM18 y TY036) se incubaron en placas de agar con *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Kentucky, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* y se determinó la zona de inhibición Tabla 1.

Tabla 1. Prueba de recubrimiento *in vitro* contra patógenos comunes

	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Salmonella</i> Heidelberg	<i>Salmonella</i> Kentucky	<i>E. coli</i> F18	<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>
AM0904	+++	++	+++	+++	++	++
B2	++	++	+++	+++	+	++
NP122	+	+	-	+	++	++
FM18	++++	++++	+++	++++	++++	++++
TY036	++++	+++	+++	++++	+++	+++
MFF109	++++	+++	+++	++++	+++	+++

[0076] En resumen, los aislados de LAB se cultivaron en caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) durante la noche mientras se incubaban a 37 °C. Los *Bacillus* se cultivaron en caldo de soja tríptico durante la noche mientras se incubaban a 37 °C. Se utilizó un asa estéril para transferir los LAB a una placa MRS o los *Bacillus* a una placa de agar de soja tríptico para que crezca una sola colonia densa en el centro de una placa o placa doble. Esta placa se incubó durante 48 horas a 37 °C para los LAB o 24 horas para los *Bacillus*. Durante la incubación, se incubó un cultivo del patógeno de interés por la noche en un medio apropiado a 37 °C. Se añadieron 100 microlitros del cultivo de patógenos a 10 ml de agar blando de soja tríptico conservado a 45 °C. El agar blando de soja tríptico se vertió sobre la placa de agar de soja tríptico/MRS que contenía el aislado de LAB /*Bacillus* y se incubó durante la noche a 37 °C.

**Ejemplo 2: Prueba de formulación bacteriana en la incubadora para el control ambiental de bacterias patógenas**

*Experimento 1*

[0077] Se evaluó el efecto de varias formulaciones de prueba en incubadoras comerciales y se midió contra una incubadora de control. Las parvadas de reproductoras comerciales se estratificaron de modo que la carga bacteriana entrante fuera un factor controlado. Todas las incubadoras se encontraban en una sala de incubación común. La incubadora de control no se trató con probióticos o productos químicos. Los grupos de tratamiento fueron los siguientes: 1) control negativo 2) dosis única de esporas de *Bacillus* secas (DBS) más solución acuosa de bacterias de ácido láctico (LAB) 3) aplicación única de esporas de *Bacillus* acuosas (WBS) más LAB 4) 3 aplicaciones de WBS y LAB. Todas las aplicaciones se realizaron con un pulverizador neumático manual. Los tratamientos únicos se administraron en el momento de la transferencia. Los tres grupos de aplicación se trataron en el momento de la transferencia, en el 20 % de eclosión y en el 50 % de eclosión. Cada dosis de DBS fue de aproximadamente  $3 \times 10^8$  esporas por ave por aplicación. Cada dosis de WBS fue de aproximadamente  $3 \times 10^8$  esporas por ave por aplicación. Cada dosis de LAB fue de aproximadamente  $3 \times 10^6$  ufc por ave por aplicación. Las esporas de *Bacillus* secas se produjeron por separado en un medio de estado sólido, se secaron, se molieron y luego se enumeraron. Las esporas de *Bacillus* húmedas se cultivaron por separado en un caldo de fermentación, se centrifugaron, se liofilizaron, se molieron y luego se enumeraron. Las esporas se administraron en una proporción de 5: 5: 1 de NP122: B2: AM0904 respectivamente. Las bacterias del ácido láctico (TY036, MFF109 y FM18) se cultivaron por separado en un caldo de fermentación, se centrifugaron, se liofilizaron, se molieron y luego se enumeraron. Cada cepa se incluyó en cantidades iguales. Para medir la recuperación no selectiva, se colocaron 6 placas de agar tríptico de soja en las incubadoras durante un periodo de 5 minutos en cada uno de los siguientes puntos: transferencia, un 50 % de picoteado, un 20 % de eclosión, un 50 % de eclosión y un 75 % de eclosión. Para medir las bacterias gramnegativas, se colocaron 6 placas de agar MacConkey en las incubadoras durante un periodo de 5 minutos en cada uno de los siguientes puntos: transferencia, un 50 % de picoteado, un 20 % de

eclosión, un 50 % de eclosión y un 75 % de eclosión. Para medir las bacterias del ácido láctico, se colocaron 6 placas de agar Rogosa en las incubadoras durante un periodo de 5 minutos en cada uno de los siguientes puntos: transferencia, un 50 % de picoteado, un 20 % de eclosión, un 50 % de eclosión y un 75 % de eclosión. Para todos los tipos de placas, las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. La dosis única de *Bacillus* seca demostró proporcionar un mayor recuento de bacterias aeróbicas en todos los puntos temporales. Fig 1. Visualmente, la morfología de la colonia predominante en estas placas fue de *Bacillus*. Los recuentos de bacterias del ácido láctico fueron bajos en todos los puntos de tiempo para el control y la dosis única. Grupos de LAB en todos los puntos temporales Fig 2. LAB se incrementó en los puntos temporales de un 50 % de eclosión y de un 75 % de eclosión. La recuperación de gramnegativas fue menor en los grupos de tratamiento en tres de los cuatro puntos temporales medidos Fig 3. Estos resultados indican que las esporas de *Bacillus* secas persisten más que las *Bacillus* acuosas en la incubadora. Estos resultados también indican que los LAB no persisten en la incubadora durante un período de tiempo prolongado. Debido a esto, se necesitan múltiples dosis de LAB. Todos los tratamientos redujeron significativamente las gramnegativas. Esto indica que estas formulaciones son candidatos potenciales para reducir la proliferación patógena de bacterias (es decir, la proliferación bacteriana) dentro del gabinete de incubación.

### Experimento 2

[0078] Se evaluó el efecto de una formulación de prueba en las incubadoras y se comparó con las incubadoras de control. Las parvadas de reproductoras se estratificaron de manera que la carga bacteriana entrante fuera un factor controlado. Todas las incubadoras se encontraban en una sala de incubación común y eran del mismo tipo. La incubadora de control no se trató con probióticos sino con formaldehído. El grupo de tratamiento consistió en tres aplicaciones de esporas de *Bacillus* secas (DBS) más tres dosis de solución acuosa de bacterias de ácido láctico y se comparó con las incubadoras de control (tratadas con formaldehído). Las esporas de *Bacillus* se produjeron por separado en un medio de estado sólido, se secaron, se molieron y luego se enumeraron. Las esporas se administraron en una proporción de 5: 5: 1 de NP122: B2: AM0904 respectivamente. Las bacterias del ácido láctico (TY036, MFF109 y FM18) se cultivaron por separado en un caldo de fermentación, se centrifugaron, se liofilizaron, se molieron y luego se enumeraron. Cada cepa se incluyó en cantidades iguales. Las tres dosis suministraron  $1 \times 10^9$  esporas por ave y  $1 \times 10^7$  ufc de bacterias del ácido láctico por ave durante el período de tratamiento. Para medir la recuperación no selectiva, se colocaron 6 placas de agar triptico de soja en las incubadoras durante un periodo de 5 minutos en cada uno de los siguientes puntos: transferencia, un 50 % de picoteado, un 20 % de eclosión, un 50 % de eclosión y un 75 % de eclosión. Para medir las bacterias gramnegativas, se colocaron 6 placas de agar MacConkey en las incubadoras durante un periodo de 5 minutos en cada uno de los siguientes puntos: transferencia, un 50 % de picoteado, un 20 % de eclosión, un 50 % de eclosión y un 75 % de eclosión. Para medir las bacterias del ácido láctico, se colocaron 6 placas de agar MRS en las incubadoras durante un periodo de 5 minutos en cada uno de los siguientes puntos: transferencia, un 50 % de picoteado, un 20 % de eclosión, un 50 % de eclosión y un 75 % de eclosión. Para todos los tipos de placas, las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Los tratamientos se administraron en la transferencia, en un 20% de eclosión y en un 50 % de eclosión. Los recuentos aeróbicos totales en placa fueron más altos en todos los puntos temporales Fig 4. La morfología de la colonia predominante del grupo tratado fue de *Bacillus*. Los recuentos de bacterias del ácido láctico también fueron más altos en todos los puntos temporales Fig 5. Las bacterias gramnegativas también fueron mayores en todos los puntos temporales en las incubadoras tratadas. Fig 6. Estos resultados indican que las bacterias beneficiosas suministradas por la formulación estaban presentes y en cantidades mayores en los grupos tratados en comparación con los grupos de control. Si bien la cantidad de bacterias gramnegativas también fue mayor en los grupos de tratamiento, el aumento fue inferior a 0.5 log<sub>10</sub> ufc. Esto se comparó con un producto químico agresivo, el formaldehído. Esto indica que esta formulación puede ser una alternativa eficaz al formaldehído para reducir la proliferación de bacterias dentro del gabinete de incubación.

### Ejemplo 3: Prueba de formulación bacteriana para mejorar el rendimiento en pollos de engorde.

[0079] La formulación bacteriana, compuesta por tres aislados de *Bacillus* (AM0904, NP122), en una formulación de polvo seco, se combinaron con tres cepas de bacterias del ácido láctico (FM18, TY036 y MFF109) también en forma de polvo seco. La formulación se administró en la transferencia, en el 20 % de eclosión, en el 50 % de eclosión y en el 75% de eclosión mediante un dispensador neumático mecánico. Las cuatro dosis suministraron  $1 \times 10^9$  esporas por ave y  $1 \times 10^7$  ufc de bacterias del ácido láctico por ave durante el período de tratamiento. Las esporas de *Bacillus* se produjeron por separado en un medio de estado sólido, se secaron, se molieron y luego se enumeraron. Las esporas se administraron en una proporción de 5: 5: 1 de NP122: B2: AM0904 respectivamente. Las bacterias del ácido láctico (TY036, MFF109 y FM18) se cultivaron por separado en un caldo de fermentación, se centrifugaron, se liofilizaron, se molieron y se enumeraron. Cada cepa se incluyó en cantidades iguales. El polvo se aplicó en el sistema de ventilación de la incubadora y los ventiladores se utilizaron para distribuir las bacterias beneficiosas de la formulación alrededor del gabinete de incubación. Las parvadas de reproductoras se asignaron al azar entre los grupos tratados y de control para controlar la carga bacteriana entrante y el tamaño del huevo. Se dividió un pasillo de una sola incubadora entre los grupos de control y tratados para controlar el entorno de la incubadora. Las granjas comerciales adicionales por contrato se dividieron entre grupos de control y grupos tratados para controlar el entorno y la gestión de la nave de engorde (cobertizo). Se evaluaron un total de 16 naves (400 000 pollos de engorde) (8 tratadas y 8 de control). Se midieron los pesos corporales y la mortalidad a los siete días. En cada nave, tratada o de control, se pesaron al menos 400 polluelos en 10 lotes de aves. Los polluelos se

tomaron de diferentes puntos dentro de la nave para reducir el error de muestreo. La mortalidad a los siete días se tomó de los registros mantenidos para cada cobertizo por el administrador de la parvada. Los grupos tratados habían mejorado el peso corporal a los 7 días y habían mejorado la mortalidad a los 7 días Fig 7. El peso corporal y la viabilidad en la venta de las parvadas también mejoraron en los grupos de tratamiento Fig 8. La conversión alimenticia de las parvadas tratadas fue 7 puntos más alta Fig 9. El integrador de pollos de engorde notificó los datos del final de las parvadas utilizando sus métodos de recopilación de datos. Estos resultados indican que la formulación bacteriana mejoró el rendimiento tanto a los 7 días como al final de la parvada. El peso corporal y la viabilidad mostraron una divergencia continua desde los 7 días hasta el final del lote. Los 7 puntos de mejora de la conversión alimenticia mostraron una mejora del 3.5 % en la utilización del pienso, el mayor coste del crecimiento de los pollos de engorde y un indicador de la salud y el rendimiento de la parvada.

**Ejemplo 4: Prueba de polluelos tratados con formulación bacteriana para detectar esporas termotolerantes, presuntas bacterias del ácido láctico (LAB) y bacterias gramnegativas.**

[0080] Se estudiaron tripas de pollos tratados con la formulación bacteriana del ejemplo 3 o con formaldehído para detectar esporas termotolerantes, presuntas bacterias del ácido láctico (LAB) y bacterias gramnegativas.

Materiales y métodos

[0081] Inmediatamente antes de sacar los polluelos de las incubadoras, se sacaron de la incubadora doce aves por grupo de tratamiento. Las aves se transportaron (~1 h) a un centro de investigación apropiado y se sacrificaron de manera humanitaria por asfixia con CO<sub>2</sub>. Los paquetes intestinales que contenían duodeno, íleon y ciego se retiraron asépticamente y se homogeneizaron por separado. Las muestras de intestino se diluyeron en solución salina estéril a una tasa de 1: 4 p/vol. Se hicieron diluciones de factor de dilución 10 colocando 200 µl de la muestra (N) en la primera fila de una placa estéril de 96 pocillos y diluyendo secuencialmente mediante transferencia de 20 µl a 180 µl de solución salina estéril a la 10<sup>-7</sup> dilución. Las diluciones (N a 10<sup>-7</sup>) se sembraron mediante una gota de 10 µl en agar MRS y agar MacConkey. Para la siembra en placa de agar tripticasa de soja (TSA), las muestras de intestino se pasteurizaron a 80 °C durante 10 minutos antes de transferir 200 µl a una placa de 96 pocillos. El resto de las diluciones y métodos de siembra fueron los mismos que los del agar MRS y MacConkey. Las placas de agar se contaron después de 24 h de incubación a 37 °C.

Resultados y discusión

[0082] Se encontró un marcado aumento de esporas termotolerantes en el TGI de los pollos tratados con la formulación bacteriana tal como se muestra en la tabla 2. Los recuentos anormalmente altos en el exp. 1 se debieron a que las muestras no se pasteurizaron antes de la dilución y la siembra en placa. Los experimentos posteriores incluyeron un paso de pasteurización.

Tabla 2. Enumeración promedio (Log<sub>10</sub> UFC/g) de recuentos de esporas termotolerantes en pollos de engorde comerciales el día de la eclosión (DOH). Los promedios se basan en n = 12 y se muestran con ± error estándar. \* denota una diferencia significativa (p <0.05) entre el formaldehído y los grupos de formulación bacteriana

Agar de soja triptico (TSA) (pasteurizado; recuento de esporas)					
Grupo de tratamiento	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5
Formaldehído	8.95±0.2	1.34±0.48	0.69±0.36	0.44±0.3	0±0
Formulación bacteriana	8.22±0.4	5.3±0.15*	5.83±0.18*	5.01±0.17*	5.37±0.17*

[0083] Se contó el número de presuntas bacterias del ácido láctico (LAB) aisladas del TGI de pollos tratados con formaldehído o con la formulación bacteriana y se muestra en la tabla 3. Con la excepción del exp 5, todos los experimentos mostraron una disminución en el número de LAB recuperadas del TGI del polluelo en comparación con los polluelos tratados con formaldehído. Una hipótesis para esta observación es que las dos cepas de *Pedicoccus acidilactici* en el producto de formulación bacteriana se seleccionaron para superar en competición a otros aislados LAB y pueden estar inhibiendo el crecimiento y la colonización de otras LAB de tipo salvaje, reduciendo el número total de LAB presentes. Esta tendencia no se observó en el exp 5, aunque el número inusualmente bajo de LAB observadas en el grupo de formaldehído probablemente contribuyó a este resultado.

Tabla 3. Enumeración promedio (Log<sub>10</sub> UFC/g) de recuentos presuntivos de bacterias del ácido láctico en pollos de engorde comerciales DOH. Los promedios se basan en n = 12 y se muestran con ± error estándar. \* denota una diferencia significativa (p <0.05) entre el formaldehído y los grupos de formulación bacteriana

Agar Mann-Rogosa-Sharp (MRS) (recuento presuntivo de LAB)					
Grupo de tratamiento	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5
Formaldehído	7.79±0.17	7.26±0.34	6.26±0.83	5.1±0.99	2.85±0.96
Formulación bacteriana	6.77±0.56	2.88±0.79*	4.64±0.78	3.86±0.93	4.82±0.77

5 [0084] El número de bacterias gramnegativas, que se consideran patógenas o no beneficiosas para el hospedador, aisladas se muestra en la tabla 4. En todos menos en el exp 5, se demostró que el número de bacterias gramnegativas era menor en las aves tratadas con formulación bacteriana que en los pollos tratados con formaldehído. Se ha demostrado que todos los aislados de probióticos en la formulación bacteriana tienen un efecto inhibitorio contra los aislados gramnegativos comunes. En el exp 5, los recuentos de bacterias gramnegativas fueron los mismos entre el grupo del formaldehído y el de la formulación bacteriana, aunque los números generales para ambos grupos fueron muy bajos. Es probable que la formulación bacteriana solo sea capaz de reducir el número de bacterias gramnegativas hasta un cierto nivel, ya que niveles muy bajos dan como resultado densidades bacterianas bajas en el intestino, lo que hace menos probable que los aislados de formulación bacteriana y las bacterias gramnegativas estén en competencia directa.

10  
15 Tabla 4. Enumeración promedio ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de recuentos presuntivos de bacterias gramnegativas en pollos de engorde comerciales DOH. Los promedios se basan en  $n = 12$  y se muestran con  $\pm$  error estándar. \* denota una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el formaldehído y los grupos de formulación bacteriana

Agar MacConkey (recuento de gramnegativas)					
Grupo de tratamiento	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5
Formaldehído	8.39±0.19	6.56±0.83	3.9±0.93	4.95±0.99	2.84±0.92
Formulación bacteriana	5.79±0.91*	2.6±0.83*	1.32±0.7*	3.14±1.02	2.95±1.1

LISTADO DE SECUENCIAS

[0085]  
5 <110> Novozymes A/S  
<120> MÉTODO PARA REDUCIR LA FLORACIÓN MICROBIANA EN CULTIVOS DE AVES  
10 <130> 14132-WO-PCT  
<150> US 62/286,759  
<151> 2016-01-25  
15 <160> 6  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
20 <211> 1447  
<212> DNA  
<213> *Pediococcus acidilactici*  
<400> 1  
25 agacggctag ctctaaaag gttacccac cggcttggg tgttacaac tctcatggtg 60  
tgacggggcg tgtgtacaag gcccggaac gtattcaccg cggcatgctg atccgcgatt 120  
actagcgatt cggactctgt gtaggcgagt tgcagcctac agtccgaact gagaatggtt 180  
30 ttaagagatt agctaaacct cgcggtttcg cgactcgttg taccatccat ttagcacgt 240  
gtgtagccca ggtcataagg ggcgatgatga ttgacgtcg tccccacctt cctccggtt 300  
35 gtcaccggca gtctcactag agtgccaac tgaatgctgg caactagtaa taagggttgc 360  
gctcgttgcg ggacttaacc caacatctca cgacacgagc tgacgacaac catgcaccac 420  
ctgtcattct gtccccgaag ggaacgccta atctcttagg ttggcagaag atgtcaagac 480  
40 ctggaaggt tcttcgctga gcttgaatt aaaccacatg ctccaccgct tgtcggggcc 540  
cccgtcaatt ctttgagtt tcaacctgc ggtcgtactc cccaggcgga ttactaatg 600  
45 cgttagctgc agcactgaag ggcggaaacc ctccaacact tagtaatcat cgtttacggc 660  
atggactacc agggatctca atcctgttcg ctaccatgc ttctgagcct cagcgtcagt 720  
tacagaccag acagccgct tcgccactgg tgttctcca tatatctacg catttcaccg 780  
50 ctacacatgg agttccactg tctctctcg cactcaagtc tcccagtttc caatgcactt 840  
cttcggttga gccgaaggct ttacattag acttaaaga ccgctcgcgc tcgcttacg 900  
55 cccaataaat ccggataacg ctgccacct acgtattacc gcggtcgtcg gcacgtagtt 960  
agccgtggct ttctggttaa ataccgtcac tgggtgaaca gtactctca cccacgttct 1020  
60 tcttaacaa cagagcttta cgagccgaaa cccttctca ctacgcggc gttgctccat 1080  
cagacttgcg tccatttggg aagattccct actgctgcct cccgtaggag tctgggccgt 1140  
gtctcagtc caatgtggcc gattaccctc tcaggtcggc tacgcatcat cgccttgggtg 1200  
65 agccgttacc tcaccaacta gtaaatgccc cgcgggtcca tccagaagtg atagcagagc 1260

ES 2 883 164 T3

catctttaa aagaaaacca ggcggtttc tctgtatac ggtattagca tctgtttcca 1320  
 ggtgtatcc cctgctctg ggcaggttac ccacgtgta ctcacccgtc cgccactcac 1380  
 5 ttcgtgttaa aatctcattc agtgcaagca cgtcataatc aattaacgga agtgcgttcg 1440  
 acttgca 1447  
 10 <210> 2  
 <211> 1437  
 <212> DNA  
 <213> *Pediococcus acidilactici*  
 15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1433)..(1433)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 25 <400> 2  
 ggctagctcc taaaaggnta cccacccggc ttgggtgtt acaaactctc atgggtgac 60  
 gggcgggtg tacaaggccc ggaacgtat tcaccgcggc atgctgatcc gcgattacta 120  
 30 gcgattccga ctctgttag gcgagttgca gcctacagtc cgaactgaga atggtttaa 180  
 gagattagct aaacctcgc gttcgcgac tcgtgtacc atccattga gcacgtgtg 240  
 35 agcccaggtc ataaggggca tgatgattg acgtcgtccc caccttctc cggtttgca 300  
 ccggcagct cactagagtg cccaactgaa tgctggcaac tagtaataag ggtgcgctc 360  
 gttcggggac ttaaccaac atctcagac acgagctgac gacaacatg caccactgt 420  
 40 cattctgcc ccgaagggaa cgcctaact cttagggttg cagaagatgt caagacctgg 480  
 taaggttct cgctagctt cgaattaac cacatgctcc accgctgtg cgggccccg 540  
 45 tcaattctt tgagttcaa cctgcggtc gtactccca ggcggattac ttaatcgtt 600  
 agctgcagca ctgaaggcg gaaacctcc aaccttagt aatcatcgt tacgcatgg 660  
 actaccaggg tatctaacc tgtcgtac ccatgcttc gacctcagc gtcagtaca 720  
 50 gaccagacag ccgcctcgc cactggtgtt ctccatata tctacgcat tcaccgctac 780  
 acatggagt ccactgctt ctctgact caagtctcc agttccaat gcacttctc 840  
 55 ggtgagccg aaggcttca cattagactt aaaagaccgc ctgcgctgc ttacgcca 900  
 ataaatccg ataacgctg ccacctactg attaccgcg ctgctggcac gtagtagcc 960  
 60 gtggcttct ggtaaatac cgtcactgg tgaacagta ctctaccca cgttcttct 1020  
 taacaacaga gcttacgag ccgaaacct tctcactca cgcggcgtg ctccatcaga 1080  
 ctgctgcca ttgtgaaga tccctactg ctgcctccc taggagtctg ggccgtgtct 1140  
 65 cagtccaat gtggccgatt acctctcag gtcggctacg catcatgcc ttggtgagcc 1200

ES 2 883 164 T3

gttacctcac caactagcta atgcgccgcg ggtccatcca gaagtgatag cagagccatc 1260  
 ttttaaaga aaaccaggcg gtttctctg ttatcggta ttagcatctg ttccaggtg 1320  
 5 ttatcccctg cttctgggca ggttaccac gtgttactca cccgtccgcc actcacttcg 1380  
 tgttaaaatc tcattcagtg caagcacgtc ataatcaatt aacggaagt cgntcga 1437

10 <210> 3  
 <211> 708  
 <212> DNA  
 <213> Enterococcus faecium

15 <400> 3  
 tccatatac tacgcattc accgtgagct cgcattccac tctccttc tgactcaag 60  
 tctccagct ccaatgacc tccccggtg agccgggggc ttcacatca gacttaagaa 120  
 20 accgcctgcg ctgccttac gcccaatcma tccggacaac gcttgccacc tacgtattac 180  
 cgcggctgct ggcacgtagt tagccgtggc ttctggta gataccgtca agggatgaac 240  
 agtactctc atcctgttc ttcttaaca acagagttt acgatccgaa aacctcttc 300  
 25 actcacgagg ygtgctcgg tcagacttc gtccattgcc gaagattccc tactgctgcc 360  
 tcccgtagga gttgggccc tgtctcagty ccaatgttky cgatcacct ctcaggtcgg 420  
 30 ctatktwt kttgccttg tgagccgta cctaccaac tagtaatgc accgcgggtc 480  
 catccatcag gcaccccga aagcgcctt caaatcaaaa ccatgcggtt tcgattgta 540  
 tacggtatta gcacctgtt ccaagtgtta tcccctctg atgggcagg taccacgtg 600  
 35 ttactaccc gttgccact cctcttttc cggtgagca agctccrtg gaaaaagaag 660  
 cgttcgact gcatgtatta ggcacgccg cagcgttct cctgagcc 708

40 <210> 4  
 <211> 1422  
 <212> DNA  
 <213> Bacillus amyloliquefaciens

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 50 <223> n is a, c, g, or t

<400> 4  
 ttcggcggct ggctccntaa aggttacctc accgacttcg ggtgttaca actctcgtg 60  
 55 tgtgacgggc ggtgtgtaca aggcccggga acgtattcac cgcggcatgc tgatccgca 120  
 ttactagcga ttccagctc acgcagtcga gttgcagact gcgatccgaa ctgagaacag 180  
 atttgtggga ttggctaac ctgcgggtt cgctgccctt tttctgtcc attgtagcac 240  
 60 gttgttagcc caggtcataa ggggcatgat gatttgacgt catccccacc ttctccggt 300  
 ttgtaccgg cagtcacct agagtgccca actgaatgct ggcaactaag atcaagggt 360  
 65 gcgctcgtg cgggacttaa cccaacatc cagcacga gctgacgaca accatgcacc 420

ES 2 883 164 T3

acctgtcact ctgccccga aggggacgtc ctatctctag gattgtcaga ggatgtcaag 480  
 acctggtaag gttcttcgcg ttgcttcgaa ttaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg 540  
 5 cccccgtaa ttctttgag ttcagtctt gcgaccgtac tcccaggcg gagtgctaa 600  
 tgcgtagct gcagactaa ggggcggaaa ccccctaaca cttagcactc atcgttacg 660  
 gcgtggacta ccagggatc taatcctgt cgctccccac gcttcgctc ctacagctca 720  
 10 gttacagacc agagagtcgc cttgccact ggtgttctc cacatctca cgcaattcac 780  
 cgctacacgt ggaattccac tctccttc tgactcaag tccccagtt tccaatgacc 840  
 15 ctccccggt gagccggggg cttcacatc agacttaaga aaccgctgc gagccctta 900  
 cgccaataa ttccggaca cgctggcac ctactatta cgcggctgc tggcacgtag 960  
 ttagccgtg cttctggtt aggtaccgc aagggtccgc cctattgaa cggcactgt 1020  
 20 tctccctaa caacagagct ttacgatccg aaaacctca tcactcacgc ggcgttgctc 1080  
 cgtcagactc tgcaccatg cgaagattc cctactgctg cctccgtag gagtctggc 1140  
 25 cgtgtctcag tccagtggt gccgatcacc ctctcaggtc ggctacgcat cgtcgcctg 1200  
 gtgagccgtt acctaccaa ctagctaag cgccgcggt ccatctgtaa gtgtagccg 1260  
 aagccacctt ttatgtctga accatcgggt tcagacaacc atccggtatt agccccggt 1320  
 30 tcccgagtt atccagctc tacaggcagg ttaccacgt gttactcacc cgccgccgc 1380  
 taacatcagg gagcaagctc ccatctgtcc gctcgactg ca 1422  
 35  
 <210> 5  
 <211> 1421  
 <212> DNA  
 <213> Bacillus amyloliquefaciens  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1405)..(1405)  
 45 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 5  
 tgcagtcgag cggacagatg ggagctgct ccctgatgtt agcggcggac gggtagtaa 60  
 50 cacgtgggta acctgcctgt aagactggga taactccggg aaaccggggc taataccgga 120  
 tggttgttg aaccgatgg ttacagacata aaaggtggct tcggctacca cttacagatg 180  
 gacccggcg gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggcgac gatgcgtagc 240  
 55 cgacctgaga gggtagcgg ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag 300  
 gcagcagtag ggaatctcc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg 360  
 60 atgaaggtt tcgatccta aagctctgt gttaggaag aacaagtcc gttcaaatag 420  
 ggcggcacct tgacggtacc taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgag 480  
 gtaataccta ggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagggtc cgcaggcggg 540  
 65 ttcttaagtc tgatgtgaaa gccccggct caaccgggga gggcattgg aaactgggga 600

ES 2 883 164 T3

actgagtgc agaagaggag agtgaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt 660  
 ggaggaacac cagtggcgaa ggcgactctc tggctgttaa ctgacgctga ggagcgaaag 720  
 5 cgtggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa 780  
 gtgttagggg gttccgccc cttagtgctg cagctaacgc attaagcact ccgcttgggg 840  
 10 agtacggtcg caagactgaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaaa gcggtggagc 900  
 atgtggttta attcgaagca acgcaagaa ccttaccagg tcttgacatc ctctgacaat 960  
 15 cctagagata ggacgtcccc ttcgggggca gactgacagg tggatcatgg ttgtcgtcag 1020  
 ctctgtctgt gagatgttg gtttaagtccc gcaacgagcg caaccctga tcttagttgc 1080  
 cagcattcag ttgggcactc taagtgact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat 1140  
 20 gacgtcaaat catcatgccc ctatgacct gggctacaca cgtgtacaaa tggacagaac 1200  
 aaagggcagc gaaaccgca ggtaagcca atcccacaaa tctgttctca gttcggatcg 1260  
 cagtctgcaa ctgactgcg tgaagctgga atcgctagta atcgcgatc agcatgccgc 1320  
 25 ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accacgagag ttgtaacac 1380  
 ccgaagtcgg tgaggaacc ttanggagc cagccgccga a 1421  
 30  
 <210> 6  
 <211> 1421  
 <212> DNA  
 <213> Bacillus amyloliquefaciens  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 40 <223> n is a, c, g, or t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1417)..(1417)  
 45 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 6  
 tcggcggctg gctcctntaaa ggttacctca ccgactcgg gtgttacaaa ctctcgtggt 60  
 50 gtgacgggcg gtgtgtacaa ggccccggaa cgtattcacc gcggcatgct gatccgcgat 120  
 tactagcgat tccagcttca cgcagtcgag ttgcagactg cgatccgaac tgagaacaga 180  
 tttgtgggat tggctaacc tcgcggttc gctgccctt gttctgtcca ttgtagcacg 240  
 55 tgtgtagccc aggtcataag gggcatgatg attgacgtc atccccacct tcctccggtt 300  
 tgtcaccggc agtcacctta gactgcccga ctgaatgctg gcaactaaga tcaaggggtg 360  
 60 cgctcgttc gggactaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacaa ccatgcacca 420  
 cctgtcactc tgccccgaa ggggacgtcc tatcttagg attgtcagag gatgcaaga 480  
 cctgtaagg ttctcgcgt tgcttgaat taaaccacat gctccaccgc ttgtcgggc 540  
 65 ccccgtaaat tccttgagt ttcagtctg cgaccgtact cccagggcgg agtgcttaat 600

ES 2 883 164 T3

gcgftagctg cagcactaag gggcggaaac ccctaacac ttagcactca tcgfttacgg 660  
5 cgtggactac cagggtatct aatcctgttc gctccccacg ctftcgtcc tcagcgtcag 720  
ftacagacca gagagtgcgc ttgccactg gtgttcctcc acatctctac gcatttcacc 780  
gctacacgtg gaattccact ctctcttct gcactcaagt tccccagtt ccaatgacc 840  
10 tccccggtg agccgggggc ttccacatca gacttaagaa accgcctgcg agccctttac 900  
gcccaataat tccggacaac gcttgcacc tacgtattac cgcggctgct ggcacgtagt 960  
15 tagccgtggc ttctggta ggtaccgtca aggtgccgc ctattgaac ggcactgtt 1020  
cttccctaac aacagagctt tacgatccga aaacctcat cactcacgcg gcgttgctcc 1080  
gtcagacttt cgtccattgc ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtctgggcc 1140  
20 gtgtctcagt cccagtgtg ccatcacc tctcaggtcg gctacgcac gtcgccttg 1200  
tgagccgta cctaccaac tagctaatgc gccgcgggc catctgtaag tggtagccga 1260  
agccacctt tatgtctgaa ccatgcggt cagacaacca tccggtatta gccccggtt 1320  
25 cccggagta tccagctt acaggcaggt taccacgtg ttactaccc gtcgcccgt 1380  
aacatcaggg agcaagctcc catctgtccg ctgacntgc a 1421  
30

## REIVINDICACIONES

1. Método para mejorar uno o varios parámetros de rendimiento de aves de corral que comprende el paso de administrar uno o varios probióticos que comprenden una o varias cepas de *Bacillus* y una o varias cepas de bacterias del ácido láctico en el gabinete de incubación de aves de corral, donde la bacteria o bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste en
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- 1) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964 o un mutante de la misma,
- ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959 o un mutante de la misma, y
- iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960 o un mutante de la misma,
- donde se reduce el nivel de bacterias patógenas, y donde menos del 90 % de los huevos se incuban cuando el probiótico o probióticos se administran en el gabinete de incubación de aves de corral.
2. Método según la reivindicación 1, donde se incuban menos del 80 % de los huevos, por ejemplo, menos del 70 %, del 60 %, del 50 %, del 40 %, del 30 %, del 20 %, del 10 %, del 5 % o menos del 1 % se incuban cuando se administran el probiótico o probióticos en el gabinete de incubación de aves de corral.
3. Método según la reivindicación 1, donde la cepa o cepas de *Bacillus* y la cepa o cepas de bacterias del ácido láctico se administran en un momento seleccionado del grupo que consiste en desde el 10 % de eclosión hasta el 20 % de eclosión, desde el 20 % de eclosión hasta el 30 % de eclosión, desde el 30 % de eclosión hasta el 40 % de eclosión, desde el 40 % de eclosión hasta el 50 % de eclosión, desde el 50 % de eclosión hasta el 60 % de eclosión, desde el 60 % de eclosión hasta el 70 % de eclosión, desde el 70 % de eclosión hasta el 80 % de eclosión, desde el 80 % de eclosión hasta el 90 % de eclosión, desde el 90 % de eclosión hasta el 100 % de eclosión, o cualquier combinación de los mismos.
4. Método según la reivindicación 3, donde la cepa o cepas de *Bacillus* y la cepa o cepas de bacterias del ácido láctico se administran de una vez desde el 10 % de eclosión hasta el 90 % de eclosión.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la administración se realiza pulverizando el probiótico o probióticos en el gabinete de incubación de aves de corral.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el probiótico o probióticos son una formulación en polvo, por ejemplo, una formulación en polvo seco.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el probiótico o probióticos comprenden uno o varios *Bacillus* seleccionados del grupo que consiste en
- 1) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositada como NRRL con número de depósito B-50914, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositada como NRRL con número de depósito B-50914 o un mutante de la misma,
- ii) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositada como NRRL con número de depósito B-50910, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositada como NRRL con número de depósito B-50910 o un mutante de la misma, y
- iii) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositada como NRRL con número de depósito B-50908, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositada como NRRL con número de depósito B-50908 o un mutante de la misma.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el probiótico o probióticos comprenden
- a) una o varias bacterias del ácido láctico seleccionadas del grupo que consiste en
- i) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositado como NRRL con número de depósito B-50964,
- ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositado como NRRL con número de depósito B-50959, y
- iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositado como NRRL con número de depósito B-50960, y
- b) uno o varios *Bacillus* seleccionados del grupo que consiste en
- iv) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositado como NRRL con número de depósito B-50914,

- v) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositado como NRRL con número de depósito B-50910, y  
vi) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositado como NRRL con número de depósito B-50908.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el probiótico o probióticos comprenden una secuencia de ADNr 16S seleccionada del grupo que consiste en:

(a) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 1;

(a) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 2;

(c) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 3;

(d) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 4;

(e) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 5; y

(f) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 6.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el parámetro o parámetros de rendimiento se seleccionan del grupo que consiste en aumento de peso corporal, tasa de crecimiento, tasa de conversión alimenticia y salud general.

11. Composición que comprende una o varias cepas de *Bacillus* y una o varias cepas de bacterias del ácido láctico que además comprenden un coadyuvante de flujo de silicato, donde la bacteria o bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste en

i) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* FM18 depositada como NRRL con número de depósito B-50964 o un mutante de la misma,

ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus acidilactici* TY036 depositada como NRRL con número de depósito B-50959 o un mutante de la misma, y

iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Enterococcus faecium* MFF109 depositada como NRRL con número de depósito B-50960 o un mutante de la misma, y

donde el o los *Bacillus* se seleccionan del grupo que consiste en

i) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositada como NRRL con número de depósito B-50914, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositada como NRRL con número de depósito B-50914 o un mutante de la misma,

ii) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositada como NRRL con número de depósito B-50910, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositada como NRRL con número de depósito B-50910 o un mutante de la misma, y

iii) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositada como NRRL con número de depósito B-50908, una cepa que tiene todas las características de identificación de *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositada como NRRL con número de depósito B-50908 o un mutante de la misma.

12. Composición según la reivindicación 11, donde:

(a) la bacteria o bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste en

i) *Pediococcus acidilactici* FM18 depositado como NRRL con número de depósito B-50964,

- ii) *Pediococcus acidilactici* TY036 depositado como NRRL con número de depósito B-50959, y
- iii) *Enterococcus faecium* MFF109 depositado como NRRL con número de depósito B-50960, y

(b) los *Bacillus* se seleccionan del grupo que consiste en

- i) *Bacillus amyloliquefaciens* AM0904 depositado como NRRL con número de depósito B-50914,
- ii) *Bacillus amyloliquefaciens* NP122 depositado como NRRL con número de depósito B-50910, y
- iii) *Bacillus amyloliquefaciens* B2 depositado como NRRL con número de depósito B-50908.

13. Composición según la reivindicación 11 o 12, donde la cepa o cepas de *Bacillus* y una o varias cepas de bacterias del ácido láctico comprenden una secuencia de ADNr 16S seleccionada del grupo que consiste en:

(a) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 1;

(a) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 2;

(c) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 3;

(d) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 4;

(e) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 5; y

(f) ADNr 16S que tiene al menos un 98 %, *p. ej.*, al menos un 98.2 %, al menos un 98.4 %, al menos un 98.6 %, al menos un 98.8 %, al menos un 99.0 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, al menos un 99.7%, al menos un 99.8 %, al menos un 99.9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N.º: 6.

# Recuperación bacteriana no selectiva después del tratamiento con esporas de *Bacillus* y bacterias acuosas de ácido láctico

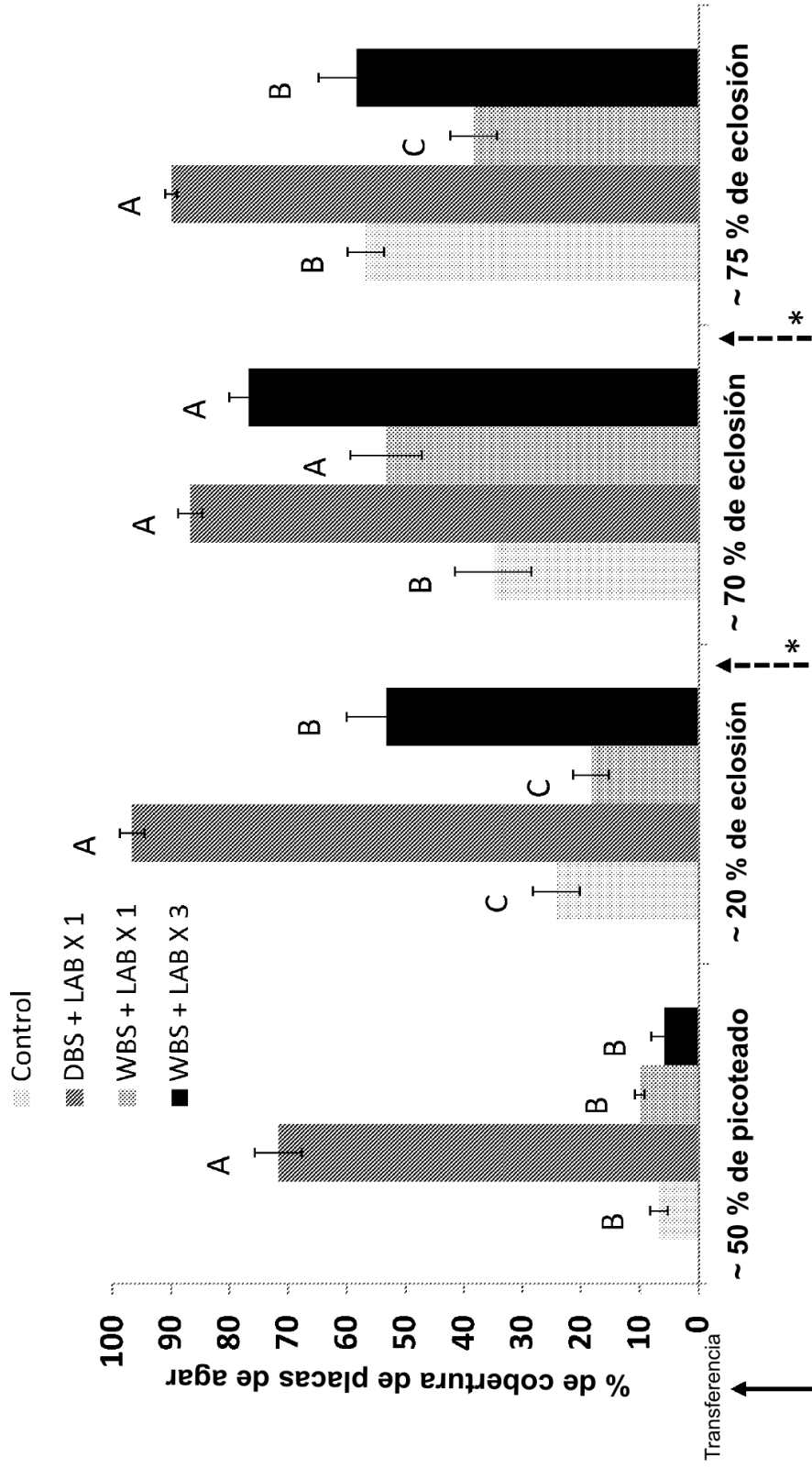
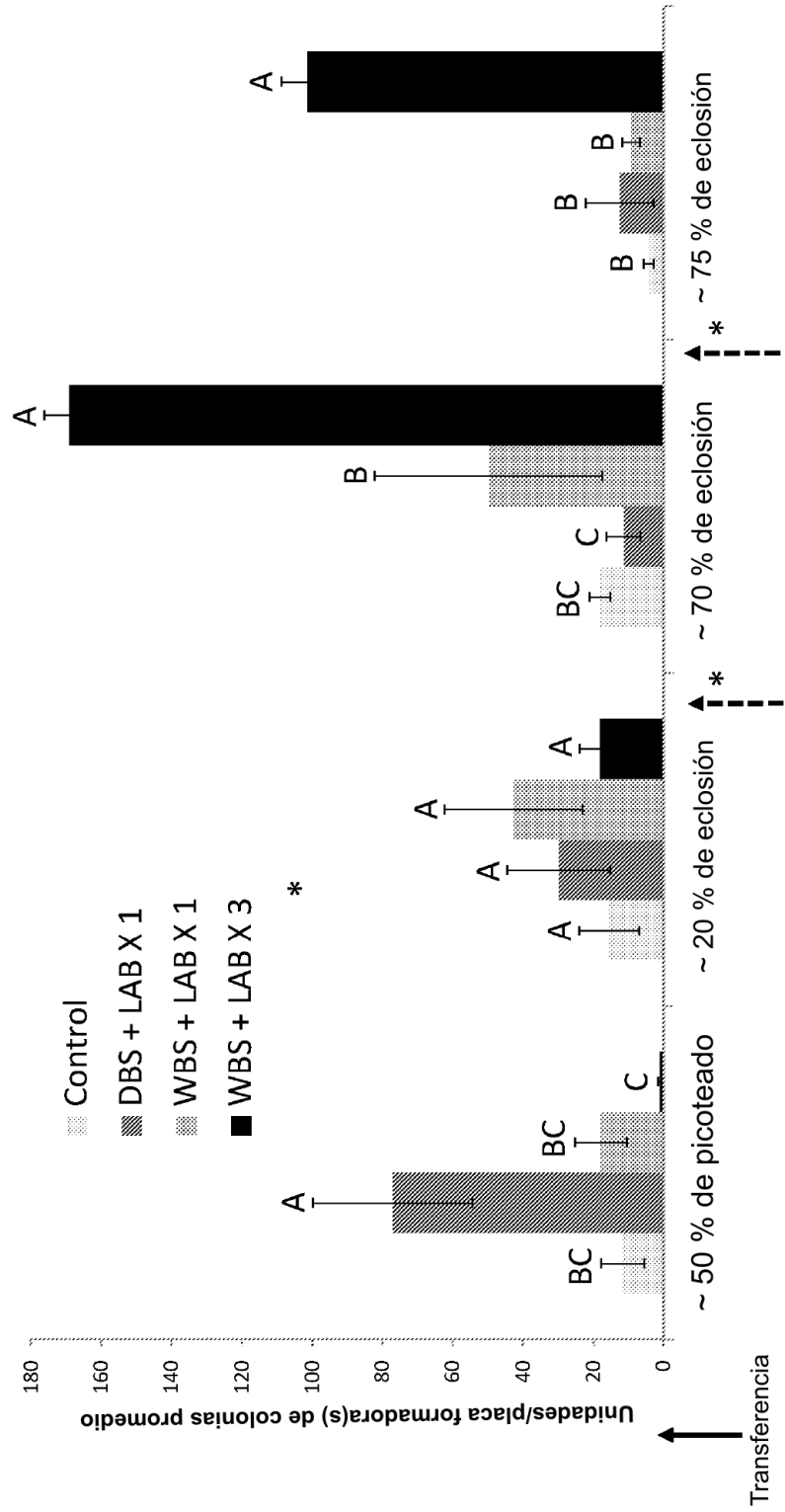


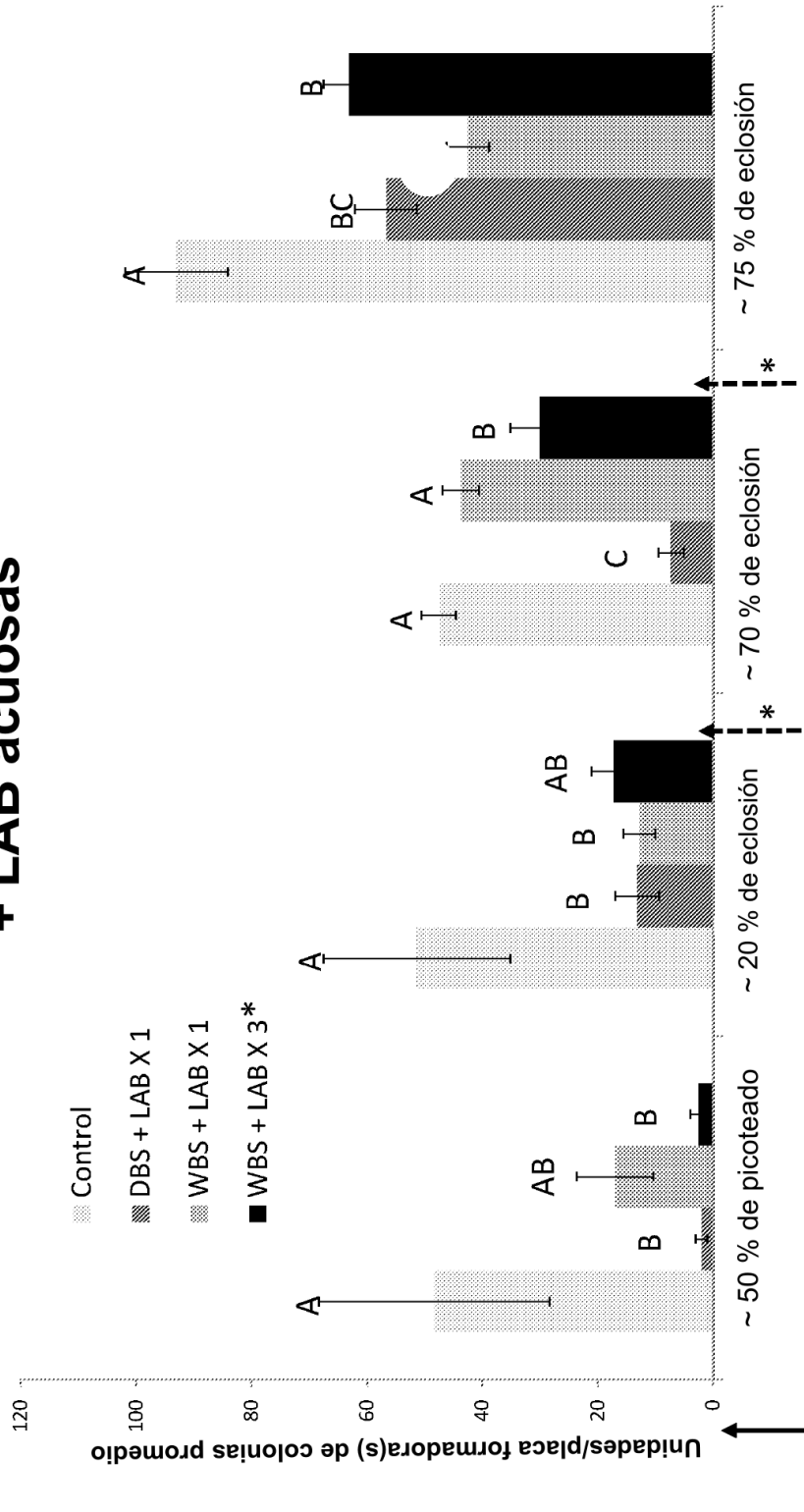
Figura 1

## Recuperación de bacterias del ácido láctico de los gabinetes de incubación después de esporas de Bacillus secas o acuosas + LAB acuosas



**Figura 2**

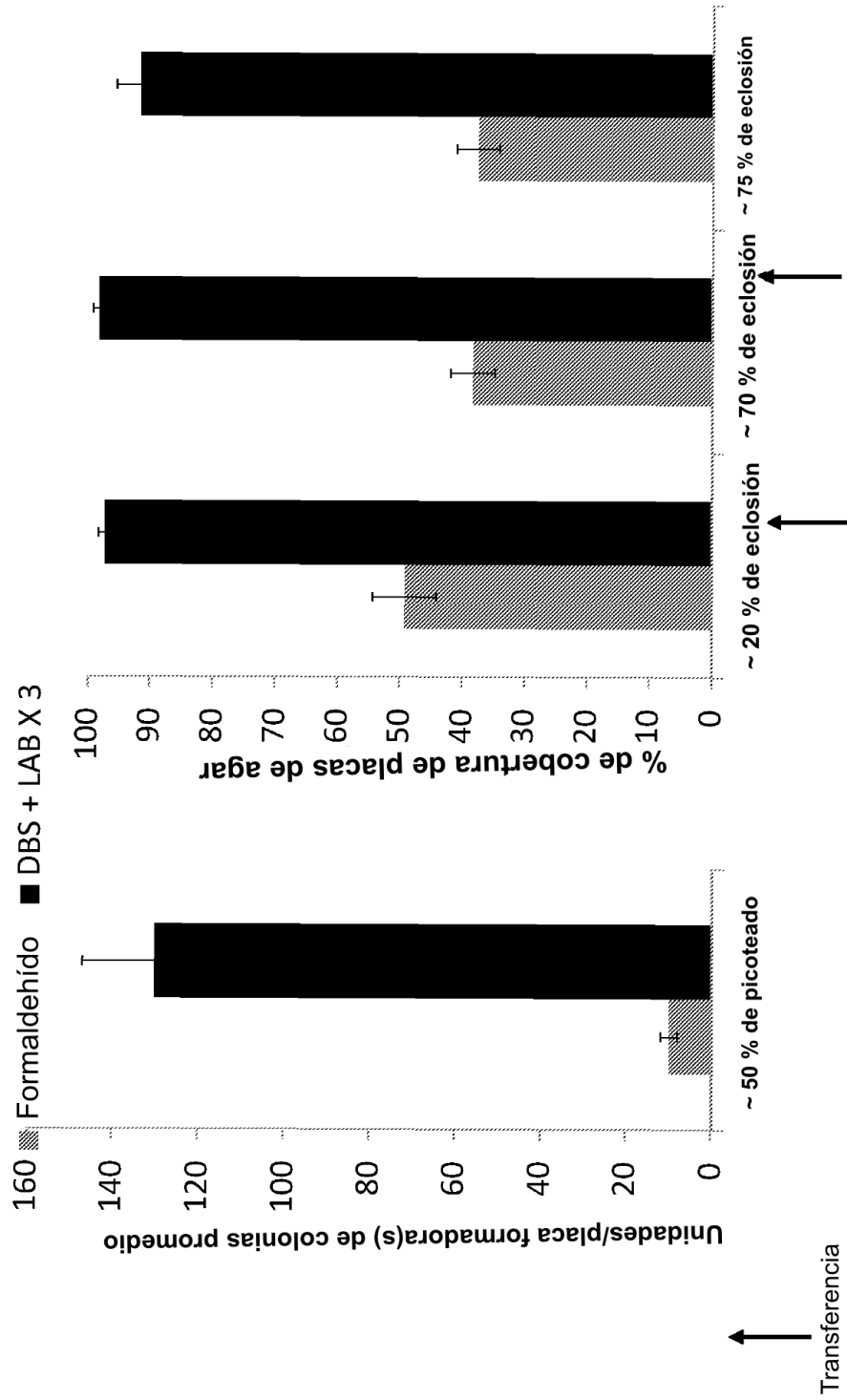
# Recuperación de bacterias gramnegativas de los gabinetes de incubación después de esporas de Bacillus secas o acuosas + LAB acuosas



Transferencia Las flechas indican los tiempos de aplicación. DBS, spray de Bacillus seco. WBS, spray de Bacillus húmedo.

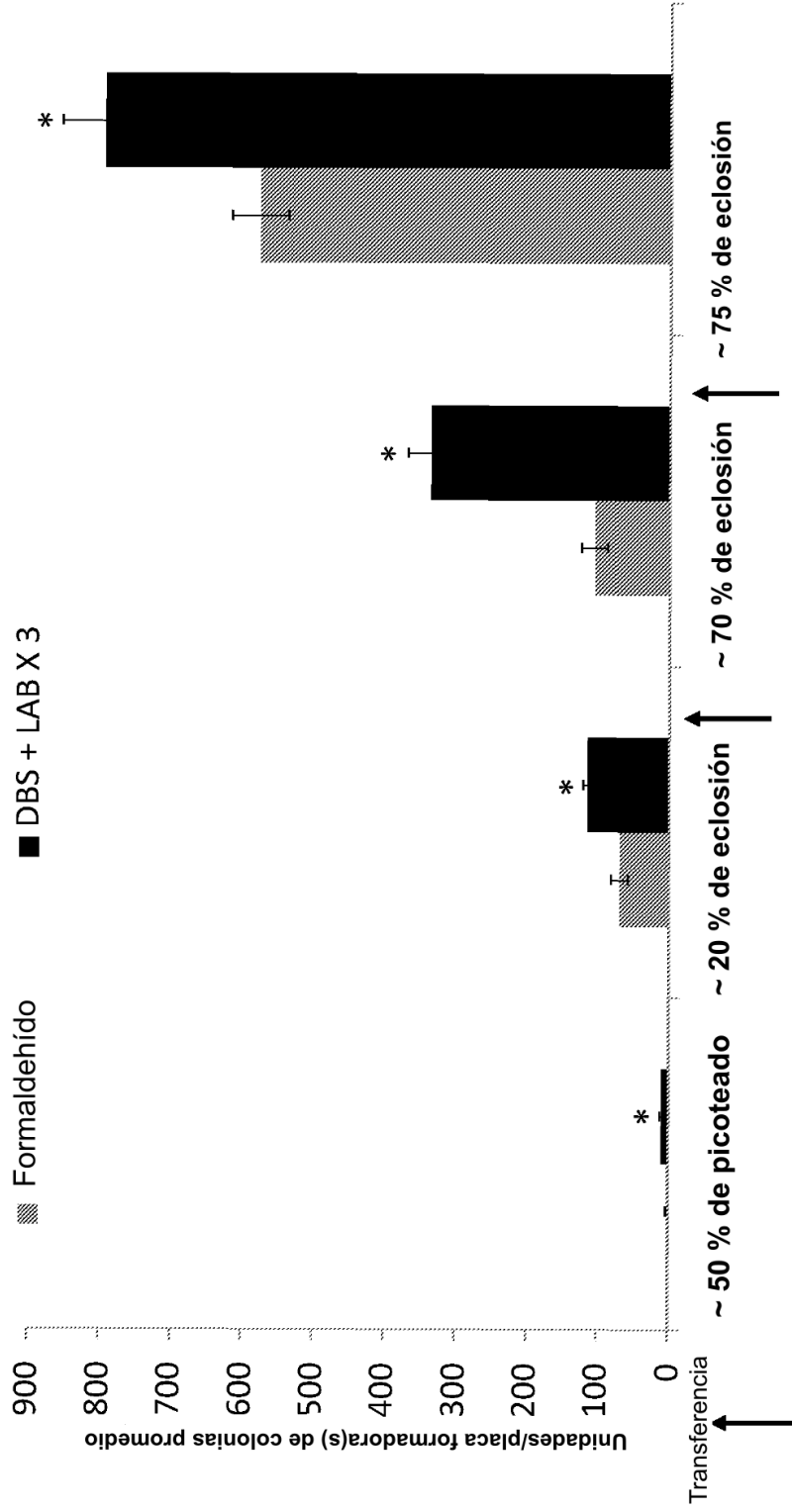
Figura 3

**Recuperación bacteriana no selectiva de los gabinetes de incubación sin tratar o después de 3 aplicaciones de esporas secas y LAB acuosas**



**Figura 4**

## Recuperación de presuntas bacterias del ácido láctico de los gabinetes de incubación sin tratar o después de 3 aplicaciones de esporas secas y LAB acuosas



**Figura 5**

# Recuperación de bacterias gramnegativas de los gabinetes de incubación sin tratar o después de 3 aplicaciones de esporas secas y LAB acuosas

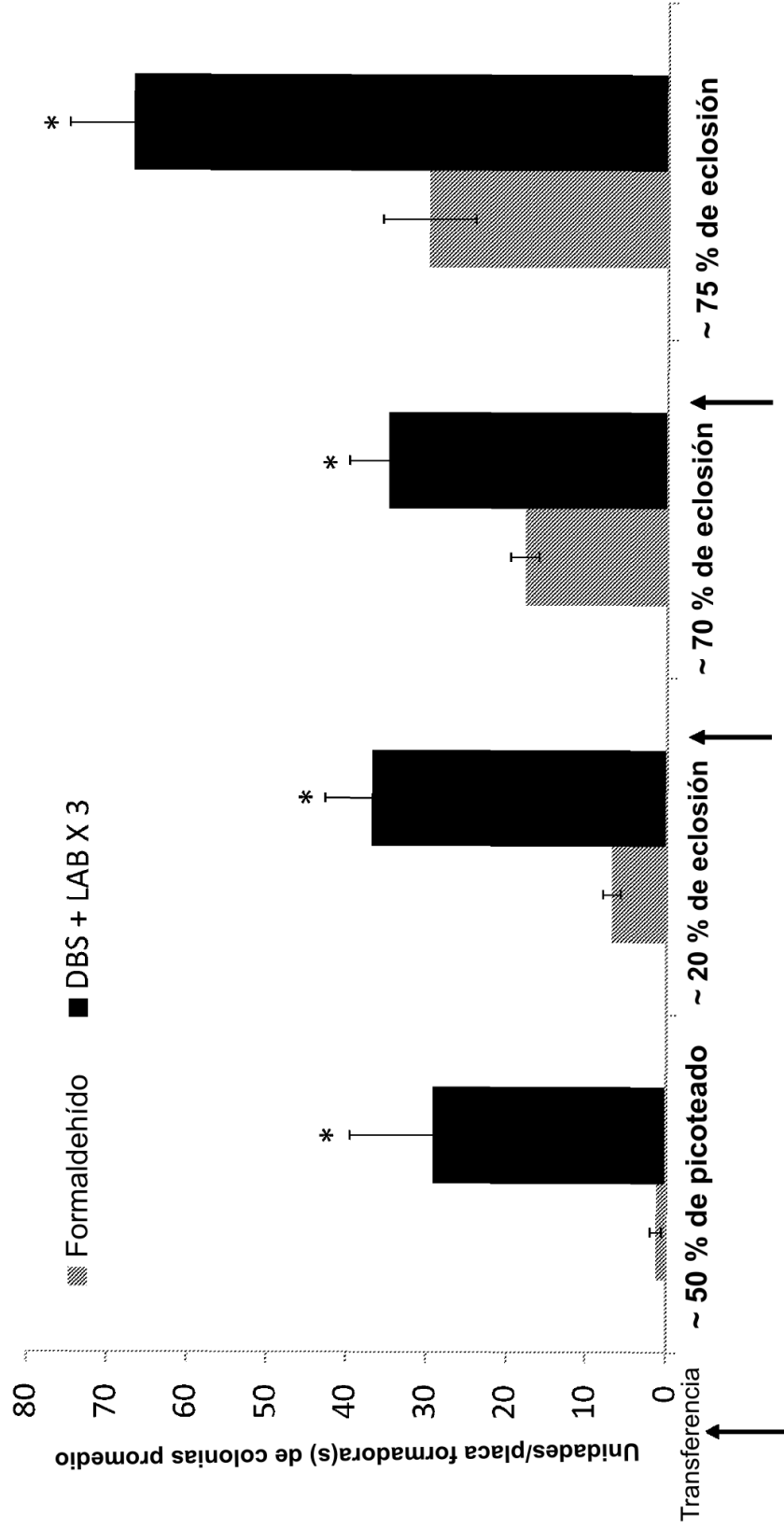


Figura 6

# Peso corporal y mortalidad a los 7 días

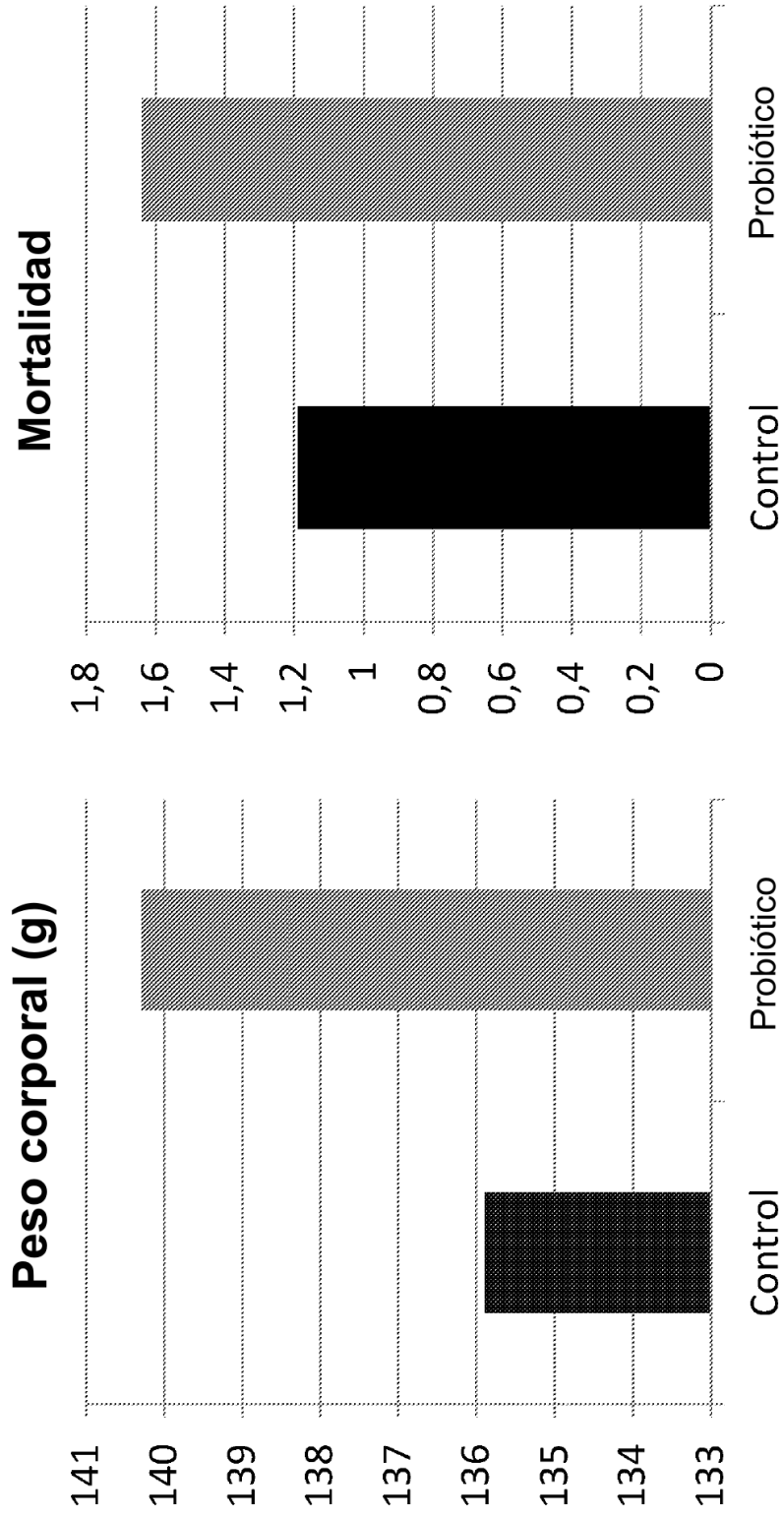


Figura 7

# Peso de venta y viabilidad

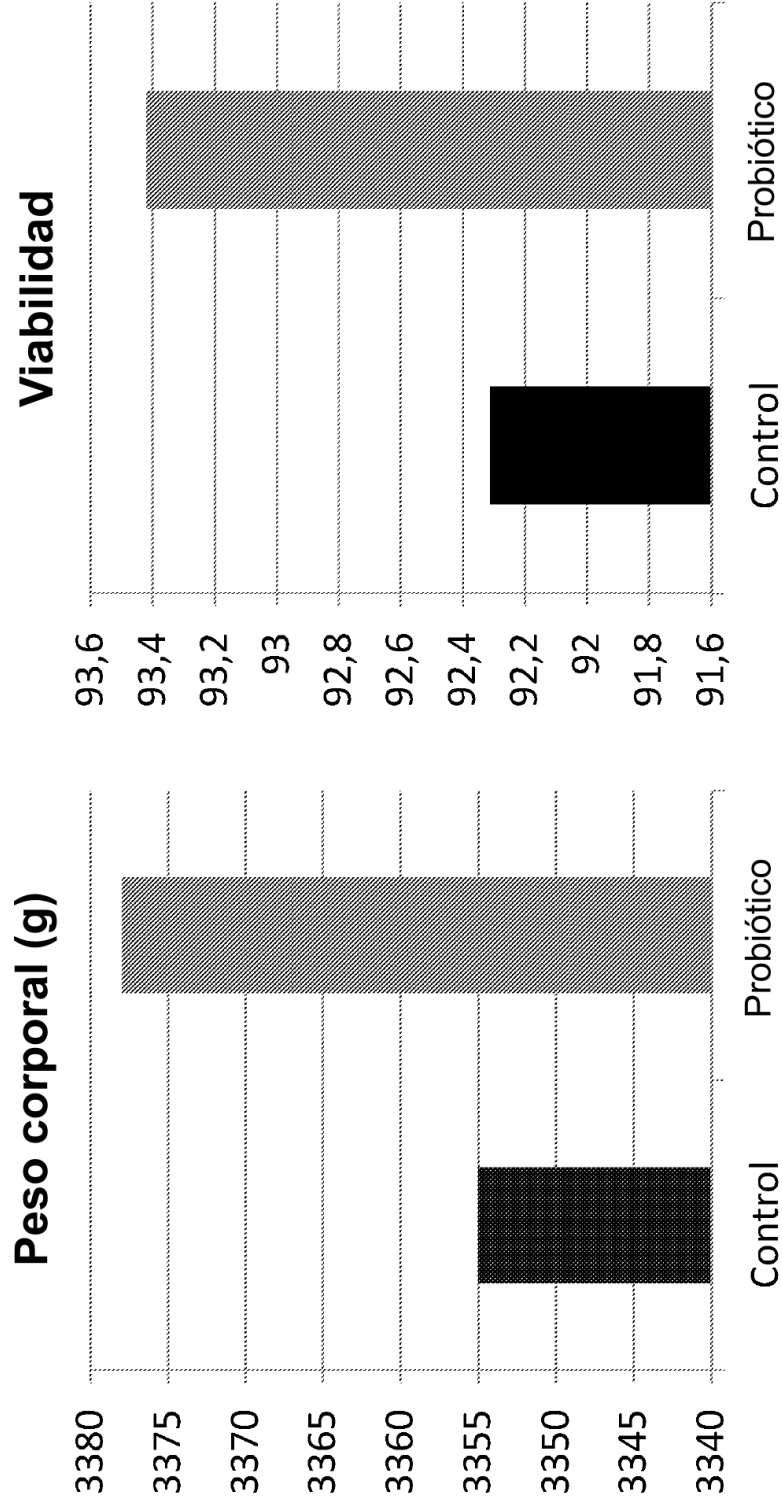


Figura 8

# Conversión alimenticia de venta

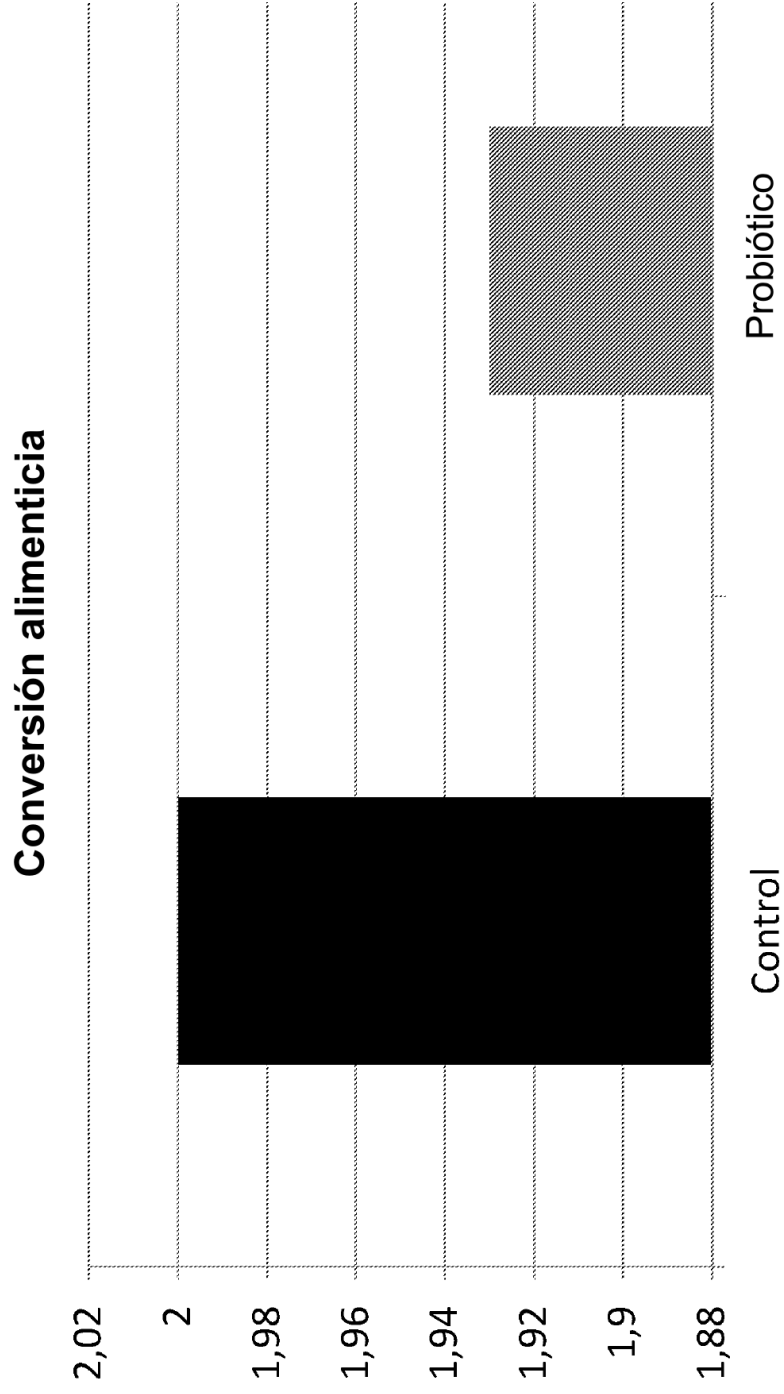


Figura 9