

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA REDUCIR LOS GASES ATMOSFÉRICOS ENTÉRICOS PERJUDICIALES EN EL GANADO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad a las solicitudes de patente provisional estadounidense N.º 62/972.973, presentada el 11 de febrero de 2020; 63/024.191, presentada el 13 de mayo de 2020; 63/038.985, presentada el 15 de junio de 2020; y 63/126.711, presentada el 17 de diciembre de 2020, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los gases que retienen calor en la atmósfera se denominan “gases de efecto invernadero” o “GHG”, e incluyen dióxido de carbono, metano, óxido nitroso y gases fluorados (informe EPA 2016 en 6).

El dióxido de carbono (CO₂) ingresa a la atmósfera a través de la combustión de combustibles fósiles (carbón, gas natural y petróleo), desechos sólidos, árboles y productos de madera, y también como resultado de ciertas reacciones químicas, por ejemplo, la fabricación de cemento. El dióxido de carbono se elimina de la atmósfera mediante, por ejemplo, la absorción de las plantas, como parte del ciclo biológico del carbono.

El óxido nitroso (N₂O) se emite durante las actividades industriales y durante la combustión de combustibles fósiles y desechos sólidos. En la agricultura, la aplicación excesiva de fertilizantes que contienen nitrógeno y las prácticas de control del suelo deficientes también pueden conducir a un aumento de las emisiones de óxido nitroso y otros gases a base de nitrógeno.

Los gases fluorados que incluyen, por ejemplo, hidrofluorocarbonos, perfluorocarbonos, hexafluoruro de azufre y trifluoruro de nitrógeno son potentes gases de efecto invernadero sintéticos que se emiten a partir de una variedad de procesos industriales.

El metano (CH₄) se emite durante la producción y el transporte de carbón, gas natural y petróleo. Además, otras prácticas agrícolas y la descomposición de desechos orgánicos en lagunas y en rellenos sanitarios municipales pueden producir emisiones de metano. En particular, las emisiones de metano, sin embargo, también pueden generarse a partir de la producción de animales de ganado, muchos de cuyos

sistemas digestivos comprenden microorganismos metanogénicos (*Overview of Greenhouse Gases* 2016).

En función de recientes mediciones de centros de monitoreo en el mundo y la medición de aire más antiguo de burbujas de aire retenido en capas de hielo de la Antártida y Groenlandia, las concentraciones atmosféricas globales de los GHG han aumentado significativamente durante los últimos cien años (informe EPA 2016 en, por ejemplo, 6, 15).

Especialmente desde la Revolución Industrial que comenzó en el siglo XVIII, la actividad humana ha contribuido a la cantidad de GHG en la atmósfera mediante la combustión de combustibles fósiles, la tala de bosques y la realización de otras actividades. Muchos de los GHG que se emiten a la atmósfera permanecen allí durante largos períodos de tiempo que varían de una década a muchos milenios. Con el tiempo estos gases se eliminan de la atmósfera mediante reacciones químicas o mediante sumideros de emisión, tales como océanos y vegetación que absorben los GHG de la atmósfera.

Los líderes mundiales han intentado frenar el aumento de las emisiones de GHG a través de tratados y otros acuerdos interestatales. Uno de estos intentos es a través del uso de sistemas de créditos de carbono. Un crédito de carbono es una expresión genérica para un certificado o permiso comercializable que representa el derecho a emitir una tonelada de dióxido de carbono o un GHG equivalente. En un sistema de créditos de carbono típico, un órgano de gobierno fija cuotas en función de la cantidad de emisiones de GHG que puede producir un operador. Para exceder estas cuotas se requiere que el operador adquiera permisos extra de otros operadores que no hayan utilizado todos sus créditos de carbono.

Un objetivo de los sistemas de créditos de carbono es incentivar a las empresas a invertir en más tecnologías, maquinarias y prácticas ecológicas para beneficiarse del comercio de estos créditos. De acuerdo con el Protocolo de Kioto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático (CMNUCC), una gran cantidad de países han aceptado someterse internacionalmente a las políticas de reducción de GHG, incluido el comercio de créditos de emisiones. Si bien Estados Unidos no se sometió al Protocolo de Kioto, y si bien no hay un sistema nacional de comercio de emisiones central en los EE. UU., algunos estados, tales como California y un grupo de estados del noreste, han comenzado a adoptar tales esquemas de comercio.

Otro intento para reducir los GHG atmosféricos, en particular, las emisiones de

metano, consiste en el uso de aditivos o suplementos alimenticios en la producción ganadera. El ganado rumiante, por ejemplo, ganado vacuno, oveja, búfalo, cabra, ciervo y camello, es único por sus cuatro compartimentos estomacales: retículo, rumen, omaso y abomaso. El rumen, en particular, es un órgano grande y hueco en donde se produce la fermentación microbiana de sustancias ingeridas, tal como material de planta fibroso. Este órgano puede contener 40-60 galones de material, con una concentración microbiana estimada de 150 mil millones de microbios por cucharadita de contenido del rumen.

El rumen funciona como un recipiente de fermentación anaeróbica para ciertas bacterias que producen subproductos de fermentación gaseosos, incluso oxígeno, nitrógeno, H_2 y dióxido de carbono. Ver la **Figura 1**. La metanogénesis es un proceso natural que contribuye a la eficacia del sistema digestivo, reduce la presión parcial de H_2 y permite el funcionamiento normal de las enzimas microbianas. El proceso es regulado por metanógenos, y el más común de estos es *Methanobrevibacter*. Los metanógenos forman una biopelícula sobre las superficies en las que bacterias y protozoos productores de hidrógeno producen activamente el H_2 necesario para reducir el dióxido de carbono a metano.

Como un ejemplo, el ganado vacuno, criado tanto para carne como para leche, así como para productos no comestibles como estiércol y trabajo, es responsable de las mayores cantidades de emisiones del ganado, al representar alrededor de 65 % de las emisiones del sector del ganado. Una vaca puede eructar aproximadamente de 130 a más de 250 galones de gas ruminal producido mediante fermentación cada día. Esto es importante para la salud de la vaca, ya que impide la hinchazón; sin embargo, el resultado negativo es la emisión de GHG, tales como dióxido de carbono y metano, a la atmósfera.

Otros animales, incluso animales no rumiantes, también contribuyen a la producción de GHG entéricos. Por ejemplo, los cerdos, roedores, monos, caballos, mulas, burros, rinocerontes, hipopótamos, osos, aves de corral y ciertas otras aves también contienen bacterias metanogénicas en sus sistemas digestivos. Ciertos animales monogástricos también producen emisiones de N_2O y CO_2 .

Además de la fermentación intestinal, el estiércol del ganado también puede ser una fuente de emisiones de GHG. El estiércol contiene dos componentes que pueden generar emisiones de GHG durante el almacenamiento y el procesamiento: material orgánico que puede convertirse en emisiones de metano, y nitrógeno que genera de manera indirecta emisiones de óxido nitroso. El metano se libera cuando las

bacterias metanogénicas descomponen el material orgánico en el estiércol mientras se mantiene en lagunas, pozos de relaves o tanques de retención. Además, el estiércol y la orina liberan nitrógeno en forma de amoníaco (NH_3) durante el almacenamiento y el procesamiento. El amoníaco luego puede transformarse en óxido nitroso. (Gerber *et al.* 2013).

En la actualidad, los enfoques para reducir las emisiones de metano de ganado incluyen la defaunación del sistema digestivo e incluso la vacunación contra metanógenos. Sin embargo, las desventajas de estas estrategias son que pueden reducir la cantidad de microbios intestinales beneficiosos, y los métodos pueden tener resultados efímeros debido a la adaptación microbiana. Adicionalmente, los proveedores de energía han intentado recolectar el metano de lagunas de estiércol y pozos de recolección como una forma de combustible biogás; sin embargo, los métodos son ineficaces y no capturan cantidades significativas de metano en relación con la cantidad total de metano generada por la producción de ganado.

Otras estrategias han implicado la modificación de la dieta, en particular para pastizales donde pasta el ganado, a fin de manipular la fermentación intestinal mediante, por ejemplo, la inhibición directa de metanógenos y protozoos, o al alejar los iones de hidrógeno de los metanógenos mediante redireccionamiento para reducir la metanogénesis. Dichas modificaciones de la dieta incluyen, por ejemplo, la adición de probióticos, acetógenos, bacteriocinas, ionóforos (por ejemplo, monensina y lasalocida), ácidos orgánicos y/o extractos vegetales (por ejemplo, taninos y/o algas) como alimentación. (Ishler 2016). La mayoría de los compuestos antimetanogénicos son costosos y efímeros, muestran resultados inconsistentes, requieren concentraciones altas, no contienen aceptores de H_2 , no afectan los metanógenos en forma de biopelículas, y comprenden compuestos que son fácilmente destruidos y/o excretados.

Los productos de aditivo alimenticio específicos incluyen, por ejemplo, Mootral, Bovaer® y FutureFeed, cada uno con sus propias limitaciones. Mootral es un suplemento alimenticio que comprende una combinación patentada de compuestos activos de ajo, y flavonoides derivados de cítricos. El producto funciona mediante inhibición/eliminación directa de bacterias metanogénicas. La cantidad de reducción real de metano, de alrededor de 30 %, es baja, no obstante, en comparación con el costo por vaca por año. Adicionalmente, el producto puede aumentar el contenido de urea de la leche, lo que indica un aumento en la producción de óxido nitroso.

Bovaer® es un aditivo alimenticio que comprende 3-nitrooxi propanol, que inhibe la metil coenzima M reductasa, una enzima que cataliza la etapa final en la

metanogénesis. La cantidad de reducción real de metano lograda también es relativamente baja, de alrededor de 30 %, y de una duración relativamente corta. Adicionalmente, debido a la falta de aceptores de H₂, el producto puede causar un olor a pescado en la leche producida debido a un aumento en la producción de trimetilamina.

FutureFeed es un suplemento alimenticio que utiliza un tipo específico de alga que puede reducir las emisiones de metano entérico en hasta 98 %. Sin embargo, el producto es costoso a 200 dólares por kg y tarda en tener un impacto consistente sobre la producción de gases entéricos.

La industria del ganado es importante para la producción de, por ejemplo, carnes y productos lácteos; sin embargo, crecientes preocupaciones por el cambio climático y la necesidad de reducir las emisiones de GHG exigen mejores enfoques para la producción de ganado con emisiones de GHG reducidas.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona composiciones y métodos para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero atmosféricos de animales de ganado. Más específicamente, la presente invención proporciona composiciones que, cuando entran en contacto con el sistema digestivo y/o los desechos de un animal de ganado, conducen a una reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero que habrían sido producidas de otro modo por los procesos digestivos y/o los desechos del animal. Ventajosamente, las composiciones y métodos también pueden mejorar la salud general de un animal de ganado.

En formas de realización específicas, la presente invención proporciona una composición para la salud digestiva para reducir el metano, dióxido de carbono y/u otros gases atmosféricos perjudiciales entéricos y/o los precursores de estos producidos en el sistema digestivo y/o los desechos de un animal de ganado, en donde la composición comprende uno o más microorganismos beneficiosos y/o uno o más subproductos de crecimiento microbiano. En formas de realización preferidas, los microorganismos beneficiosos son hongos, levaduras y/o bacterias no patógenos capaces de producir uno o más de los siguientes: agentes tensioactivos, tales como lipopéptidos y/o glicolípidos; compuestos bioactivos con efectos antimicrobianos e inmunomoduladores; policétidos; ácidos; péptidos; compuestos antiinflamatorios; enzimas, tales como proteasas, amilasas y/o lipasas; y fuentes de aminoácidos, vitaminas y otros nutrientes.

Ventajosamente, en formas de realización preferidas, las presentes composiciones pueden ayudar a reducir las emisiones de gases atmosféricos perjudiciales que resultan de la producción de ganado al controlar y/o inhibir los microbios metanogénicos, y/o los simbioses de estos, que están presentes en el sistema digestivo y/o los desechos del animal.

En una forma de realización, la composición altera las biopelículas de metanógenos. En una forma de realización, la composición inhibe directamente los metanógenos y/o la vía biológica implicada en la metanogénesis.

Ventajosamente, en formas de realización preferidas, las presentes composiciones también pueden disminuir la cantidad de H₂ en exceso que puede producirse cuando se inhibe la metanogénesis, al, por ejemplo, introducir aceptores de H₂.

En ciertas formas de realización, la composición puede formularse para la administración entérica y/o parenteral al sistema digestivo del animal de ganado. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, la composición puede formularse como polvos, gránulos y/o pélets de alimento seco para complementar los granos y/o el forraje (por ejemplo, plantas de pastizal, heno, forraje fermentado y/o residuo de cultivo).

En ciertas formas de realización preferidas, la composición comprende uno o más microorganismos, y/o subproductos de crecimiento de estos, en donde los microorganismos son bacterias, hongos y/o levaduras. Los microorganismos pueden ser, por ejemplo, bacterias *Bacillus* spp.; mixobacterias; hongos *Pleurotus* spp.; hongos *Lentinula* spp.; hongos *Trichoderma* spp.; levaduras *Saccharomyces* spp.; *Debaryomyces hansenii*; *Starmerella bombicola*; *Wickerhamomyces anomalus*; *Meyerozyma guilliermondii*; *Pichia occidentalis*; *Monascus purpureus*; y/o *Acremonium chrysogenum*.

Cuando están presentes, las bacterias se pueden usar en forma de espora, como células vegetativas y/o como una mezcla de estas.

Los hongos pueden estar en forma de células vivas o inactivas, micelios, esporas y/o cuerpos fructíferos. Los cuerpos fructíferos, si están presentes, pueden estar, por ejemplo, cortados y/o mezclados en gránulos y/o una forma de polvo.

Las levaduras pueden estar en forma de células vivas o inactivas o esporas, así como en forma de células secas y/o durmientes (por ejemplo, un hidrolizado de levadura).

En una forma de realización preferida, la composición comprende una cepa de

B. amyloliquefaciens. En una forma de realización preferida específica, la cepa de *B. amyloliquefaciens* es *B. amyloliquefaciens* NRRL B-67928 ("*B. amy*"). *B. amy* es particularmente ventajosa en comparación con los microorganismos probióticos tradicionales debido a su capacidad para producir esporas que siguen siendo viables en el tracto digestivo y, en algunas formas de realización, después de su excreción de los desechos del animal. Adicionalmente, *B. amy* produce una mezcla única de metabolitos que proporciona un amplio espectro de beneficios digestivos y ambientales cuando se administra a un animal de ganado y/o sus desechos.

En una forma de realización de ejemplo, la composición comprende *B. amy*. En una forma de realización de ejemplo, la composición comprende *B. subtilis* B4 (NRRL B-68031). En una forma de realización de ejemplo, la composición comprende *Pleurotus ostreatus*. En una forma de realización de ejemplo, la composición comprende *Saccharomyces boulardii*. En una forma de realización de ejemplo, la composición comprende *Debaryomyces hansenii*.

En ciertas formas de realización de ejemplo, la composición puede comprender cualquier combinación de *B. amy*, *P. ostreatus*, *S. boulardii* y/o *D. hansenii*.

En una forma de realización, la composición para el sistema digestivo comprende un subproducto de crecimiento microbiano. El subproducto de crecimiento microbiano puede producirse por los microorganismos de la composición, y/o estos pueden producirse por separado y agregarse a la composición.

En una forma de realización, el subproducto de crecimiento se ha purificado de un medio de cultivo en el que se produjo. De manera alternativa, en una forma de realización, el subproducto de crecimiento se utiliza en forma cruda. La forma cruda puede comprender, por ejemplo, un sobrenadante líquido que se genera a partir del cultivo de un microbio que produce el subproducto de crecimiento de interés, que incluye células y/o nutrientes residuales.

Los subproductos de crecimiento pueden incluir metabolitos y/u otros productos bioquímicos como resultado del crecimiento celular, incluso, por ejemplo, biotensioactivos, enzimas, policétidos, ácidos, alcoholes, solventes, proteínas y/o péptidos.

En ciertas formas de realización, la composición comprende un potenciador de la germinación para potenciar la germinación de microorganismos en forma de esporas utilizados en la composición a base de microbios. En formas de realización específicas, los potenciadores de la germinación son aminoácidos, por ejemplo, L-alanina y/o L-leucina. En una forma de realización, el potenciador de la germinación es

manganeso.

En una forma de realización, la composición comprende uno o más ácidos grasos. En ciertas formas de realización preferidas, el ácido graso es un ácido graso saturado de cadena larga que tiene una cadena principal de carbono de 14-20 carbonos, por ejemplo, ácido mirístico, ácido palmítico o ácido esteárico. En algunas formas de realización, una combinación de dos o más ácidos grasos saturados de cadena larga se incluye en la composición. En algunas formas de realización, un ácido graso saturado de cadena larga puede inhibir la metanogénesis y/o aumentar la permeabilidad de la membrana celular de metanógenos.

En algunas formas de realización, la composición puede comprender componentes adicionales que se conoce que reducen el metano en el sistema digestivo del animal de ganado, por ejemplo, algas (por ejemplo, *Asparagopsis taxiformis* y/o *Asparagopsis armata*); algas marinas; nitrooxipropanoles (3-nitrooxipropanol y/o etil-3-nitrooxipropanol); antraquinonas; ionóforos (por ejemplo, monensina y/o lasalocida); polifenoles (por ejemplo, saponinas, taninos); extracto de *Yucca schidigera* (productora de saponina esteroide); extracto de *Quillaja saponaria* (especie de planta productora de saponina triterpenoide); organoazufres (por ejemplo, extracto de ajo); flavonoides (por ejemplo, quercetina, rutina, kaempferol, naringina y antocianidinas); bioflavonoides de frutos cítricos verdes, escaramujo y grosellas negras); ácido carboxílico y/o terpenos (por ejemplo, d-limoneno, pineno y extractos cítricos).

En una forma de realización de ejemplo, la composición comprende un microorganismo tal como, por ejemplo, *B. amy*, y 3-nitrooxipropanol (3NOP), un compuesto orgánico que tiene la fórmula $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{ONO}_2$. 3NOP es eficaz para inhibir una o más enzimas implicadas en la metanogénesis, por ejemplo, metil coenzima M reductasa. En una forma de realización, la composición de la presente puede comprender una o más sustancias y/o nutrientes adicionales para complementar las necesidades nutricionales del animal de ganado y promover la salud y/o el bienestar del animal de ganado, por ejemplo, fuentes de aminoácidos (incluidos los aminoácidos esenciales), péptidos, proteínas, vitaminas, microelementos, grasas, ácidos grasos, lípidos, carbohidratos, esteroides, enzimas, minerales, tales como calcio, magnesio, fósforo, potasio, sodio, cloro, azufre, cromo, cobalto, cobre, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, níquel, selenio y zinc, y/u otros compuestos bioactivos con efectos antiinflamatorios, antimicrobianos y/o inmunomoduladores en animales. En algunas formas de realización, los microorganismos de la composición producen y/o

proporcionan estas sustancias.

En formas de realización preferidas, la presente invención proporciona un método para reducir las emisiones de gases atmosféricos perjudiciales al reducir el metano, dióxido de carbono y/u otros gases atmosféricos perjudiciales, y/o los precursores de estos (por ejemplo, nitrógeno y/o amoníaco, que son precursores de óxido nítrico), producidos en los sistemas digestivos y/o los desechos de los animales de ganado.

En ciertas formas de realización específicas, los métodos comprenden poner en contacto una composición para la salud digestiva de acuerdo con la presente invención con el sistema digestivo de un animal de ganado. La composición puede administrarse por vía entérica y/o parenteral al sistema digestivo del animal de ganado. Por ejemplo, la composición puede administrarse al animal de ganado por vía oral, a través del alimento y/o agua potable del animal; mediante endoscopia; mediante inyección directa en una o más partes del sistema digestivo; mediante un supositorio; mediante trasplante fecal; y/o mediante enema.

Ventajosamente, en formas de realización preferidas, los métodos dan como resultado una inhibición directa de las bacterias metanogénicas y/o los simbioses de estas, la alteración de las biopelículas metanogénicas, y/o la alteración de vía biológica implicada en la metanogénesis en el sistema digestivo del animal de ganado, por ejemplo, el rumen, el estómago y/o los intestinos.

En ciertas formas de realización, los métodos también pueden contrarrestar la disminución de aceptor de H_2 que resulta de una menor metanogénesis. En consecuencia, se pueden prevenir y/o reducir los potenciales efectos negativos del exceso de H_2 en productos de ganado. Por ejemplo, el exceso de H_2 en el tracto digestivo de los mamíferos puede generar un olor a pescado en la leche debido a la sobreproducción de trimetilamina.

En algunas formas de realización, los métodos dan como resultado una mayor conversión de nitrógeno en masa muscular, lo que reduce la cantidad de nitrógeno disponible para la producción de amoníaco y óxido nítrico.

En ciertas formas de realización, los métodos también reducen las emisiones de GHG de los desechos de los animales de ganado (por ejemplo, orina y/o estiércol). En algunas formas de realización, los microorganismos beneficiosos de la composición pueden sobrevivir el transporte a través del sistema digestivo y se excretan con los desechos del animal, donde siguen inhibiendo los metanógenos y/o los simbioses de estos, alterando las biopelículas metanogénicas, alterando las vías biológicas

implicadas en la metanogénesis y/o compensando la pérdida de aceptor de H_2 . La composición puede administrarse al sistema digestivo del animal de ganado y/o directamente al producto de desecho.

En ciertas formas de realización específicas, la composición puede administrarse directamente a una laguna de estiércol, pozo de desechos, pozo de relaves, tanque u otra instalación de almacenamiento donde se almacena y/o trata el estiércol del ganado. Ventajosamente, en algunas formas de realización, los microorganismos en la composición pueden facilitar una mayor tasa de descomposición del estiércol mientras reducen la cantidad de metano y/u óxido nitroso emitida por este. Además, en algunas formas de realización, aplicar la composición al estiércol mejora el valor del estiércol como un fertilizante orgánico debido a la capacidad de los microorganismos para inocular el suelo al que se aplica el estiércol. Los microbios luego crecen y, por ejemplo, mejoran la biodiversidad del suelo, mejoran las propiedades de rizosfera y mejoran el crecimiento y la salud de las plantas.

En algunas formas de realización, los métodos pueden comprender además agregar materiales para mejorar el crecimiento de los microorganismos de la presente composición en el momento de la aplicación (por ejemplo, agregar nutrientes y/o prebióticos). En ciertas formas de realización, el animal de ganado puede alimentarse con una fuente de prebióticos, que puede incluir, por ejemplo, forraje seco para animales, paja, heno, alfalfa, granos, pasto, frutas, vegetales, avena y/o residuo de cultivo.

En algunas formas de realización, se pueden utilizar los métodos para mejorar la salud general de un animal de ganado, por ejemplo, al contribuir a un microbioma intestinal sano, mejorar la digestión, aumentar la relación de conversión de alimento en músculo, aumentar la producción y la calidad de la leche, reducir y/o tratar la deshidratación y el estrés por calor, modular el sistema inmunitario y aumentar la expectativa de vida.

En algunas formas de realización, los métodos de la presente invención pueden ser utilizados por un productor ganadero para reducir el uso de créditos de carbono. Por lo tanto, en ciertas formas de realización, los métodos de la presente pueden comprender además realizar mediciones para evaluar el efecto del método sobre la reducción de la generación de metano, dióxido de carbono y/u otros gases atmosféricos perjudiciales, y/o los precursores de estos (por ejemplo, nitrógeno y/o amoníaco), y/o para evaluar el efecto del método sobre el control de metanógenos y/o protozoos en el sistema digestivo y/o los desechos del animal de ganado, mediante el

uso de técnicas estándar en la técnica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra vías biológicas implicadas en la metanogénesis.

La **Figura 2** muestra los resultados de estudios *in vitro* de composiciones de acuerdo con formas de realización de la presente invención para determinar su capacidad para reducir las emisiones de metano entérico del rumen del ganado.

La **Figura 3** muestra los resultados de estudios *in vitro* de composiciones de acuerdo con formas de realización de la presente invención para determinar su capacidad para reducir las emisiones de dióxido de carbono entérico del rumen del ganado.

La **Figura 4** muestra los resultados de estudios *in vitro* de *B. amy* a tasas variables de inclusión para determinar su capacidad para reducir las emisiones de metano entérico del rumen del ganado.

La **Figura 5** muestra los resultados de estudios *in vitro* de *B. amy* a tasas variables de inclusión para determinar su capacidad para reducir las emisiones de dióxido de carbono entérico del rumen del ganado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones y métodos para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero atmosféricos de la producción de ganado. Más específicamente, la presente invención proporciona composiciones que, cuando entran en contacto con el sistema digestivo y/o los desechos de un animal de ganado, conducen a una reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero que habrían sido producidas de otro modo por los procesos digestivos del animal. Ventajosamente, en algunas formas de realización, las composiciones y métodos también pueden mejorar la productividad y la salud general de los animales de ganado.

En formas de realización específicas, la presente invención proporciona una composición para la salud digestiva para reducir el metano, dióxido de carbono y/u otros gases atmosféricos perjudiciales y/o los precursores de estos producidos en el sistema digestivo y/o los desechos de un animal de ganado, en donde la composición comprende uno o más microorganismos beneficiosos y/o uno o más subproductos de crecimiento microbiano.

Definiciones seleccionadas

Como se usa en la presente, una "biopelícula" es un agregado complejo de microorganismos, tal como bacterias, en donde las células se adhieren entre sí y/o a una superficie. Las células en las biopelículas son fisiológicamente distintas a las células planctónicas del mismo organismo, que son células individuales que flotan o nadan en medio líquido.

Como se usa en la presente, el término "control" usado en referencia a un microorganismo indeseable (por ejemplo, un metanógeno) se extiende al acto de eliminar, incapacitar, inmovilizar y/o reducir las cantidades de población del microorganismo, y/o de otro modo volver al microorganismo incapaz de reproducirse y/o llevar a cabo los procesos que son indeseables (por ejemplo, la producción de metano).

Como se usa en la presente, el "sistema digestivo" se refiere al sistema de órganos en el cuerpo de un animal que permite la digestión o el consumo de alimento y su conversión en energía y desechos. El sistema digestivo puede estar compuesto de, por ejemplo, una cavidad oral, esófago, papo, molleja, proventrículo, estómago, rumen, retículo, omaso, abomaso, páncreas, hígado, intestino delgado, intestino grueso (colon), ciego, apéndice y/o ano. También se contemplan órganos o partes adicionales relacionados con la digestión y que son específicos de un animal en particular.

Como se usa en la presente, una molécula de ácido nucleico, polinucleótido, polipéptido, proteína, compuesto orgánico tal como una molécula pequeña (por ejemplo, las descritas más adelante) u otro compuesto "aislado" o "purificado" está sustancialmente libre de otros compuestos, tal como material celular, al que se asocia en la naturaleza. Por ejemplo, un polinucleótido purificado o aislado (ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN)) está libre de los genes o secuencias que lo flanquean en su estado natural. Un polipéptido purificado o aislado está libre de los aminoácidos o las secuencias que lo flanquean en su estado natural. Una cepa microbiana purificada o aislada se elimina del ambiente en el que existe en la naturaleza. Por lo tanto, la cepa aislada puede existir como, por ejemplo, un cultivo biológicamente puro o como esporas (u otras formas de la cepa) junto con un portador.

En ciertas formas de realización, los compuestos purificados son al menos 60 % en peso del compuesto de interés. Preferentemente, la preparación es al menos 75 %, con mayor preferencia al menos 90 %, y con máxima preferencia al menos 99 %, en peso del compuesto de interés. Por ejemplo, un compuesto purificado es

uno que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % (p/p) del compuesto deseado en peso. La pureza se mide a través de cualquier método estándar adecuado, por ejemplo, mediante análisis de cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Como se usa en la presente, “ionóforos” son antibióticos no terapéuticos de poliéter carboxílico que interrumpen el gradiente de concentración de iones (Ca^{2+} , K^{+} , H^{+} , Na^{+}) a través de los microorganismos, lo que les provoca el ingreso a un ciclo de iones en vano. La interrupción de la concentración de iones evita que el microorganismo mantenga su metabolismo normal y hace que el microorganismo gaste energía adicional. Los ionóforos funcionan al seleccionar en contra o afectar negativamente el metabolismo de bacterias gram positivas, tales como metanógenos, y protozoos.

Un “metabolito” se refiere a cualquier sustancia producida por el metabolismo (por ejemplo, un subproducto de crecimiento) o una sustancia necesaria para formar parte de un proceso metabólico particular. Un metabolito puede ser un compuesto orgánico que es un material de inicio, un producto intermedio o un producto final del metabolismo. Los ejemplos de metabolitos pueden incluir, entre otros, enzimas, toxinas, ácidos, solventes, alcoholes, proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, microelementos, aminoácidos, polímeros, policétidos y tensioactivos.

Como se usa en la presente, un “metanógeno” es un microorganismo que produce gas metano como un subproducto del metabolismo. Los metanógenos son arqueas que pueden encontrarse en los sistemas digestivos y en los desechos metabólicos de animales rumiantes y animales no rumiantes (por ejemplo, cerdos, aves de corral y caballos). Los ejemplos de metanógenos incluyen, entre otros, *Methanobacterium* spp. (por ejemplo, *M. formicicum*), *Methanobrevibacter* spp. (por ejemplo, *M. ruminantium*), *Methanococcus* spp. (por ejemplo, *M. paripaludis*), *Methanoculleus* spp. (por ejemplo, *M. bourgensis*), *Methanoforens* spp. (por ejemplo, *M. stordalenmirens*), *Methanofollis liminatans*, *Methanogenium wolfei*, *Methanomicrobium* spp. (por ejemplo, *M. mobile*), *Methanopyrus kandleri*, *Methanoregula boonei*, *Methanosaeta* spp. (por ejemplo, *M. concilii*, *M. thermophile*), *Methanosarcina* spp. (por ejemplo, *M. barkeri*, *M. mazei*), *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanothermobacter* spp. y/o *Methanothermobacter soehngenii*.

Se entiende que los rangos proporcionados en la presente son una forma abreviada de referirse a los valores dentro del rango. Por ejemplo, se entiende que un

rango de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subrangos del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 así como todos los valores decimales intermedios entre los números enteros mencionados anteriormente, por ejemplo, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 y 1,9. Con respecto a los subrangos, se contemplan de manera específica los “subrangos anidados” que se extienden desde cualquier punto final del rango. Por ejemplo, un subrango anidado de un rango de ejemplo de 1 a 50 puede comprender 1 a 10, 1 a 20, 1 a 30 y 1 a 40 en una dirección, o 50 a 40, 50 a 30, 50 a 20 y 50 a 10 en otra dirección.

Como se usa en la presente, “reducción” significa una alteración negativa y “aumento” significa una alteración positiva, en donde la alteración positiva o negativa es de al menos 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

La expresión de transición “que comprende”, que es sinónimo de “que incluye” o “que contiene” es inclusiva o no concluyente y no excluye elementos o etapas de método adicionales no mencionados. Por el contrario, la frase de transición “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. La frase de transición “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados “y a aquellos que no afecten considerablemente las características básicas y novedosas” de la invención reivindicada. El uso de la expresión “que comprende” contempla otras formas de realización que “consisten” o “consisten esencialmente en” los componentes mencionados.

A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, como se usa en la presente, se entiende que el término “o” es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, como se usa en la presente, se entiende que los términos “un”, “una”, “y”, “el” y “la” están en singular o en plural.

A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, como se usa en la presente, se entiende que la expresión “alrededor de” significa dentro de un rango de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Alrededor de puede entenderse como dentro de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 % o 0,01 % del valor indicado.

La mención de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable en la presente incluye definiciones de esa variable como un grupo único o una combinación de grupos enumerados. La mención de una forma de realización para una variable o un aspecto en la presente incluye dicha forma de realización como cualquier forma de realización individual o en combinación con cualquier otra forma de realización o partes de esta.

Todas las referencias citadas en la presente se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Composiciones para la salud digestiva

En formas de realización preferidas, la presente invención proporciona una composición para la salud digestiva para reducir el metano, dióxido de carbono, nitrógeno y/u otros gases atmosféricos perjudiciales y/o los precursores de estos producidos en el sistema digestivo y/o los desechos de un animal de ganado, en donde la composición comprende uno o más microorganismos beneficiosos y/o uno o más subproductos de crecimiento microbiano.

En ciertas formas de realización, la composición para la salud digestiva es una "composición a base de microbios", que significa una composición que comprende componentes que se produjeron como resultado del crecimiento de microorganismos u otros cultivos celulares. Por lo tanto, la composición a base de microbios puede comprender los mismos microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano. Los microbios pueden estar en estado vegetativo, en forma de espora, en forma micelar, en cualquier otra forma de propágulo, o una mezcla de estas. Los microbios pueden ser planctónicos o estar forma de biopelícula, o una mezcla de ambas formas. Los subproductos de crecimiento pueden ser, por ejemplo, metabolitos, componentes de la membrana celular, proteínas expresadas y/u otros componentes celulares. Los microbios pueden estar intactos o lisados. Las células pueden estar totalmente ausentes o presentes en, por ejemplo, una concentración de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} o más CFU por mililitro de la composición.

De manera ventajosa, en formas de realización preferidas, las presentes composiciones pueden alterar los procesos digestivos de los animales de ganado, lo que genera una disminución de la producción de gas atmosférico entérico.

En algunas formas de realización, las presentes composiciones pueden usarse para reducir la producción de metano, dióxido de carbono y/o óxido nitroso en ganado

y/o desechos de ganado. Por ejemplo, las composiciones pueden inhibir o controlar directamente bacterias metanogénicas y/o los simbioses de estas en el sistema digestivo y/o los desechos del animal, así como alterar la integridad y/o la producción de las biopelículas formadas por metanógenos. Adicionalmente, en algunas formas de realización, las composiciones pueden interferir en las vías biológicas implicadas en la metanogénesis. Además, en algunas formas de realización, las composiciones pueden compensar la pérdida de compuestos aceptores de H_2 que resulta cuando se reduce la metanogénesis.

En algunas formas de realización, la composición también puede mejorar el crecimiento y la salud del ganado, mientras permite una transformación más completa de las fuentes de proteínas en el alimento para reducir la liberación de nitrógeno en el desecho de los animales en forma de, por ejemplo, amoníaco y/o urea. Ventajosamente, en algunas formas de realización, esto puede dar como resultado una menor producción de óxido nitroso.

En formas de realización preferidas, los microorganismos beneficiosos de las composiciones de la presente son hongos, levaduras y/o bacterias no patógenas. Los microorganismos beneficiosos pueden estar activos, inactivos y/o durmientes. En formas de realización preferidas, el microorganismo es uno caracterizado como "considerado generalmente como seguro", o GRAS, por el ente regulador correspondiente.

Los microorganismos de la presente invención pueden ser microorganismos naturales o modificados por ingeniería genética. Por ejemplo, los microorganismos pueden transformarse con genes específicos para exhibir características específicas. Los microorganismos también pueden ser mutantes de una cepa deseada. Como se usa en la presente, "mutante" significa una cepa, variante genética o subtipo de un microorganismo de referencia, en donde el mutante tiene una o más variaciones genéticas (por ejemplo, una mutación puntual, mutación contrasentido, mutación sin sentido, eliminación, duplicación, mutación por cambio de marco o expansión de repetición) en comparación con el microorganismo de referencia. Los procedimientos para fabricar mutantes son conocidos en la técnica microbiológica. Por ejemplo, la mutagénesis UV y la nitrosoguanidina se usan ampliamente para este fin.

En algunas formas de realización, los microorganismos beneficiosos se seleccionan en función de una resistencia natural o adquirida a ciertos antibióticos administrados a un animal de ganado para, por ejemplo, controlar los microbios patógenos y/o perjudiciales en el sistema digestivo o en alguna otra parte del cuerpo

del animal.

En algunas formas de realización, los microorganismos beneficiosos de la presente composición son capaces de sobrevivir el transporte a través del sistema digestivo del animal de ganado y son excretados en los desechos del animal (por ejemplo, estiércol). Por lo tanto, en ciertas formas de realización, administrar una composición de acuerdo con formas de realización de la presente invención al animal puede dar como resultado una reducción en la producción de GHG en los desechos del animal mediante la inhibición de los metanógenos y/o los simbioses de estos, la alteración de las biopelículas de metanógenos, la interferencia en las vías biológicas implicadas en la metanogénesis, y la compensación de la pérdida de aceptor de H_2 .

En una forma de realización específica, la composición comprende de alrededor de 1×10^6 a alrededor de 1×10^{13} , de alrededor de 1×10^7 a alrededor de 1×10^{12} , de alrededor de 1×10^8 a alrededor de 1×10^{11} o de alrededor de 1×10^9 a alrededor de 1×10^{10} CFU/g de cada especie de microorganismo presente en la composición.

En ciertas formas de realización, la cantidad de microorganismos en una aplicación de la composición asciende a de alrededor de 1 a 100 gramos por cabeza (animales individuales en un rebaño), o de alrededor de 5 a alrededor de 85 gramos por cabeza, o de alrededor de 10 a alrededor de 70 gramos por cabeza.

En una forma de realización, la composición comprende alrededor de 1 a 100 % de microorganismos totales en volumen, alrededor de 10 a 90 %, o alrededor de 20 a 75 %.

En ciertas formas de realización preferidas, la composición comprende una o más bacterias y/o subproductos de crecimiento de estas. Las bacterias pueden ser, por ejemplo, *Myxococcus* sp. (por ejemplo, *M. xanthus*) y/o una o más bacterias *Bacillus* spp. En ciertas formas de realización, las *Bacillus* spp. son *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* (por ejemplo, cepa "B4" NRRL B-68031) y/o *B. licheniformis*. Las bacterias se pueden usar en forma de espora, como células vegetativas y/o como una mezcla de estas.

En una forma de realización, la composición comprende *B. amyloliquefaciens*. En una forma de realización preferida, la cepa de *B. amyloliquefaciens* es *B. amyloliquefaciens* NRRL B-67928 ("*B. amy*").

Un cultivo del microbio *B. amyloliquefaciens* "*B. amy*" se ha depositado en el Agricultural Research Service Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Culture Collection, 1815 N. University St., Peoria, IL, EE.UU.. La institución de depósito le ha

asignado al depósito el número de acceso NRRL B-67928 y se depositó el 26 de febrero de 2020.

En una realización, el microorganismo es *B. subtilis* NRRL B-68031 "B4". Se ha depositado un cultivo del microbio B4 en la Colección de Cultivos del Laboratorio de Investigación Regional del Norte (NRRL) del Servicio de Investigación Agrícola, 1815 N. University St., Peoria, IL, EE. UU. El depositario ha asignado el número de acceso NRRL B-68031 al depósito y fue depositado el 6 de mayo de 2021.

Cada una de los cultivos objeto de la presente se ha depositado en condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente a quien el Comisionado de Marcas y Patentes de Estados Unidos determine que tiene derecho a este de conformidad con 37 CFR 1.14 y 35 U.S.C 122. El depósito está disponible cuando lo requieran las normativas de patentes extranjeras en países en donde se presentan las contrapartes de la presente solicitud o su progenie. Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una habilitación para poner en práctica la presente invención no obstante los derechos de patente otorgados por acción gubernamental.

Además, el depósito de cultivo de la presente se almacenará y estará disponible al público de acuerdo con lo establecido en el Tratado de Budapest sobre el Depósito de Microorganismos, es decir, se almacenará con todo el cuidado necesario para mantenerlo viable y sin contaminación durante un período de al menos cinco años después del pedido más reciente de suministrar una muestra del depósito, y, en cualquier caso, durante un período de al menos treinta (30) años después de la fecha de depósito o durante la protección de cualquier patente que se pueda emitir y que divulgue el cultivo. El depositante reconoce su obligación de reemplazar el depósito si la institución de depósito no puede suministrar una muestra cuando se solicite, debido a la condición del depósito. Todas las restricciones relacionadas con la disponibilidad al público del depósito de cultivo de la presente se eliminarán irrevocablemente al otorgar la patente que lo divulga.

En una forma de realización, los microorganismos beneficiosos son levaduras y/u hongos. Las especies de levaduras y hongos adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen *Acaulospora*, *Acremonium chrysogenum*, *Aspergillus*, *Aureobasidium* (por ejemplo, *A. pullulans*), *Blakeslea*, *Candida* (por ejemplo, *C. albicans*, *C. apicola*, *C. batistae*, *C. bombicola*, *C. floricola*, *C. kuoi*, *C. riidocensis*, *C. nodaensis*, *C. stellate*), *Cryptococcus*, *Debaryomyces* (por ejemplo, *D. hansenii*), *Entomophthora*, *Hanseniaspora* (por ejemplo, *H. uvarum*), *Hansenula*,

Issatchenkia, *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. phaffii*), *Lentinula* spp. (por ejemplo, *L. edodes*), *Meyerozyma* (por ejemplo, *M. guilliermondii*), *Monascus purpureus*, *Mortierella*, *Mucor* (por ejemplo, *M. piriformis*), *Penicillium*, *Phythium*, *Phycomyces*, *Pichia* (por ejemplo, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. occidentalis*, *P. kudriavzevii*), *Pleurotus* (por ejemplo, *P. ostreatus*, *P. sajorcaju*, *P. cystidiosus*, *P. cornucopiae*, *P. pulmonarius*, *P. tuberregium*, *P. citrinopileatus* y *P. flabellatus*), *Pseudozyma* (por ejemplo, *P. aphidis*), *Rhizopus*, *Rhodotorula* (por ejemplo, *R. bogoriensis*); *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, *S. torula*), *Starmerella* (por ejemplo, *S. bombicola*), *Torulopsis*, *Thraustochytrium*, *Trichoderma* (por ejemplo, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. viridae*), *Ustilago* (por ejemplo, *U. maydis*), *Wickerhamiella* (por ejemplo, *W. domericqiae*), *Wickerhamomyces* (por ejemplo, *W. anomalus*), *Williopsis* (por ejemplo, *W. mrakii*), *Zygosaccharomyces* (por ejemplo, *Z. bailii*), y otras.

En ciertas formas de realización específicas, la composición comprende uno o más hongos y/o uno o más subproductos de crecimiento de estos. Los hongos pueden ser, por ejemplo, hongos *Pleurotus* spp., por ejemplo, *P. ostreatus* (setas de ostra), hongos *Lentinula* spp., por ejemplo, *L. edodes* (seta shiitake), y/u hongos *Trichoderma* spp., por ejemplo, *T. viridae*. Los hongos pueden estar en forma de células vivas o inactivas, micelios, esporas y/o cuerpos fructíferos. Los cuerpos fructíferos, si están presentes, pueden estar, por ejemplo, cortados y/o mezclados en gránulos y/o una forma de polvo.

En ciertas formas de realización específicas, la composición comprende una o más levaduras y/o uno o más subproductos de crecimiento de estas. Las levaduras pueden ser, por ejemplo, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces* spp. (por ejemplo, *S. cerevisiae* y/o *S. boulardii*), *Debaryomyces hansenii*, *Starmerella bombicola*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia occidentalis*, *Monascus purpureus* y/o *Acremonium chrysogenum*. Las levaduras pueden estar en forma de células vivas o inactivas o esporas, así como en forma de células secas y/o durmientes (por ejemplo, un hidrolizado de levadura).

En una forma de realización de ejemplo, la composición comprende una cepa de *B. amyloliquefaciens*, por ejemplo, *B. amy*. En otra forma de realización de ejemplo, la composición comprende *P. ostreatus* y *S. boulardii*. En otra forma de realización de ejemplo, la composición comprende *D. hansenii*. En aun otra forma de realización de ejemplo, la composición comprende *B. amy*, *P. ostreatus*, *S. boulardii* o *D. hansenii*, y/o cualquier combinación de estos.

En una forma de realización, la composición a base de microbios comprende un subproducto de crecimiento microbiano. El subproducto de crecimiento microbiano puede producirse por los microorganismos de la composición, y/o estos pueden producirse por separado y agregarse a la composición.

En una forma de realización, el subproducto de crecimiento se ha purificado del medio de cultivo en el que se produjo. De manera alternativa, en una forma de realización, el subproducto de crecimiento se utiliza en forma cruda. La forma cruda puede comprender, por ejemplo, un sobrenadante líquido que se genera a partir del cultivo de un microbio que produce el subproducto de crecimiento de interés, que incluye células y/o nutrientes residuales.

Los subproductos de crecimiento pueden incluir metabolitos u otros productos bioquímicos como resultado del crecimiento celular, incluso, por ejemplo, aminoácidos, péptidos, policétidos, antibióticos, proteínas, enzimas, biotensioactivos, solventes, vitaminas y/u otros metabolitos.

Los microorganismos y/o los subproductos de crecimiento presentes en la composición pueden ser útiles para inhibir los metanógenos y/o la vía de metanogénesis, alterar las biopelículas de metanógenos y/o reducir la acumulación de H₂ en el sistema digestivo de un animal de ganado. Además, en formas de realización preferidas, la composición puede ser útil para mejorar la salud general de un animal de ganado.

Bacillus spp.

En ciertas formas de realización, la composición comprende *B. amy* y/o subproductos de crecimiento de esta. *B. amy* es particularmente ventajosa en comparación con los microorganismos probióticos tradicionales debido a su capacidad para producir esporas que siguen siendo viables en el tracto digestivo y, en algunas formas de realización, después de su excreción de los desechos del animal. Adicionalmente, *B. amy* produce una mezcla única de metabolitos que proporciona un amplio espectro de beneficios digestivos y ambientales cuando se administra a un animal de ganado y/o sus desechos.

En ciertas formas de realización, como se ejemplifica en la Tabla 1 a continuación, los subproductos de crecimiento pueden inhibir directamente los metanógenos, alterar las biopelículas de metanógenos y/o reducir la concentración de H₂ en el sistema digestivo de un animal de ganado.

Tabla 1. Subproductos de crecimiento de *B. amy* de ejemplo para reducir la metanogénesis y el H₂

Funciones	Subproductos de crecimiento	Ejemplos (producidos por <i>B. amy</i>)
Inhibición de metanógenos	Enzimas	Proteinasa K (y/o un homólogo de esta): puede lisar específicamente la pseudomureína, un componente estructural principal de la pared celular de algunas arqueas, incluso metanógenos. Ácido diglicólico deshidrogenasa (DGADH), (y/o un homólogo de esta): puede alterar los enlaces de éter entre la cadena principal de glicerol y los ácidos grasos de la capa de fosfolípidos de membranas de células de arqueas.
	Ácidos orgánicos	Ácido propiónico y/o ácido acético: pueden alterar la estructura de las membranas de células de arqueas.
Alteración de biopelículas de metanógenos	Biotensioactivos de lipopéptidos; Biotensioactivos de glicolípidos; Policétidos	Surfactina, fengicina, iturina, bacilomicina, liquenisina, difcidina y/o un glicolípidos a base de maltosa: pueden interferir en la producción y/o mantenimiento de la matriz de exopolisacárido que forma biopelículas, lo que interfiere con las capacidades de formación y/o adhesión de la biopelícula.
Reducción de H ₂	Ácidos orgánicos	Ácido propiónico: puede estimular los microorganismos acetogénicos, que producen ácido acético a partir de hidrógeno y dióxido de carbono. Esto da como resultado una menor disponibilidad de hidrógeno para que los microbios metanogénicos lleven a cabo la metanogénesis, y también ayuda a impedir que las concentraciones de H ₂ aumenten cuando disminuye la metanogénesis. Un mayor H ₂ puede conducir a una acumulación de trimetilamina en el sistema digestivo, que causa un olor "a pescado" en la leche producida.

En una forma de realización, como se ejemplifica en la Tabla 2 a continuación,

la composición comprende *B. amy*, y/o subproductos de crecimiento de este, que pueden mejorar la productividad y salud general de un animal de ganado al realizar una variedad de funciones beneficiosas para la salud. Por lo tanto, en algunas formas de realización, *B. amy* puede servir como un probiótico cuando se administra a un animal.

Tabla 2. Subproductos de crecimiento de *B. amy* de ejemplo para mejorar la salud del ganado

Funciones	Subproductos de crecimiento	Ejemplos (producidos por <i>B. amy</i>)
Regulación del microbioma intestinal	Biotensioactivos; Antibióticos naturales; Ácidos orgánicos	Biotensioactivos, incluso lipopéptidos y glicolípidos, así como antibióticos naturales (por ejemplo, policétidos, penicilinas, cefalosporinas, validamicinas, carbapenemos y nocardinas): pueden inhibir el crecimiento de microorganismos intestinales patógenos, o de otro modo perjudiciales (por ejemplo, <i>Anaeroplasma</i>, <i>Acholeplasma</i> y ciertos hongos), al, por ejemplo, interferir en la membrana celular y/o la estructura de biopelícula del microorganismo patógeno o perjudicial. Ácidos orgánicos, tales como ácido propiónico: pueden promover el crecimiento de microorganismos intestinales beneficiosos (por ejemplo, <i>Proteobacteria</i>, <i>Rhodospirillaceae</i>, <i>Campylobacteriales</i> y <i>Butyricimonas</i>) al, por ejemplo, alterar el pH del sistema digestivo para que sea un entorno más favorable para tal crecimiento. En ciertas formas de realización, la regulación del microbioma intestinal también conduce a una reducción de las emisiones de óxido nítrico debido a una reducción de las bacterias intestinales oxidantes de amoníaco.
Estimulación de las hormonas del crecimiento (por ejemplo, GH/IGH-1);	Ácidos orgánicos; Biotensioactivos; Enzimas digestivas	Ácidos orgánicos, tales como los ácidos grasos de cadena corta butirato y valerato: pueden mejorar la digestión mediante, por ejemplo, una

aumentar la tasa de aumento de peso; y aumentar la conversión de alimento en músculo mediante una mejor digestión		mejor función de las células intestinales y/o del rumen. Biotensioactivos de glicolípidos y lipopéptidos: pueden mejorar la digestión al, por ejemplo, mejorar la biodisponibilidad de los nutrientes y el agua a través de las células intestinales/del rumen y mejorar su absorción en el torrente sanguíneo. Enzimas digestivas, tales como amilasas, lipasas y proteasas (por ejemplo, proteasa similar a collagenasa, peptidasa E (dipeptidasa específica de Asp del terminal N), peptidasa s8 (serina peptidasa similar a subtilisina), serina peptidasa y endopeptidasa La): pueden mejorar la conversión de alimento en músculo al aumentar la digestión de las proteínas, grasas y carbohidratos en el alimento que de otro modo serían difíciles o imposibles de digerir para el animal. Adicionalmente, debido a que el nitrógeno es necesario para la conversión de alimento en masa muscular, una mayor absorción de nitrógeno en el sistema digestivo debido a una mejor conversión en músculo puede dar como resultado menos precursores de óxido nítrico, y, en consecuencia, menos emisiones de óxido nítrico.
Mejorar la cantidad y la calidad de la leche producida en mamíferos	Enzimas lignocelulíticas; Ácido fólico/folato	Enzimas lignocelulíticas, tales como celulosa, xilanasas, lacasa y manganeso catalasa: pueden mejorar la digestión de los polisacáridos, tales como celulosa, xilano, hemicelulosa y lignina, en los componentes necesarios la producción de leche. Folato: puede ayudar a aumentar la producción de leche al, por ejemplo, mejorar el metabolismo de la glándula mamaria. Adicionalmente, el folato es un nutriente importante

		para, por ejemplo, el crecimiento y el desarrollo neural. Por lo tanto, una mayor cantidad de folato en la leche producida puede mejorar la calidad nutricional de la leche para la alimentación de las crías, lo que acorta potencialmente el tiempo necesario para el destete y/o aumenta el crecimiento y la tasa de supervivencia de las crías.
Mejorar la salud inmunitaria, la expectativa de vida y la salud general	Vitaminas	Riboflavina, producida por riboflavina sintasa: puede proporcionar antinocicepción y efectos antiinflamatorios en un animal de ganado. Folato, producido mediante una proteína de síntesis de folato bifuncional: puede ayudar a regular la conversión de energía, la expresión génica y la producción de ADN, además de ser un agente antiinflamatorio. Ubiquinona (CoQ10), producida mediante O-metiltransferasa de biosíntesis de ubiquinona: puede, como antioxidante, impedir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, que puede producir aterosclerosis.

En algunas formas de realización, la composición puede comprender otras especies de *Bacillus*, tales como, por ejemplo, *B. licheniformis* y/o *B. subtilis*. En algunas formas de realización, *B. licheniformis* puede reducir la producción de metano a través de metanógenos, e inhibe las bacterias metanogénicas mediante la producción de ácido propiónico y otros metabolitos, tales como biotensioactivos lipopéptidos. Además, *B. licheniformis* puede contribuir a disminuir la concentración de amoníaco en los fluidos ruminales del ganado vacuno mientras contribuye a aumentar la producción de proteínas de la leche. En cerdos, *B. licheniformis* y *B. subtilis* pueden contribuir a aumentar los recuentos de *Lactobacillus* fecal, aumentar la digestibilidad del nitrógeno y disminuir la emisión de amoníaco y mercaptanos.

Pleurotus ostreatus

En ciertas formas de realización, como se ejemplifica en la Tabla 3 a

continuación, la composición comprende *P. ostreatus* y/o los subproductos de crecimiento de este, en donde los subproductos de crecimiento pueden inhibir directamente los metanógenos, alterar las biopelículas de metanógenos y/o reducir la concentración de H₂ en el sistema digestivo de un animal de ganado.

Tabla 3. Subproductos de crecimiento de *P. ostreatus* de ejemplo para reducir la metanogénesis

Funciones	Subproductos de crecimiento	Ejemplos (producidos por <i>P. ostreatus</i>)
Inhibición de metanógenos	Policétidos	Lovastatina, y/o un policétido homólogo a esta: pueden inhibir la HMG-CoA reductasa, la enzima implicada en la formación de los bloques de construcción de isoprenoides que son esenciales para la síntesis de la membranas de células de arqueas. De manera ventajosa, la lovastatina puede inhibir el crecimiento de metanógenos sin efectos adversos en otras bacterias celulolíticas en el sistema digestivo.
Alteración de biopelículas de metanógenos	Biotensioactivos de lipopéptidos	Biotensioactivos de lipopéptidos, tales como surfactinas, iturinas, fengicinas y liquenisininas: pueden interferir en la producción y/o el mantenimiento de la matriz de exopolisacáridos que forma biopelículas, lo que interfiere con las capacidades de formación y/o adhesión de la biopelícula.

En ciertas formas de realización, una composición que comprende *P. ostreatus* debe complementarse con un aceptor de H₂ para reducir la acumulación de H₂ que resulta de la metanogénesis disminuida. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se puede incluir *B. amy*, *Saccharomyces boulardii* y/o *Debaryomyces hansenii* para suministrar aceptores de H₂ al sistema digestivo.

En una forma de realización, como se ejemplifica en la Tabla 4 a continuación, la composición también comprende subproductos de crecimiento de *P. ostreatus*, que pueden mejorar la productividad y salud general de un animal de ganado al realizar una variedad de funciones beneficiosas para la salud. Por lo tanto, en algunas formas de realización, *P. ostreatus* puede servir como un probiótico cuando se administra a un animal.

Tabla 4. Subproductos de crecimiento de *P. ostreatus* de ejemplo para mejorar la salud del ganado

Funciones	Subproductos de crecimiento	Ejemplos (producidos por <i>P. ostreatus</i>)
Regulación del microbioma intestinal	Biotensioactivos; Antibióticos naturales; Ácidos grasos de cadena corta	Biotensioactivos de lipopéptidos, así como antibióticos naturales (por ejemplo, pleurotina, leucopleurotina y ácido dihidropleurotínico): pueden inhibir el crecimiento de microorganismos intestinales patógenos, o de otro modo perjudiciales, al, por ejemplo, interferir en la membrana celular y/o la estructura de biopelícula del microorganismo patógeno o perjudicial. Ácidos grasos de cadena corta, tales como ácido linoleico y ácido S-coriólico: pueden ser tóxicos para ciertas especies de nematodos, y pueden inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas. Otros metabolitos secundarios de <i>P. ostreatus</i> también pueden tener actividad inhibidora contra especies perjudiciales de levadura, tales como <i>C. albicans</i>, <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i>.
Mejorar la tasa de crecimiento y la eficacia de digestión, incluso reducir la diarrea	Biotensioactivos; Ácidos grasos de cadena corta; Enzimas lignocelulíticas; Nutrientes	Biotensioactivos, incluso lipopéptidos: pueden mejorar la digestión al, por ejemplo, mejorar la biodisponibilidad de los nutrientes y el agua a través de las células intestinales/del rumen y mejorar su absorción en el torrente sanguíneo. Ácidos grasos de cadena corta, tales como ácido linoleico y ácido S-coriólico: pueden aumentar la absorción de minerales en el sistema digestivo. Enzimas lignocelulíticas, tales como celulosa, xilanasa, lacasa y manganeso peroxidasa: pueden mejorar la digestión de los polisacáridos, tales como celulosa, xilano, hemicelulosa y lignina.

		<i>Pleurotus ostreatus</i> es una fuente de nutrientes que promueven el crecimiento, incluso selenio y proteína. <i>Pleurotus ostreatus</i> comprende 30-35 % de proteína en peso, y alrededor de 55 a 60 ug/g de selenio. El selenio es un oligomineral esencial para el ganado vacuno, está implicado en la función inmunitaria adecuada, actúa como antioxidante y ayuda a activar las hormonas tiroideas. La deficiencia de selenio causa daño muscular, aumenta la tasa de enfermedades, altera el crecimiento y disminuye la eficacia reproductiva.
Mejorar la cantidad y la calidad de la leche producida en mamíferos	Enzimas lignocelulíticas	Las enzimas lignocelulíticas, tales como celulosa, xilanas, lacasa y manganeso catalasa, pueden mejorar la digestión de los polisacáridos, tales como celulosa, xilano, hemicelulosa y lignina, en los componentes necesarios la producción de leche.

Saccharomyces boulardii

En ciertas formas de realización, como se ejemplifica en la Tabla 5 a continuación, la composición comprende *S. boulardii* y/o los subproductos de crecimiento de este, en donde los subproductos de crecimiento pueden inhibir directamente los metanógenos, alterar las biopelículas de metanógenos y/o reducir la concentración de H₂ en el sistema digestivo de un animal de ganado.

Tabla 5. Subproductos de crecimiento de *S. boulardii* de ejemplo para reducir la metanogénesis y el H₂

Funciones	Subproductos de crecimiento	Ejemplos (producidos por <i>S. boulardii</i>)
Inhibición de metanógenos	Enzimas	Proteinasa K (y/o un homólogo de esta): puede lisar específicamente la pseudomureína, un componente estructural principal de la pared celular de algunas arqueas, incluso metanógenos.
Reducción de H ₂	Enzimas digestivas; Vitaminas; Ácidos orgánicos	Enzimas digestivas, incluso sacarosa e isomaltasa: la sacarosa puede catalizar la hidrólisis de la sacarosa a fructosa y glucosa, mientras que la isomaltasa puede digerir el almidón y otros polisacáridos. La microflora ruminal

		libera hidrógeno de la sacarosa y el almidón malabsorbidos. Vitaminas B y ácidos orgánicos: pueden estimular los microorganismos acetogénicos, que producen ácido acético a partir de hidrógeno y dióxido de carbono. Esto da como resultado una menor disponibilidad de hidrógeno para que los microbios metanogénicos lleven a cabo la metanogénesis, y también ayuda a impedir que las concentraciones de H₂ aumenten cuando disminuye la metanogénesis.
--	--	--

En una forma de realización, como se ejemplifica en la Tabla 6 a continuación, la composición también comprende subproductos de crecimiento de *S. boulardii*, que pueden mejorar la productividad y salud general de un animal de ganado al realizar una variedad de funciones beneficiosas para la salud. Por lo tanto, en algunas formas de realización, *S. boulardii* puede servir como un probiótico cuando se administra a un animal.

Tabla 6. Subproductos de crecimiento de *S. boulardii* de ejemplo para mejorar la salud del ganado

Funciones	Subproductos de crecimiento	Ejemplos (producidos por <i>S. pleurotus</i>)
Regulación del microbioma intestinal	Terpenos y terpenoides; Antibióticos naturales; Ácidos grasos; Enzimas	Sesquiterpenoides y triterpenoides: pueden reducir los efectos negativos de los patógenos (por ejemplo, <i>E. coli</i>, <i>Vibrio cholera</i>, <i>Clostridium difficile</i> y <i>Salmonella</i> spp.), tales como la gastroenteritis. Antibióticos naturales (por ejemplo, policétidos, penicilinas, cefalosporinas, validamicinas, carbapenemos y nocardinas): pueden inhibir el crecimiento de microorganismos intestinales patógenos, o de otro modo perjudiciales, al, por ejemplo, interferir en la membrana celular y/o la estructura de biopelícula del microorganismo patógeno o perjudicial. Ácidos grasos, tales como piruvato,

		B-alanina, ácido lipoico, ácido decanoico y ácido cáprico: pueden inhibir la adhesión y/o la formación de biopelícula de <i>Candida albicans</i>. Enzimas, tales como una proteasa de 54 kDa: pueden degradar las toxinas clostridiales. Pantotenato (vitamina B5): puede reducir el crecimiento bacteriano al regular la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.
Mejorar la tasa de crecimiento y la eficacia de digestión	Vitaminas; Ácidos orgánicos; Aminoácidos	Vitaminas B y ácidos orgánicos: pueden estimular los microorganismos acetogénicos, que producen ácido acético, una fuente de carbono, a partir de hidrógeno y dióxido de carbono. Valina, un aminoácido: permite una transformación más completa de las fuentes de proteínas en el alimento. Adicionalmente, una mejor transformación del alimento reduce la cantidad de nitrógeno excretado en los desechos, en forma de, por ejemplo, amoníaco, lo que reduce los precursores de NO₂.
Mejorar la cantidad y la calidad de la leche producida en mamíferos	Folato/ácido fólico	Folato: puede ayudar a aumentar la producción de leche al, por ejemplo, mejorar el metabolismo de la glándula mamaria. Adicionalmente, el folato es un nutriente importante para, por ejemplo, el crecimiento y el desarrollo neural. Por lo tanto, una mayor cantidad de folato en la leche producida puede mejorar la calidad nutricional de la leche para la alimentación de las crías, lo que acorta potencialmente el tiempo necesario para el destete y/o aumenta el crecimiento y la tasa de supervivencia de las crías.
Mejorar la salud inmunitaria, la expectativa de vida y la salud general	Terpenos y terpenoides; Antibióticos naturales;	Sesquiterpenoides y triterpenoides: pueden reducir los efectos negativos de los patógenos (por ejemplo, <i>E. coli</i>, <i>Vibrio cholera</i>, <i>Clostridium</i>

	Ácidos grasos; Enzimas; Vitaminas	<i>difficile</i> y <i>Salmonella</i> spp.), tales como la gastroenteritis. Antibióticos naturales (por ejemplo, policétidos, penicilinas, cefalosporinas, validamicinas, carbapenemos y nocardinas): pueden inhibir el crecimiento de microorganismos intestinales patógenos, o de otro modo perjudiciales, al, por ejemplo, interferir en la membrana celular y/o la estructura de biopelícula del microorganismo patógeno o perjudicial. Ácidos grasos, tales como piruvato, B-alanina, ácido lipoico, ácido decanoico y ácido cáprico: pueden inhibir la adhesión y/o la formación de biopelícula de <i>Candida albicans</i>. Enzimas, tales como una proteasa de 54 kDa: pueden degradar las toxinas clostridiales. Pantotenato (vitamina B5), producido mediante pantotenato sintasa: puede reducir el crecimiento bacteriano al regular la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Riboflavina, producida por riboflavina sintasa: puede proporcionar antinocicepción y efectos antiinflamatorios en un animal de ganado. Folato, producido mediante la enzima multifuncional FOL1p: puede ayudar a regular la conversión de energía, la expresión génica y la producción de ADN, además de ser un agente antiinflamatorio. Ubiquinona (CoQ10), producida mediante la proteína de biosíntesis de ubiquinona CoQ9p: puede mejorar la salud respiratoria y, como antioxidante, impedir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, que puede producir aterosclerosis.
--	--	---

		Metabolitos secundarios: pueden reducir un estado proinflamatorio al disminuir los niveles de CD40-, CD80- y CD197 y reducir su secreción del factor de necrosis tumoral (TNF)- α y la interleucina (IL)-6.
--	--	--

Debaryomyces hansenii

En ciertas formas de realización, como se ejemplifica en la Tabla 7 a continuación, la composición comprende *D. hansenii* y/o los subproductos de crecimiento de este, en donde los subproductos de crecimiento pueden inhibir directamente los metanógenos, alterar las biopelículas de metanógenos y/o reducir la concentración de H₂ en el sistema digestivo de un animal de ganado.

Tabla 7. Subproductos de crecimiento de *D. hansenii* de ejemplo para reducir la metanogénesis y el H₂

Funciones	Subproductos de crecimiento	Ejemplos (producidos por <i>D. hansenii</i>)
Inhibición de metanógenos	Enzimas; Ácidos grasos; Ácidos orgánicos	Proteínasa K (y/o un homólogo de esta): puede lisar específicamente la pseudomureína, un componente estructural principal de la pared celular de algunas arqueas, incluso metanógenos. Ácidos grasos de cadena media, tales como ácido palmítico: pueden ser directamente tóxicos para los metanógenos. La producción de ácidos grasos se ve mejorada en condiciones extremas, tales como bajo pH y alta temperatura. Ácido propiónico: puede estimular los microorganismos acetogénicos, que producen ácido acético a partir de hidrógeno y dióxido de carbono. Esto da como resultado una menor disponibilidad de hidrógeno para que los microbios metanogénicos lleven a cabo la metanogénesis.

Alteración de la biopelícula de metanógeno	Biotensioactivos de glicolípidos	Biotensioactivos de glicolípidos, tales como soforolípidos: pueden interferir en la producción y/o el mantenimiento de la matriz de exopolisacáridos que forma biopelículas, lo que interfiere con las capacidades de formación y/o adhesión de la biopelícula.
Reducción de H ₂	Ácidos orgánicos	Ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido pirúvico, ácido cítrico y ácido fórmico: pueden inhibir la metanogénesis y reducir el H ₂ . Esto da como resultado una menor disponibilidad de hidrógeno para que los microbios metanogénicos lleven a cabo la metanogénesis, y también ayuda a impedir que las concentraciones de H ₂ aumenten cuando disminuye la metanogénesis.

En una forma de realización, como se ejemplifica en la Tabla 8 a continuación, la composición también comprende subproductos de crecimiento de *D. hansenii*, que pueden mejorar la productividad y salud general de un animal de ganado al realizar una variedad de funciones beneficiosas para la salud. Por lo tanto, en algunas formas de realización, *D. hansenii* puede servir como un probiótico cuando se administra a un animal.

Tabla 8. Subproductos de crecimiento de *D. hansenii* de ejemplo para mejorar la salud del ganado

Funciones	Subproductos de crecimiento	Ejemplos (producidos por <i>D. hansenii</i>)
Regulación del microbioma intestinal	Aldehídos; Antibióticos naturales	Aldehídos tales como 2-metilpropanal y 3-metilbutanal: puede tener actividad antibacteriana y antioxidante. Antibióticos naturales, tales como una micocina de 22 kDa: puede tener actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Candida neoformans</i>
Mejorar la tasa de crecimiento y la eficacia de digestión	Glicolípidos; Enzimas digestivas; Fosfatidilinositol;	Biotensioactivos de glicolípidos, tales como soforolípidos: pueden mejorar la digestión al, por ejemplo,

	Vitaminas	mejorar la biodisponibilidad de los nutrientes y el agua a través de las células intestinales/del rumen y mejorar su absorción en el torrente sanguíneo. Enzimas digestivas, tales como amilasas, lipasas y proteasas (por ejemplo, proteasa A, B, D): pueden mejorar la conversión de alimento en músculo al aumentar la digestión de las proteínas, grasas y carbohidratos en el alimento que de otro modo serían difíciles o imposibles de digerir para el animal. Fosfatidilinositol: puede aumentar la sensibilidad a la insulina. Ergosterol: puede servir como un precursor de la vitamina D, que tiene un rol crucial en los procesos inmunitario y de crecimiento, y mejora la reabsorción del calcio.
Mejorar la cantidad y la calidad de la leche producida en mamíferos	Folato/ácido fólico;	Folato: puede ayudar a aumentar la producción de leche al, por ejemplo, mejorar el metabolismo de la glándula mamaria. Adicionalmente, el folato es un nutriente importante para, por ejemplo, el crecimiento y el desarrollo neural. Por lo tanto, una mayor cantidad de folato en la leche producida puede mejorar la calidad nutricional de la leche para la alimentación de las crías, lo que acorta potencialmente el tiempo necesario para el destete y/o aumenta el crecimiento y la tasa de supervivencia de las crías.
Mejorar la salud inmunitaria, la expectativa de vida y la salud general	Vitaminas; Aminas; Fosfatidilinositol	Folato: puede ayudar a regular la conversión de energía, la expresión génica y la producción de ADN, además de ser un agente antiinflamatorio. Riboflavina: puede proporcionar antinocicepción y efectos antiinflamatorios en un animal de ganado.

		Ergosterol: puede servir como un precursor de la vitamina D, que tiene un rol crucial en los procesos inmunitario y de crecimiento, y mejora la reabsorción del calcio. Aminas, tales como espermidina y espermina: pueden sincronizar una variedad de agentes biológicos (tales como Ca^{2+}, Na^+, K^+-ATPasa), lo que mantiene el potencial de membrana y controla el pH y el volumen intracelulares. La espermidina regula los procesos biológicos, tales como el influjo de Ca^{2+} por parte del receptor de N-metil-D-aspartato (receptor de NMDA) glutamatérgico, que se ha asociado con óxido nítrico sintasa (NOS) y la activación de la vía cGMP/PKG y una disminución de la actividad de Na^+, K^+-ATPasa en los sinaptosomas de la corteza cerebral. La espermidina es un agente de longevidad en mamíferos debido a diversos mecanismos de acción. La autofagia es el mecanismo principal a nivel molecular, pero se ha descubierto evidencia de otros mecanismos, incluso reducción de la inflamación, metabolismo de lípidos y regulación del crecimiento, proliferación y muerte de las células Fosfatidilinositol: puede mejorar la fertilidad, reducir el estrés oxidativo, aumentar los niveles de HDL-colesterol y apolipoproteína A-1 en plasma, y reducir los niveles de triglicéridos. <i>D. hansenii</i> tiene la capacidad de sobrevivir el estrés GI, por ejemplo, debido a la tolerancia al calor activada por fosfatidilinositol. También puede adherirse a las células Caco-2 y mucina e inducir una alta relación de IL-10/IL-12, lo cual puede tener un efecto antiinflamatorio. <i>D. hansenii</i> también puede estimular los parámetros antioxidantes e
--	--	--

		inmunitarios innatos y la expresión de las vías de transducción de señal de genes relacionados con el sistema inmunitario
--	--	---

Otros microorganismos

En ciertas formas de realización, la composición puede comprender uno o más de otros microorganismos y/o subproductos de crecimiento de estos que son útiles para reducir la producción de metano y/o mejorar la salud del ganado.

En una forma de realización, la composición comprende *Lentinula edodes* vivas, que pueden inhibir la actividad de HMG-CoA reductasa sin la producción de lovastatina.

En una forma de realización, la composición comprende *Trichoderma viridae* y/o *Acremonium chrysogenum*, que también producen estatinas similares a la lovastatina con potencial para actuar como inhibidores de HMG-CoA reductasa.

En una forma de realización, la composición comprende arroz de levadura roja, o *koji*, el producto de arroz fermentado de *Monascus purpureus*. El arroz de levadura roja comprende monacolina K, que tiene una estructura similar a la lovastatina y tiene la capacidad de inhibir la actividad de HMG-CoA reductasa.

En una forma de realización, la composición comprende levaduras de *Wickerhamomyces anomalus*, que pueden potenciar la acetogénesis y la utilización de hidrógeno por parte de bacterias acetogénicas dentro del sistema digestivo de un rumiante, lo que reduce la metanogénesis y/o desplaza las bacterias metanogénicas. De manera ventajosa, esto da como resultado una menor disponibilidad de hidrógeno para el microorganismo metanogénico para llevar a cabo procesos en los que se produce el metano, sin afectar negativamente la salud digestiva del animal.

Además, *Wickerhamomyces anomalus* produce fitasa, una enzima útil para mejorar la digestión y la biodisponibilidad de fósforo del alimento, así como toxinas *killer* (por ejemplo, exo- β -1,3-glucanasa) útiles para controlar microorganismos patógenos.

Además, *Wickerhamomyces anomalus* produce valina, un aminoácido que contribuye al crecimiento y a la salud de los animales de ganado y permite una transformación más completa de las fuentes de proteínas en el alimento para reducir la cantidad de nitrógeno excretado en sus desechos en forma de, por ejemplo, amoníaco.

Componentes adicionales

En ciertas formas de realización, la composición comprende un potenciador de la germinación para potenciar la germinación de microorganismos en forma de esporas utilizados en la composición a base de microbios. En formas de realización específicas, los potenciadores de la germinación son aminoácidos, por ejemplo, L-alanina y/o L-leucina. En una forma de realización, el potenciador de la germinación es manganeso.

En una forma de realización, la composición comprende uno o más ácidos grasos. Los ácidos grasos pueden ser producidos por los microorganismos de la composición, y/o pueden ser producidos por separado e incluidos como un componente adicional. En ciertas formas de realización preferidas, el ácido graso es un ácido graso saturado de cadena larga que tiene una cadena principal de carbono de 14-20 carbonos, por ejemplo, ácido mirístico, ácido palmítico o ácido esteárico. En algunas formas de realización, una combinación de dos o más ácidos grasos saturados de cadena larga se incluye en la composición. En algunas formas de realización, un ácido graso saturado de cadena larga puede inhibir la metanogénesis y/o aumentar la permeabilidad de la membrana celular de metanógenos.

En algunas formas de realización, la composición puede comprender componentes adicionales que se conoce que reducen el metano en el sistema digestivo del animal de ganado, por ejemplo, algas (por ejemplo, *Asparagopsis taxiformis* y/o *Asparagopsis armata*); algas marinas; nitrooxipropanoles (por ejemplo, 3-nitrooxipropanol y/o etil-3-nitrooxipropanol); antraquinonas; ionóforos (por ejemplo, monensina y/o lasalocida); polifenoles (por ejemplo, saponinas, taninos); extracto de *Yucca schidigera* (especie de planta productora de saponina esteroideal); extracto de *Quillaja saponaria* (especie de planta productora de saponina triterpenoide); organoazufres (por ejemplo, extracto de ajo); flavonoides (por ejemplo, quercetina, rutina, kaempferol, naringina y antocianidinas; bioflavonoides de frutos cítricos verdes, escaramujo y grosellas negras); ácido carboxílico y/o terpenos (por ejemplo, d-limoneno, pineno y extractos cítricos).

En una forma de realización de ejemplo específica, la composición comprende un microorganismo, por ejemplo, *B. amy*, y 3-nitrooxipropanol (3NOP), un compuesto orgánico que tiene la fórmula $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{ONO}_2$. 3NOP es eficaz para inhibir una o más enzimas implicadas en la metanogénesis, por ejemplo, metil coenzima M reductasa (Mcr).

Mcr media la etapa final de todas las vías de metanogénesis, con CoM (ácido

2-mercaptoetansulfónico) como un cofactor esencial que actúa como el portador del grupo metilo. Mcr reduce metil-CoM a metano. 3NOP puede fijarse competitivamente al sitio activo de Mcr y luego oxidar el Ni^{1+} necesario para la actividad de Mcr. (Patra *et al.* 2017).

En algunas formas de realización, la inclusión de 3NOP en la presente composición puede dar como resultado la inactivación o inhibición de Mcr y, por lo tanto, menores emisiones de metano del ganado.

En una forma de realización, la composición de la presente puede comprender una o más sustancias y/o nutrientes adicionales para complementar las necesidades nutricionales del animal de ganado y promover la salud y/o el bienestar del animal de ganado, por ejemplo, fuentes de aminoácidos (incluidos los aminoácidos esenciales), péptidos, proteínas, vitaminas, microelementos, grasas, ácidos grasos, lípidos, carbohidratos, esteroides, enzimas y minerales, tales como calcio, magnesio, fósforo, potasio, sodio, cloro, azufre, cromo, cobalto, cobre, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, níquel, selenio y zinc. En algunas formas de realización, los microorganismos de la composición producen y/o proporcionan estas sustancias.

En una forma de realización, la composición puede comprender uno o más biotensioactivos. Los biotensioactivos son un grupo estructuralmente diverso de sustancias tensioactivas producidas por microorganismos, que son biodegradables y se pueden producir de manera eficaz mediante organismos seleccionados en sustratos renovables. Todos los biotensioactivos son anfifílicos. Estos consisten en dos partes: una porción (hidrófila) polar y un grupo (hidrófobo) no polar. La porción lipofílica común de una molécula biotensioactiva es la cadena de hidrocarburo de un ácido graso, mientras que la parte hidrófila se forma mediante grupos éster o alcohol de lípidos neutros, mediante un grupo carboxilato de ácidos grasos o aminoácidos (o péptidos), un ácido orgánico en el caso de flavolípidos o, en el caso de glicolípidos, mediante un carbohidrato.

Debido a su estructura anfifílica, los biotensioactivos aumentan el área superficial de sustancias hidrófobas insolubles en agua, aumentan la biodisponibilidad de agua de dichas sustancias y cambian las propiedades de superficies celulares bacterianas. Los biotensioactivos se acumulan en interfaces, lo que reduce la tensión interfacial y conduce a la formación de estructuras micelares agregadas en solución. Los biotensioactivos microbianos eficaces y seguros reducen las tensiones superficiales e interfaciales entre las moléculas de líquidos, sólidos y gases. La capacidad de los biotensioactivos de formar poros y desestabilizar membranas

biológicas permite el uso de estos como agentes antibacterianos, antifúngicos y hemolíticos.

Los biotensioactivos de acuerdo con la presente invención pueden incluir, por ejemplo, glicolípidos, lipopéptidos, flavolípidos, fosfolípidos, ésteres de ácidos grasos y polímeros de alto peso molecular, tales como lipoproteínas, complejos de lipopolisacárido-proteína, y complejos de polisacárido-proteína-ácido graso.

En una forma de realización, el biotensioactivo es un glicolípido. Los glicolípidos pueden incluir, por ejemplo, soforolípidos, ramnolípidos, lípidos de celobiosa, lípidos de manosileritritol y lípidos de trehalosa. En una forma de realización, el biotensioactivo es un lipopéptido. Los lipopéptidos pueden incluir, por ejemplo, surfactina, iturina, artrofactina, viscosina, fengicina y liquenisina. En ciertas formas de realización, se usa una mezcla de biotensioactivos.

En una forma de realización, el biotensioactivo se ha purificado del medio de fermentación en el que se produjo. De manera alternativa, en una forma de realización, el biotensioactivo se utiliza en forma cruda que comprende caldo de fermentación que resulta del cultivo de un microbio que produce biotensioactivo. Esta solución de biotensioactivo en forma cruda puede comprender de alrededor de 0,001 % a 99 %, de alrededor de 25 % a alrededor de 75 %, de alrededor de 30 % a alrededor de 70 %, de alrededor de 35 % a alrededor de 65 %, de alrededor de 40 % a alrededor de 60 %, de alrededor de 45 % a alrededor de 55 %, o alrededor de 50 % de biotensioactivo puro, junto con células y/o nutrientes residuales.

En una forma de realización, la composición comprende una saponina a razón de 1 a 10 ml/l, o de 2 a 6 ml/l de fluido ruminal. Las saponinas son tensioactivos naturales que se encuentran en muchas plantas y que exhiben características similares a los biotensioactivos microbianos, por ejemplo, autoasociación e interacción con membranas biológicas. Hay tres categorías básicas de saponinas, incluso saponinas triterpenoides, saponinas esteroidales y glicoalcaloides esteroidales.

Algunas familias conocidas de plantas que acumulan saponina triterpenoide incluyen *Leguminosae*, *Amaranthaceae*, *Apiaceae*, *Caryophyllaceae*, *Aquifoliaceae*, *Araliaceae*, *Cucurbitaceae*, *Berberidaceae*, *Chenopodiaceae*, *Myrsinaceae* y *Zygophyllaceae*, entre muchas otras. *Quillaja* y las legumbres como semillas de soja, porotos y arvejas son una fuente rica en saponinas triterpenoides. Las saponinas esteroidales se encuentran por lo general en miembros de las familias *Agavaceae*, *Alliaceae*, *Asparagaceae*, *Dioscoreaceae*, *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Bromeliaceae*, *Palmae* y *Scrophulariaceae* y se acumulan de manera abundante en plantas de cultivo

tales como batata, allium, espárrago, fenogreco, yucca y ginseng. Los glicoalcaloides esteroideos se encuentran normalmente en miembros de la familia *Solanaceae*, incluso tomate, papa, berenjena y morrón.

En ciertas formas de realización, un extracto de planta que contiene saponina puede reducir la producción de metano al alterar el pH del rumen y/o reducir los simbioses protozoo-metanógeno.

En una forma de realización, la composición puede comprender además agua. Por ejemplo, el microorganismo y/o los subproductos de crecimiento se pueden mezclar con agua y se administran al animal de ganado. En otra forma de realización, la composición se puede mezclar con agua potable para un animal de ganado como, por ejemplo, un aditivo y/o suplemento alimenticio. La composición de agua potable puede comprender, por ejemplo, 1 g/l a alrededor de 50 g/l de la composición a base de microbios, alrededor de 2 g/l a alrededor de 20 g/l, o alrededor de 5 g/l a alrededor de 10 g/l.

Ventajosamente, la composición puede mejorar la hidratación y reducir los casos y/o la gravedad del estrés por calor en animales de ganado.

La composición puede formularse para la administración entérica y/o parenteral al sistema digestivo del animal de ganado. Por ejemplo, la composición puede formularse para la administración oral mediante alimento, agua y/o endoscopia; y/o para la administración mediante inyección directa en una o más partes del sistema digestivo (por ejemplo, el rumen, el estómago y/o los intestinos), mediante endoscopia, mediante enema, mediante trasplante fecal y/o mediante supositorio.

En ciertas formas de realización, la composición puede comprender además uno o más portadores y/o excipientes adecuados para administrar la composición al sistema digestivo del animal de ganado, preferentemente al rumen, y puede formularse en preparaciones en, por ejemplo, formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, pélets prensados, polvos, gránulos, pomadas, geles, lociones, soluciones, supositorios, gotas, parches, inyecciones, inhaladores y aerosoles.

Los portadores y/o excipientes de acuerdo con la presente invención pueden incluir cualesquier solventes, diluyentes, amortiguadores (tales como, por ejemplo, solución salina amortiguada neutra, solución salina amortiguada con fosfato, u opcionalmente amortiguadoras de Tris-HCl, acetato o fosfato), emulsiones de aceite en agua o agua en aceite, composiciones acuosas con o sin inclusión de cosolventes orgánicos adecuados para, por ejemplo, uso IV, solubilizantes (tales como, por

ejemplo, Tween 80, polisorbato 80), coloides, medio de dispersión, vehículos, agentes de relleno, agentes quelantes (tales como, por ejemplo, EDTA o glutatión), aminoácidos (tales como, por ejemplo, glicina), proteínas, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, emulgentes, endulzantes, colorantes, saborizantes, aromatizantes, espesantes, recubrimientos, conservantes (tales como, por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico), antioxidantes (tales como, por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), agentes controladores de la tonicidad, agentes retardantes de la absorción, adyuvantes, agentes volumétricos (tales como, por ejemplo, lactosa, manitol) y similares. El uso de portadores y/o excipientes en el campo de fármacos y suplementos es conocido. Excepto por cualquier medio o agente convencional que sea incompatible con los componentes de las presentes composiciones, se puede contemplar su uso en las presentes composiciones.

En una forma de realización de ejemplo, la composición a base de microbios puede formularse para la administración directa al sistema digestivo o una parte de este mediante, por ejemplo, inyección y/o endoscopia, por ejemplo, como una solución o suspensión. La solución o suspensión puede comprender diluyentes o solventes aceptables desde el punto de vista entérico, no tóxicos y adecuados, tales como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer o solución isotónica de cloruro de sodio, o agentes dispersantes o humectantes y de suspensión adecuados, tales como aceites estériles, suaves, no volátiles, incluso monoglicéridos o diglicéricos sintéticos, y ácidos grasos, incluso ácido oleico. Preferentemente, se pueden emplear soluciones en agua o salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores, particularmente para soluciones inyectables por vía enteral.

En una forma de realización de ejemplo, la composición a base de microbios puede formularse para la administración oral como un alimento húmedo o seco preelaborado, en donde el alimento preelaborado se ha cocinado y/o procesado para estar listo para consumo animal. Por ejemplo, el microorganismo y/o los subproductos de crecimiento pueden estar vertidos y/o mezclados con el alimento preelaborado, o el microorganismo y/o los subproductos de crecimiento pueden servir como recubrimiento en el exterior de porciones de alimento seco para animales, por ejemplo, bocados, croquetas o pélets.

En una forma de realización, la composición puede comprender además ingredientes crudos para elaborar alimento para animales, en donde los ingredientes crudos, junto con el microorganismo y/o los subproductos de crecimiento, luego se cocinan y/o procesan para elaborar un producto alimenticio seco o húmedo mejorado.

Los ingredientes crudos pueden incluir, por ejemplo, granos, pastos, fibra, forraje, heno, paja, semillas, nueces, residuos de cultivos, vegetales, frutas, material vegetal seco, y otros condimentos, aditivos y/o fuentes de nutrientes. En una forma de realización, la composición se agrega a los ingredientes alimentarios crudos a una concentración de alrededor de 0,1 % a alrededor de 50 %, alrededor de 1 % a alrededor de 25 %, o alrededor de 5 % a alrededor de 15 % en peso.

La composición a base de microbios se puede agregar al alimento húmedo o seco y/o a los ingredientes alimenticios a una concentración de, por ejemplo, alrededor de 0,1 % a 99 %, alrededor de 1 % a alrededor de 75 %, o alrededor de 5 % a alrededor de 50 % en peso.

Como se usa en la presente, “alimento seco” se refiere a alimento que presenta un contenido de humedad limitado, típicamente en el rango de alrededor de 5 % a alrededor de 15 % o 20 % p/v. Por lo general, el alimento seco procesado está en forma de porciones individuales de tamaño pequeño a medio, por ejemplo, bocados, croquetas, golosinas, galletas, nueces, tortas o pélets.

Las porciones de alimento seco complementario pueden comprender concentraciones consistentes de la composición a base de microbios por porción. En otra forma de realización, la composición se puede utilizar como un recubrimiento de superficie en las porciones de alimentos secos. Se pueden usar métodos conocidos en la técnica para producir alimentos procesados secos, que incluyen molienda a presión, extrusión y/o peletización.

En una forma de realización de ejemplo, los alimentos secos se pueden preparar, por ejemplo, mediante extrusión de husillo, que incluye cocinar, conformar y cortar ingredientes crudos en una forma y un tamaño específicos en un período muy corto. Los ingredientes pueden mezclarse en una masa expansible homogénea y cocinarse en una extrusora, y forzarse a través de una matriz bajo presión y alto calor. Después de la cocción, los pélets se dejan enfriar, antes de pulverizarse opcionalmente con un recubrimiento. Este recubrimiento puede comprender, por ejemplo, grasa líquida o concentrado, que incluye formas hidrolizadas líquidas o en polvo de un tejido animal, tal como hígado o intestino de, por ejemplo, pollo o conejo, y/o un aceite nutricional. En otras formas de realización, el pélet se recubre mediante una técnica de encapsulado al vacío, en donde el pélet se somete al vacío y luego se expone a materiales de recubrimiento, después de lo cual la liberación del vacío conduce los materiales de recubrimiento dentro del pélet. El secado con aire caliente se puede emplear para reducir el contenido de humedad total a 10 % o menos.

En una forma de realización, el alimento seco se produce mediante un proceso de peletización "en frío" o un proceso que no usa alto calor ni vapor. El proceso puede usar, por ejemplo, aglutinantes líquidos con propiedades viscosas y cohesivas para mantener los ingredientes juntos sin riesgo de desnaturalizar o degradar componentes y/o nutrientes importantes en las composiciones de la presente invención.

En una forma de realización, la composición puede aplicarse al forraje animal o a la materia vegetal cortada y seca, tal como heno, paja, ensilaje, granos germinados, legumbres y/o granos.

En una forma de realización, la composición puede prepararse como un producto de biomasa secado por pulverización. La biomasa puede separarse a través de métodos conocidos, tales como centrifugación, filtración, separación, decantación, una combinación de separación y decantación, ultrafiltración o microfiltración.

En una forma de realización, la composición tiene un alto contenido nutricional, por ejemplo, que comprende hasta 50 % de proteínas, así como polisacáridos, vitaminas y minerales. Como resultado, la composición puede usarse como parte de toda una composición de alimento para animales completa. En una forma de realización, la composición de alimento comprende la presente composición que varía de 15 % del alimento a 99 % del alimento.

En una forma de realización, la presente composición puede comprender nutrientes adicionales para complementar la dieta de un animal y/o promover la salud y/o el bienestar del animal, tales como, por ejemplo, fuentes de aminoácidos (incluidos los aminoácidos esenciales), péptidos, proteínas, vitaminas, microelementos, grasas, ácidos grasos, lípidos, carbohidratos, esteroides, enzimas, prebióticos y minerales. En algunas formas de realización, los microorganismos de la composición producen y/o proporcionan estas sustancias.

Las composiciones preferidas comprenden vitaminas y/o minerales en cualquier combinación. Las vitaminas para su uso en una composición de esta invención pueden incluir, por ejemplo, vitaminas A, E, K3, D3, B1, B3, B6, B12, C, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, ácido nicotínico, cloruro de colina, inositol y ácido paraaminobenzoico. Los minerales pueden incluir, por ejemplo, calcio, magnesio, fósforo, potasio, sodio, cloro, azufre, cromo, cobalto, cobre, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, níquel, selenio y zinc. Otros componentes pueden incluir, entre otros, antioxidantes, beta-glucanos, sal biliar, colesterol, enzimas, carotenoides y muchos otros. Las vitaminas y los minerales típicos son aquellos, por ejemplo, recomendados para el consumo diario y en la cantidad diaria recomendada (RDA),

aunque las cantidades precisas pueden variar. La composición preferentemente incluiría un complejo de las vitaminas, minerales y oligominerales de RDA, así como aquellos nutrientes que no tienen una RDA establecida, pero que tienen una función beneficiosa en la fisiología de mamíferos saludables.

Producción de microorganismos y/o subproductos de crecimiento microbiano

La presente invención utiliza métodos para el cultivo de microorganismos y la producción de metabolitos microbianos y/u otros subproductos de crecimiento microbiano. La presente invención utiliza además procesos de cultivo que son adecuados para el cultivo de microorganismos y la producción de metabolitos microbianos en una escala deseada. Estos procesos de cultivo incluyen, entre otros, cultivo/fermentación sumergida, fermentación en estado sólido (SSF) y modificaciones, híbridos y/o combinaciones de estos.

Como se usa en la presente, "fermentación" se refiere al cultivo o crecimiento de células en condiciones controladas. El crecimiento puede ser aeróbico o anaeróbico. En formas de realización preferidas, los microorganismos se cultivan mediante SSF y/o versiones modificadas de esta.

En una forma de realización, la presente invención proporciona materiales y métodos para la producción de biomasa (por ejemplo, material celular viable), metabolitos extracelulares, nutrientes residuales y/o componentes intracelulares.

El recipiente de crecimiento de microbios utilizado de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier fermentador o reactor de cultivo para uso industrial. En una forma de realización, el recipiente puede tener controles/sensores funcionales o puede estar conectado a controles/sensores funcionales para medir factores importantes en el proceso de cultivo, tales como pH, oxígeno, presión, temperatura, humedad, densidad microbiana y/o concentración de metabolitos.

En una forma de realización adicional, el recipiente también puede ser capaz de monitorear el crecimiento de microorganismos dentro del recipiente (por ejemplo, medición de la cantidad de células y fases de crecimiento). Alternativamente, puede tomarse una muestra diaria del recipiente y someterse a enumeración mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como la técnica de colocación en placas de dilución.

En una forma de realización, el método incluye complementar el cultivo con una fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser, por ejemplo, nitrato de potasio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, amoníaco, urea y/o

cloruro de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar independientemente o en una combinación de dos o más.

El método puede proporcionar oxigenación al cultivo en crecimiento. Una forma de realización utiliza un movimiento lento de aire para eliminar el aire que contiene poco oxígeno e introducir aire oxigenado. En el caso de la fermentación sumergida, el aire oxigenado puede ser aire ambiente complementado diariamente a través de mecanismos que incluyen impulsores para la agitación mecánica de líquido y burbujeadores de aire para suministrar burbujas de gas al líquido para la disolución de oxígeno en el líquido.

El método puede comprender además complementar el cultivo con una fuente de carbono. La fuente de carbono normalmente es un carbohidrato, tal como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, trehalosa, manosa, manitol y/o maltosa; ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido málico, ácido malónico y/o ácido pirúvico; alcoholes, tales como etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol y/o glicerol; grasas y aceites, tales como aceite de soja, aceite de canola, aceite de salvado de arroz, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de sésamo y/o aceite de linaza; etc. Estas fuentes de carbono se pueden usar independientemente o en una combinación de dos o más.

En una forma de realización, se incluyen factores de crecimiento y oligonutrientes para microorganismos en el medio. Esto se prefiere particularmente cuando se cultivan microbios que son incapaces de producir todas las vitaminas que requieren. También se pueden incluir nutrientes inorgánicos en el medio, que incluyen oligoelementos, tales como hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y/o cobalto. Además, se pueden incluir fuentes de vitaminas, aminoácidos esenciales y microelementos, por ejemplo, en forma de harinas o comidas, como harina de maíz, o en forma de extractos, como extracto de levadura, extracto de papa, extracto de carne de res, extracto de soja, extracto de cáscara de banana y similares, o en formas purificadas. También se pueden incluir aminoácidos, tales como aquellos útiles para la biosíntesis de proteínas.

En una forma de realización, también se pueden incluir sales inorgánicas. Las sales inorgánicas utilizables pueden ser dihidrógeno fosfato de potasio, hidrógeno fosfato dipotásico, hidrógeno fosfato disódico, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de hierro, cloruro de hierro, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, sulfato de zinc, cloruro de plomo, sulfato de cobre, cloruro de calcio, cloruro de sodio, carbonato de calcio y/o carbonato de sodio. Estas sales inorgánicas

se pueden usar independientemente o en una combinación de dos o más.

En una forma de realización, también se pueden incluir uno o más bioestimulantes, es decir, sustancias que mejoran la velocidad de crecimiento de un microorganismo. Los bioestimulantes pueden ser específicos de una especie o pueden mejorar la velocidad de crecimiento de una variedad de especies.

En algunas formas de realización, el método para el cultivo puede comprender además agregar un agente antimicrobiano en el medio antes y/o durante el proceso de cultivo.

En ciertas formas de realización, se puede agregar un antibiótico a un cultivo a concentraciones bajas para producir microbios que son resistentes al antibiótico. Se seleccionan los microbios que sobreviven a la exposición al antibiótico y se los vuelve a cultivar de manera repetida en presencia de concentraciones crecientes del antibiótico para obtener un cultivo resistente al antibiótico. Esto se puede realizar en un entorno de laboratorio o a escala industrial mediante métodos conocidos en la técnica de microbiología. En ciertas formas de realización, la cantidad de antibiótico en el cultivo comienza a, por ejemplo, 0,0001 ppm y aumenta de alrededor de 0,001 a 0,1 ppm en cada repetición hasta que la concentración en el cultivo es igual a, o alrededor de igual a, la dosis que se aplicaría por lo general a un animal de ganado.

En ciertas formas de realización, los antibióticos son los usados a menudo en el alimento del ganado para promover el crecimiento y ayudar a tratar y prevenir enfermedades e infecciones en animales, tales como, por ejemplo, procaína, penicilina, tetraciclinas (por ejemplo, clortetraciclina, oxitetraciclina), tilosina, bacitracina, sulfato de neomicina, estreptomicina, eritromicina, monensina, roxarsona, salinomicina, tilosina, lincomicina, carbadox, laidlomocina, lasalocida, oleandomicina, virginiamicina y bambermicina. Al producir microbios beneficiosos que son resistentes a un antibiótico de ganado particular, los microbios pueden seleccionarse en función de qué antibiótico puede administrarse al animal para tratar o prevenir una afección. Alternativamente, se puede seleccionar un antibiótico para un animal de ganado en función de qué microbio beneficioso se está administrando al animal de acuerdo con los presentes métodos para no lastimar al microbio beneficioso.

El pH de la mezcla debe ser adecuado para el microorganismo de interés. Se pueden usar amortiguadores y reguladores de pH, tales como carbonatos y fosfatos, para estabilizar el pH cerca de un valor preferido. Cuando los iones metálicos están presentes en altas concentraciones, puede ser necesario el uso de un agente quelante en el medio.

Los microbios se pueden cultivar en forma planctónica o como biopelícula. En el caso de la biopelícula, el recipiente puede tener dentro un sustrato sobre el cual se pueden cultivar los microbios en un estado de biopelícula. El sistema también puede tener, por ejemplo, la capacidad de aplicar estímulos (tales como la tensión de cizallamiento) que incentiva y/o mejora las características de crecimiento de la biopelícula.

En una forma de realización, el método para el cultivo de microorganismos se lleva a cabo a alrededor de 5 a alrededor de 100 °C, preferentemente, 15 a 60 °C, con mayor preferencia, 25 a 50 °C. En una forma de realización adicional, el cultivo puede llevarse a cabo continuamente a una temperatura constante. En otra forma de realización, el cultivo puede estar sujeto a temperaturas cambiantes.

En una forma de realización, el equipo utilizado en el método y el proceso de cultivo es estéril. El equipo de cultivo, tal como el reactor/recipiente, puede estar separado de una unidad de esterilización, pero conectado a esta, por ejemplo, un autoclave. El equipo de cultivo también puede tener una unidad de esterilización que esteriliza *in situ* antes de comenzar la inoculación. El aire puede esterilizarse a través de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el aire ambiente puede pasar al menos a través de un filtro antes de ser introducido en el recipiente. En otras formas de realización, el medio puede pasteurizarse u, opcionalmente, no agregarse calor en absoluto, donde el uso de baja actividad de agua y bajo pH puede explotarse para controlar el crecimiento bacteriano indeseable.

En una forma de realización, la presente invención proporciona además un método para producir metabolitos microbianos, tales como, biotensioactivos, enzimas, proteínas, etanol, ácido láctico, beta-glucano, péptidos, intermediarios metabólicos, ácido graso poliinsaturado y lípidos, mediante el cultivo de una cepa de microbios de la presente invención en condiciones apropiadas para el crecimiento y la producción de metabolitos; y, opcionalmente, purificar el metabolito. El contenido de metabolitos producido a través del método puede ser, por ejemplo, al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

El contenido de biomasa del medio de fermentación puede ser, por ejemplo, de 5 g/l a 180 g/l o más, o de 10 g/l a 150 g/l. La concentración celular puede ser, por ejemplo, al menos 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} o 1×10^{13} células por gramo de producto final.

El subproducto de crecimiento microbiano producido por los microorganismos de interés puede retenerse en los microorganismos o segregarse en el medio de

crecimiento. El medio puede contener compuestos que estabilizan la actividad del subproducto de crecimiento microbiano.

El método y el equipo para el cultivo de microorganismos y la producción de subproductos microbianos se pueden realizar en un proceso por lotes, un proceso cuasi continuo o un proceso continuo.

En una forma de realización, toda la composición de cultivo microbiano se elimina al finalizar el cultivo (por ejemplo, al lograr, por ejemplo, una densidad celular deseada, o la densidad de un metabolito específico). En este procedimiento por lotes, se inicia un lote completamente nuevo tras recolectar el primer lote.

En otra forma de realización, solo se elimina una parte del producto de fermentación en cualquier momento. En esta forma de realización, la biomasa con células viables, esporas, conidios, hifas y/o micelios permanece en el recipiente como un inoculante para un nuevo lote de cultivo. La composición que se elimina puede ser un medio libre de células o contener células, esporas u otros propágulos reproductivos, y/o una combinación de estos. De esta manera, se crea un sistema cuasi continuo.

Ventajosamente, el método no requiere equipos complicados o un alto consumo de energía. Los microorganismos de interés pueden cultivarse a pequeña o gran escala en el sitio y utilizarse, incluso si están mezclados con sus medios.

Preparación de productos a base de microbios

Un "producto a base de microbios" es un producto que se aplicará en la práctica para lograr un resultado deseado. El producto a base de microbios puede ser simplemente una composición a base de microbios recolectada de un proceso de cultivo de microbios. Alternativamente, un producto a base de microbios puede comprender ingredientes adicionales que se han agregado. Estos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, estabilizadores, amortiguadores, portadores (por ejemplo, soluciones de agua o sal), nutrientes agregados para fomentar un mayor crecimiento microbiano, potenciadores del crecimiento no nutritivos y/o agentes que facilitan el seguimiento de los microbios y/o la composición en el entorno al que se aplica. El producto a base de microbios también puede comprender mezclas de composiciones a base de microbios. El producto a base de microbios también puede comprender uno o más componentes de una composición a base de microbios que han sido procesados de alguna manera, tales como, entre otros, filtración, centrifugación, lisis, secado, purificación y similares.

Un producto a base de microbios de la presente invención es simplemente el medio de fermentación que contiene un microorganismo y/o los metabolitos microbianos producidos por el microorganismo y/o cualquier nutriente residual. El producto de fermentación puede usarse directamente sin extracción ni purificación. Si se desea, la extracción y la purificación se pueden lograr fácilmente mediante el uso de métodos o técnicas estándar de extracción y/o purificación descritos en la literatura.

Los microorganismos en el producto a base de microbios pueden estar en forma activa o inactiva. Además, los microorganismos pueden eliminarse de la composición y utilizar el cultivo residual. Los productos a base de microbios pueden usarse sin estabilización, conservación y almacenamiento adicionales. Ventajosamente, el uso directo de estos productos a base de microbios conserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación por agentes extraños y microorganismos indeseables, y mantiene la actividad de los subproductos de crecimiento microbiano.

Los microbios y/o el medio (por ejemplo, caldo o sustrato sólido) resultantes del crecimiento microbiano pueden eliminarse del recipiente de crecimiento y transferirse a través de, por ejemplo, tuberías para su uso inmediato.

En una forma de realización, el producto a base de microbios es simplemente los subproductos de crecimiento del microorganismo. Por ejemplo, los biotensioactivos producidos por un microorganismo se pueden recolectar de un recipiente de fermentación sumergida en forma cruda, que comprende, por ejemplo, alrededor de 50 % de biotensioactivo puro en caldo líquido.

En otras formas de realización, el producto a base de microbios (microbios, medio o microbios y medio) se puede colocar en recipientes de tamaño apropiado, teniendo en cuenta, por ejemplo, el uso previsto, el método de aplicación contemplado, el tamaño del recipiente de fermentación y cualquier medio de transporte desde la instalación de crecimiento de microbios hasta la ubicación de uso. Por lo tanto, los recipientes en los que se coloca la composición a base de microbios pueden ser, por ejemplo, de 1 galón a 1.000 galones o más. En otras formas de realización, los recipientes son de 2 galones, 5 galones, 25 galones, o más grandes.

Tras la recolección de, por ejemplo, el producto de fermentación de levadura, de los recipientes de crecimiento, se pueden agregar componentes adicionales a medida que el producto recolectado se coloca en recipientes y/o se envía por tubería (o se transporta de otro modo para su uso). Los aditivos pueden ser, por ejemplo, amortiguadores, portadores, otras composiciones a base de microbios producidas en

la misma instalación o en una diferente, modificadores de la viscosidad, conservantes, nutrientes para el crecimiento de microbios, agentes de seguimiento, solventes, biocidas, otros microbios y otros ingredientes específicos para un uso previsto.

Otros aditivos adecuados, que pueden estar contenidos en las formulaciones de acuerdo con la invención, incluyen sustancias que se usan habitualmente para tales preparaciones. Los ejemplos de tales aditivos incluyen tensioactivos, agentes emulsionantes, lubricantes, agentes amortiguadores, agentes de control de solubilidad, agentes de ajuste del pH, conservantes, estabilizadores y agentes resistentes a la luz ultravioleta.

En una forma de realización, el producto puede comprender además agentes amortiguadores que incluyen ácidos orgánicos y aminoácidos o sus sales. Los amortiguadores adecuados incluyen citrato, gluconato, tartarato, malato, acetato, lactato, oxalato, aspartato, malonato, glucoheptonato, piruvato, galactarato, glucarato, tartronato, glutamato, glicina, lisina, glutamina, metionina, cisteína, arginina y una mezcla de estos. También se pueden usar ácidos fosfóricos y fosforosos o sus sales. Los amortiguadores sintéticos son adecuados para usarse, pero es preferible usar amortiguadores naturales tales como ácidos orgánicos y aminoácidos o sus sales enumerados anteriormente.

En una forma de realización adicional, los agentes de ajuste del pH incluyen hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato o bicarbonato de potasio, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico o una mezcla.

En una forma de realización, se pueden incluir en la formulación componentes adicionales tales como una preparación acuosa de una sal, tal como bicarbonato o carbonato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio o bifosfato de sodio.

Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, el producto a base de microbios puede comprender un caldo en el que se cultivaron los microbios. El producto puede ser, por ejemplo, al menos, en peso, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 % de caldo. La cantidad de biomasa en el producto, en peso, puede ser, por ejemplo, entre 0 % y 100 %, incluidos todos los porcentajes entre estos.

Opcionalmente, el producto puede almacenarse antes de su uso. El tiempo de almacenamiento es preferentemente corto. Por lo tanto, el tiempo de almacenamiento puede ser de menos 60 días, 45 días, 30 días, 20 días, 15 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 2 días, 1 día o 12 horas. En una forma de realización preferida, si hay células vivas presentes en el producto, el producto se almacena a una temperatura fría, tal como, por ejemplo, menos de 20 °C, 15 °C, 10 °C o 5 °C. Por otro lado, una

composición biotensioactiva puede almacenarse normalmente a temperatura ambiente.

Producción local de productos a base de microbios

En ciertas formas de realización de la presente invención, una instalación de crecimiento de microbios produce microorganismos nuevos de alta densidad y/o subproductos de crecimiento microbiano de interés en una escala deseada. La instalación de crecimiento de microbios puede estar ubicada en el sitio de aplicación o cerca de este. La instalación produce composiciones a base de microbios de alta densidad en cultivos por lotes, cuasi continuos o continuos.

Las instalaciones de crecimiento de microbios de la presente invención pueden ubicarse en el lugar donde se utilizará el producto a base de microbios (por ejemplo, un pastizal para ganado vacuno al aire libre). Por ejemplo, la instalación de crecimiento de microbios puede estar a menos de 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 o 1 milla de la ubicación de uso.

Debido a que el producto a base de microbios se puede generar localmente, sin recurrir a los procesos de estabilización, conservación, almacenamiento y transporte de microorganismos de la producción microbiana convencional, se puede generar una densidad de microorganismos mucho más alta, lo que requiere un volumen menor del producto a base de microbios para su uso en la aplicación en el sitio o que permite aplicaciones microbianas de densidad mucho más alta cuando sea necesario para lograr la eficacia deseada. Esto permite un biorreactor reducido (por ejemplo, un recipiente de fermentación más pequeño, suministros de material de inicio, nutrientes y agentes de control del pH más pequeños), lo que hace que el sistema sea eficaz y puede eliminar la necesidad de estabilizar las células o separarlas de su medio de cultivo. La generación local del producto a base de microbios también facilita la inclusión del medio de crecimiento en el producto. El medio puede contener agentes producidos durante la fermentación que son particularmente adecuados para su uso local.

Los cultivos de microbios robustos y de alta densidad producidos localmente son más eficaces en el campo que aquellos que han permanecido en la cadena de suministro por algún tiempo. Los productos a base de microbios de la presente invención son particularmente ventajosos en comparación con los productos tradicionales en donde las células se han separado de los metabolitos y nutrientes presentes en los medios de crecimiento de fermentación. Los tiempos de transporte

reducidos permiten la producción y entrega de lotes nuevos de microbios y/o sus metabolitos en el momento y el volumen requeridos por la demanda local.

Las instalaciones de crecimiento de microbios de la presente invención producen composiciones a base de microbios nuevas, que comprenden los microbios en sí mismos, los metabolitos microbianos y/u otros componentes del medio en el que se cultivan los microbios. Si se desea, las composiciones pueden tener una alta densidad de células vegetativas o propágulos, o una mezcla de células vegetativas y propágulos.

En una forma de realización, la instalación de crecimiento de microbios está ubicada en, o cerca de, un sitio donde se utilizarán los productos a base de microbios (por ejemplo, una instalación de producción ganadera), preferentemente dentro de las 300 millas, con mayor preferencia, dentro de las 200 millas, incluso con mayor preferencia, dentro de las 100 millas. Ventajosamente, esto permite que las composiciones se adapten para su uso en una ubicación especificada. La fórmula y la potencia de las composiciones a base de microbios se pueden personalizar para condiciones locales específicas en el momento de la aplicación, como, por ejemplo, qué especie animal se trata; qué estación, clima y/o época del año es cuando se aplica una composición; y qué modo y/o tasa de aplicación se utiliza.

Ventajosamente, las instalaciones de crecimiento de microbios distribuidas brindan una solución al problema actual de depender de productores industriales remotos cuya calidad de producto se ve afectada debido a retrasos en el procesamiento corriente arriba, cuellos de botella en la cadena de suministro, almacenamiento inadecuado y otras contingencias que inhiben la entrega y aplicación a tiempo de, por ejemplo, un producto viable de alto recuento celular y el medio y los metabolitos asociados en los que se cultivan originalmente las células.

Además, al producir una composición localmente, la formulación y la potencia se pueden ajustar en tiempo real a una ubicación específica y a las condiciones presentes en el momento de la aplicación. Esto proporciona ventajas sobre las composiciones que se elaboran previamente en una ubicación central y que tienen, por ejemplo, relaciones y formulaciones establecidas que pueden no ser óptimas para una ubicación dada.

Las instalaciones de crecimiento de microbios proporcionan versatilidad de elaboración por su capacidad de adaptar los productos a base de microbios para mejorar las sinergias con las geografías de destino. Ventajosamente, en formas de realización preferidas, los sistemas de la presente invención aprovechan el poder de

los microorganismos locales de origen natural y sus subproductos metabólicos para mejorar la gestión de los GHG.

El tiempo de cultivo para los recipientes individuales puede ser, por ejemplo, de 1 a 7 días o más. El producto de cultivo se puede recolectar de varias maneras diferentes.

La producción local y entrega dentro de, por ejemplo, las 24 horas de la fermentación da como resultado composiciones puras de alta densidad celular y costos de envío sustancialmente más bajos. Dadas las perspectivas de un rápido avance en el desarrollo de inoculantes microbianos más eficaces y potentes, los consumidores se beneficiarán enormemente de esta capacidad de entregar rápidamente productos a base de microbios.

Métodos para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero

En formas de realización preferidas, la presente invención proporciona un método para reducir las emisiones de gases atmosféricos perjudiciales al reducir el metano, dióxido de carbono y/u otros gases atmosféricos perjudiciales, y/o los precursores de estos (por ejemplo, nitrógeno y/o amoníaco, que son precursores de óxido nitroso), producidos en el sistema digestivo y/o los productos de desecho de los animales de ganado.

Como se usa en la presente, animales de "ganado" se refiere a animales domesticados, es decir, especies que han sido influenciadas, reproducidas, domesticadas y/o controladas a lo largo de una cantidad sostenida de generaciones por los seres humanos, de modo que existe una relación mutualística entre el animal y el ser humano. Particularmente, los animales de ganado incluyen animales criados en un entorno agrícola o industrial para producir artículos de consumo, tales como alimento, fibra y trabajo. Los tipos de animales incluidos en el término ganado pueden incluir, entre otros, alpacas, llamas, cerdos, caballos, mulas, burros, camellos, perros, rumiantes, gallinas, pavos, patos, gansos, gallinas de Guinea y pichones de paloma.

En ciertas formas de realización, los animales de ganado son "rumiantes" o mamíferos que tienen un estómago compartimentalizado adecuado para fermentar alimentos de origen vegetal antes de la digestión con la ayuda de un microbioma intestinal especializado. Los rumiantes incluyen, por ejemplo, bovinos, ovejas, cabras, cabras montesas, jirafas, ciervos, ciervos canadienses, alces, caribús, renos, antílopes, gacelas, impalas, ñus y algunos canguros.

En formas de realización de ejemplo específicas, los animales de ganado son

animales bovinos, que son animales rumiantes que pertenecen a la subfamilia *Bovinae*, de la familia *Bovidae*. Los animales bovinos pueden incluir especies domesticadas y/o salvajes. Los ejemplos específicos incluyen, entre otros, búfalo de agua, anoa, tamarao, uro, banteng, gaur, gayal, yak, kouprey, ganado doméstico para carne y lácteos (por ejemplo, *Bos taurus*, *Bos indicus*), buey, novillo, cebú, saola, bisonte, bisonte americano, bisonte europeo, bongo, kudú, kewwel, imbabala, nyala, sitatunga y eland.

En ciertas formas de realización específicas, los métodos comprenden poner en contacto una composición a base de microbios de acuerdo con la presente invención con el sistema digestivo de un animal de ganado. La composición puede administrarse por vía entérica y/o parenteral al, por ejemplo, sistema digestivo del animal de ganado. Por ejemplo, la composición puede administrarse al animal de ganado por vía oral, a través del alimento, pastizal y/o agua potable del animal de ganado; mediante endoscopía; mediante inyección directa en, por ejemplo, el rumen, estómago y/o intestinos; mediante un supositorio; mediante trasplante fecal; y/o mediante enema.

En ciertas formas de realización, la composición también puede aplicarse directamente al desecho para reducir las emisiones de GHG.

De manera ventajosa, en formas de realización preferidas, los métodos dan como resultado una reducción de bacterias metanogénicas y/o protozoos presentes en el sistema digestivo y/o los desechos del animal de ganado. En ciertas formas de realización, los métodos también pueden dar como resultado una reducción de metano, dióxido de carbono, otros gases atmosféricos perjudiciales y/o los precursores de estos, tales como nitrógeno y/o amoníaco (precursores de óxido nitroso), en el sistema digestivo y/o los desechos del animal de ganado.

Como se usa en la presente, "reducción" se refiere a una alteración negativa de al menos 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

En algunas formas de realización, la reducción deseada se logra dentro de un período de tiempo relativamente corto, por ejemplo, dentro de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas desde el momento en que los animales ingieren la composición. En algunas formas de realización, la reducción deseada se logra dentro de, por ejemplo, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses o 6 meses después de emplear los presentes métodos. En algunas formas de realización, la reducción deseada se logra dentro de 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o 5 años después de

emplear los presentes métodos.

En algunas formas de realización, los métodos pueden comprender además agregar materiales para mejorar el crecimiento de los microorganismos de la presente composición en el momento de la aplicación (por ejemplo, agregar nutrientes y/o prebióticos). En una forma de realización, las fuentes de nutrientes pueden incluir, por ejemplo, fuentes de magnesio, fosfato, nitrógeno, potasio, selenio, calcio, azufre, hierro, cobre, zinc, proteínas, vitaminas y/o carbono. En ciertas formas de realización, el animal de ganado puede alimentarse con una fuente de prebióticos, que puede incluir, por ejemplo, forraje seco para animales, paja, heno, alfalfa, granos, pasto, frutas, vegetales, avena y/o residuo de cultivo.

En algunas formas de realización, antes de aplicar la composición, el método comprende evaluar un animal de ganado, un rebaño de animales de ganado o un sitio de almacenamiento de desechos de ganado para determinar las condiciones locales, determinar una formulación preferida para la composición (por ejemplo, el tipo, la combinación y/o las relaciones de microorganismos y/o subproductos de crecimiento) que se personaliza para las condiciones locales, y producir la composición con dicha formulación preferida.

Las condiciones locales pueden incluir, por ejemplo, edad, salud, tamaño y especie de los animales; tamaño del rebaño; propósito para producir el animal (por ejemplo, carne, pelaje, huevos, trabajo, leche, etc.); especies dentro de la población microbiana de los intestinos y/o los desechos de un animal; condiciones ambientales, tales como la cantidad y el tipo de emisiones de GHG, el clima actual y/o la estación/época del año; modo y/o tasa de aplicación de la composición, y otras que se consideren relevantes.

Después de la evaluación, se puede determinar una formulación preferida para la composición de modo que la composición se pueda personalizar para estas condiciones locales. Luego, la composición se cultiva, preferentemente en una instalación de crecimiento de microbios que está dentro de las 300 millas, preferentemente dentro de las 200 millas, incluso con mayor preferencia, dentro de las 100 millas de la ubicación de la aplicación (por ejemplo, una instalación de producción de animales o ganado, o una laguna).

En algunas formas de realización, las condiciones locales se evalúan periódicamente, por ejemplo, una vez al año, semestralmente o incluso mensualmente. De esta manera, la fórmula de la composición se puede modificar en tiempo real según sea necesario para satisfacer las necesidades de las condiciones

locales cambiantes.

En una forma de realización de ejemplo, la dosis diaria de la composición administrada a cada animal es de alrededor de 10 mg a alrededor de 10 g, o de alrededor de 15 mg a alrededor de 5 gramos, por 100 kg de peso corporal del animal.

En ciertas formas de realización, los métodos comprender agregar la composición a agua potable y/o alimento como un suplemento dietético. El suplemento dietético puede tener cualquier forma adecuada, como salsa, agua potable, bebidas, yogur, polvo, gránulos, pasta, suspensión, masticable, bocado, solución líquida, golosinas, bocadillos, pélets, píldoras, cápsulas, comprimidos, sachets o cualquier otra forma de administración adecuada. El suplemento alimenticio puede comprender las presentes composiciones a base de microbios, así como compuestos opcionales, tales como vitaminas, minerales, probióticos, prebióticos y antioxidantes. En algunas formas de realización, el suplemento alimenticio puede mezclarse con una composición de alimento o con agua u otro diluyente antes de la administración al animal.

En algunas formas de realización, la composición se aplica a un campo o pastizal de pastoreo, así como al agua potable y/o al alimento.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, la administración de las composiciones a base de microbios se puede realizar como parte de un régimen alimenticio, que puede abarcar un período que va desde el parto hasta la vida adulta del animal. En ciertas formas de realización, el animal es un animal joven o en crecimiento. En algunas formas de realización, el animal es un animal adulto. En otras formas de realización, la administración comienza, por ejemplo, de forma regular o extendida, cuando el animal ha alcanzado más de alrededor de 30 %, 40 %, 50 %, 60 % u 80 % de su vida útil prevista o anticipada.

En algunas formas de realización, los métodos de la presente invención pueden ser utilizados por un productor ganadero o un procesador de desechos para reducir el uso de créditos de carbono. Por lo tanto, en ciertas formas de realización, los métodos de la presente pueden comprender además realizar mediciones para evaluar el efecto del método sobre la reducción de la generación de dióxido de carbono y/u otros gases atmosféricos perjudiciales, y/o los precursores de estos (por ejemplo, nitrógeno y/o amoníaco), y/o para evaluar el efecto del método sobre el control de metanógenos en el sistema digestivo y/o los desechos del animal de ganado, mediante el uso de técnicas estándar en la técnica.

Estas mediciones se pueden realizar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Storm *et al.* 2012, incorporado en la presente por

referencia), que incluyen, por ejemplo, captura y cuantificación de gases, cromatografía, cámaras de respiración (que miden la cantidad de metano exhalado por un animal individual), y técnica de producción de gas *in vitro* (donde el alimento se fermenta en condiciones de laboratorio y microbianas controladas para determinar la cantidad de metano y/u óxido nitroso emitido por gramo de materia seca). Las mediciones también pueden ser en forma de pruebas de la población microbiana en un animal, por ejemplo, tomar muestras de leche, heces y/o contenido del estómago y usar, por ejemplo, secuenciación de ADN y/o colocación de células en placas para determinar la cantidad de microbios metanogénicos presentes.

Las mediciones se pueden realizar en un punto temporal determinado después de la aplicación de la composición a base de microbios. En algunas formas de realización, las mediciones se realizan después de alrededor de 1 semana o menos, 2 semanas o menos, 3 semanas o menos, 4 semanas o menos, 30 días o menos, 60 días o menos, 90 días o menos, 120 días o menos, 180 días o menos, y/o 1 año o menos.

Además, las mediciones pueden repetirse con el tiempo. En algunas formas de realización, las mediciones se repiten diariamente, semanalmente, mensualmente, bimensualmente, semimensualmente, semestralmente y/o anualmente.

Tratamiento de desecho de ganado

En ciertas formas de realización específicas, una composición de acuerdo con formas de realización de la presente invención se administra directamente a una laguna de estiércol, pozo de desechos, pozo de relaves, tanque u otra instalación de almacenamiento donde se almacenan y/o tratan los desechos del ganado y/o del procesamiento de alimentos.

Ventajosamente, en algunas formas de realización, los microorganismos en la composición, por ejemplo, *B. amy*, pueden facilitar una mayor descomposición del estiércol mientras reducen la cantidad de GHG emitida por este, por ejemplo, metano, dióxido de carbono y/u óxido nitroso. Además, en algunas formas de realización, aplicar la composición al estiércol mejora el valor del estiércol como un fertilizante orgánico debido a la capacidad de los microorganismos para inocular el suelo de un campo o cultivo al que se aplica finalmente el estiércol. Los microorganismos y sus subproductos de crecimiento pueden mejorar la biodiversidad del suelo, mejorar las propiedades de rizosfera y mejorar el crecimiento y la salud de las plantas, lo que puede conducir a, por ejemplo, una menor necesidad de fertilizantes sintéticos ricos en

nitrógeno.

En algunas formas de realización, la laguna o pozo de desechos comprende otros subproductos de desecho de animales y/o procesamiento de alimentos, por ejemplo, desechos del procesamiento de aceite de palma (por ejemplo, efluente de la molienda para obtener aceite de palma), desechos del procesamiento de aceite de oliva (por ejemplo, torta del prensado de la oliva y agua residual de la molienda de la oliva), desechos del procesamiento de lácteos (por ejemplo, suero de leche ácido) y desechos de matadero (por ejemplo, restos de cadáveres de ganado). Estos productos de desecho altos en grasa producen contaminación y malos olores, y pueden formar capas semisólidas de grasa sobre el agua residual, lo que incentiva el crecimiento de microorganismos productores de GHG.

En ciertas formas de realización, los microorganismos de las presentes composiciones pueden ayudar a metabolizar la capa de grasa y aumentar la tasa de descomposición, además de proporcionar los beneficios de reducción de GHG descritos anteriormente.

En ciertas formas de realización, el método comprende complementar la composición con un biotensioactivo, por ejemplo, un ramnolípido y/o un soforolípido, que puede mejorar la degradación de las grasas y mejorar el control de los microorganismos que producen GHG.

EJEMPLOS

Se puede tener una mejor comprensión de la presente invención y de sus múltiples ventajas a partir de los siguientes ejemplos, proporcionados a modo de ilustración. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de algunos de los métodos, aplicaciones, formas de realización y variantes de la presente invención. Estos no deben considerarse como limitativos de la invención. Se pueden hacer numerosos cambios y modificaciones con respecto a la invención.

EJEMPLO 1 – PRUEBAS *IN VITRO*

Las composiciones de acuerdo con las formas de realización de la presente invención se cribaron por su capacidad para reducir las emisiones entéricas de metano y dióxido de carbono en el ganado vacuno. Veinticuatro recipientes se llenaron con fluido de rumen de ganado vacuno, saliva artificial, 1 g de sólidos de rumen, 1 g de ración súper básica y 1 % en volumen de una composición de tratamiento. Se realizaron triplicados de ocho tratamientos, incluido un control por triplicado.

Los tratamientos incluían:

0 – Control

1 – *B. amy*

2 – *P. ostreatus*

3 – *S. boulardii*

4 – *B. amy* + *P. ostreatus*

5 – *B. amy* + *S. boulardii*

6 – *P. ostreatus* + *S. boulardii*

7 – *B. amy* + *P. ostreatus* + *S. boulardii*

Después de 24 horas, se midió la cantidad de metano, dióxido de carbono y los volúmenes totales de gas (ml/gDM) recolectados de cada recipiente.

La **Figura 2** muestra los resultados para el metano. El Tratamiento 1, que comprendía *B. amy*, mostró una reducción de 78 % ($p = 0,05$) en la cantidad promedio de gas metano en comparación con el control. El Tratamiento 6, que comprendía *S. boulardii* y *P. ostreatus*, mostró una reducción de 69 % ($p = 0,03$) en la cantidad promedio de gas metano en comparación con el control.

La **Figura 3** muestra los resultados para la reducción de dióxido de carbono. El Tratamiento 1, que comprendía *B. amy*, mostró la mayor reducción de la cantidad promedio de gas dióxido de carbono en comparación con el control, y el Tratamiento 6, que comprendía *S. boulardii* y *P. ostreatus*, mostró la segunda mayor reducción.

EJEMPLO 2 – PRUEBAS *IN VITRO* ADICIONALES

El Tratamiento N.º 1 del Ejemplo 1 anterior que comprendía *B. amy* se evaluó a tasas variables de inclusión para determinar su capacidad para reducir las emisiones de metano y dióxido de carbono entéricos en el ganado. Se realizaron ocho réplicas de cada una de cinco diferentes tasas de inclusión en recipientes individuales (40 recipientes en total). Los recipientes comprendían fluido de rumen, saliva artificial, 1 g de sólidos de rumen, 1 g de ración súper básica y una tasa variable de inclusión del Tratamiento N.º 1. Las tasas variables de inclusión fueron: 0 % (control), 0,1 %, 0,2 %, 0,5 % y 1 %.

Veinticuatro horas después del inicio de la fermentación de rumen *in vitro*, se midió la cantidad de metano, dióxido de carbono y los volúmenes totales de gas (ml/gDM) recolectados de cada recipiente.

La **Figura 4** muestra los resultados para el metano. El tratamiento que

comprende una tasa de inclusión de 0,2 % de *B. amy* mostró la mayor reducción de las emisiones de CH₄. (* indica una reducción significativa, $p = 0,0174$).

La **Figura 5** muestra los resultados para el dióxido de carbono. El tratamiento que comprende una tasa de inclusión de 0,2 % de *B. amy* mostró la mayor reducción de las emisiones de CO₂. (* indica una reducción significativa, $p = 0,0491$).

EJEMPLO 3 – PRODUCTO DE *B. AMY*

Un producto a base de microbios de la presente invención comprende *B. amy*. Se cultiva inóculo de *B. amy* en un reactor a pequeña escala durante de 24 a 48 horas. Se cultiva inóculo de *Myxococcus xanthus* en un matraz de cultivo de semillas con un volumen de trabajo de 2 l durante de 48 a 120 horas. Se inocula un reactor de fermentación con los dos inóculos. Se introduce de manera continua medio de nutrientes en el reactor de fermentación desde un tanque de alimentación. El medio de nutrientes comprende:

Glucosa	1 g/l a 5 g/l
Peptona de caseína	1 g/l a 10 g/l
K ₂ HPO ₄	0,01 g/l a 1,0 g/l
KH ₂ PO ₄	0,01 g/l a 1,0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g/l a 1,0 g/l
NaCl	0,01 g/l a 1,0 g/l
CaCO ₃	0,5 g/l a 5 g/l
Ca(NO ₃) ₂	0,01 g/l a 1,0 g/l
Extracto de levadura	0,01 g/l a 5 g/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,001 g/l a 0,5 g/l
Oligoelemento Teknova	0,5 ml/l a 5 ml/l

Se suspende portador de anclaje de partículas de granos finos en el medio de nutrientes. El portador comprende celulosa (1,0 a 5,0 g/l) y/o harina de maíz (1,0 a 8,0 g/l).

El pH en el reactor se mantiene a alrededor de 6,8; la temperatura se mantiene a alrededor de 24 °C; el DO se mantiene a alrededor de 50 %; y el caudal de aire se mantiene a alrededor de 1 vvm.

Se produce una capa de espuma que comprende subproductos de crecimiento microbiano durante la fermentación, se la extrae mediante purga y se la recolecta en un recipiente que comprende un medidor de pH. Se usa el medidor de pH para monitorear el pH de la espuma: si el pH varía fuera del rango de 2,0 a 3,0, se agregan reguladores del pH para llevar el pH de vuelta a ese rango para la preservación a largo plazo de los metabolitos allí contenidos. El proceso de producción, purga del reactor y recolección de la espuma continúa por 7 días o más (por ejemplo, indefinidamente).

Se realiza un muestreo del fermentador y el tanque de recolección de espuma para recuento de CFU, porcentaje de esporulación y/o pureza a las 0 h, y luego dos veces por día durante la fermentación. El muestreo también puede realizarse al momento de purgar y recolectar la espuma. Cuando/si se detecta un porcentaje de esporulación del cultivo bacteriano (mediante estimación con portaobjetos de microscopio) mayor de 20 %, se agrega un medio de nutrientes adicional al fermentador. Se lleva a cabo análisis de LC-MS en muestras acidificadas de lipopéptidos del tanque de recolección de espuma. Las muestras se almacenan a alrededor de 4 °C.

El ciclo de fermentación continúa durante al menos una semana, y se introduce medio de nutrientes y se recolecta espuma hasta, por ejemplo, que ya no pueda extraerse espuma del fermentador. Se observa producción de lipopéptidos tan pronto como 3 horas después de la inoculación, y el rendimiento total alcanza de 20 a 30 g/l por semana (o 250 kg secos de lipopéptidos por semana). El rendimiento de este método puede ser hasta 10 veces mayor que el de los métodos no antagónicos tradicionales de cultivo de *B. amyloliquefaciens*.

Concentración y secado del producto

Se recolecta la biomasa celular, que comprende esporas de *B. amy*, y se la seca hasta una humedad residual no mayor de 8 %. La espuma sin celdas y/o el sobrenadante restantes, que pueden reducir la tensión superficial hasta 29-30 mN/m a 200 ppm, se evaporan con evaporadores industriales para obtener un líquido de alta viscosidad que contiene biotensioactivos y otros metabolitos. Luego, el compuesto viscoso se seca para producir un polvo, que se muele y mezcla con las esporas secas a una relación de 1 g de esporas con respecto a 50 mg de sobrenadante.

El producto final contiene preferentemente no menos de 100 mil millones de esporas por gramo. El tratamiento ideal para el ganado es 1 g de la composición por cabeza de ganado por día, o, si se aplica a un pastizal, 1 g por 100 pies cuadrados de pastizal por semana.

EJEMPLO 4 – PRODUCTO DE *P. OSTREATUS* Y *S. BOULARDII*

Un producto a base de microbios de la presente invención comprende *P. ostreatus* y *S. boulardii*.

P. ostreatus puede producirse mediante el uso de recipientes de fermentación sumergida a gran escala que tienen un volumen de 500 l a 2800 l. El ciclo de fermentación es de alrededor de 10 días, con un rendimiento de producción de

biomasa promedio de alrededor de $1,7 \times 10^6$ células/g. Como un ejemplo, estos rendimientos producen un contenido de lovastatina de >13 % en peso.

S. boulardii puede producirse mediante el uso de recipientes de fermentación sumergida a gran escala que tienen un volumen de 500 l a 2800 l. El ciclo de fermentación es de alrededor de 16 horas, con un rendimiento de producción de biomasa promedio de alrededor de $2,3 \times 10^9$ células/g.

Los dos productos a base de microbios pueden mezclarse y secarse para producir una composición tal que 1 dosis diaria para una cabeza de ganado comprenda 150 mg de *P. ostreatus* y 10 g de *S. boulardii*.

EJEMPLO 5 – PRODUCTO DE *D. HANSENI*

Un producto a base de microbios de la presente invención comprende *D. hansenii*. Una dosis del producto comprende 5×10^{10} CFU por día por cabeza de ganado.

REFERENCIAS

- Gobierno de Australia Occidental. (2018). "Carbon farming: reducing methane emissions from cattle using feed additives". <https://www.agric.wa.gov.au/climate-change/carbon-farming-reducing-methane-emissions-cattle-using-feed-additives>. ("Carbon Farming 2018").
- Gerber, P.J., *et al.* (2013). "Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities". Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [*Food and Agriculture Organization of the United Nations*], Roma. Visto el 5 de abril de 2019. <http://www.fao.org/3/i3437e/i3437e.pdf>. ("Gerber *et al.* 2013").
- Holtshausen, L. *et al.* (2009). "Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows". *J. Dairy Sci.* 92:2809-2821.
- Ishler, V.A., (2016). "Carbon, Methane Emissions and the Dairy Cow". Penn State College of Agricultural Sciences. <https://extension.psu.edu/carbon-methane-emissions-and-the-dairy-cow>. ("Ishler 2016").
- Patra, A., Park, T., Kim, M. *et al.* (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *J Animal Sci Biotechnol* 8, 13. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9> ("Patra *et al.* 2017").
- Pidwirny, M. (2006). "The Carbon Cycle". *Fundamentals of Physical Geography, 2nd Edition*. Visto el 1 de octubre de 2018. <http://www.physicalgeography.net/fundamentals/9r.html>. ("Pidwirny 2006").
- Storm, Ida M.L.D., A.L.F. Hellwing, N.I. Nielsen y J. Madsen. (2012). "Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants". *Animals (Basel)*. Jun. 2(2): 160-183. doi: 10.3390/ani2020160.
- Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. (2016). "Climate Change Indicators in the United States." https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-08/documents/climate_indicators_2016.pdf. ("Informe EPA 2016").

Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. (2016). "Overview of Greenhouse Gases". *Greenhouse Gas Emissions*. <https://www.epa.gov/ghgemissions/overview-greenhouse-gases>. ("Greenhouse Gas Emissions 2016").