



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0030026

(51)⁷ A23K 1/16; A23K 1/18

(13) B

(21) 1-2012-00349

(22) 16/07/2010

(86) PCT/EP2010/060325 16/07/2010

(87) WO/2011/006993 20/01/2011

(30) 09165789.0 17/07/2009 EP

(45) 25/11/2021 404

(43) 27/05/2013 302A

(73) DSM IP ASSETS B.V. (NL)

Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, The Netherlands

(72) FREHNER, Marco (CH); VERLHAC-TRICHET, Viviane (FR); NARBEL, Philippe (CH).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) CHẾ PHẨM THỨC ĂN CHĂN NUÔI DÙNG CHO CÁ, CHẾ PHẨM TRỘN SẴN DÙNG CHO CÁ VÀ CHẤT PHỤ GIA BỔ SUNG VÀO THỨC ĂN CHĂN NUÔI DÙNG CHO CÁ CHỨA ALPHA-PINEN VÀ XINNAMALDEHYT

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm thức ăn cho động vật thủy sản chứa ít nhất hai hoạt chất tự nhiên được chọn từ nhóm bao gồm alpha-pinen, alpha-terpineol, xinnamal-dehyt, dihydroeugenol, eugenol, meta-cresol và terpinolen. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp cải thiện tỷ lệ chuyển hóa thức ăn chăn nuôi ở động vật thủy sản và phương pháp làm giảm tỷ lệ chết ở động vật thủy sản. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp cải thiện mức tăng trọng hàng ngày ở động vật thủy sản, phương pháp điều chỉnh hệ vi khuẩn đường ruột ở động vật thủy sản và phương pháp bảo vệ động vật thủy sản chống lại sự lây nhiễm do vi sinh vật gây bệnh gây ra.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng các hoạt chất tự nhiên được chọn từ nhóm bao gồm alpha-pinen, alpha-terpineol, xinnamaldehyt, dihydroeugenol, eugenol, meta-cresol và terpinolen để sản xuất thức ăn cho động vật thủy sản bao gồm cá và tôm, đặc biệt là cho cá nước lạnh, ví dụ như cá hồi, cá trap, cá vược và cá nước ấm như ví dụ cá chép, cá rô phi, cá trê. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến việc sử dụng ít nhất hai chất nêu trên để cải thiện tỷ lệ chuyển hóa thức ăn chăn nuôi và/hoặc mức tăng trọng hằng ngày ở cá, để làm giảm tỷ lệ chết bằng cách điều chỉnh hệ vi sinh vật đường ruột và/hoặc bằng cách bảo vệ động vật này chống lại sự lây nhiễm do vi sinh vật gây bệnh gây ra. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm thức ăn chăn nuôi mới cho cá chứa ít nhất hai hoạt chất, tốt hơn là ít nhất ba hoặc bốn hoạt chất được chọn từ nhóm bao gồm alpha-pinen, alpha-terpineol, xinnamaldehyt, dihydroeugenol, eugenol, meta-cresol và terpinolen.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thuật ngữ thức ăn chăn nuôi hoặc chế phẩm thức ăn chăn nuôi có nghĩa là hợp chất bất kỳ, chế phẩm, hỗn hợp, hoặc chế phẩm thích hợp để động vật dễ hấp thu.

Một yếu tố quan trọng trong nuôi trồng thủy sản là tốc độ quay vòng. Tốc độ quay vòng được quyết định bởi việc làm thế nào để cá sinh trưởng nhanh đến thời điểm có thể thu hoạch. Như ví dụ, điều này mất từ 12 đến 18 tháng để nuôi cá hồi đại tây dương từ cá hồi non (giai đoạn sinh lý khi cá hồi đại tây dương có thể được chuyển lần đầu từ nước ngọt sang nước mặn) đến thời điểm có thể thu hoạch được. Tốc độ quay vòng nhanh cho một vài kết quả tích cực. Đầu tiên, nó hỗ trợ cho dòng tiền mặt. Thứ hai, nó cải thiện việc quản lý rủi ro. Cụ thể, tỷ lệ chết cao là một rủi ro lớn đối với những người nuôi cá.

Thường biết rằng tỷ lệ chết tăng là do sự mất cân bằng của hệ vi khuẩn đường ruột và/hoặc nhiễm các vi sinh vật gây bệnh. Bệnh ở cá là hiện tượng phổ biến và khả năng bùng phát sẽ cao hơn nếu giai đoạn phát triển kéo dài. Một rủi ro nữa là cá sẽ thoát ra ngoài do các sự kiện ngẫu nhiên, ví dụ do lưới vận chuyển, hoặc do thời tiết xấu làm các đăng cá bị hỏng.

Đối với các vật nuôi khác, việc sử dụng kháng sinh và vacxin để phòng ngừa sự phát triển bệnh đã được biết đến. Trong nuôi trồng thủy sản, kháng sinh không được sử dụng nhiều – ít nhất là trong nuôi trồng thủy sản nước lạnh – do thực tế là bệnh lây lan rất nhanh, cá bị bệnh không ăn nhiều và cũng do tác động tiêu cực đến môi trường của thức ăn chăn nuôi có lẫn thuốc được đào thải ra. Vacxin được sử dụng rộng rãi nếu có nhưng chúng không được phát triển cho tất cả các loại bệnh.

Để thay thế cho được chất tổng hợp, việc sử dụng các chất chiết thực vật và tinh dầu trong thức ăn cho động vật đã được mô tả trong các tài liệu chuyên ngành. Ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO2004/091307 mô tả việc sử dụng polyphenol, và các hoạt chất tự nhiên khác trong thức ăn chăn nuôi để làm tăng tỷ lệ sống của *Artemia* sau khi nở. Tuy nhiên, WO2004/091307 không đề cập đến việc chọn ra các hợp chất được sử dụng. Hơn thế nữa, việc sử dụng polyphenol để làm giảm tỷ lệ chết như được mô tả trong tài liệu trên chỉ hữu ích ở thời điểm nở.

Do đó, hiện nay trong ngành nuôi trồng thủy sản đang tồn tại một nhu cầu ngăn ngừa sự phát triển bệnh, nhờ đó làm giảm tỷ lệ chết bằng biện pháp phòng bệnh bất kỳ bao gồm biện pháp kháng vi sinh vật ở phạm vi đường ruột.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng các chất nêu trên có tiềm năng lớn được sử dụng trong thức ăn cho cá, ví dụ để cải thiện tỷ lệ chuyển hóa thức ăn chăn nuôi (Feed Conversion Ratio - FCR) và/hoặc mức tăng trọng và/hoặc để điều chỉnh hệ vi khuẩn đường ruột. Hơn thế nữa, các tác giả sáng chế ngạc nhiên phát hiện ra rằng các chất được nêu ở đây cũng được đề cập là các hợp chất, có hoạt tính kháng vi sinh vật dẫn đến làm giảm tỷ lệ chết. Việc lựa chọn cụ thể các hoạt chất theo sáng chế lần đầu tiên cho phép kiểm soát số lượng bệnh trên cá do một số tác nhân gây bệnh khác nhau gây ra.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, theo một phương án cụ thể thứ nhất, sáng chế mô tả phương pháp sử dụng ít nhất hai hoạt chất được chọn từ nhóm bao gồm alpha-pinen, alpha-terpineol, xinnamaldehyt, dihydroeugenol, eugenol, meta-cresol và terpinolen trong thức ăn cho cá để cải thiện tỷ lệ chuyển hóa thức ăn chăn nuôi (FCR) và/hoặc mức tăng trọng và/hoặc làm giảm tỷ lệ chết bằng cách điều chỉnh hệ sinh vật đường ruột và/hoặc ngăn ngừa bệnh do các vi sinh vật gây bệnh gây ra. Ví dụ, các hợp chất đã chọn theo sáng chế, ví dụ xinnamaldehyt, dihydroeugenol, eugenol, và meta-cresol đã được chỉ ra là cho tác dụng tốt

trong việc ức chế sự phát triển của *Yersinia ruckeri*, một vi sinh vật gây bệnh đỏ miệng ruột (Enteric Redmouth - ERM), một bệnh đặc biệt được tìm thấy ở cá hồi và gây tỷ lệ chết cao.

Theo một phương án khác, alpha-pinen và/hoặc alpha-terpineol và/hoặc xinnamaldehyt và/hoặc dihydroeugenol và/hoặc eugenol và/hoặc meta-cresol và/hoặc terpinolen được sử dụng để cải thiện khả năng tiêu hóa thức ăn chăn nuôi ở động vật và/hoặc duy trì sức khỏe động vật bằng cách hỗ trợ chức năng của hệ miễn dịch.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp sử dụng ít nhất ba hoạt chất được chọn từ nhóm bao gồm alpha-pinen, alpha-terpineol, xinnamaldehyt, dihydroeugenol, eugenol, meta-cresol và terpinolen trong thức ăn cho cá để cải thiện tỷ lệ chuyển hóa thức ăn chăn nuôi (FCR) và/hoặc tăng trọng và/hoặc để làm giảm tỷ lệ chết bằng cách điều chỉnh hệ vi sinh vật đường ruột và/hoặc ngăn ngừa bệnh do các vi sinh vật gây bệnh gây ra.

Theo một phương án được ưu tiên, alpha-pinen và xinnamaldehyt được dùng để cải thiện khả năng tiêu hóa thức ăn chăn nuôi ở động vật và/hoặc duy trì sức khỏe động vật bằng cách hỗ trợ chức năng của hệ miễn dịch.

Mô tả chi tiết sáng chế

FCR có thể được xác định dựa trên thử nghiệm nuôi cá bao gồm xử lý lần đầu, trong đó hỗn hợp gồm ít nhất hai hợp chất theo sáng chế được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi động vật với hàm lượng thích hợp tính theo mỗi kg thức ăn chăn nuôi, và xử lý lần thứ hai (đối chứng) không bổ sung các hợp chất vào thức ăn cho động vật này.

Như thường đã biết, FCR được cải thiện sẽ thấp hơn FCR đối chứng. Theo một phương án cụ thể, FCR được cải thiện (tức là, được giảm) so với đối chứng ít nhất 1,0%, tốt hơn là ít nhất 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4%, hoặc ít nhất 2,5%.

Thuật ngữ "ruột" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ đường tiêu hóa hoặc đường dạ dày ruột (cũng được đề cập là ống tiêu hóa) và thuật ngữ này được dùng để chỉ hệ thống các cơ quan ở động vật đa bào mà lấy thức ăn, tiêu hóa thức ăn để tạo ra năng lượng và chất dinh dưỡng, và thải ra chất thải còn lại.

Thuật ngữ "vi sinh vật đường ruột" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ các chủng vi khuẩn tự nhiên cư trú trong ruột và duy trì sức khỏe bằng cách hỗ trợ tiêu hóa thích hợp.

Thuật ngữ "điều chỉnh" như được sử dụng ở đây kết hợp với hệ vi sinh vật đường ruột thường chỉ việc làm thay đổi, thao tác, biến đổi, hoặc điều chỉnh chức năng hoặc tình trạng của hệ vi sinh vật này ở động vật có chức năng bình thường hoặc khỏe mạnh, nghĩa là, sử dụng với mục đích không phải điều trị.

Thuật ngữ "hỗ trợ chức năng của hệ miễn dịch" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ tác dụng kích thích miễn dịch của các hợp chất.

Thuật ngữ "tỷ lệ chết" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ tỷ lệ động vật còn sống ở cuối giai đoạn sinh trưởng so với số lượng động vật ban đầu có trong ao. Tỷ lệ này có thể được xác định dựa trên thử nghiệm thử gây nhiễm bệnh cho cá gồm hai nhóm cá được thử gây bệnh bằng tác nhân gây bệnh cụ thể cho cá nhằm mục đích gây ra tỷ lệ chết nằm trong khoảng từ 40 đến 80% động vật ở nhóm không được xử lý. Tuy nhiên, ở nhóm thử nghiệm được cho ăn bằng hàm lượng thích hợp tính trên mỗi kg thức ăn chăn nuôi của hỗn hợp gồm ít nhất hai hợp chất theo sáng chế, tỷ lệ chết giảm so với nhóm không được xử lý ít nhất 5%, tốt hơn là ít nhất 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, hoặc ít nhất 50%.

Cụ thể, các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng các hợp chất theo sáng chế và hỗn hợp của chúng cho hiệu quả kháng lại một số vi sinh vật gây bệnh ở cá cá nước ấm và nước lạnh. Alpha-pinen, alpha-terpineol, xinnamaldehyt, dihydroeugenol, meta-cresol và terpinolen được chỉ ra là có tác dụng ức chế đối với *Vibrio anguillarum*, một tác nhân gây bệnh phẩy khuẩn ở tôm.

Alpha-pinen, xinnamaldehyt, dihydroeugenol, eugenol, limonen, và meta-cresol được chỉ ra là có tác dụng ức chế đối với *Aeromonas salmonicida*, một tác nhân gây bệnh được biết đến là bệnh nhọt.

Alpha-pinen, alpha-terpineol, xinnamaldehyt, dihydroeugenol, eugenol, meta-cresol và terpinolen cũng được chỉ ra là có tác dụng ức chế đối với *Edwardsella tarda* gây nhiễm khuẩn toàn thân ở cá.

Alpha-pinen, alpha-terpineol, xinnamaldehyt, dihydroeugenol, eugenol, và terpinolen được chỉ ra là có tác dụng ức chế đối với *Lactococcus garvieae* một tác nhân gây bệnh Latococcosis, một bệnh mới xuất hiện mà ảnh hưởng đến nhiều loài cá và gây tổn thất kinh tế nghiêm trọng đối với cả ngành nuôi trồng thủy sản nước ngọt lẫn nước mặn nếu nhiệt độ nước tăng trên 16°C vào các tháng mùa hè.

Xinnamaldehyt, dihydroeugenol, eugenol, và meta-cresol có tác dụng ức chế sự phát triển của *Yersinia ruckeri*, một vi sinh vật gây bệnh đỏ miệng ruột (ERM), một bệnh thường được phát hiện ở cá hồi.

Xinnamaldehyt và meta-cresol được chỉ ra là có tác dụng ức chế đối với:

(i) *Vibrio salmonicida* là vi khuẩn ưa lạnh là tác nhân gây bệnh phẩy khuẩn ở cá hồi Đại Tây Dương sống ở nước lạnh.

(ii) *Aeromonas hydrophila* gây loét và bệnh nhiễm trùng xuất huyết. Tác nhân này có sức đề kháng rất mạnh với các chất kháng khuẩn đơn giản thông thường như clo-rin.

(iii) *Photobacterium damsela* trước đây được gọi là *Pasteurella piscicida*: một tác nhân gây bệnh gây tổn thất nghiêm trọng cho ngành nuôi cá biển có vai trò kinh tế quan trọng như cá cam và cá song chấm đỏ ở Nhật và cá vược có sọc và cá vược trắng ở Mỹ.

(iv) *Streptococcus iniae* là tác nhân có khả năng gây bệnh ở cá biển và gây tỷ lệ chết cao: các lần bùng phát của nó có thể gây ra tỷ lệ chết nằm trong khoảng từ 30 đến 50%.

Các tác nhân gây bệnh cho thủy sản khác như:

(i) *Piscirickettsia salmonis* là một tác nhân gây xuất huyết trên thận ở cá hồi hoặc nhiễm trùng huyết do trùng rận ở cá hồi (Salmonid Rickettsial Septicaemia - SRS),

(ii) *Vibrio viscosus* mới đây được đổi tên là *Moritella viscosa* là nguyên nhân gây ra bệnh được gọi là “loét mùa đông”,

(iii) *Ich* (ký sinh trùng) một trong số các ký sinh trùng động vật nguyên sinh phổ biến ở cá,

(iv) *Vibrio harveyi*, là nguyên nhân gây ra bệnh phát sáng, một bệnh mà thường thấy ở tôm nuôi thương mại

cũng đều bị ức chế bởi hỗn hợp của các hợp chất được mô tả trong sáng chế.

Theo một khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn cho cá chứa ít nhất hai hoạt chất được chọn từ nhóm bao gồm alpha-pinen (CAS 99-86-5), alpha-terpineol (CAS 98-55-5), xinnamaldehyt (CAS 14371-10-9/104-55-2), dihydroeugenol (CAS 2785-87-7), eugenol (CAS 97-53-0), meta-cresol (CAS 108-39-4) và terpinolen (CAS 554-61-0). Các hợp chất theo sáng chế đều sẵn có trên thị trường hoặc dễ dàng được điều chế bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này nhờ các quy trình và các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc trong các hỗn hợp làm chế phẩm thức ăn cho cá, ở dạng chất chiết có nguồn gốc tự nhiên hoặc hỗn hợp các chất chiết hoặc ở dạng các hợp chất tự nhiên.

Thuật ngữ "chất chiết" như được sử dụng ở đây bao gồm các chế phẩm thu được bằng cách chiết bằng dung môi (mà cũng được biết là "các dầu chiết"), cất bằng hơi nước (mà cũng được biết đến là "các tinh dầu") hoặc các phương pháp khác đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các dung môi chiết thích hợp bao gồm rượu như etanol.

Thuật ngữ "tự nhiên" trong trường hợp này được hiểu là các chất mà bao gồm các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên và thu được từ các sản phẩm tự nhiên hoặc thông qua quá trình tổng hợp.

(Các) hoạt chất hoặc chất tự nhiên hoặc các thành phần chiết khác có thể được bổ sung với lượng nhỏ. Ví dụ về các thành phần này là: capsaixin, tannin, piperin, trimetylamin, 3,4-xilenol, rượu furfurylic và hỗn hợp của chúng.

Nếu hỗn hợp chứa ít nhất hai hợp chất nêu trên được ưu tiên, xinnamaldehyt và/hoặc meta-cresol được sử dụng làm thành phần chính của hỗn hợp này. Thích hợp nếu hỗn hợp này chứa 10-90% trọng lượng meta-cresol và/hoặc xinnamaldehyt, 1-50 % trọng lượng alpha-pinen, 1-50% trọng lượng dihydro-eugenol, trong đó các lượng nêu trên được tính theo tổng lượng của các thành phần này. Tổng lượng của các hoạt chất này có thể thay đổi trong giới hạn rộng nhưng cuối cùng được sử dụng trong thức ăn cho cá với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 5000ppm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 1000ppm, được tính theo trọng lượng khô của thức ăn cho cá.

Hỗn hợp được ưu tiên nhất gồm ít nhất hai hợp chất như nêu trên chứa, xinnamaldehyt và alpha-pinen làm thành phần chính của hỗn hợp này. Thích hợp nếu hỗn hợp này chứa 30-70% trọng lượng alpha-pinen, 30-70% trọng lượng xinnamaldehyt, 1-20% trọng lượng metacresol, 1-20% trọng lượng dihydro-eugenol, trong đó các lượng này được tính theo tổng lượng của các thành phần này. Tổng lượng của các hoạt chất này có thể thay đổi trong giới hạn rộng nhưng cuối cùng được sử dụng trong thức ăn cho cá với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 5000ppm, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 1000ppm, được tính theo trọng lượng khô của thức ăn cho cá.

Tất cả các hợp chất nêu trên (các hoạt chất và các thành phần khác) có thể được sử dụng cùng với chất hoạt động bề mặt nhũ hóa. Chất nhũ hóa có thể được chọn thích hợp từ các chất có bản chất phần nào ưa nước, ví dụ trong số các este polyglyxerol của

axit béo như axit rixinoleic được este hóa hoặc este propylen glycol của axit béo, sacaro-este hoặc sacaro-glyxerit, polyetylen glycol, lexithin, v.v..

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, hỗn hợp của các hoạt chất có thể chứa xinnamaldehyt với lượng 20% trọng lượng, meta-cresol với lượng 20% trọng lượng, dihydro-eugenol với lượng 20% trọng lượng, alpha-pinen với lượng 20% trọng lượng, trimetylamin với lượng 3% trọng lượng, piperin với lượng 1,8% trọng lượng và rượu furfurylic với lượng 4% trọng lượng.

Theo một phương án được ưu tiên khác của sáng chế, hỗn hợp của các hoạt chất chứa alpha-pinen với lượng nằm trong khoảng từ 40 đến 60% trọng lượng, xinnamaldehyt với lượng nằm trong khoảng từ 40 đến 60% trọng lượng, và có thể chứa thêm trimetylamin với lượng từ 1 đến 5% trọng lượng, piperin với lượng từ 1 đến 5%, và rượu furfurylic với lượng từ 3 đến 8% trọng lượng.

Việc kết hợp chế phẩm thức ăn cho cá chứa (các) hoạt chất vào thức ăn cho cá có thể được tiến hành như được mô tả trong ví dụ 1. Sau đó, hỗn hợp của các hoạt chất được phối chế trực tiếp dưới dạng dầu, sau đó dầu này được trộn với dầu được phun lên trên các hạt thức ăn chăn nuôi như được mô tả trong ví dụ 1.

Việc kết hợp chế phẩm thức ăn cho cá chứa (các) hoạt chất vào thức ăn cho cá có thể theo cách khác còn được tiến hành bằng cách tạo ra một hỗn hợp trộn sẵn gồm các hoạt chất và các chất phụ gia thích hợp khác. Hỗn hợp trộn sẵn này có thể chứa hỗn hợp hoặc hợp chất hoặc chất chiết tự nhiên có hoạt tính với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 10% trọng lượng, các chất phụ gia thông thường khác với lượng nằm trong khoảng từ 0 đến 40% trọng lượng, như chất tạo màu, và giá thể hấp thu thông thường bất kỳ với lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 98%.

Giá thể này có thể chứa, ví dụ, sợi gỗ với lượng nằm trong khoảng từ 40 đến 50% trọng lượng, stearin với lượng nằm trong khoảng từ 8 đến 10% trọng lượng, bột nghệ với lượng nằm trong khoảng từ 4 đến 5% trọng lượng, bột hương thảo với lượng nằm trong khoảng từ 4 đến 5% trọng lượng, đá vôi với lượng nằm trong khoảng từ 22 đến 28% trọng lượng, gôm với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 3% trọng lượng, như gôm arabic, đường và/hoặc tinh bột với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 50% trọng lượng và nước với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 15% trọng lượng.

Sau đó, hỗn hợp trộn sẵn này được trộn cùng với vitamin, ví dụ vitamin C, muối khoáng và các thành phần phụ gia thức ăn chăn nuôi khác, ví dụ chất chiết nấm men chứa nucleotit, glucan và các chất điều chỉnh hệ vi khuẩn đường ruột và cuối cùng sau

đó được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi với lượng sao cho thức ăn chăn nuôi này sẽ chứa 10-5000ppm, tốt hơn là 100-1000ppm hoặc 100-500ppm hoạt chất theo sáng chế.

Hơn thế nữa, tốt hơn nếu chế phẩm theo sáng chế được sử dụng cùng với chất chiết nấm men chứa nucleotit, và glucan.

Ngoài ra, tùy ý, các thành phần phụ gia trong thức ăn chăn nuôi là các chất màu, ví dụ carotenoid như beta-caroten, astaxanthin, và lutein; hợp chất thơm; các chất làm ổn định; peptit kháng khuẩn; axit béo đa chưa bão hòa; và/hoặc ít nhất một enzym được chọn từ trong số phytaza (EC 3.1.3.8 hoặc 3.1.3.26); xylanaza (EC 3.2.1.8); galactanaza (EC 3.2.1.89); alpha-galactosidaza (EC 3.2.1.22); proteaza (EC 3.4.), phospholipaza A1 (EC 3.1.1.32); phospholipaza A2 (EC 3.1.1.4); lysophospholipaza (EC 3.1.1.5); phospholipaza C (EC 3.1.4.3); phospholipaza D (EC 3.1.4.4); amylaza như, ví dụ, alpha-amylaza (EC 3.2.1.1); và/hoặc beta-glucanaza (EC 3.2.1.4 hoặc EC 3.2.1.6).

Ví dụ về các axit béo đa chưa bão hòa là axit béo đa chưa bão hòa C18, C20 và C22, như axit arachidonic, axit docosahexaenoic, axit eicosapentaenoic và axit gamma-linoleic.

Thức ăn cho cá như được mô tả ở đây có thành phần xấp xỉ là protein với lượng 20-60% trọng lượng, và lipit và lượng ẩm với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 45% trọng lượng.

Theo một vài ví dụ cụ thể, thức ăn cho cá chứa một hoặc nhiều nguồn sau:

- protein, carbohydrat và lipit (ví dụ, bột cá, dầu cá, bột huyết, bột lông vũ, bột gia cầm, bột gà và/hoặc các loại bột khác được tổng hợp từ chất thải khác của lò mổ),
- mỡ động vật (ví dụ, mỡ gia cầm),
- bột rau (ví dụ, bột đậu nành, bột đậu lupin, bột đậu Hà Lan, bột đậu, bột nho và/hoặc bột hoa hướng dương),
- dầu thực vật (ví dụ, dầu hạt nho, dầu đậu nành),
- tinh bột (ví dụ, tinh bột lúa mì hoặc tinh bột ngũ cốc) và
- axit amin bổ sung (ví dụ, lysin)

Thuật ngữ "thức ăn cho cá" như được sử dụng ở đây bao gồm chế phẩm thức ăn cho cá theo sáng chế và các thành phần như được mô tả trên đây. Thông thường, thức ăn cho cá chứa thành phần là bột cá. Thích hợp là thức ăn cho cá ở dạng bông hoặc hạt, ví dụ hạt ép đùn.

Theo một khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến chế phẩm thức ăn cho động vật thủy sản và việc sử dụng chế phẩm này để nuôi cá. Thức ăn chăn nuôi này đặc biệt thích

hợp để nuôi cá hồi, bao gồm cá hồi Đại Tây Dương (*Salmo salar*), các loài cá hồi khác, và các loại cá không phải cá hồi như cá tuyết, cá vược ở biển, cá tráp ở biển và cá trình. Tuy nhiên, có thể dùng chế phẩm này để nuôi tất cả các loại cá, ví dụ cá bơn, cá bơn lưỡi ngựa, cá đuôi và cá ngừ.

Sáng chế được mô tả và được yêu cầu bảo hộ ở đây không bị giới hạn phạm vi ở nhiều phương án cụ thể được mô tả ở đây, vì các phương án này chỉ nhằm minh họa cho một vài khía cạnh của sáng chế. Các phương án tương đương bất kỳ được dự định thuộc phạm vi của sáng chế. Thực vậy, các cải biến của sáng chế ngoài các cải biến được thể hiện và mô tả ở đây là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này từ phần mô tả nêu trên. Các cải biến này cũng được dự định nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo ra thức ăn cho cá dạng ép

Các nguyên liệu thô chính được nghiền và trộn. Sau đó, các thành phần nhỏ được cho vào máy trộn và hỗn hợp đồng nhất được điều hòa bằng cách bổ sung nước và hơi nước vào khối hỗn hợp trong máy điều hòa sơ bộ. Việc làm này bắt đầu quá trình nấu ở giai đoạn tinh bột (thành phần kết dính). Khối hỗn hợp nêu trên được đưa vào máy nghiền viên. Khối hỗn hợp này được ép qua khuôn của máy nghiền và các dải được cắt thành các hạt bên ngoài khuôn. Hàm lượng ẩm thấp và không cần thiết phải làm khô thức ăn chăn nuôi này.

Sau đó, dầu bổ sung bao gồm chế phẩm thức ăn cho cá theo sáng chế được phun lên trên bề mặt của các hạt, nhưng vì các hạt này tương đối chắc nên tổng lượng lipit hiếm khi vượt quá 24%. Dầu bổ sung có thể là dầu cá hoặc dầu thực vật, ví dụ dầu hạt nho hoặc dầu đậu nành, hoặc hỗn hợp dầu thực vật hoặc hỗn hợp dầu cá và dầu thực vật. Sau khi bao dầu, các hạt này được làm lạnh trong máy lạnh và được đóng gói. Thức ăn cho cá thành phẩm dạng ép chứa chế phẩm như được mô tả trong sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 5000ppm.

Ví dụ 2: Phương pháp tạo ra thức ăn cho cá dạng ép đùn

Các nguyên liệu thô chính được nghiền và trộn. Các thành phần nhỏ bao gồm chế phẩm thức ăn cho cá theo sáng chế được bổ sung vào máy trộn. Hỗn hợp đồng nhất được điều hòa bằng cách bổ sung nước và hơi nước trong thiết bị điều hòa. Dầu bổ sung cũng được bổ sung vào khối hỗn hợp ở giai đoạn này. Việc làm này bắt đầu quá trình nấu ở

giai đoạn tinh bột (thành phần kết dính). Cho khối hỗn hợp này vào máy ép đùn. Máy ép đùn có thể là loại một vít hoặc hai vít. Do chuyển động quay của khối hỗn hợp này trong máy ép đùn, khối này được trộn thêm. Dầu bổ sung, nước và hơi nước được thêm vào khối này trong máy ép đùn. Ở thời điểm cuối trong máy ép đùn, khối này có nhiệt độ trên 100°C và áp suất lớn hơn áp suất của môi trường xung quanh. Khối này được ép qua các lỗ trên đĩa khuôn của máy ép đùn. Do việc giải phóng nhiệt độ và áp suất, nên một số ẩm sẽ bay hơi ngay sau đó (thoát nhanh) và khối ép đùn trở nên xốp. Các sợi được cắt thành các hạt bằng dao quay. Hàm lượng nước là khá cao (18-28%) và do đó, các hạt được làm khô ngay đến xấp xỉ 10% lượng nước trong thiết bị làm khô.

Sau khi làm khô, có thể bổ sung thêm dầu vào thức ăn chăn nuôi bằng cách phun dầu lên trên bề mặt của thức ăn chăn nuôi, hoặc bằng cách nhúng thức ăn chăn nuôi trong dầu. Thuận lợi là bổ sung dầu vào thức ăn chăn nuôi trong bình kín, nơi mà áp suất không khí thấp hơn áp suất của môi trường xung quanh (bao chân không) sao cho các hạt thức ăn chăn nuôi xốp hấp thu nhiều dầu hơn. Thức ăn chăn nuôi chứa hơn 40% lipid có thể được sản xuất theo cách này. Sau khi bao dầu, thức ăn chăn nuôi được làm lạnh và được đóng gói. Dầu có thể được bổ sung ở một số thời điểm trong quy trình này như nêu trên, và dầu này có thể là dầu cá hoặc dầu thực vật, ví dụ dầu hạt nho hoặc dầu đậu nành, hoặc hỗn hợp dầu thực vật hoặc hỗn hợp dầu cá và dầu thực vật.

Cá cần protein, mỡ, các chất khoáng và vitamin để phát triển và có sức khỏe tốt. Chế độ ăn của cá ăn động vật là đặc biệt quan trọng. Giai đoạn đầu trong quá trình nuôi cá ăn động vật, cá nguyên con hoặc cá tăng đáy được sử dụng để đáp ứng các yêu cầu dinh dưỡng của cá nuôi. Cá tăng đáy được trộn với nhiều loại nguyên liệu thô khô, như bột cá và tinh bột, được gọi là thức ăn chăn nuôi bán ẩm hoặc mềm. Nếu việc nuôi cá ở trên được công nghiệp hóa, thức ăn chăn nuôi bán ẩm hoặc mềm này được thay thế bằng thức ăn chăn nuôi ép khô. Thức ăn chăn nuôi này dần dần tự được thay thế bằng thức ăn chăn nuôi khô dạng ép đùn.

Ngày nay, thức ăn chăn nuôi dạng ép đùn được sử dụng hầu hết trong việc nuôi một số loài cá như nhiều loại cá hồi, cá tuyết, cá vược ở biển và cá trap ở biển.

Nguồn protein chủ yếu trong thức ăn cho cá dạng khô là bột cá với lượng khác nhau. Các nguồn protein động vật khác cũng được sử dụng cho thức ăn cho cá dạng khô. Do đó, việc sử dụng bột huyết, bột xương, bột lông vũ và các loại bột khác được tạo ra từ chất thải khác của lò mổ, ví dụ bột gà đã được biết đến. Các loại bột này thường rẻ

hơn bột cá và dầu cá. Tuy nhiên, ở một vài vùng địa lý, việc sử dụng các nguyên liệu thô này để sản xuất thức ăn cho động vật nuôi lấy thịt và cá bị cấm.

Việc sử dụng protein thực vật như gluten lúa mì, gluten ngô, protein đậu tương, bột đậu lupin, bột đậu Hà Lan, bột đậu, bột nho, bột hoa hướng dương và bột gạo cũng được biết đến.

Ví dụ 3: Đánh giá tác dụng của các hoạt chất theo sáng chế đến khả năng sống sót của *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsellia tarda*, *Photobacterium damsela*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*.

Hoạt tính kháng vi sinh vật của chế phẩm theo sáng chế đối với *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsellia tarda*, *Photobacterium damsela*, *Lactococcus garvieae*, và *Streptococcus iniae* được xác định *in vitro*.

Trong các thử nghiệm này, các vi sinh vật dưới đây, môi trường phát triển, các điều kiện nuôi cấy và phương pháp đánh giá được sử dụng:

Vi khuẩn: Tất cả các chủng gây bệnh được thử đều thuộc bộ sưu tập chủng của trung tâm sức khỏe động vật hoang dã và cá, Viện nghiên cứu bệnh học động vật, Đại học Bern (Thụy Sĩ).

Xác định mức pha loãng vi khuẩn thích hợp: Sau 24 giờ cấy chuyển vi khuẩn trên đĩa thạch máu cừu (Biomérieux, Geneva) một lượng nhỏ được chuyển sang môi trường NaCl vô trùng cho đến khi thu được giá trị McFarland là 0,5. Từ dung dịch này, tiến hành pha loãng đến mức 3, 1,5 và 0,75% trong TSB trên đĩa có 96 lỗ có đáy tròn. Mỗi lỗ chứa được tổng thể tích là 100µl. Sau 24 giờ ở nhiệt độ 22°C, đánh giá sự phát triển của vi khuẩn. Mức pha loãng nào mà thu được vết phân đánh dấu lỗ, phủ lên một nửa lỗ đáy tròn được chọn cho các thử nghiệm này.

Xác định tác động của dung môi: Để hòa tan các chất thử nghiệm trong thạch TSB, rượu (ETOH) được sử dụng. Để xác định tác dụng có thể có của rượu, nồng độ cuối cùng theo tính toán của rượu trong các lỗ thử (0,1, 0,05 và 0,025%) được thử ở các nồng độ khác nhau của vi khuẩn, và không cho thấy bất kỳ tác động nào đến sự phát triển của vi khuẩn.

Nồng độ của các chất thử nghiệm: khoảng liều *in vitro* được ước lượng dựa trên việc đánh giá rằng lượng thức ăn có thể thấp nhất là 1000ppm và tỷ lệ cho ăn hằng ngày là 2%. Nồng độ có thể tồn tại ở ruột được ước tính tối đa là 0,1µl/100µl. Sau đó, mức

pha loãng bậc 2 được thử dần tới nồng độ cuối cùng của chất thử là 0,85µg/ml; 0,42µg/ml và 0,21µg/ml nếu được điều chỉnh đến mật độ trung bình của tinh dầu.

Từ mỗi chất, điều chế dung dịch gốc chứa 2µl chất thử, 18µl ETOH và 180µl PBS.

Chuẩn bị các đĩa: Thử nghiệm ba lần ở ba nồng độ (0,21, 0,42 và 0,85µg/ml) đối với mỗi chất thử. Trên mỗi đĩa, đối chứng dương bao gồm vi khuẩn trong TSB và đối chứng trống (PBS) được bao gồm. Ba mẫu khác với ETOH ở ba mức pha loãng cũng được bao gồm trên mỗi đĩa.

Đọc đĩa: Sau khi ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 22°C, đọc các đĩa này sử dụng thang điểm từ 0 (không có sự phát triển vi khuẩn = không có vết trên đáy lỗ) đến 3 (phát triển bình thường = kích thước của vết tương đương với kích thước của vết thu được từ đối chứng dương).

Các kết quả dưới đây được ghi lại và được thể hiện tóm tắt trong bảng 1:

Nồng độ vi khuẩn thích hợp cho thử nghiệm: Nồng độ 1,5% có giá trị McFarland 0,5 tạo ra vết có thể nhìn rõ bằng mắt thường phủ lên 2/3 lỗ đáy tròn. Do đó, nồng độ này được coi là thích hợp cho các phép thử.

Tác động của ETOH đến sự phát triển vi khuẩn: Không phát hiện thấy tác động bất kỳ của các nồng độ rượu được sử dụng (1%, 0,5% và 0,05%).

Tác động của các chất thử: Các kết quả được thể hiện tóm tắt trong bảng 1. Không thấy có sự chênh lệch lớn nào giữa ba mẫu cũng như ba mẫu trên các đĩa khác nhau. Tất cả các đối chứng dương đều cho thấy sự phát triển của vi khuẩn mà có thể nhìn rõ bằng mắt thường trong 48 giờ. Như được kỳ vọng từ các thử nghiệm sơ bộ, không xác định được tác động tiêu cực của rượu. Tác động với phổ rộng nhất đến vi khuẩn được nhận thấy với xinnamaldehyt, và alpha-pinen, sau đó mới đến meta-cresol và dihydro-eugenol.

Bảng 1: Tác động của các chất thử khác nhau đến sự phát triển của *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsella tarda*, *Photobacterium damsela*, *Lactococcus garvieae*, và *Streptococcus iniae* sau 48 giờ ủ ở nhiệt độ 22°C. Các giá trị là giá trị trung bình của 5 bản sao riêng rẽ. nd: không được xác định, 3: không tác động, 0: ức chế sự phát triển tối đa.

Bảng 1:

		<i>Y. ruckeri</i>	<i>Y. ruckeri</i> 89	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. tarda</i>	<i>P. damsela</i>	<i>L. garvieae</i>	<i>S. Iniae</i>
0,85µg/ml	alpha-pinen	1	nd	0	nd	0	nd	0	nd	0,22	nd
	alpha-terpineol	3	nd	0	nd	1,44	nd	0	nd	0,33	nd
	xinnamaldehyt	0	0,02	0	0,02	0	0	0	0	0	0
	dihydro-eugenol	0	nd	0	nd	0	nd	0	nd	0	nd
	eugenol	0	nd	0,56	nd	0	nd	0	nd	0,56	nd
	limonen	3	nd	1	nd	0	nd	0	nd	1	nd
	meta-cresol	0	0,02	0	0,02	0	0	0	0	1	0
	terpinolen	3	nd	0	nd	1,44	nd	0	nd	0,33	nd
0,42µg/ml	alpha-pinen	3	nd	0	nd	0	nd	0	nd	2,67	nd
	alpha-terpineol	3	nd	0	nd	3	nd	0	nd	2,67	nd
	xinnamaldehyt	0,27	2,33	0	0,02	0	0	0	0	2,93	0,27
	dihydro-eugenol	3	nd	1	nd	1,33	nd	2,6	nd	1	nd
	eugenol	2,89	nd	1,67	nd	0,78	nd	1,9	nd	1,67	nd
	limonen	3	nd	2,67	nd	0,67	nd	0,1	nd	2,67	nd
	meta-cresol	2,13	0,73	0,6	0,02	0	0	0	0	3	1,13
	terpinolen	3	nd	0	nd	3	nd	0	nd	2,67	nd
0,21µg/ml	alpha-pinen	3	nd	0	nd	0	nd	0	nd	3	nd
	alpha-terpineol	3	nd	3	nd	3	nd	0,11	nd	3	nd
	xinnamaldehyt	2,8	3	0,2	0,02	0,73	0	0,47	0	3	3
	dihydro-eugenol	3	nd	2	nd	2,56	nd	3	nd	2	nd
	eugenol	3	nd	3	nd	2	nd	3	nd	3	nd
	limonen	3	nd	3	nd	2	nd	1,44	nd	3	nd
	meta-cresol	3	1	1,53	0,2	0,13	0	1,93	1,4	3	3
	terpinolen	3	nd	3	nd	3	nd	0,11	nd	3	nd

Ví dụ 4: Đánh giá tác dụng của các hoạt chất theo sáng chế đến khả năng sống của *Vibrio anguillarum*, và *Aeromonas salmonicida*.

Tác động ức chế phát triển của *Aeromonas salmonicida* và *Vibrio anguillarum* sau 48 giờ ủ ở nhiệt độ 22°C của các hỗn hợp gồm các chất khác nhau được đánh giá. Các điều kiện của phép thử là như được mô tả trong ví dụ 3 và các nồng độ thử là (0,21µg/ml, 0,42µg/ml và 0,85µg/ml). Các giá trị nêu trong bảng 2 và 3 lần lượt là giá trị trung bình của ba bản sao riêng rẽ trên ba đĩa khác nhau đối với *Aeromonas salmonicida* và *Vibrio anguillarum*. 3: nghĩa là không tác động, 0: nghĩa là ức chế sự phát triển tối đa.

Các chất được thử một mình hoặc ở dạng hỗn hợp là meta-cresol, xinnamaldehyt, alpha-pinen, dihydroeugenol. Hỗn hợp các chất này được pha chế theo tỷ lệ 1:1 đối với hỗn hợp gồm hai chất, 1:1:1 đối với hỗn hợp gồm ba chất và 1:1:1:1 đối với hỗn hợp gồm bốn chất.

Kết quả: Tất cả các hợp chất và hỗn hợp của các hợp chất đều thể hiện tác dụng ức chế ở mức nhất định đối với hai tác nhân gây bệnh được thử nghiệm ở nồng độ cao nhất, và tính phụ thuộc liều rõ ràng của các tác động này trên hai loài vi khuẩn đã được quan sát thấy và được thể hiện trong bảng 2 và bảng 3.

Bảng 2: Kết quả của thử nghiệm ức chế *Aeromonas salmonicida*

Sản phẩm	Nồng độ		
	0,85µg/ml	0,42µg/ml	0,21µg/ml
meta-cresol	0,02	0,02	0,33
xinnamaldehyt	0,02	0,02	0,33
alpha-pinen	0,02	0,22	2
dihydroeugenol	0,02	1,33	3
meta-cresol/xinnamaldehyt 1:1	0,02	0,22	2
meta-cresol/alpha-pinen 1:1	0,02	0,22	1,67
meta-cresol/dihydroeugenol 1:1	0,02	1,11	2,33
xinnamaldehyt/alpha-pinen 1:1	0,02	0,11	1,78
xinnamaldehyt/dihydroeugenol 1:1	0,02	0,89	3
alpha-pinen/dihydroeugenol 1:1	0,02	1,78	3
meta-cresol/xinnamaldehyt/alpha-pinen 1:1:1	0,02	0,33	2
meta-cresol/xinnamaldehyt/dihydroeugenol 1:1:1	0,02	0,67	2
meta-cresol/alpha-pinen/dihydroeugenol 1:1:1	0,02	0,89	2,33
xinnamaldehyt/alpha-pinen/dihydroeugenol 1:1:1	0,02	1,22	2,44
meta-cresol/xinnamaldehyt/alpha-pinen/dihydroeugenol 1:1:1:1	0,02	1,33	2,33
ETOH	3	3	3
Đối chứng dương	3		
Đối chứng âm	0,02		

Bảng 3: Ước chế *Vibrio anguillarum*

Sản phẩm	Nồng độ		
	0,85µg/ml	0,42µg/ml	0,21µg/ml
meta-cresol	0,02	2,67	3
xinnamaldehyt	0,02	0,02	1
alpha-pinen	0,02	0,02	0,02
dihydroeugenol	0,02	1,56	2,67
meta-cresol/xinnamaldehyt 1:1	0,02	0,89	2,67
meta-cresol/alpha-pinen 1:1	0,02	0,02	2,67
meta-cresol/dihydroeugenol 1:1	0,02	2,22	3
xinnamaldehyt/alpha-pinen 1:1	0,02	0,02	0,02
xinnamaldehyt/dihydroeugenol 1:1	0,02	0,11	2,89
alpha-pinen/dihydroeugenol 1:1	0,02	0,02	1,78
meta-cresol/xinnamaldehyt/alpha-pinen 1:1:1	0,02	0,02	2,78
meta-cresol/xinnamaldehyt/dihydroeugenol 1:1:1	0,02	2,33	3
meta-cresol/alpha-pinen/dihydroeugenol 1:1:1	0,02	2,33	2,89
xinnamaldehyt/alpha-pinen/dihydroeugenol 1:1:1	0,02	0,67	3
meta-cresol/xinnamaldehyt/alpha-pinen/dihydroeugenol 1:1:1:1	0,02	2,22	3
ETOH	3	3	3
Đối chứng dương	3		
Đối chứng âm	0,02		

Ví dụ 5: Tác động của hỗn hợp tinh dầu chứa alpha-pinen, xinnamaldehyt, dihydroeugenol và meta-cresol đến tỷ lệ chết của cá hồi vân được thử gây nhiễm bệnh bằng *Aeromonas salmonicida*.

Thử nghiệm gây nhiễm bệnh bằng *Aeromonas salmonicida* được tiến hành ở cá hồi vân mới sinh để kiểm tra tác động của ba liều hỗn hợp gồm bốn tinh dầu được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi.

Cá: 600 con cá hồi vân non thu được từ trại cá ở Thụy Sĩ.

Các điều kiện nuôi cá: Đối với giai đoạn thích nghi và giai đoạn nuôi thử nghiệm trước khi gây nhiễm bệnh, cá thu được từ cùng chế độ thức ăn được nhốt trong bể kính có dung tích 130 lít được lắp với hệ thống nuôi nước vôi chảy liên tục và sục khí liên tục. Nhiệt độ của nước được duy trì ở nhiệt độ $17 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Tại thời điểm gây nhiễm bệnh, cá thu được từ mỗi phương pháp xử lý được chuyển sang bốn bể kính có dung tích 38 lít được lắp hệ thống nuôi nước vôi chảy liên tục và sục khí liên tục. Nhiệt độ nước được duy trì ở nhiệt độ $17,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Thức ăn và quá trình nuôi: Một hạt thức ăn cơ bản cho cá hồi vân mới sinh được tạo ra có đường kính 4mm. Từ các hạt này, thức ăn viên được điều chỉnh phù hợp với kích thước của cá sẽ được tạo ra và một mẻ thức ăn khoảng 5kg được tạo ra bằng cách bao hỗn hợp tinh dầu ở các liều lượng khác nhau được trộn với dầu trên thức ăn viên. Tiến hành bao nhờ bơm nhu động và máy trộn rời để đảm bảo phân phối đồng nhất sản phẩm.

Cá được cho ăn hằng ngày ở tỷ lệ 3,3% thể trọng. Tỷ lệ thức ăn được điều chỉnh thường xuyên theo mức tăng trọng của cá.

Bốn loại thức ăn thử nghiệm được tạo ra:

- Thức ăn A: thức ăn đối chứng không được bổ sung hỗn hợp tinh dầu
- Thức ăn B: thức ăn cơ bản được bổ sung 500ppm hỗn hợp tinh dầu
- Thức ăn C: thức ăn cơ bản được bổ sung 2000ppm hỗn hợp tinh dầu
- Thức ăn D: thức ăn cơ bản được bổ sung 4000ppm hỗn hợp tinh dầu

Hỗn hợp tinh dầu là hỗn hợp dưới đây: alpha-pinen, xinnamaldehyt, dihydroeugenol và meta-cresol với lượng tương đương. Thức ăn thử nghiệm được cho ăn trong bốn tuần trước khi thử gây bệnh và sau khi thử gây bệnh cho đến khi kết thúc thử nghiệm. Trọng lượng cá được ghi lại lúc bắt đầu cho ăn thức ăn thử nghiệm, trước khi thử gây bệnh và kết thúc thử nghiệm trên số cá còn lại.

Thử nghiệm gây bệnh: Liều thử gây bệnh được xác định trong thử nghiệm sơ bộ, trên cùng một quần thể cá và trong cùng một điều kiện. Sau một khoảng thời gian 4 tuần cho ăn thử nghiệm, 25 con cá được chia ngẫu nhiên vào bốn bể kính có dung tích 38 lít. Sau đó, cá từ mỗi thùng thử nghiệm này được gây tê và được thử gây bệnh bằng cách tiêm trong màng bụng *Aeromonas salmonicida* với liều $1,2 \times 10^2$ cfu/con được xác định bằng cách đo quang phổ. Sau đó, tỷ lệ chết hằng ngày được ghi lại trong một khoảng thời gian ba tuần. Cá chết đầu tiên từ mỗi bể kính được nghiên cứu vi khuẩn học để khẳng định vi khuẩn gây bệnh học gây chết cá. Kết thúc thử nghiệm, toàn bộ cá còn sống được đánh giá các dấu hiệu nhiễm bệnh bên ngoài và ngoài ra tiến hành mổ và nghiên cứu vi khuẩn 6 cá đối với mỗi nhóm thức ăn.

Các kết quả về tỷ lệ chết cộng dồn được thể hiện trong bảng 4:

Bảng 4: Giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của tỷ lệ chết cộng dồn theo liều lượng của hỗn hợp tinh dầu

Ngày sau thử nghiệm	Đối chứng		500ppm		2000ppm		4000ppm	
	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	7,0	2,0	8,0	7,3	2,0	2,3	0,0	0,0
5	14,0	7,7	15,1	6,8	10,0	9,5	6,0	6,9
6	16,0	8,6	22,2	11,5	11,0	10,5	7,0	6,8
7	16,0	8,6	23,3	11,5	11,0	10,5	8,0	6,5
8	17,0	8,9	23,3	11,5	12,0	11,8	9,0	8,2
9	20,0	11,3	23,3	11,5	12,0	11,8	10,0	10,1
10	20,0	11,3	23,3	11,5	12,0	11,8	10,0	10,1
11	20,0	11,3	23,3	11,5	12,0	11,8	12,0	13,9
12	20,0	11,3	23,3	11,5	12,0	11,8	12,0	13,9
13	21,0	12,4	23,3	11,5	12,0	11,8	14,0	17,7
14	21,0	12,4	23,3	11,5	12,0	11,8	14,0	17,7
15	21,0	12,4	23,3	11,5	12,0	11,8	15,0	19,7
16	21,0	12,4	23,3	11,5	12,0	11,8	15,0	19,7
17	21,0	12,4	23,3	11,5	12,0	11,8	15,0	19,7
18	21,0	12,4	23,3	11,5	12,0	11,8	15,0	19,7
19	21,0	12,4	23,3	11,5	12,0	11,8	15,0	19,7

Kết quả: Mức hấp thụ thức ăn chăn nuôi là bình thường và cá phát triển từ 4 đến khoảng 14g trong thử nghiệm.

Các kết quả này cho thấy tác động phụ thuộc liều lượng của các tinh dầu ở cá hồi vân được thử gây bệnh bằng *A. salmonicida*. Giá trị trung bình thấp nhất được nhận thấy ở hai nhóm nhận liều cao hơn, trong khi đó ở nhóm nhận liều thấp nhất nhận thấy tỷ lệ chết cộng dồn cao hơn một chút so với nhóm đối chứng. Các kết quả này gợi ý rằng hỗn hợp gồm bốn tinh dầu trong thức ăn có tác dụng có lợi đến cá hồi vân bị nhiễm *A. salmonicida*. Tỷ lệ chết cộng dồn và sự có mặt vi khuẩn ở cá còn sống khi kết thúc thử nghiệm được nhận thấy là có sự chênh lệch.

Ví dụ 6: Tác động của hỗn hợp tinh dầu chứa alpha-pinen và xinnamaldehyt đến tỷ lệ chết của cá hồi vân được thử gây bệnh bằng *Aeromonas salmonicida*.

Mục đích: Thử nghiệm thử gây bệnh bằng *Aeromonas salmonicida* được tiến hành ở cá hồi vân mới sinh để kiểm tra tác động của alpha-pinen và xinnamaldehyt khi được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi.

Cá: 600 con cá hồi vân non thu được từ DSM Nutritional Products

Điều kiện nuôi cá: Đối với giai đoạn thích nghi và giai đoạn cho ăn thử nghiệm trước khi thử gây bệnh, cá thu được từ cùng chế độ thức ăn được nhốt trong bể kính có dung tích 130 lít hệ thống nuôi nước vôi chảy liên tục và sục khí liên tục. Nhiệt độ nước được duy trì ở $14,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Tại thời điểm bị nhiễm, cá từ mỗi chế độ xử lý được chuyển vào bốn bể kính có dung tích 38 lít được lắp hệ thống nuôi nước vôi chảy liên tục và sục khí liên tục. Nhiệt độ nước được duy trì ở $13,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Thức ăn và quá trình nuôi: Một hạt thức ăn cơ bản cho cá hồi vân non được sản xuất có đường kính 4mm. Từ các hạt này, thức ăn viên được điều chỉnh phù hợp với kích thước của cá được tạo ra và một mẻ thức ăn chăn nuôi khoảng 5kg được tạo ra bằng cách bao hỗn hợp tinh dầu với các lượng khác nhau được trộn với dầu lên thức ăn viên. Tiến hành bao nhờ bơm nhu động và máy trộn cụ thể để đảm bảo sự phân phối đồng nhất sản phẩm.

Cá được cho ăn hàng ngày ở tỷ lệ 3,3% thể trọng. Tỷ lệ thức ăn được điều chỉnh đều đặn theo tăng trọng cho cá.

Ba thức ăn thử nghiệm được tạo ra:

- Thức ăn A: thức ăn đối chứng không được bổ sung hỗn hợp tinh dầu
- Thức ăn B: thức ăn cơ bản được bổ sung 4000ppm alpha-pinen
- Thức ăn C: thức ăn cơ bản được bổ sung 4000ppm alpha-pinen + xinnamaldehyt với lượng tương đương

Thức ăn thử nghiệm được cho ăn trong bốn tuần trước khi thử gây bệnh và sau khi gây bệnh cho đến khi kết thúc thử nghiệm.

Trọng lượng cá được ghi lại lúc bắt đầu cho ăn thử nghiệm, trước khi thử gây bệnh và lúc kết thúc thử nghiệm trên cá còn lại.

Thử nghiệm thử gây bệnh: Liều liều thử gây bệnh được xác định trong thử nghiệm sơ bộ, trên cùng một quần thể cá và trong các điều kiện như nhau. Sau một khoảng thời gian 4 tuần cho ăn thử nghiệm, 25 con cá được chia ngẫu nhiên vào bốn bể

kính có dung tích 38 lít. Sau đó, cá từ mỗi thùng thử nghiệm được gây mê và được the gây bệnh bằng cách tiêm trong màng bụng *Aeromonas salmonicida* với liều 5×10^3 cfu/con được xác định bằng cách đo quang phổ. Sau đó, tỷ lệ chết hàng ngày được ghi lại trong một khoảng thời gian ba tuần. Cá chết đầu tiên từ mỗi bể kính được nghiên cứu vi khuẩn học để khẳng định vi khuẩn gây bệnh gây chết cá. Kết thúc thử nghiệm, tất cả các con cá còn sống được đánh giá dấu hiệu nhiễm bệnh bên ngoài và ngoài ra tiến hành mổ và nghiên cứu vi khuẩn 6 cá mỗi nhóm thức ăn.

Kết quả: Mức hấp thu thức ăn chăn nuôi là bình thường và cá phát triển từ 1 đến khoảng 8g trong thử nghiệm.

Các kết quả cho thấy rằng một mình alpha-pinen không có tác dụng nhưng hỗn hợp alpha-pinen + xinnamaldehyt có tác dụng tích cực trong việc làm giảm tỷ lệ chết 15% so với nhóm xử lý đối chứng. Các kết quả tỷ lệ chết cộng dồn được thể hiện trong bảng 5:

Bảng 5: Giá trị trung bình $\pm$ SD của tỷ lệ chết cộng dồn theo hỗn hợp tinh dầu

Ngày sau khi lây nhiễm	Đối chứng		Alpha-pinen (4000ppm)		Alpha-pinen + xinnamaldehyt (mỗi chất 2000ppm)	
	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	1	2
6	4,1	5,9	5,0	3,8	2,0	2,3
7	16,2	9,9	21,1	14,3	11,0	3,8
8	25,3	8,6	37,3	11,2	22,0	5,2
9	28,3	10,0	40,3	9,5	24,0	5,7
10	30,4	12,3	41,4	8,6	25,0	6,8
11	33,4	13,5	43,4	9,1	27,0	3,8
12	33,4	13,5	43,4	9,1	27,0	3,8
13	34,4	12,7	43,4	9,1	28,0	3,3
14	34,4	12,7	43,4	9,1	29,0	3,8

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi dùng cho cá chứa alpha-pinen và xinnamaldehyt làm các thành phần chính.
2. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo điểm 1, trong đó chế phẩm này là chất chiết tự nhiên chứa alpha-pinen và xinnamaldehyt làm các thành phần chính.
3. Chế phẩm trộn sẵn dùng cho cá chứa alpha-pinen và xinnamaldehyt làm các thành phần chính.
4. Chế phẩm trộn sẵn theo điểm 3, trong đó chế phẩm này là chất chiết tự nhiên chứa alpha-pinen và xinnamaldehyt làm các thành phần chính.
5. Chất phụ gia bổ sung vào thức ăn chăn nuôi dùng cho cá chứa alpha-pinen và xinnamaldehyt làm các thành phần chính.
6. Chất phụ gia theo điểm 5, trong đó chế phẩm này là chất chiết tự nhiên chứa alpha-pinen và xinnamaldehyt làm các thành phần chính.