



(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)



1-0035960

(51)⁷ A23K 1/18; C12N 1/20; A61K 35/74;
A23K 1/00

(13) B

(21) 1-2014-03316

(22) 12/04/2013

(86) PCT/US2013/036457 12/04/2013

(87) WO/2013/155468 17/10/2013

(30) 61/623,512 12/04/2012 US; 61/745,324 21/12/2012 US

(45) 26/06/2023 423

(43) 25/06/2015 327A

(73) DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (DK)

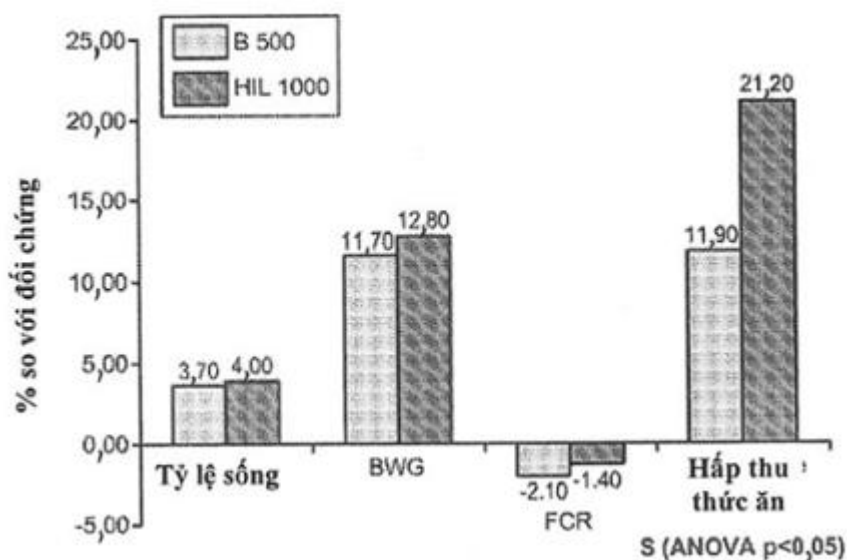
Langebrogade 1 P.O. Box 17, DK-1011 Copenhagen K, Denmark

(72) FROUEL, Stephane (FR); KROMM, Christopher (US).

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

(54) CHẾ PHẨM VÀ PHỤ GIA THỨC ĂN CHĂN NUÔI CHỨA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT

(57) Sáng chế đề cập đến các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* và phương pháp hữu ích để cải thiện đặc tính của động vật thủy sinh. Sáng chế cũng đề cập đến các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* và phương pháp hữu ích để ức chế hoặc làm chậm sự sinh trưởng của tác nhân gây bệnh trong động vật thủy sinh.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực nuôi trồng thủy sản. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* mang lại lợi ích cho các động vật thủy sinh và phương pháp sử dụng các chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nghề nuôi trồng thủy sản là hệ thống sản xuất ngày càng phổ biến để cung cấp cá và các loài giáp xác cho thức ăn của người. Nghề nuôi tôm đã trở thành công nghiệp toàn cầu với giá trị bán lẻ hằng năm hàng tỷ đô la. Tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) là một trong số các loài thủy sản chính trên thế giới. Người nuôi tôm ngày càng quan tâm đến các giải pháp mà có thể cải thiện chất lượng nước, năng suất và tỷ lệ sống.

Ngoài ra, các bệnh do các tác nhân gây bệnh như virus gây hội chứng đốm trắng (White Spot Syndrome virus: WSSV) và loài *Vibrio* liên tục gây thiệt hại cho công nghiệp nuôi tôm ở các vùng thuộc châu Á và Nam Mỹ. Các thiệt hại này làm tiêu tốn hàng tỷ đô la và làm giảm sản lượng. Do vấn đề an toàn thực phẩm và môi trường, việc sử dụng chất kháng sinh ngày càng giảm trong nghề nuôi tôm.

Do đó, trong nghề nuôi trồng thủy sản rất cần có các giải pháp không dùng chất kháng sinh để cải thiện chất lượng nước, năng suất, tỷ lệ sống và sức chống chịu tác nhân gây bệnh ở động vật thủy sinh. Vì vậy, cần có các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* mang lại lợi ích cho các động vật thủy sinh và phương pháp sử dụng các chủng này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* được phân lập, chế phẩm chứa các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* này, phương pháp sử dụng các chủng này cho động vật, chế phẩm thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho động vật, và phương pháp sản xuất các chủng này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều chủng *Bacillus* được phân lập được chọn từ nhóm bao gồm *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. brevis*, *B. alkalophilus*, *B. clausii*, *B.*

halodurans, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis* và *B. lentus*. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều chủng *Lactobacillus* được phân lập được chọn từ nhóm bao gồm *L. helveticus*, *L. amylovorus*, *L. curvatus*, *L. cellobiosus*, *L. amylolyticus*, *L. alimentarius*, *L. aviaries*, *L. crispatus*, *L. curvatus*, *L. gallinarum*, *L. hilgardii*, *L. johnsonii*, *L. kefiranoaecium*, *L. kefiri*, *L. mucosae*, *L. panis*, *L. pentosus*, *L. pontis*, *L. zaeae*, *L. sanfranciscensis*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. buchnerii*, *L. farciminis*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. sakei* và *L. salviarium*.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều chủng được phân lập được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus pumilis* 3064, *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507), *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus pumilis* 119 (NRRL B-50796), *Bacillus subtilis* 3A-P4 (ATCC PTA-6506), *Bacillus subtilis* 22C-P1 (ATCC PTA-6508), *Bacillus licheniformis* 842 (NRRL B-50516), *Bacillus subtilis* BS27 (NRRL B-50105), *Bacillus licheniformis* BL21 (NRRL B-50134), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 (NRRL B-50543), và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544), *Lactobacillus farcimins* CNCM-I-3699, và *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698, và các chủng có tất cả các đặc tính của chúng, dẫn xuất hoặc biến thể bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa một hoặc nhiều chủng được phân lập được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus pumilis* 3064, *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507), *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus pumilis* 119 (NRRL B-50796), *Bacillus subtilis* 3A-P4 (ATCC PTA-6506), *Bacillus subtilis* 22C-P1 (ATCC PTA-6508), *Bacillus licheniformis* 842 (NRRL B-50516), *Bacillus subtilis* BS27 (NRRL B-50105), *Bacillus licheniformis* BL21 (NRRL B-50134), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 (NRRL B-50543), và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544), *Lactobacillus farcimins* CNCM-I-3699, và *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698, và

các chủng có tất cả các đặc tính của chúng, dẫn xuất hoặc biến thể bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chủng *Bacillus pumilis* 3064, chủng *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), và chủng *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507). Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chủng *Bacillus pumilis* 119 (NRRL B-50796), chủng *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), và chủng *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507). Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chủng *Bacillus subtilis* 1013 (NRRL B-50509), chủng *Bacillus subtilis* BS918 (NRRL B-50508), và chủng *Bacillus subtilis* BS3BP5 (ATCC PTA-50510). Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chủng *Bacillus licheniformis* 842 (NRRL B-50516), chủng *Bacillus subtilis* BS27 (NRRL B-50105), và chủng *Bacillus licheniformis* BL21 (ATCC PTA-50134). Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chủng *Bacillus subtilis* 3A-P4 (ATCC PTA-6506), chủng *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507), và chủng *Bacillus subtilis* 22C-P1 (ATCC PTA-6508).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm việc cho động vật sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa một hoặc nhiều chủng được phân lập được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus pumilis* 3064, *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507), *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus pumilis* 119 (NRRL B-50796), *Bacillus subtilis* 3A-P4 (ATCC PTA-6506), *Bacillus subtilis* 22C-P1 (ATCC PTA-6508), *Bacillus licheniformis* 842 (NRRL B-50516), *Bacillus subtilis* BS27 (NRRL B-50105), *Bacillus licheniformis* BL21 (NRRL B-50134), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 (NRRL B-50543), và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544), *Lactobacillus farcimins* CNCM-I-3699, và *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698, và các chủng có tất cả các đặc tính của chúng, dẫn xuất hoặc biến thể bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc cho động vật sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa chủng *Bacillus pumilis* 3064, chủng *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), và chủng *Bacillus subtilis* BS15

Ap4 (ATCC PTA-6507). Theo một số phương án, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc cho động vật sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa chủng *Bacillus pumilis* 119 (NRRL B-50796), chủng *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), và chủng *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507). Theo một số phương án, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc cho động vật sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa chủng *Bacillus subtilis* 1013 (NRRL B-50509), chủng *Bacillus subtilis* BS918 (NRRL B-50508), và chủng *Bacillus subtilis* BS3BP5 (ATCC PTA-50510). Theo một số phương án, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc cho động vật sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa chủng *Bacillus licheniformis* 842 (NRRL B-50516), chủng *Bacillus subtilis* BS27 (NRRL B-50105), và chủng *Bacillus licheniformis* BL21 (ATCC PTA-50134). Theo một số phương án, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc cho động vật sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa chủng *Bacillus subtilis* 3A-P4 (ATCC PTA-6506), chủng *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507), và chủng *Bacillus subtilis* 22C-P1 (ATCC PTA-6508).

Theo phương án bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này, sau khi cho động vật sử dụng, chủng tạo ra ít nhất một lợi ích trong hoặc cho động vật này so với động vật không được sử dụng chủng này: (a) tăng tỷ lệ sống, (b) tăng trọng (tăng một trong hai hoặc cả trọng lượng hằng ngày trung bình lẫn tổng trọng lượng), (c) tăng hấp thu thức ăn, (d) tăng chiều dài, (e) tăng chuyển hóa thức ăn, (f) tăng chiều dài và/hoặc mật độ lông nhung, (g) tăng chống chịu độ mặn thấp, (h) tăng chống chịu độ mặn cao, (i) tăng chống chịu nhiệt độ cao, (j) tăng chống chịu nhiệt độ thấp, (k) tăng chống chịu formalin, (l) tăng tỷ lệ sống khi đáp lại tác nhân gây bệnh, hoặc (m) tỷ lệ chết. Sáng chế tạo ra các lợi ích chống stress và sự nhiễm tác nhân gây bệnh ở động vật. Theo một số phương án, sáng chế làm tăng tỷ lệ sống chống tác nhân gây bệnh, ví dụ, virus gây hội chứng đốm trắng hoặc loài *Vibrio* (ví dụ, *Vibrio harveyi*). Theo các phương án khác, sáng chế làm tăng chống chịu nhiệt độ cao hoặc thấp, hoặc độ mặn cao hoặc thấp. Theo một số phương án, động vật được tiếp xúc với nhiệt độ cao hoặc thấp, độ mặn cao hoặc thấp, virus gây hội chứng đốm trắng hoặc loài *Vibrio*.

Theo phương án bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này, động vật là tôm. Theo một số phương án, tôm này là tôm ấu trùng, ấu trùng muộn hoặc chưa trưởng thành. Tôm được sử dụng theo các phương án được mô tả trong bản mô tả này bao gồm tất cả các

giống và loài tôm, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Litopenaeus*, *Farfantepenaeus*, và *Penaeus*. *Penaeus* spp. bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Penaeus stylirostris*, *Penaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Penaeus chinensis*, *Penaeus occidentalis*, *Penaeus californiensis*, *Penaeus semisulcatus*, *Penaeus monodon*, *Penaeus esculentu*, *Penaeus setiferus*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum*, *Penaeus indicus* và *Penaeus merguensis*. Theo phương án cụ thể, tôm là *Penaeus vannamei*.

Theo một số phương án, khi chủng được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng cho động vật, chủng này cải thiện ít nhất một trong số các lợi ích được mô tả trong bản mô tả này ít nhất 2% so với đối chứng không được xử lý. Chủng được đề xuất có thể được sử dụng ở nồng độ bất kỳ hữu hiệu để cải thiện ít nhất một trong số các lợi ích được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, (các) chủng này được sử dụng ở khoảng 1×10^5 đến 1×10^{11} CFU/động vật/ngày.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho động vật, chứa một hoặc nhiều chủng được phân lập được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus pumilis* 3064, *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507), *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus pumilis* 119 (NRRL B-50796), *Bacillus subtilis* 3A-P4 (ATCC PTA-6506), *Bacillus subtilis* 22C-P1 (ATCC PTA-6508), *Bacillus licheniformis* 842 (NRRL B-50516), *Bacillus subtilis* BS27 (NRRL B-50105), *Bacillus licheniformis* BL21 (NRRL B-50134), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 (NRRL B-50543), and *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544), *Lactobacillus farcimins* CNCM-I-3699, and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698, và các chủng có tất cả các đặc tính của chúng, dẫn xuất hoặc biến thể bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho động vật chứa chủng *Bacillus pumilis* 3064, chủng *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), và chủng *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho động vật chứa chủng *Bacillus pumilis* 119 (NRRL B-50796), chủng *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), và chủng *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho động vật chứa chủng

Bacillus subtilis 1013 (NRRL B-50509), chủng *Bacillus subtilis* BS918 (NRRL B-50508), và chủng *Bacillus subtilis* BS3BP5 (ATCC PTA-50510). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho động vật chứa chủng *Bacillus licheniformis* 842 (NRRL B-50516), chủng *Bacillus subtilis* BS27 (NRRL B-50105), và chủng *Bacillus licheniformis* BL21 (ATCC PTA-50134). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho động vật chứa chủng *Bacillus subtilis* 3A-P4 (ATCC PTA-6506), chủng *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507), và chủng *Bacillus subtilis* 22C-P1 (ATCC PTA-6508). Theo một số phương án, một hoặc nhiều chủng được mô tả trong bản mô tả này được bổ sung vào chế phẩm thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho động vật với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 2000 gam/tấn thức ăn. Theo một số phương án, một hoặc nhiều chủng được mô tả trong bản mô tả này được bổ sung vào chế phẩm thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho động vật với lượng 50, 100, 250, 500, hoặc 1000 gam/tấn thức ăn.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất một hoặc nhiều chủng được phân lập được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus pumilis* 3064, *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013), *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (ATCC PTA-6507), *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus pumilis* 119 (NRRL B-50796), *Bacillus subtilis* 3A-P4 (ATCC PTA-6506), *Bacillus subtilis* 22C-P1 (ATCC PTA-6508), *Bacillus licheniformis* 842 (NRRL B-50516), *Bacillus subtilis* BS27 (NRRL B-50105), *Bacillus licheniformis* BL21 (NRRL B-50134), *Bacillus pumilis* AGTP BS 1068 (NRRL B-50543), và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544), *Lactobacillus farcimins* CNCM-I-3699, và *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698, và các chủng có tất cả các đặc tính của chúng, dẫn xuất hoặc biến thể bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng, bao gồm các bước: (a) cho sinh trưởng trong môi trường canh lỏng, giống bao gồm một hoặc nhiều chủng; và (b) tách một hoặc nhiều chủng ra khỏi môi trường canh lỏng. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước làm khô ở nhiệt độ thấp chủng được phân lập và thêm chủng đã được làm khô ở nhiệt độ thấp này vào vật mang. Theo các phương án khác, phương pháp này còn bao gồm bước giữ lại môi trường canh lỏng sau khi chủng đã được tách ra khỏi nó để tạo ra dịch nổi.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ thể hiện các giai đoạn phát triển ở tôm từ các giai đoạn ấu trùng, ấu trùng muộn và chưa trưởng thành.

Fig. 2A là đồ thị thể hiện tỷ lệ sống, tăng trọng (body weight gain: BWG), chiều dài, và đáp ứng hấp thu thức ăn ở tôm ấu trùng muộn để đáp lại việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* và *Lactobacillus*.

Fig. 2B là ảnh chụp tôm ấu trùng muộn thể hiện kích thước của tôm để đáp lại việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* và *Lactobacillus*.

Fig. 3 là đồ thị thể hiện tỷ lệ sống, tăng trọng, tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (feed conversion ratio: FCR), và đáp ứng hấp thu thức ăn ở tôm chưa trưởng thành để đáp lại việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* và *Lactobacillus*.

Fig. 4 là ảnh chụp thể hiện lịch sử của lông nhung ở tôm đã được sử dụng chế phẩm *Bacillus* và *Lactobacillus*, so với đối chứng không được xử lý bằng một trong hai chế phẩm này.

Fig. 5 là đồ thị thể hiện nồng độ *Vibrio* trong ruột của tôm đã được sử dụng chế phẩm *Bacillus* và *Lactobacillus*, so với đối chứng không được xử lý bằng một trong hai chế phẩm này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi giải thích các phương án theo sáng chế một cách chi tiết, cần phải hiểu rằng.

Theo sáng chế, có thể sử dụng sinh học phân tử và vi sinh vật học thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật này được mô tả đầy đủ trong tài liệu chuyên ngành. Ví dụ, xem: Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Các giới hạn số trong bản mô tả này là xấp xỉ, và do đó có thể bao gồm các trị số nằm ngoài giới hạn này trừ khi có quy định khác. Các giới hạn số bao gồm tất cả các trị số nằm giữa và bao gồm cả trị số dưới và trị số trên, với số gia là một đơn vị, với điều kiện có cách biệt ít nhất hai đơn vị giữa trị số dưới bất kỳ và trị số trên bất kỳ. Ví dụ, nếu giới hạn được viện dẫn nằm trong khoảng từ 100 đến 1000, thì dự tính rằng tất cả các trị số riêng rẽ, như 100, 101, 102, v.v., và các giới hạn nhỏ, như 100 đến 144, 155 đến 170, 197 đến 200, v.v., đều đếm được một cách rõ ràng. Đối với các giới hạn chứa các trị số

nhỏ hơn một hoặc chứa các phân số lớn hơn một (ví dụ, 1,1, 1,5, v.v.), một đơn vị được coi là 0,0001, 0,001, 0,01 hoặc 0,1, nếu thích hợp. Đối với các giới hạn chứa các chữ số duy nhất nhỏ hơn mười (ví dụ, 1 đến 5), một đơn vị thường được coi là 0,1. Đây chỉ các ví dụ được dự tính cụ thể, và tất cả các tổ hợp có thể có của các trị số nằm giữa trị số thấp nhất và trị số cao nhất đếm được, sẽ được coi là được nêu rõ trong bản mô tả này. Các giới hạn số được nêu trong bản mô tả này để chỉ, ngoài các thứ khác, các lượng tương đối của các thành phần trong hỗn hợp, và các giới hạn nhiệt độ và các thông số khác viện dẫn trong các phương pháp.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng một số chủng vi sinh vật là hữu ích để cải thiện đặc tính ở động vật thủy sinh. Ngoài ra, Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng một số chủng vi sinh vật là hữu ích để ức chế hoặc làm chậm sự sinh trưởng của các tác nhân gây bệnh hoặc gia tăng tính chống chịu tác động ở động vật thủy sinh.

Được mô tả trong bản mô tả này là các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* có tác dụng tích cực đối với sức khỏe của động vật thủy sinh. Các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* mà hữu ích ở động vật thủy sinh sẽ được mô tả. Ví dụ này không nhằm giới hạn sáng chế đối với các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* chỉ sử dụng được ở động vật thủy sinh.

Theo một phương án, các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* là hữu ích để cải thiện đặc tính của động vật thủy sinh. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "đặc tính" chỉ một hoặc nhiều thông số sau ở động vật thủy sinh, như tôm: (a) tăng tỷ lệ sống, (b) tăng trọng (tăng một trong hai hoặc cả trọng lượng hằng ngày trung bình lẫn tổng trọng lượng), (c) tăng hấp thu thức ăn, (d) tăng chiều dài, (e) chuyển hóa thức ăn, bao gồm cả tỷ lệ thức ăn:mức tăng trọng lẫn tỷ lệ mức tăng trọng:thức ăn, (f) tăng chiều dài và/hoặc mật độ lông nhung, (g) tăng chống chịu độ mặn thấp, (h) tăng chống chịu độ mặn cao, (i) tăng chống chịu nhiệt độ cao, (j) tăng chống chịu nhiệt độ thấp, (k) tăng chống chịu formalin, (l) tăng tỷ lệ sống khi đáp lại tác nhân gây bệnh, như WSSV hoặc loài *Vibrio*, (m) tỷ lệ chết, và các số đo khác đã biết trong lĩnh vực này.

"Sự cải thiện về đặc tính" hoặc "đặc tính được cải thiện" như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là sự cải thiện ở ít nhất một trong số các thông số nêu trong định nghĩa về đặc tính. Đặc tính được cải thiện được đo theo động vật đối chứng. Động vật đối chứng được mô tả trong bản mô tả này là động vật (ví dụ, tôm) chưa được sử dụng chế phẩm *Bacillus* và/hoặc *Lactobacillus*.

Sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* cho động vật thủy sinh, như tôm. Theo một phương án, phương pháp này cải thiện đặc tính của động vật thủy sinh. Do đó, có thể mang lại lợi ích cho nhà nuôi trồng thủy sản nếu sử dụng theo cách thông thường các chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*, riêng rẽ hoặc kết hợp với các chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* khác, không chỉ để xử lý và ngăn ngừa bệnh mà còn để cải thiện đặc tính.

Theo phương án khác, việc sử dụng một hoặc nhiều chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* ức chế hoặc làm chậm sự sinh trưởng của tác nhân gây bệnh. Ví dụ, việc sử dụng một hoặc nhiều chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* ức chế hoặc làm chậm sự sinh trưởng của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV) hoặc loài *Vibrio*. Phương pháp này cũng có thể được sử dụng để làm giảm hoặc ngăn ngừa bệnh liên quan đến WSSV hoặc loài *Vibrio* ở các động vật thủy sinh hiện không bị nhiễm các tác nhân gây bệnh này. Bằng cách ức chế hoặc làm chậm sự sinh trưởng của tác nhân gây bệnh, động vật thủy sinh được mô tả trong bản mô tả này sẽ có tỷ lệ sống được cải thiện khi tiếp xúc với tác nhân gây bệnh, hoặc có đặc tính được cải thiện như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo phương án khác, việc sử dụng một hoặc nhiều chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* cho phép động vật thủy sinh gia tăng tính chống chịu tác động. Ví dụ, việc sử dụng một hoặc nhiều chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* cho phép động vật thủy sinh gia tăng tính chống chịu độ mặn cao hoặc thấp, nhiệt độ cao hoặc thấp, formalin cao hoặc thấp. Bằng cách gia tăng tính chống chịu tác động, động vật thủy sinh được mô tả trong bản mô tả này sẽ có tỷ lệ sống được cải thiện khi tiếp xúc với yếu tố tác động, hoặc có đặc tính được cải thiện như được mô tả trong bản mô tả này.

Phương pháp sử dụng một hoặc nhiều chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* cho động vật thủy sinh cũng được đề xuất. phương pháp này có thể bao gồm việc cấp một hoặc nhiều chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* cho động vật thủy sinh như tôm. (Các) chủng có thể được cấp trong giai đoạn ấu trùng, giai đoạn ấu trùng muộn, giai đoạn chưa trưởng thành, hoặc giai đoạn sinh trưởng khác bất kỳ của động vật này.

Cụ thể, các chủng *Bacillus* có nhiều đặc tính khiến cho chúng trở nên hữu ích cho các chế phẩm mà động vật tiêu hóa được. Ví dụ, các chủng *Bacillus* tạo ra các enzym ngoại bào, như proteaza, amylaza và cellulaza. Ngoài ra, các chủng *Bacillus* tạo ra các yếu tố kháng vi sinh vật, như gramixidin, subtilin, bacitracin và polymyxin. Hơn thế nữa, các chủng *Bacillus* là các chủng tạo bào tử do đó là thích hợp. Ngoài ra, một số loài

Bacillus có trạng thái GRAS, tức là chúng thường được coi là an toàn. *Bacillus* là loài tạo bào tử duy nhất được coi là GRAS.

Các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* được mô tả trong bản mô tả này ức chế hoặc làm chậm sự sinh trưởng của một hoặc nhiều tác nhân gây bệnh ở động vật thủy sinh. Ví dụ, các tác nhân gây bệnh thuộc phạm vi của sáng chế bao gồm các tác nhân khác nhau mà cụ thể là gây nhiễm cho các loài thủy sản nuôi trồng. Các tác nhân gây bệnh bao gồm các tác nhân gây bệnh là virus hoặc vi khuẩn cũng như các độc tố do tảo sản sinh ra, ví dụ, tảo đơn bào hai roi. Các tác nhân gây bệnh này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus gây hội chứng đốm trắng (White Spot Syndrome Virus: WSSv), virus gây hội chứng Taura (Taura Syndrome Virus: TSV), virus gây bệnh đầu vàng (Yellow Head Virus: YHV), các loài *Vibrio* (bao gồm *V. anguillarum* và *V. ordalii*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio harveyi*), tác nhân và virus gây bệnh hoại tử dưới vỏ và cơ quan tạo máu (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis: IHNV) và IHHNV, tác nhân gây hội chứng còi cọc-dị dạng (run-deformity syndrome: RDS) của *Penaeus vannamei*, virus kiểu Baculo, virus gây bệnh hoại tử tuyến tụy (Infectious Pancreatic Necrosis Virus: IPNV), *Hirame rhabdovirus* (HIRRV), virus gây bệnh vàng đuôi (Yellowtail Ascites Virus: YAV), virus gây bệnh hoại tử thần kinh ở cá háo sọc (Striped Jack Nervous Necrosis Virus: SJNNV), *Irido*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Serratia liquefaciens*, *Yersinia ruckeri* typ I, virus gây bệnh thiếu máu ở cá hồi (Infectious salmon anaemia: ISA), bệnh tuyến tụy (Pancreas Disease: PD), bệnh nhiễm trùng huyết xuất huyết do virus (Viral Hemorrhagic Septicemia: VHS), *Rennibacterium salmoninarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, các loài *Pasteurella* (bao gồm *P. piscicida*), các loài *Yersinia*, các loài *Streptococcus*, *Edwardsiella tarda* và *Edwardsiella ictaluria*; virus gây bệnh nhiễm trùng huyết xuất huyết do virus, bệnh hoại tử tuyến tụy lây nhiễm, virus huyết ở cá chép, virus gây bệnh ở cá nheo, virus gây bệnh xuất huyết ở cá chép cỏ, *nodaviridae* như virus gây bệnh hoại tử thần kinh, virus gây bệnh thiếu máu lây nhiễm ở cá hồi; và các ký sinh trùng *Ceratomyxa shasta*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Cryptobia salmositica*, *Lepeophtheirus salmonis*, loài *Tetrahymena*, loài *Trichodina* và loài *Epistylus*, độc tố của tảo đơn bào hai roi bao gồm độc tố gây tiêu chảy do ngộ độc tôm-cua (Dietary Shellfish Poisoning: DSP), liệt do ngộ độc tôm-cua (Paralytic Shellfish Poisoning: PSP), ngộ độc độc tố thần kinh (Neurotoxic Shellfish Poisoning: NSP) và *Ciguatera*, và nhiều loài khác, tất cả các loài này đều gây thiệt hại nghiêm trọng cho nghề nuôi trồng thủy sản.

Theo một phương án, các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* theo sáng chế ức chế hoặc làm chậm sự sinh trưởng của WSSv hoặc loài *Vibrio* ở động vật thủy sinh. Theo phương án khác, các chủng *Bacillus* và *Lactobacillus* theo sáng chế ức chế hoặc làm chậm sự sinh trưởng của WSSv hoặc *Vibrio harveyi* ở động vật thủy sinh. Nhiều chủng *Bacillus* có thể được kết hợp để kiểm soát các tác nhân gây bệnh khác nhau như các tác nhân gây bệnh nêu trên.

Các chủng *Bacillus* được phát hiện là hữu ích cho các ứng dụng được mô tả trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chủng *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. brevis*, *B. alkalophilus*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis* và *B. lentus*. Theo ít nhất một số phương án, (các) chủng *Bacillus* là *Bacillus pumilis* 3064, *Bacillus subtilis* BS 2084, *Bacillus subtilis* BS15 Ap4, *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *Bacillus pumilis* 119, *Bacillus subtilis* 3A-P4, *Bacillus subtilis* 22C-P1, *Bacillus licheniformis* 842, *Bacillus subtilis* BS27, *Bacillus licheniformis* BL21, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069. Theo ít nhất một số phương án, chủng *B. pumilus* là *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068. Theo một phương án, các chủng *Bacillus* được sử dụng theo sáng chế là tổ hợp của *Bacillus pumilis* 3064, *Bacillus subtilis* BS 2084 và *Bacillus subtilis* BS15 Ap4. Theo phương án khác, các chủng *Bacillus* được sử dụng theo sáng chế là tổ hợp của *Bacillus pumilis* 119, *Bacillus subtilis* BS 2084 và *Bacillus subtilis* BS15 Ap4. Theo phương án khác, các chủng *Bacillus* được sử dụng theo sáng chế là tổ hợp của *Bacillus subtilis* BS1013, *Bacillus subtilis* BS918 và *Bacillus subtilis* BS3BP5. Theo phương án khác, các chủng *Bacillus* được sử dụng theo sáng chế là tổ hợp của *Bacillus subtilis* 3A-P4, *Bacillus subtilis* 15A-P4 và *Bacillus subtilis* 22C-P1. Theo phương án khác, các chủng *Bacillus* được sử dụng theo sáng chế là tổ hợp của *Bacillus licheniformis* 842, *Bacillus subtilis* BS27 và *Bacillus licheniformis* BL21.

Các chủng này được lưu giữ bởi Danisco USA, Inc. of Waukesha, Wisconsin at the Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Ill., 61604. Ngày lưu giữ ban đầu và số hiệu lưu giữ là như sau: *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, 13-5-2011 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442, 4-8-2011 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521, 4-8-2011 (NRRL B-50545),

Bacillus subtilis AGTP BS918, 13-5-2011 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, 13-5-2011 (NRRL B-50509), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068, 4-8-2011 (NRRL B-50543), và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, 4-8-2011 (NRRL B-50544). *Bacillus subtilis* BS 2084 (NRRL B-50013) được lưu giữ vào ngày 8-3-2007 tại Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Ill., 61604. Tất cả các chủng lưu giữ này đều được tạo ra theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest (Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure).

Các chủng sau được lưu giữ bởi Agtech Products, Inc. of Waukesha, Wisconsin at American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110. Ngày lưu giữ ban đầu và số hiệu lưu giữ là như sau: *Bacillus subtilis* 3A-P4, 12-01-2005 (ATCC PTA 6506), *Bacillus subtilis* BS15-AP4, 12-01-2005 (ATCC PTA-6507), *Bacillus subtilis* 22C-P1, 12-01-2005 (ATCC PTA-6508).

Bacillus licheniformis 842 được lưu giữ bởi Danisco USA of Waukesha, Wisconsin at Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) on May 20, 2011 (NRRL B-50516). *Bacillus subtilis* BS27 được lưu giữ bởi AgTech Inc. of Waukesha, Wisconsin at Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) vào ngày 24-01-2008 (NRRL B-50105). *Bacillus licheniformis* BL21 được lưu giữ bởi AgTech Products, Inc. of Waukesha, Wisconsin at Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) vào ngày 15-04-2008 (NRRL B-50134). *Bacillus pumilus* BP119 được lưu giữ bởi DuPont Nutrition Biosciences ApS of Copenhagen, Denmark at Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) vào ngày 18-12-2012 (NRRL B-50796) và cũng có bán trên thị trường từ hãng Genesis Biosciences (Lawrenceville, GA).

Dẫn xuất hoặc biến thể *Bacillus* bất kỳ cũng thuộc phạm vi của sáng chế và là hữu ích trong các phương pháp được mô tả và yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, các chủng có tất cả các đặc tính của *Bacillus pumilus* 3064, *Bacillus subtilis* BS 2084, *Bacillus subtilis* BS15 Ap4, *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *Bacillus pumilus* 119, *Bacillus subtilis* 3A-P4, *Bacillus subtilis* 22C-P1, *Bacillus licheniformis* 842, *Bacillus subtilis* BS27, *Bacillus licheniformis* BL21, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 cũng thuộc

phạm vi của sáng chế và là hữu ích trong các phương pháp được mô tả và yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, any derivative or variant of *Bacillus pumilis* 3064, *Bacillus subtilis* BS 2084, *Bacillus subtilis* BS15 Ap4, *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *Bacillus pumilis* 119, *Bacillus subtilis* 3A-P4, *Bacillus subtilis* 22C-P1, *Bacillus licheniformis* 842, *Bacillus subtilis* BS27, *Bacillus licheniformis* BL21, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068, and *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 cũng đều được bao gồm và hữu ích trong các phương pháp được mô tả và yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này.

Profin di truyền của các chủng *Bacillus pumilus* 3064 và *Bacillus pumilis* 119 (NRRL B-50796) được so sánh bằng cách sử dụng phép phân tích mô hình RAPD chuẩn và phương pháp Sanger xác định trình tự đích đa năng Chaperonin-60 (*cpn60*) và ADN_r 16S. Trên cơ sở mô hình băng RAPD và phân tích trình tự *cpn60* và ADN_r 16S gồm năm mẫu lặp lại, *Bacillus pumilus* 3064 và *Bacillus pumilis* 119 (NRRL B-50796) được xác định là tương đương nhau về mặt di truyền. Theo đó, như được sử dụng trong bản mô tả này, *Bacillus pumilus* 3064 và *Bacillus pumilis* 119 được sử dụng thay thế cho nhau.

Các chủng *Lactobacillus* được phát hiện là hữu ích cho các ứng dụng được mô tả trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chủng *L. helveticus*, *L. amylovorus*, *L. curvatus*, *L. cellobiosus*, *L. amylolyticus*, *L. alimentarius*, *L. aviaries*, *L. crispatus*, *L. curvatus*, *L. gallinarum*, *L. hilgardii*, *L. johnsonii*, *L. kefiranoferium*, *L. kefir*, *L. mucosae*, *L. panis*, *L. pentosus*, *L. pontis*, *L. zeae*, *L. sanfranciscensis*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. buchnerii*, *L. farciminis*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. sakei* hoặc *L. salvarium*. Theo ít nhất một số phương án, các chủng *Lactobacillus* là *Lactobacillus farciminis* CNCM-I-3699, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698, hoặc tổ hợp của chúng. Cả *Lactobacillus farciminis* CNCM-I-3699 lẫn *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698 đều được lưu giữ tại National Micro-organism Collection of Pasteur Institute (CNCM, Paris).

Dẫn xuất hoặc biến thể *Lactobacillus* bất kỳ cũng đều được bao gồm và hữu ích trong các phương pháp được mô tả và yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, các chủng có tất cả các đặc tính của *Lactobacillus farciminis* CNCM-I-3699

hoặc *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698 cũng đều được bao gồm và hữu ích trong các phương pháp được mô tả và yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, dẫn xuất hoặc biến thể bất kỳ của *Lactobacillus farcimins* CNCM-I-3699 hoặc *Lactobacillus rhamnosus* CNCM-I-3698 cũng đều được bao gồm và hữu ích trong các phương pháp được mô tả và yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "biến thể" có ít nhất 80% tương đồng trình tự di truyền với các chủng được bộc lộ bằng cách sử dụng phép phân tích phản ứng chuỗi nhờ polymeraza đối với ADN đa hình được khuếch đại ngẫu nhiên (random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction: RAPD-PCR). Mức tương đồng của các trình tự di truyền có thể thay đổi. Theo một số phương án, biến thể có ít nhất 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng trình tự di truyền với các chủng được bộc lộ bằng cách sử dụng phép phân tích RAPD-PCR. Sáu đoạn môi có thể được sử dụng cho phép phân tích RAPD-PCR bao gồm: Đoạn môi 1 (5'-GGTGCGGGAA-3') (SEQ ID NO:1), Đoạn môi 2 (5'-GTTTCGCTCC-3') (SEQ ID NO:2), Đoạn môi 3 (5'-GTAGACCCGT-3') (SEQ ID NO:3), Đoạn môi 4 (5'-AAGAGCCCGT-3') (SEQ ID NO:4), Đoạn môi 5 (5'-AACGCGCAAC-3') (SEQ ID NO: 5), Đoạn môi 6 (5'-CCCGTCAGCA-3') (SEQ ID NO: 6). Phép phân tích RAPD có thể được thực hiện bằng cách sử dụng Ready-to-GoTM RAPD Analysis Beads (Amersham Biosciences, Sweden), được thiết kế dưới dạng các hỗn hợp phản ứng trộn sẵn, phân tán sẵn cho phép phân tích RAPD.

Sản xuất và sử dụng vi sinh vật được cấp trực tiếp

Để sản xuất DFM được mô tả trong bản mô tả này, các chủng có thể được sinh trưởng trong canh trường dinh dưỡng lỏng. Đối với các chủng *Bacillus*, sự sinh trưởng tốt hơn là đạt đến mức mà ở đó tạo ra số lượng bào tử cao nhất. Theo một phương án, các chủng được sinh trưởng đến mật độ quang (optical density: OD) mà ở đó sản lượng ít nhất là 10^7 – 10^9 đơn vị tạo khuẩn lạc (colony forming unit: CFU)/ml môi trường nuôi cấy. Các chủng theo sáng chế được sản xuất bằng cách lên men các chủng vi khuẩn. Quá trình lên men được bắt đầu bằng cách nhân giống. Việc này bao gồm các bước chuyển giống lặp lại và vô trùng thành thể tích ngày càng lớn đóng vai trò giống cấy cho quá trình lên men, được thực hiện trong các bình lên men lớn bằng thép không gỉ trong môi trường chứa protein, hydrat cacbon và chất khoáng cần cho sự sinh trưởng tối ưu. Môi trường

được lấy ví dụ là Trypticase Soy Broth. Sau khi thêm giống cấy vào bình lên men, kiểm soát nhiệt độ và việc khuấy để có mức sinh trưởng cực đại. Khi giống đạt đến mật độ quần thể cực đại, thu giống bằng cách tách tế bào ra khỏi môi trường lên men. Bước này thường được thực hiện bằng cách ly tâm. Dịch nổi có thể được sử dụng trong phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Tiếp theo, có thể xác định số lượng giống.

Theo ít nhất một số phương án, vi khuẩn được tạo viên. Theo ít nhất một số phương án, vi khuẩn được làm khô ở nhiệt độ thấp. Theo ít nhất một số phương án, vi khuẩn được trộn với chất mang. Tuy nhiên, không cần thiết phải làm khô ở nhiệt độ thấp các chủng trước khi sử dụng chúng. Các chủng có thể được sử dụng có hoặc không có chất bảo quản, và được cô, không được cô, hoặc ở dạng pha loãng.

Tiếp theo, có thể xác định số lượng giống. CFU (đơn vị tạo khuẩn lạc) là số lượng tế bào sống của mẫu thu được từ các phương pháp cấy vi sinh vật chuẩn. Thuật ngữ này bắt nguồn từ thực tế rằng tế bào đơn khi được cấy lên môi trường thích hợp sẽ sinh trưởng và trở thành khuẩn lạc sống trong môi trường thạch. Do nhiều tế bào có thể phát triển thành một khuẩn lạc sống nên thuật ngữ đơn vị tạo khuẩn lạc là số đo đơn vị hữu ích hơn so với số lượng tế bào.

Số lượng vi khuẩn là quan trọng khi được kết hợp với chất mang. Theo một phương án, trong thời gian sản xuất chế phẩm, số lượng này ít nhất là khoảng $1,0 \times 10^6$ – $1,0 \times 10^{12}$ CFU/g. Tuy nhiên, số lượng có thể tăng hoặc giảm so với các con số cơ bản này và vẫn có tác dụng đầy đủ. Ví dụ, số lượng trong thời gian sản xuất chế phẩm có thể ít nhất là khoảng $1,0 \times 10^3$, $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, $1,0 \times 10^9$, $1,0 \times 10^{10}$, $1,0 \times 10^{11}$, $1,0 \times 10^{12}$, $1,0 \times 10^{13}$, $1,0 \times 10^{14}$ hoặc $1,0 \times 10^{15}$ CFU/g.

Sáng chế đề xuất chế phẩm chứa một hoặc nhiều chủng được mô tả trong bản mô tả này. Chế phẩm này có thể được cấp cho động vật thủy sinh dưới dạng vi sinh vật được cấp trực tiếp (direct-fed microbial: DFM). Có thể thêm một hoặc nhiều chất mang hoặc các thành phần khác vào DFM. DFM có thể được sản xuất ở các dạng vật lý khác nhau, ví dụ, dưới dạng chế phẩm rải trên bề mặt, dưới dạng thể cô hòa tan trong nước để sử dụng dưới dạng thuốc lỏng thú y hoặc được thêm vào chế phẩm thay sữa, viên nang gelatin, hoặc gel. Theo một phương án về dạng chế phẩm rải trên bề mặt, sản phẩm lên men vi khuẩn axit lactic làm khô ở nhiệt độ thấp được thêm vào chất mang, như whey, maltodextrin, sucroza, dextroza, đá vôi (canxi cacbonat), cám gạo, giống nấm men, tinh bột sấy khô, và/hoặc natri silic aluminat. Theo một phương án về thể cô hòa tan trong

nước để sử dụng dưới dạng thuốc lỏng thú y hoặc chế phẩm bổ sung thay sữa, sản phẩm lên men vi khuẩn axit lactic làm khô ở nhiệt độ thấp được thêm vào chất mang hòa tan trong nước, như whey, maltodextrin, sucroza, dextroza, tinh bột sảy khô, natri silic aluminat, và chất lỏng được thêm vào để tạo ra thuốc thú y hoặc chế phẩm bổ sung được thêm vào sữa hoặc chế phẩm thay sữa. Theo một phương án về dạng viên nang gelatin, sản phẩm lên men vi khuẩn axit lactic làm khô ở nhiệt độ thấp được thêm vào chất mang, như whey, maltodextrin, đường, đá vôi (canxi cacbonat), cám gạo, giống nấm men tinh bột sảy khô, và/hoặc natri silic aluminat. Theo một phương án, vi khuẩn axit lactic và chất mang được bao trong viên nang gelatin phân hủy được. Theo một phương án về dạng gel, sản phẩm lên men vi khuẩn axit lactic làm khô ở nhiệt độ thấp được thêm vào chất mang, như dầu thực vật, sucroza, silic dioxit, polysorbate 80, propylen glycol, hydroxylanisol butyl hóa, axit xitric, etoxyquin, và/hoặc chất màu nhân tạo để tạo ra gel.

Tùy ý, (các) chủng có thể được trộn với chế phẩm phụ gia khô bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cơ chất sinh trưởng, enzym, đường, hydratcacbon, sản phẩm chiết và các thành phần vi lượng kích thích sinh trưởng. Đường có thể là: lactoza; maltoza; dextroza; malto-dextrin; glucoza; fructoza; manosa; tagatoza; sorboza; raffinosa và galactoza. Lượng đường nằm trong khoảng 50-95%, riêng rẽ hoặc kết hợp. Sản phẩm chiết có thể là nấm men hoặc chất hòa tan lên men nấm men sảy khô với lượng nằm trong khoảng 5-50%. Cơ chất sinh trưởng có thể là: trypticaza, nằm trong khoảng 5-25%; natri lactat, nằm trong khoảng 5-30%; và Tween 80, nằm trong khoảng 1-5%. Hydratcacbon có thể là manitol, sorbitol, adonitol và arabitol. Hydratcacbon nằm trong khoảng 5-50% riêng rẽ hoặc kết hợp. Các thành phần vi lượng có thể là: canxi cacbonat, nằm trong khoảng 0,5-5,0%; canxi clorua, nằm trong khoảng 0,5-5,0%; dikali phosphat, nằm trong khoảng 0,5-5,0%; canxi phosphat, nằm trong khoảng 0,5-5,0%; mangan proteinat, nằm trong khoảng 0,25-1,00%; và mangan, nằm trong khoảng 0,25-1,0%.

Giống và chất mang (khi được sử dụng) có thể được thêm vào máy trộn dạng dải hoặc cánh khuấy và trộn trong 15 phút, mặc dù thời gian có thể tăng hoặc giảm. Các thành phần được trộn sao cho tạo ra hỗn hợp đồng nhất gồm giống và chất mang. Thành phẩm tốt hơn là bột khô chảy được. Tiếp theo, thêm (các) chủng vào thức ăn động vật hoặc thức ăn trộn sẵn, thêm vào nước dùng cho động vật, hoặc sử dụng theo cách khác đã biết trong lĩnh vực này. Thức ăn dùng cho động vật có thể được thêm một hoặc nhiều

chúng được mô tả trong bản mô tả này hoặc với chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này.

Các chủng có thể được sử dụng với lượng hữu hiệu cho động vật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật thủy sinh. Động vật thủy sinh bao gồm động vật có xương sống, động vật không xương sống, động vật chân khớp, cá, động vật thân mềm, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tôm (ví dụ, tôm he, tôm nước mặn, tôm nước ngọt, v.v.), cua, hàu, sò, tôm pandan, cá xương sụn (ví dụ, cá vược, cá vược sọc, cá rô phi, cá da trơn, cá tráp, cá hồi Bắc Mỹ, cá vằn, red drum, salmonids, cá chép, cá nheo, đuôi vàng, v.v.), động vật giáp xác, v.v.. Tôm bao gồm tất cả các giống và các loài tôm, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Litopenaeus*, *Farfantepenaeus* và *Penaeus*. Loài *Penaeus* bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Penaeus stylirostris*, *Penaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Penaeus chinensis*, *Penaeus occidentalis*, *Penaeus californiensis*, *Penaeus semisulcatus*, *Penaeus monodon*, *Penaeus esculentu*, *Penaeus setiferus*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum*, *Penaeus indicus* và *Penaeus merguensis*, và các loài tôm *Penaeus* khác.

Các chế phẩm *Bacillus* và *Lactobacillus* được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng cho động vật thủy sinh ở giai đoạn sinh trưởng bất kỳ. Theo một số phương án, các chế phẩm này được sử dụng cho tôm trong giai đoạn sinh trưởng ấu trùng, ấu trùng muộn hoặc chưa trưởng thành. Ví dụ, xem Fig. 1.

Thuật ngữ "sử dụng" có nghĩa là hành động đưa ít nhất một chủng và/hoặc dịch nổi từ môi trường nuôi cấy của ít nhất một chủng được mô tả trong bản mô tả này vào động vật thủy sinh. Theo một số phương án, sử dụng ít nhất một chủng là sử dụng tới đường dạ dày-ruột của động vật. Sử dụng có thể là qua đường miệng. Cụ thể, việc sử dụng này có thể được thực hiện bằng cách bổ sung thức ăn dự tính cho động vật với ít nhất một chủng, tiếp theo thức ăn đã được bổ sung này được động vật tiêu hóa. Việc sử dụng cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ống thông dạ dày hoặc cách khác bất kỳ để đưa trực tiếp ít nhất một chủng vào đường dạ dày-ruột của động vật. Theo một số phương án, việc sử dụng một hoặc nhiều chủng cho động vật được thực hiện bằng phương pháp thích hợp bất kỳ, bao gồm việc thêm các chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* vào nước tiếp xúc với động vật hoặc nước mà động vật tiêu hóa, dưới dạng chế phẩm rải trên bề mặt, dưới dạng thể cô hòa tan trong nước để sử dụng dưới dạng thuốc lỏng thú y, viên nang gelatin hoặc gel. Các chủng *Bacillus* tốt hơn là được sử dụng dưới dạng bào tử.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" có nghĩa là lượng DFM và/hoặc dịch nổi đủ để cho phép cải thiện đặc tính của động vật, hoặc ức chế hoặc làm chậm sự sinh trưởng của tác nhân gây bệnh được mô tả trong bản mô tả này. Lượng cải thiện có thể được đo như được mô tả trong bản mô tả này hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này. Các lượng hữu hiệu này có thể được sử dụng cho động vật bằng cách cấp không hạn chế thức ăn chứa DFM. DFM cũng có thể được sử dụng trong một hoặc nhiều liều.

Theo ít nhất một số phương án, mức cải thiện ít nhất là 2% so với đối chứng không được xử lý. Theo một số phương án, mức cải thiện ít nhất là 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95%.

Lượng hữu hiệu có thể được sử dụng cho động vật trong một hoặc nhiều liều. Thuật ngữ "ít nhất một chủng" có nghĩa là chủng duy nhất nhưng cũng có nghĩa là hỗn hợp gồm ít nhất hai chủng vi khuẩn. Theo ít nhất một số phương án, nhiều hơn một trong số (các) chủng được mô tả trong bản mô tả này được kết hợp. Thuật ngữ "hỗn hợp gồm ít nhất hai chủng," có nghĩa là hỗn hợp gồm hai, ba, bốn, năm, sáu chủng hoặc nhiều hơn. Theo một số phương án, tỷ lệ các chủng trong hỗn hợp có thể thay đổi nằm trong khoảng từ 1% đến 99%. Theo một số phương án, tỷ lệ các chủng được sử dụng trong hỗn hợp ít nhất là 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95%. Các phương án khác về hỗn hợp các chủng nằm trong khoảng từ 25% đến 75%. Các phương án khác về hỗn hợp các chủng là khoảng 50% đối với mỗi chủng. Khi hỗn hợp chứa nhiều hơn hai chủng, các chủng có thể có mặt với tỷ lệ hầu như ngang bằng hoặc với tỷ lệ khác nhau.

Ví dụ, các chủng có thể được kết hợp theo tỷ lệ khác nhau để xác định tỷ lệ tốt nhất cải thiện đặc tính của động vật hoặc ức chế hoặc làm chậm sự sinh trưởng của tác nhân gây bệnh. Khi được sử dụng kết hợp, tỷ lệ các chủng được lấy làm ví dụ sau có thể được sử dụng: 1/3 mỗi một trong ba chủng khác nhau; 1/4 mỗi một trong bốn chủng khác nhau; 1/5 mỗi một trong năm chủng khác nhau; 40% chủng thứ nhất, 40% chủng thứ hai, và 20% chủng thứ ba; 50% chủng thứ nhất, 25% chủng thứ hai, và 25% chủng thứ ba; 70% chủng thứ nhất, 20% chủng thứ hai, và 10% chủng thứ ba. Các tổ hợp khác của các chủng cũng có thể được sử dụng. Ngoài ra, tổ hợp chứa hơn 50% CFU/gam có thể được sử dụng để tăng lượng vi sinh vật cấp cho động vật.

Theo một số phương án, khi vi khuẩn được thêm vào thức ăn động vật hoặc vào phụ gia thức ăn động vật, lượng được thêm vào ít nhất là nằm trong khoảng 10 – 20000 gam/tấn thức ăn. Tuy nhiên, số lượng có thể tăng hoặc giảm so với con số này và vẫn có tác dụng đầy đủ. Ví dụ, lượng vi khuẩn được thêm vào có thể là 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 10000, 15000 hoặc 20000 gam/tấn thức ăn. Theo cách khác, lượng này có thể là lượng bất kỳ nằm trong khoảng 50 – 20000 gam/tấn thức ăn.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* được thêm vào thức ăn động vật ở tỷ lệ ít nhất $1,0 \times 10^1$ CFU/động vật/ngày. Theo phương án khác, một hoặc nhiều chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* được thêm vào thức ăn động vật ở tỷ lệ ít nhất $1,0 \times 10^2$, $1,0 \times 10^3$, $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, $1,0 \times 10^9$, $1,0 \times 10^{10}$, $1,0 \times 10^{11}$, $1,0 \times 10^{12}$, $1,0 \times 10^{13}$, $1,0 \times 10^{14}$ hoặc $1,0 \times 10^{15}$ CFU/động vật/ngày.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* được thêm vào thức ăn động vật ở tỷ lệ ít nhất $1,0 \times 10^3$ CFU/gam thức ăn. Theo phương án khác, một hoặc nhiều chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* được thêm vào thức ăn động vật ở tỷ lệ ít nhất $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, $1,0 \times 10^9$, $1,0 \times 10^{10}$, $1,0 \times 10^{11}$, $1,0 \times 10^{12}$, $1,0 \times 10^{13}$, $1,0 \times 10^{14}$ hoặc $1,0 \times 10^{15}$ CFU/gam thức ăn. Theo phương án cụ thể, chủng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* được thêm vào thức ăn động vật ở tỷ lệ ít nhất 2×10^8 – 2×10^9 CFU/g.

DFM được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng, ví dụ, dưới dạng dung dịch nuôi cấy chứa chủng, dịch nổi sản xuất chủng, hoặc sản phẩm vi khuẩn của dung dịch nuôi cấy.

DFM có thể được sử dụng cho động vật bằng một hoặc nhiều cách. Ví dụ, (các) chủng có thể được sử dụng ở dạng rắn, có thể được phân bố trong tá dược, tốt hơn là nước, và cấp trực tiếp cho động vật, có thể được trộn cơ học với nguyên liệu thức ăn ở dạng khô, hoặc (các) chủng có thể được tạo ra trong dung dịch và sau đó phun lên nguyên liệu thức ăn. Phương pháp sử dụng (các) chủng cho động vật được coi là nằm trong giới hạn hiểu biết của chuyên gia trong lĩnh vực này.

Khi được sử dụng kết hợp với nguyên liệu thức ăn, nguyên liệu thức ăn có thể bao gồm ngô, thức ăn đậu tương, các sản phẩm phụ như bã hạt lọc sấy khô, vỏ trấu, canxi cacbonat, dầu khoáng, bột rong biển, đậu tương nghiền, cám, silic dioxit, canxi propionat, hoặc nguồn bổ sung vitamin/chất khoáng.

Thời gian sử dụng là không quan trọng miễn là sự cải thiện được thể hiện ở một hoặc nhiều đặc tính được mô tả trong bản mô tả này, như: (a) tăng tỷ lệ sống, (b) tăng trọng (tăng một trong hai hoặc cả trọng lượng hằng ngày trung bình lẫn tổng trọng lượng), (c) tăng hấp thu thức ăn, (d) tăng chiều dài, (e) tăng chuyển hóa thức ăn, (f) tăng chiều dài và/hoặc mật độ lông nhung, (g) tăng chống chịu độ mặn thấp, (h) tăng chống chịu độ mặn cao, (i) tăng chống chịu nhiệt độ cao, (j) tăng chống chịu nhiệt độ thấp, (k) tăng chống chịu formalin, (l) tăng tỷ lệ sống khi đáp lại tác nhân gây bệnh, hoặc (m) tỷ lệ chết. Việc sử dụng có thể là ở thời điểm bất kỳ có hoặc không có thức ăn. Tuy nhiên, chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* tốt hơn là được sử dụng với thức ăn hoặc ngay trước khi ăn.

Do đó, theo ít nhất một số phương án, lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng vi khuẩn được sử dụng cho động vật bằng cách bổ sung thức ăn dự tính cho động vật với lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng vi khuẩn. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "bổ sung" có nghĩa là hành động đưa trực tiếp lượng hữu hiệu của vi khuẩn được đề xuất trong bản mô tả này vào thức ăn dự tính cho động vật. Do đó, động vật, khi ăn, tiêu hóa vi khuẩn được đề xuất trong bản mô tả này.

Thức ăn cho động vật chứa ít nhất một chủng vi khuẩn được mô tả trong bản mô tả này.

Theo ít nhất một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm bước cho động vật thủy sinh sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*, một hoặc nhiều tổ hợp của chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*, một hoặc nhiều dịch nổi từ môi trường nuôi cấy chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*, thức ăn chứa một hoặc nhiều chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* hoặc hỗn hợp của chúng. Việc sử dụng này cải thiện một hoặc nhiều đặc tính được mô tả trong bản mô tả này, như: (a) tăng tỷ lệ sống, (b) tăng trọng (tăng một trong hai hoặc cả trọng lượng hằng ngày trung bình lẫn tổng trọng lượng), (c) tăng hấp thu thức ăn, (d) tăng chiều dài, (e) tăng chuyển hóa thức ăn, (f) tăng chiều dài và/hoặc mật độ lông nhung, (g) tăng chống chịu độ mặn thấp, (h) tăng chống chịu độ mặn cao, (i) tăng chống chịu nhiệt độ cao, (j) tăng chống chịu nhiệt độ thấp, (k) tăng chống chịu formalin, (l) tăng tỷ lệ sống khi đáp lại tác nhân gây bệnh, hoặc (m) tỷ lệ chết.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Tác dụng của *Bacillus* và *Lactobacillus* bất hoạt bằng nhiệt đối với đặc tính sinh trưởng của tôm trắng (*Penaeus vannamei*) giai đoạn ấu trùng muộn

Trong nghiên cứu này, trọng lượng ban đầu, trọng lượng cuối, mức tăng trọng hằng tuần, hấp thu thức ăn, tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR), chiều dài, tỷ lệ sống, tỷ lệ cơ ruột, màu gan tụy, dị dạng và mức độ uốn cong được đo. Tôm trắng *Litopenaeus vannamei* ở giai đoạn ấu trùng muộn được sử dụng. Năm lần lặp được thực hiện đối với mỗi mẫu xử lý nêu trong Bảng 1 bên dưới (Bac = *Bacillus*; HIL = Heat Inactivated *Lactobacillus*). Khoảng 300 con tôm/m² được duy trì trong bể kính dung tích 200 lít. Nước được duy trì ở 29°C với độ mặn 25 ppt. Khoảng 20% nước được thay mỗi ngày.

Bảng 1

Số	Xử lý	Liều thử nghiệm (g/tấn)
1	Mẫu đối chứng	-
2	Bac 500	500 (10 ⁸ CFU/g thức ăn)
3	HIL 500	500
4	HIL 1000	1000
5	HIL 500 + Bac 500	500 g/tấn HIL + 500 g/tấn Bac

Chế phẩm thức ăn *Bacillus* chứa sản phẩm lên men *Bacillus* sấy khô, canxi cacbonat, vỏ trấu và dầu khoáng. Số lượng tối thiểu là $2 \times 10^8 - 2 \times 10^9$ CFU/g. Chế phẩm này chứa *Bacillus pumilis* 3064 (50%), *Bacillus subtilis* BS 2084 (25%) và *Bacillus subtilis* BS15 Ap4 (25%). Như được bàn luận trên đây, *Bacillus pumilus* 3064 và *Bacillus pumilis* 119 được xác định là tương đương nhau về mặt di truyền trên cơ sở mô hình bằng RAPD và phân tích trình tự *cpn60* và ADN_r 16S đối với năm mẫu lặp lại. Theo đó, *Bacillus pumilus* 3064 và *Bacillus pumilis* 119 được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này.

Chế phẩm thức ăn *Lactobacillus* đã được bất hoạt bằng nhiệt. Nồng độ ban đầu của *Lactobacillus* trước khi bất hoạt bằng nhiệt là $8,10 \times 10^9$ CFU/g. Nồng độ lý thuyết của *Lactobacillus* trong thành phẩm là $8,10 \times 10^8$ CFU/g. Chế phẩm *Lactobacillus* chứa *Lactobacillus* được bất hoạt bằng nhiệt, bột rong biển, ngô nở nghiền, đậu tương nghiền (thu được bằng cách chiết), cám nghiền, silic dioxit và canxi propionat. Chế phẩm này chứa *Lactobacillus rhamnosus* MA27/6B, *Lactobacillus farciminis* MA27/6R.

Thức ăn cho tôm thương mại dùng để tăng kích thước tôm được sử dụng. Tế bào *Bacillus* và/hoặc *Lactobacillus* được cân theo yêu cầu liều lượng, tiếp theo trộn với nước muối thường vô trùng 1,5% (1g thức ăn/125 microlit nước muối thường). Dung dịch này được trộn đều với thức ăn cho tôm. Thức ăn cho tôm được bao dầu cá theo tỷ lệ 40 microlit dầu cá/g thức ăn. Mẫu được giữ ở -4°C cho đến khi sử dụng. Tế bào *Bacillus* và/hoặc *Lactobacillus* được đưa vào thức ăn bằng cách rải lên bề mặt sau khi ép đùn.

Ấu trùng muông được cấp thức ăn 4 giờ một lần như thường được thực hiện trong bể ương. Tôm được cấp thức ăn bằng artemia sống và chuyển sang thức ăn thử nghiệm (trình tự từng thứ bột/thức ăn thay thế) cho đến khi kết thúc giai đoạn thử nghiệm trong 20 ngày. Lượng thức ăn trong mỗi thứ bột được ghi lại và điều chỉnh cẩn thận.

Như được quan sát thấy trên Fig. 2, việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* làm tăng tỷ lệ sống, thể trọng (BWG), chiều dài và hấp thu thức ăn ở tôm ấu trùng muông so với mẫu đối chứng tôm không được xử lý. Việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* ở 500 gam/tấn thức ăn làm cho tỷ lệ sống tăng 5,3 phần trăm, thể trọng tăng 27,3 phần trăm, chiều dài tăng 9,6 phần trăm và hấp thu thức ăn tăng 6,0 phần trăm. Việc sử dụng chế phẩm *Lactobacillus* ở 1000 gam/tấn thức ăn làm cho tỷ lệ sống tăng 8,0 phần trăm, thể trọng tăng 32,9 phần trăm, chiều dài tăng 13,7 phần trăm và hấp thu thức ăn tăng 5,7 phần trăm. Tất cả các trị số đều được tính theo mẫu đối chứng không tiếp nhận chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*, là tổng của bốn thử nghiệm (S (ANOVA $p < 0.05$)).

Ví dụ 2

Tác dụng của *Bacillus* và *Lactobacillus* bị bất hoạt bằng nhiệt đối với tính chống chịu tác động của tôm trắng (*Penaeus vannamei*) ở giai đoạn ấu trùng muông.

Trong nghiên cứu này, đáp ứng stress của tôm ấu trùng muông với độ mặn cao, độ mặn thấp, nhiệt độ cao và nhiệt độ thấp được đánh giá. Ngoài ra, đáp ứng stress của tôm với formalin được đánh giá. Tỷ lệ sống, protein sốc nhiệt HSP70, glutathion peroxidaza (GPx), và N/K ATPaza được đo. HSP70 là protein sốc nhiệt 70kDa, một loại chaperon phân tử được chuyển hóa, được tìm thấy trong tương bào và trong các khoang khác của tế bào, nó tăng cường khả năng sống sót của tế bào bị stress. Nó đóng vai trò quan trọng trong chu trình tế bào của nhiều protein trong cả điều kiện bình thường lẫn điều kiện stress. Glutathion peroxidaza (GPx) là tên chung của họ enzym có hoạt tính peroxidaza mà vai trò sinh học chủ yếu của nó là bảo vệ sinh vật trước tác hại oxy hóa. Chức năng

sinh học của glutathion peroxidaza là khử lipid hydroperoxit thành các rượu tương ứng và khử hydro peroxit tự do thành nước. Dung dịch formaldehyt (hoặc formalin) là chất khử trùng chung được sử dụng làm thuốc sát trùng, chất diệt nấm hoặc chất bảo quản trong các ngành công nghiệp khác nhau. Phương thức tác động chính của nó là tạo ra các liên kết ngang cộng hóa trị với các nhóm chức trên protein. Trong nghề nuôi trồng thủy sản, nó được sử dụng làm chất khử trùng trong bể ương.

Tôm trắng *Litopenaeus vannamei* ở giai đoạn ấu trùng muộn được sử dụng. Năm lần lặp được thực hiện đối với mỗi mẫu xử lý nêu trong Bảng 2 bên dưới (Bac = *Bacillus*; HIL = Heat Inactivated *Lactobacillus*.) Khoảng 40 con tôm được duy trì cho mỗi bể kính 10 lít. Ấu trùng được giữ trong nước muối 20 ppt đối với thử nghiệm tác động formalin có nồng độ 0 hoặc 800 ppm. Ấu trùng được giữ trong nước muối 25 ppt ở 15°C và 35°C cho thử nghiệm tác động nhiệt độ. Thử nghiệm tác động độ mặn được thực hiện trong 0-5 ppt và 40 ppt ở nhiệt độ trong phòng 27-28°C. Tôm được tiếp xúc với yếu tố tác động trong 24 giờ.

Bảng 2

Số	Mẫu xử lý	Liều thử nghiệm (g/tấn)	Thử nghiệm tác động
1	Mẫu đối chứng	-	0-5 và 40 ppt, 15°C và 35°C Formalin 800ppm
2	Bac 500	500	
3	HIL 500	500	
4	HIL 1000	1000	
5	HIL 500 + Bac 500	500 g/tấn HIL + 500 g/tấn Bac	

Các chế phẩm *Bacillus* và *Lactobacillus*, chế phẩm thức ăn và chế phẩm ăn kiêng đã được sản xuất như được mô tả trong Ví dụ 1. Như được thấy trong Bảng 3, việc sử dụng *Bacillus* (500 gam/tấn thức ăn) hoặc *Lactobacillus* (1000 gam/tấn thức ăn) làm tăng tính chống chịu tác động ở tôm. Cụ thể, việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* (500 gam/tấn thức ăn) hoặc *Lactobacillus* (1000 gam/tấn thức ăn) làm tăng đáng kể tính chống chịu độ mặn thấp (lần lượt là 17,7 phần trăm và 8,2 phần trăm) và độ mặn cao (lần lượt là 1,1 phần trăm và 6,5 phần trăm). Ngoài ra, việc sử dụng *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* làm tăng đáng kể tính chống chịu nhiệt độ thấp (lần lượt là 12,5 phần trăm và 12,7 phần trăm). Việc sử dụng *Lactobacillus* cũng làm tăng tính chống chịu nhiệt độ cao (3,2 phần trăm). Tất cả các trị số đều được tính theo nhóm đối chứng không được xử lý không tiếp nhận chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*.

Số liệu này là đặc biệt thích hợp cho các điều kiện nuôi trồng thủy sản nằm ở nơi có mùa mưa nhiều, như châu Á. Độ mặn thấp và nhiệt độ thấp thường xảy ra trong các mùa mưa này.

Bảng 3

Mẫu xử lý	Bacillus (500 g/tấn)	HIL (1000 g/tấn)
Độ mặn thấp (0-5 ppt)	+17,7	+8,2
Độ mặn cao (40 ppt)	+1,1	+6,5
Nhiệt độ thấp (15°C)	+12,5	+12,7
Nhiệt độ cao (35°C)	-10,1	+3,2

*Các trị số được thể hiện là phần trăm tăng so với nhóm đối chứng không được xử lý S (ANOVA $p < 0,05$)

Như được thấy trong Bảng 4, việc sử dụng *Bacillus* (500 gam/tấn thức ăn) hoặc *Lactobacillus* (1000 gam/tấn thức ăn) làm tăng hoạt tính của cả pectinaza lẫn amylaza trong gan tụy và ruột của tôm chưa trưởng thành. Cụ thể, việc sử dụng các chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* làm tăng đáng kể hoạt tính của pectinaza trong gan tụy (lần lượt là 30,2 phần trăm và 19,6 phần trăm) và ruột (lần lượt là 0,2 phần trăm và 6,11 phần trăm). Việc sử dụng các chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* làm tăng đáng kể hoạt tính của amylaza trong gan tụy (lần lượt là 4,8 phần trăm và 13,1 phần trăm) và ruột (lần lượt là 6,8 phần trăm và 10,2 phần trăm). Tất cả các trị số đều được tính theo nhóm đối chứng không được xử lý không tiếp nhận chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*.

Bảng 4

	Bacillus (500 g/tấn)	HIL (1000 g/tấn)
Hoạt tính pectinaza tương đối trong gan tụy	+30,2	+19,6
Hoạt tính pectinaza tương đối trong ruột	+0,2	+6,11
Hoạt tính amylaza tương đối trong gan tụy	+4,8	+13,1
Hoạt tính amylaza tương đối trong ruột	+6,8	+10,2

*Các trị số được thể hiện là phần trăm tăng so với nhóm đối chứng không được xử lý S (ANOVA $p < 0,05$)

Ví dụ 3

Tác dụng của *Bacillus* và *Lactobacillus* được bắt hoạt bằng nhiệt đối với đặc tính sinh trưởng của tôm trắng chưa trưởng thành (*Penaeus vannamei*)

Trong nghiên cứu này, mức tăng trọng, chiều dài, tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR), enzyme tiêu hóa (pectinaza, amylaza) trong gan tụy và ruột, và mô ruột được đo. Tôm

trắng chưa trưởng thành *Litopenaeus vannamei* được thử nghiệm. Năm lần lặp được thực hiện đối với mỗi mẫu xử lý nêu trong Bảng 5 bên dưới (Bac = *Bacillus*; HIL = Heat Inactivated *Lactobacillus*.) Trong một nghiên cứu, khoảng 25 con tôm/bể được thử nghiệm cho mỗi lần lặp lại. Nước được duy trì ở 29°C với độ mặn 25 ppt. Trong nghiên cứu khác, khoảng 300 con được giữ cho mỗi lưới/thử nghiệm lặp lại. Tôm được cho thích nghi trong lồng lưới trong bảy ngày trước khi thí nghiệm. Lồng lưới được đặt trong ao tôm và đặt tấm lưới để tôm không thoát ra. Hai bộ bánh cánh quạt được lắp trong ao để làm tăng lượng oxy hòa tan và để làm tuần hoàn nước.

Bảng 5

Số	Mẫu xử lý	Liều thử nghiệm (g/tấn)
1	Mẫu đối chứng	-
2	Bac 500	500
3	HIL 500	500
4	HIL 1000	1000
5	HIL 500 + Bac 500	500 g/tấn HIL + 500 g/tấn Bac

Các chế phẩm *Bacillus* và *Lactobacillus*, chế phẩm thức ăn và chế phẩm ăn kiêng đã được sản xuất như được mô tả trong Ví dụ 1. Như được thấy trên Fig. 3, việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* (500 gam/tấn thức ăn) hoặc *Lactobacillus* (1000 gam/tấn thức ăn) làm tăng tỷ lệ sống, thể trọng (BWG) và hấp thu thức ăn ở tôm chưa trưởng thành. Việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* ở 500 gam/tấn thức ăn làm cho tỷ lệ sống tăng 3,7 phần trăm, thể trọng tăng 11,7 phần trăm và hấp thu thức ăn tăng 11,9 phần trăm. Việc sử dụng chế phẩm *Lactobacillus* ở 1000 gam/tấn thức ăn làm cho tỷ lệ sống tăng 4,0 phần trăm, thể trọng tăng 12,8 phần trăm và hấp thu thức ăn tăng 21,2 phần trăm. Tất cả các trị số đều được tính theo mẫu đối chứng không tiếp nhận chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*, và là tổng của ba thử nghiệm (S (ANOVA $p < 0,05$)).

Khi kết thúc nghiên cứu, mô lông nhung của tôm được đánh giá. Đặc tính của tôm được sử dụng chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* gia tăng, ít nhất một phần, là do sinh lý ruột được cải thiện. Như được thấy trên Fig. 4, tôm ăn thức ăn có bổ sung *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* có lông nhung dài hơn và mật độ cao hơn so với mẫu đối chứng không ăn thức ăn bổ sung. Sinh lý ruột được cải thiện này chứng tỏ khả năng tiêu hóa cao hơn ở tôm được sử dụng chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*.

Ví dụ 4

Tác dụng của *Bacillus* và *Lactobacillus* được bắt hoạt bằng nhiệt đối với tính chống chịu tác động ở tôm trắng chưa trưởng thành (*Penaeus vannamei*)

Trong nghiên cứu này, đáp ứng stress với độ mặn cao, độ mặn thấp, nhiệt độ cao, và nhiệt độ thấp được đánh giá. Ngoài ra, đáp ứng stress với formalin được đánh giá. Tỷ lệ sống, protein sốc nhiệt HSP70, glutathion peroxidaza (GPx), lipid peroxidaza, TBAR và catalaza được đo.

Độ mặn: Hai mươi con tôm trong ba lần lặp mẫu xử lý trong Bảng 6 được lấy mẫu cho thử nghiệm tác động độ mặn bằng cách chia thành hai nhóm. Nhóm thứ nhất được giữ trong bể kính với 40 ppt nước. Nhóm thứ hai được giữ trong bể kính với 0-5 ppt nước. Tỷ lệ sống được đánh giá.

Formalin: Hai mươi con tôm trong ba lần lặp mẫu xử lý trong Bảng 6 được lấy mẫu cho thử nghiệm tác động formalin bằng cách chia thành hai nhóm. Nhóm thứ nhất được giữ trong bể kính 10 L với 0 ppm formalin trong nước. Nhóm thứ hai được giữ trong bể kính 10 L với 600 ppm formalin trong nước. Tỷ lệ sống được đánh giá hàng ngày/tuần.

Nhiệt độ: 20 con tôm từ mỗi lần lặp lại được lấy mẫu hàng tuần trong khoảng 30 để nghiên cứu tính chống chịu tác động nhiệt độ. Nhóm thứ nhất được giữ trong giỏ nhỏ treo trong bình 1000 L chứa nước 35°C. Tôm từ mỗi mẫu xử lý được giữ trong 24 giờ. Nhóm thứ hai được giữ trong bể kính 10 L chứa nước 15°C để nghiên cứu tính chống chịu tác động nhiệt độ. Tôm từ mỗi mẫu xử lý được giữ trong 1 giờ.

Bảng 6

Số	Mẫu xử lý	Liều thử nghiệm (g/tấn)	Thử nghiệm tác động
1	Mẫu đối chứng	-	0-5 và 40 ppt, 15°C và 35°C Formalin 800ppm
2	Bac 500	500	
3	HIL 500	500	
4	HIL 1000	1000	
5	HIL 500 + Bac 500	500 g/tấn HIL + 500 g/tấn Bac	

Các chế phẩm *Bacillus* và *Lactobacillus*, chế phẩm thức ăn và chế phẩm ăn kiêng đã được sản xuất như được mô tả trong Ví dụ 1. Như được thấy trong Bảng 7, việc sử dụng *Bacillus* (500 gam/tấn thức ăn) hoặc *Lactobacillus* (1000 gam/tấn thức ăn) làm tăng tính chống chịu tác động ở tôm chưa trưởng thành. Cụ thể, việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* làm tăng đáng kể tính chống chịu độ mặn thấp (lần lượt là

13,3 phần trăm và 10,0 phần trăm). Việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* cũng làm tăng tính chống chịu độ mặn cao (1,8 phần trăm). Ngoài ra, việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* làm tăng đáng kể tính chống chịu nhiệt độ thấp (lần lượt là 16,4 phần trăm và 16,4 phần trăm). Việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* cũng làm tăng tính chống chịu nhiệt độ cao (3,3 phần trăm). Tất cả các trị số đều được tính theo nhóm đối chứng không được xử lý không tiếp nhận chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*.

Như được bàn luận trong các ví dụ trên đây, số liệu này là đặc biệt thích hợp cho các điều kiện nuôi trồng thủy sản nằm ở nơi có mùa mưa nhiều, như châu Á. Độ mặn thấp và nhiệt độ thấp thường xảy ra trong các mùa mưa này.

Bảng 7

Mẫu xử lý	<i>Bacillus</i> (500 g/tấn)	HIL (1000 g/tấn)
Độ mặn thấp (0-5 ppt)	+13,3	+10,0
Độ mặn cao (40 ppt)	+1,8	-0,7
Nhiệt độ thấp (15°C)	+16,4	+16,4
Nhiệt độ cao (35°C)	+3,3	-5,0

*Các trị số được thể hiện là phần trăm tăng so với nhóm đối chứng không được xử lý S (ANOVA $p < 0,05$)

Ví dụ 5

Tác dụng của *Bacillus* và *Lactobacillus* được bắt hoạt bằng nhiệt đối với đáp ứng bệnh ở tôm trắng (*Penaeus vannamei*)

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ sống, thông số miễn dịch (ví dụ, tổng số lượng tế bào máu (total hemocyte count: THC), hoạt tính thực bào, mức glucoza, oxyhemoxyanin (Oxy), tỷ lệ oxyhemoxyanin:protein (Oxy:prot), hoạt tính phenoloxidaza (PO), và protein huyết tương), và mức biểu hiện gen proPO, HSP70, SP, PE và LGBPP được đo. Tôm trắng *Litopenaeus vannamei* được đo mức đáp ứng bệnh. Năm lần lặp được thực hiện đối với mỗi mẫu xử lý nêu trong Bảng 8 bên dưới (Bac = *Bacillus*; HIL = Heat Inactivated *Lactobacillus*.) Khoảng 20-25 con tôm/bể được thử nghiệm cho mỗi lần lặp lại.

Liều quyết định bệnh WSSv: Vào cuối thí nghiệm, tôm từ mỗi mẫu xử lý được thử nghiệm tính kháng bệnh nhiễm virus gây hội chứng đốm trắng (WSSv). Tôm được tiêm huyền phù WSSv ở nồng độ LD₅₀ đã được xác định trước. Tỷ lệ chết được ghi lại trong 10 ngày sau liều quyết định. Nguyên nhân gây chết được xác nhận bằng phân tích PCR.

Liều quyết định *Vibrio*: Vào cuối thí nghiệm, tôm từ mỗi mẫu xử lý được thử nghiệm tính kháng bệnh nhiễm *V. harveyi*. Huyền phù vi khuẩn *V. harveyi* được điều chế từ giống 18-24 giờ và điều chỉnh đến nồng độ cuối khoảng 10^6 CFU/ml nước nuôi. Sau khi phơi nhiễm, tôm được đưa trở lại bể nuôi và tỷ lệ chết được ghi lại trong 14 ngày. Tổng số lượng loài *Vibrio* trong nước nuôi và trong ruột tôm được xác định bằng cách sử dụng Thiosulphate Citrate Bile salt Sucrose làm môi trường nuôi cấy đặc hiệu đối với Vibrionaceae. Tổng số lượng loài *Vibrio* được tính sau khi ủ ở 35°C trong 18-24 giờ.

Bảng 8

Số	Mẫu xử lý	Liều thử nghiệm (g/tấn)
1	Mẫu đối chứng	-
2	Bac 500	500
3	HIL 1000	1000
4	HIL 500 + Bac 500	500 g/tấn HIL + 500 g/tấn Bac

Các chế phẩm *Bacillus* và *Lactobacillus*, chế phẩm thức ăn và chế phẩm ăn kiêng đã được sản xuất như được mô tả trong Ví dụ 1. Như được thấy trong Bảng 9, việc sử dụng *Bacillus* (500 gam/tấn thức ăn) hoặc *Lactobacillus* (1000 gam/tấn thức ăn) làm tăng tỷ lệ sống ở tôm 10-14 ngày sau khi phơi nhiễm WSSv hoặc *Vibrio*. Cụ thể, việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* (500 gam/tấn thức ăn) hoặc *Lactobacillus* (1000 gam/tấn thức ăn) làm tăng đáng kể tỷ lệ sống để đáp lại sự phơi nhiễm WSSv (lần lượt là 6,1 phần trăm và 12,2 phần trăm) và *Vibrio* (lần lượt là 8,8 phần trăm và 2,3 phần trăm). Hơn thế nữa, như được thấy trên Fig. 5, việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* (500 gam/tấn thức ăn) hoặc *Lactobacillus* (1000 gam/tấn thức ăn) làm giảm lượng tác nhân gây bệnh ở ruột tôm (S (ANOVA $p < 0,05$)).

Tất cả các trị số đều được tính theo nhóm đối chứng không được xử lý không tiếp nhận chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus* (S (ANOVA $p < 0,05$)).

Bảng 9

	<i>Bacillus</i> (500 g/tấn)	HIL (1000 g/tấn)
Phơi nhiễm WSSv	+6,1	+12,2
Phơi nhiễm <i>Vibrio</i>	+8,8	+2,3

*Các trị số được thể hiện là phần trăm tăng so với nhóm đối chứng không được xử lý S (ANOVA $p < 0,05$)

Việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* (500 gam/tấn thức ăn) hoặc *Lactobacillus* (1000 gam/tấn thức ăn) bảo vệ tôm chống các tác nhân gây bệnh WSSv và *Vibrio* ít nhất một phần do việc kích thích quá trình biểu hiện các gen và các hoạt động của tế bào tham gia vào quá trình miễn dịch. Ví dụ, hoạt tính thực bào tăng 21,0 phần trăm khi tôm được xử lý bằng chế phẩm *Bacillus*, so với đối chứng không được xử lý. Hơn thế nữa, hoạt tính phenoloxidaza tăng 24,8 phần trăm khi tôm được xử lý bằng chế phẩm *Lactobacillus*, so với đối chứng không được xử lý. Ngoài ra, mức biểu hiện gen proPO và HSP70 là giảm ở tôm phơi nhiễm WSSv được xử lý bằng chế phẩm *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*.

Ví dụ 6

Đặc tính được cải thiện ở tôm trắng (*Penaeus vannamei*) so với các dung dịch trên cơ sở *Bacillus* thương mại khác

Chế phẩm *Bacillus* theo sáng chế được so sánh với các dung dịch trên cơ sở *Bacillus*-thương mại khác (Novozymes PondPlus® và INVE Sanolife) về tác dụng của chúng đối với đặc tính sinh trưởng và tỷ lệ chết ở tôm trắng (*Penaeus vannamei*) sinh trưởng trong ao ngoài trời. Ba lần lặp lại được thực hiện đối với mỗi mẫu xử lý nêu trong Bảng 10 và Bảng 13 bên dưới. Các ao ngoài trời có kích thước khoảng 3330 mét vuông và chứa khoảng 187000 con tôm/ao (562500 con/hecta). Trước khi thử nghiệm, tôm trải qua khoảng thời gian tạo điều kiện hai tuần, khi đó chúng dễ dàng điều chỉnh theo thức ăn cơ bản và các điều kiện thử nghiệm. Sau khoảng thời gian tạo điều kiện, tôm được cấp thức ăn không hạn chế trong suốt thử nghiệm năm tháng. Nhiệt độ nước nằm trong khoảng 20-31°C trong suốt thử nghiệm. Tất cả các thức ăn đều là isonitrogen và isoenergetic (xem Bảng 11). Thức ăn do hãng Zhejiang Xinxin Feed Co.,Ltd (Jiaxin, Zhejiang, China) cung cấp. Mỗi ao được lắp hai máy sục khí, không thay nước. Thử nghiệm mỗi con được đo vào giữa và cuối thử nghiệm. Hấp thu thức ăn được ghi lại hằng ngày. Mật độ ban đầu (con/hecta), trọng lượng thu hoạch (kg/hecta), hấp thu thức ăn (kg/hecta), tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) và tỷ lệ sống (%) cũng được đo.

Tất cả các số liệu đều được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD. Số liệu này được phân tích bằng ANOVA một chiều. Khác biệt giữa các nhóm được phân tích bằng phương pháp Duncan. Các khác biệt có $P < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê. Tất cả các phép thử đều được thực hiện bằng cách sử dụng SPSS 11.5.

Bảng 10

Số	Mẫu xử lý	Liều thử nghiệm (g/tấn)
1	Đối chứng	—
2	<i>Bacillus subtilis</i> BS2084 <i>Bacillus subtilis</i> BS15Ap4 <i>Bacillus pumilis</i> BP119	Trong thức ăn được phun 50g/tấn thức ăn (2×10^9 CFU/g thức ăn)
3	Nguồn vi sinh vật <i>Bacillus subtilis</i> BS27 <i>Bacillus licheniformis</i> BA842 <i>Bacillus licheniformis</i> BL21	Trong thức ăn được phun 50g/tấn thức ăn (2×10^9 CFU/g thức ăn)
4	Novozymes PondPlus®	Trong nước được phun 60 ngày đầu: 20-25g ($>10 \times 10^8$ CFU/g)/333 m ² mỗi 7 ngày >60 ngày: 25-30g ($>10 \times 10^8$ CFU/g)/333 m ² mỗi 7 ngày

Chế phẩm thức ăn *Bacillus* trong các mẫu xử lý 2 và 3 chứa sản phẩm lên men *Bacillus*, canxi cacbonat, vỏ trấu và dầu khoáng. Chế phẩm này được đưa vào thức ăn của tôm bằng cách phun dung dịch lỏng *Bacillus* lên bề mặt thức ăn của tôm. Novozymes PondPlus® được phun trực tiếp vào ao.

Như được bàn luận trên đây, *Bacillus pumilus* 3064 và *Bacillus pumilis* 119 được xác định là tương đương nhau về mặt di truyền trên cơ sở mô hình băng RAPD và phép phân tích trình tự *cpn60* và ADNr 16S gồm năm mẫu lặp lại. Theo đó, *Bacillus pumilus* 3064 và *Bacillus pumilis* 119 được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này.

Bảng 11

	Thành phần dinh dưỡng (%)
Protein thô	43,19±0,06
Lipit thô	6,22±0,35
Tro	10,91±0,05

Bảng 12

Đặc tính sinh trưởng

Số		Mật độ ban đầu (con/hecta)	Trọng lượng thu hoạch (kg/hecta)	Hấp thu thức ăn (kg/hecta)	FCR	Tỷ lệ sống (%)
1	Đối chứng	$56,25 \times 10^4$	$2892,50 \pm 38,26^c$	$4907,38 \pm 139,75^a$	$1,69 \pm 0,05^a$	$42,33 \pm 0,6^b$
2	Novozymes PondPlus®	$56,25 \times 10^4$	$3015,50 \pm 79,15^{bc}$	$4383,09 \pm 179,99^b$	$1,45 \pm 0,04^b$	$44,00 \pm 1,7^{ab}$
3	Người vi sinh vật <i>Bacillus subtilis</i> BS27 <i>Bacillus licheniformis</i> BA842 <i>Bacillus licheniformis</i> BL21	$56,25 \times 10^4$	$3104,25 \pm 93,16^b$	$4334,87 \pm 177,44^b$		
4	<i>Bacillus subtilis</i> BS2084 <i>Bacillus subtilis</i> BS 15Ap4 <i>Bacillus pumilis</i> BP119	$56,25 \times 10^4$	$3446,00 \pm 60,25^a$	$4409,73 \pm 38,47^b$	$1,40 \pm 0,05^b$	$44,00 \pm 1,0^{ab}$
					$1,28 \pm 0,03^c$	$45,33 \pm 1,2^a$

Như được thấy trong Bảng 12, tất cả các mẫu xử lý đều làm gia tăng năng suất cuối của tôm nuôi trong ao về trọng lượng cuối và FCR ($p < 0,05$) so với mẫu đối chứng không được xử lý. Tỷ lệ sống cũng gia tăng nhờ các mẫu xử lý này. Đáng chú ý, chế phẩm *Bacillus subtilis* BS2084, *Bacillus subtilis* BS 15Ap4 và *Bacillus pumilis* BP119 (mẫu xử lý 4) và các chế phẩm Nguồn vi sinh vật[®] *Bacillus subtilis* BS27, *Bacillus licheniformis* BA842 và *Bacillus licheniformis* BL21 (mẫu xử lý 3) cho mức cải thiện đáng kể về đặc tính sinh trưởng so với sản phẩm Novozymes Pondplus[®] *Bacillus*. Chế phẩm *Bacillus subtilis* BS2084, *Bacillus subtilis* BS 15Ap4 và *Bacillus pumilis* BP119 cho mức cải thiện rất đáng kể về đặc tính sinh trưởng, cụ thể là trọng lượng thu hoạch tăng 19,2% so với mẫu đối chứng không được xử lý, và trọng lượng thu hoạch tăng 14,3% so với Novozymes Pondplus[®]. Chế phẩm *Bacillus subtilis* BS2084, *Bacillus subtilis* BS 15Ap4 và *Bacillus pumilis* BP119 cho mức cải thiện FCR 24,3% so với đối chứng không được xử lý, và mức cải thiện 11,7% so với Novozymes Pondplus[®]. Chế phẩm Nguồn vi sinh vật[®] *Bacillus subtilis* BS27, *Bacillus licheniformis* BA842 và *Bacillus licheniformis* BL21 cũng cho mức cải thiện đáng kể so với đối chứng không được xử lý và Novozymes Pondplus[®] (xem Bảng 12).

Bảng 13

Số	Mẫu xử lý	Liều thử nghiệm (g/tấn)
1	Mẫu đối chứng	—
2	Nguồn vi sinh vật <i>Bacillus subtilis</i> BS27 <i>Bacillus licheniformis</i> BA842 <i>Bacillus licheniformis</i> BL21	Trong thức ăn được phun 50g/tấn thức ăn (2×10^9 CFU/g thức ăn)
3	INVE Sanolife	

Các chế phẩm thức ăn *Bacillus* trong mẫu xử lý 2 của Bảng 13 chứa sản phẩm lên men *Bacillus*, canxi cacbonat, cám gạo và dầu khoáng. Chế phẩm này được đưa vào thức ăn của tôm bằng cách phun dung dịch lỏng *Bacillus* lên bề mặt thức ăn của tôm.

Bảng 14

Đặc tính sinh trưởng

Số		Mật độ ban đầu (con/hecta)	Trọng lượng thu hoạch (kg/hecta)	Hấp thu thức ăn (kg/hecta)	FCR	Tỷ lệ sống (%)
1	Đối chứng	$56,25 \times 10^4$	$2672,75 \pm 79,14$	$4805,44 \pm 328,51$	$1,79 \pm 0,07$	$40,86 \pm 2,01$
2	INVE Sanolife	$56,25 \times 10^4$	$2833,50 \pm 57,07$	$4400,75 \pm 97,57$	$1,55 \pm 0,04$	$40,26 \pm 1,02$
3	Nguồn vi sinh vật <i>Bacillus subtilis</i> BS27 <i>Bacillus licheniformis</i> BA842 <i>Bacillus licheniformis</i> BL21	$56,25 \times 10^4$	$3145,25 \pm 15,30$	$4539,90 \pm 127,59$	$1,44 \pm 0,04$	$43,61 \pm 0,10$

Như được thấy trong Bảng 14, so với mẫu đối chứng không được xử lý, các mẫu xử lý 2 và 3 làm gia tăng năng suất cuối của tôm trắng nuôi trong ao về trọng lượng cuối và FCR ($p < 0,05$). Đáng chú ý, chế phẩm Nguồn vi sinh vật[®] *Bacillus subtilis* BS27, *Bacillus licheniformis* BA842 và *Bacillus licheniformis* BL21 (mẫu xử lý 3) có mức cải thiện đáng kể về đặc tính sinh trưởng so với INVE Sanolife. Chế phẩm Nguồn vi sinh vật[®] *Bacillus subtilis* BS27, *Bacillus licheniformis* BA842 và *Bacillus licheniformis* BL21 làm gia tăng trọng lượng thu hoạch 17,7% so với đối chứng không được xử lý và 11,0% so với mẫu INVE Sanolife. Chế phẩm Nguồn vi sinh vật[®] *Bacillus subtilis* BS27, *Bacillus licheniformis* BA842 và *Bacillus licheniformis* BL21 cải thiện FCR 19,6% so với đối chứng không được xử lý và 7,1% so với mẫu INVE Sanolife. Tỷ lệ sống cũng được gia tăng với chế phẩm Nguồn vi sinh vật[®] *Bacillus subtilis* BS27, *Bacillus licheniformis* BA842 và *Bacillus licheniformis* BL21 so với đối chứng không được xử lý cũng như mẫu INVE Sanolife.

Kết quả này chứng minh rằng các chế phẩm *Bacillus* theo sáng chế là ưu việt hơn đáng kể so với các dung dịch vi sinh vật khác để gia tăng đặc tính sinh trưởng và năng suất tôm trắng nuôi trong ao khi được sử dụng dưới dạng phụ gia thức ăn. Trọng lượng cuối và FCR được cải thiện một cách rõ rệt khi các chế phẩm theo sáng chế được so sánh với cả Novozymes Pondplus[®] và INVE Sanolife, cũng như mẫu đối chứng không được xử lý.

YÊU CẦU BẢO HỘ**1. Chế phẩm chứa:**

- (i) chủng *Bacillus pumilis* 3064 hoặc 119, được lưu trữ là NRRL B-50796; chủng *Bacillus subtilis* BS 2084, được lưu trữ là NRRL B-50013; và chủng *Bacillus subtilis* BS15 Ap4, được lưu trữ là ATCC PTA-6507; hoặc
- (ii) chủng *Bacillus licheniformis* 842, được lưu trữ là NRRL B-50516; chủng *Bacillus subtilis* BS27, được lưu trữ là NRRL B-50105; và chủng *Bacillus licheniformis* BL21, được lưu trữ là NRRL B-50134.

2. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa:

- (i) chủng *Bacillus pumilis* 3064 hoặc 119, được lưu trữ là NRRL B-50796; chủng *Bacillus subtilis* BS 2084, được lưu trữ là NRRL B-50013; và chủng *Bacillus subtilis* BS15 Ap4, được lưu trữ là ATCC PTA-6507; hoặc
- (ii) chủng *Bacillus licheniformis* 842, được lưu trữ là NRRL B-50516); chủng *Bacillus subtilis* BS27, được lưu trữ là NRRL B-50105; và chủng *Bacillus licheniformis* BL21, được lưu trữ là NRRL B-50134.

3. Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi, chứa:

- (i) chủng *Bacillus pumilis* 3064 hoặc 119, được lưu trữ là NRRL B-50796; chủng *Bacillus subtilis* BS 2084, được lưu trữ là NRRL B-50013; và chủng *Bacillus subtilis* BS15 Ap4, được lưu trữ là ATCC PTA-6507; hoặc
- (ii) chủng *Bacillus licheniformis* 842, được lưu trữ là NRRL B-50516); chủng *Bacillus subtilis* BS27, được lưu trữ là NRRL B-50105; và chủng *Bacillus licheniformis* BL21, được lưu trữ là NRRL B-50134

4. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo điểm 2, trong đó các chủng nêu trên được bổ sung trong chế phẩm với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 2000 gam/tấn thức ăn chăn nuôi.

5. Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo điểm 3, trong đó các chủng nêu trên được bổ sung trong chế phẩm với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 2000 gam/tấn thức ăn chăn nuôi.



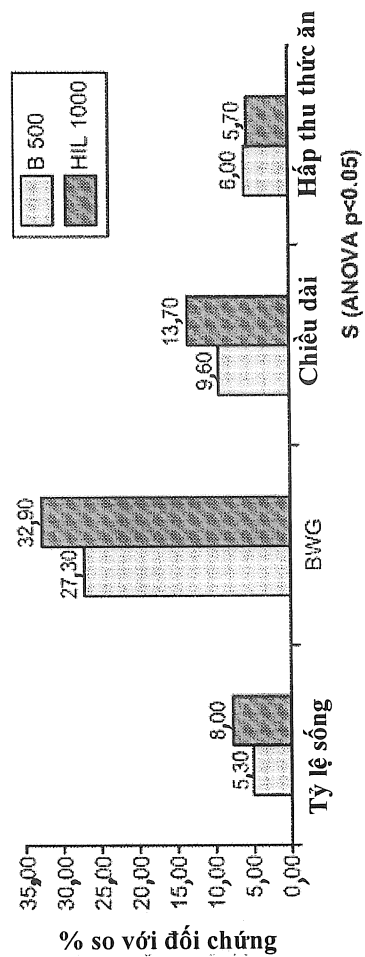


FIG. 2A

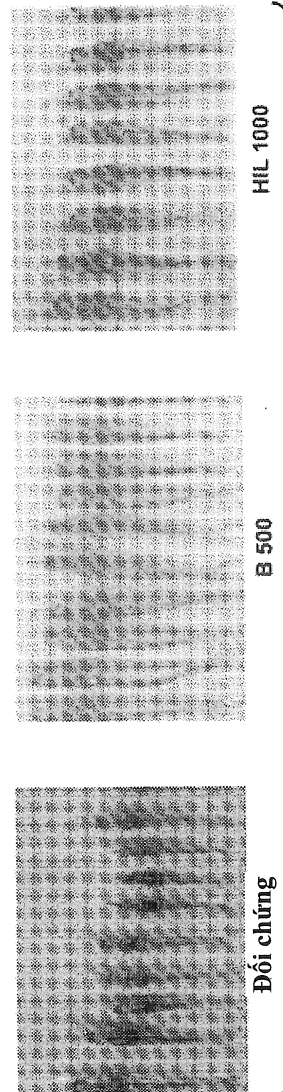
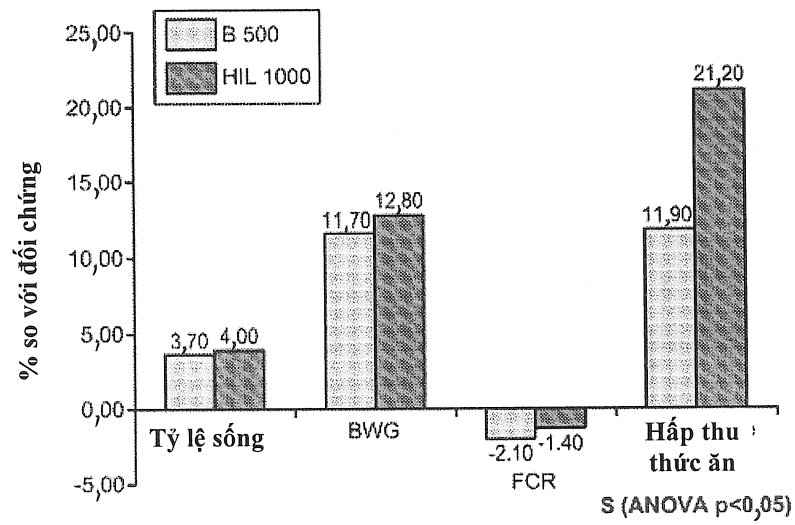
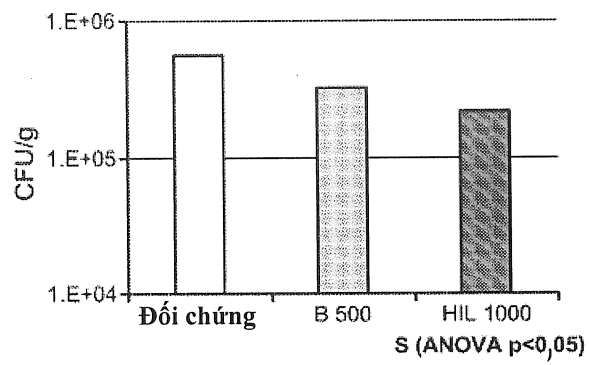


FIG. 2B

3 / 4

**FIG. 3****FIG. 5**

4 / 4

