



(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)



1-0048460

(51)¹⁹ C12R 1/125

(13) B

(21) 1-2020-00382

(22) 28/06/2018

(86) PCT/EP2018/067422 28/06/2018

(87) WO2019/002471 03/01/2019

(30) 17179052.0 30/06/2017 EP; 201710618158.9 26/07/2017 CN

(45) 25/07/2025 448

(43) 27/04/2020 385A

(73) EVONIK OPERATIONS GMBH (DE)

Rellinghauser Straße 1-11, 45128 Essen, Germany

(72) PELZER, Stefan (DE); PETRI, Daniel (DE); GIATSI, Christos (GR); MOLCK, Stella (DE); KIPKER, Maïke (DE); KLEINBOLTING, Jessica (DE); STANNEK-GOBEL, Lorena (DE); DORANALLI, Kiran (IN); HTOO, John Khun Kyaw (CA); BORGMEIER, Claudia (DE); HERBOLD, Sandra (DE); MEURER, Guido (DE).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHỦNG BACILLUS SUBTILIS CÓ HOẠT TÍNH LỢI KHUẨN, THỨC ĂN CHĂN NUÔI, THỰC PHẨM VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHỦNG NÀY

(21) 1-2020-00382

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* có hoạt tính ức chế mạnh tác nhân gây bệnh ở lợn và gia cầm, thức ăn chăn nuôi, thực phẩm, dược phẩm chứa chủng này, phương pháp chăn nuôi động vật, phương pháp kiểm soát và/hoặc phòng ngừa tác dụng có hại cho môi trường của phân hoặc dịch bị nhiễm, phương pháp kiểm soát và/hoặc cải thiện chất lượng nước hoặc dung dịch nước, và phương pháp xử lý và/hoặc phòng ngừa bệnh do vi sinh vật gây ra ở cây trồng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* có hoạt tính ức chế mạnh tác nhân gây bệnh ở lợn và gia cầm để sử dụng làm chế phẩm lợi khuẩn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Như đã biết trong lĩnh vực này, chủng *Bacillus subtilis* được sử dụng làm thành phần lợi khuẩn trong công nghiệp sản xuất thức ăn chăn nuôi. Chức năng của lợi khuẩn (cũng được gọi là “vi sinh vật được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng trực tiếp cho động vật”) là tác động đến hệ vi khuẩn đường ruột theo cách tích cực bằng cách trợ giúp sự sinh trưởng của các vi khuẩn có lợi và/hoặc ức chế sinh trưởng của các vi khuẩn gây bệnh. Lý tưởng là nhờ việc sử dụng các lợi khuẩn sẽ không cần phải sử dụng kháng sinh tăng cường sinh trưởng. Ngoài ra, mong muốn rằng lợi khuẩn thực hiện các chức năng khác như giúp tiêu hóa các thành phần thức ăn chăn nuôi cụ thể.

Do đó, xem xét tình trạng nêu trên, cần phải có các lợi khuẩn mà tác động đến hệ vi khuẩn đường ruột theo cách tích cực và ngoài ra, thực hiện theo cách mong muốn ít nhất một chức năng khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra được chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* có nhiều đặc tính có lợi. Ngoài khả năng ức chế sinh trưởng của *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *S. aureus subsp. aureus*, *S. gallinaceus*, *S. suis*, *C. coli* và *E. cecorum*, là các tác nhân gây bệnh chủ yếu trên lợn và gia cầm, cụ thể là chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* theo sáng chế có tốc độ tăng sinh rất cao với sự có mặt của mật và giúp chuyển hóa xenluloza một cách rất hiệu quả.

Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 theo sáng chế được xác định bằng cách sàng lọc các chủng phân lập có trong tự nhiên. Chủng *Bacillus subtilis* này được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức vào ngày 14 tháng 06 năm 2017 theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest về sự công nhận quốc tế đối với việc lưu trữ vi sinh vật nhằm mục đích đăng ký sáng chế với mã đăng ký nêu trên dưới tên EVONIK DEGUSSA GMBH, nay đã được đổi tên thành EVONIK OPERATIONS GMBH.

Do đó, theo mục đích thứ nhất, sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* và/hoặc thể hỗn tạp của nó được chọn từ nhóm bao gồm:

a) chủng *Bacillus subtilis* lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM 32540;

b) chủng đột biến của chủng *Bacillus subtilis* lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM 32540 có toàn bộ các đặc điểm nhận diện của chủng DSM 32540, trong đó tốt hơn nếu chủng đột biến này có độ tương đồng trình tự ADN so với chủng DSM 32540 ít nhất bằng 95%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 96%, 97% hoặc 98%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% hoặc 99,5% và/hoặc tốt hơn nếu chủng đột biến này có độ tương đồng trình tự ADN bộ gen so với chủng DSM 32540 ít nhất bằng 95%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 96%, 97% hoặc 98%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%, 99,5% hoặc 99,8%, tốt nhất nếu bằng 100%;

c) thể hỗn tạp của (a) hoặc (b);

d) thể hỗn tạp chứa hỗn hợp hữu hiệu của các hợp chất được chứa trong (a), (b) hoặc (c).

Chủng *Bacillus subtilis* lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM 32540 có các trình tự đặc trưng sau:

a) trình tự ADN ribosom 16S có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99% hoặc 99,5%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1;

b) trình tự yqfD có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99% hoặc 99,5%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2;

c) trình tự gyrB có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99% hoặc 99,5%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3;

d) trình tự rpoB có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99% hoặc 99,5%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4;

e) trình tự groEL có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99% hoặc 99,5%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5.

Do đó, theo một mục đích khác, sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis*, cụ thể là chủng *Bacillus subtilis* có các đặc tính nêu trên, hoặc thể hỗn tạp của nó, trong đó chủng *Bacillus subtilis* này có ít nhất một, tốt hơn nếu toàn bộ các đặc tính sau:

a) trình tự *yqfD* có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99,8% hoặc 99,9%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2;

b) trình tự *gyrB* có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99,8% hoặc 99,9%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3;

c) trình tự *rpoB* có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99,8% hoặc 99,9%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4;

d) trình tự *groEL* có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99,8% hoặc 99,9%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5;

trong đó tốt hơn nữa nếu chủng *Bacillus subtilis* này có trình tự ADN ribosom 16 S có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99,5, 99,8% hoặc 99,9%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1.

Do đó, theo một mục đích khác, sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó, cụ thể là chủng *Bacillus subtilis* có các đặc tính nêu trên, có hai, ba hoặc bốn, tốt hơn nếu toàn bộ các đặc tính sau:

a) trình tự ADN ribosom 16S có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99,8% hoặc 99,9%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1;

b) trình tự *yqfD* có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99,8% hoặc 99,9%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2;

c) trình tự *gyrB* có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99,8% hoặc 99,9%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3;

d) trình tự *rpoB* có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99,8% hoặc 99,9%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4;

e) trình tự *groEL* có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99,8% hoặc 99,9%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5.

Do đó, theo một mục đích cụ thể, sáng chế cũng đề cập đến chủng *Bacillus subtilis*, có các đặc tính sau:

a) trình tự ADN ribosom 16S như nêu trong SEQ ID NO.1;

b) trình tự *yqfD* như nêu trong SEQ ID NO.2;

c) trình tự *gyrB* như nêu trong SEQ ID NO.3.

Tốt hơn nữa, chủng *Bacillus subtilis* này có các đặc tính bổ sung sau:

d) trình tự *rpoB* như nêu trong SEQ ID NO.4;

e) trình tự *groEL* như nêu trong SEQ ID NO.5.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tốt hơn nữa chủng theo sáng chế được đặc trưng bởi ít nhất một, tốt hơn nữa nếu toàn bộ, các đặc tính khác sau:

Tốt hơn nữa chủng theo sáng chế có thể sinh trưởng trong các điều kiện kỵ khí. Tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế có thể phân hủy xenluloza không tan trong nước cũng như protein trong các điều kiện kỵ khí này.

Tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế có thể phân hủy xenluloza không tan trong nước trong các điều kiện kỵ khí.

Tốt hơn nữa chủng theo sáng chế ức chế rất hữu hiệu vi khuẩn lây nhiễm, cụ thể là ít nhất một chủng, tốt hơn nữa toàn bộ các chủng, được chọn từ *Clostridium perfringens* ATCC 13124; *Clostridium perfringens* BB-081_Cpe; *Clostridium perfringens*

BB_031_Cpe; *C. difficile* DSM 1296; *S. aureus subsp. aureus* DSM 20231; *S. gallinaceus* DSM 15349; *S. suis* DSM 9682; *C. coli* DSM 4689 và *E. cecorum* DSM 20683.

Tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế tương ứng có đường kính vòng ly giải tác nhân gây bệnh ít nhất bằng 15mm, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 20mm, trong thử nghiệm đối kháng giết khuẩn trên đĩa thạch LBKelly đối với chủng điển hình *Clostridium perfringens* ATCC 13124 và/hoặc đường kính vòng ly giải tác nhân gây bệnh ít nhất bằng 20mm đối với chủng *Clostridium perfringens* BB-081_Cpe và/hoặc đường kính vòng ly giải tác nhân gây bệnh ít nhất bằng 15mm, tốt hơn nếu ít nhất bằng 18mm, đối với chủng *Clostridium perfringens* BB_031_Cpe.

Tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế có khả năng sinh trưởng trong sự có mặt của axit axetic ở hàm lượng bằng 0,05% khối lượng, axit propionic ở hàm lượng bằng 0,05% khối lượng và/hoặc axit lactic ở hàm lượng bằng 0,2% khối lượng.

Tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế có ít nhất một, tốt hơn nếu toàn bộ các hoạt tính enzym sau: hoạt tính xenlulaza; hoạt tính xylanaza; hoạt tính catalaza; hoạt tính superoxit dismutaza.

Tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế có hoạt tính xylanaza ít nhất bằng 8 mU/mL, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 10 mU/mL, tốt nhất nếu khoảng 12 mU/mL.

Tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế có khả năng sản sinh lactat và tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế có khả năng phân hủy độc tố nấm.

Tốt hơn nữa nếu chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế có khả năng sinh trưởng trong sự có mặt của mật ở nồng độ bằng 2mM, tốt hơn nữa nếu trong sự có mặt của mật ở nồng độ bằng 4mM. Tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế có khả năng tăng sinh nhanh trong các điều kiện nồng độ mật cao này.

Ngoài ra, tốt hơn nếu chủng theo sáng chế có khả năng sinh trưởng trong các điều kiện nồng độ muối cao, cụ thể là trong sự có mặt của NaCl ở hàm lượng bằng 5% khối lượng, tốt hơn nữa nếu trong sự có mặt của NaCl ở hàm lượng bằng 10% khối lượng, trong ít nhất một ngày.

Tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế có khả năng sống sót ở nhiệt độ cao cần thiết để tạo viên thức ăn chăn nuôi dùng cho động vật, tốt hơn nếu chủng theo sáng chế

có khả năng sống sót ở nhiệt độ 80°C, tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế có khả năng sống sót ở nhiệt độ 95°C hoặc 99°C, trong ít nhất 20 phút.

Không bị ràng buộc bởi giả thuyết bất kỳ, các tác giả sáng chế phát hiện thấy rằng chủng *Bacillus subtiliss* theo sáng chế tăng cường sức khỏe động vật, cụ thể là sức khỏe đường ruột, bằng cơ chế tác động nhiều mặt, bao gồm sản sinh các chất chuyển hóa có hiệu quả chọn lọc và cạnh tranh với vi khuẩn gây bệnh bằng cách tiêu thụ tốt hơn các chất dinh dưỡng có sẵn, nhờ đó ngăn ngừa sự thiết lập hiệu quả của vi khuẩn gây bệnh trong ruột. Do đó, enzym sản sinh bởi *Bacillus subtilis* có thể hỗ trợ thiết lập hệ vi sinh vật đường ruột cân bằng bằng cách cung cấp các chất dinh dưỡng được tiêu hóa sơ bộ.

Đây là ưu điểm lớn của các lợi khuẩn so với các kháng sinh, ở chỗ chủng theo sáng chế không tiêu diệt vi khuẩn một cách tùy tiện và không làm cho các chủng vi khuẩn gây bệnh kháng kháng sinh. Thông thường, chủng theo sáng chế có thể cạnh tranh một cách chọn lọc với vi khuẩn gây bệnh bằng cách sản sinh các chất kháng vi sinh vật có hiệu quả đặc hiệu, và một cách lý tưởng là có thể đồng thời tăng cường sự sinh trưởng và khả năng sống sót của hệ vi khuẩn đường ruột có lợi. Tốt hơn nữa nếu chủng theo sáng chế có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch toàn thân ở động vật được điều trị.

Tốt hơn nữa các chủng đột biến của chủng *Bacillus subtiliss* DSM 32540 theo sáng chế là chủng đột biến tự phát. Thuật ngữ “chủng đột biến tự phát” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các chủng đột biến được đột biến từ chủng *Bacillus subtiliss* DSM 32540 mà không sử dụng các tác nhân gây đột biến có chủ ý. Chủng đột biến tự phát này có thể được thu nhận bằng các phương pháp thông thường, như nuôi cấy chủng *Bacillus subtilis* trong sự có mặt của ánh sáng cực tím (UV) và/hoặc bằng cách tác động nhiệt độ cao hoặc sản sinh thể nguyên sinh và/hoặc trong sự có mặt của kháng sinh nhất định mà chủng gốc miễn cảm và đánh giá hoạt tính sinh học được cải thiện hoặc khả năng được cải thiện để tăng cường một hoặc nhiều dấu hiệu phân biệt của sức khỏe động vật của các chủng kháng kháng sinh bất kỳ. Các phương pháp khác để xác định các chủng đột biến tự phát là đã biết trong lĩnh vực này. Tuy nhiên, ngoài các chủng đột biến tự phát được ưu tiên này, toàn bộ các loại chủng đột biến khác của chủng *Bacillus subtiliss* DSM 32540, như các chủng đột biến được thu nhận bằng cách thiết kế di truyền, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến các chủng đột biến không có trong tự nhiên, cụ thể là chủng đột biến tự phát như nêu trên, của chủng *Bacillus subtiliss* DSM 32540, có các đặc tính như nêu trên.

Theo phương án ưu tiên, tốt hơn nếu chủng theo sáng chế và thể hỗn tạp của chúng được sử dụng qua đường miệng cho người hoặc động vật.

Do đó, theo một mục đích khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, như thức ăn chăn nuôi, thực phẩm, nước uống và nước dùng để nuôi trồng cũng như dược phẩm, chứa chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế và/hoặc thể hỗn tạp của nó.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế và/hoặc thể hỗn tạp của nó làm thành phần lợi khuẩn trong thức ăn chăn nuôi hoặc thực phẩm.

Tốt hơn nếu thực phẩm theo sáng chế là sản phẩm sữa, cụ thể là sữa chua, phomat, sữa, bơ và phomat sữa ít béo.

Các tế bào của chủng theo sáng chế có thể có mặt, cụ thể là trong chế phẩm theo sáng chế, dưới dạng bào tử (không hoạt động), tế bào sinh dưỡng (đang sinh trưởng), tế bào ở trạng thái chuyển tiếp (đang chuyển tiếp từ pha sinh trưởng sang pha hình thành bào tử) hoặc hỗn hợp của ít nhất hai, cụ thể là toàn bộ các loại tế bào này. Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế chứa chủ yếu hoặc chỉ chứa bào tử của chủng theo sáng chế.

Ngoài ra, tế bào của chủng theo sáng chế cũng có thể được sử dụng ở dạng bất hoạt, không sống, do các tế bào không sống cũng được kỳ vọng là vẫn có tác dụng lợi khuẩn. Phương pháp bất hoạt tế bào của chủng theo sáng chế là đã biết trong lĩnh vực này.

Chủng *Bacillus subtiliss* theo sáng chế và chế phẩm chứa nó, khi được sử dụng cho động vật, tốt hơn nếu tăng cường sức khỏe của động vật này và/hoặc cải thiện tình trạng thể chất chung của động vật này và/hoặc cải thiện tốc độ chuyển hóa thức ăn của động vật này và/hoặc làm giảm tỷ lệ chết của động vật này và/hoặc làm tăng tỷ lệ sống của động vật này và/hoặc cải thiện mức độ tăng cân của động vật này và/hoặc làm tăng năng suất của động vật này và/hoặc làm tăng khả năng chống chịu dịch bệnh của động vật này và/hoặc làm tăng đáp ứng miễn dịch của động vật này và/hoặc thiết lập hoặc duy trì hệ vi khuẩn đường ruột khỏe mạnh trong động vật này và/hoặc làm giảm mức độ phát

tán tác nhân gây bệnh thông qua phân của động vật này. Đặc biệt, chủng theo sáng chế và chế phẩm nó có thể được sử dụng để hỗ trợ thiết lập lại hệ vi khuẩn đường ruột cân bằng khỏe mạnh sau khi sử dụng kháng sinh để điều trị bệnh.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp tăng cường sức khỏe của động vật và/hoặc cải thiện tình trạng thể chất chung của động vật và/hoặc cải thiện tốc độ chuyển hóa thức ăn của động vật và/hoặc làm giảm tỷ lệ chết của động vật và/hoặc làm tăng tỷ lệ sống sót của động vật và/hoặc cải thiện mức độ tăng cân của động vật và/hoặc làm tăng năng suất của động vật và/hoặc làm tăng khả năng chống chịu dịch bệnh của động vật và/hoặc làm tăng đáp ứng miễn dịch của động vật và/hoặc thiết lập hoặc duy trì hệ vi khuẩn đường ruột khỏe mạnh trong động vật và/hoặc làm giảm mức độ phát tán tác nhân gây bệnh thông qua phân của động vật, bao gồm bước sử dụng chủng theo sáng chế và/hoặc thể hỗn tạp của nó và/hoặc chế phẩm chứa chúng cho động vật.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng chủng theo sáng chế và/hoặc thể hỗn tạp của nó và/hoặc chế phẩm chứa chúng để tăng cường sức khỏe của động vật và/hoặc cải thiện tình trạng thể chất chung của động vật và/hoặc cải thiện tốc độ chuyển hóa thức ăn của động vật và/hoặc làm giảm tỷ lệ chết của động vật và/hoặc làm tăng tỷ lệ sống sót của động vật và/hoặc cải thiện mức độ tăng cân của động vật và/hoặc làm tăng năng suất của động vật và/hoặc làm tăng khả năng chống chịu dịch bệnh của động vật và/hoặc làm tăng đáp ứng miễn dịch của động vật và/hoặc thiết lập hoặc duy trì hệ vi khuẩn đường ruột khỏe mạnh trong động vật và/hoặc làm giảm mức độ phát tán tác nhân gây bệnh thông qua phân của động vật, bao gồm bước sử dụng chủng theo sáng chế và/hoặc thể hỗn tạp của nó và/hoặc chế phẩm chứa chúng cho động vật.

Sáng chế cũng đề cập đến chủng theo sáng chế như nêu trên và thể hỗn tạp của nó và chế phẩm chứa chúng, để tăng cường sức khỏe của động vật và/hoặc cải thiện tình trạng thể chất chung của động vật và/hoặc cải thiện tốc độ chuyển hóa thức ăn của động vật và/hoặc làm giảm tỷ lệ chết của động vật và/hoặc làm tăng tỷ lệ sống sót của động vật và/hoặc cải thiện mức độ tăng cân của động vật và/hoặc làm tăng năng suất của động vật và/hoặc làm tăng khả năng chống chịu dịch bệnh của động vật và/hoặc làm tăng đáp ứng miễn dịch của động vật và/hoặc thiết lập hoặc duy trì hệ vi khuẩn đường ruột khỏe mạnh trong động vật và/hoặc làm giảm mức độ phát tán tác nhân gây bệnh thông qua phân của động vật.

Thuật ngữ “làm tăng năng suất của động vật” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tác dụng bất kỳ sau: sản xuất nhiều trứng, sữa hoặc thịt hơn hoặc trứng, sữa hoặc thịt có chất lượng cao hơn, hoặc tăng sản lượng của con đã cai sữa.

Phương pháp và sử dụng chủng theo sáng chế và thể hỗn tạp của nó và chế phẩm chứa chúng có thể là sử dụng để điều trị bệnh hoặc sử dụng không để điều trị bệnh. Theo một phương án ưu tiên, phương pháp và sử dụng theo sáng chế là sử dụng không để điều trị bệnh, cụ thể là ứng dụng trong chăn nuôi.

Do phân của động vật chưa được xử lý do vi khuẩn gây bệnh và các thành phần khác có thể có tác dụng có hại cho môi trường, cụ thể là đối với chính động vật và/hoặc người tiếp xúc với phân này, mà có thể tránh được bằng cách cho động vật ăn hoặc xử lý trực tiếp phân hoặc ỏ rơm của động vật bằng chủng theo sáng chế hoặc thể hỗn tạp của nó và chế phẩm chứa chúng, nên sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kiểm soát và/hoặc phòng ngừa tác dụng có hại cho môi trường của phân hoặc dịch bị nhiễm, bao gồm bước đưa ít nhất một chủng, một thể hỗn tạp và/hoặc một chế phẩm theo sáng chế vào phân, dịch bị nhiễm, chất thải, hang ổ, hoặc bề phân. Tốt hơn nếu, chế phẩm theo sáng chế được đưa vào ở dạng lỏng, ví dụ, bằng cách phun, hoặc dưới dạng bột, ví dụ bằng cách rắc.

Do vi khuẩn có hại có thể có ảnh hưởng bất lợi đến độ sệt của chất thải và cụ thể là có thể làm cho chất thải lỏng hơn hoặc rất lỏng, mà có thể dẫn đến tổn thương bàn chân của gia cầm và có thể tránh được bằng cách cho động vật này ăn chủng theo sáng chế hoặc thể hỗn tạp của nó và chế phẩm chứa chúng. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kiểm soát và/hoặc cải thiện độ sệt của chất thải, cụ thể là phương pháp bảo đảm độ rắn của chất thải và/hoặc phương pháp phòng ngừa tổn thương bàn chân, bao gồm bước cho động vật, cụ thể là gia cầm, ăn ít nhất một chủng, một thể hỗn tạp và/hoặc một chế phẩm theo sáng chế.

Chủng theo sáng chế và thể hỗn tạp của nó cũng có thể được sử dụng để cải thiện chất lượng nước. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kiểm soát và/hoặc cải thiện chất lượng nước hoặc dung dịch nước, cụ thể là nước uống và/hoặc nước sử dụng để nuôi trồng, bao gồm bước đưa ít nhất một chủng và/hoặc ít nhất một thể hỗn tạp và/hoặc ít nhất một chế phẩm theo sáng chế vào nước hoặc dung dịch nước này.

Hơn nữa, chủng theo sáng chế và thể hỗn tạp của nó cũng có thể được sử dụng để xử lý các bệnh của thực vật do vi sinh vật gây ra. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xử lý và/hoặc phòng ngừa các bệnh của thực vật, cụ thể là cây trồng, do vi sinh vật gây ra bao gồm bước đưa ít nhất một chủng và/hoặc ít nhất một thể hỗn tạp và/hoặc ít nhất một chế phẩm theo sáng chế vào các thực vật này. Phương pháp này có thể được thực hiện ở dạng lỏng, như bằng cách phun, hoặc ở dạng rắn, cụ thể là dưới dạng bột.

Bằng cách sử dụng chủng, thể hỗn tạp và chế phẩm theo sáng chế, tốt hơn nếu ít nhất một đặc tính nêu trên được cải thiện, trong đó tốt hơn nếu đặc tính nêu trên được cải thiện ở mức độ ít nhất bằng 1%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 3% hoặc ít nhất bằng 5%, so với đối chứng âm thích hợp. Động vật chuẩn đã biết trong ngành chăn nuôi có thể được sử dụng làm đối chứng âm, nhưng tốt hơn nếu động vật được điều trị tương tự như động vật thử nghiệm, được sử dụng làm đối chứng âm, nhưng không sử dụng chủng và/hoặc thể hỗn tạp theo sáng chế.

Cụ thể là, chủng, thể hỗn tạp và chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng hoặc được cấp cho động vật ở lượng hữu hiệu ức chế và/hoặc làm giảm sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh trong ruột của động vật. Các vi khuẩn gây bệnh này bao gồm *Clostridia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Enterococci*, *Staphylococci*, *Aeromonas*, *Streptococci*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Haemophilus*, *Brachyspira* và *Vibrio*. Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để làm giảm lượng vi khuẩn gây bệnh, virus gây bệnh và động vật nguyên sinh gây bệnh phát tán trong phân của động vật. Các phương pháp theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để duy trì hoặc làm tăng sinh trưởng của vi khuẩn có lợi, như vi khuẩn axit lactic, trong ruột của động vật. Bằng cách làm giảm vi khuẩn gây bệnh và/hoặc làm tăng hoặc duy trì vi khuẩn có lợi, chế phẩm theo sáng chế có thể duy trì toàn bộ hệ vi khuẩn đường ruột khỏe mạnh.

Do đó, theo một mục đích khác, sáng chế cũng đề cập đến chủng theo sáng chế và thể hỗn tạp của nó và chế phẩm chứa chúng để ức chế và/hoặc làm giảm sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh và/hoặc duy trì và/hoặc làm tăng sinh trưởng của vi khuẩn có lợi trong ruột của động vật, trong đó tốt hơn nếu vi khuẩn gây bệnh được chọn từ *Clostridia*, cụ thể là vi khuẩn gây bệnh được chọn từ *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *C. novyi*, *C. septicum* và *C. colinum*, *Listeria*, cụ thể là vi khuẩn gây bệnh được chọn từ *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* và *L. welshimeri*, *Salmonella*, cụ thể là *S. enterica* bao gồm

các phân loài *enterica*, *arizonae*, *bongori* và cụ thể là các typ huyết thanh, *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. heidelberg* và *S. infantis*, *Enterococci*, cụ thể là *E. faecalis*, *E. faecium* và *E. cecorum*, *Staphylococci*, cụ thể là *S. aureus*, from *Aeromonas*, *Streptococci*, cụ thể là *S. suis* và *S. gallinaceus*, *Campylobacter*, cụ thể là *C. jejuni* và *C. coli*, *Escherichia coli*, *Haemophilus*, cụ thể là *Haemophilus parasuis*, *Brachyspira*, cụ thể là *Brachyspira hyodysenteriae* và *Vibrio*, cụ thể là *V. parahemolyticus* và *V. harveyi*, và tốt hơn nếu vi khuẩn gây bệnh được chọn từ vi khuẩn axit lactic, cụ thể là vi khuẩn gây bệnh được chọn từ *Lactobacilli* và *Bifidobacteria*.

Theo phương án ưu tiên, lượng của ít nhất một vi khuẩn gây bệnh, cụ thể là lượng của *Clostridium perfringens*, được giảm ít nhất 0,5 log, tốt hơn nữa nếu ít nhất 1 log, 2 log, hoặc 3 log.

Do đó, theo một mục đích khác, sáng chế cũng đề cập đến chủng theo sáng chế và thể hỗn tạp của nó và chế phẩm chứa chúng để ức chế và/hoặc làm giảm sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh và/hoặc duy trì và/hoặc làm tăng sinh trưởng của vi khuẩn có lợi trong ruột của động vật, trong đó tốt hơn nếu vi khuẩn gây bệnh được chọn từ *Clostridia*, cụ thể là vi khuẩn gây bệnh được chọn từ *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *C. novyi*, *C. septicum* và *C. colinum*, *Listeria*, cụ thể là vi khuẩn gây bệnh được chọn từ *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* và *L. welshimeri*, *Salmonella*, cụ thể là *S. enterica* bao gồm các phân loài *enterica*, *arizonae*, *bongori* và cụ thể là các typ huyết thanh, *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. heidelberg* và *S. infantis*, *Enterococci*, cụ thể là *E. faecalis*, *E. faecium* và *E. cecorum*, *Staphylococci*, cụ thể là *S. aureus*, *Aeromonas*, *Streptococci*, cụ thể là *S. suis* và *S. gallinaceus*, *Campylobacter*, cụ thể là *C. jejuni* và *C. coli*, *Escherichia coli*, *Haemophilus*, cụ thể là *Haemophilus parasuis*, *Brachyspira*, cụ thể là *Brachyspira hyodysenteriae* và *Vibrio*, cụ thể là *V. parahemolyticus* và *V. harveyi*, và tốt hơn nếu vi khuẩn gây bệnh được chọn từ vi khuẩn axit lactic, cụ thể là vi khuẩn gây bệnh được chọn từ *Lactobacilli* và *Bifidobacteria*.

Sự xuất hiện và/hoặc sự sinh trưởng tăng của vi khuẩn gây bệnh thực sự hoặc có thể dẫn đến bùng phát các bệnh nhất định. Ví dụ, sự xuất hiện và/hoặc sự sinh trưởng tăng của *Clostridium perfringens* có thể dẫn đến bùng phát các bệnh đường ruột, cụ thể là bùng phát bệnh viêm ruột hoại tử ở lợn và gia cầm. Sự xuất hiện và/hoặc sự sinh trưởng tăng của *Clostridium perfringens* cũng có thể dẫn đến bùng phát các bệnh khác như bệnh

viêm ruột do vi khuẩn, bệnh viêm da hoại thư và bệnh viêm gan đường mật. Thậm chí dạng nhẹ nhất của bệnh lây nhiễm bởi *Clostridium perfringens* có thể được kèm theo bệnh tiêu chảy, gây ra chất thải ướt và có thể dẫn đến các bệnh thứ phát như bệnh viêm bàn chân. Trong khi *Clostridium perfringens* typ C thường được xem là nguyên nhân chính gây bệnh viêm ruột hoại tử và bệnh viêm ruột hoại tử xuất huyết ở lợn con, thì *Clostridium perfringens* typ A được xem là nguyên nhân gây bệnh đường ruột ở lợn còn bú và cho ăn kèm theo bệnh viêm ruột hoại tử thể nhẹ và teo lông nhưng.

Clostridium difficile là tác nhân gây bệnh quan trọng mới phát sinh gây bệnh tiêu chảy chủ yếu ở lợn mới sinh. Lợn con bị lây nhiễm có thể bị chứng khó thở, trướng bụng, và sung búi.

Staphylococcus aureus subsp. aureus có thể gây bệnh ké chậu ở gà, bệnh viêm vú do liên cầu khuẩn ở lợn nái và vi khuẩn này có khả năng sản sinh độc tố gây ngộ độc thực phẩm ở người.

E. cecorum có thể gây tình trạng đi khập khiễng, bệnh viêm khớp và bệnh viêm xương tủy ở gà giò thường gây ra bởi bệnh viêm khớp và/hoặc mô xương. Hơn nữa, *E. cecorum* có thể gây bệnh viêm màng ngoài tim.

S. gallinaceus có thể gây nhiễm khuẩn huyết ở gia cầm. Các tổn thương vĩ mô bao gồm phi đại lách, chứng gan to, chứng thận to và tình trạng sung huyết. Nhiều vùng hoại tử và/hoặc bệnh nhồi máu ở gan và lách kết hợp với bệnh viêm nội mạc van tim cũng được quan sát.

C. coli là vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm, hầu hết mọi người thường bị nhiễm bệnh do ăn thịt lợn có chứa vi khuẩn này. *C. coli* gây bệnh viêm đường tiêu hóa và bệnh và viêm ruột cấp tính ở người, và bệnh tiêu chảy cấp tính. Lợn là vật chủ chính, nhưng *C. coli* cũng có thể lây nhiễm cho người, các loài gia cầm và nhiều động vật khác.

S. suis là tác nhân gây bệnh quan trọng ở lợn và một trong những nguyên nhân quan trọng nhất gây chết do vi khuẩn ở lợn con sau khi cai sữa gây nhiễm khuẩn huyết, bệnh viêm màng não và nhiều bệnh lây nhiễm khác.

Các tác nhân gây bệnh có thể cũng gây bệnh, như bệnh viêm đa khớp, bệnh viêm đa thanh dịch tơ huyết, rối loạn đường ruột sau cai sữa như bệnh tiêu chảy sau cai sữa và bệnh phù và chứng kiết lỵ ở lợn.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa chủng và/hoặc chế phẩm theo sáng chế nêu trên.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm ruột hoại tử và bệnh viêm ruột hoại tử xuất huyết, cụ thể là bệnh viêm ruột hoại tử cận lâm sàng và bệnh viêm ruột hoại tử xuất huyết, ở động vật, tốt hơn nếu lợn hoặc gia cầm, chứa chủng và/hoặc chế phẩm theo sáng chế nêu trên.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm ruột do vi khuẩn, bệnh viêm da hoại thư, bệnh viêm gan đường mật, bệnh lây nhiễm *Clostridium*, bệnh tiêu chảy, chứng khó thở, trướng bụng, sung búi, bệnh ké chấu, bệnh viêm da bàn chân, bệnh viêm vú do liên cầu khuẩn, tình trạng đi khắp khiêng, bệnh viêm khớp, bệnh viêm đa khớp, bệnh viêm đa thanh dịch tơ huyết, rối loạn đường ruột sau cai sữa như bệnh tiêu chảy sau cai sữa và bệnh phù, chứng kiết lỵ, bệnh viêm xương tủy, bệnh viêm khớp và/hoặc mô xương, bệnh viêm màng ngoài tim, phì đại lách, chứng gan to, chứng thận to, tình trạng sung huyết, tình trạng hoại tử, bệnh nhồi máu ở gan hoặc lách, bệnh viêm nội mạc van tim, nhiễm khuẩn huyết và/hoặc bệnh viêm màng não, ở động vật, tốt hơn nếu ở lợn hoặc gia cầm, chứa chủng và/hoặc chế phẩm theo sáng chế nêu trên.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh, tốt nhất nếu bệnh đường ruột, tốt hơn nếu bệnh viêm ruột hoại tử hoặc bệnh viêm ruột hoại tử xuất huyết, tốt nhất nếu bệnh viêm ruột hoại tử cận lâm sàng hoặc bệnh viêm ruột hoại tử xuất huyết cận lâm sàng, ở lợn hoặc gia cầm, bao gồm bước sử dụng chủng và/hoặc chế phẩm và/hoặc thể hỗn tạp theo sáng chế cho động vật cần điều trị.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh, tốt hơn nếu bệnh ở lợn hoặc gia cầm, được chọn từ bệnh viêm ruột do vi khuẩn, bệnh viêm da hoại thư, bệnh viêm gan đường mật, bệnh lây nhiễm *Clostridium*, bệnh tiêu chảy, chứng khó thở, trướng bụng, sung búi, bệnh ké chấu, bệnh viêm da bàn chân, bệnh viêm vú do liên cầu khuẩn, tình trạng đi khắp khiêng, bệnh viêm khớp, bệnh viêm đa khớp, bệnh viêm đa thanh dịch tơ huyết, rối loạn đường ruột sau cai sữa như bệnh tiêu chảy sau cai sữa và bệnh phù, chứng kiết lỵ, bệnh viêm xương tủy, bệnh viêm khớp và/hoặc mô xương, bệnh viêm màng ngoài tim, phì đại lách, chứng gan to, chứng thận to, tình trạng sung huyết, tình trạng hoại tử, bệnh nhồi máu ở gan hoặc lách, bệnh viêm nội mạc van tim, nhiễm

khuẩn huyết và/hoặc bệnh viêm màng não, bao gồm bước sử dụng chủng và/hoặc chế phẩm và/hoặc thể hỗn tạp theo sáng chế cho động vật cần điều trị.

Chủng theo sáng chế và/hoặc thể hỗn tạp của nó và/hoặc chế phẩm chứa chúng có thể được sử dụng cho động vật trong thức ăn chăn nuôi và/hoặc nước uống trong nhiều ngày trong toàn bộ cuộc đời của động vật hoặc trong các giai đoạn hoặc các khoảng thời gian cụ thể của cuộc đời của động vật. Ví dụ, chủng và/hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể chỉ được sử dụng trong chế độ dinh dưỡng khởi động hoặc chế độ dinh dưỡng kết thúc của động vật trang trại.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp tăng cường sức khỏe của người và/hoặc cải thiện tình trạng thể chất chung của người và/hoặc làm tăng khả năng chống chịu dịch bệnh của người và/hoặc làm tăng đáp ứng miễn dịch của người và/hoặc thiết lập hoặc duy trì hệ vi khuẩn đường ruột khỏe mạnh trong người, bao gồm bước sử dụng chủng theo sáng chế và/hoặc thể hỗn tạp của nó và/hoặc chế phẩm chứa chúng cho người.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng chủng theo sáng chế và/hoặc thể hỗn tạp của nó và/hoặc chế phẩm chứa chúng để tăng cường sức khỏe của người và/hoặc cải thiện tình trạng thể chất chung của người và/hoặc làm tăng khả năng chống chịu dịch bệnh của người và/hoặc làm tăng đáp ứng miễn dịch của người và/hoặc thiết lập hoặc duy trì hệ vi khuẩn đường ruột khỏe mạnh trong người, bao gồm bước sử dụng chủng theo sáng chế và/hoặc thể hỗn tạp của nó và/hoặc chế phẩm chứa chúng cho người.

Chế phẩm theo sáng chế, cụ thể là thức ăn chăn nuôi, thực phẩm và dược phẩm cũng như nước uống hoặc nước sử dụng để nuôi trồng, tốt hơn nếu chứa chủng theo sáng chế và được sử dụng cho động vật ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 1×10^3 đến 2×10^{12} CFU/g thức ăn chăn nuôi hoặc mL nước, cụ thể là ở hàm lượng khoảng 1×10^3 hoặc khoảng 1×10^4 hoặc khoảng 1×10^5 hoặc khoảng 1×10^6 hoặc khoảng 1×10^7 hoặc khoảng 1×10^8 hoặc khoảng 1×10^9 hoặc khoảng 1×10^{10} hoặc khoảng 1×10^{11} hoặc khoảng 1×10^{12} CFU/g thức ăn chăn nuôi hoặc mL nước, tốt hơn nếu ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 1×10^4 đến 1×10^{10} CFU/g thức ăn chăn nuôi hoặc mL nước, tốt hơn nữa nếu ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 1×10^4 đến 1×10^7 CFU/g thức ăn chăn nuôi hoặc mL nước.

Một cách tương ứng, tốt hơn nếu hàm lượng ưu tiên của chủng theo sáng chế và/hoặc thể hỗn tạp của nó trong thức ăn chăn nuôi, thực phẩm và nước uống theo sáng

chế nằm trong khoảng từ 0,1% đến 10% khối lượng, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 0,2% đến 5% khối lượng, tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 0,3% đến 3% khối lượng.

Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng cho toàn bộ các loài động vật, cụ thể là toàn bộ các loài động vật không phải người và không phải côn trùng, tốt hơn nữa nếu toàn bộ các loài động vật có xương sống như động vật có vú, động vật thủy sinh và chim.

Động vật có thể thu được lợi ích từ sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật trang trại, thú nuôi, động vật ngoại lai, động vật trong vườn thú, động vật thủy sinh, động vật được sử dụng trong thể thao, giải trí hoặc nghề nghiệp.

Tốt hơn nếu các thú nuôi được chọn từ chó, mèo, gia cầm và thú nuôi ngoại lai.

Tốt hơn nếu động vật thủy sinh được chọn từ các loài cá có vây và loài giáp xác được sử dụng để làm thực phẩm cho người. Động vật này bao gồm, cụ thể là, cá chép, cá rô phi, cá da trơn, cá ngừ, cá hồi salmon, cá hồi trout, cá chêm, cá tráp, cá pecca, cá tuyết, tôm, tôm hùm, cua, tôm pandan và tôm sông. Các loại cá hồi salmon được ưu tiên trong trường hợp này là cá hồi Đại Tây Dương, cá hồi đỏ, cá hồi masu, cá hồi vua, cá hồi chum, cá hồi coho, cá hồi Danube, cá hồi Thái Bình Dương và cá hồi hồng.

Tốt hơn nữa nếu động vật thủy sinh khác là cá nuôi được tiếp tục chế biến để thu được bột cá hoặc dầu cá. Về vấn đề này, tốt hơn nếu cá nuôi là cá trích, cá minh thái, cá mòi dầu, cá trống, cá ốt vảy nhỏ hoặc cá tuyết.

Theo phương án ưu tiên khác, động vật này là động vật trang trại, được nuôi để tiêu thụ hoặc dưới dạng động vật sản xuất thực phẩm, như gia cầm, lợn và động vật nhai lại.

Gia cầm có thể được chọn từ gia cầm sinh sản hoặc gia cầm nuôi trong nhà, và cả từ gia cầm làm cảnh hoặc chim hoang dã.

Gia cầm sinh sản được ưu tiên trong trường hợp này là gà, gà tây, vịt và ngỗng. Vật nuôi sinh sản trong trường hợp này tốt hơn nếu gia cầm được tối ưu hóa để sản xuất con giống non hoặc gia cầm được tối ưu hóa để lấy thịt.

Gia cầm làm cảnh hoặc chim hoang dã được ưu tiên là công, gà lôi, gà gô, gà gô chukkar, gà sao, chim cú, gà gô khổng lồ lai Âu Á, gà gô trắng, chim bồ câu và thiên nga, với chim cú được đặc biệt ưu tiên.

Gia cầm được ưu tiên khác là loại chim chạy, cụ thể là đà điều châu Phi và đà điều châu Úc, cũng như vẹt.

Tốt hơn nếu động vật nhai lại theo sáng chế được chọn từ gia súc, dê và cừu. Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho động vật nhai lại chưa trưởng thành để tăng cường sức khỏe của chúng và, cụ thể là, để làm giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy ở động vật này. Động vật nhai lại chưa trưởng thành là động vật nhai lại, bao gồm bê, ở độ tuổi nằm trong khoảng từ khi sinh ra đến khoảng mười hai tuần.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa ít nhất một chất mang hoặc thành phần thức ăn chăn nuôi điển hình hoặc hỗn hợp của chúng.

Các chất mang thích hợp là các thành phần bào chế trợ được bổ sung vào để cải thiện sự hoàn nguyên, hiệu lực, hoặc các đặc tính vật lý và/hoặc để trợ giúp trong việc bao gói và sử dụng. Các chất mang này có thể được bổ sung vào một cách riêng rẽ hoặc kết hợp. Các chất mang này có thể được chọn từ chất chống đông bánh, chất chống oxy hóa, chất độn, và/hoặc chất bảo vệ. Ví dụ về các chất mang hữu ích bao gồm polysacarit (cụ thể là tinh bột, maltodextrin, metylxenluloza, gôm, chitosan và/hoặc inulin), nguồn protein (cụ thể là bột sữa đã tách kem và/hoặc bột nước sữa ngọt), peptit, đường (cụ thể là lactoza, trehaloza, sucroza và/hoặc dextroza), lipit (cụ thể là lexitin, dầu thực vật và/hoặc dầu khoáng), muối (cụ thể là natri clorua, natri cacbonat, canxi cacbonat, đá phấn, đá vôi, magie cacbonat, natri phosphat, canxi phosphat, magie phosphat và/hoặc natri xitrat), và silicat (cụ thể là đất sét, cụ thể là đất sét beolit, silic dioxit vô định hình, silic dioxit được hun khói/kết tủa, zeolit, đất tẩy màu, baylith, clintpolit, montmorilonit, diatomit, talc, bentonit, và/hoặc muối silicat như nhôm, magie và/hoặc canxi silicat). Các chất mang thích hợp đối với phụ gia thức ăn chăn nuôi được đề cập trong American Feed Additive Manufacturers Association's Official Publication, được công bố hàng năm. Ví dụ, xem Official Publication of American Feed Control Officials, Sharon Krebs, editor, 2006 edition, ISBN 1-878341-18-9. Các chất mang này có thể được bổ sung vào sau khi cô cạn trường lên men và/hoặc trong khi và/hoặc sau khi làm khô. Các chất mang được ưu tiên theo sáng chế được chọn từ canxi cacbonat, diatomit và dầu thực vật.

Theo một phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến chế phẩm đậm đặc, cụ thể là chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi, tức là chế phẩm thích hợp để bào chế thức ăn chăn nuôi, mà chứa ít nhất một chủng theo sáng chế và ít nhất một chất mang như nêu trên, trong đó

ít nhất một chủng tốt hơn nếu ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10% khối lượng, tốt hơn nữa nếu ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,2 đến 5% khối lượng, cụ thể là ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,3% đến 3% khối lượng, tốt nhất nếu ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,4% đến 2,2% khối lượng, và ít nhất một chất mang tốt hơn nếu ở hàm lượng ít nhất là 90% khối lượng, tốt hơn nếu ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 90% đến 99,9% khối lượng, tốt hơn nữa nếu ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 95% đến 99,8% khối lượng, cụ thể là ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 97% đến 99,7% khối lượng, tốt nhất nếu ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 97,8% đến 99,6% khối lượng, và trong đó chất mang tốt hơn nếu về cơ bản bao gồm đá vôi, cụ thể là đá vôi với các phân diatomit và/hoặc dầu thực vật nhỏ hơn.

Chế phẩm được ưu tiên theo sáng chế, chứa chủng ổn định, có thể được sử dụng để bào chế thức ăn chăn nuôi và được phẩm cũng như nước uống và nước sử dụng để nuôi trồng tốt hơn nếu chứa chủng theo sáng chế với hàm lượng như mô tả nêu trên. Theo một phương án được ưu tiên, 50 đến 1000g chế phẩm đậm đặc này, cụ thể là 50, 100, 250, 500 hoặc 1000g chế phẩm đậm đặc này, được sử dụng trên mỗi tấn thức ăn chăn nuôi, nước uống hoặc nước sử dụng để nuôi trồng để thu được chế phẩm có thể được sử dụng cho động vật nuôi. Tốt hơn nếu chế phẩm đậm đặc này chứa ít nhất một chủng theo sáng chế với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 2×10^{11} CFU, cụ thể là nằm trong khoảng từ 2×10^9 đến 1×10^{11} CFU, trên mỗi g chế phẩm đậm đặc.

Bắt đầu từ các chế phẩm đậm đặc này, thức ăn chăn nuôi và thực phẩm có thể được bào chế bằng cách trộn chế phẩm đậm đặc này lẫn lộn với các thành phần thức ăn chăn nuôi hoặc thực phẩm điển hình.

Các thành phần thức ăn chăn nuôi điển hình thích hợp mà có thể được chứa trong chế phẩm theo sáng chế và/hoặc được sử dụng trong việc bào chế thức ăn chăn nuôi bắt đầu từ chế phẩm đậm đặc theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều thành phần sau: protein, hydrat cacbon, chất béo, các lợi khuẩn khác, prebiotic (thức ăn sử dụng cho vi khuẩn sống sót có lợi cho đường ruột), enzym, vitamin, chất điều biến miễn dịch, sản phẩm thay thế sữa, khoáng chất, axit amin, chất ức chế cầu trùng, các sản phẩm trên cơ sở axit và/hoặc thuốc, như kháng sinh.

Các thành phần chứa hydrat cacbon mà có thể được sử dụng theo sáng chế là, ví dụ, cỏ, thức ăn thô, bột lúa mì, bột hướng dương hoặc bột đậu tương, và hỗn hợp của chúng.

Các thành phần chứa protein mà có thể được sử dụng theo sáng chế là, ví dụ, protein đậu tương, protein đậu Hà lan, gluten lúa mì hoặc gluten ngô, và hỗn hợp của chúng.

Các thành phần chứa chất béo mà có thể được sử dụng theo sáng chế cụ thể là dầu, có nguồn gốc từ cả động vật và thực vật, như dầu thực vật, ví dụ, dầu đậu tương, dầu hạt cải, dầu hạt hướng dương, dầu hạt lanh hoặc dầu cọ, dầu cá, và hỗn hợp của chúng.

Các thành phần chứa protein mà còn chứa chất béo có thể được sử dụng theo sáng chế là, ví dụ, bột cá, bột loài nhuyễn thể, bột loài hai mảnh vỏ, bột mực ống hoặc vỏ tôm, cũng như hỗn hợp của chúng.

Tốt hơn nếu các lợi khuẩn khác (DFM) có thể được sử dụng kết hợp với chủng và thể hỗn tạp theo sáng chế là vi khuẩn được chọn từ các loài *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus alevi*, *Bacillus cereus*, *Bacillus badius*, *Bacillus thurigiensis*, *Enterococcus faecium*, và *Pediococcus acidilactici*. Ví dụ ưu tiên về các vi khuẩn này là *Bacillus subtilis* DSM 32539 (được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức vào ngày 14 tháng 06 năm 2017 theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest về sự công nhận quốc tế đối với việc lưu trữ vi sinh vật nhằm mục đích đăng ký sáng chế) và các chủng phát sinh của nó, *Bacillus licheniformis* DSM 32314 và *Bacillus subtilis* DSM 32315 (đều được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức vào ngày 12 tháng 05 năm 2016 theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest về sự công nhận quốc tế đối với việc lưu trữ vi sinh vật nhằm mục đích đăng ký sáng chế) và các chủng phát sinh của nó, *Bacillus subtilis* PB6 (như được mô tả trong Patent Mỹ số 7,247,299 và được lưu trữ với mã đăng ký ATCC số PTA-6737), được bán bởi Kemin dưới dạng nhãn hiệu CLOSTAT®, *Bacillus subtilis* C-3102 (như được mô tả trong Patent Mỹ số 4,919,936 và được lưu trữ với mã đăng ký FERM BP-1096 ở Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, in Japan), được bán bởi Calpis dưới dạng nhãn hiệu CALSPORIN®, *Bacillus subtilis* DSM 17299, được bán bởi Chr. Hansen dưới dạng nhãn hiệu GalliPro®, *Bacillus licheniformis* DSM 17236, được bán bởi Chr. Hansen dưới

dạng nhãn hiệu GalliProTect®, hỗn hợp của bào tử *Bacillus licheniformis* DSMZ 5749 và bào tử *Bacillus subtilis* DSMZ 5750, được bán bởi Chr. Hansen dưới dạng nhãn hiệu BioPlus®YC, *Bacillus subtilis* DSM 29784, được bán bởi Adisseo/Novozymes dưới dạng nhãn hiệu Alterion®, *Bacillus subtilis*, được bán bởi Chr. Hansen dưới dạng nhãn hiệu PORCBOOST®, hoặc chủng *Bacillus coagulans* như được mô tả trong Patent Mỹ số 6,849,256. Các lợi khuẩn không phải *Bacillus* khác, như *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, hoặc *Hansenula*, cũng có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Đặc biệt là, các lợi khuẩn khác trong thực phẩm được biết là có lợi cho sức khỏe của người có thể được sử dụng, như vi khuẩn sản sinh axit lactic, cụ thể là *Lactobacilli*, hoặc *Bifidobacteria*. Khi không được bào chế dưới dạng một phần của chế phẩm theo sáng chế, thì lợi khuẩn khác có thể được sử dụng cùng với chế phẩm theo sáng chế (ở cùng thời điểm hoặc khác thời điểm).

Tốt hơn nếu cơ chất đặc hiệu cho lợi khuẩn có thể được sử dụng theo sáng chế là oligosacarit, cụ thể là được chọn từ galactooligosacarit, silaylologosacarit, lactuloza, lactosucroza, fructooligosacarit, palatinoza hoặc isomaltoza oligosacarit, glycosyl sucroza, maltooligosacarit, isomalttooligosacarit, xyclodextrin, gentiooligosacarit, oligosacarit đậu tương, xylooligosacarit, dextran, pectin, polygalacturonan, rhamnogalacturonan, mannan, hemixenluloza, arabinogalactan, arabinan, arabinoxylan, tinh bột không tiêu hóa, mehbioza, chitosan, agaroza, inulin, tagatoza, polydextroza, và alginat.

Tốt hơn nếu enzym có thể được sử dụng trong thức ăn chăn nuôi chế phẩm theo sáng chế và hỗ trợ tiêu hóa thức ăn được chọn từ phytaza (EC 3.1.3.8 hoặc 3.1.3.26), xylanaza (EC 3.2.1.8), galactanaza (EC 3.2.1.89), galactosidaza, cụ thể là alpha-galactosidaza (EC 3.2.1.22), proteaza (EC 3,4), phospholipaza, cụ thể là phospholipaza A1 (EC 3.1.1.32), A2 (EC 3.1.1.4), C (EC 3.1.4.3), và D (EC 3.1.4.4), lysophospholipaza (EC 3.1.1.5), amylaza, cụ thể là alpha-amylaza (EC 3.2.1.1); lysozym (EC 3.2.1.17), glucanaza, cụ thể là beta-glucanaza (EC 3.2.1.4 hoặc EC 3.2.1.6), glucoamylaza, cellulaza, pectinaza, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Ví dụ về các phytaza có bán trên thị trường bao gồm Bio-Feed™ Phytase (Novozymes), Ronozyme® P và HiPhos™ (DSM Nutritional Products), Natuphos™ (BASF), Finase® và Quantum® Blue (AB Enzymes), Phyzyme® XP

(Verenium/DuPont) và Aextra® PHY (DuPont). Các phytaza được ưu tiên khác bao gồm các phytaza được mô tả trong, ví dụ, WO 98/28408, WO 00/43503, và WO 03/066847.

Ví dụ về xylanaza có bán trên thị trường bao gồm Ronozyme® WX và G2 (DSM Nutritional Products), Econase® XT và Lúa mạch (AB Vista), Xylathin® (Verenium) và Aextra® XB (xylanaza/beta-glucanaza, DuPont). Ví dụ về proteaza có bán trên thị trường bao gồm Ronozyme® ProAct (DSM Nutritional Products).

Vitamin có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm vitamin A, vitamin D3, vitamin E, vitamin K, ví dụ, vitamin K3, vitamin B12, biotin, cholin, vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, niacin, axit folic và panthothenat, ví dụ, Ca-D-panthothenat, hoặc hỗn hợp của chúng.

Chất điều hòa miễn dịch mà có thể được sử dụng là, ví dụ, kháng thể, xytokin, huyết tương được sấy phun, interleukin, hoặc interferon, hoặc hỗn hợp của chúng.

Khoáng chất có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm bo, coban, clorua, crom, đồng, florua, iot, sắt, mangan, molypden, selen, kẽm, canxi, magie, kali, hoặc natri, hoặc hỗn hợp của chúng.

Axit amin có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm lysin, alanin, threonin, metionin hoặc tryptophan, hoặc hỗn hợp của chúng.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi bao gồm bước trộn ít nhất một chủng và/hoặc ít nhất một thể hỗn tạp của nó và/hoặc ít nhất một chế phẩm đậm đặc theo sáng chế, cụ thể là ở lượng hữu hiệu để tăng cường sức khỏe động vật, cụ thể là sức khỏe đường ruột, với các thành phần thức ăn chăn nuôi, như protein, lipid và/hoặc hydrat cacbon, và tùy ý các chất có lợi khác, tốt hơn nếu như nêu trên, để thu được thức ăn chăn nuôi. Phương pháp này có thể cũng bao gồm bước tạo viên.

Các quy trình tạo viên chuẩn là đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng, bao gồm quá trình ép đùn thức ăn chăn nuôi khô hoặc bán ẩm. Tốt hơn nếu nhiệt độ tạo viên nằm trong khoảng từ 65°C đến 120°C.

Chủng và chế phẩm theo sáng chế có thể được thu nhận bằng cách nuôi cấy chủng theo sáng chế theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm việc sử dụng môi trường và các phương pháp khác như được mô tả trong, ví dụ, US 6,060,051,

EP0287699 hoặc US2014/0010792. Các quy trình nuôi cấy vi sinh vật ở quy mô lớn thông thường bao gồm lên men chìm, lên men trên giá thể rắn, hoặc nuôi cấy trên bề mặt lỏng. Vào cuối quá trình lên men, do chất dinh dưỡng đã cạn kiệt, các tế bào của các chủng bắt đầu chuyển tiếp từ pha sinh trưởng sang pha hình thành bào tử, sao cho sản phẩm cuối của quá trình lên men phần lớn là các bào tử, các chất chuyển hóa và môi trường lên men dư. Sự hình thành bào tử là một phần của vòng đời tự nhiên của các chủng này và nói chung được bắt đầu do tế bào đáp ứng với sự hạn chế chất dinh dưỡng. Sự lên men được thiết lập để thu được mức độ cao các đơn vị tạo khuẩn lạc của các tế bào *Bacillus subtilis* và để thúc đẩy sự hình thành bào tử. Các tế bào vi khuẩn, bào tử và chất chuyển hóa trong môi trường nuôi cấy thu được từ quá trình lên men có thể được sử dụng trực tiếp hoặc được cô bằng các phương pháp công nghiệp thông thường, như ly tâm, lọc dòng chảy tiếp tuyến, lọc sâu, và làm bay hơi. Canh trường lên men đã cô có thể được rửa, ví dụ, thông qua quá trình lọc tách, để loại bỏ canh trường lên men còn dư và các chất chuyển hóa.

Canh trường lên men hoặc canh trường nuôi cấy đặc có thể được làm khô mà có hoặc không bổ sung chất mang bằng cách sử dụng các quy trình hoặc các phương pháp làm khô thông thường như sấy phun, sấy thăng hoa, sấy trên khay, sấy tầng sôi, sấy bằng trống, hoặc làm bay hơi. Các sản phẩm khô thu được có thể được xử lý tiếp, như bằng cách nghiền hoặc tạo viên, để đạt được kích thước hạt hoặc dạng vật lý cụ thể. Các chất mang, như đã được mô tả trên đây, cũng có thể được bổ sung vào sau khi làm khô.

Thể hỗn tạp của chủng theo sáng chế có thể là thể hỗn tạp không chứa tế bào hoặc thể hỗn tạp chứa mảnh tế bào vụn hoặc thể hỗn tạp chứa hỗn hợp gồm các tế bào nguyên vẹn và mảnh tế bào vụn.

Thể hỗn tạp không chứa tế bào của chủng theo sáng chế có thể được thu nhận, ví dụ, bằng cách ly tâm và/hoặc lọc canh trường lên men. Phụ thuộc vào kỹ thuật được sử dụng, thể hỗn tạp không chứa tế bào này không thể hoàn toàn không chứa tế bào, mà có thể vẫn chứa một lượng tế bào nhỏ hơn. Do các tế bào tiết các hợp chất như các chất chuyển hóa, enzym và/hoặc peptit vào trong môi trường xung quanh, nên dịch nổi của các tế bào chứa hỗn hợp các hợp chất này, cụ thể là các chất chuyển hóa, enzym và/hoặc peptit, như được tiết bởi các tế bào này. Do đó, theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, thể hỗn tạp của các chủng là dịch nổi của canh trường lên men.

Các chế phẩm chứa mảnh tế bào vụn của các chủng có thể được thu nhận bằng cách làm vỡ tế bào bằng các kỹ thuật như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, ví dụ, bằng phương tiện cơ học hoặc bằng cách sử dụng áp suất cao. Phụ thuộc vào độ lớn của lực được đưa vào, thu được chế phẩm chỉ chứa các tế bào bị phá vỡ hoặc chế phẩm chứa hỗn hợp gồm mảnh tế bào vụn và các tế bào nguyên vẹn. Việc đồng nhất hóa các tế bào có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng máy ép tế bào French press, thiết bị siêu âm, thiết bị đồng nhất hóa, thiết bị vi lỏng hóa, máy nghiền bi, máy nghiền trục, máy nghiền sử dụng đá cuội, máy nghiền hạt, trục nghiền áp suất cao, máy nén trục đứng, máy trộn công nghiệp, máy trộn cắt tốc độ cao, máy trộn cánh khuấy, và/hoặc polytron đồng nhất hóa. Các biện pháp thay thế thích hợp là xử lý tế bào bằng enzym và/hoặc hóa học.

Thế hỗn tạp không chứa tế bào theo sáng chế còn bao gồm thế hỗn tạp được thu nhận bằng cách trước tiên là làm vỡ các tế bào bằng các kỹ thuật như nêu trên và tiếp theo loại bỏ mảnh tế bào vụn và các tế bào nguyên vẹn còn lại. Bước loại bỏ mảnh tế bào vụn và các tế bào nguyên vẹn còn lại có thể được thực hiện cụ thể là bằng cách ly tâm và/hoặc lọc.

Thế hỗn tạp của chủng theo sáng chế có thể chứa hoạt chất là ít nhất một chất chuyển hóa, tốt hơn nếu hỗn hợp các chất chuyển hóa, như được mô tả chi tiết dưới đây, và/hoặc ít nhất một enzym được chọn từ các proteaza, cụ thể là subtilisin, xylanaza và/hoặc xenlulaza, và/hoặc ít nhất một peptit, và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Thế hỗn tạp chứa hỗn hợp hữu hiệu của các chất chuyển hóa như được chứa trong chủng theo sáng chế và/hoặc như được chứa trong thế hỗn tạp tế bào như nêu trên, có thể được thu nhận, ví dụ, theo các phương pháp được nêu trong patent Mỹ số 6,060,051. Cụ thể là, thế hỗn tạp này có thể được thu nhận bằng cách kết tủa các chất chuyển hóa như được chứa trong thế hỗn tạp được nêu trên bằng cách sử dụng các dung môi hữu cơ như etyl axetat và tiếp theo hòa tan lại các chất chuyển hóa đã kết tủa trong dung môi thích hợp. Tiếp theo, các chất chuyển hóa có thể được tinh chế bằng cách lọc loại cở, sao cho tách nhóm các chất chuyển hóa thành các phân đoạn khác nhau dựa trên giới hạn khối lượng phân tử.

Thế hỗn tạp chứa hỗn hợp hữu hiệu của các chất chuyển hóa như được chứa trong chủng theo sáng chế và/hoặc như được chứa trong thế hỗn tạp tế bào như nêu trên, có thể

được thu nhận, ví dụ, theo các phương pháp được nêu trong patent Mỹ số 6,060,051. Cụ thể là, thể hỗn tạp này có thể được thu nhận bằng cách kết tủa các chất chuyển hóa như được chứa trong thể hỗn tạp được nêu trên bằng cách sử dụng các dung môi hữu cơ như ethyl axetat và tiếp theo hòa tan lại các chất chuyển hóa đã kết tủa trong dung môi thích hợp. Tiếp theo, các chất chuyển hóa có thể được tinh chế bằng cách lọc loại cở, sao cho tách nhóm các chất chuyển hóa thành các phân đoạn khác nhau dựa trên giới hạn khối lượng phân tử.

Tốt hơn nếu thể hỗn tạp chứa hỗn hợp hữu hiệu của các chất chuyển hóa theo sáng chế bao gồm ít nhất năm, tốt hơn nữa nếu ít nhất 6, 7, 8, 9, 10 hoặc 12; cụ thể là toàn bộ các chất chuyển hóa của chủng theo sáng chế. Hàm lượng của các chất chuyển hóa của chủng DSM 32540 được thể hiện trong Bảng 5.1. Tốt hơn nếu các chất chuyển hóa có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 400 đến 4000 Dalton, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 500 đến 3500 Dalton.

Tốt hơn nếu theo sáng chế lượng hữu hiệu của chủng và/hoặc thể hỗn tạp và/hoặc chế phẩm theo sáng chế luôn được sử dụng trong các phương án theo sáng chế. Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng tạo ra ít nhất một tác dụng có lợi cho động vật và/hoặc môi trường, cụ thể là với các đặc tính như nêu trên, so với động vật không được sử dụng chủng và/hoặc thể hỗn tạp và/hoặc chế phẩm theo sáng chế, nhưng đã được sử dụng cùng chế độ dinh dưỡng (bao gồm thức ăn chăn nuôi và các hợp chất khác).

Trong các ứng dụng điều trị bệnh, tốt hơn nếu lượng có tác dụng điều trị bệnh của chủng và/hoặc thể hỗn tạp và/hoặc chế phẩm theo sáng chế được sử dụng. Thuật ngữ “lượng có tác dụng điều trị bệnh” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng đủ để làm giảm, đảo ngược hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh lý ở động vật. Mức liều tối ưu đối với động vật khác nhau có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bằng cách đánh giá khả năng của chế phẩm để (i) ức chế hoặc làm giảm vi khuẩn gây bệnh trong ruột ở các liều khác nhau, (ii) làm tăng hoặc duy trì hàm lượng của vi khuẩn có lợi và/hoặc (iii) tăng cường sức khỏe của động vật, cụ thể là sức khỏe đường ruột, ở các liều khác nhau, trong số các tiêu chuẩn khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Các đặc điểm của chủng liên quan đến khả năng sống sót trong đường tiêu hóa.

Các chủng *Bacillus subtiliss* được sàng lọc từ các mẫu môi trường khác nhau để thu được chủng tốt làm vi sinh vật cho động vật ăn trực tiếp (DFM)/lợi khuẩn. Do chủng này được dự định để đạt được tiềm năng đầy đủ của nó trong ruột của động vật đích, chủng này được sàng lọc sơ bộ để chịu được các điều kiện môi trường khác nhau và các điều kiện liên quan đến ruột. Bào tử của chủng được tạo ra (Nicholson and Setlow 1990), rửa và ủ ở nhiệt độ 80°C trong 20 phút (tiệt trùng theo phương pháp Pasteur), sau đó chuẩn độ theo các độ pha loãng logarit/1 trong 10 bằng cách sử dụng môi trường thạch canh thang thịt bê (VI, DifcoTM, no. 234420, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany). Dịch pha loãng ở độ pha loãng cao nhất thứ hai trước khi không sinh trưởng được bảo quản ở nhiệt độ -80°C và sử dụng làm điểm khởi đầu chuẩn hóa cho toàn bộ các đánh giá khác từ trạng thái bào tử. Để mô phỏng quá trình vận chuyển qua dạ dày (Argenzio 2004a; Trampel and Duke 2004), khả năng sống sót khi tiếp xúc với axit được đánh giá dựa theo Larsen *et al.* (2014). Quá trình sinh trưởng của các tế bào sinh dưỡng cũng được đánh giá ở độ pH thấp biểu thị quá trình sinh trưởng trong điều kiện dạ dày/diều và mề, cũng như trong sự có mặt của mật ở nồng độ lên đến 4 mM (B8631, CAS 8008-63-8, Sigma-Aldrich) ở độ pH=7 để xác nhận quá trình trưởng của chủng ở đoạn gần của ruột non ngay sau khi ra khỏi dạ dày hoặc mề (Argenzio 2004b; Trampel and Duke 2004). Khả năng sống sót của chủng trong điều kiện kỵ khí ở ruột (Argenzio 2004b; Trampel and Duke 2004) được đánh giá bằng cách nuôi cấy dung dịch bào tử đã được chuẩn hóa trong các điều kiện kỵ khí (AnaeroPakTM, Thermo Fisher Scientific) trong môi trường VI có bổ sung 2,5 mM KNO₃ (Glaser *et al.*, 1995). Hơn nữa, hoạt tính phân giải protein và phân giải xenluloza kỵ khí của các chủng được đánh giá trên đĩa thạch VI có bổ sung 1% bột sữa đã tách kem (70166, Sigma-Aldrich) hoặc 0,1% xenluloza AZCL-HE không tan trong nước (I-AZCEL, Megazyme International, Bray, Ireland).

Hơn nữa, hoạt tính phân giải xenluloza kỵ khí của các chủng được đánh giá trên đĩa thạch VI có bổ sung 0,1% xenluloza AZCL-HE không tan trong nước (I-AZCEL, Megazyme International, Bray, Ireland). Sau 24 giờ trong các điều kiện kỵ khí, màu xanh của thạch biểu thị hoạt tính xenlulaza.

Ứng suất thẩm thấu, như cũng được thấy trong ruột (Argenzio 2004b; Trampel and Duke 2004), được đánh giá bằng cách xác định quá trình trương trên thạch VI có bổ sung 10% NaCl (den Besten et al., 2009). Cuối cùng, độ ổn định nhiệt của bào tử được đánh giá để xác định độ ổn định tạo viên bằng cách cho bào tử tiếp xúc với nhiệt độ 99°C trong 20 phút (Palop et al., 1996) và tiếp theo nuôi cấy trên thạch VI.

Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 sống sót sau khi đi qua dạ dày mô phỏng, quá trình trương của chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 được quan sát bắt đầu ở độ pH=6. Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 sinh trưởng kỵ khí và có thể phân hủy xenluloza không tan trong nước và protein trong các điều kiện kỵ khí. Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 có thể sinh trưởng trong sự có mặt của mật ở nồng độ bằng 2mM và 4mM, trong sự có mặt của mật lợn ở hàm lượng bằng 0,3% khối lượng và trong sự có mặt của mật gà ở hàm lượng bằng 0,3% khối lượng cũng như trong sự có mặt của NaCl ở hàm lượng bằng 10% khối lượng. Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 đạt được số lượng bào tử trung bình bằng $9,1 \times 10^8$ CFU/mL, và các bào tử của chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 có khả năng sống sót sau khi tiếp xúc với nhiệt độ 99°C trong 20 phút.

Tài liệu tham khảo

Argenzio, R. A. (2004a). Secretion of the Stomach and Accessory Glands, p. 405 - 418. In: Reece, W. O. (ed.), *Duke's Physiology of Domestic Animals*; Twelfth Edition, Chapter 25; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Argenzio, R. A. (2004b). Digestive and Absorptive Functions of the Intestines, p. 419 - 437. In: Reece, W. O. (ed.), *Duke's Physiology of Domestic Animals*; Twelfth Edition, Chapter 26; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Dawson, R. M. C.; Elliot, D. C.; Elliot, W. H.; Jones, K. M. (1986). *Data for Biochemical Research*; 3rd edition, Oxford Science Publishing, United Kingdom.

Den Besten HMW, Mols M, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T. (2009). Phenotypic and transcriptomic analyses of mildly and severely salt-stressed *Bacillus cereus* ATCC 14579 cells. *Appl Environ Microbiol.* 75:4111-9.

Glaser, P., A. Danchin, F. Kunst, P. Zuber, and M. M. Nakano. (1995). Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177:1112-1115

Nicholson W. L., Setlow P. Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood C R, Cutting S M, editors. Molecular biological methods for *Bacillus*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.; 1990. pp. 27-74.

Palop, A., Raso, J., Pagan, R., Condon, S. and Sala, F.J. (1996). Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenized foods. International Journal of Food Microbiology 29, 1-10.

Trampel, D. W. and Duke, G. E. (2004). Avian Digestion, p. 488 - 500. In: Reece, W. O. (ed.), Duke's Physiology of Domestic Animals; Twelfth Edition, Chapter 29; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Ví dụ 2. Hiệu quả của chủng so sánh so với tình trạng của chủng được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng trực tiếp cho động vật/lợi khuẩn sử dụng làm dinh dưỡng cho động vật - đánh giá định lượng khả năng chống chịu với mật.

Để đánh giá khả năng cạnh tranh của chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 được chọn lọc từ ví dụ 1, phân tích tiêu chuẩn được thực hiện bằng cách sử dụng chủng *Bacillus subtilis* DSM 17299 và/hoặc chủng *Bacillus licheniformis* DSM 17236 có bán trên thị trường. Khả năng sinh trưởng của các chủng trong đoạn gần của ruột non trong sự có mặt của mật ở độ pH trung tính ngay sau khi đi qua dạ dày (Argenzio 2004b; Trampel and Duke 2004) được xác định bằng quá trình trưởng của chủng trong môi trường VIB có bổ sung mật lợn ở hàm lượng bằng 0,3% khối lượng (Sigma Aldrich). Môi trường nuôi cấy qua đêm với hỗn dịch tế bào chủng tiềm năng (50 μ L) và 10 mL VIB trong bình nón dung tích 100mL được ủ ở nhiệt độ 37°C và tốc độ bằng 200 vòng/phút, sau đó khoảng 50 μ L môi trường nuôi cấy qua đêm được chuyển vào các đĩa dạng tổ ong 100 giếng (Oy Growth Curves Ab Ltd, former Thermo Labsystems, Helsinki, Finland) với 1 mL VIB ở độ pH = 7 có bổ sung mật lợn ở hàm lượng bằng 0,3% khối lượng để thu được OD 0.2 per mL. Chủng sinh trưởng đặc hiệu ở nhiệt độ 37°C và tốc độ bằng 200 vòng/phút được quan sát trong 48 giờ với mật độ quang được xác định 15 phút một lần bằng cách sử dụng thiết bị Bioscreen C MBR với gói phần mềm BioLink (Oy Growth Curves Ab Ltd). Đánh giá định lượng đối với mỗi chủng được so sánh dưới dạng diện tích dưới đường cong nằm trong khoảng thời điểm từ 0 đến 5 giờ (AUC5 = mật độ quang x thời gian (giờ)), diện tích dưới đường cong nằm trong khoảng thời điểm từ 0 đến 10 giờ (AUC10 =

mật độ quang x thời gian (giờ)), và thời gian cho đến khi các chủng đạt được mật độ quang tối đa (T_{max} tính theo đơn vị giờ). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Quá trình sinh trưởng của chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 và các chủng chuẩn DSM 17299 và DSM 17236 trong sự có mặt của mật lợn ở hàm lượng bằng 0,3% khối lượng.

Chủng	T_{max}	AUC5	AUC10	AUC30
DSM 32540	9,25	3,33	10,35	31,68
DSM 17299	26	1,57	3,68	22,67
DSM 17236	36,75	1,19	3,27	15,02

AUC5, diện tích dưới đường cong nằm trong khoảng thời điểm từ 0 đến 5 h = mật độ quang x giờ; AUC10, diện tích dưới đường cong nằm trong khoảng thời điểm từ 0 đến 10 h = mật độ quang x giờ; T_{max} , thời gian tính theo đơn vị giờ cho đến khi đạt được mật độ quang cực đại.

Trong so sánh trực tiếp, chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 đạt đến mật độ quang cực đại của nó trong sự có mặt của mật lợn ở hàm lượng bằng 0,3% khối lượng nhanh hơn 16,75 giờ so với chủng DSM 17299 và nhanh hơn 27,5 giờ so với chủng DSM 17236. Ngoài ra, chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 tương ứng sinh trưởng nhanh gấp 2,7 lần trong 5 giờ đầu, nhanh gấp 3,2 lần trong 10 giờ đầu và nhanh gấp 2,1 lần trong 30 giờ đầu so với quá trình sinh trưởng của chủng DSM 17236. Hơn nữa, chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 có khả năng sinh trưởng trong sự có mặt của mật gà ở hàm lượng bằng 0,3% khối lượng.

Tài liệu tham khảo

Argenzio, R. A. (2004b). Digestive and Absorptive Functions of the Intestines, p. 419 - 437. In: Reece, W. O. (ed.), *Duke's Physiology of Domestic Animals*; Twelfth Edition, Chapter 26; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Trampel, D. W. and Duke, G. E. (2004). Avian Digestion, p. 488 - 500. In: Reece, W. O. (ed.), *Duke's Physiology of Domestic Animals*; Twelfth Edition, Chapter 29; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Ví dụ 3. Hiệu quả của chủng so sánh so với vi sinh vật được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng trực tiếp cho động vật (DFM) / lợi khuẩn trong tình trạng kỹ thuật đối với sự dinh dưỡng của động vật - quá trình trưởng trong sự có mặt của các axit béo mạch ngắn (short chain fatty acid - SCFA).

Quá trình trưởng tương đối của các chủng DSM 32540 và DSM 17299 được đánh giá trong sự có mặt của các axit béo mạch ngắn như được quan sát trong ruột với tầm quan trọng tăng dần về phía ruột già (Argenzio 2004b; Trampel and Duke 2004). Các thử nghiệm được bắt đầu bằng cách sử dụng dung dịch bào tử đã được chuẩn hóa như được mô tả trong ví dụ 1 đánh giá quá trình trưởng hiếu khí trong môi trường VI ở nhiệt độ 37°C và độ pH=6, thông số đọc được là quá trình trưởng so với quá trình không sinh trưởng. Đối với thử nghiệm này, môi trường VI được điều chỉnh đến độ pH = 6 bằng cách sử dụng dung dịch đệm McIlvaine (Palop et al., 1996) và sau đó có bổ sung 0,05% axit axetic (HA, 537020, CAS 64-19-7, Sigma-Aldrich), 0,05% axit propionic (HP, P1386, CAS 79-09-4, Sigma-Aldrich) hoặc 0,2% axit lactic (HL, W261106, CAS 50-21-5, Sigma-Aldrich). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Đánh giá quá trình trưởng của chủng *Bacillus subtiliss* DSM 32540 và chủng DSM 17299 trong sự có mặt của axit béo mạch ngắn ở độ pH = 6.

Chủng	Axit axetic	Axit propionic	Axit lactic
DSM 32540	Có	Có	Có
DSM 17299	Không sinh trưởng	Không sinh trưởng	Không sinh trưởng

Chủng *Bacillus subtiliss* DSM 32540 có khả năng sinh trưởng ở độ pH=6 trong sự có mặt của axit axetic, axit propionic và axit lactic, trong khi đó chủng DSM 17299 không có khả năng sinh trưởng từ giai đoạn bào tử trong các điều kiện này.

Tài liệu tham khảo

Argenzio, R. A. (2004b). Digestive and Absorptive Functions of the Intestines, p. 419 - 437. In: Reece, W. O. (ed.), *Duke's Physiology of Domestic Animals*; Twelfth Edition, Chapter 26; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Palop, A., Raso, J., Pagan, R., Condon, S. and Sala, F.J. (1996). Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology* 29, 1-10.

Trampel, D. W. and Duke, G. E. (2004). Avian Digestion, p. 488 - 500. In: Reece, W. O. (ed.), *Duke's Physiology of Domestic Animals*; Twelfth Edition, Chapter 29; Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Ví dụ 4. Hiệu quả của chủng so sánh so với vi sinh vật được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng trực tiếp cho động vật (DFM)/lợi khuẩn trong tình trạng kỹ thuật đối với sự dinh dưỡng của động vật - đánh giá định lượng hoạt tính enzym.

Tương tự với thử nghiệm được thực hiện trong ví dụ 2, các chủng DSM 32540, DSM 17299 và DSM 17236 được so sánh để đánh giá hoạt tính phân giải xylan hiệu quả tương ứng. Hoạt tính xylanaza được xác định như được mô tả trong Larsen et al., (2014). Phân tích được thực hiện ba lần lặp lại độc lập, sau đó tính trung bình dưới dạng mili đơn vị trên mỗi microlit dung dịch.

Bảng 4.1. Hoạt tính xylanaza của các chủng DSM 32540, DSM 17299 và DSM 17236.

Chủng	Hoạt tính xylanaza (mU/mL)
DSM 32540	11,8 $\pm$ 0,3
DSM 17299	11,8 $\pm$ 1,5
DSM 17236	7,9 $\pm$ 1,3

Trong so sánh trực tiếp, chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 có hoạt tính xylanaza cao gấp 1,5 lần so với chủng DSM 17236 và hoạt tính xylanaza tương đương so với chủng DSM 17299.

Tài liệu tham khảo

Larsen, N., Thorsen, L., Kpikpi, E. N., Stuer-Lauridsen, B., Cantor, M. D., Nielsen, B., Brockmann, E., Derkx, E. M. F. and Jespersen, L. (2014). Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. Applied microbiology and biotechnology, 98(3), 1105-1118.

Ví dụ 5. Hiệu quả của chủng so sánh so với vi sinh vật được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng trực tiếp cho động vật (DFM)/lợi khuẩn trong tình trạng kỹ thuật đối với sự dinh dưỡng của động vật - sự biểu hiện của các chất chuyển hóa và sự ức chế tác nhân gây bệnh.

Tương tự như các thử nghiệm được thực hiện trong ví dụ 2, các chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 và chủng thể đại DSM 10 được so sánh để đánh giá số lượng tương ứng của các chất chuyển hóa được biểu hiện và các tác nhân gây bệnh được ức chế trong môi trường tương ứng. Để phân tích sự biểu hiện của chất chuyển hóa, các chủng khởi động được sinh trưởng và các thử nghiệm được thực hiện như được mô tả trong Scholz et al. (2011). Từ môi trường canh thang Luria Bertani (10mL, LB, Thermo Fisher

Scientific), chủng khởi động được sinh trưởng trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C và tốc độ bằng 160 vòng/phút trong bình dung tích 100mL, 100μL được chuyển sang chủng chính. Chủng chính được sinh trưởng trong môi trường LB (10mL) chứa dung dịch kim loại vi lượng KellyT (0,2mL/L, LBKelly, Scholz et al. 2011), hoặc môi trường canh thang đậu tương Trypticase (10mL, Oxoid, Thermo Fisher Scientific) với 0,6% chiết xuất nấm men (Y1625, CAS 8013-1-2, Sigma-Aldrich; môi trường canh thang thu được được viết tắt là TSBYE), cả hai trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C ở tốc độ bằng 160 vòng/phút trong bình dung tích 100mL. Môi trường nuôi cấy chính (4mL) được kết hợp với n-butanol (2mL) trong ống thử nghiệm dung tích 15mL, lắc xoáy trong 3 phút, sau đó siêu âm trong 15 phút. Sau khi ly tâm trong 1 phút ở tốc độ bằng 5000 vòng/phút, pha hữu cơ được phân tách, làm khô trong điều kiện chân không và phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao - khối phổ ion hóa bằng phun điện tử (HPLC-ESI-MS; Chen et al., 2006). Mỗi mẫu được đo ở hai chế độ khác nhau, chế độ âm và dương, và khối phổ được thu nhận. Các pic thu được như được báo cáo tương tự trong Teo and Tan (2005) được chuyển đổi thành khối lượng phân tử tính theo đơn Da. Các kết quả để so sánh được thể hiện trong Bảng 5.1.

Bảng 5.1. (a) So sánh các chất chuyển hóa được biểu hiện bởi chủng DSM 32540 và chủng thể đại DSM 10 tương ứng trong môi trường canh thang LB-Kelly và TSBYE (n/d có nghĩa là không phát hiện được)

Chủng	330 Da	350 Da	352 Da	423 Da	424 Da	477 Da	480 Da	572 Da	993 Da	994 Da	1008 Da	1143 Da
DSM 10	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	có	n/d	có	n/d
DSM 32540	có	có	có	có	có	có	có	có	có	có	có	có

Bảng 5.1. (b) So sánh các chất chuyển hóa được biểu hiện bởi chủng DSM 32540 và chủng thể đại DSM 10 tương ứng trong môi trường canh thang LB-Kelly và TSBYE (n/d có nghĩa là không phát hiện được)

Chủng	1022 Da	1026 Da	1036 Da	1040 Da	1050 Da	1460 Da	1462 Da	1476 Da	1489 Da	1504 Da	1505 Da	3401 Da
DSM 10	có	n/d	có	n/d	có	có	có	có	n/d	có	n/d	có
DSM 32540	có	có	có	có	có	có	n/d	có	có	có	có	có

Ngoài ra, hoạt tính ức chế tác nhân gây bệnh thông qua quá trình sản sinh chất chuyển hóa thứ cấp của *Bacillus subtilis*, dưới dạng một phần của các chất chuyển hóa từ Bảng 5.1. nhưng không được đánh giá chặt chẽ, được đánh giá bằng thử nghiệm đối kháng giết khuếch tán (Parente et al. 1995).

Thử nghiệm đối kháng giết khuẩn được thực hiện với 7 tác nhân gây bệnh khác nhau, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* DSM 1296, *Enterococcus cecorum* DSM 20683, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* DSM 20231, *Streptococcus gallinaceus* DSM 15349, *Streptococcus suis* ATCC 43765 và *Campylobacter coli* ATCC 33559.

Ba chủng *Clostridium perfringens* gây bệnh tiềm năng được thử nghiệm là chủng điển hình *Clostridium perfringens* ATCC 13124 từ Teo and Tan (2005), cũng như hai chủng phân lập gây bệnh *Clostridium perfringens* từ lợn, do RIPAC-LABOR GmbH, Potsdam-Golm, Germany cung cấp. Chủng *Clostridium perfringens* typ C từ Ripac như sau: Chủng BB-081_Cpe và chủng BB-031_Cpe được phân lập từ đường tiêu hóa của lợn dương tính với bệnh viêm ruột hoại tử. Chủng BB-081_Cpe là dương tính với cpb2 (Songer et al. 2005) và âm tính với netB và chủng BB-031_Cpe được thử nghiệm dương tính với độc tố $\beta 2$ (Allaart et al. 2012). Chủng ATCC 13124 được biết là chủng sinh độc tố alpha typ A đóng vai trò là chủng *Clostridia* điển hình.

Clostridium difficile là tác nhân gây bệnh quan trọng mới phát sinh gây bệnh tiêu chảy chủ yếu ở lợn mới sinh (Songer et al. 2000). Lợn con bị lây nhiễm có thể bị chứng khó thở, trướng bụng, và sung búi. Bệnh tiêu chảy có thể không xuất hiện ở toàn bộ các lợn bị lây nhiễm. Chủng DSM 1296 là chủng *C. difficile* điển hình đã biết và sản sinh độc tố tế bào.

Staphylococcus aureus subsp. aureus có thể gây bệnh ké chấu ở gà (McMullin 2004), bệnh viêm vú do liên cầu khuẩn ở lợn nái (Contreras et al. 2011) và vi khuẩn này có khả năng sản sinh độc tố gây ngộ độc thực phẩm ở người (2016 Centers for Disease Control and Prevention). Chủng DSM 20231 là chủng huyết thanh typ 3.

E. cecorum có thể gây tình trạng đi khập khiễng, bệnh viêm khớp và bệnh viêm xương tủy ở gà giò thường gây ra bởi bệnh viêm khớp và/hoặc mô xương. Ngoài ra, *E. cecorum* có thể gây bệnh viêm màng ngoài tim [Kense et al. 2011]. Chủng DSM 20683 được phân lập từ manh tràng của gà.

S. gallinaceus có thể gây nhiễm khuẩn huyết ở gia cầm. Các tổn thương vĩ mô bao gồm phù đại lách, chứng gan to, chứng thận to và tình trạng sung huyết. Nhiều vùng hoại tử và/hoặc bệnh nhồi máu ở gan và lách kết hợp với bệnh viêm nội mạc van tim cũng được quan sát [Collins et al. 2002].

S. suis là tác nhân gây bệnh quan trọng ở lợn và một trong những nguyên nhân quan trọng nhất gây chết do vi khuẩn ở lợn con sau khi cai sữa gây nhiễm khuẩn huyết, bệnh viêm màng não và nhiều bệnh lây nhiễm khác [Goyette-Desjardins *et al.* 2014]. Chuồng ATCC 43765 thuộc nhóm huyết thanh học: R; kiểu huyết thanh 2 và được phân lập từ lợn.

C. coli là vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm, hầu hết mọi người thường bị nhiễm bệnh do ăn thịt lợn có chứa vi khuẩn này. *C. coli* gây bệnh viêm đường tiêu hóa và bệnh và viêm ruột cấp tính ở người, và bệnh tiêu chảy cấp tính [Fitzgerald *et al.* 2007]. Lợn là vật chủ chính, nhưng *C. coli* cũng có thể lây nhiễm cho người, các loài gia cầm và nhiều động vật khác. Chuồng ATCC 33559 được phân lập từ phân lợn.

Các chủng *Bacillus* được sinh trưởng trong môi trường TSBYE (10mL, 30g/L TSB + 6g/L chiết xuất nấm men) hoặc môi trường LB-Kelly (môi trường LB có bổ sung dung dịch chứa các nguyên tố vi lượng của môi trường DSMZ 1032) trong 16 giờ ở nhiệt độ 37°C và tốc độ bằng 200 vòng/phút trong bình lắc dung tích 100mL. Các chủng gây bệnh được sinh trưởng trong các điều kiện thích hợp dưới dạng môi trường nuôi cấy lỏng đến mật độ quang ở bước sóng 595nm ít nhất bằng 1, sau đó môi trường nuôi cấy (100μL) được cấy trải bằng thìa vô trùng trên bề mặt của các đĩa thạch. Đối với *S. gallinaceus*, các đĩa thạch BHI, toàn bộ các tác nhân gây bệnh còn lại, các đĩa thạch TSBYE được sử dụng. Ba giếng đường kính 9 mm được cắt thành các đĩa khô. Giếng thứ nhất được sử dụng làm môi trường đối chứng không được cấy với chủng thử nghiệm, giếng thứ hai được cấy với chủng *Bacillus* không ức chế (100μL, *B. cereus* var. *toyoi*, NCIMB 40112), giếng thứ ba được cấy với chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 hoặc DSM 17299 (100μL). Sau 24 giờ ủ trong các điều kiện thích hợp ở nhiệt độ 37°C, đường kính vòng ly giải (mm) được xác định bằng cách đo từ mép của giếng được cắt đến bờ của vết được ly giải. Mỗi khuẩn lạc được đo hai lần (theo chiều ngang và chiều dọc), sau đó tính trung bình. Các kết quả được thể hiện trong các bảng sau.

Bảng 5.2: So sánh hoạt tính ức chế các chủng gây bệnh Clostridium của *Bacillus subtilis* DSM 32540, DSM 17236 và DSM 17299 trong các thử nghiệm đối kháng giếng khuếch tán trên môi trường LB Kelly, các trị số được tính theo đường kính vòng ly giải tác nhân gây bệnh (mm).

Tác nhân gây bệnh → Lợi khuẩn ↓	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	<i>Clostridium perfringens</i> BB-081 Cpe	<i>Clostridium perfringens</i> BB_031 Cpe	<i>C. difficile</i> DSM 1296
DSM 32540	20,3	26,3	18,7	12,3
DSM 17299	8	8	8	n/d
DSM 17236	17	15,5	8	8

Dữ liệu cho thấy rằng DSM 32540 có khả năng ức chế sinh trưởng của *Clostridium perfringens* và *S. difficile* rất hữu hiệu, cụ thể là so với DSM 17299.

Bảng 5.3: So sánh hoạt tính ức chế các chủng gây bệnh *Staphylococcus*, *Streptococcus* và *Campylobacter* của *Bacillus subtilis* DSM 32540, DSM 17236 và DSM 17299 trong các thử nghiệm đối kháng giếng khuếch tán trên môi trường LB Kelly, các trị số được tính theo đường kính vòng ly giải tác nhân gây bệnh (mm).

Tác nhân gây bệnh → Lợi khuẩn ↓	<i>S. aureus subsp. aureus</i> DSM 20231	<i>S. gallinaceus</i> DSM 15349	<i>S. suis</i> DSM 9682	<i>C. coli</i> DSM 4689
DSM 32540	21	21,8	30,4	28,4
DSM 17299	8	8	13,5	8
DSM 17236	n/d	n/d	20,7	8

Dữ liệu cho thấy rằng DSM 32540 có khả năng ức chế sinh trưởng của *S. aureus subsp. aureus*, *S. gallinaceus*, *S. suis* và *C. coli* rất hữu hiệu, cụ thể là so với DSM 17299.

Bảng 5.4: So sánh hoạt tính ức chế các chủng gây bệnh *Enterococcus cecorum* của *Bacillus subtilis* DSM 32540, DSM 17236 và DSM 17299 trong các thử nghiệm đối kháng giếng khuếch tán trên môi trường TSBYE, các trị số được tính theo đường kính vòng ly giải tác nhân gây bệnh (mm).

Tác nhân gây bệnh → Lợi khuẩn ↓	<i>E. cecorum</i> DSM 20683
DSM 32540	16,9
DSM 17299	8
DSM 17236	13,7

Dữ liệu cho thấy rằng DSM 32540 có khả năng ức chế sinh trưởng của *E. cecorum* rất hữu hiệu, cụ thể là so với DSM 17299.

Tài liệu tham khảo

Teo, A. Y.-L. and Tan, H.-M. (2005). *Inhibition of Clostridium perfringens by a novel strain of Bacillus subtilis from the gastrointestinal tracts of healthy chickens*. Appl. Environm. Microbiol., 71:4185-90.

Paul McMullin (2004) Chapter: *Staphylococcus aureus subsp. aureus* infections in chickens. Book: A pocket guide to poultry health and disease. Publisher: 5m Publishing.

Parente, E., Brienza, C., Moles, M., & Ricciardi, A. (1995). *A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity*. Journal of microbiological methods, 22(1), 95-108.

GA Contreras, JM Rodríguez (2011) *Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology* Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, Volume 16, Issue 4, pp 339-356

(2016) U.S. Department of Health & Human Services (<https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/staphylococcal.html>)

Allaart, J. G., de Bruijn, N. D., van Asten, A. J., Fabri, T. H., and Gröne, A. (2012). NetB-producing and beta2-producing *Clostridium perfringens* associated with subclinical necrotic enteritis in laying hens in the Netherlands. Avian Pathol., 41:541-546

JG Songer, FA Uzal (2005) *Clostridial Enteric Infections in Pigs*. Volume: 17 issue: 6, page(s): 528-536 Journal of Veterinary Diagnostic Investigation

Songer JG, Post KW, Larson DJ, et al. (2000) *Infection of neonatal swine with Clostridium difficile*. Swine Health Prod. 2000;8(4):185-189

MJ Kense, WJM Landman (2011) *Enterococcus cecorum infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology*. Avian Pathology, Volume 40, Issue 6

MD Collins, RA Hutson, E Falsen, E Ingana, M Bisgaard (2002) *Streptococcus gallinaceus sp. nov., from chickens*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 1161-1164

G Goyette-Desjardins, J-P Auger, J Xu, M Segura, M Gottschalk (2014) *Streptococcus suis, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing*. Emerg Microbes Infect. 2014 Jun; 3(6):e45.

C Fitzgerald, I Nachamkin (2007). *Campylobacter and Arcobacter*. In P. R. Murray (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 933-946). Washington D.C.: ASM Press.

Ví dụ 6. Đánh giá định lượng hoạt tính enzym chống oxy hóa.

Sự có mặt của các gốc oxy phản ứng trong mất cân bằng oxy hóa, có thể gây ra bởi các điều kiện căng thẳng, ví dụ ứng suất nhiệt (Lin et al., 2006), có thể dẫn đến phân hủy ADN, protein hoặc lipid. Các lợi khuẩn có thể hỗ trợ hệ thống bảo vệ oxy hóa của vật chủ bằng cách làm tăng hoạt tính enzym chống oxy hóa (Aluwong et al., 2013, Mishra et al., 2015). Do đó, chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 được sàng lọc hoạt tính enzym chống oxy hóa, cụ thể là hoạt tính superoxit dismutaza và hoạt tính catalaza.

Để đánh giá hoạt tính catalaza của các màng sinh học được sinh trưởng của chủng, chủng được sinh trưởng trong môi trường LB có bổ sung glucoza trong 15 giờ ở nhiệt độ 37° C và tốc độ bằng 200 vòng/phút trong các bình lắc. Các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh đến mật độ quang OD₆₀₀ bằng 1,0 và các môi trường nuôi cấy (10μL) được cấy điểm lên các đĩa thạch chứa môi trường TSBYE (30g/L TSB + 6g/L chiết xuất nấm men) hoặc môi trường LB-Kelly (môi trường LB có bổ sung dung dịch chứa các nguyên tố vi lượng của môi trường DSMZ 1032), được ủ ở nhiệt độ 37° C trong điều kiện hiếu khí và ở nhiệt độ 37°C trong điều kiện 0,2% oxy trong 15 giờ. Dung dịch H₂O₂ 3% (dung dịch hydroperoxit 3%, Sigma-Aldrich®) được nhỏ vào các khuẩn lạc và hoạt tính catalaza được phân tích. Thông số đọc được là mức độ sản sinh O₂ và H₂O từ H₂O₂ là kết quả của quá trình tạo bọt trên các khuẩn lạc.

Bảng 6.1. Đánh giá hoạt tính catalaza của các khuẩn lạc của chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 được sinh trưởng dưới dạng màng sinh học trên môi trường LB-Kelly hoặc môi trường TSBYE trong các điều kiện hiếu khí.

Chủng	TSBYE	LB-Kelly
DSM 32540	Có	Có

Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 có hoạt tính catalaza khi được sinh trưởng trong các điều kiện hiếu khí.

Bảng 6.2. Đánh giá hoạt tính catalaza của các khuẩn lạc của chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 được sinh trưởng dưới dạng màng sinh học trên môi trường LB-Kelly hoặc môi trường TSBYE trong điều kiện 0,2% oxy.

Chủng	TSBYE	LB-Kelly
DSM 32540	Có	Có

Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 cũng có hoạt tính catalaza khi được sinh trưởng trong điều kiện 0,2% oxy.

Hoạt tính catalaza cũng được phân tích trong chiết xuất protein thu được từ các tế bào sinh vật phù du được sinh trưởng trong các điều kiện hiếu khí. Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 được sinh trưởng trong 15 giờ trong môi trường LB chứa glucoza ở nhiệt độ 37°C và tốc độ bằng 200 vòng/phút trong các bình lắc. Môi trường nuôi cấy tế bào (8mL) được thu nhận bằng cách ly tâm trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C và tốc độ bằng 3000 vòng/phút và hạt tế bào được tạo hỗn dịch lại trong dung dịch PBS có độ pH = 7,3. Các chiết xuất tế bào hòa tan được thu nhận bằng máy nghiền bi kích cỡ nhỏ. Các tế bào đã được phá vỡ được ly tâm trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C và tốc độ bằng 13000 vòng/phút và dịch nổi được sử dụng trong các bước tiếp theo. Nồng độ protein của các chiết xuất protein được xác định bằng phương pháp Bradford với chất chuẩn là albumin huyết thanh bò (Bradford, 1976). Nồng độ của các chiết xuất protein được điều chỉnh bằng dung dịch PBS có độ pH = 7,3, các chiết xuất protein được trộn với dung dịch đệm nạp mẫu tự nhiên (2x, VWR) và phương pháp điện di trên gel tự nhiên (gel polyacrylamit không biến tính 10%, Biorad) được thực hiện để phân tách protein ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, hoạt tính catalaza trong các chiết xuất tế bào từ các tế bào sinh vật phù du được phát hiện bằng cách nhuộm màu gel bằng dung dịch nhuộm màu chứa 1% FeCl₃ và 1% K₃Fe(CN)₆ (Woodbury et al., 1971). Hoạt tính catalaza có thể được quan sát dưới dạng các băng sáng màu.

Chủng	LB with glucoza
DSM 32540	Có

Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 cũng có hoạt tính catalaza trong các điều kiện thử nghiệm đặc hiệu này.

Hoạt tính superoxit dismutaza cũng được phân tích trong các chiết xuất protein từ các tế bào được sinh trưởng trong các điều kiện hiếu khí. Các chiết xuất tế bào được thu nhận bằng phương pháp mô tả nêu trên và protein được phân tách bằng phương pháp điện di trên gel tự nhiên ở nhiệt độ 4°C. Hoạt tính superoxit dismutaza được phát hiện bằng cách nhuộm màu gel bằng phương pháp nhuộm màu xanh nitro tetrazolium do Beauchamp and Fridovich phát triển (1971).

Chủng	LB chứa glucoza
DSM 32540	Có

Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 có hoạt tính superoxit dismutaza trong các điều kiện thử nghiệm.

Tài liệu tham khảo

Aluwong, T.; Kawu, M.; Raji, M.; Dzenda, T.; Govwang, F.; Sinkalu, V. and Ayo, J. (2013). Effect of Yeast Probiotic on Growth, Antioxidant Enzyme Activities and Malondialdehyde Concentration of Broiler Chickens. *Antioxidants* 2: 326-339

Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Lin, H.; Decuypere, E. and Buyse, J. (2006). Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 144: 11-17.

Mishra, V.; Shah, C.; Mokashe, N.; Chavan, R.; Yadav, H. and Prajapati, J. (2015). Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *J. Agric. Food Chem* 63: 3615-3626

Woodbury, W.; Spencer, A.K. and Stahmann, M.A. (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem.* 44: 301-305.

Ví dụ 7. Phát hiện sản sinh lactat

Các kết quả nghiên cứu *in vitro* cho thấy rằng hoạt tính ức chế tái bản của tác nhân gây bệnh có thể được điều hòa bởi các hợp chất khối lượng phân tử thấp (Oelschläger 2010). Đứng đầu danh sách này là các axit béo mạch ngắn, ví dụ axit lactic (Oelschläger 2010). Hoạt tính ức chế các tác nhân gây bệnh có thể được giải thích theo cơ chế làm giảm độ pH bằng cách sản sinh axit lactic (Fuller 1992). Vi khuẩn axit lactic, cũng được sử dụng làm lợi khuẩn trong thức ăn chăn nuôi có khả năng sản sinh axit lactic là sản phẩm cuối cùng chính trong quá trình lên men carbohydrate (Halasz 2009). Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 có thể sản sinh lactat *in vitro*.

Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 và *Bacillus toyonensis* - lợi khuẩn bacillus có khả năng sản sinh axit lactic- được so sánh đánh giá về khả năng sản sinh lactat kỵ khí. Khả năng sản sinh lactat được xác định như sau: Các chủng khởi động của chủng được sinh trưởng qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong môi trường TSBYE (10mL, 30g/L TSB +

6g/L chiết xuất nấm men) trong các điều kiện hiếu khí. Chúng chính được cấy với mật độ quang OD₆₀₀ bằng 0,2 trong môi trường TSBYE (10mL) có bổ sung 25g/L sucroza và 5mM KNO₃ trong các ống Falcon dung tích 15mL ở nhiệt độ 37°C kết hợp không lắc trong 48 giờ. Hàm lượng lactat trong dịch nổi được đo bằng phương pháp HPLC-UV.

	Tỷ lệ sản sinh lactat (%)
<i>Bacillus toyonensis</i>	100,00
DSM 32540	147,47

Chúng *Bacillus subtilis* DSM 32540 sản sinh lactat ở tỷ lệ cao hơn 50% so với chủng lợi khuẩn *Bacillus toyonensis*.

Tài liệu tham khảo

A Halasz (2009) Book: Food quality and standards Volume III; EOLSS Publishers Co Ltd. Chapter: Lactic acid bacteria.

TA Oelschläger (2010) Mechanisms of probiotic actions - A review. International Journal of Medical Microbiology Volume 300, Issue 1, January 2010, Pages 57-62.

R Fuller 1992 Publisher: Springer science and business media Dordrecht Book: Probiotics: The scientific basis Chapter 9.8 Antimicrobial activity.

Ví dụ 8. So sánh năng suất của lợn được nuôi ở Trung Quốc được cho ăn *Chủng Bacillus subtilis* DSM 32540

Thử nghiệm bao gồm 168 lợn con đã cai sữa 25 ngày (Landrace × Yorkshire), được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm điều trị (Bảng 8.1), với 8 lô lặp lại, 7 lợn con có cân nặng trung bình bằng $6,5 \pm 0,5$ kg trong mỗi lô. Ba nhóm điều trị chủ yếu dựa trên ngô-bột đậu tương (Bảng 8.2) và bao gồm; 1. Đối chứng cơ bản (Đối chứng), 2. Đối chứng + 30g Virginiamycin/MT thức ăn chăn nuôi (AGP), 3. Đối chứng + Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 ở 250 g/MT chứa $2,0 \times 10^9$ CFU/g (DSM 32540). Điều trị thử nghiệm là cho ăn theo nhu cầu ở dạng cám từ 1 đến 42 ngày tuổi

Bảng 8.1: Điều trị thử nghiệm

Điều trị	Kiểu chế độ dinh dưỡng	Lượng chất phụ gia được bao gồm
1	Chế độ dinh dưỡng đối chứng (không có AGP)	--
2	Chế độ dinh dưỡng đối chứng + kháng sinh (AGP, virginiamycin (0,04 kg/t))	--
3	Chế độ dinh dưỡng đối chứng + DSM 32540	500 g/t

Bảng 8.2. Thành phần và thành phần dinh dưỡng của chế độ dinh dưỡng cơ bản.

Thành phần	% Khối lượng
Ngô	48
SBM, 46%	11,68
Lúa mạch	10
SBM lên men, 50%	6
Nước sữa, 3,5%	5,3
Đậu tương đầy đủ chất béo	4
Dầu đậu tương	3
Bột cá	3
Glucosa	2,5
Đường mía	2,5
IS, 38%	0,98
CPM, 23%	0,45
Lys, 98%	0,45
Chất axit hóa	0,3
Thr	0,25
Muối	0,24
Metamino	0,2
Valin	0,08
Try	0,07
Thức ăn sơ chế	1
Thành phần dinh dưỡng	% Khối lượng
Protein thô	22,00
Xơ thô	3,89
ME, MJ/kg	14,23
ME, kcal/kg	3402
NE, MJ/kg	10,40
NE, kcal/kg	2485
Ca (%)	0,80
Av P (%)	0,40
SID Lys	1,35
SID Met	0,57
SID Cys	0,24
SID M+C	0,81
SID Thr	0,85
SID Trp	0,30
SID Arg	0,97
SID Ile	0,74
SID Leu	1,45
SID Val	0,92

Các kết quả của các phương pháp điều trị đến mức độ tăng cân, tốc độ chuyển hóa thức ăn, mức độ hấp thu dinh dưỡng và bệnh tiêu chảy của các lợn con được thể hiện trong Bảng 8.3 và 8.4.

Bảng 8.3. Dữ liệu năng suất từ 1 đến 42 ngày sau cai sữa.

Tuổi	Điều trị		
	Đối chứng âm	Đối chứng dương	DSM 32540
ADG 1-42	0,460	0,482	0,476
Mức độ hấp thu dinh dưỡng	0,770	0,772	0,773

trung bình hàng ngày, kg			
FCR 1-42	2,42	2,34	2,11

Bảng 8.4. Điểm số đánh giá tình trạng bệnh tiêu chảy theo tỷ lệ phần trăm lợn con bị bệnh tiêu chảy

Điều trị	Đối chứng âm	Đối chứng dương	DSM 32540
1~7 ngày	8,99	7,72	7,72
8~21 ngày	6,16	4,69	4,43
22~42 ngày	2,05	1,73	1,95

Mức độ tăng cân trung bình hàng ngày, tốc độ chuyển hóa thức ăn, mức độ hấp thu dinh dưỡng cũng như điểm số đánh giá tình trạng bệnh tiêu chảy được cải thiện đáng kể bằng cách bổ sung chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 so với đối chứng âm, nhưng tương đương với đối chứng dương chứa AGP.

Ví dụ 9. So sánh năng suất của lợn được nuôi ở Tây Ban Nha được cho ăn chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540

Thử nghiệm bao gồm 64 lợn con đã cai sữa 21 ngày với cân nặng trung bình bằng $7,3 \pm 0,35$ kg được chia ngẫu nhiên thành hai nhóm điều trị (Bảng 9.1), với 6 lô lặp lại, 4 lợn con trong mỗi lô. Hai nhóm điều trị chủ yếu dựa trên ngô-bột đậu tương (Bảng 9.2) và bao gồm; 1. Đối chứng cơ bản (Đối chứng), 2. Đối chứng + Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 ở 250 g/MT chứa $2,0 \times 10^9$ CFU/g (DSM 32540). Điều trị thử nghiệm là cho ăn theo nhu cầu ở dạng cám từ 1-42 ngày tuổi sau cai sữa.

Bảng 9.1. Thành phần và thành phần dinh dưỡng của chế độ dinh dưỡng cơ bản.

Thành phần	% Khối lượng
Ngô	34,63
Bột đậu tương, 44% CP	26,10
Lúa mạch	10,00
Bột nước sữa	9,00
Bột đậu tương, đầy đủ chất béo	8,40
Bột hạt cải dầu	5,00
Dầu đậu tương	3,00
Monocanxiphsphat	1,09
Đá vôi (CaCO_3)	0,95
Thức ăn sơ chế dùng cho lợn	0,50
L-Lys HCl (78%)	0,42
Muối (NaCl)	0,38
MetAMINO®	0,24
ThreAMINO®	0,15
ValAMINO®	0,06
TrpAMINO®	0,07
Tổng cộng	100,0000
Thành phần dinh dưỡng	% Khối lượng

Protein thô	22,00
Xơ thô	3,89
ME, MJ/kg	14,23
ME, kcal/kg	3402
NE, MJ/kg	10,40
NE, kcal/kg	2485
Ca (%)	0,80
Av P (%)	0,40
SID Lys	1,35
SID Met	0,57
SID Cys	0,24
SID M+C	0,81
SID Thr	0,85
SID Trp	0,30
SID Arg	0,97
SID Ile	0,74
SID Leu	1,45

Bảng 9.2. Năng suất của lợn từ ngày 0 đến ngày 42, có và không có chế độ dinh dưỡng có bổ sung chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 trên cơ sở chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc kháng sinh tăng cường sinh trưởng.

Age	Điều trị	
	Đối chứng âm	DSM 32540
ADG, kg	0,263	0,297
Mức độ hấp thu dinh dưỡng trung bình hàng ngày, kg	0,389	0,429
FCR	1,507	1,473

Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 có toàn bộ các đặc tính được cải thiện đáng kể so với đối chứng âm.

Thông tin lưu trữ vi sinh vật

Chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 theo sáng chế được xác định bằng cách sàng lọc các chủng phân lập có trong tự nhiên. Chủng *Bacillus subtilis* này được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany vào ngày 14 tháng 06 năm 2017 theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest về sự công nhận quốc tế đối với việc lưu trữ vi sinh vật nhằm mục đích đăng ký sáng chế với mã đăng ký nêu trên dưới tên EVONIK DEGUSSA GMBH, nay đã được đổi tên thành EVONIK OPERATIONS GMBH.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> EVONIK OPERATIONS GMBH					
<120> CHỦNG <i>BACILLUS SUBTILIS</i> CÓ HOẠT TÍNH LỢI KHUẨN, THỨC ĂN CHĂN NUÔI, THỰC PHẨM, VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHỦNG NÀY					
<130> 2017P00172EP					
<160> 5					
<170> PatentIn version 3,5					
<210> 1					
<211> 1537					
<212> ADN					
<213> <i>Bacillus subtilis</i>					
<400> 1					
agagtttgat	cctggctcag	gacgaacgct	ggcggcgtgc	ctaatacatg	caagtcgagc 60
ggacagatgg	gagcttgctc	cctgatgtta	gcggcggacg	ggtgagtaac	acgtgggtaa 120
cctgcctgta	agactgggat	aactccggga	aaccggggct	aataccggat	ggttggttta 180
accgcatggt	tcaaacataa	aaggtggcct	cggctaccac	ttacagatgg	accgcggcgc 240
cattagctag	ttggtgaggt	aacggctcac	caaggcgacg	atgcgtagcc	gacctgagag 300
ggtgatcggc	cacactggga	ctgagacacg	gcccagactc	ctacgggagg	cagcagtagg 360
gaatcttccg	caatggacga	aagtctgacg	gagcaacgcc	gcgtgagtga	tgaaggtttt 420
cggatcgtaa	agctctgttg	ttaggggaaga	acaagtaccg	ttcgaatagg	gcggtacctt 480
gacggtacct	aaccgaaag	ccacggctaa	ctacgtgccg	gcagccgcgc	taatacgtag 540
gtggcaagcg	ttgtccggaa	ttattggcgc	taaagggtc	gcaggcggtt	tcttaagctt 600
gatgtgaaag	ccccggctc	aaccggggag	ggtcattgga	aactggggaa	cttgagtcca 660
gaagaggaga	gtggaattcc	acgtgtagcg	gtgaaatgcg	tagagatgtg	gaggaacacc 720
agtggcgaa	gcgactctct	ggctctgtaac	tgacgtcgag	gagcgaaagc	gtggggagcg 780
aacaggatta	gataccctgg	tagtccacgc	cgtaaaccgat	gagtgcctaag	tgtagggggg 840
tttccgcccc	ttagtctgct	agctaaccga	ttaaagcactc	cgctggggga	gtacggctcg 900
aagactgaaa	ctcaaaggaa	ttgacggggg	ccgcacaag	cggtgaggca	tgtggtttaa 960
ttcgaagcaa	cgcgaagaac	cttaccaggt	cttgacatcc	ctcgacaatc	ctagagatag 1020
gacgtccctt	tcggggggcag	agtgacaggt	ggtgcattggt	tgctgctcagc	tcgtgtcgtg 1080
agatgttggt	taaagtcctg	caacgagcgc	aacccttgat	cttagttgcc	agcattcagt 1140
tgggcactct	aaggtgactg	ccggtgacaa	accggaggaa	ggtggggatg	acgtcaaatac 1200
atcatgcccc	ttatgacctg	ggctacacac	gtgctacaat	ggacagaaca	aagggcgagc 1260
aaaccgcgag	gttaagccaa	tcccacaaat	ctgttctcag	ttcggatcgc	agtctgcaac 1320
tcgactgcgt	gaagctggaa	tcgctagtaa	tcgcggtatca	gcactgcgcgc	gtgaatacgt 1380
tcccgggctt	tgtacacacc	gcccgtcaca	ccacgagagt	ttgtaacacc	cgaagtcggt 1440
gaggtaacct	tttaggagcc	agccgcgcaa	ggtgggacag	atgattgggg	tgaagtcgta 1500
acaaggtagc	cgtatcgga	ggtgcggctg	gatcacc		1537
<210> 2					
<211> 1197					
<212> ADN					
<213> <i>Bacillus subtilis</i>					
<400> 2					
gtgaaaaata	aatggctgtc	ttttttttcg	ggtaagggtcc	agcttgaatt	gacgggaaga 60
gggattgagc	ggctccttaa	tgaatgcaca	agacagggga	ttccgggtctt	tcattgtcaaa 120
aaaaagaaag	aagcgtatc	gttatatata	cagcttcagg	atgtacatgc	ctttcggcgcg 180
gtgagaagta	aatttaaatg	taaagcccg	tttatcaatc	ggaagggatt	tccttctctg 240
ttgctgaaat	caaagctgaa	tataggattt	acgatcggtt	ttgcgatttt	tttcatcctt 300
ttgtttttac	tttccaatat	ggtgtggaaa	attgatgtga	caggcgctaa	gcctgaaaca 360
gaacatcaaa	tgaggcgagc	tcttaaatgaa	atcggcgtca	aaaagggcgc	tctgcagttt 420
ttaatgatgt	cgcccgaaaa	aatacagaaa	tcgttaacca	atggaataga	caatatcact 480
tgggtcggag	ttgatctgaa	ggggacgacc	attcacatga	aagttgtgga	gaaaaatgaa 540
cccgaaaaag	aaaagtatgt	tagcccgcg	aatattgtcg	ccaaaaagaa	agcaaccatt 600
acgagaatgt	ttgtgcacaa	aggacagcct	atggccgcga	tacacgatca	tggtgaaaag 660
gggcagctgc	ttgtttcggg	actgatcggc	agcgagagcc	atcagcagga	agttgcctca 720
aaagcagaaa	tttacggaga	aacctggat	agatcagaag	tgacagctcc	gcttgaaaca 780
ttatttaacg	tctatacggg	caaagtaag	acaaagcaca	agctttctat	tggttctttg 840
gcaatcccg	tctgggggat	gacgtttaaa	aaagaggaat	tgaagcatcc	aaaaacagaa 900
aaagaaaaag	attcgcttca	ttttctcgga	tttaagctcc	ctgtatctta	tgtaaaagag 960
caaacgagag	aaagtgaaga	ggctttcgga	aaatatacga	aagaagaagc	agttcaagaa 1020
ggcattaaat	tgggtaaaac	ggatgtagag	gataaaaatg	gcgaaaacgc	cagggtgaaa 1080
agtgaaaaa	ttttgcacca	gactgttgag	aatggtaaa	taaaagttgat	tattctctac 1140
caagttatag	aagatatcgt	tcaaaccaca	cctattgtca	gggagactga	agaatga 1197
<210> 3					
<211> 1923					
<212> ADN					
<213> <i>Bacillus subtilis</i>					
<400> 3					
gtggctatgg	aacagcagca	aaacagttat	gatgaaaatc	agatacaggt	actagaagga 60
ttggaagctg	ttcgtaaaag	acgggggatg	tatatcggtt	cgacaaacag	caaaggcctt 120
caccacctgg	tatgggaaat	tgctgacaa	agtattgacg	aagccctcgc	cggttattgt 180
acggatatca	atatccaaat	cgaaaaagac	aacagtatca	cggttgtaga	taatggccgc 240
ggtattccag	tcgggtattc	tgaaaaaatg	ggcgcgtcctg	cggtagaagt	cattatgacg 300
gtgcttcag	caggagaaa	atttgacgga	agcggctata	aagtatccgc	aggattacac 360
ggtgtaggtg	cgctggctcg	aaacgcacta	tcaacagagc	ttgatgtgac	ggttcaccgt 420
gacggtaaaa	ttcaccgcca	aacctataaa	cgcggaagtc	cggttacaga	ccttgaaatc 480
attggcgaaa	cggatcatat	aggaacgacg	acacattttg	ttccggaccc	tgaaattttc 540
acagaaacaa	ccgagtatga	ttatgatctg	cttgcaaaac	gcgtgcgtga	attagccttt 600

```

ttaacaaagg gcgtaaacat caccgattgag gataaacgtg aaggacaaga gcgcaaaaat 660
gaataaccatt acgaaggcgg aattaaaaagt tatgtagagt atttaaaccg ttctaaagag 720
gttgtccatg aagagccgat ttacattgaa ggcgaaaagg acggcataac ggttgaagta 780
gctttgcaat acaatgacag ctacacaaagc aacattttact cgtttacaaa caacattaac 840
acgtacgaag gcggtaccga tgaagctggc tttaaaacgg gcctgactcg tgttatcaac 900
gattacgcca gaaaaaaagg gcttattaaa gaaaatgac caaacctaag cggagatgac 960
gtaagggaag ggctgacagc gattatttca atcaaacacc ctgatccgca gtttgagggc 1020
caaacgaaaa caaagctggg caactcagaa gcacggacga tcaccgatac gttattttct 1080
gcggcgatgg aaacattttat gctggaaaat ccagatgcgg ccaaaaaaat tgtcgataaa 1140
ggcttaatgg cagcaagagc aagaatggct gcgaaaaaag cgcgtgaact aacacgcgct 1200
aagagtgcct tggaaatttc aaacctgccc ggtaagttag cggactgctc ttcaaaagat 1260
ccgagcatct ccgagttata tatcgtagag ggtgactctg ccggaggatc tgctaaacaa 1320
ggacgcgaca gacattttcca agccattttg ccgcttagag gtaagatcct aaacgttgaa 1380
aaggccagac tggataaaaat cctttctaac aacgaagttc gctctatgat cacagcgctc 1440
ggcacaggta tcggggaaga cttcaacctt gagaaagccc gttatcacia agttgtcatt 1500
atgacagatg ccgatgttga cggcgcgcat atcagaacac tgcgtttaac gttcttttac 1560
agatatatgc gccaaattat cgaaaatggc tacgtgtaca ttgcgcagcc gccgctctac 1620
aaggttcaac aggggaaacg cgttgaatat gcatacaatg acaaggagct tgaagagctg 1680
ttaaaaactc ttctcaaacg gcctaagcct ggactgcagc gttacaaaag tcttggtgaa 1740
atgaatgcca cccagctttg ggagacaacc atggatccta gctccagaac acttcttcag 1800
gtaactcttg aagatgcaat ggatgcggac gagacttttg aaatgcttat gggcgacaaa 1860
gtagaaccgc gccgaaactt catagaagcg aatgcgagat acgttaaaaa tcttgacatc 1920
taa
<210> 4
<211> 3582
<212> ADN
<213> Bacillus subtilis
<400> 4
ttgacaggtc aactagttca gtatggacga caccgccagc gcagaagcta tgctcgcat 60
agcgaagtgt tagaattacc aaatctcatt gaaattcaaa cctcttctta tcagtgggtt 120
cttgatgagg gtcttagaga gatgtttcaa gacatatcac caattgagga ttctactggg 180
aacctctctc ttgagttcat tgattatagt ttaggtgagc ctaaatatcc thtagaggaa 240
tcaaaagaac gtgatgtgac ttactcagct ccgctaagag tgaagggttcg ttaattaac 300
aaagaaactg gagaggtaaa agaccaagat gtcttcatgg gtgatttccc tattatgaca 360
gatacaggta cttttatcat taacgggtgcg gaacgcgtta tcgtttccca gcttggtcgg 420
tctccaagtg tatatttcag tggtaaagta gacaaaaacg gtaaaaaagg ttttaccgca 480
actgtcattc caaacctggg cgcattggtta gaatacgaac ctgatgcgaa agatgttgtt 540
tatgtccgca ttgatcgcat acgttaagttg ccggttacgg ttcttttgcg tgctctcgcc 600
ttcggctccg atcaagagat ccttgatctc ataggagaaa acgaataact gcgaaatcgc 660
cttgataaag ataacacaga aaacagcgac aaagcgttgc tggaaattta cgagcgtctc 720
cgtcctggag agccgcctac agtagaaaat gcgaaaagct tgcttgatc tcgtttcttt 780
gatacgaaac gatacagatc tgccaatgta ggacgctata aaattaataa aaaacttcac 840
attaagaatc gctcttccaa tcagagactt gctgaaacgc ttgttgatcc tgaacacgga 900
gaaatccttg ctgaaaaagg tcagattctt gatagaagaa cacttgataa agtactgcca 960
tacttagaaa acggaatcgg tttcagaaaag ctgtatccga atggcggcgt tgttgaagat 1020
gaagtaactc ttcaatcaat taaaaatctt gctccgactg atcaagaagg agaacaggtt 1080
attaatgtaa tcggcaatgc ttacatcgaa gaagagatta aaaacatcac gcctgctgat 1140
attatttctt caatcageta cttcttcaac ctgctgcacg gagtaggaga cacagatgat 1200
atcgatcatc ttgaaaaccg ccgtttacgt tctgtaggcg agcttcttca gaaccaattc 1260
cgtatcgggt taagccgtat ggagcgtgtg gttcgtgaga gaatgtcaat tcaagatacg 1320
aatacaatta cgcctcagca gctgatcaat attcgtcctg ttattgcgtc cattaaagag 1380
ttctttggaa gctcacagct ttctcaattc atggatcaga atggcggcgt tgctgaatta 1440
acgcacaagc gccgtctgtc agcattagga ccgggcggat tgacacgtga gcgtgccgga 1500
atggaagtgc gtgacgttca ctactccac tatggccgta tgtgtccgat tgaacgcct 1560
gagggcccca acatcggttt gatcaactca ctttcatctt atgcaaaagt aaacggtttt 1620
ggctttattg aaacgcata tcgccgcgtt gacctgaaa cagggaaaagt aacgggcaga 1680
atcgattact taactgctga tgaagaggat aactatgttg tcgctcaagc gaacgctcgt 1740
cttgatgacg aaggcgctt tattgatgac agcatcgtag ctcgtttccg cggggagaa 1800
actgttggtt ccagaaatcg tgtagactac atggatgtat ccgctaagca ggttgatct 1860
gctgcgacag catgtattcc gttcttagaa aacgatgact ccaaccgtgc cctcatgga 1920
gcgaacatgc agcgtcaggg tgtgcctttg atgcagccgg aagcgcatt cgttggaact 1980
ggtatggaat acgtatcagg aaaagactct ggtgcgctg ttatttgtaa acacccaggt 2040
atcgttgaac gcgtagaagc gaaaaacgtt tgggttcgcc gttatgaaga agtagacggc 2100
aaaaaagtaa aaggaaacct ggataaatac agcctgctga aatttgctcg ctctaacca 2160
ggtacgtgct acaaccagcg tccgatcgta agtgcggcg atgaagtgg taaaaggaga 2220
atccttgctg acggtccttc tatggagctt ggtgaacttg cacttgccg taacgtaatg 2280
gtcggcttca tgacatggga tggctacaac tatgaggatg ccatcatcat gaggtaacgc 2340
ctagtgaagg atgatgttta cacatctatc cacattgaag aatacgaatc agaagcagc 2400
gatacgaaac ttggacctga agaaatcact cgcgatattc caaacgctcg tgaagatgca 2460
cttcgcaatc ttgatgaccg cggaatcatc cgtattgggg cagaagtaaa agacggagat 2520
cttcttgttg gtaaagtaac gcctaaaggg gtaactgaac tgactgcaga agaacgcctt 2580
cttcacgcca tcttgccgga gaaagcccg gaggttcctc atacttctct tcgtgtgcct 2640
cacggcggcg gcggaattat ccatgacgtt aaagtcttca accgtgaaga cggagacgaa 2700
cttctctcag gtgttaacca gtttagtacg gtatatatcg ttcagaaacg taagatttct 2760
gaaggggata aaatggccgg tcgtcacggg aacaaagggt ttatctctaa gattcttctc 2820
gaagaggata tgccttacct tctgacggc acaccaattg atatcatgct taaccgcgtg 2880
ggcgtacatc cacgtatgaa catcggcgag gtattggaac ttcacatggg tatggccgct 2940
cgttaccttg gattcacat cgcactctct gtatttgacg gagcgcgaga agaggatgtc 3000
tgggaaacac ttgaagaagc cgcatgtctc cgtgacgcca aaacagtgct ttacgacgga 3060
cgtactggcg agccgtttga taaccgtgta tctgtcggta tcatgtacat gatcaaaactg 3120

```

```

gctcacatgg ttgacgataa acttcatgcg cgctctacag gcccttactc acttggttacg 3180
cagcagcctc ttggcggttaa agcgcaattt ggccgacagc gtttcggtga gatggaggtt 3240
tgggcacttg aagcttacgg tgcggcttac actcttcaag aaattctgac tgttaagtct 3300
gatgacgtgg ttggacgtgt gaaaacatac gaagccatcg ttaaaggcga caatgttcct 3360
gaaccaggtg ttccggaatc attcaaaagta ttaatcaaaag aacttcaaag cttaggtatg 3420
gatgtcaaaa tcctttctgg tgatgaagaa gaaatagaaa tgagagattt agaagacgaa 3480
gaagatgcga aacaagctga cggcctggca ttatcagggt atgaagagcc ggaagaaaca 3540
gcatctgcag acgttgaacg tgatgtagta acaaaagaat aa 3582
<210> 5
<211> 1632
<212> ADN
<213> Bacillus subtilis
<400> 5
atggcaaaag aaattaagtt tagtgaagaa gctcgccgcg caatgcttcg cgggtgcgat 60
gcacttgctg atgctgttaa agtaacttta ggaccaaaaag gacgcaacgt ggttctagag 120
aaaaaattcg gttctccggt aatcacaaat gacggtgtaa caatcgctaa agaaatcgag 180
cttgaagatg cgtttgaaaa catgggtgcg aagcttggtt ctgaagtagc cagcaaaaaca 240
aacgacgttg ccggtgacgg tacaacaact gcgacagttc ttgcacaagc aatgatccgt 300
gaaggcctta aaaacgtaac agcaggcgct aaccctgtag gcgtgcgtaa aggtatggaa 360
caagctgtag ctgttgcaat cgaaaactta aaagaaattt ctaagccaat cgaaggcaaa 420
gagtctatcg ctacaggttg tgcgatctct gctgctgatg aggaagtcgg aagccttacc 480
gctgaagcaa tggagcgcgt aggaacacgac ggcggttatca caatcgaaga gtctaaaggc 540
tttacaactg agcttgaaat tgttgaaagt atgcaattcg accgcggata tgcgtctcct 600
tacatggtaa ctgactctga taagatggaa gcggttcttg acaatcctta catcttaatc 660
acagacaaaa aaatcacaaa catccaagaa atccttctcg tgcttgayca ggttggtcag 720
caaggcaaac catgcttct gatcgctgag gatgttgaa gcaagcact tgcaacactt 780
gttgtaaca aacttcgtgg cacattcaac gcagttgctg ttaaagctcc tggcttcggt 840
gaccgccgta aagcaatgct tgaagacatc gctgtcctta ctggcggaga agtcacaca 900
gaagatcttg gccttgacct gaaatctact caaatcgctc aattgggacg cgcttctaaa 960
gttgctgcta ctaaagaaaa cacaacaatc gttgaaggcg ctggcgaaaac agacaaaatt 1020
tctgcccgcg tgactcaaat ccgcgctcaa gtggaagaaa caacttctga gttcgacaga 1080
gaaaaattac aagagcgtct tgcgaaactt gctggcggcg tagctgtcat taaagtcggc 1140
gctgcgactg aaactgagct gaaagagcgt aaacttcgca tcgaagacgc cctgaactca 1200
actcgcgtag ctgttgaaag aggcacgcta tccggtgggt gtacagcgct tgtaaacgta 1260
tataacaaag tcgctgcagt tgaagctgaa ggcgatgctc aaacagggtat caacatcggt 1320
cttcgcgcgc ttgaagagcc aatccgtcaa atcgcacaca acgctggtct tgaaggatct 1380
gtcatcggtg agcgcctcaa aaacgaagaa atcggcgtag gcttcaacgc tgcaactggc 1440
gaatgggtta acatgatcga aaaaggtatc gttgacccaa ctaaagttac acgctcagct 1500
cttcaaaacg ctgcgtctgt agctgcaatg ttcttaacaa ctgaagccgt tgcgctgac 1560
aagccagaag aaaacgctgg cggcggaatg cctgatatgg gcggcatggg cggtatgggc 1620
ggcatgatgt aa 1632

```

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó được chọn từ nhóm bao gồm:

a) chủng *Bacillus subtilis* lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM 32540;

b) chủng đột biến của chủng *Bacillus subtilis* lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM 32540, trong đó chủng đột biến này có độ tương đồng trình tự ADN bộ gen so với chủng *Bacillus subtilis* lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM 32540 ít nhất bằng 98% và có khả năng ức chế sinh trưởng các chủng *C. perfringens* ATCC 13124; *C. perfringens* BB-081_Cpe; *C. perfringens* BB_031_Cpe; *C. difficile* DSM 1296; *S. aureus subsp. aureus* DSM 20231; *S. gallinaceus* DSM 15349; *S. suis* DSM 9682; *C. coli* DSM 4689 và *E. cecorum* DSM 20683 và có khả năng sinh trưởng trong sự có mặt của mật ở nồng độ bằng 2mM;

c) thể hỗn tạp của (a) hoặc (b), trong đó thể hỗn tạp này là dịch nổi của canh trường lên men của các chủng theo mục (a) hoặc (b) và chứa chất chuyển hóa, enzym và peptit được bài tiết bởi các chủng này.

2. Chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó theo điểm 1, trong đó chủng đột biến của chủng *Bacillus subtilis* DSM 32540 theo điểm 1 (b) có độ tương đồng trình tự ADN bộ gen so với chủng DSM 32540 ít nhất bằng 99%.

3. Chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chủng *Bacillus subtilis* này có ít nhất một, hoặc toàn bộ các đặc tính sau:

a) trình tự yqfD có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 99,8%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2;

b) trình tự gyrB có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 99,8%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3;

c) trình tự rpoB có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 99,8%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4;

d) trình tự groEL có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 99,8%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5.

4. Chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chủng *Bacillus subtilis* này có trình tự ADN ribosom 16 S có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 99,5%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 99,8%, tốt nhất nếu bằng 100%, so với polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1;
5. Chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ chủng này có khả năng sinh trưởng kỵ khí, cụ thể là chủng này có khả năng phân hủy xenluloza không hòa tan trong nước và protein trong điều kiện kỵ khí.
6. Chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ chủng này có khả năng sinh trưởng trong sự có mặt của axit axetic ở hàm lượng bằng 0,05% khối lượng, axit propionic ở hàm lượng bằng 0,05% khối lượng và/hoặc axit lactic ở hàm lượng bằng 0,2% khối lượng.
7. Chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ chủng này có ít nhất một, tốt hơn nếu toàn bộ các hoạt tính enzym sau: hoạt tính xenlulaza; hoạt tính xylanaza; hoạt tính catalaza; hoạt tính superoxit dismutaza.
8. Chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ chủng này có khả năng sinh trưởng trong sự có mặt của mật ở nồng độ bằng bằng 4mM.
9. Thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và ít nhất một thành phần thức ăn chăn nuôi hoặc thực phẩm bổ sung, tốt hơn nếu được chọn từ protein, hydrat cacbon, chất béo, lợi khuẩn khác, cơ chất đặc hiệu cho lợi khuẩn, enzym, vitamin, chất điều hòa miễn dịch, sản phẩm thay thế sữa, khoáng chất, axit amin, chất ức chế cầu trùng, sản phẩm trên cơ sở axit, dược chất, và hỗn hợp của chúng.
10. Thực phẩm chứa chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và ít nhất một thành phần thức ăn chăn nuôi hoặc thực phẩm bổ sung, tốt hơn nếu được chọn từ protein, hydrat cacbon, chất béo, lợi khuẩn khác, cơ chất đặc hiệu cho lợi khuẩn, enzym, vitamin, chất điều hòa miễn dịch, sản phẩm thay thế sữa, khoáng chất, axit amin, chất ức chế cầu trùng, sản phẩm trên cơ sở axit, dược chất, và hỗn hợp của chúng.

11. Dược phẩm chứa chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và chất mang dược dụng.

12. Phương pháp chăn nuôi động vật, cụ thể là lợn hoặc gia cầm, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm bước cho động vật này sử dụng chủng *Bacillus subtilis* hoặc thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và/hoặc thức ăn chăn nuôi theo điểm 9 và/hoặc dược phẩm theo điểm 11, trong đó động vật này không bao gồm người.

13. Phương pháp kiểm soát và/hoặc phòng ngừa tác dụng có hại cho môi trường của phân hoặc dịch bị nhiễm, bao gồm bước đưa ít nhất một chủng và/hoặc ít nhất một thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và/hoặc ít nhất một thức ăn chăn nuôi, thực phẩm, dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11 vào phân, dịch bị nhiễm, chất thải, hang ổ, hoặc bể phân.

14. Phương pháp kiểm soát và/hoặc cải thiện chất lượng nước hoặc dung dịch nước, cụ thể là nước uống hoặc nước dùng để nuôi trồng, bao gồm bước đưa ít nhất một chủng và/hoặc ít nhất một thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và/hoặc ít nhất một thức ăn chăn nuôi, thực phẩm, dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11 vào nước hoặc dung dịch nước.

15. Phương pháp xử lý và/hoặc phòng ngừa bệnh do vi sinh vật gây ra ở cây trồng, bao gồm bước đưa ít nhất một chủng và/hoặc ít nhất một thể hỗn tạp của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và/hoặc ít nhất một thức ăn chăn nuôi, thực phẩm, dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11 vào cây trồng này.