



(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)



1-0048635

(51)⁷ C12R 1/125; A23K 10/18; C12N 1/20; (13) B
A23K 10/16; A61K 35/742

(21) 1-2019-05457

(22) 14/03/2018

(86) PCT/EP2018/056442 14/03/2018

(87) WO2018/167171 20/09/2018

(30) 17160843.3 14/03/2017 EP; 18154862.9 02/02/2018 EP

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/02/2020 383A

(73) CHR. HANSEN A/S (DK)

Boege Alle 10-12, 2970 Hoersholm, DENMARK

(72) SANDVANG, Dorthe (DK); STYRISHAVE, Tina (DK).

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

(54) THỨC ĂN CHO ĐỘNG VẬT, PHỤ GIA THỨC ĂN CHO ĐỘNG VẬT, HOẶC
CHẾ PHẨM TRỘN SẴN THỨC ĂN CHO ĐỘNG VẬT CHỨA CHỦNG
BACILLUS SUBTILLIS

(21) 1-2019-05457

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* được chọn từ nhóm bao gồm a) chủng có số lưu giữ là DSM32324, b) chủng có số lưu giữ là DSM32325, và c) chủng đột biến của (a) hoặc (b) mà có độ nhạy đối với ampicilin, vancomyxin, gentamixin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin, và chloramphenicol; và có hoạt tính ức chế chống lại *E. coli* và *Clostridium perfringens*.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm *Bacillus* chứa ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế, tốt hơn là chủng *Bacillus subtilis* DSM32324 và/hoặc

chủng *Bacillus subtilis* DSM32325, làm vi khuẩn cho ăn trực tiếp (DFM), hỗn hợp trộn sẵn, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc thức ăn chăn nuôi.

Sáng chế đề cập đến phương pháp làm cải thiện một hoặc nhiều thông số hiệu suất của động vật được chọn từ nhóm bao gồm i) tăng trọng lượng (WG), ii) tỷ lệ chuyển hóa thức ăn thấp (FCR), iii) điểm tổn thương viêm ruột hoại tử thấp, iv) tần số viêm ruột hoại tử thấp, v) tỷ lệ chết do viêm ruột hoại tử thấp, vi) yếu tố hiệu quả sản xuất châu Âu tăng (EPEF), và vii) tỷ lệ chết thấp, bằng cách cho động vật ăn thức ăn là chủng hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* được chọn từ nhóm bao gồm a) chủng có số lưu giữ là DSM32324, b) chủng có số lưu giữ là DSM32325, và c) chủng đột biến của (a) hoặc (b) mà có độ nhạy đối với ampicilin, vancomycin, gentamixin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin, và chloramphenicol; và có hoạt tính ức chế chống lại *Escherichia coli* và *Clostridium perfringens*.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm *Bacillus* chứa ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế, tốt hơn là chủng *Bacillus subtilis* DSM32324 và/hoặc chủng *Bacillus subtilis* DSM32325, làm vi khuẩn cho ăn trực tiếp (*Direct Fed Microbial*: DFM), hỗn hợp trộn sẵn, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc thức ăn chăn nuôi.

Sáng chế đề cập đến phương pháp làm cải thiện một hoặc nhiều thông số hiệu suất của động vật được chọn từ nhóm bao gồm i) tăng trọng lượng (*weight gain*: WG), ii) tỷ lệ chuyển hóa thức ăn thấp (*feed conversion ratio*: FCR), iii) điểm tổn thương viêm ruột hoại tử thấp, iv) tần số viêm ruột hoại tử thấp, v) tỷ lệ chết do viêm ruột hoại tử thấp, vi) yếu tố hiệu quả sản xuất châu Âu tăng (*European Production Efficacy Factor*: EPEF), và vii) tỷ lệ chết thấp, bằng cách cho động vật ăn thức ăn là chủng hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc loại bỏ các chất kích thích tăng trưởng kháng sinh ở Liên minh châu Âu (European Union) năm 2006 đã dẫn đến nhu cầu ngày càng tăng đối với các chất phụ gia thức ăn hiệu quả có chi phí và độ nhạy cao với các tác dụng ức chế về tầm quan trọng của con người và thú y.

Phụ gia thức ăn probiotic dựa trên *Bacillus* được biết đến với tác dụng tích cực đối với sức khỏe và sản xuất ở lợn và gia cầm. Những sản phẩm này có liên quan đến ngành công nghiệp thức ăn vì bào tử ổn định nhiệt và có thể tồn tại trong quá trình tạo hạt ở nhiệt độ lên tới 90-95°C. Các vi khuẩn hình thành nội bào tử *Bacillus subtilis* và *Bacillus licheniformis* thường được coi là an toàn (*Nói chung Regarded làm Safe: GRAS*) bởi Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (*U.S. Food and Drug Administration: FDA*) và được Hiệp hội các quan chức kiểm soát thức ăn Hoa Kỳ (*Association of American Feed Control Officials: AAFCO*) chấp nhận.

Công bố đơn quốc tế WO2013/153159 mô tả phương pháp chọn chủng *Bacillus* có độ nhạy kháng sinh, hoạt tính ức chế chống lại *E.coli* và *Clostridium perfringens* và khả năng sinh bào tử cao.

Nhiều chủng phân lập được sàng lọc cho thấy tình trạng kháng kháng sinh không mong muốn trên các điểm phân giới được xác định bởi Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu (*European Food Safety Authority: EFSA*) và đã bị loại bỏ do những lo ngại về an toàn. Nhiều chủng phân lập cho thấy sự ức chế *Clostridium perfringens* trong khi chỉ có một số chủng phân lập ức chế *E. coli*. Các chủng có sự ức chế mầm bệnh tốt nhất chủ yếu thuộc loài *B. amyloliquefaciens*.

Công bố đơn quốc tế WO2016/060934 thể hiện trong Bảng 7 hoạt tính kháng *E. coli* của 10 chủng *Bacillus*. Năm trong số sáu chủng *B. amyloliquefaciens* thể hiện hoạt tính kháng *E. coli* trong khi chỉ có một trong hai chủng *B. subtilis*, chủng được phân lập từ sản phẩm Kemin, clostat, đã chứng minh hoạt tính kháng *E. coli*. Thật thú vị, chủng này sau đó đã được tìm thấy là một *B. amyloliquefaciens*, xem Công bố đơn quốc tế WO2016/118840 (trang 46, dòng 23).

Công bố đơn quốc tế WO2016118840 mô tả các chủng *Bacillus* khác nhau để cải thiện sức khỏe và hiệu suất của động vật chăn nuôi, đặc biệt là hai chủng *B. amyloliquefaciens* và hai chủng *B. subtilis* (xem Bảng 3.1). Chỉ có hai trong số các

chủng, chủng *B. subtilis* có số hiệu lưu giữ là DSM29870 và chủng *B. amyloliquefaciens* có số hiệu lưu giữ là DSM29869, được phát hiện là nhạy đối với cả tám loại kháng sinh được thử nghiệm. Kết quả đối với ampicilin không được cung cấp.

Chủng *B. subtilis* có số hiệu lưu giữ là DSM29870 được thấy là ức chế sự tăng trưởng của các chủng *E. coli* ATCC10535 và ATC25922 *in vitro* (Ví dụ 4). Ví dụ 7 cung cấp kết quả của ba thử nghiệm *Clostridium perfringens*. Không có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm được cho ăn DSM29870 (T4) và nhóm được cho ăn bacitracin (T3) liên quan đến tất cả các thông số được đo trong các thử nghiệm này. Kết quả đối với BWG, FCR và Tỷ lệ chết của chim với các tổn thương viêm ruột hoại tử là trung gian giữa nhóm không nhiễm, không điều trị (T1) và nhóm nhiễm, không điều trị (T2).

Tuy nhiên, vẫn cần một chủng probiotic có thể được sử dụng để làm cải thiện sức khỏe và tính năng của động vật chăn nuôi.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* được chọn từ nhóm bao gồm a) chủng có số lưu giữ là DSM32324, b) chủng có số lưu giữ là DSM32325, và c) chủng đột biến của (a) hoặc (b) mà có độ nhạy đối với ampicilin, vancomycin, gentamixin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin, và chloramphenicol; và có hoạt tính ức chế chống lại *E. coli* và *Clostridium perfringens*.

Chủng vi khuẩn là để chỉ vi khuẩn mà vẫn không thay đổi về mặt di truyền khi được tăng trưởng hoặc nhân giống. Sự đa dạng của các vi khuẩn giống hệt nhau được đưa vào khi tham chiếu đến một chủng

Chế phẩm chứa ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế, ví dụ làm vi khuẩn cho ăn trực tiếp (DFM), chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn, hoặc thức ăn chăn nuôi có thể để cho động vật ăn.

Ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế có thể được thêm vào thức ăn trong quá trình chăn nuôi, sau khi chăn nuôi bởi nhà cung cấp, bởi người cho động vật

ăn, trước khi cung cấp ăn cho động vật. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* được sử dụng trong phương pháp và chế phẩm được mô tả trong sáng chế này là đặc biệt thích hợp bởi vì chúng có khả năng sống sót (như bào tử) trong các điều kiện nhiệt và áp suất của quá trình sản xuất một sản phẩm thức ăn viên khô.

Bệnh viêm ruột hoại tử gây ra bởi *Clostridium perfringens* đã trở thành một vấn đề kinh tế nghiêm trọng trong chăn nuôi gia cầm hiện đại. Mục đích của một số nghiên cứu *in vivo* được mô tả trong các ví dụ là nghiên cứu tác dụng của các chất phụ gia thức ăn chứa chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế lên sinh bệnh học của bệnh viêm ruột hoại tử (*necrotic enteritis*: NE) trong các nghiên cứu gà thịt nuôi lồng. Các nghiên cứu *in vivo* khác trên gia cầm tập trung vào hiệu suất có hoặc không có thử nghiệm đối với *Clostridium perfringens*.

Các nghiên cứu về pin/lồng sàn riêng lẻ đã được thực hiện để đánh giá ảnh hưởng của *Bacillus subtilis* DSM32324 và DSM32325 đối với sự phát triển của viêm ruột hoại tử cận lâm sàng. Hai cơ sở nghiên cứu độc lập khác nhau đã được sử dụng, một cơ sở ở Châu Âu (Ví dụ 3, DSM32324) và cơ sở khác ở Hoa Kỳ (Ví dụ 4, DSM32325) có nghĩa là các tham số đánh giá hơi khác nhau đã được sử dụng để đánh giá hiệu quả của hai chủng

Mỗi thử nghiệm pin/lồng trên sàn riêng biệt được thực hiện để đánh giá sự ảnh hưởng của *Bacillus subtilis* DSM32324 và DSM32325 lên sự phát triển của bệnh viêm ruột hoại tử dưới lâm sàng. Hai cơ sở nghiên cứu độc lập khác nhau được sử dụng, một là dựa trên tiêu chuẩn châu Âu (Ví dụ 3, DSM32324) và cái còn lại là dựa trên tiêu chuẩn Mỹ (Ví dụ 4, DSM32325) có nghĩa là các thông số đánh giá hơi khác nhau đã được sử dụng để đánh giá hiệu quả của hai chủng.

Đối với *Bacillus subtilis* DSM3234 các thông số hiệu suất tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (*feed conversion rat*: FCR) và mức tăng trọng lượng trung bình (*average weight gain*: AWG) được đo ở ngày 21, ngày 35 và ngày 42 cho thấy một sự cải thiện đáng kể đối với tất cả các điểm dữ liệu khi xem xét *Bacillus subtilis* DSM3234 làm phụ gia thức ăn khi so sánh với nhóm đối chứng bị nhiễm mà không được điều trị.

Đáng ngạc nhiên là, nhóm được điều trị bằng *Bacillus* không cho thấy bất kỳ sự khác biệt đáng kể nào đối với nhóm đối chứng không nhiễm bệnh, không dùng thuốc, mặc dù nhóm sau không nhận được thử nghiệm và được coi là khỏe mạnh (Bảng 7).

Trong thử nghiệm viêm ruột cận lâm sàng gây ra trong thử nghiệm *in vivo*, *Bacillus subtilis* DSM3234 làm giảm điểm tổn thương bệnh viêm ruột hoại tử ở gà và làm giảm tỷ lệ chết của bệnh viêm ruột hoại tử một cách đáng kể (Bảng 8).

Bacillus subtilis DSM32325 làm giảm bệnh viêm ruột hoại tử thường xuyên ở gà khi so sánh với đối chứng nhiễm bệnh không được điều trị theo cách có ý nghĩa về mặt thống kê khi dữ liệu của Ngày 25 và 26 được kết hợp lại. Đáng ngạc nhiên là, the bệnh viêm ruột hoại tử thường xuyên thậm chí còn thấp hơn trong nhóm được điều trị bằng *Bacillus* than in the Amoxicilin treatd mẫu đối chứng group (Bảng 9).

Further, *Bacillus subtilis* DSM32325 làm giảm bệnh viêm ruột hoại tử severity (điểm trung bình) khi so sánh với đối chứng nhiễm bệnh không được điều trị theo cách có ý nghĩa về mặt thống kê khi dữ liệu của Ngày 25 và 26 được kết hợp lại. Đáng ngạc nhiên là, điểm trung bình thậm chí còn thấp hơn trong nhóm được điều trị bằng *Bacillus* so với nhóm được điều trị bằng Amoxilin (Bảng 10).

Hai chủng *B. subtilis* cũng được đánh giá trong hai thử nghiệm hiệu suất cho ăn, Ví dụ 5 (DSM32324 và DSM32325) và Ví dụ 6 (DSM32324).

Ví dụ 5 đề cập đến kết quả của thử nghiệm của 1800 gà trống thịt Ross 308 và thấy rằng đối với giai đoạn vỗ béo toàn thể (0-42 ngày tuổi), gà thịt được bổ sung bằng chủng *Bacilli* DSM32324 hoặc DSM32325 tăng trưởng một cách đáng kể so với các con đối chứng. Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) và EPEF của tất cả gà thịt được bổ sung bằng DSM19489, DSM32324 và DSM32325 được cải thiện một cách đáng kể khi so sánh với các chỉ số này của các con đối chứng.

Ví dụ 6 đề cập đến kết quả của thử nghiệm của 1300 gà trống thịt Ross 308 trên mỗi nhóm điều trị và chứng minh rằng DSM19489 có xu hướng làm giảm tỷ lệ chết ($p=0.096$) và *Bacillus subtilis* DSM32324 làm giảm rõ rệt và đáng kể tỷ lệ chết

đặc biệt ở giai đoạn kết thúc cũng phục vụ cho ý nghĩa thống kê về tỷ lệ chết trong thử nghiệm tổng thể.

Ví dụ 7 nghiên cứu ảnh hưởng của ba chủng Bacilli được chọn (DSM32324, DSM32325 và DSM25840) về hiệu suất và khả năng tiêu hóa rõ ràng và kết luận rằng cả ba chủng đều cho kết quả tốt đáng ngạc nhiên và cải thiện đáng kể

Các con được bổ sung DSM32324 cho thấy mức mức tăng trọng hàng ngày cao hơn (Bảng 16), tỷ lệ chuyển hóa thức ăn hàng ngày và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn trong giai đoạn bắt đầu (dữ liệu không được hiển thị) và tỷ lệ tiêu hóa protein cao hơn ở D42 (Bảng 17) so với các loài chim không được bổ sung

Các con được bổ sung DSM25840 cho thấy mức mức tăng trọng hàng ngày cao hơn (Bảng 16) và sự hấp thu thức ăn hàng ngày trong giai đoạn bắt đầu (dữ liệu không được biểu thị), thể trọng cao hơn ở D42 (Bảng 16) và tỷ lệ tiêu hóa tro, protein và năng lượng cao hơn ở D42 (Bảng 17) khi so sánh với các loài chim không được bổ sung.

Các con được bổ sung DSM32325 cho thấy mức mức tăng trọng hàng ngày cao hơn (Bảng 16) và sự hấp thu thức ăn hàng ngày trong giai đoạn bắt đầu (dữ liệu không được biểu thị), và tỷ lệ tiêu hóa canxi và phospho thấp hơn ở D42 (Bảng 17) khi so sánh với các loài chim không được bổ sung.

Kết luận, các nghiên cứu này đã chứng minh rằng chủng *Bacillus subtilis* số hiệu lưu giữ là DSM32324 và DSM32325 cho thấy hiệu quả trong việc giảm bệnh viêm ruột hoại tử trong các thử nghiệm *in vivo* và tác động tích cực đến các thông số hiệu suất ở gia cầm. Những phát hiện quan trọng là sự gia tăng đáng kể của tăng trọng lượng (*Weight Gain*: WG), giảm đáng kể tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (*Feed Conversion Ratio*: FCR), giảm đáng kể tỷ lệ chết và tăng đáng kể yếu tố hiệu quả sản xuất châu Âu (*European Production Efficacy Factor*: EPEF)

Ví dụ 8 cho thấy chế phẩm Bacillus theo sáng chế, EPB5, chứa DSM32324, DSM25840 và DSM32325 theo tỷ lệ 8:3:5, làm cải thiện hiệu suất ở gà thịt khi so sánh

với những con gà được cho ăn chế độ ăn tương ứng mà không bổ sung chế phẩm sinh học. Đáp ứng tích cực đã được chứng minh về tỷ lệ chuyển hóa thức ăn và tăng trọng lượng trung bình. Đáng ngạc nhiên, các nhóm được điều trị bằng EBP5 cho thấy sự cải thiện đáng kể đối với một số thông số về hiệu suất so với các nhóm điều trị chủng đơn *Bacillus*, một lần nữa cho thấy sự khác biệt đáng kể về các thông số hiệu suất đối với nhóm đối chứng nhiễm bệnh không dùng thuốc. Hơn nữa, cả hai chủng đơn *Bacillus subtilis* DSM32234, *Bacillus subtilis* DSM32235 và *Bacillus amyloliquefaciens* DSM25840 cũng như hỗn hợp EBP5 làm giảm điểm tổn thương bệnh viêm ruột hoại tử ở gà và làm giảm tỷ lệ chết của bệnh viêm ruột hoại tử một cách đáng kể trong thử nghiệm *in vivo*.

Ví dụ 9 cho thấy rằng chế phẩm *Bacillus* theo sáng chế làm cải thiện hiệu suất ở gà tây từ 1 đến 147 ngày tuổi (thời gian cho ăn 147 ngày) ở mức liều nằm trong khoảng từ 250mg/kg đến 2000mg/kg khi so sánh với những con được cho ăn chế độ ăn tương ứng mà không bổ sung probiotic. Đáp ứng tích cực đã được chứng minh về tăng trọng lượng cơ thể, tỷ lệ chuyển hóa thức ăn và hàm lượng chất khô của bài tiết

Ví dụ 10 cho thấy chế phẩm *Bacillus* theo sáng chế có thể được kết hợp với vắc-xin, chẳng hạn như vắc-xin *Salmonella Typhimurium* sống, mà không ảnh hưởng đến vắc-xin của quần thể *Salmonella* ban đầu và khả năng bảo vệ chống lại *Salmonella Heidelberg* trên gà thịt. Nghiên cứu chỉ ra rằng, thậm chí có thể có tác dụng phụ để có được cả vắc-xin và chế phẩm *Bacillus* (Bảng 20)

Định nghĩa

Nói chung, các thuật ngữ và cụm từ được sử dụng ở đây có ý nghĩa được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này, có thể được tìm thấy bằng cách tham khảo các văn bản tiêu chuẩn, tài liệu tham khảo tạp chí và nội dung mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Các định nghĩa sau đây được cung cấp để làm rõ việc sử dụng cụ thể của chúng trong bản mô tả này.

Như được sử dụng ở đây, các dạng số ít “a”, “an” và “the” được dự định bao gồm cả các dạng số nhiều, trừ khi có quy định khác.

Thức ăn chăn nuôi: Thuật ngữ “thức ăn chăn nuôi” dùng để chỉ hợp chất, chế phẩm hoặc hỗn hợp bất kỳ phù hợp hoặc dành cho động vật ăn. Thức ăn chăn nuôi cho động vật một chiều bao gồm các dịch cô đặc cũng như vitamin, khoáng chất, enzym, axit amin và/hoặc các thành phần thức ăn khác (như trong hỗn hợp). Thức ăn gia súc có thể bao gồm cỏ cho súc vật. Ví dụ về thức ăn gia cầm được đưa ra trong các Ví dụ 3 đến 7.

Chế phẩm: Thuật ngữ “chế phẩm” dùng để chỉ một chế phẩm chứa chất mang và ít nhất một chủng vi khuẩn như được mô tả trong tài liệu này. Các chế phẩm được mô tả trong tài liệu này có thể là vi khuẩn cho ăn trực tiếp (DFM), phụ gia hoặc hỗn hợp thức ăn chăn nuôi hoặc thức ăn chăn nuôi.

Dịch cô đặc: Thuật ngữ “cô đặc” có nghĩa là một loại thức ăn có nồng độ protein và năng lượng cao, chẳng hạn như bột cá, mật đường, oligosacarit, lúa miến, hạt và ngũ cốc (toàn bộ hoặc được chế biến bằng cách nghiền, xay, v.v., từ ngô, yến mạch, lúa mạch đen, lúa mạch, lúa mì), bánh ép hạt có dầu (ví dụ từ hạt bông, nghệ tây, hướng dương, đậu nành (như bột đậu nành), hạt cải dầu/cải dầu, đậu phộng hoặc lạc), bánh hạt nhân, chất có nguồn gốc từ nấm men và hạt chung cất (như hạt chung cất ẩm (*Wet Distillers Grains*: WDS) và hạt chung cất khô với các chất hòa tan (*Dried Distillers Grains With Solubles*: DDGS)).

Kiểm soát nhiễm trùng *C. perfringens* và/hoặc viêm ruột hoại tử: Thuật ngữ “kiểm soát nhiễm trùng *C. perfringens* và/hoặc viêm ruột hoại tử” có nghĩa là phương pháp và/hoặc chế phẩm mà ức chế một phần hoặc hoàn toàn nhiễm trùng *C. perfringens* và/hoặc viêm ruột hoại tử ở động vật. Theo đó, thuật ngữ “kiểm soát nhiễm trùng *C. perfringens* và/hoặc viêm ruột hoại tử” có nghĩa là nhiễm trùng *C. perfringens* và/hoặc viêm ruột hoại tử được giảm hoặc loại bỏ hoàn toàn.

Vi khuẩn cho ăn trực tiếp: Thuật ngữ “vi khuẩn cho ăn trực tiếp” hay là

“DFM” có nghĩa là các vi sinh vật sống bao gồm cả bào tử, khi được sử dụng đủ lượng, mang lại lợi ích, như cải thiện tiêu hóa hoặc sức khỏe, trên vật chủ.

Hoạt tính của enzym trong điều kiện yếm khí: Thuật ngữ “hoạt tính enzym trong điều kiện yếm khí” có nghĩa là hoạt tính của các enzym được tạo ra bởi chủng *Bacillus* trong quá trình tăng trưởng trong điều kiện yếm khí. Ví dụ 4 của công bố đơn quốc tế số WO2013/153159 mô tả phương pháp thử nghiệm các chủng *Bacillus* để tạo ra các enzym xylanaza, xenluloza và proteaza.

Yếu tố hiệu quả sản xuất châu Âu (EPEF): Yếu tố hiệu quả sản xuất châu Âu là một cách so sánh hiệu suất sống của đàn gia cầm. Con số độc lập này tạo điều kiện thuận lợi cho việc so sánh hiệu suất trong và giữa các trang trại và có thể được sử dụng để đánh giá các biến thiên về môi trường, khí hậu và quản lý. EPEF được tính là $[(\text{khả năng sống (\%)} \times \text{Trọng lượng sống (kg)}) / (\text{Tuổi suy giảm (ngày)} \times \text{FCR})] \times 100$, trong đó khả năng sống là tỷ lệ gia cầm sống khi kết thúc nghiên cứu, Trọng lượng sống là trọng lượng trung bình của gia cầm khi kết thúc nghiên cứu, tuổi suy giảm là tuổi của chim khi kết thúc nghiên cứu và FCR là tỷ lệ chuyển hóa thức ăn khi kết thúc nghiên cứu.

Lượng/nồng độ/liều lượng hữu hiệu: Các thuật ngữ “lượng hữu hiệu”, “nồng độ hữu hiệu” hoặc “liều lượng hữu hiệu” được định nghĩa là lượng, nồng độ hoặc liều lượng của chủng vi khuẩn đủ để cải thiện tiêu hóa hoặc năng suất của động vật. Liều lượng hữu hiệu thực tế với số lượng tuyệt đối phụ thuộc vào các yếu tố bao gồm: tình trạng sức khỏe của động vật được đề cập, sự có mặt của các thành phần khác. “Lượng hữu hiệu”, “nồng độ hữu hiệu” hoặc “liều lượng hữu hiệu” của các chủng vi khuẩn có thể được xác định bằng các thử nghiệm thông thường mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Ví dụ về lượng hữu hiệu cho gia cầm được đưa ra trong các Ví dụ 3, 4, 5, 6 và 7.

Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR): FCR là thước đo hiệu quả của động vật trong việc chuyển hóa khối lượng thức ăn thành tăng sản lượng mong muốn. Động vật được nuôi để lấy thịt - chẳng hạn như lợn, gia cầm, gia súc, cừu và cá - sản lượng là khối

lượng mà con vật đạt được. Cụ thể FCR là khối lượng thực phẩm ăn được chia cho đầu ra, tất cả trong một khoảng thời gian xác định. FCR có thể được xác định như được mô tả trong Ví dụ 7. Cải thiện FCR có nghĩa là giảm giá trị FCR.

Cho động vật ăn: Thuật ngữ “cho động vật ăn” tức là chế phẩm theo sáng chế được dùng qua đường miệng cho động vật với lượng hữu hiệu. Việc dùng qua đường miệng có thể được lặp đi lặp lại, ví dụ một hoặc nhiều lần mỗi ngày trong một khoảng thời gian xác định như vài ngày, một tuần, vài tuần, một tháng hoặc vài tháng. Cho gia cầm ăn, ví dụ có thể được thực hiện như được mô tả trong các Ví dụ 3, 4, 5, 6 và 7. Theo đó, các thuật ngữ “cho ăn” có nghĩa là việc dùng qua đường miệng bất kỳ như dùng qua đường thức ăn chăn nuôi hoặc dùng qua nước uống hoặc trong một số trường hợp nhất định, bằng cách uống bằng miệng hoặc bình xịt

Thức ăn xanh cho gia súc: Thuật ngữ "thức ăn xanh gia súc" như được định nghĩa ở đây còn bao gồm thức ăn thô. Thức ăn xanh cho gia súc là nguyên liệu thực vật tươi như cỏ khô và thức ăn ủ chua từ cây cỏ, cỏ và các loại cây cỏ khác, rong biển, ngũ cốc mọc và các loại đậu, hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng. Ví dụ về các loại cây cỏ thức ăn xanh là cỏ linh lăng (cỏ linh lăng), cây ba kích chim, đồng thau (ví dụ cải xoăn, cải dầu (cải dầu), rutabaga (swede), củ cải), cỏ ba lá (ví dụ cỏ ba lá châu Âu, cỏ ba lá đỏ, cỏ ba lá subterranean (1 loại cỏ ba lá được gieo trồng ở Úc), cỏ ba lá trắng, cỏ (ví dụ cỏ Bermuda, cỏ đại thân cao, cỏ yến mạch giả, cỏ roi nhỏ, cỏ heath (*một loại cỏ lâu năm chủ yếu ở châu Âu (Sieglingia decumbens)*), cỏ meadow (*một loại cỏ lâu năm, Poa pratensis*), cỏ orchard (*một loại cỏ Á-Âu (Dactylis glomerata)* được trồng rộng rãi trên đồng cỏ), lúa mạch đengrass (*loại cỏ bất kỳ thuộc chi Lolium, có nguồn gốc từ Á-Âu và thường được sử dụng làm thức ăn thô xanh hoặc để ổn định đất*), cỏ Timothy, ngô, kê, lúa mạch, yến mạch, lúa mạch đen, lúa miến, đậu nành và lúa mì và rau củ như củ cải đường. Thức ăn xanh cho gia súc còn bao gồm dư lượng cây trồng từ sản xuất ngũ cốc (như thân cây ngô, rơm từ lúa mì, lúa mạch, yến mạch, lúa mạch đen và các loại ngũ cốc khác), dư lượng từ các loại rau như ngọn củ cải, dư lượng từ việc sản xuất hạt có dầu như thân cây và hạt đậu nành cây họ đậu và các phân đoạn từ tinh chế ngũ cốc để dùng cho động vật hoặc con người hoặc từ việc sản xuất nhiên liệu hoặc

các ngành công nghiệp khác.

Hoạt tính ức chế chống lại *Clostridium perfringens*: Thuật ngữ “Hoạt tính ức chế chống lại *Clostridium perfringens*” có nghĩa là sự tăng trưởng của *Clostridium perfringens* bị ức chế và/hoặc một số hoặc tất cả *Clostridium perfringens* bị giết. Điều này có thể được xác định bằng thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1.

Hoạt tính ức chế chống lại *E. coli*: Thuật ngữ “Hoạt tính ức chế chống lại *E. coli*” có nghĩa là sự tăng trưởng của *E. coli* bị ức chế và/hoặc một số hoặc tất cả *E. coli* bị giết. Điều này có thể được xác định bằng thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1.

Phân lập: Thuật ngữ “phân lập” có nghĩa là các chủng vi khuẩn được mô tả trong tài liệu này ở dạng hoặc môi trường không xảy ra trong tự nhiên, tức là chủng này ít nhất được loại bỏ một phần từ một hoặc nhiều thành phần tự nhiên có trong đó gắn liền với thiên nhiên.

Hạt: Các thuật ngữ “hạt” và/hoặc “tạo hạt” dùng để chỉ các viên nén hoặc hạt hình tròn, hình cầu và/hoặc hình trụ rắn và quy trình để tạo ra các dạng rắn này, cụ thể là các hạt thức ăn và thức ăn gia súc được ép đùn thành dạng rắn. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ép đùn” là các thuật ngữ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và đề cập đến quy trình nén chế phẩm, như được mô tả trong tài liệu này, thông qua một lỗ kèm theo áp lực.

Gia cầm: Thuật ngữ “gia cầm” có nghĩa là các loại gia cầm thuần hóa được nuôi bởi con người để cho trứng mà chúng tạo ra và/hoặc thịt và/hoặc lông của chúng. Gia cầm bao gồm gà giống, gà thịt và gà đẻ trứng. Gia cầm bao gồm các thành viên của Superorder Galloanserae (fowl), đặc biệt là Galliformes (bao gồm gà, Guinea fowls, chim cú và gà tây) và họ Anatidae, bộ ngỗng, thường được gọi là “chim nước” và bao gồm cả các loại vịt nhà và ngỗng nhà. Gia cầm còn bao gồm các loài chim khác bị giết để lấy thịt, chẳng hạn như bồ câu và đà điểu. Ví dụ về gia cầm bao gồm gà (bao gồm gà đẻ trứng, gà thịt và gà con), vịt, ngỗng, chim bồ câu, gà tây và chim cú.

Ngăn ngừa nhiễm *C. perfringens* và/hoặc viêm ruột hoại tử: Thuật ngữ “ngăn ngừa nhiễm *C. perfringens* và/hoặc viêm ruột hoại tử” có nghĩa là phương pháp và/hoặc chế phẩm để ngăn ngừa sự phát triển của việc nhiễm *C. perfringens* và/hoặc viêm ruột hoại tử ở động vật.

Đường khử: Đường khử là loại đường bất kỳ có nhóm aldehyt phản ứng hoặc có khả năng tạo thành một loại để cho phép đường hoạt động như một chất khử. Các đầu khử được hình thành bởi sự phân cắt enzym của liên kết glycosidic giữa các hydrat cacbon polyme. Đường khử bao gồm glucoza, glyxeraldehyt và galactosa cũng như disaccarit, như lactosa và maltoza và có thể được đo bằng phương pháp Nelson-Somogyi (NS) hoặc axit dintrosalixylic (DNS). DNS là một hợp chất thơm phản ứng với đường khử và các phân tử khử khác để tạo thành axit 3-amino-5-nitrosalixylic, hấp thụ ánh sáng mạnh ở bước sóng 540nm. Thử nghiệm mô phỏng tình huống khi thức ăn được động vật ăn vào và được tiêu hóa trong đường tiêu hóa. Khả năng của các chủng *Bacillus* khác nhau làm suy giảm polysaccarit không tinh bột (*Non Starch Polysaccharit*: (NSP) để khử đường đã được nghiên cứu trong Ví dụ 2.

Thức ăn thô: Thuật ngữ “thức ăn thô” có nghĩa là nguyên liệu thực vật khô có hàm lượng chất xơ cao, chẳng hạn như chất xơ, cám, trấu từ hạt và ngũ cốc và tàn dư cây trồng (như thân cây, cùi dừa, rom, trấu, chất thải củ cải đường).

Nhạy với kháng sinh: Thuật ngữ “nhạy với kháng sinh” có nghĩa là đặc tính kiểu hình của một chủng vi khuẩn, sự phát triển của chủng vi khuẩn nói trên bị ức chế trong các điều kiện mà chủng vi khuẩn sẽ phát triển. Trong bản mô tả này, độ nhạy với kháng sinh được kiểm tra theo hướng dẫn của CLSI (M07 - A8 và M45 - A2). Chủng *Bacillus* được coi là nhạy nếu tăng trưởng chỉ được phát hiện tại hoặc dưới nồng độ điểm phân giới được chỉ định trong Tạp chí EFSA 2012; 10 (6): 2740 đối với vancomyxin, gentamixin, kanamixin, streptomycin, erythromyxin, clindamycin, tetracyclin và chloramphenicol. Đối với ampicilin, không có điểm phân giới do EFSA đưa ra cho *Bacillus*; điểm phân giới 4mg/l đã được chọn cho một chủng được coi là nhạy cảm.

Dịch ủ xi-lô: Thuật ngữ “dịch ủ xi-lô” có nghĩa là thức ăn gia súc được lên men, có độ ẩm cao có thể được cho ăn động vật ăn cỏ như ngựa và động vật nhai lại, ví dụ: lạc đà, lama, gia súc và cừu, hoặc được sử dụng làm nguyên liệu nhiên liệu sinh học cho các bể phân hủy kỵ khí. Nó được lên men và được lưu trữ trong một quy trình gọi là ủ xi-lô, và thường được làm từ các loại cây cỏ hoặc ngũ cốc (ví dụ như ngô, lúa miến, yến mạch, lúa mạch đen, cây cỏ đại, cỏ cây cỏ khô) hoặc các cây họ đậu như cỏ ba lá, cỏ linh lăng, đậu tằm, bằng cách sử dụng toàn bộ phần cây xanh (không chỉ hạt). Dịch ủ xi-lô có thể được làm từ nhiều loại cây trồng trên đồng ruộng, và các thuật ngữ đặc biệt có thể được sử dụng tùy thuộc vào loại (dịch yến mạch đối với yến mạch, dịch cỏ khô đối với cỏ linh lăng). Dịch ủ xi-lô được tạo ra bằng cách đặt thảm thực vật xanh lá vào xi-lô, chất đóng nó thành một đồng lớn được phủ bằng tấm nhựa, hoặc bằng cách bọc các kiện lớn trong màng nhựa.

Bào tử: Thuật ngữ “bào tử” và “nội bào tử” có thể hoán đổi cho nhau và có ý nghĩa thông thường, mà người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ bào tử dùng để chỉ một vi sinh vật ở trạng thái không sinh sản, được bảo vệ.

Ổn định: Thuật ngữ “ổn định” là một thuật ngữ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và theo khía cạnh được ưu tiên, ổn định có nghĩa là khả năng của vi sinh vật ở duy trì được trạng thái sống cho đến khi nó được sử dụng cho động vật để cải thiện sức khỏe của động vật

Lợn: Thuật ngữ “lợn” hay “heo” có nghĩa là lợn được thuần hóa được con người giữ làm thức ăn, chẳng hạn như thịt của chúng. Lợn bao gồm các thành viên của chi *Sus*, chẳng hạn như *Sus Scrofa localus* hoặc *Sus localus* và bao gồm lợn con, lợn cai sữa, lợn đang lớn, lợn trưởng thành, lợn chân giò, lợn nái, lợn nái con, lợn nái trưởng thành hoàn toàn và lợn nái đang mang thai.

Protein thực vật: Thuật ngữ “protein thực vật” dùng để chỉ bất kỳ hợp chất, chế phẩm hoặc hỗn hợp nào bao gồm ít nhất một protein có nguồn gốc từ hoặc thu được từ một loại rau, bao gồm protein biến đổi và dẫn xuất protein.

Protein thực vật có thể thu được từ các nguồn protein thực vật, chẳng hạn như các loại đậu và ngũ cốc, ví dụ như nguyên liệu từ thực vật thuộc họ *Fabaceae* (Leguminosae), ví dụ đậu tương, đậu lupin, đậu Hà Lan, hoặc đậu hạt; *Cruciferae*, *Chenopodiaceae*, ví dụ củ cải đỏ, củ cải đường, rau bina hoặc quinoa; và *Poaceae*. Các ví dụ khác về nguồn protein thực vật là các loại ngũ cốc như lúa mạch, lúa mì, lúa mạch đen, yến mạch, ngô (ngô), gạo và lúa miến.

Tăng trọng lượng: Tăng trọng lượng của động vật là sự mức tăng trọng lượng của động vật trong một khoảng thời gian xác định. Ví dụ về việc xác định mức tăng trọng lượng trung bình được đưa ra trong Ví dụ 3 và ví dụ về xác định mức tăng trọng lượng hàng ngày được đưa ra trong Ví dụ 7.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* được chọn từ nhóm bao gồm chủng có số lưu giữ là DSM32324, chủng có số lưu giữ là DSM32325, và chủng đột biến của DSM32324 hoặc DSM32325 mà có độ nhạy đối với ampicillin, vancomycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin, và chloramphenicol; và có hoạt tính ức chế chống lại *E. coli* và *Clostridium perfringens*.

Chủng vi khuẩn được mô tả trong sáng chế này được phân lập, tức là có mặt ở dạng hoặc môi trường không xảy ra trong tự nhiên.

Thuật ngữ “vi khuẩn đột biến” hoặc “chủng đột biến” là để chỉ chủng vi khuẩn đột biến tự nhiên (tự phát, tự nhiên) hoặc một vi khuẩn được gây đột biến chứa một hoặc nhiều thể đột biến trong bộ gen của chúng (ADN) không có trong ADN của chủng gốc. Một đột biến được gây ra là một vi khuẩn trong đó đột biến được gây ra bằng cách điều trị ở người, chẳng hạn như điều trị bằng phương pháp điều trị đột biến bất kỳ được sử dụng thông thường bao gồm điều trị bằng đột biến hóa học, như đột biến hóa học được chọn từ (i) đột biến liên quan đến hoặc kết hợp với vào ADN như một chất tương tự bazơ, ví dụ 2-aminopurin hoặc tác nhân càn hóa lẫn nhau như ICR-191, (ii) một chất gây đột biến mà phản ứng với ADN bao gồm các tác nhân alkyl hóa

như nitrosoguanidin hoặc hydroxylamin, hoặc etan metyl sulphonat (EMS) hoặc N-metyl-N'-nitro-N -nitroguanidin (NTG), bức xạ UV- hoặc gama, v.v ... Ngược lại, thuật ngữ "đột biến tự phát" hoặc "đột biến xảy ra tự nhiên" của là không bị gây đột biến bởi con người.

Một đột biến có thể được đưa vào nhiều phương pháp điều trị đột biến (điều trị duy nhất nên được hiểu là một bước gây đột biến sau đó là bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng hiện tại được ưu tiên là không quá 20, hoặc không quá 10, hoặc không quá 5 phương pháp điều trị (hoặc các bước sàng lọc/lựa chọn) được thực hiện. Trong đột biến được ưu tiên theo sáng chế, ít hơn 1%, ít hơn 0,1, dưới 0,01, dưới 0,001% hoặc thậm chí dưới 0,0001% nucleotit trong hệ gen của vi khuẩn đã được thay thế bằng một nucleotit khác, hoặc bị xóa, so với chủng gốc.

Vi khuẩn đột biến như được mô tả ở trên là không GMO (không biến đổi gen), tức là không được cải biến bằng công nghệ ADN tái tổ hợp. Thay thế cho phương pháp được ưu tiên ở trên để tạo ra đột biến bằng phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên, cũng có thể tạo ra một đột biến như vậy bằng phương pháp gây đột biến trực tiếp tại vị trí, ví dụ bằng cách sử dụng các kỹ thuật tách dòng vô tính được thiết kế phù hợp.

Khi đột biến được tạo ra như một đột biến xảy ra tự phát, chủng này được đưa vào bước chọn lọc mà không cần xử lý gây đột biến trước đó.

Theo một phương án, chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế có ít nhất 98% (như ít nhất 98,5%, như ít nhất 99%, như ít nhất 99,5%, như ít nhất 99,6%, như ít nhất 99,7%, như ít nhất 99,8%, như ít nhất 99,9%) trình tự giống với trình tự nucleotit của DSM32324.

Theo một phương án, chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế có ít nhất 98% (như ít nhất 98,5%, như ít nhất 99%, như ít nhất 99,5%, như ít nhất 99,6%, như ít nhất 99,7%, như ít nhất 99,8%, như ít nhất 99,9%) trình tự giống với trình tự axit amin của DSM32324.

Theo một phương án, chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế có ít nhất 98% (như ít nhất 98,5%, như ít nhất 99%, như ít nhất 99,5%, như ít nhất 99,6%, như ít nhất 99,7%, như ít nhất 99,8%, như ít nhất 99,9%) trình tự giống với trình tự nucleotit của DSM32325.

Theo một phương án, chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế có ít nhất 98% (như ít nhất 98,5%, như ít nhất 99%, như ít nhất 99,5%, như ít nhất 99,6%, như ít nhất 99,7%, như ít nhất 99,8%, như ít nhất 99,9%) trình tự giống với trình tự axit amin của DSM32325.

Chủng *Bacillus* được coi là có hoạt tính ức chế đối với *E. coli* nếu vùng ức chế ít nhất là 0,5mm (vùng ức chế thấp). Tốt hơn là, vùng ức chế là nằm trong khoảng ít nhất 0,5mm và 2mm (trung bình), tốt hơn nữa là lớn hơn 2mm (cao). Vùng ức chế có thể là khác nhau đối với các chủng *E. coli* khác nhau. Đối với các chủng được coi là có hoạt tính ức chế chống lại *E. coli* theo sáng chế, nó sẽ có vùng ức chế ít nhất là 0,5mm đối với tất cả các chủng *E. coli* được thử nghiệm. Tốt hơn là, vùng ức chế của 2, 3, 4 hoặc thậm chí tốt hơn nữa là vùng ức chế của tất cả 5 chủng *E. coli* ít nhất là nằm trong khoảng 0,5mm và 2mm. Thậm chí tốt hơn nữa là, vùng ức chế của 2, 3, 4 hoặc thậm chí tốt hơn nữa là vùng ức chế của tất cả 5 chủng *E. coli* là lớn hơn 2mm.

Chủng *Bacillus* được coi là có hoạt tính ức chế đối với *Clostridium perfringens* nếu vùng ức chế ít nhất là 0,5mm (vùng ức chế thấp). Tốt hơn là, vùng ức chế là nằm trong khoảng ít nhất 0,5mm và 2mm (trung bình), tốt hơn nữa là lớn hơn 2mm (cao). Vùng ức chế có thể là khác nhau đối với các chủng *Clostridium perfringens* khác nhau. Đối với các chủng được coi là có hoạt tính ức chế chống lại *Clostridium perfringens* theo sáng chế, nó sẽ có vùng ức chế ít nhất là 0,5mm đối với tất cả the *Clostridium perfringens* strains tested. Tốt hơn là, vùng ức chế của 2, 3, 4 hoặc thậm chí tốt hơn nữa là vùng ức chế của tất cả 5 chủng *Clostridium perfringens* ít nhất là nằm trong khoảng 0,5mm và 2mm. Thậm chí tốt hơn nữa là, vùng ức chế của 2, 3, 4 hoặc thậm chí tốt hơn nữa là vùng ức chế của tất cả 5 chủng *Clostridium perfringens* là lớn hơn 2mm.

Tốt hơn là, chủng *Bacillus* cũng có thể làm tăng lượng đường khử từ sự thoái biến của polysaccarit không chứa tinh bột (*Non Starch Polysaccharide*: NSP). Khả năng của các chủng *Bacillus* khác nhau làm thoái biến NSP thành đường khử đã được nghiên cứu trong Ví dụ 2 và kết quả được cung cấp trong Bảng 4. Các chủng có khả năng tăng lượng đường có sẵn lên ít nhất 500kJ/kg thức ăn khi được thử nghiệm như đã nêu trong ví dụ được coi là thích hợp hơn.

Dựa trên các mô tả thử nghiệm chi tiết, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể lặp lại các thử nghiệm này để xác định xem một chủng *Bacillus* cụ thể có tuân thủ độ nhạy cảm với kháng sinh, hoạt tính ức chế và khả năng làm giảm NSP hay không. Theo cách này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể liên tục tạo ra các chủng với các đặc tính đã nêu. Tốt hơn là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng sẽ bao gồm thử nghiệm độ nhạy cảm của tế bào sinh dưỡng ở độ pH=4 và xét nghiệm kháng mật để đảm bảo rằng các chủng có thể sống sót ở một mức độ đủ trong dài dạ dày-ruột, ví dụ như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2013/153159. Rõ ràng, các thử nghiệm này có thể được thực hiện theo thứ tự bất kỳ và một số chủng có thể được loại trừ trong quá trình nếu chúng không đáp ứng các tiêu chí.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm *Bacillus* chứa ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế. Theo một phương án, chế phẩm *Bacillus* chứa 1 chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế. Theo phương án khác, chế phẩm *Bacillus* chứa hai chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế, ví dụ sự kết hợp của *Bacillus subtilis* DSM32324 và *Bacillus subtilis* DSM32325.

Chế phẩm *Bacillus* theo sáng chế có thể bao gồm sự kết hợp của ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế và ít nhất một chủng *Bacillus* khác. Chế phẩm *Bacillus* có thể bao gồm ít nhất hai chủng, như ít nhất ba, như ít nhất bốn, như ít nhất năm chủng *Bacillus*, ít nhất một trong số này là chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế.

Chủng *Bacillus* có thể được sử dụng trong hỗn hợp bất kỳ trong chế phẩm *Bacillus*. Ví dụ, chế phẩm *Bacillus* có thể bao gồm ít nhất một chủng *Bacillus*

subtilis theo sáng chế và/hoặc ít nhất một chủng *Bacillus licheniformis* và/hoặc ít nhất một chủng *Bacillus amyloliquefaciens*, ví dụ hai chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế và ít nhất một chủng *Bacillus amyloliquefaciens*. Chế phẩm có thể bao gồm *Bacillus subtilis* DSM32324 và/hoặc *Bacillus subtilis* DSM32325 kết hợp với *Bacillus amyloliquefaciens* DSM25840 và/hoặc *Bacillus licheniformis* DSM17236 và/hoặc *Bacillus subtilis* DSM19489. Sự kết hợp có thể bất kỳ khác của chủng *Bacillus* theo sáng chế với chủng *Bacillus* khác cũng có thể được tạo ra. Làm ví dụ cụ thể, chế phẩm *Bacillus* chứa *Bacillus subtilis* DSM32324, *Bacillus subtilis* DSM32325 và *Bacillus amyloliquefaciens* DSM25840. Làm ví dụ cụ thể khác, chế phẩm *Bacillus* chứa *Bacillus subtilis* DSM32324, *Bacillus subtilis* DSM32325 và *Bacillus licheniformis* DSM17236. Theo một ví dụ cụ thể khác nữa, chế phẩm *Bacillus* chứa *Bacillus subtilis* DSM32324, *Bacillus subtilis* DSM32325 và *Bacillus subtilis* DSM19489.

Nếu sử dụng nhiều hơn một chủng, người ta dự tính rằng tỷ lệ của mỗi chủng trong chế phẩm sẽ là 1 đến 99%, chẳng hạn như 20 đến 80%, ví dụ 30 đến 70%, đặc biệt hơn 20%, 33%, 40% hoặc 50% tổng lượng phân lập vi khuẩn được tính là thành phần CFU/g. Các chủng riêng lẻ có thể có mặt với số lượng bằng nhau hoặc số lượng không bằng nhau.

Phương án được ưu tiên hiện nay theo sáng chế là chế phẩm *Bacillus* chứa DSM32324, DSM25840 và DSM32325 với tỷ lệ 8:3:5.

Các chủng hoặc chủng *Bacillus* có liên quan được cung cấp ở dạng thương mại mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Theo đó, theo một phương án, chủng hoặc các chủng *Bacillus* của chế phẩm có mặt ở dạng khô (ví dụ được sấy phun) hoặc dạng đông lạnh. Chế phẩm có thể được cung cấp dưới bất kỳ hình thức phù hợp nào, chẳng hạn như ở dạng chất lỏng, ví dụ, gel, huyền phù đặc, bột hoặc viên.

Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm *Bacillus* chứa từ 10^5 đến 10^{12} CFU/g, như từ 5×10^5 đến 10^{12} CFU/g, tốt hơn nữa là từ 10^6 đến 10^{12} CFU/g, và tốt nhất là từ 10^7 đến 10^{12} CFU/g, như từ 10^8 đến 10^{11} CFU/g, ví dụ từ 10^9 đến 10^{10} CFU/g mỗi

chủng vi khuẩn trong chế phẩm. Chế phẩm Bacillus chứa ít nhất 5×10^4 CFU của mỗi chủng trên mỗi gam chế phẩm mà khác biệt với chế phẩm theo sáng chế ở, ví dụ thức ăn chăn nuôi có các chủng có trong tự nhiên.

Thuật ngữ “CFU/g” đề cập đến trọng lượng gram của chế phẩm bao gồm các chất mang như canxi cacbonat, chất chống đông bánh như nhôm silicat và kieselgur (đất tảo) và các thành phần khác có trong chế phẩm.

Chế phẩm theo sáng chế bao gồm ít nhất một chủng Bacillus theo sáng chế và ít nhất một chất mang và/hoặc thành phần khác mà làm cho chế phẩm thích hợp để cho động vật ăn hoặc làm phụ gia cho nước uống.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hỗn hợp trộn sẵn” là để chỉ chủng Bacillus được thêm vào chất mang để tạo ra hỗn hợp trộn sẵn rồi sau đó được thêm vào thức ăn chăn nuôi ở tỷ lệ đưa vào mong muốn.

Ngoài ra, ít nhất một chủng Bacillus của sáng chế có thể được cùng kết hợp với các thành phần thức ăn chăn nuôi như được thảo luận chi tiết sau đây. Các chế phẩm này có thể ở dạng viên được ép đùn qua các quy trình ép viên tiêu chuẩn.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn bao gồm bước thêm ít nhất một chủng Bacillus theo sáng chế vào thức ăn chăn nuôi hoặc các thành phần có liên quan của nó.

Vi khuẩn Bacillus tồn tại dưới dạng bào tử và tế bào sinh dưỡng có thể phân chia để tạo ra nhiều tế bào sinh dưỡng hơn. Khi tài liệu tham khảo được đưa ra ở đây cho Bacillus, điều này liên quan đến cả bào tử và tế bào sinh dưỡng trừ khi có quy định khác.

Trong chế phẩm Bacillus của sáng chế, chủng hoặc các chủng Bacillus tốt nhất được cung cấp dưới dạng bào tử. Các chức năng chính của bào tử nói chung là để đảm bảo sự sống sót của vi khuẩn thông qua các giai đoạn stress môi trường. Do đó, chúng có khả năng chống lại tia cực tím và tia gama, hút ẩm, lysozym, nhiệt độ, thiếu dinh

dưỡng và khử trùng hóa học. Lớp ngoài bào tử không thấm vào nhiều phân tử độc hại và cũng có thể chứa các enzym có liên quan đến sự nảy mầm. Lõi có cấu trúc tế bào bình thường, chẳng hạn như ADN và ribosom, nhưng bào tử không hoạt động trao đổi chất.

Dạng thực vật của vi khuẩn tạo ra tác nhân có thể làm giảm mầm bệnh do vi khuẩn hoặc có tác dụng có lợi khác trong dải dạ dày-ruột (*gastrointestinal tract*: GIT) của động vật. Vì vậy, việc kích hoạt lại và nảy mầm của bào tử sau khi dùng cho động vật là rất quan trọng.

Từ tài liệu được biết rằng, mật có một số ảnh hưởng tiêu cực đến sự sống sót và nảy mầm và phát triển của các tế bào sinh dưỡng trong GIT của động vật. Do đó, vi khuẩn probiotic nói chung sẽ có thể tồn tại và sinh sôi nảy nở trong ruột động vật bằng cách chịu được độ pH thấp và kháng muối mật để có ích như các chế phẩm *Bacillus* probiotic để bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Các ví dụ cung cấp các thử nghiệm *in vitro* hữu ích về vấn đề này. Thử nghiệm độ nhạy cảm với pH thấp (mô phỏng điều kiện dạ dày) tập trung vào sức đề kháng của tế bào sinh dưỡng với độ pH=4. Người ta biết rằng, bào tử sẽ kháng ở giá trị pH=2-3 và tế bào sinh dưỡng sẽ chết ở độ pH=2. Tuy nhiên, độ pH dạ dày có thể có giá trị pH lên đến 4 đặc biệt là trong điều kiện nuôi dưỡng. Điều này có thể dẫn đến sự nảy mầm của bào tử và do đó có liên quan để kiểm tra độ nhạy của tế bào sinh dưỡng ở độ pH=4. Các chủng được chọn tốt nhất nên có khả năng kháng độ pH ở mức 4.

Chủng *Bacillus subtilis* có số hiệu lưu giữ là DSM32324 và DSM32325 được thử nghiệm về độ nhạy của tế bào sinh dưỡng ở độ pH=4 và đề kháng đường mật đảm bảo rằng các chủng là phù hợp.

Chế phẩm *Bacillus* có thể bao gồm một hoặc hai chủng *B. subtilis* khác nhau và/hoặc một hoặc hai chủng *B. licheniformis* và/hoặc một hoặc hai chủng *Bacillus amyloliquefaciens*, trong đó mỗi chủng độc lập được chọn để thực hiện một vai trò và/hoặc chức năng cụ thể. Sự kết hợp của các chủng này có thể được kết hợp với thức ăn chăn nuôi, chẳng hạn như thức ăn gia cầm và cuối cùng được sử dụng để cải thiện

sức khỏe và năng suất của động vật nông nghiệp (ví dụ: gia súc và/hoặc gia cầm). Ví dụ, các chủng và/hoặc các chủng kết hợp có thể làm giảm mầm bệnh đường ruột ở gia cầm và mức tăng trọng lượng của gia cầm thương phẩm.

Theo phương án khác, chế phẩm *Bacillus* theo sáng chế có thể được kết hợp với vacxin, như vacxin *Salmonella* Typhimurium sống, để làm giảm sự nhiễm trùng *Salmonella* và/hoặc increase FCR.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn chứa ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế, và còn chứa một hoặc nhiều dịch cô đặc, vitamin, khoáng chất, enzym, axit amin và/hoặc thành phần thức ăn khác. Theo một phương án thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn chứa chủng *Bacillus subtilis* DSM32324. Theo phương án khác thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn chứa chủng *Bacillus subtilis* DSM32325. Thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn có thể bao gồm both *Bacillus subtilis* DSM32324 và *Bacillus subtilis* DSM32325.

Theo một khía cạnh cụ thể, thức ăn chăn nuôi chứa thức ăn thô xanh. Nói chung, thức ăn thô xanh chứa nguồn protein thực vật. Theo phương án cụ thể, nguồn protein thực vật là nguyên liệu từ một hoặc nhiều loại thực vật thuộc họ Fabaceae. Theo một phương án cụ thể khác, nguồn protein thực vật là nguyên liệu từ một hoặc nhiều loại thực vật thuộc họ Chenopodiaceae. Các ví dụ khác về nguồn protein thực vật là hạt cải dầu và bắp cải. Theo một phương án cụ thể khác, đậu tương là một nguồn protein thực vật ưa thích. Ví dụ, thức ăn thô xanh bao gồm 0-80% ngô; và/hoặc 0-80% lúa miến; và/hoặc 0-70% lúa mì; và/hoặc 0-70% lúa mạch; và/hoặc 0-30% yến mạch; và/hoặc 0-40% bột đậu nành; và/hoặc 0-10% bột cá; và/hoặc 0-20% nước sữa whey.

Theo một phương án, thức ăn thô xanh và ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế được trộn với dịch cô đặc. Theo phương án khác, thức ăn thô xanh và ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế được trộn với hỗn hợp trộn sẵn. Theo phương án khác, thức ăn thô xanh và ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế

được trộn với vitamin và/hoặc chất khoáng. Theo phương án khác, thức ăn thô xanh và ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế được trộn với một hoặc nhiều enzym. Theo phương án khác, thức ăn thô xanh và ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế được trộn với các thành phần thức ăn khác, chẳng hạn như các chất tạo màu, chất ổn định, phụ gia cải thiện tăng trưởng và hợp chất thơm/chất điều vị, axit béo đa bất bão hòa (PUFA); chất tạo oxy phản ứng, peptit chống vi khuẩn, polypeptit chống nấm và axit amin.

Theo phương án cụ thể, thức ăn chăn nuôi bao gồm hoặc chứa sữa (ví dụ từ lợn nái, bò, dê, cừu), ví dụ cho lợn con ăn. Theo phương án cụ thể khác, thức ăn chăn nuôi bao gồm hoặc chứa thức ăn thay thế sữa, ví dụ để cho lợn con ăn.

Theo phương án khác, thức ăn chăn nuôi có thể bao gồm một hoặc nhiều vitamin, như một hoặc nhiều vitamin hòa tan trong chất béo và/hoặc một hoặc nhiều vitamin hòa tan trong nước. Theo phương án khác, thức ăn chăn nuôi có thể tùy ý bao gồm một hoặc nhiều chất khoáng, như một hoặc nhiều chất khoáng vi lượng và/hoặc một hoặc nhiều chất khoáng macro. Thông thường các vitamin tan trong chất béo và nước, cũng như các khoáng chất vi lượng tạo thành một phần của cái gọi là hỗn hợp trộn sẵn dành cho thức ăn, trong khi các khoáng chất macro thường được thêm vào thức ăn. Các ví dụ không giới hạn của các vitamin tan trong chất béo bao gồm vitamin A, vitamin D3, vitamin E và vitamin K, ví dụ vitamin K3. Các ví dụ không giới hạn của các vitamin tan trong nước bao gồm vitamin B12, biotin và cholin, vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, niacin, axit folic và panthotenat, ví dụ Ca-D-pantotenat. Các ví dụ không giới hạn của khoáng chất vi lượng bao gồm bo, coban, clorua, crom, đồng, florua, iot, sắt, mangan, molybden, selen và kẽm. Các ví dụ không giới hạn của chất khoáng macro bao gồm canxi, magie, kali và natri.

Thức ăn chăn nuôi. chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn theo sáng chế có thể còn chứa ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm phytaza (EC 3.1.3.8 hoặc 3.1.3.26); xylanaza (EC 3.2.1.8); galactanaza (EC 3.2.1.89); alpha-galactosidaza (EC 3.2.1.22); proteaza (EC 3.4); phospholipaza A1 (EC 3.1.1.32); phospholipaza A2 (EC 3.1.1.4); lysophospholipaza (EC 3.1.1.5); phospholipaza C

(3.1.4.3); phospholipaza D (EC 3.1.4.4); amylaza such as. ví dụ. alpha-amylaza (EC 3.2.1.1); lysozyme (EC 3.2.1.17); và beta-glucanaza (EC 3.2.1.4 hoặc EC 3.2.1.6). hoặc any mixture thereof.

Thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn theo sáng chế có thể chứa thêm một hoặc nhiều axit amin được thêm vào. Ví dụ về các axit amin được sử dụng trong thức ăn chăn nuôi là lysin, alanin, beta-alanin, threonin, methionin và tryptophan. Thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn theo sáng chế có thể bao gồm các chất tạo màu, chất ổn định, chất phụ gia cải thiện tăng trưởng và các chất thơm/chất điều vị, axit béo đa bất bão hòa (PUFA); chất tạo oxy phản ứng, peptit chống vi khuẩn và polypeptit chống nấm. Ví dụ về các chất tạo màu là các caroten như beta-caroten, astaxanthin và lutein. Ví dụ về các chất thơm/chất điều vị là creosol, anetol, deca-, undeca-và/hoặc dodeca-lacton, ionon, sít, gingerol, piperidin, propyliden phirithit, butyliden phirithit, capsaixin và tannin. Ví dụ axit béo đa bất bão hòa là axit béo đa bất bão hòa C18, C20 và C22, như axit arachidonic, axit docosohexaenoic, axit eicosapentaenoic và axit gama-linoleic. Ví dụ về các chất tạo oxy phản ứng là các chất hóa học như perborat, persulphat hoặc percacbonat; và các enzym như oxyaza, oxyaza hoặc syntetaza.

Theo một phương án thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn chứa một hoặc nhiều coccidiostat.

Thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn còn chứa chất mang. Chất mang có thể chứa một hoặc nhiều hợp chất sau đây: nước, glyxerol, etylen glycol, 1,2-propylen glycol hoặc 1,3-propylen glycol, natri clorua, natri benzoat, kali sorbat, natri sulfat, kali sulfat, magie sulfat, natri thiosulfat, canxi cacbonat, natri xitrat, dextrin, maltodextrin, glucoza, sucroza, sorbitol, lactoza, whey, whey permeat, bột mì, cám lúa mì, bột ngô, tinh bột và xenluloza.

Theo một phương án, một hoặc nhiều chủng vi khuẩn là ổn định khi chịu áp lực áp dụng/đặt được trong quá trình ép đùn cho viên. Theo một phương án cụ thể, một hoặc nhiều chủng vi khuẩn ổn định ở áp suất từ 1 bar đến 40 bar.

Theo phương án cụ thể, một hoặc nhiều chủng vi khuẩn là ổn định ở nhiệt độ cao. Đặc biệt, các chủng vi khuẩn ổn định khi chúng phải chịu nhiệt độ đạt được trong quá trình ép đùn để ép viên. Theo một phương án đặc biệt hơn nữa, một hoặc nhiều chủng vi khuẩn ổn định ở nhiệt độ từ 70°C đến 120°C.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn còn chứa một hoặc nhiều vi sinh vật bổ sung. Theo phương án cụ thể, thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn còn chứa vi khuẩn từ một hoặc nhiều chi sau đây: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* và *Megasphaera* hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo phương án cụ thể, thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn còn chứa vi khuẩn từ một hoặc nhiều chủng sau đây *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megatrium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus simplex*, *Bacillus mojavenensis*, *Bacillus safensis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus tequilensis*. hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo phương án cụ thể, thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn còn chứa một hoặc nhiều loại nấm men. Một hoặc nhiều loại nấm men có thể được chọn từ nhóm bao gồm *Saccharomycetaceae*, *Saccharomyces* (như *S. cerevisiae* và/hoặc *S. boumỡ lorenii*), *Kluyveromyces* (như *K. marxianus* và *K. lactis*), *Candida* (như *C. utilis*, còn được gọi là *Torula yeast*), *Pichia* (như *P. pastoris*), *Torulaspora* (như *T. delbrueckii*), nấm men *Phaffia* và *Basidiomycota*.

Chế độ ăn động vật có thể, ví dụ được sản xuất dưới dạng thức ăn nghiền (không phải viên) hoặc thức ăn viên. Thông thường, các loại thức ăn nghiền được trộn lẫn và đủ lượng vitamin và khoáng chất thiết yếu được thêm vào theo các thông số kỹ thuật cho các chất đang được quan tâm. Dịch nuôi cấy vi khuẩn và các enzym tùy ý có

thể được thêm vào dưới dạng chế phẩm rắn hoặc lỏng. Ví dụ, đối với thức ăn nghiền, chế phẩm nuôi cấy rắn hoặc lỏng có thể được thêm vào trước hoặc trong bước trộn thành phần. Đối với thức ăn dạng viên, chế phẩm *Bacillus* (lỏng hoặc rắn) cũng có thể được thêm vào trước hoặc trong bước thành phần thức ăn. Thông thường, chế phẩm *Bacillus* lỏng theo sáng chế bao gồm (các) chủng vi khuẩn tùy ý với polyol, chẳng hạn như glyxerol, etylen glycol hoặc propylen glycol, và được thêm vào sau bước ép viên, như bằng cách sấy phun chế phẩm lỏng thành các viên. Các vi khuẩn cũng có thể được kết hợp trong chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn ngừa hoặc kiểm soát sự hình thành tập đoàn vi khuẩn hoặc nhiễm vi khuẩn, ví dụ bằng *E. coli* và/hoặc *Clostridium*, như *Clostridium difficile*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, hoặc *Clostridium septicum*.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa hoặc kiểm soát sự hình thành tập đoàn vi khuẩn hoặc nhiễm vi khuẩn, ví dụ bằng *E. coli* và/hoặc *Clostridium*, như *Clostridium difficile*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, hoặc *Clostridium septicum*, phương pháp này bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu chủng theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế cho động vật cần điều trị.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến phương pháp cho động vật ăn bao gồm bước dùng chế phẩm *Bacillus* theo sáng chế cho động vật, cụ thể là động vật một dạ dày.

Động vật một dạ dày bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gia cầm, chẳng hạn như gà thịt, gà giống, gà đẻ trứng, gà tây, đà điểu, chim cút, vịt và ngỗng, động vật ăn cỏ, chẳng hạn như ngựa và động vật nhai lại, ví dụ lạc đà, lạc đà Nam Mỹ, gia súc và cừu, bê, lợn, như lợn con, lợn cai sữa, lợn đang lớn, lợn trưởng thành, lợn chân giò, lợn nái, lợn nái con, lợn nái trưởng thành hoàn toàn, lợn nái đang mang thai, các loài gặm nhấm như thỏ, vật nuôi như mèo và chó, cá (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở cá hồi thịt đỏ, cá hồi, cá rô phi, cá da trơn và cá chép; và các loài giáp xác (bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở tôm to và tôm bé). Lợn và/hoặc gia cầm là các động vật một dạ dày được ưu tiên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế hoặc thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn chứa ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế để làm cải thiện hiệu suất của động vật, cụ thể là động vật một dạ dày.

Bằng chứng là trong các ví dụ, việc sử dụng chủng *Bacillus subtilis* theo sáng chế giúp cải thiện sức khỏe đường tiêu hóa của động vật, ví dụ, ngăn ngừa hoặc kiểm soát viêm ruột và tạo ra các thông số hiệu suất động vật được cải thiện cho động vật được điều trị so với đối chứng. Các thông số hiệu suất của động vật bao gồm nhưng không giới hạn ở mức mức tăng trọng lượng (WG), tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR), giảm tỷ lệ chết và tăng yếu tố hiệu quả sản xuất châu Âu (EPEF).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm tăng khả năng tiêu hóa của thức ăn chăn nuôi, như tỷ lệ tiêu hóa protein, phương pháp này bao gồm việc cho ăn chủng theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế cho động vật.

Do đó, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chủng theo sáng chế, hoặc chế phẩm theo sáng chế, để làm cải thiện một hoặc nhiều thông số hiệu suất của động vật được chọn từ nhóm bao gồm:

- i) tăng trọng lượng (WG),
- ii) tỷ lệ chuyển hóa thức ăn thấp (FCR),
- iii) điểm tổn thương viêm ruột hoại tử thấp,
- iv) tần số viêm ruột hoại tử thấp,
- v) tỷ lệ chết do viêm ruột hoại tử thấp,
- vi) yếu tố hiệu quả sản xuất châu Âu tăng (EPEF), và

vii) tỷ lệ chết thấp.

Theo phương án được ưu tiên theo sáng chế, thuật ngữ "hiệu suất động vật" được xác định bằng mức mức tăng trọng lượng cơ thể của động vật và/hoặc theo tỷ lệ chuyển hóa thức ăn. Thuật ngữ "cải thiện hiệu suất động vật" có nghĩa là mức tăng trọng lượng cơ thể và/hoặc giảm tỷ lệ chuyển hóa thức ăn và/hoặc cải thiện khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng hoặc năng lượng tiêu hóa trong thức ăn và/hoặc năng lượng chuyển hóa và/hoặc tăng hiệu quả thức ăn do sử dụng thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn theo sáng chế trong thức ăn chăn nuôi so với thức ăn chăn nuôi mà không bao gồm thức ăn chăn nuôi, phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp trộn sẵn nêu trên. Tốt hơn là, thuật ngữ "cải thiện hiệu suất động vật" có nghĩa là có sự mức tăng trọng lượng cơ thể và/hoặc giảm tỷ lệ chuyển hóa thức ăn.

Thuật ngữ "tăng trọng lượng" là đề chỉ động vật mức tăng trọng lượng cơ thể khi được cho ăn thức ăn chứa chế phẩm thức ăn so với động vật được cho ăn mà không có chế phẩm thức ăn theo sáng chế. Cụ thể, Tăng trọng lượng (WG) của động vật là sự mức tăng trọng lượng của động vật trong một khoảng thời gian xác định. Trong một phương án, sự cải thiện mức tăng trọng lượng cơ thể ít nhất là 0,5%, chẳng hạn như ít nhất 1%, chẳng hạn như ít nhất 2%, chẳng hạn như ít nhất 2,5%, chẳng hạn như ít nhất 3%, chẳng hạn như ít nhất 4% %, chẳng hạn như ít nhất 5%, chẳng hạn như ít nhất 6%, chẳng hạn như ít nhất 7%, chẳng hạn như ít nhất 8%, chẳng hạn như ít nhất 9%, chẳng hạn như ít nhất 10%.

Theo một phương án, cải thiện tăng trọng lượng dẫn đến tăng trọng lượng ít nhất là 0,5%, như ít nhất 0,8%, như ít nhất 1,2%, như ít nhất 1,5%, như ít nhất 1,8%, như ít nhất 2,0%, như ít nhất 2,5%, như ít nhất 3,0%, như ít nhất 4,0%, như ít nhất 5,0%, như ít nhất 6,0%, như ít nhất 7,0%. Theo phương án được ưu tiên, cải thiện tăng trọng lượng dẫn đến tăng trọng lượng được chọn từ nhóm bao gồm từ 1,8% đến 2,0%, từ 2,0% đến 2,2%, từ 2,2% đến 2,4%, từ 2,4% đến 2,6%, từ 2,6% đến 2,8%, từ 2,8% đến 3,0%, từ 3,0% đến 3,2%, từ 3,2% đến 3,4%, từ 3,4% đến 3,6%, từ 3,6% đến 3,8%,

từ 3,8% đến 4,0%, từ 4% đến 5%, từ 5% đến 7%, từ 7% đến 10%, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Thuật ngữ “tỷ lệ chuyển hóa thức ăn thấp” hoặc “tỷ lệ chuyển hóa thức ăn được cải thiện” có nghĩa là việc sử dụng chế phẩm phụ gia thức ăn trong thức ăn dẫn đến lượng thức ăn được yêu cầu cho động vật để mức tăng trọng lượng của động vật giảm bằng một lượng nhất định so với lượng thức ăn cần thiết để mức tăng trọng lượng của động vật bằng cùng một lượng khi thức ăn không bao gồm thành phần phụ gia thức ăn nói trên.

Theo một phương án, sự cải thiện tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) dẫn đến FCR là -2,5% hoặc nhỏ hơn -2,5%, như nhỏ hơn -2,6%, như nhỏ hơn -2,7%, như nhỏ hơn -2,8%, như nhỏ hơn -2,9%, như nhỏ hơn -3,0%. Theo phương án được ưu tiên, sự cải thiện FCR dẫn đến FCR là từ -5% đến -2%, như FCR là từ -4% đến -2%, như FCR là từ -3,5% đến -2,5%. Theo một khía cạnh cụ thể, sự cải thiện FCR dẫn đến FCR nằm trong khoảng được chọn từ nhóm bao gồm từ -5% đến -4,5%, từ -4,5% đến -4%, từ -4% đến -3,8%, từ -3,8% đến -3,6%, từ -3,6% đến -3,4%, từ -3,4% đến -3,2%, từ -3,2 đến -3,0%, từ -3,0% đến -2,8% và từ -2,8 đến -2,5%, hoặc tổ hợp của tất cả các khoảng này.

Khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng như được sử dụng ở đây có nghĩa là phân chất dinh dưỡng biến mất khỏi dải dạ dày-ruột hoặc một đoạn được chỉ định của dải dạ dày-ruột, ví dụ, ruột non. Khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng có thể được đo bằng sự khác biệt giữa những gì được đưa vào đối tượng và những gì đi ra trong phân của đối tượng hoặc giữa những gì được đưa vào đối tượng và những gì còn lại trong phần thức ăn được hấp thụ và tiêu hóa (digesta) trên một đoạn nhất định của dải dạ dày-ruột, ví dụ hồi tràng. Khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng được sử dụng ở đây có thể được đo lường bằng sự khác biệt giữa lượng chất dinh dưỡng và chất dinh dưỡng bài tiết bằng tổng số chất bài tiết trong một khoảng thời gian; hoặc với việc sử dụng chất đánh dấu trợ không được động vật hấp thụ và cho phép nhà nghiên cứu tính toán lượng chất dinh dưỡng biến mất trong toàn bộ dải dạ dày-ruột hoặc một đoạn của dải dạ dày-ruột. Một chất trợ như vậy có thể là titan dioxit, crom oxit hoặc tro không tan trong axit.

Khả năng tiêu hóa có thể được biểu thị bằng phần trăm chất dinh dưỡng trong thức ăn, hoặc là đơn vị khối lượng chất dinh dưỡng tiêu hóa trên mỗi đơn vị khối lượng chất dinh dưỡng trong thức ăn. Khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng như được sử dụng ở đây bao gồm khả năng tiêu hóa tinh bột, tỷ lệ tiêu hóa chất béo, tỷ lệ tiêu hóa protein, tỷ lệ tiêu hóa khoáng chất và khả năng tiêu hóa axit amin.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm cải thiện một hoặc nhiều thông số hiệu suất của động vật được chọn từ nhóm bao gồm:

- i) tăng trọng lượng (WG),
- ii) tỷ lệ chuyển hóa thức ăn thấp (FCR),
- iii) điểm tổn thương viêm ruột hoại tử thấp,
- iv) tần số viêm ruột hoại tử thấp,
- v) tỷ lệ chết do viêm ruột hoại tử thấp,
- vi) yếu tố hiệu quả sản xuất châu Âu tăng (EPEF), và
- vii) tỷ lệ chết thấp,

phương pháp này bao gồm việc cho ăn chủng theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế cho động vật.

Chế phẩm theo sáng chế còn có thể được sử dụng cho chế phẩm thức ăn linh hoạt (*flexible feed formulation*: FFF) trong đó động vật được nuôi bằng thức ăn có năng lượng chuyển hóa giảm và chế phẩm theo sáng chế, nhờ đó hiệu suất động vật chấp nhận được hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn được chấp nhận trong mặc dù năng lượng chuyển hóa giảm trong thức ăn. Năng lượng chuyển hóa giảm có thể ở mức từ 97% đến 99% thức ăn tiêu chuẩn cho động vật đang được quan tâm, chẳng hạn như từ 97% đến 98% hoặc từ 98% đến 99%.

Thông tin lưu giữ vi sinh vật

Chủng *Bacillus licheniformis* DSM17236 được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) ngày 07/04/2005 bởi Chr. Hansen A/S, Denmark. Quá trình lưu giữ được thực hiện theo Hiệp ước Budapest về đăng ký lưu giữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký sáng chế.

Chủng *Bacillus subtilis* DSM19489 được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) ngày 27/06/2007 bởi Chr. Hansen A/S, Denmark. Quá trình lưu giữ được thực hiện theo Hiệp ước Budapest về đăng ký lưu giữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký sáng chế.

Chủng *Bacillus mojavenensis* DSM25839 được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) ngày 03/04/2012 bởi Chr. Hansen A/S, Denmark. Quá trình lưu giữ được thực hiện theo Hiệp ước Budapest về đăng ký lưu giữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký sáng chế.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* DSM25840 được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) ngày 03/04/2012 bởi Chr. Hansen A/S, Denmark. Quá trình lưu giữ được thực hiện theo Hiệp ước Budapest về đăng ký lưu giữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký sáng chế.

Chủng *Bacillus subtilis* DSM25841 được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) ngày 03/04/2012 bởi Chr. Hansen A/S, Denmark. Quá trình lưu giữ được thực hiện theo Hiệp ước Budapest về đăng ký lưu giữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký sáng chế.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* DSM27032 được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) ngày 21/03/2013 bởi Chr. Hansen A/S, Denmark. Quá trình lưu giữ được thực hiện theo Hiệp ước Budapest về đăng ký lưu giữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký sáng chế.

Chủng *Bacillus subtilis* DSM32324 được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) ngày 08/06/2016 bởi Chr. Hansen A/S, Denmark. Quá trình lưu giữ được thực hiện theo Hiệp ước Budapest về đăng ký lưu giữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký sáng chế.

Chủng *Bacillus subtilis* DSM32325 được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) ngày 08/06/2016 bởi Chr. Hansen A/S, Denmark. Quá trình lưu giữ được thực hiện theo Hiệp ước Budapest về đăng ký lưu giữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký sáng chế.

Đối với tất cả các vi sinh vật lưu giữ được xác định ở trên, áp dụng các chỉ dẫn bổ sung sau:

Liên quan đến các cơ quan Patent tương ứng của các số liệu thống kê tương ứng, người nộp đơn yêu cầu một mẫu của các vi sinh vật được lưu giữ ở trên chỉ được cung cấp bởi một chuyên gia được đề nghị bởi người yêu cầu cho đến khi dữ liệu mà theo đó patent được cấp hoặc dữ liệu mà theo đó đơn sáng chế bị từ chối hoặc rút bỏ hoặc gần như bị rút bỏ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Thử nghiệm về ức chế bệnh và độ nhạy kháng sinh

Nguyên liệu:

Canh trường truyền Veal (*Veal Infusion Broth*: VIB) (Difco, 234420)

Aga Canh trường truyền Veal (VIB) (VIB + 1,5% Agar liên quan đến vi khuẩn (Agar no. 1), Oxoid LP0011)

Canh trường Muller Hinton 2, Cation-đã được điều chỉnh (Fluka)

Đĩa aga T3 (trên mỗi lít: 3g trypton, 2g tryptosa, 1,5g dịch chiết nấm men, 0,05M natri dihydro phosphat và 0,005g MnCl₂ [pH 6,8], và 15g aga)

Canh trường Laura-Bertani (LB) (g/L: Bacto trypton 10 (Difco 0123), Dịch chiết nấm men 5 (Oxoid L21), NaCl 10 (Merck nr. 106404))

Aga dịch truyền não-tim (*Brain Heart Infusion*: BHI) (Oxoid CM375)

Muối mật (dịch chiết mật, porxin; Sigma B8631)

Đĩa thử nghiệm sinh học (Nunc 240845)

Đĩa petri (Procudan 140096, đĩa petri có gân)

Dung dịch muối sinh lý chứa pepton (0,9% natri clorua, 1% pepton) FKP

Canh trường ISO-SENSITEST (Oxoid CM0473)

Đĩa vi chuẩn (MTP) NUNC, Denmark

Khay Omni/đĩa lỗ đơn N 242811 Thermo Scientific/NUNC Denmark

Đĩa vi chuẩn 96 lỗ sâu (*Deep well*: DW) không có Rnaza/ DNaza (Thermo Fisher Science)

Ampixilin (Sigma, A9518-5G)

Vancomyxin (Sigma, V1764-250MG)

Gentamixin (Sigma, G1264-50MG)

Kanamyxin (Sigma, K1377-1G)

Streptomycin (Sigma, S6501-5G)

Erythromycin (Sigma E-5389)

Clindamycin (Sigma, C2569-10MG)

Tetracyclin (Sigma T-7660)

Chloramphenicol (Sigma, C0378-5G)

Escherichia coli O101 H-, K99 F5 (Viện Huyết thanh Quốc gia, Copenhagen, Denmark)

Escherichia coli O147:K89 F4 H19 (Viện Huyết thanh Quốc gia, Copenhagen, Denmark)

Escherichia coli O149:k91,k88a,c,h10 NCTC10650, (*National Collection of Type Cultures, England*)

E. coli ATCC11775 (*American type culture collection*)

E. coli Cp6salp3 (*Copenhagen Veterinary University*)

Clostridium perfringens Type A, DSM756, Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Clostridium perfringens type C, NCTC3180, (*National Collection of Type Cultures: (England)*)

Clostridium perfringens CCUG2036 (Culture Collection, University of Gothenburg, Sweden)

Clostridium perfringens CCUG2037 (Culture Collection, University of Gothenburg, Sweden)

Clostridium perfringens CCUG44727 (Culture Collection, University of Gothenburg, Sweden)

Tất cả các chủng mầm bệnh được đề cập ở trên được duy trì ở LB với 20% glyxerol trong BHI ở -80°C.

Nuôi cấy Bacillus:

Chủng Bacillus được phân lập từ phân, đất, nguồn thức ăn và được thu thập từ các bộ sưu tập ngân hàng chủng được duy trì trong VIB với 20% glyxerol trong các đĩa chính MTP ở -80°C.

Các thể phân lập hiệu khí hình thành bào tử vi khuẩn được xác định bằng trình tự ribosome 16S và gyrB (Wang et al., 2007), thử nghiệm về độ nhạy với kháng sinh theo “Hướng dẫn đánh giá về tính nhạy cảm của vi khuẩn đối với tác nhân ức chế của người và tầm quan trọng của thú y” EFSA Journal 2012;10(6):2740 như được mô tả dưới đây, khả năng kháng mật và độ nhạy cảm với pH thấp, hoạt động của enzym, tăng trưởng trong môi trường khác nhau, khả năng chịu nhiệt và hình thành bào tử như được mô tả trong Công bố đơn quốc tế WO2013/153159.

Độ nhạy với kháng sinh được xác định bằng MIC

Chủng Bacillus được phân tích về độ nhạy với kháng sinh bằng cách đo nồng độ ức chế tối thiểu (*minimum inhibitory concentration*: MIC) một số chất kháng sinh. Phương pháp được sử dụng này là phương pháp vi pha loãng canh trường như được nêu làm chuẩn trong CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute M07-A8 and M45-A2).

Huyền phù của chủng nuôi cấy qua đêm đã được thử nghiệm được cấy vào canh trường ISO-SENSITEST (Oxoid CM0473) trong các đĩa vi chuẩn với nồng độ xấp xỉ 10^5 CFU/ml (*colony-forming unit*) (đơn vị hình thành khuẩn lạc/ml) trong dịch kháng sinh pha loãng liên tục hai lần được thử nghiệm (tổng thể tích 100 μ l/lỗ) và được ủ trong không khí trong 20-24 giờ ở 37°C. Kết quả được ghi nhận sau 20 giờ ủ là nồng độ kháng sinh thấp nhất để ức chế sự tăng trưởng rõ rệt. Thử nghiệm này được thực hiện hai lần như là hai mẫu lặp sinh học độc lập.

Chỉ các chủng *Bacillus* mà dễ bị ức chế theo Hướng dẫn EFSA mới được đưa vào thử nghiệm để ức chế vi khuẩn *E. coli* và *Clostridium perfringens* gây bệnh.

Thử nghiệm chủng *Bacillus* ức chế *E. coli* gây bệnh

Chủng *Bacillus* được thêm với thể tích 50 μ l từ đĩa chuẩn master MTP vào 700 μ l VIB trong đĩa DW và được ủ ở 37°C và 175 vòng/phút qua đêm. Các chủng *E. coli* được nuôi trưởng trong LB ở 30°C qua đêm. 2ml dịch nuôi cấy qua đêm *E. coli* được trộn với 200ml aga VIB lỏng ở 50°C, và được rót vào mỗi đĩa thử nghiệm sinh học. Các đĩa được sấy khô trên một băng ghế vô trùng. Dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm, mỗi 2 μ l, được chấm vào bề mặt VIB aga được trộn với *E. coli* trong các đĩa sinh học và được ủ ở 37°C trong 1 ngày.

Bán kính của các vùng ức chế đã được gạn lọc xung quanh *Bacillus* được đo và ghi lại là “3 = cao” – lớn hơn 2mm, “2 = trung bình” – nằm trong khoảng 0,5 - 2mm và “1 = low” – nhỏ hơn 0,5mm và 0 = không ức chế.

Clostridium perfringens ức chế by aga spot test

VIB aga được rót vào đĩa thử nghiệm sinh học (200ml mỗi đĩa) và được làm khô kỹ trong băng ghế vô trùng. Dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm, 2 μ l mỗi loại, được chấm vào bề mặt đĩa VIB aga và được ủ ở 37°C qua đêm. Chủng *Clostridium perfringens* được nuôi trưởng hiếu khí trên BHI ở 37°C qua đêm. Dịch nuôi cấy qua đêm *Clostridium perfringens* được thêm vào thể tích 2ml đến 200ml BHI aga lỏng,

được trộn và được đặt nằm nhẹ nhàng vào đĩa thử nghiệm sinh học cùng với các chấm Bacillus. Các đĩa được ủ hiêm khí ở 37°C trong 1 day.

Bán kính của các vùng ức chế đã được gạn lọc xung quanh Bacillus được đo và ghi lại là “3 = cao” – lớn hơn 2mm, “2= trung bình” – nằm trong khoảng 0,5 - 2mm và “1= low” – nhỏ hơn 0,5mm và 0= không ức chế.

Các dữ liệu được lặp lại trong các ngày riêng biệt.

KẾT QUẢ

Bảng 1

Kết quả về mức ức chế *E. coli* của chủng *Bacillus* được chọn

Ức chế		Ức chế <i>E.coli</i>				
Số DSM nếu có sẵn		<i>E. coli</i> O101 F5	<i>E. coli</i> O147:K89 F4	<i>E. coli</i> O149:k91, k88a	<i>E. coli</i> ATCC 11775	<i>E. coli</i> Cp6salp3
<i>Bacillus licheniformis</i>		0	0	0	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	17236	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	19489	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>		0	0	1	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	32324	3	3	3	3	3
<i>Bacillus subtilis</i>		0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>		0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	32325	2	2	3	2	2
<i>Bacillus subtilis</i>	25841	2	2	2	2	2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	25840	1	1	2	1	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	27032	2	3	3	2	2

Bảng 2

Kết quả về mức ức chế *Clostridium* của chủng *Bacillus* được chọn

Ức chế		Ức chế				
Số DSM nếu có sẵn		DSM75	NCTC318	CCUG203	CCUG203	CCUG4472
		6	0	6	7	7
<i>Bacillus licheniformis</i>		1	2	1	0	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	17236	1	1	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	19489	0	0	0	1	0
<i>Bacillus subtilis</i>		0	2	0	0	1
<i>Bacillus subtilis</i>	32324	3	3	3	3	3
<i>Bacillus subtilis</i>		1	0	1	2	1
<i>Bacillus subtilis</i>		1	0	0	1	0
<i>Bacillus subtilis</i>	32325	3	3	3	2	3
<i>Bacillus subtilis</i>	25841	2	3	2	2	3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	25840	2	3	3	2	3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	27032	3	3	3	2	3

Các kết quả trong các Bảng 1 và 2 về mức độ ức chế *E. coli* và *Clostridium* cho thấy rằng chủng *Bacillus licheniformis* và nhiều chủng *Bacillus subtilis* được thử nghiệm không thể hiện sự ức chế *E. coli* nào và ức chế *Clostridium* kém. Tuy nhiên, hai chủng *B. subtilis* DSM32324 và DSM32325 thể hiện kết quả ấn tượng liên quan đến việc ức chế cả *E. coli* và *Clostridium*.

Ví dụ 2

Xác định lượng đường khử trong thức ăn được ủ với chế phẩm Bacillus

Mục đích của thử nghiệm này là kiểm tra khả năng của các chủng Bacillus khác nhau làm suy giảm NSP trong thức ăn gia cầm thương phẩm và tăng lượng đường có sẵn.

Bảng 3

Chế phẩm chứa hợp chất thức ăn được sử dụng trong thử nghiệm

Thành phần	% khẩu phần thức ăn
Ngô xay	30,0
Bột mỳ	27,0
Bã đậu nành	22,5
Hạt cải dầu	6,0
Hạt hướng dương	5,0
Yến mạch	4,0
Bột cá	2,0
Limeston	1,24
Monocanxifosfat	0,78
Dầu thực vật	0,54
Natri bicacbonat	0,28
Vitamin, khoáng chất, hỗn hợp tiền axit amin	0,25
Natri clorua (0,17%);	0,17

Chế phẩm thức ăn trên cơ sở bột mỳ-ngô-đậu nành (Bảng 3) được đưa vào nồi hấp ở 121°C trong 15 phút để thanh trùng. Tiếp theo, mẫu thức ăn được pha loãng 20 lần bằng dung dịch đệm phosphat để đảm bảo độ pH ở khoảng 6-6,5 trong toàn bộ thử nghiệm. Các sản phẩm Bacillus thu được bằng cách tiêm với 2% dịch nuôi cấy qua đêm các chủng Bacillus, được nuôi trưởng trong canh trường truyền Veal (VIB) (Difco, 234420). Mẫu được lấy để phân tích đường khử (DNS) (T = 0). Sau khi ủ ở

37°C trong 24 giờ, một mẫu được lấy để xác định CFU. Một mẫu khác được ly tâm và chất nổi trên bề mặt được sử dụng để xác định DNS.

Đường khử được phân tích bằng thử nghiệm axit 3,5-dinitrosalicylic (DNS) như sau:

Dung dịch đệm Na-axetat (100mM, pH=6) được trộn với chất nổi trên bề mặt là mẫu *Bacillus* đã được lọc vô trùng và ủ ở 40°C trong 10 phút. Chất phản ứng DNS được thêm vào ống thử nghiệm, trộn và ủ trong bể nước sôi trong 5 phút. Sau khi làm mát, độ hấp thụ được đo ở bước sóng 540nm trong máy quang phổ.

Đường cong chuẩn được thiết lập bằng dung dịch gốc glucoza để thể hiện kết quả ở các đơn vị đường khử hoặc enzym (lượng enzym cần thiết để giải phóng 1µmol đường lượng glucoza khử trong 1ml trên mỗi đơn vị thời gian).

Kết quả được thực hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

	Mẫu	kJ/kg thức ăn
	Số DSM nếu có sẵn	
Mẫu đối chứng		214
<i>Bacillus aryabhattai</i>		237
<i>Bacillus licheniformis</i>	17236	340
<i>Bacillus licheniformis</i>	15326	541
<i>Bacillus subtilis</i>	19489	403
<i>Bacillus subtilis</i>	25841	458
<i>Bacillus subtilis</i>	32325	642
<i>Bacillus subtilis</i>	32324	723
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	16734	515
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	27032	515
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	14623	517
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	15509	853
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	25840	1142
<i>Bacillus mojavensis</i>	25839	939

Bảng 4 thể hiện kết quả của một số chủng *Bacillus* khác nhau và cho thấy rằng tất cả các chủng *Bacillus* được thử nghiệm tạo ra nhiều chất dinh dưỡng hơn cho động vật bằng cách cung cấp nhiều đường khử hơn so với mẫu đối chứng nhưng cũng có sự khác biệt đáng kể giữa các chủng riêng lẻ.

Dựa trên kết quả ức chế *E. coli* và *Clostridium perfringens* kết hợp với kết quả khả năng tạo ra lượng đường khử tăng lên của hai chủng có hiệu suất tốt nhất, các chủng *B. subtilis* DSM32324 và DSM32325, đã được chọn để nghiên cứu *in vivo*.

Ví dụ *in vivo*

Ví dụ 3

Hiệu quả của chủng *Bacillus subtilis* DSM32324 trong thử nghiệm *Clostridium Perfringens in vivo*

Bảng 5

Chế độ ăn

Tên Thành phần	% (khối lượng)	bắt đầu	đang phát triển	hoàn thiện
Ngô, ngũ cốc		58,509	64,054	69,218
Bã đậu nành, hư hỏng, dung môi		35,550	29,771	24,511
Chất béo, rau		2,100	2,585	2,748
Dicaxi phosphat		1,734	1,780	1,693
Canxi cacbonat		1,150	0,910	0,873
Muối (NaCl)		0,386	0,390	0,393

Methionin MHA, L – Lysin, Chất khoáng vi chất, hỗn hợp trộn sẵn vitamin và L-Threonin được bao gồm trong đó theo khuyến cáo của Nhà tạo giống.

Chế độ ăn dựa trên ngô/đậu nành không dùng thuốc (Bảng 5) được sử dụng. *Bacillus subtilis* DSM32324 $1.2 \cdot 10^6$ CFU/g được thêm vào thức ăn của một trong số các nhóm. Thức ăn và nước được cung cấp tùy ý trong tất cả các thử nghiệm. Tất cả thức ăn được quây kín. Thức ăn khởi đầu được cho ăn từ ngày 0 đến 21. Vào ngày 21, thức ăn khởi đầu không dùng hết được cân và loại bỏ. Thức ăn để phát triển được cấp cho đến ngày 35 và thức ăn để phát triển không dùng hết được cân và bỏ đi. Tương tự như vậy, thức ăn hoàn thiện được cho ăn cho đến ngày 42 trong đó thức ăn hoàn thiện không dùng hết được cân và loại bỏ.

Bảng 6

Xử lý	Chủng cấy <i>Clostridium perfringens</i> CP-6	Lồng nuôi/lần xử lý	số con/lần xử lý
Không được xử lý	Không bị nhiễm	8	320
Không dùng thuốc	Ngày 19, 20 và 21	8	320
DSM32324	Ngày 19, 20 và 21	8	320

Thử nghiệm bắt đầu với 40 con gà thịt Ross 308 đực trên mỗi lồng nuôi. Việc điều trị được nhân rộng thành tám khối, ngẫu nhiên trong các khối gồm 6 lồng nuôi.

Vào các ngày 19, 20 và 21, tất cả các lồng nuôi, ngoại trừ nhóm điều trị 1 không được điều trị không nhiễm bệnh, được thử nghiệm với canh trường nuôi cấy *C. perfringens* CP-6 (Knap I, et al., 2010). Chủng này là một dòng phân lập của *C. perfringens* đã biết là gây ra NE có nguồn gốc từ một hoạt động gà thịt thương mại và được sử dụng trong nghiên cứu hiện tại như là sinh vật thử nghiệm. Chủng cấy tươi được sử dụng mỗi ngày. Mỗi lồng nuôi nhận được cùng một lượng chủng cấy tương ứng với khoảng 1×10^8 đến 1×10^9 CFU *C. perfringens* CP-6. Chủng cấy được dùng bằng cách trộn vào thức ăn trong đế của ống cấp liệu.

Vào ngày 21, ba con từ mỗi lồng nuôi đã được chọn, làm chết, cân nhóm và kiểm tra mức độ hiện diện của các tổn thương viêm ruột hoại tử. Việc chấm điểm dựa trên điểm 0 đến 3, với 0 là bình thường và 3 là nghiêm trọng nhất. Cách tính điểm như sau: 0 đối với ruột bình thường, 1 đối với chất nhầy bao phủ ít và mất trương lực, 2 đối với viêm ruột hoại tử nặng và 3 đối với viêm ruột hoại tử cực độ với sự hiện diện của máu trong lòng ruột.

Tất cả các con đều được cân vào ngày 31, 35 và 42 để thấy tác động của viêm ruột hoại tử đến các thông số về hiệu suất: Giá trị trung bình cho trọng lượng sống, mức tăng trọng lượng trung bình (AWG), mức tiêu thụ thức ăn, tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR), điểm tổn thương viêm ruột hoại tử và tỷ lệ chết (tổng và NE) được tính cho tất cả các lồng nuôi.

Phân tích dữ liệu thống kê được thực hiện theo SAS Stat Version 9.2 sử dụng phân tích ANOVA với thiết kế ngẫu nhiên hoàn chỉnh để thiết lập sự khác biệt giữa các nhóm điều trị. Lồng nuôi được coi là đơn vị thử nghiệm thống kê với chế độ ăn là hiệu ứng cố định. Kết quả được báo cáo là trung bình bình phương tối thiểu và được giả định khác nhau ở $P < 0,05$.

Bảng 7

Ngày 21

Điều trị	FCR	AWG (kg)
Không dùng thuốc, không bị nhiễm	1,447c	0,562a
Không dùng thuốc, bị nhiễm	1,652a	0,501b
DSM32324, bị nhiễm	1,575b	0,567a

Ngày 35

Điều trị	FCR	AWG (kg)
Không dùng thuốc, không bị nhiễm	1,569b	1,735ab
Không dùng thuốc, bị nhiễm	1,634a	1,679b
DSM32324, bị nhiễm	1,593b	1,756a

Ngày 42

Điều trị	FCR	AWG (kg)
Không dùng thuốc, không bị nhiễm	1,627b	2,272a
Không dùng thuốc, bị nhiễm	1,731a	2,155b
DSM32324, bị nhiễm	1,645b	2,303a

Các chữ cái gán theo các kết quả đại diện cho các nhóm điều trị khác biệt có ý nghĩa thống kê với mẫu đối chứng không dùng thuốc (P 0,05) hoặc với nhau.

Bảng 8

Điều trị	NE	NE %
	Điểm tổn thương	Tỷ lệ chết
Không dùng thuốc, không bị nhiễm	0,05b	0,0b
Không dùng thuốc, bị nhiễm	0,58a	4,3a
DSM32324, bị nhiễm	0,18b	0,7b

Các chữ cái gán theo các kết quả đại diện cho các nhóm điều trị khác biệt có ý nghĩa thống kê với mẫu đối chứng không dùng thuốc (P 0,05) hoặc với nhau.

Kết luận:

Đối với các thông số hiệu suất, tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) và mức tăng trọng lượng trung bình (AWG) được đo ở ngày 21, ngày 35 và ngày 42, đã thấy sự cải thiện đáng kể cho tất cả các điểm dữ liệu khi xem xét *Bacillus subtilis* DSM3234 làm phụ gia thức ăn khi so sánh với nhóm đối chứng bị nhiễm mà không được điều trị. Đáng ngạc nhiên là, nhóm được điều trị bằng *Bacillus* không cho thấy bất kỳ sự khác biệt đáng kể nào đối với nhóm đối chứng không nhiễm bệnh, không dùng thuốc, mặc dù nhóm sau không nhận được thử thách và được coi là khỏe mạnh (Bảng 7).

Liên quan đến viêm ruột cận lâm sàng gây ra trong thử nghiệm *in vivo*, kết quả cho thấy rằng *Bacillus subtilis* DSM3234 làm giảm tổn thương viêm ruột hoại tử ở gà và làm giảm tỷ lệ chết của bệnh viêm ruột hoại tử một cách đáng kể (Bảng 8).

Ví dụ 4

Ảnh hưởng của chủng *BACILLUS SUBTILIS* DSM32325 trong thử nghiệm *in vivo* thách thức *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá ảnh hưởng của chủng *Bacillus subtilis* DSM32325 đối với tần suất viêm ruột hoại tử và điểm tổn thương viêm hoại tử ở gà.

Gà thịt Ross 308 được phân phối thành ba nhóm với 48 con mỗi nhóm:

Nhóm đối chứng bị nhiễm, không được điều trị; nhóm bị nhiễm, được điều trị bằng kháng sinh 20mg amoxicilin/kg trọng lượng cơ thể; và nhóm bị nhiễm, được điều trị bằng thức ăn chứa *Bacillus subtilis* DSM32325 1.2 10⁶ CFU/.

Tất cả các con được cho ăn tùy ý cho tất cả các giai đoạn và được tiêm vắc-xin khi đến cơ sở nghiên cứu (D1) chống viêm phế quản truyền nhiễm và chống lại bệnh Newcastle. Cho đến ngày D9, các con được cho ăn thức ăn khởi động “Kíp 1-3” được mua tại một nhà máy thức ăn thương mại (Cibus, Kaaistraat 49; 8800 Roeselare,

Belgium). Thành phần định lượng của thức ăn khởi động là giống nhau cho tất cả các con ngoại trừ việc bao gồm các sản phẩm tương ứng trong mỗi nhóm. Từ D9 đến D26, các con nhận được thức ăn để phát triển với hàm lượng protein cao và bột cá bao gồm 40%. Thức ăn để phát triển “Teler2” được mua từ một nhà máy thức ăn thương mại (Cibus, Kaaistraat 49; 8800 Roeselare, Belgium). Thành phần của thức ăn để phát triển cho các nhóm điều trị khác nhau là hoàn toàn giống nhau, ngoại trừ việc bao gồm các sản phẩm tương ứng trong mỗi nhóm. Thức ăn nhận được mã nhóm và hỗn hợp xử lý được trộn sơ bộ sau đó được trộn với lượng thức ăn nhấm vào từng lô thức ăn.

Vào ngày 19, 20, 21 và 22, khoảng 10^9 CFU chủng *Clostridium perfringens* 56 (Timbermont et al. 2009) được dùng qua đường miệng ba lần mỗi ngày cho tất cả các con như được mô tả trong tài liệu Timbermont et al. 2009. Các tổn thương viêm ruột hoại tử được xác định vào ngày 25 và 26 (điểm 0-6) (Johnson & Reid 1970). Tần số của NE và điểm NE được phân tích bằng cách sử dụng bằng mô hình hồi quy logistic và hồi quy tuyến tính. Ý nghĩa thống kê được đánh giá ở mức $P \leq 0,05$.

Kết quả

Tỷ lệ các con dương tính với tổn thương viêm hoại tử vĩ mô (điểm tổn thương ≥ 2) vào mỗi ngày lấy mẫu được trình bày trong bảng dưới đây. Mỗi ngày, một mô hình hồi quy tuyến tính là phù hợp để phân tích sự khác biệt giữa các nhóm điều trị và IUC. Một mô hình bổ sung là phù hợp với dữ liệu của Ngày 25 và Ngày 26 cộng lại. Trong mô hình này, Ngày 25 và 26 và Nhóm được thêm vào dưới dạng hiệu ứng cố định.

Bảng 9

Nhóm	Ngày 25	Ngày 26	Ngày 25 và 26	
	%NE	%NE	%NE	$P \leq 0,05$
Đối chứng nhiễm bệnh không được điều trị	50	23	36,5	Tham khảo
Amoxixilin	44	14	29	
<i>Bacillus subtilis</i> DSM32325	25	7	16	**

** số được đánh dấu đại diện cho các nhóm điều trị khác biệt có ý nghĩa thống kê với IUC đối chứng không được điều trị ($P \leq 0,05$).

Điểm NE trung bình theo nhóm và ngày được tính theo cách tương tự.

Bảng 10

Group	Ngày 25	Ngày 26	Ngày 25 và 26	$P \leq 0,05$
	Điểm trung bình	Điểm trung bình	Điểm trung bình	
Đối chứng nhiễm bệnh không được điều trị	1,75	1,15	1,450	Tham khảo
Amoxixilin	1,56	1,07	1,315	
<i>Bacillus subtilis</i> DSM32325	1,25	1,00	1,125	**

** số được đánh dấu đại diện cho các nhóm điều trị khác biệt có ý nghĩa thống kê với IUC đối chứng không được điều trị ($P \leq 0,05$).

Kết quả cho thấy rằng *Bacillus subtilis* DSM32325 làm giảm bệnh viêm ruột hoại tử thường xuyên ở gà khi so sánh với đối chứng nhiễm bệnh không được điều trị theo cách có ý nghĩa về mặt thống kê khi dữ liệu của Ngày 25 và 26 được kết hợp lại. Đáng ngạc nhiên, tần số viêm ruột hoại tử thậm chí còn thấp hơn ở nhóm được điều trị *Bacillus* so với nhóm được điều trị Amoxicilin (Bảng 9).

Hơn nữa, *Bacillus subtilis* DSM32325 làm giảm bệnh viêm ruột hoại tử severity (điểm trung bình) khi so sánh với đối chứng nhiễm bệnh không được điều trị theo cách có ý nghĩa về mặt thống kê khi dữ liệu của Ngày 25 và 26 được kết hợp lại. Đáng ngạc nhiên là, điểm trung bình thậm chí còn thấp hơn trong nhóm được điều trị bằng *Bacillus* than in nhóm được điều trị bằng Amoxilin (Bảng 10).

Ví dụ 5

Thử nghiệm về hiệu suất cho ăn

Động vật:

Gà thịt Ross 308 một ngày tuổi được phân bổ ngẫu nhiên cho 72 lồng nuôi trên sàn, mỗi lồng chứa 25 con gà sao cho mỗi lần điều trị được lặp lại 12 lần. Các nhóm thử nghiệm là đối chứng âm tính (NC), *Bacillus subtilis* DSM19361, *Bacillus subtilis* DSM32324 và *Bacillus subtilis* DSM32325.

Chế độ ăn:

Ba pha thức ăn hỗn hợp dạng nghiền (từ 1 đến 14 ngày, 15 đến 28 ngày và 29 đến 42 ngày) không có bất kỳ hợp chất kháng sinh, chất ức chế, chất tăng cường hiệu suất, chế phẩm sinh học, enzym hoặc chất axit hóa khác được cung cấp tự do tùy ý. Chế độ ăn dựa trên ngô, lúa mì, lúa mạch, lúa mạch đen và bột đậu nành.

Bảng 11
Hàm lượng thành phần của chế độ ăn cơ bản

THÀNH PHẦN, %	Bắt đầu 0-14 đ	Đang phát triển 15-28 đ	Hoàn thiện 29-42
Ngô	19,647	19,574	20,207
Bã đậu nành 44%CP	30,147	24,190	20,210
Bột mỳ	15,000	15,000	15,000
Đậu nành chất béo đầy đủ	12,000	15,000	15,000
Lúa mạch	10,000	10,000	10,000
Lúa mạch đen	5,000	7,5000	10,000
Dầu đậu nành	4,141	4,833	--
Chất béo động vật (mỡ lợn)	--	--	5,905
Canxi cacbonat	1,139	1,067	1,045
Monocanxi phosphat	1,546	0,462	1,286
Muối	0,327	0,302	0,303
Natri bicacbonat	0,100	0,100	0,100
DL-Methionin	0,295	0,326	0,289
L-Lysin HCl	0,186	0,168	0,176
L-Threonin	0,071	0,077	0,078
Hỗn hợp trộn sẵn vitamin và khoáng chất	0,400	0,400	0,400

Chủng thử nghiệm:

Các chủng thử nghiệm *Bacillus subtilis* DSM19489, *Bacillus subtilis* DSM32324, và *Bacillus subtilis* DSM32325 được cho ăn trong suốt khoảng thời gian thử nghiệm 42 ngày ở mức liều $1,2 \times 10^6$ CFU/g thức ăn.

Quan sát:

Mức tăng hàng ngày trung bình (*Average daily gain*: ADG), thể trọng (*body weight*: BW), sự hấp thu thức ăn là sự hấp thu thức ăn hàng ngày trung bình (*average daily hấp thu thức ăn*: ADFI) và hiệu quả thức ăn; tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (*feed*

conversion ratio: FCR) ở 1, 14, 28, 35 và 42 ngày tuổi được đo. Sức khỏe toàn trạng, việc điều trị bằng thuốc và tỷ lệ chết được đánh giá hàng ngày. Yếu tố hiệu quả sản xuất châu Âu (EPEF) được tính: [(khả năng sống, % x mức tăng BW, kg)/(Thời gian nghiên cứu tính theo ngày x FCR)] x 100.

Phân tích thống kê và giải thích:

Phân tích phương sai là kỹ thuật thống kê cơ bản được áp dụng. Dữ liệu được phân tích dưới dạng thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên bởi GLM của SPSS v. 19.0, sau đó là thử nghiệm bình quân Tukey. $P < 0,05$ được coi là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, trong khi $0,05 < P < 0,10$ được coi là xu hướng gần đáng kể.

Kết quả:

Sức khỏe của động vật được coi là bình thường trong suốt nghiên cứu, và không có tác dụng phụ nào được ghi nhận. Có 23 trường hợp tử vong/loại thải (1,27%) trong khoảng từ 0 đến 14 ngày, 19 trường hợp tử vong/loại thải (1,07%) trong khoảng thời gian từ 14 đến 28 ngày và 16 trường hợp tử vong/loại thải (0,91%) trong khoảng từ 28 đến 42 ngày và chúng không liên quan đến việc điều trị. Tổng Tỷ lệ chết/loại thải là 58/1800 con (3,22%) sau 42 ngày được coi là bình thường.

Bảng 12

Điều trị	Giai đoạn vỗ béo toàn bộ, 0-42 d			
	ADG, g/ngày	ADFI, g/ngày	FCR	EPEF
1. mẫu đối chứng âm	68,6 ^b	116,2	1,69 ^b	386 ^b
2. DSM19489 (<i>B. subtilis</i>)	70,4 ^{ab}	116,1	1,65 ^a	420 ^a
3. DSM32324 (<i>B. subtilis</i>)	71,9 ^a	116,6	1,62 ^a	424 ^a
5. DSM32325 (<i>B. subtilis</i>)	70,9 ^a	115,9	1,64 ^a	416 ^a
SEM (n=12)	0,53	0,79	0,006	5,3
P (Xác suất)	0,0002	0,7429	< 0,0001	< 0,0001

Hiệu suất của các con vật là phù hợp với điều kiện thử nghiệm (gà thịt được cho ăn chế độ ăn nghiền và nuôi trong lồng trên sàn). Ở 28 ngày tuổi, gà thịt nhận DMS32324 là nặng hơn 3,77% so với con đối chứng ($P < 0,05$). Ở 35 và 42 ngày tuổi, gà thịt được bổ sung các chủng Bacilli DSM32324 hoặc DSM32325 là nặng hơn đáng kể so với các con đối chứng, cho thấy nhóm gà thịt DSM19361 có trọng lượng trung bình. Trong giai đoạn bắt đầu (từ 0 đến 14 ngày tuổi), không có sự khác biệt đáng kể giữa các phương pháp điều trị được quan sát thấy trong sự tăng trưởng, lượng thức ăn hoặc chuyển hóa thức ăn. Trong thời kỳ sinh trưởng (từ 15 đến 28 ngày tuổi), gà nhận được DSM32324 tăng trưởng đáng kể so với gà thịt đối chứng. Việc chuyển hóa thức ăn của tất cả các gà thịt được bổ sung men vi sinh đã được cải thiện đáng kể khi so sánh với các con đối chứng. Không có sự khác biệt đáng kể giữa các phương pháp điều trị được quan sát thấy trong giai đoạn tăng trưởng, lượng hấp thu thức ăn hoặc chuyển hóa thức ăn trong tuần thử nghiệm cuối cùng (từ 35 đến 42 ngày tuổi).

Đối với giai đoạn vỗ béo toàn thể (0-42 ngày tuổi), gà thịt được bổ sung bằng chủng Bacilli DSM32324 hoặc DSM32325 tăng trưởng một cách đáng kể hơn các con đối chứng. Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) và EPEF của tất cả các con gà thịt được bổ sung bằng probiotic được cải thiện một cách đáng kể khi so sánh với các giá trị này của các con đối chứng.

Ví dụ 6

Thử nghiệm về hiệu suất cho ăn

Mục đích của thử nghiệm này là đánh giá việc bổ sung *Bacillus subtilis* DSM32324 và sản phẩm thương mại *Bacillus subtilis* DSM19361 trong chế độ ăn của gà thịt. Mục đích là để đánh giá ảnh hưởng của các sản phẩm đến các thông số sản xuất trong chế độ ăn dựa trên lúa mì bao gồm cả coccidiostat và enzym cho ăn.

Có 1300 con gà con (đực) ROSS 308 trong mỗi lần điều trị - được chia thành 10 lồng mỗi lồng chứa 130 gà con. Gà được cho ăn tự do tùy ý bằng thức ăn ba pha ở dạng viên trong tất cả các giai đoạn và nước uống được cung cấp tự do tùy ý bằng

những núng cung cấp nước. Thành phần của chế độ ăn được thể hiện trong bảng dưới đây. Thức ăn được cung cấp bởi Mezinárodní testování drůbeže, s.p., nhà máy thức ăn chăn nuôi Lysá nad Labem.

Chất phụ gia thức ăn probiotic được phân bổ như sau:

T1: Nhóm đối chứng không được bổ sung;

T2: *Bacillus subtilis* DSM19489 $1,2 \times 10^6$ CFU/g thức ăn;

T3: *Bacillus subtilis* DSM32324 $1,2 \times 10^6$ CFU/g thức ăn.

Bảng 13

Thành phần chế độ ăn

Thành phần	Chế độ ăn bắt đầu	Chế độ ăn đang phát triển	Chế độ ăn hoàn thiện
	Ngày 1 – 13	Ngày 14 – 28	Ngày 29 – 42
Bột mỳ	40,000	51,880	56,450
Ngô	19,460	10,000	10,000
Bã đậu nành thêm	32,800	29,500	24,600
Dầu đậu nành	4,000	5,000	5,800
L-Lysin HCl	0,170	0,220	0,200
DL-Methionin	0,060	0,100	0,120
L-Threonin	0,060	0,080	0,060
Limeston	1,500	1,500	1,400
Muối	0,250	0,250	0,240
Monocanxi phosphat	1,000	0,770	0,500
Soda bicarbonat	0,200	0,200	0,130
AMV BR1 Plus	0,500	-	-
AMV BR2 Plus	-	0,500	-
AMV BR3 Plus	-	-	0,500

Trọng lượng sống được đo vào ngày 1 (tất cả các con trong mỗi lồng được cân cùng nhau), 13 và 28 (tất cả các con được cân riêng, không cần nhịn ăn) và 42 (tất cả các con được cân riêng sau 12 giờ nhịn ăn).

Tiêu thụ thức ăn trên 1kg trọng lượng sống được ghi nhận trên mỗi lồng vào các ngày 13, 28 và 42 và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn được tính toán.

Phân tích thống kê:

Kết quả cân nặng sống vào ngày 13, 28 và 42 và tỷ lệ chết được đánh giá theo thống kê bằng cách sử dụng mô hình ANOVA một yếu tố, tác dụng chính của Thử nghiệm điều trị Dunnett (tất cả các chế độ ăn uống có bổ sung so với đối chứng không bổ sung (T1)).

Kết quả:

Hệ số biến thiên (*Coefficient of variation*: CV) đối với Chuyển hóa thức ăn và Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn trung bình là 2,7%. CV đối với Thể trọng (*Body Weight*: BW) cuối cùng và mức tăng Thể trọng là 3,7%, và trung bình điều trị trong phạm vi biến thiên trong lồng của BW cuối cùng (như một thước đo cho tính đồng nhất của đàn) dao động từ 10,3 đến 15,3%.

Tỷ lệ chết trong đàn là thấp (tổng thể 3,4% ở các con không được bổ sung) và thấp đáng ngạc nhiên trong 13 ngày đầu.

Bảng 14

Điều trị	Tỷ lệ chết trong giai đoạn								
	Ngày 1-13		Ngày 14-28		Ngày 29-42		Ngày 1-42		
	Số con	G	Số con	g	Số con	g	Số con	g	%
Không được bổ sung	2	514	18	14421	24	45212	44	60147	3,38
DSM19489	4	1459	10	7074	14	25049	28	33582	2,15
DSM32324	3	1048	14	11295	7	11473	24	23816	1,85

Kết luận:

DSM19489 có xu hướng làm giảm tỷ lệ chết ($p=0,096$) và *Bacillus subtilis* DSM32324 làm giảm rõ rệt và đáng kể tỷ lệ chết đặc biệt ở giai đoạn kết thúc cũng phục vụ cho ý nghĩa thống kê về tỷ lệ chết trong thử nghiệm tổng thể.

Ví dụ 7

Ảnh hưởng của các chủng *Bacillus* khác nhau lên hiệu suất tăng trưởng, khả năng tiêu hóa và tình trạng sức khỏe ruột ở gà thịt

Các con được nhốt với 15 con một lồng có kích thước 1,2 m x 0,8 m từ D1 cho đến khi kết thúc thử nghiệm (D42). Sàn nhà trong mỗi lồng được phủ bằng dăm gỗ với độ dày khoảng 5cm. Một khay cho ăn thương mại với một bình chứa thức ăn được treo ở mặt trong của lồng và bốn núm cung cấp nước được gắn ở mặt bên của lồng.

Các con được cho ăn một chế độ ăn gần tối ưu với lúa mạch đen được chứa trong đó như một nguồn protein phi tinh bột và không có enzym thức ăn. Cho đến ngày D22, các con được cho ăn một thức ăn khởi đầu. Từ ngày D22 đến D42, các con được cho ăn thức ăn phát triển. Thành phần định lượng của thức ăn là giống nhau cho tất cả các động vật ngoại trừ việc bao gồm các chủng tương ứng trong mỗi nhóm. Chi tiết về thành phần thức ăn được trình bày trong Bảng 15. Các chủng cần thử nghiệm

(DSM32324, DSM25840 và DSM32325) được trộn với tỷ lệ $1,2 \times 10^6$ CFU/g thức ăn vào thức ăn.

Bảng 15

Hàm lượng thành phần của chế độ ăn cơ bản

THÀNH PHẦN, %	Bắt đầu 0-21 d	Hoàn thiện 22-42 d
Ngô	41,6	31,6
Bã đậu nành 47,3%CP	26,0	24,0
Hạt cải dầu 32,5CP	4,0	5,0
Bột cá 70,0CP	2,0	-
Bột mỳ	15,0	20,0
Lúa mạch đen	5,0	10,0
Dầu đậu nành	1,0	1,0
Chất béo động vật (mỡ lợn)	1,5	5,0
Canxi cacbonat	1,359	1,10
Monocanxi phosphat	1,2	0,85
Muối	0,18	0,21
Natri bicacbonat	0,27	0,23
DL-Methionin	0,195	0,195
L-Lysin HCl	0,15	0,21
L-Threonin	0,045	0,065
L-valin	0,015	0,035
Hỗn hợp trộn sẵn vitamin và khoáng chất	0,500	0,500

Khi thiết lập (D1), 960 con vật được đặt trong 64 chiếc lồng (tức là 15 con trên mỗi lồng). Như đã đề cập ở trên, thức ăn bắt đầu được cung cấp cho tất cả các con từ D1 đến D22. Từ D22 đến D42, thức ăn phát triển được cung cấp cho tất cả các con.

Vào ngày D12, D22 và D42, các mẫu mô được lấy từ tá tràng, ruột chảy và hồi tràng của 1 con trên mỗi lồng.

Vào ngày D1, D12, D22, D33 và D42, các con và thức ăn được cân để phân tích ảnh hưởng của probiotic đến hiệu suất tăng trưởng (tăng trọng lượng, lượng thức ăn và chuyển hóa thức ăn) trong các giai đoạn khác nhau.

Vào ngày D22 và D42, 6 con trên mỗi lồng được giết. Phần hồi tràng và manh tràng được gộp lại trên mỗi lồng. Các mẫu bổ sung của phần hồi tràng và manh tràng được đông lạnh và được bảo quản ở -80°C .

Vào ngày D19-D22 và D40-42, 3 giọt phân trên mỗi lồng đã được thu thập hàng ngày. Các phân được gộp lại trên mỗi lồng.

Sức khỏe được ghi nhận hàng ngày. Từ D1 cho đến khi kết thúc nghiên cứu tại D42, các quan sát sức khỏe tổng quát đã được thực hiện và ghi lại bởi các nhân viên kho có kinh nghiệm hàng ngày. Nếu các con có dấu hiệu bị bệnh, các quan sát sức khỏe toàn trạng được thực hiện ít nhất hai lần mỗi ngày. Tỷ lệ chết được ghi nhận hàng ngày.

Trọng lượng cơ thể (BW) được đo trên mỗi lồng vào ngày D1. Trọng lượng BW động vật được đo riêng vào ngày D12, D22, D33 và D42. Tăng trọng lượng hàng ngày (DWG) được tính trên mỗi lồng trong các giai đoạn D1 đến D12, D1 đến D22 và D1 đến D42. Tăng trọng hàng ngày (DWG) được tính trên mỗi con trong các giai đoạn D12 đến D22, D22 đến D33, D33 đến D42 và D22 đến D42.

Sự khác biệt về BW giữa thời điểm bắt đầu và kết thúc mỗi giai đoạn nghiên cứu là mức tăng trọng lượng (WG) cho giai đoạn đó. Mức tăng trọng lượng hàng ngày (DWG) được tính bằng WG chia cho số ngày trong khoảng thời gian tương ứng. DWG của các con đã chết được bao gồm khi tính DWG trung bình của mỗi nhóm, coi ngày chết của mỗi con là kết thúc thời gian nghiên cứu cho con đó.

Tiêu thụ thức ăn hàng ngày (FC) và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) được tính ở cấp lồng cho các giai đoạn D1 đến D12, D12 đến D22, D1 đến D22, D22 đến D33, D33 đến D42, D22 đến D42 và D1 đến D42.

Thức ăn được cung cấp cho các con (Thức ăn IN) được cân vào ngày D1, D12, D22 và D33. Khi vào ngày bất kỳ, một lồng đã hết thức ăn và cần phải cung cấp thêm, thức ăn bổ sung được thêm vào cũng được cân và ghi lại dưới dạng “Thức ăn IN”. Thức ăn còn lại trong mỗi lồng (“Thức ăn OUT”) được cân vào ngày D12, D22, D33 và D42. Sự khác biệt về trọng lượng thức ăn khi bắt đầu và kết thúc mỗi giai đoạn nghiên cứu được tính toán để xác định mức tiêu thụ thức ăn (FC) trên mỗi lồng. Sự khác biệt về trọng lượng thức ăn giữa thời điểm bắt đầu và kết thúc của mỗi giai đoạn nghiên cứu (“Thức ăn IN” – “Thức ăn OUT”) là FC của lồng tương ứng trong khoảng thời gian đó. FC trung bình hàng ngày trên mỗi con được tính bằng FC chia cho số ngày trong khoảng thời gian tương ứng nhân với số lượng con sẽ ăn trong khoảng thời gian đó trong lồng tương ứng.

Các chất khô, protein thô, chất béo thô, hàm lượng Ca, P, năng lượng và titan dioxit được xác định trên phần hồi tràng và manh tràng được thu thập vào ngày D22 và D42 và trên thức ăn. Titan oxit đã được thêm vào thức ăn (0,3%) như một chất đánh dấu trợ. Khả năng tiêu hóa trong hồi tràng biểu kiến được tính toán theo mô tả của Waititu và cộng sự, 2014.

Các mẫu được phân tích tại Department of Animal Sciences, Subdivision Animal Nutrition of Wageningen University dưới sự giám sát của Leon de Jrid. Các phương pháp sau được sử dụng:

Chất khô: Sấy 3 giờ ở 103°C dựa trên ISO 6496 (1999)

Tro: 3 giờ làm nóng ở 550°C dựa trên ISO 5984 (2002)

Protein: Phương pháp Kjeldahl dựa trên ISO 5983 (2005)

Chất béo: Chiết xuất bằng ete dầu hỏa sau khi xử lý bằng axit dựa trên ISO 6492 (1999)

Canxi: Phổ hấp thụ dựa trên ISO 6869 (2000)

Photpho: Xác định phổ dựa trên ISO 6869 (2000)

Năng lượng: phương pháp nhiệt lượng bom dựa trên ISO 9831 (1998)

Titan: xác định phép đo phổ dựa trên sự phá hủy Kjeldahl, sau đó tô màu bằng peroxit và đo độ hấp thụ ở 408nm.

Chất khô, protein thô, chất béo thô, hàm lượng Ca, năng lượng và titan dioxit được xác định trên phân thu gom được thu thập vào ngày D19-D22 và D40-D42 và thức ăn. Titan oxit đã được thêm vào thức ăn (0,3%) như một chất đánh dấu tracer. Tổng lưu lượng đường rõ ràng được tính toán như mô tả của Waititu và cộng sự, 2014.

Dữ liệu được phân tích bằng chương trình RStudio (Version 0.99.467, RStudio, Inc.). Tất cả dữ liệu ngoại trừ trọng lượng cơ thể và tăng trọng lượng hàng ngày ở cấp độ các con được phân tích bằng mô hình hồi quy tuyến tính với nhóm điều trị là hiệu ứng cố định (quy trình lm của gói lme). Trọng lượng cơ thể và tăng trọng hàng ngày ở cấp độ các con được phân tích bằng mô hình hồi quy hỗn hợp tuyến tính với nhóm điều trị là hiệu ứng cố định và lồng là hiệu ứng ngẫu nhiên để điều chỉnh cho cụm các con trong lồng (quy trình lme của gói nlme) (Độ lệch giao thức n°1). Ý nghĩa thống kê được đánh giá ở mức $P \leq 0,05$.

Kết quả:

Tám con đã chết trong nghiên cứu (0,8%).

Bảng dưới đây cho thấy trọng lượng cơ thể trung bình trên mỗi ngày nghiên cứu và điều trị. Sự khác biệt được phân tích với các mô hình hồi quy hỗn hợp tuyến tính với xử lý như hiệu ứng cố định phân loại và lồng là hiệu ứng ngẫu nhiên để giải thích cho việc phân cụm các con trong lồng.

Bảng 16

Thể trọng trung bình

Tên nhóm	D12		D22		D33		D42	
	Trung bình	Giá trị <i>P</i>	Trung bình	Giá trị <i>P</i>	Trung bình	Giá trị <i>P</i>	Trung bình	Giá trị <i>P</i>
NC	266	Ref.	687	Ref.	1569	Ref.	2390	Ref.
DSM32324	272	0,220	730	0,010	1613	0,208	2459	0,176
DSM25840	286	<0,001	759	<0,001	1672	0,003	2525	0,009
DSM32325	283	0,001	744	0,001	1632	0,070	2476	0,087

Bảng 17 cho thấy khả năng tiêu hóa trong hồi tràng biểu kiến (*apparent ileal digestibility*: AID) trung bình trên mỗi chất dinh dưỡng và lần điều trị. Sự khác biệt được phân tích với các mô hình hồi quy tuyến tính với xử lý là hiệu ứng cố định phân loại (quy trình lm của gói lme4)

Bảng 17
Trung bình khả năng tiêu hóa trong hồi tràng biểu kiến (AID)

Tên nhóm	Chất khô		Tro		Protein		Chất béo		Ca		Phospho		Năng lượng	
	Trung bình	Giá trị P	Trung bình	Giá trị P	Trung bình	Giá trị P	Trung bình	Giá trị P	Trung bình	Giá trị P	Trung bình	Giá trị P	Trung bình	Giá trị P
NC	57,6	Tham khảo	38,2	Tham khảo	74,1	Tham khảo	61,6	Tham khảo	36,6	Tham khảo	53,8	Tham khảo	65,0	Tham khảo
DSM32324	58,8	0,233	38,7	0,697	76,3	0,050	59,5	0,515	36,3	0,900	53,6	0,879	66,5	0,160
DSM25840	59,5	0,075	40,8	0,039	76,3	0,050	64,0	0,458	33,4	0,190	54,0	0,842	67,2	0,043
DSM32325	57,4	0,862	37,5	0,568	74,6	0,639	63,1	0,640	31,3	0,031	51,0	0,039	65,4	0,677

Kết luận:

Mục đích của thử nghiệm này là để đánh giá tác dụng của các chủng chủng *Bacillus* khác nhau lên hiệu suất tăng trưởng và khả năng tiêu hóa ở gà thịt.

Chủng được thử nghiệm cho thấy tác dụng đáng kể lên hiệu suất và khả năng tiêu hóa trong hồi tràng biểu kiến:

Các con được bổ sung DSM32324 cho thấy mức mức tăng trọng lượng hàng ngày cao hơn (Bảng 16), tỷ lệ hấp thu thức ăn hàng ngày và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn hàng ngày trong giai đoạn bắt đầu (dữ liệu không được biểu thị) và tỷ lệ tiêu hóa protein cao hơn ở D42 (Bảng 17) khi so sánh với các loài các con không được bổ sung.

Các con được bổ sung DSM25840 cho thấy mức mức tăng trọng lượng hàng ngày cao hơn (Bảng 16) và sự hấp thu thức ăn hàng ngày trong giai đoạn bắt đầu (dữ liệu không được biểu thị), thể trọng cao hơn ở D42 (Bảng 16) và tỷ lệ tiêu hóa tro, protein và năng lượng cao hơn ở D42 (Bảng 17) khi so sánh với các loài các con không được bổ sung.

Các con được bổ sung DSM32325 cho thấy mức mức tăng trọng lượng hàng ngày cao hơn (Bảng 16) và sự hấp thu thức ăn hàng ngày trong giai đoạn bắt đầu (dữ liệu không được biểu thị), và tỷ lệ tiêu hóa canxi và phospho thấp hơn ở D42 (Bảng 17) khi so sánh với các loài các con không được bổ sung.

Kết luận, cả ba chủng cho thấy kết quả tốt đáng ngạc nhiên và cải thiện đáng kể.

Ví dụ 8

Tác dụng so sánh của 4 probiotic khác nhau được dùng trong thức ăn đối với mẫu đối chứng của bệnh viêm ruột hoại tử gây ra bởi *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ở gà thịt

Mục đích của thử nghiệm này là để đánh giá tác dụng của DSM32324, DSM25840 và DSM32325 cũng như thành phần của tất cả chúng theo tỷ lệ 8:3:5, EPB5, lên hiệu suất của gà thịt Cobb 500 được thử nghiệm với NE và so sánh tác dụng của từng chủng với tác dụng của chế phẩm.

Ngày nở của Cobb 500 gà con được lấy từ trại giống Cobb Vantress, Cleveland, GA. 2250 gà con đã được phân bổ cho nghiên cứu. Tất cả các con đã được tiêm vắc-xin phòng ngừa bằng vắc-xin coccidia với nhãn khuyến cáo liều lượng vào ngày nở.

Thực hành quản lý lồng tiêu chuẩn sản đã được sử dụng trong suốt thử nghiệm. Lồng được kiểm tra hàng ngày về tỷ lệ chết. Trọng lượng các con (kg) trên mỗi lồng được ghi lại khi bắt đầu nghiên cứu và DOT 21,35 và 42.

Chế độ ăn của gà thịt được cho ăn dưới dạng vụn (thức ăn khởi động) hoặc dưới dạng viên (thức ăn phát triển và thức ăn hoàn thiện). Thành phần định lượng của thức ăn là giống nhau cho tất cả các động vật ngoại trừ việc bao gồm các chủng *Bacillus* hoặc thành phần đối với các nhóm điều trị. Chế phẩm thức ăn là như sau:

Bảng 18

Tên Thành phần	% (khối lượng)	bắt đầu	đang phát triển	hoàn thiện
Ngô, grain		58,509	64,054	69,218
Bã đậu nành, , hư hỏng, dung môi		35,550	29,771	24,511
Chất béo, rau		2,100	2,585	2,748
Dicanxi phosphat		1,734	1,780	1,693
Canxi cacbonat		1,150	0,910	0,873
Muối, (NaCl)		0,386	0,390	0,393

Methionin MHA, L – Lysin, Chất khoáng vi chất, hỗn hợp trộn sẵn vitamin và L-Threonin được bao gồm trong đó theo khuyến cáo của Nhà tạo giống.

Tất cả việc nuôi là ở trong lồng. Thức ăn khởi đầu được cấp và cho ăn từ ngày DOT 0 đến 21. Vào ngày DOT 21, thức ăn bắt đầu không tiêu thụ được cân và loại bỏ. Thức ăn phát triển được phát cấp và cho ăn cho đến ngày DOT 35. Vào ngày DOT 35, thức ăn phát triển không tiêu thụ được cân và loại bỏ. Thức ăn hoàn thiện được cấp và cho ăn cho đến ngày DOT 42. Vào ngày DOT 42, thức ăn hoàn thiện không tiêu thụ được cân và loại bỏ.

Thử nghiệm bao gồm 45 chiếc lồng bắt đầu với 50 con gà thịt đực trên mỗi lồng. Các phương pháp điều trị được lặp lại trong chín khối, ngẫu nhiên trong các khối năm lồng mỗi cái.

Bảng 19

Điều trị	Mô tả	Đích thức ăn (cfu/g thức ăn)	<i>Clostridium perfringens</i>	Lồng nuôi/lần xử lý
T1	Mẫu đối chứng không có probiotic	0	DOT 19,20, và 21	9
T2	<i>Bacillus subtilis</i> DSM32324	8×10^5	DOT 19,20, và 21	9
T3	<i>Bacillus subtilis</i> DSM32325	5×10^5	DOT 19,20, và 21	9
T4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM25840	3×10^5	DOT 19,20, và 21	9
T5	EBP5	$1,6 \times 10^6$	DOT 19,20, và 21	9

Vào các ngày 19, 20 và 21, tất cả các lồng nuôi được thử nghiệm với canh trường nuôi cấy *C. perfringens*. Dòng phân lập của *C. perfringens* được biết là gây ra NE được sử dụng làm vi sinh vật thử nghiệm. Chủng cấy tươi được sử dụng mỗi ngày. Mức độ chuẩn độ là khoảng 10^{8-9} CFU/lồng. Mỗi lồng nuôi nhận được cùng một lượng chủng cấy. Chủng cấy được dùng bằng cách trộn vào thức ăn trong đế của ống cấp liệu.

Vào ngày 21, năm con từ mỗi lồng nuôi đã được chọn, làm chết, cân nhóm và kiểm tra mức độ hiện diện của các tổn thương viêm ruột hoại tử. Việc chấm điểm dựa trên điểm 0 đến 3, với 0 là bình thường và 3 là nghiêm trọng nhất. Cách tính điểm như sau: 0 đối với ruột bình thường, 1 đối với chất nhầy bao phủ ít và mất trương lực, 2 đối với viêm ruột hoại tử nặng và 3 đối với viêm ruột hoại tử cực độ với sự hiện diện của máu trong lòng ruột.

Không có điều trị bằng thuốc đồng thời được sử dụng trong nghiên cứu. Lồng được sử dụng làm đơn vị thống kê. Các giá trị cân bằng của cân nặng sống, tăng trọng lượng, tiêu thụ thức ăn, tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR), điểm tổn thương NE và tỷ lệ chết (tổng và NE) được tính toán. Dữ liệu thô được phân tích thống kê (ANOVA) bằng cách sử dụng Thiết kế khối hoàn chỉnh ngẫu nhiên (*Random Complete Block Design*).

Thử nghiệm Tukey's HSD ($p \leq 0,05$) được sử dụng để phân tách các giá trị trung bình khi giá trị ANOVA F là có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

Các ký tự viết ở trên khác nhau trong các dòng biểu thị mức ý nghĩa ở mức $P < 0,05$.

Kết quả:

Bảng 20

Ngày 21 Điều trị	Hấp thu Thức ăn	FCR	AWG (kg)
1. Không dùng thuốc	44,70a	1,903a	0,430b
2. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32324	43,48a	1,694c	0,476a
3. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32325	44,92a	1,649c	0,509a
4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM25840	42,32a	1,786b	0,436b
5. EBP5	43,14a	1,646c	0,488a

Bảng 21

Ngày 35	Hấp thu	FCR	AWG
Điều trị	Thức ăn		(kg)
1. Không dùng thuốc	143,17a	1,909a	1,606b
2. <i>Bacillus subtilis</i> DSM3234	141,29a	1,802b	1,667a
3. <i>Bacillus subtilis</i> DSM3235	145,73a	1,816b	1,695a
4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM25840	140,13a	1,801b	1,641ab
5. EBP5	142,33a	1,774b	1,689a

Bảng 22

Ngày 42	Hấp thu	FCR.	AWG.	Phần trăm
Điều trị	Thức ăn		(kg)	Tỷ lệ chết
1. Không dùng thuốc	199,77a	1,957a	2,237b	4,2a
2. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32234	197,67a	1,873bc	2,291ab	3,1a
3. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32235	203,61a	1,896b	2,322a	2,7a
4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM25840	196,86a	1,898b	2,244b	3,3a
5. EBP5	199,87a	1,841c	2,342a	2,7a

Bảng 23

	Tổn thương	NE %
Điều trị	NE	Tỷ lệ chết
1. Không dùng thuốc	1,0a	4,2a
2. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32234	0,5c	0,4b
3. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32235	0,5c	0,9b
4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM25840	0,7b	1,6b
5. EBP5	0,5c	0,4b

Bàn luận và kết luận

Đối với các thông số hiệu suất, tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) và tăng trọng trung bình (AWG) đo được ở ngày 21, ngày 35 và ngày 42, đã thấy sự cải thiện đáng kể cho tất cả các điểm dữ liệu khi xem xét cụ thể các chất phụ gia thức ăn có chứa probiotic và EBP5 cụ thể là khi so sánh với nhóm đối chứng bị nhiễm mà không được điều trị.

Đáng ngạc nhiên, các nhóm được điều trị EBP5 cho thấy sự cải thiện đáng kể đối với một số thông số về hiệu suất khi so sánh với các nhóm điều trị chủng đơn *Bacillus*, một lần nữa cho thấy sự khác biệt đáng kể về các thông số hiệu suất đối với nhóm đối chứng nhiễm bệnh không dùng thuốc.

Liên quan đến viêm ruột cận lâm sàng gây ra trong thử nghiệm *in vivo*, kết quả cho thấy cả hai chủng *Bacillus subtilis* DSM32234, *Bacillus subtilis* DSM32235 và *Bacillus amyloliquefaciens* DSM25840 cũng như hỗn hợp EBP5 làm giảm điểm tổn thương bệnh viêm ruột hoại tử ở gà và làm giảm tỷ lệ chết của bệnh viêm ruột hoại tử một cách đáng kể.

Ví dụ 9

Chế phẩm BACILLUS chứa ba chủng BACILLUS ở gà tây đực

Thử nghiệm bao gồm 300 con gà tây đực khỏe mạnh một ngày tuổi (Kartzfehn Premium) được phân bổ ngẫu nhiên tới 60 lồng với 5 con trên mỗi lồng (10 lần lặp lại cho mỗi nhóm điều trị).

Chế độ ăn bao gồm chế độ ăn kiểu gà tây thương mại không xác định có thành phần phân như được nêu trong Bảng 24 cho gà tây từ 01 đến 63 ngày tuổi và trong Bảng 25 cho gà tây từ 64 đến 147 ngày tuổi. Thành phần định lượng của thức ăn là giống nhau cho tất cả các động vật ngoại trừ việc đưa thành phần *Bacillus* cho nhóm điều trị.

Chế phẩm Bacillus EBP5 chứa $1,6 \times 10^9$ CFU/g DSM32324, $0,6 \times 10^9$ CFU/g DSM25840 và $1,0 \times 10^9$ CFU/g DSM32325, tức là theo tỷ lệ 8: 3: 5, được trộn vào thức ăn.

Bảng 24. Thành phần chế phẩm trong chế độ ăn P1, P2, và P3 đối với gà tây

Pha cho ăn		P1 (01 đến 14 ngày tuổi)	P2 (15 đến 35 ngày tuổi)	P3 (36 đến 63 ngày tuổi)
		Thành phần		
Bã đậu nành (Protein thô:49%)	g/kg	470,00	442,80	369,00
Ngô	g/kg	352,40	389,40	455,70
Bột mỳ	g/kg	79,30	79,30	79,30
Dầu đậu nành	g/kg	35,00	35,00	41,00
Monocanxi phosphat	g/kg	25,00	17,90	17,90
Limeston	g/kg	20,20	17,80	18,80
Hỗn hợp trộn sẵn *)	g/kg	12,00	12,00	12,00
Methionin	g/kg	2,50	2,20	2,20
Lysin	g/kg	1,60	1,60	2,10
Limeston	g/kg	2,00;1,90;1,75;1,50;1,00;0	2,00;1,90;1,75;1,50;1,00;0	2,00;1,90;1,75;1,50;1,00;0
EPB5	g/kg	0;0,1;0,25;0,50;1,00;2,00	0;0,1;0,25;0,50;1,00;2,00	0;0,1;0,25;0,50;1,00;2,00

* Lượng trên mỗi kg Hỗn hợp trộn sẵn: 600000 I.U. Vit. A (axetat); 120000 I.U. Vit. D3; 6000 mg Vit. E (α -tocopherol axetat); 200 mg Vit. K3 (MSB); 250 mg Vit. B1 (mononitrat); 420 mg Vit. B2 (cryst. riboflavin); 300 mg Vit. B6 (pyridoxin-HCl); 1500 μ g Vit. B12; 3000 mg niacin (niaxinamit); 12500 μ g biotin (loại thức ăn công nghiệp); 100 mg axit folic (cryst., loại thức ăn công nghiệp); 1000 mg axit pantothenic (Ca d-pantothenat); 60000 mg cholin (clorua); 5000 mg sắt (sắt cacbonat);

5000 mg kẽm (kẽm sulfat); 6000 mg mangan (mangan oxit); 1000 mg đồng (đồng oxit); 45 mg iot (canxi-iodat); 20 mg selenium (natri-selenit); 140 g natri (NaCl); 55 g magie (magie sulfat); chất mang: canxi cacbonat (canxi tối thiểu 38%); Monteban G100: 5'833 mg

Bảng 25. Thành phần chế phẩm trong chế độ ăn P4, P5, và P6 đối với gà tây

Pha cho ăn		P4 (64 đến 91 ngày tuổi)	P5 (92 đến 119 ngày tuổi)	P6 (120 đến 147 ngày tuổi)
		Thành phần		
Ngô	g/kg	524,60	606,80	658,00
Bã đậu nành (Protein thô:49%)	g/kg	303,00	225,00	173,00
Bột mỳ	g/kg	79,30	79,30	79,30
Dầu đậu nành	g/kg	37,80	35,00	38,00
Monocanxi phosphat	g/kg	19,00	16,00	14,90
Limeston	g/kg	18,70	17,00	15,30
Hỗn hợp trộn sẵn *	g/kg	12,00	12,00	12,00
L-Lysin	g/kg	2,00	2,80	3,50
DL-Methionin	g/kg	1,60	1,50	1,50
L-Threonin	g/kg		0,50	0,30
L-Tryptophan	g/kg		0,10	0,20
Limeston	g/kg	2,00;1,90;1,75;1,50;1,00;0	2,00;1,90;1,75;1,50;1,00;0	2,00;1,90;1,75;1,50;1,00;0
Probiotic	g/kg	0;0,1;0,25;0,50;1,00;2,00	0;0,1;0,25;0,50;1,00;2,00	0;0,1;0,25;0,50;1,00;2,00

*Lượng trên mỗi kg Hỗn hợp trộn sẵn: 600000 I.U. Vit. A (axetat); 120000 I.U. Vit. D3; 6000 mg Vit. E (α -tocopherol axetat); 200 mg Vit. K3 (MSB); 250 mg Vit. B1 (mononitrat); 420 mg Vit. B2 (cryst. riboflavin); 300 mg Vit. B6 (pyridoxin-

HCl); 1500 µg Vit. B12; 3000 mg niacin (niacinamit); 12500 µg biotin (loại thức ăn công nghiệp); 100 mg axit folic (cryst., loại thức ăn công nghiệp); 1000 mg axit pantothenic (Ca d-pantothenat); 60000 mg cholin (clorua); 5000 mg sắt (sắt cacbonat); 5000 mg kẽm (kẽm sulfat); 6000 mg mangan (mangan oxit); 1000 mg đồng (đồng oxit); 45 mg iot (canxi-iodat); 20 mg seleni (natri-selenit); 140 g natri (NaCl); 55 g magie (magie sulfat); chất mang: canxi cacbonat (canxi tối thiểu 38%); Monteban G100: 5'833 mg

Kết quả:

Bảng 26. Tác dụng của EBP5 lên hiệu suất ở gà tây đực trong giai đoạn cho ăn tổng thể (P1 đến P6)

Nhóm điều trị	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Giá trị P
Tổng số con	n ⁰ 50	50	50	50	50	50	
Lập lại	n ⁰ 10	10	10	10	10	10	
EBP5	mg/kg	100	250	500	1,000	2,000	
P 1 đến P 6 (01 đến 147 ngày tuổi)							
Số con	n ⁰ 48	49	48	48	49	49	
Thể trọng bắt đầu	g 61,2 ± 1,0	61,2 ± 0,8	61,3 ± 1,0	61,2 ± 1,0	61,3 ± 0,8	61,2 ± 1,0	1,000
Thể trọng kết thúc	g 24169,3 ± 321,6 ^a	24522,9 ± 335,0 ^{ab}	24721,4 ± 252,2 ^{bc}	24917,7 ± 251,2 ^c	25333,3 ± 311,2 ^d	25759,3 ± 282,2 ^e	<0,001
Thể trọng đạt được	g 24108,1 ± 320,9 ^a	24461,7 ± 334,6 ^{ab}	24660,2 ± 252,0 ^{bc}	24856,5 ± 251,1 ^c	25272,0 ± 310,9 ^d	25698,1 ± 282,4 ^e	<0,001
Thể trọng đạt được/ngày	g/ngày 164,0 ± 2,2 ^a	166,4 ± 2,3 ^{ab}	167,8 ± 1,7 ^{bc}	169,1 ± 1,7 ^c	171,9 ± 2,1 ^d	174,8 ± 1,9 ^e	<0,001
Hấp thu thức ăn	g 51538,2 ± 735,3 ^{ab}	51309,4 ± 408,7 ^{ab}	51294,0 ± 377,0 ^{ab}	50941,6 ± 598,1 ^{ab}	51049,7 ± 404,7 ^a	51737,8 ± 581,9 ^b	0,016
Hấp thu thức ăn/ngày	g/ngày 350,6 ± 5,0 ^{ab}	349,0 ± 2,8 ^{ab}	348,9 ± 2,6 ^{ab}	346,5 ± 4,1 ^{ab}	347,3 ± 2,8 ^a	352,0 ± 4,0 ^b	0,016
Chuyển hóa thức ăn	2,138 ± 0,024 ^d	2,098 ± 0,035 ^e	2,080 ± 0,026 ^{bc}	2,050 ± 0,025 ^{ab}	2,020 ± 0,032 ^a	2,013 ± 0,025 ^a	<0,001

^{ab} Các ký tự viết ở trên khác nhau trong các mức biểu thị mức ý nghĩa tại P < 0,05

Thể trọng đạt được:

Trọng lượng cơ thể ban đầu của gà tây là khoảng 61,2 g và gần như tương tự ở tất cả các nhóm điều trị. Tăng trọng lượng cơ thể tổng thể ở gà tây được cho ăn chế độ ăn mà không chứa EBP5 (nhóm đối chứng) lên tới 24,11 kg; liên quan đến thời gian cho ăn 147 ngày, mức tăng trọng lượng cơ thể hàng ngày đạt trung bình 164 g. Tăng trọng lượng toàn thân cho thấy sự cải thiện đáng kể khi bổ sung EBP5 ở mức liều 250 trở lên (250 mg/kg: + 2,3%; 500 mg/kg: + 3,1%; 1.000 mg/kg: + 4,8%; 2.000 mg/kg: + 6,6%) so với mẫu đối chứng, trong khi ở gà tây được cho ăn chế độ ăn có EBP5 ở mức liều 100 mg/kg không có thay đổi đáng kể nào được tìm thấy (+ 1,0%) khi so sánh với mẫu đối chứng.

Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn

Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn tổng thể (thức ăn: tăng) của gà tây được cho ăn chế độ ăn mà không sử dụng EBP5 đạt 2.138, cho thấy mức hiệu suất đáng kể và vượt trội so với các mục tiêu được đưa ra bởi nhà tạo giống (2,540). Do lợi ích của việc tăng trọng cơ thể ở gà tây được cho ăn chế độ ăn có chứa liều tăng EBP5 có liên quan đến việc giảm đáng kể tỷ lệ chuyển hóa thức ăn tổng thể (250 mg/kg: 2.080; 500 mg/kg: 2.050; 1.000 mg/kg: 2.020; 2.000 mg/kg: 2.013) so với mẫu đối chứng.

Kết luận:

Tỷ lệ chết chung (bao gồm cả loại thải) lên tới 2,7% cho thấy tình trạng sức khỏe tuyệt vời của cả đàn.

Thử nghiệm hiện tại cho thấy sự cải thiện đáng kể về các thông số sản xuất ở những con được cho ăn chế độ ăn có chứa 250 mg/kg đến 2000 mg/kg EBP5 probiotic đa chủng Bacillus. Tăng trọng lượng cơ thể cho đến khi 147 ngày tuổi được tăng cường đáng kể nhờ EBP5 lên tới 6,6% (2.000 mg/kg) khi so sánh với mẫu đối chứng.

Ở những con gà tây được cho ăn chế độ ăn có chứa mức tăng liều EBP5 probiotic đa chủng *Bacillus* có liên quan đến tỷ lệ chuyển hóa thức ăn tổng thể được cải thiện đáng kể lên tới 5,8% (2.000 mg/kg) so với mẫu đối chứng.

Điều đáng chú ý là ở mức liều từ 250 mg/kg đến 2000 mg/kg, hàm lượng chất khô trung bình tổng thể của chất bài tiết được tăng cường đáng kể khi so sánh với mẫu đối chứng.

Ví dụ 10

Sự kết hợp của chế phẩm BACILLUS với 3 chủng BACILLUS và vac-xin SALMONELL được làm yếu trực tiếp ở gà

Một trăm hai mươi (120) con gà con Ross x Ross vào ngày nở không có giới tính được phân bổ cho ba phòng cách ly khác nhau, mỗi phòng chứa bốn mươi (40) gà con khi bắt đầu nghiên cứu. Mỗi lồng chứa khoảng bốn (4) in-sơ (10cm) vỏ thông tươi, một ống cho ăn và một chuồng nước để cho ăn và uống tùy ý.

Tất cả các con đã được tiêm vắc-xin coccidia vào ngày đầu tiên và không sử dụng thuốc điều trị đồng thời. Lồng được kiểm tra hàng ngày về tỷ lệ chết.

Chế độ ăn bắt đầu (vụn) và chế độ ăn phát triển (thức ăn viên) từ ngày 22 đến ngày kết thúc bao gồm gà thịt kiểu thương mại không xác định. Thành phần định lượng của thức ăn là giống nhau cho tất cả các động vật ngoại trừ việc đưa thành phần *Bacillus* cho nhóm điều trị. Thành phần *Bacillus* bao gồm DSM32324, DSM25840 và DSM32325 theo tỷ lệ 8: 3: 5 được trộn với tỷ lệ $1,6 \times 10^6$ CFU/gam thức ăn vào thức ăn.

AviPro® Megan® Vac 1, vắc-xin *Salmonella Typhimurium* sống được sản xuất bởi Lohmann Animal Health, Maine, Hoa Kỳ, trong các thuật ngữ sau đây được gọi là Meg Meg Vac Vac, được phun thô ở 1 ngày tuổi cho các nhóm điều trị T2 và T3 ở mức 1 liều trên mỗi con trong thể tích 0,25 ml mỗi con gà.

Bảng 27
Nhóm điều trị (40 số con trong mỗi nhóm)

Nhóm	Megan Vac	Thành phần Bacillus trong chế độ ăn
T1	Không	Không
T2	Có	Không
T3	Có	$1,6 \times 10^6$ CFU/gam thức ăn

Vào ngày thứ 3, bốn manh tràng và bốn lá lách từ mỗi lần điều trị đã được cân và thu thập để xác nhận sự xâm nhập của vắc-xin. Tất cả các con còn lại được dùng liều (bằng ống thông) với 3×10^7 CFU *Salmonella Heidelberg* (Alali et al., 2013) vào ngày 4.

Vào ngày 40, ngay trước khi giết mổ, mười con trong mỗi lần điều trị được lấy ra từ mỗi lồng riêng lẻ, được làm chết và manh tràng được loại ra vô trùng. Các mẫu manh tràng đã được thử nghiệm đối với *Salmonella*.

Kết quả:

Kết quả tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trong các mẫu manh tràng và gan/lách được thu thập từ bốn con vào ngày 3 (xem Bảng 28) xác nhận sự xâm nhập của vắc-xin.

Bảng 28
Salmonella prevalences trong các mẫu manh tràng và gan/lách

Loại mẫu	Điều trị	Số	Số dương tính (%)
Manh tràng	T1	4	0
	T2	4	0
	T3	4	0
Gan/lá lách	T1	4	0
	T2	4	3
	T3	4	4

Các phân lập *Salmonella* nghi ngờ đã được xác nhận bằng kháng huyết thanh đặc biệt Poly-O *Salmonella* (MiraVista, Indianapolis, IN).

Chỉ riêng Megan Vac hoặc với chế phẩm Bacillus có số lượng *Salmonella* thấp nhất ở manh tràng vào ngày 40 so với các con không được điều trị (dữ liệu không được hiển thị).

Như đã thấy rõ trong Bảng 29 dưới đây, FCR của con được cho ăn chế phẩm Megan Vac + Bacillus (T3) thấp hơn ở các con không được điều trị (T1) và các con được điều trị bằng Megan Vac (T2).

Bảng 29
Hiệu suất ở ngày 40

Điều trị	Hấp thu thức ăn (kg/lòng)	Tăng trọng lượng (kg/con sống)	FCR
T1	95,86	1,86	1,47
T2	110,32	2,16	1,50
T3	106,70	2,15	1,38

Kết luận

Mục tiêu là đánh giá hiệu quả của một loại probiotic dựa trên Bacillus đối với sự xâm nhập của vắc-xin *Salmonella Typhimurium* sống và chế phẩm Bacillus có khả năng bảo vệ chống lại thách thức *Salmonella Heidelberg* ở gà thịt.

Các mẫu ngày 3 chỉ ra rằng thành phần Bacillus không ảnh hưởng đến việc nhiễm khuẩn *Salmonella* ban đầu.

Ngoài ra, nghiên cứu chỉ ra rằng có thể có tác dụng phụ khi có cả vắc-xin và chế phẩm Bacillus.

Tài liệu tham khảo

Công bố đơn quốc tế WO2013/153159

Công bố đơn quốc tế WO2016/060934

Công bố đơn quốc tế WO2016/118840

Alali, W. Q, C.L. Hofacre, G. F. Mathis and G. Faltys, 2013. Effect of essential oil compound on shedding and colonization of *Salmonella* enteric serovar *heidelberg* in broilers, Poultry Science 92: 836-841.

Johnson J, Reid WM. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chicken, Exp Parasitol., 1970, Aug;28(1):30-6.

Knap I, Lund B, Kehlet AB, Hofacre C, Mathis G.: *Bacillus licheniformis* prevents necrotic enteritis in broiler chicken. Avian Dis. 2010 Jun;54(2):931-5.

Timbermont L, et al. Lanckriet A, Gholamiandehkordi AR, Pasmans F, Martel A, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F., Origin of *Clostridium perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers., Comp Immunol Microbiol Infect Dis., 2009, Nov;32(6):503-12

Waititu et al. Effect of Supplementing Direct-Fed Microbials on Broiler Performance, Nutrient Digestibilities, and Immune Responses. Poult Sci, 2014, 93 (3), 625-635

Wang et al., Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group, Int J Syst Evol Microbiol. 2007 Aug;57(Pt 8):1846-50.

Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to inhibitors of human and veterinary importance”, EFSA Journal 2012;10(6):2740

Yêu cầu bảo hộ

1. Thức ăn cho động vật, phụ gia thức ăn cho động vật, hoặc chế phẩm trộn sẵn thức ăn cho động vật có khả năng kháng được cải thiện đối với sự phát triển của *Escherichia coli* và *Clostridium perfringens* chứa:

(i) từ 10^5 đến 10^{12} đơn vị tạo thành tập đoàn trên mỗi gam (CFU/g) của ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* được chọn từ nhóm bao gồm:

a) chủng được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) có số lưu giữ là DSM32324,

b) chủng có số lưu giữ tại DSMZ là DSM32325, và

(ii) một hoặc nhiều thức ăn động vật, phụ gia thức ăn động vật, hoặc thành phần trộn sẵn thức ăn động vật,

trong đó, ít nhất một chủng *Bacillus* là hữu hiệu để ức chế sự phát triển của *Escherichia coli* và *Clostridium perfringens*.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* bao gồm chủng *Bacillus subtilis* được lưu giữ tại DSMZ với số lưu giữ là DSM32324.

3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* bao gồm chủng *Bacillus subtilis* được lưu giữ tại DSMZ với số lưu giữ là DSM32325.

4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* bao gồm chủng *Bacillus subtilis* được lưu giữ tại DSMZ với số lưu giữ là DSM32324, và chủng *Bacillus subtilis* được lưu giữ tại DSMZ với số lưu giữ là DSM32325.

5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất một chủng *Bacillus subtilis* có mặt dưới dạng bào tử.

6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này là phụ gia thức ăn động vật.

7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều thức ăn động vật, phụ gia thức ăn động vật, hoặc thành phần trộn sẵn thức ăn động vật bao gồm thức ăn gia súc, sữa, hoặc đồ thay thế sữa.

8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều thức ăn động vật, phụ gia thức ăn động vật, hoặc thành phần trộn sẵn thức ăn động vật bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ vitamin, khoáng chất, enzym và axit amin.

9. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều thức ăn động vật, phụ gia thức ăn động vật, hoặc thành phần trộn sẵn thức ăn động vật bao gồm một hoặc nhiều chất mang được chọn từ glyxerol, etylen glycol, 1,2-propylen glycol, 3-propylen glycol, natri clorua, natri benzoat, kali sorbat, natri sulfat, kali sulfat, magie sulfat, natri thiosulfat, canxi cacbonat, natri xitrat, dextrin, maltodextrin, glucoza, sucroza, sorbitol, lactoseza, whey, whey permeat, bột mỳ, cám lúa mỳ, bột ngô gluten, tinh bột và xenluloza.