



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

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

(11) 
1-0022383

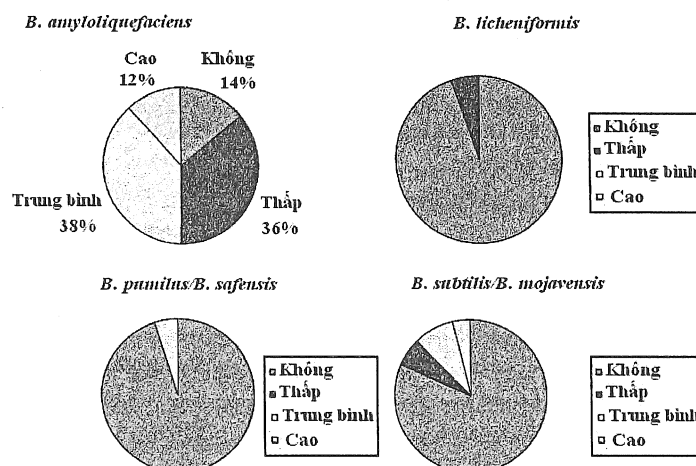
(51)⁷ C12N 1/20, 15/10, A23K 1/00, A23L
1/30, C12R 1/07, 1/125

(13) B

- (21) 1-2014-03699 (22) 11.04.2013
(86) PCT/EP2013/057590 11.04.2013 (87) WO2013/153159 17.10.2013
(30) 12164087.4 13.04.2012 EP
(45) 25.12.2019 381 (43) 25.02.2015 323
(73) CHR. HANSEN A/S (DK)
Boege Alle 10-12, DK-2970 Hoersholm, Denmark
(72) NIELSEN, Beatrice (DE), CANTOR, Mette Dines (DK), STUER-LAURIDSEN,
Birgitte (DK), DERKX, Patrick (NL), JOHANSEN, Eric (CA)
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHỦNG BACILLUS CÓ TÍNH Mẫn CẢM VỚI KHÁNG SINH, PHƯƠNG PHÁP CHỌN LỌC CHỦNG NÀY, PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN CHỦNG ĐỘT BIẾN CỦA NÓ, CHẾ PHẨM BACILLUS, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỨC ĂN CHĂN NUÔI

(57) Sáng chế đề cập đến chủng Bacillus, khác biệt ở chỗ chủng này có (i) tính mẫn cảm với ampicilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin và cloramphenicol; (ii) ức chế sinh trưởng của E. coli và Clostridium perfringens; và (iii) tỷ lệ tạo bào tử bằng ít nhất 80% khi được đo sau 2 ngày ủ; phương pháp chọn lọc chủng này; phương pháp thu nhận chủng đột biến của nó; chế phẩm Bacillus chứa nó; phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi; phương pháp sản xuất hỗn hợp thức ăn sơ chế; và phương pháp chăn nuôi động vật. Nhiều chủng này là Bacillus amyloliquefaciens. Một số Bacillus amyloliquefaciens này được phân loại tiếp là Bacillus amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens, các chủng còn lại là Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum. Chủng Bacillus này có thể dùng làm chất phụ gia thức ăn chăn nuôi để tạo ra tác dụng có lợi cho vật nuôi.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus*; phương pháp chọn lọc chủng này; phương pháp thu chủng đột biến của nó; chế phẩm *Bacillus* chứa nó; phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi; phương pháp sản xuất hỗn hợp thức ăn sơ chế và phương pháp chăn nuôi động vật. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus* phân lập, khác biệt ở chỗ chủng này có tính miễn cảm với ampicilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin và cloramphenicol và có tính kháng các tác nhân gây bệnh, như *E. coli* và *Clostridium perfringens*. Tỷ lệ tạo bào tử của các chủng này ít nhất bằng 80% khi đo ở ngày thứ 2, do đó có thể tạo ra được các bào tử *Bacillus* an toàn và hữu ích trong sản xuất thức ăn chăn nuôi. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng bào tử của chủng *Bacillus* theo sáng chế để sản xuất phụ gia thức ăn chăn nuôi, đặc biệt là các chế phẩm dùng cho lợn và gia cầm, trong đó các chủng này có tác dụng hữu ích đến sức khỏe, chuyển hóa thức ăn và kích thích tăng trưởng cho vật nuôi.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chủng *Bacillus* spp thường được dùng để sản xuất chế phẩm lợi khuẩn trong công nghiệp thức ăn chăn nuôi và tác dụng có lợi của các chế phẩm này đến năng suất và sức khỏe vật nuôi là đã biết (Spiehs et al., 2008; Cutting, 2011). Việc sử dụng các chế phẩm này ngày càng được phổ biến do *Bacillus* có khả năng thay thế hoặc giảm sử dụng các kháng sinh kích thích tăng trưởng trong công nghiệp thức ăn chăn nuôi.

Tuy nhiên, hiện vẫn có nhu cầu đối với các chủng *Bacillus* không có tính kháng lại các kháng sinh thường dùng cho người.

Lợn, đặc biệt là lợn con, thường bị tiêu chảy do vi khuẩn như *Escherichia coli* (*E.coli*), *Clostridium perfringens* typ A và *Clostridium perfringens* typ C (*C.perfringens*). Nếu không được điều trị kịp thời, lợn có thể bị chết và giảm khả năng sinh trưởng, chẳng

hạn bị sụt cân.

E. coli là nguyên nhân chính gây bệnh tiêu chảy ở lợn con và từ 50% đến 75% kháng sinh được sử dụng ở các trang trại là để điều trị bệnh tiêu chảy cho lợn ở giai đoạn cai sữa, chủ yếu do *E. coli*. Bệnh tiêu chảy là bệnh dịch nguy hiểm nhất đối với lợn cai sữa và người chăn nuôi (lên đến 40kg) và *E. coli* là nguyên nhân gây bệnh tiêu chảy nghiêm trọng nhất (Klose et al., 2010).

Nhiễm khuẩn đường ruột ở lợn xuất hiện chủ yếu ở giai đoạn trước cai sữa và thường xuất hiện đồng thời với hội chứng xuất huyết đường ruột ảnh hưởng đến lợn ở giai đoạn xuất chuồng. Mặc dù việc chủng ngừa vacxin kháng *C. perfringens* typ C đã giảm đáng kể tỷ lệ lợn chết trước cai sữa, nhưng trên thị trường hiện không có vacxin kháng *C. perfringens* typ A. Tình trạng lây nhiễm *C. perfringens* typ A được ghi nhận với tần suất ngày càng tăng ở lợn trước cai sữa, phương pháp chẩn đoán và điều trị dự phòng lại phức tạp hơn so với các phương pháp chẩn đoán và điều trị bệnh nhiễm khuẩn *C. perfringens* typ C.

Nguyên nhân gây ra các bệnh nhiễm khuẩn và bệnh lý ở gia cầm là do các vi khuẩn gây bệnh, bao gồm *E. coli* và *Clostridium perfringens*. Các bệnh nhiễm khuẩn và các bệnh lý do các tác nhân gây bệnh này làm tăng tỷ lệ gia cầm chết, giảm năng suất, và tăng chi phí sản xuất. Ngoài ra, các tác nhân gây bệnh này có thể lây truyền cho người. Bệnh nhiễm khuẩn đường ruột ở gia cầm là bệnh toàn thân gây ra bởi *E. coli* xuất hiện chủ yếu ở gà giò và gia cầm.

Các chế phẩm lợi khuẩn được sử dụng trong lĩnh vực thú y để tạo ra hệ đường ruột khỏe mạnh cho động vật chống lại các vi sinh vật, bao gồm giảm vi khuẩn có hại như *Clostridia* và *E. coli* và tăng vi khuẩn có lợi như *Lactobacillus* spp. và *Bifidobacterium*. Các chế phẩm lợi khuẩn rất thích hợp để tạo ra sự cân bằng khỏe mạnh giữa các vi khuẩn gây bệnh và vi khuẩn có lợi do không giống như các kháng sinh, các chế phẩm này tiêu diệt vi khuẩn một cách có chọn lọc và không tạo ra các chủng vi khuẩn gây bệnh kháng kháng sinh. Các chế phẩm lợi khuẩn duy trì hệ đường ruột khỏe mạnh theo nhiều cơ chế bao gồm: tiêu diệt một cách có chọn lọc các vi khuẩn gây bệnh, giảm số lượng vi khuẩn gây bệnh bằng cách sản sinh các chất kháng khuẩn, cải thiện sự tăng trưởng và khả năng

sống sót lợi khuẩn đường ruột, và kích thích đáp ứng miễn dịch hệ thống ở động vật.

Do đó, cần có một hoặc nhiều chủng *Bacillus* thích hợp để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh nhiễm khuẩn *E. coli* và/hoặc *Clostridium* ở lợn và gia cầm.

Bài báo Guo et al., 2006, đề cập đến phương pháp sàng lọc chủng *Bacillus* để dùng làm chế phẩm lợi khuẩn và thử nghiệm *Bacillus subtilis* MA139 ở lợn. 124 mẫu được thu thập từ gà giò, lợn, đất, thực phẩm lên men và các loại thảo mộc Trung Quốc. 750 chủng tạo bào tử hiếu khí được phân lập từ các mẫu này. Tính kháng *E. coli* K88 và *E. coli* K99, *Salmonella* và *Staphylococcus aureus* đã được đánh giá bằng cách sử dụng đĩa thử nghiệm khuếch tán. 6 chủng *Bacillus* có các hoạt tính mạnh nhất được thử nghiệm về khả năng sống sót ở điều kiện giống môi trường đường ruột (pH = 2 và 0,3% muối mật). Chủng *B. subtilis* MA139 có hoạt tính mạnh nhất và được thử nghiệm *in vivo* với 90 lợn con trong 28 ngày thử nghiệm. Các trị số trọng lượng tăng hàng ngày (average daily gain - ADG) và lượng thức ăn tiêu thụ được cải thiện. Lượng vi khuẩn axit lactic tăng, lượng *E. coli* trong phân giảm. Tuy nhiên, tính kháng *Clostridium perfringens* và mẫn cảm với kháng sinh không được thử nghiệm.

Bài báo Barbosa et al., 2005 đề cập đến việc phân lập 237 chủng *Bacillus* từ phân gà giò (ở trên nền đất). 31 chủng phân lập được mô tả đặc điểm. Một số chủng phân lập là thuộc loài *B. subtilis* và *B. licheniformis*. Một số chủng *B. subtilis* có tính kháng *C. perfringens* và *S. aureus*. *B. licheniformis* cũng có tính kháng *C. perfringens*. Tuy nhiên, không có chủng *Bacillus* được chọn nào có tính kháng *E. coli* như chủng *Bacillus* của sáng chế. Một chủng *Bacillus* phân lập được chọn có khả năng ức chế sự sinh trưởng nhưng không kháng hoàn toàn chủng *E. coli* O78:K80 và không có tính kháng các chủng *E. coli* khác được thử nghiệm (xem, Bảng 5 của bài báo này). Hơn nữa, bài báo này cũng không đề cập đến tỷ lệ tạo bào tử sau 2 ngày ủ hoặc tính mẫn cảm với vancomycin, kanamycin, streptomycin, và clindamycin của các chủng này.

Bài báo Chaiyawan et al., 2010, đề cập đến chủng *Bacillus* sp. T3-1, mẫn cảm với kháng sinh được sử dụng rộng rãi trong điều trị và có tính kháng *C. perfringens* ATCC 15191. Chủng này không có tính kháng chủng *E. coli* O157. Hơn nữa, bài báo này cũng không đề cập đến tỷ lệ tạo bào tử sau 2 ngày ủ của chủng này.

Theo bài báo Benitez et al., 2011, sự có mặt của *E.coli* ở dạng còn nguyên hoạt tính hoặc dạng bất hoạt tính đã làm tăng tổng hợp peptit kháng khuẩn bởi chủng *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006.

US 7,754,469 đề cập đến vi sinh vật và phương pháp điều trị cho gia cầm và US 8,021,654 đề cập đến phương pháp điều trị cho lợn bằng các chủng *Bacillus*.

Tuy nhiên, không có bài báo hoặc patent nào mô tả hoặc gợi ý để chọn lọc chủng *Bacillus* có tính miễn cảm với các kháng sinh thường dùng cho người, có tính kháng cả *Clostridium perfringens* lẫn *E. coli* và có tỷ lệ tạo bào tử cao để tạo ra chủng có khả năng tạo bào tử cao và hữu ích để sản xuất chế phẩm lợi khuẩn *Bacillus*.

Các bài báo Barbosa et al., 2005, Chaiyawan et al., 2010, và Guo et al., 2006 đều không đề cập đến chủng *Bacillus* có tính miễn cảm với các kháng sinh thường dùng cho người, có tính kháng cả *Clostridium perfringens* lẫn *E. coli*, và tỷ lệ tạo bào tử cao.

Tóm lại, các chủng *Bacillus* được sàng lọc theo các tài liệu đã biết trong lĩnh vực này đều không có đủ ba đặc tính khác biệt như các chủng *Bacillus* theo sáng chế, tức là có tính miễn cảm với các kháng sinh thường dùng cho người, tính kháng *E. coli* và *Clostridium perfringens* và tỷ lệ tạo bào tử cao. Không tài liệu nào đã biết trong lĩnh vực này đề cập đến chủng *Bacillus* đáp ứng đầy đủ cả ba tiêu chuẩn này

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến chủng *Bacillus*, khác biệt ở chỗ chủng này có tính miễn cảm với ampicilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin và cloramphenicol; tính kháng *E. coli* và *Clostridium perfringens*; và tỷ lệ tạo bào tử ít nhất bằng 80% khi đo ở ngày thứ 2.

Giải pháp của sáng chế được thực hiện theo phương pháp chọn lọc chủng *Bacillus* có các đặc tính cải tiến này.

Bước quan trọng đầu tiên của phương pháp chọn lọc theo sáng chế là sàng lọc chủng *Bacillus* đặc hiệu có tính miễn cảm với các kháng sinh thường dùng cho người. Cụ thể hơn, các chủng này được sàng lọc về tính miễn cảm với ampicilin, vancomycin, gen-

tamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin và cloramphenicol.

Ngoài ra, các chủng này được sàng lọc về tính kháng *E. coli* và *Clostridium perfringens* và tỷ lệ tạo bào tử ít nhất bằng 80% khi đo ở ngày thứ 2.

Trong số 261 chủng phân lập từ đất, phân lợn và thực phẩm đã lên men được nghiên cứu bởi sáng chế, 161 chủng phân lập có tính kháng kháng sinh trong thử nghiệm sàng lọc sơ bộ được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Trong số 100 chủng phân lập có tính miễn cảm với kháng sinh, 56 chủng có tính kháng *Clostridium perfringens* và chỉ 22 chủng có tính kháng cả *E. coli* lẫn *Clostridium perfringens*. Trong số này, 12 chủng phân lập là thuộc loài *B. amyloliquefaciens*. Các chủng phân lập còn lại là thuộc loài *B. subtilis* và *B. mojavensis*. Đặc tính của 22 chủng trong số 32 chủng được chọn từ thử nghiệm sàng lọc lần hai được thể hiện trong Bảng 2 và Bảng 3.

Quá trình chọn lọc tập trung vào các đặc tính (i) tính an toàn, (ii) hiệu quả và (iii) tạo nhiều bào tử trong môi trường thích hợp để sinh trưởng. Khía cạnh an toàn chủ yếu tập trung vào tính không kháng kháng sinh là quan trọng do ngày càng có nhiều vi khuẩn kháng kháng sinh ở người. Các vi khuẩn này gây ra các bệnh đã biết nhưng không điều trị được bằng kháng sinh do chúng đã kháng thuốc.

Đã biết rằng *Bacillus* có thể sản sinh các chất có tính kháng vi sinh vật như chất diệt vi khuẩn, enzym, chất tiêu vi khuẩn hoặc surfactin. Mục đích chọn lọc quan trọng thứ hai là tính kháng *E. coli* và *Clostridium perfringens* do cả hai tác nhân gây bệnh này đều là nguyên nhân chính gây bệnh tiêu chảy ở lợn và gia cầm. Tính kháng tác nhân gây bệnh được đánh giá với ba chủng *E. coli* và chủng *Clostridium perfringens* typ A, tuy nhiên các kết quả về tính kháng toàn bộ các loài *E. coli* và tính kháng các typ *Clostridia* khác, như *Clostridium perfringens* typ C cũng được dự tính.

Mục đích chọn lọc quan trọng thứ ba là đặc tính để sản xuất chế phẩm lợi khuẩn. *Bacillus* được nuôi cấy trong thiết bị lên men và ở cuối quá trình này cần tạo nhiều bào tử để thu được hiệu suất cao. Quá trình hình thành bào tử của *Bacillus* được nghiên cứu trong nhiều năm nhưng vẫn còn rất nhiều vấn đề chưa được làm sáng tỏ. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng trong quá trình sinh trưởng và phát triển, một số

loài *Bacillus* có tỷ lệ tạo bào tử rất thấp. Đã nhận thấy rằng *Bacillus* biệt hóa thành các quần thể chứa các tế bào đặc biệt, như quần thể sinh bào tử, quần thể sản sinh enzym để chuyển hóa các chất dinh dưỡng phức hợp và quần thể tế bào chết (Lopez and Kolter, 2010). Sự biệt hóa này được điều hòa bởi các tín hiệu ngoại bào, hầu hết các tín hiệu này được tạo ra bởi chính *Bacillus*. Có giả thuyết cho rằng sự sản sinh nhiều enzym hoặc chất kháng khuẩn có thể làm giảm hiệu suất tạo bào tử. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này sẽ ngạc nhiên khi nhận thấy chủng *Bacillus* theo sáng chế có cả tính kháng vi sinh vật và tỷ lệ tạo bào tử cao.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện tính kháng vi sinh vật của 261 chủng *Bacillus* theo sáng chế. Ngạc nhiên là nhiều chủng *Bacillus amyloliquefaciens* theo sáng chế cũng có tính kháng vi sinh vật.

Mô tả chi tiết sáng chế

Việc bắt đầu hạn chế sử dụng các chất kháng sinh kích thích tăng trưởng ở Liên minh châu Âu vào năm 2006 đã làm tăng nhu cầu về chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hiệu quả cao và do đó cần có các chế phẩm lợi khuẩn thế hệ mới. Các tác dụng tích cực đến sức khỏe và năng suất ở lợn và gia cầm của các chất phụ gia chăn nuôi probiotic chứa *Bacillus* là đã biết. Các chế phẩm này được dùng nhiều trong ngành công nghiệp thức ăn chăn nuôi do các bào tử là bền nhiệt và có thể sống sót ở nhiệt độ lên đến 90°C đến 95°C trong quá trình nghiền tạo hạt.

Các chế phẩm lợi khuẩn dùng cho lợn cần phải an toàn cho người, động vật, và môi trường, sinh trưởng và chuyển hóa nhanh thức ăn của động vật. Mục đích của sáng chế là sàng lọc theo ba bước nhiều vi khuẩn hiếu khí tạo nội bào tử (aerobic endospore-forming bacteria - AEB) từ các nguồn khác nhau về tác dụng probiotic của chúng ở lợn. Các chủng AEB được phân lập từ thực phẩm đã lên men (Kantong, và Gergoush primary starters), phân lợn, đất và các bộ sưu tập chủng khác nhau. 261 chủng AEB phân lập được xác định bằng cách giải trình tự gen 16S ADN ribosom, và nghiên cứu tính kháng kháng sinh bằng cách xác định nồng độ ức chế tối thiểu (minimal inhibitory concentration - MIC) của một số kháng sinh.

Các phân tích khác được thực hiện bao gồm các phân tích về tính kháng muối mật và tính kháng axit, khả năng ức chế tác nhân gây bệnh, khả năng sinh trưởng trên các môi trường khác nhau, sự hình thành bào tử cũng như sự tương tác với các dòng tế bào động vật để đánh giá khả năng tác động vào các màng không thấm ở đường ruột. Kết quả phân tích cho thấy có sự khác biệt đáng kể giữa cả các loài lẫn các chủng. Các loài phân lập được theo sáng chế chủ yếu thuộc chi *Bacillus* bao gồm *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* và *B. safensis* từ nguồn thực phẩm đã lên men, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* từ phân lợn và *B. licheniformis* và *B. simplex* từ đất.

Do lo ngại về tính an toàn, nên nhiều chủng phân lập được theo sáng chế có tính kháng kháng sinh không mong muốn cao hơn nồng độ giới hạn theo quy định của EFSA đã được loại bỏ. Đã quan sát thấy hầu hết các chủng này đều sinh trưởng tốt khi nuôi cấy qua đêm trên môi trường canh thang bê, trong khi đó có 16% các chủng này không sinh trưởng tốt trong môi trường lên men thích hợp. Trong bước 2 của quá trình sàng lọc theo sáng chế, 32 chủng không kháng kháng sinh được chọn được xác định bằng cách giải trình tự gen *gyrB*, và phân tích vi ảnh PFGE. Ngoài ra, tác dụng của chúng trên các mầm bệnh được chọn được đánh giá và quan sát thấy sự khác biệt đáng kể giữa các chủng phân lập. Nhiều chủng phân lập có khả năng ức chế *Clostridium perfringens*, trong khi đó chỉ một vài chủng có khả năng ức chế *E. coli*. Do đó, kết quả nghiên cứu của sáng chế cho thấy hiếm khi có chủng vi khuẩn có khả năng ức chế cả *Clostridium perfringens* lẫn *E. coli*. Bước 3 của quá trình sàng lọc theo sáng chế thu được 10 chủng có khả năng ức chế mạnh tác nhân gây bệnh và các phân tích độ ổn định nhiệt của bào tử, giải trình tự bộ gen và các nghiên cứu *in vitro* về tác dụng của các chủng này lên các màng không thấm ở đường ruột được thực hiện.

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus*, khác biệt ở chỗ chủng này có tính miễn cảm với ampicilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin và cloramphenicol.

Thuật ngữ “miễn cảm với ampicilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin và cloramphenicol” được dùng trong bản mô tả để chỉ chủng vi khuẩn miễn cảm với kháng sinh cụ thể, không sinh trưởng ở nồng độ giới hạn theo quy định của EFSA (EFSA, 2008) được thể hiện trong Bảng 1.

Các trị số MIC thể hiện trong Bảng 1 là dựa trên tài liệu hướng dẫn cập nhật của EFSA (*Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed* (FEEDAP) về các tiêu chuẩn để đánh giá tính kháng kháng sinh của các vi khuẩn ở người và vật nuôi. *EFSA Journal* (2008) 732, 1-15) đề cập đến danh mục các kháng sinh và nồng độ giới hạn thích hợp cho chi *Bacillus*. Nồng độ giới hạn của ampicilin cho *Bacillus* không được đề cập đến bởi EFSA, tuy nhiên EFSA có đề cập đến nồng độ giới hạn của ampicilin cho một số vi khuẩn probiotic khác, như *Lactobacillus* spp. Do đó, tính mẫn cảm của các chủng *Bacillus* kháng ampicilin được chọn làm nồng độ giới hạn trong sáng chế.

Bảng 1. Nồng độ giới hạn của các kháng sinh khác nhau thường dùng cho người theo EFSA

Nhóm kháng sinh	Kháng sinh	Nồng độ giới hạn theo EFSA, mg/L
B-lactam	Ampicilin	4
Glycopeptit	Vancomycin	4
Aminoglycosit	Gentamicin	4
	Kanamycin	8
	Streptomycin	8
Macrolit	Erythromycin	4
Lincosamit	Clindamycin	4
Tetracyclin	Tetracyclin	8
Cloramphenicol	Cloramphenicol	8

Theo sáng chế, các chủng phân lập được phải có tính mẫn cảm với toàn bộ các kháng sinh nêu trên. Trong thực tế, tức là các chủng này không sinh trưởng ở nồng độ giới hạn khi được thử nghiệm bằng phương pháp pha loãng dịch nuôi cấy vi sinh vật ở nồng độ ức chế tối thiểu.

Theo sáng chế, nồng độ ức chế tối thiểu được đo bằng phương pháp pha loãng dịch nuôi cấy vi sinh vật theo tiêu chuẩn của CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute M07-A8 and M45-A2) được thực hiện như sau:

Dịch nuôi cấy qua đêm chứa các chủng cần thử nghiệm được cấy vào môi trường canh thang ISO-SENSITEST (Oxoid CM0473) trên các vi đĩa ở nồng độ bằng khoảng 10^5 CFU/mL (colony forming unit/mL) theo tỷ lệ pha loãng hai lần liên tiếp của kháng sinh được thử nghiệm (tổng thể tích bằng 100µL/giếng) và ủ kỵ khí trong 20 đến 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các đĩa chế tạo sẵn VetMIC Lact-1 và Lact-2 chứa các kháng sinh am-

picilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin, và cloramphenicol được sử dụng. Nồng độ ức chế sinh trưởng tối thiểu của các kháng sinh được đo sau 24 giờ.

Theo khía cạnh này, sáng chế cũng đề cập đến chủng *Bacillus* có tính kháng *E. coli*. Theo sáng chế, hoạt tính này được đo bằng thử nghiệm chấm thạch *E. coli* được thực hiện như sau:

Cấy 9mL môi trường canh thang bê (Veal Infusion Broth - VIB) với dịch nuôi cấy *Bacillus* cần thử nghiệm, ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc qua đêm ở tốc độ 175 vòng/phút. Đồng thời, cấy 9mL môi trường canh thang được chiết xuất từ não và tim của bò hoặc lợn (Brain Heart Infusion - BHI) với chủng *E. coli* được chọn từ *E. coli* O149 (O149:k91, k88a), *E. coli* O147 (O147:K89 F4), và *E. coli* O101 (O101, F5) và ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C.

Bổ sung 2mL dịch nuôi cấy *E. coli* qua đêm vào 200mL môi trường thạch lỏng canh thang bê ở nhiệt độ 50°C, và đổ vào mỗi đĩa thử nghiệm sinh học. Các đĩa được làm khô trên bàn vô trùng. Dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm cần thử nghiệm được chấm lên bề mặt môi trường thạch canh thang bê đã được trộn với *E. coli* và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 ngày. Bán kính vòng kháng khuẩn bao quanh các vết chấm và đường kính các vết chấm được ghi lại.

Chủng *Bacillus* được xem là có tính kháng *E. coli* khi bán kính vòng kháng khuẩn ít nhất bằng 1,5mm. Tốt hơn nếu, bán kính vòng kháng khuẩn ít nhất bằng 2,0mm, ví dụ ít nhất bằng 2,5mm, tốt hơn nữa nếu bán kính vòng kháng khuẩn ít nhất bằng 3,0mm, tốt nhất nếu bán kính vòng kháng khuẩn ít nhất bằng 3,5mm và còn tốt hơn nữa nếu bán kính vòng kháng khuẩn ít nhất bằng 4,0mm. Vòng kháng khuẩn có thể không giống nhau đối với các chủng *E. coli* khác nhau. Tốt hơn nếu, chủng *Bacillus* theo sáng chế được xem là có tính kháng *E. coli* khi bán kính vòng kháng khuẩn nhất bằng 1,5mm đối với toàn bộ các chủng *E. coli* được thử nghiệm. Tốt hơn nếu, bán kính vòng kháng khuẩn của hai hoặc còn tốt hơn nữa nếu bán kính vòng kháng khuẩn của toàn bộ ba chủng *E. coli* ít nhất bằng 2,0mm. Chủng *Bacillus* theo sáng chế có khả năng ức chế sự sinh trưởng của *E. coli*, đặc biệt ức chế sự sinh trưởng của các loài được thử nghiệm. Đã kiểm chứng thấy

rằng khi một chủng *Bacillus* không có tính kháng một loài *E. coli* thì thường cũng không có tính kháng các loài *E. coli* khác (Bảng 5, Barbosa et al., 2005) và ngược lại, tức là khi một chủng *Bacillus* có tính kháng một loài *E. coli* thì thường cũng có tính kháng các loài *E. coli* khác (Bảng 1, Guo et al., 2006).

Theo khía cạnh này, sáng chế cũng đề cập đến chủng *Bacillus* có tính kháng *Clostridium perfringens*. Theo sáng chế, hoạt tính này được đo bằng thử nghiệm chấm thạch *Clostridium perfringens* được thực hiện như sau:

Cấy 9mL môi trường canh thang bê với dịch nuôi cấy *Bacillus* cần thử nghiệm, ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc qua đêm ở tốc độ 175 vòng/phút. Đồng thời, cấy 9mL môi trường canh thang BHI với *Clostridium perfringens* Typ A, DSM 756, và ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong bình kỵ khí.

Dịch nuôi cấy *Bacillus* được chấm lên bề mặt môi trường thạch canh thang bê trong đĩa petri và ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Trộn 2ml dịch nuôi cấy *C. perfringens* qua đêm với 200mL môi trường thạch lỏng canh thang BHI, và rót vào môi trường thạch canh thang bê chứa các chấm *Bacillus*. Các đĩa này được ủ kỵ khí ở nhiệt độ 37°C trong 1 ngày. Bán kính vòng kháng khuẩn trong suốt bao quanh các vết chấm được đo.

Chủng *Bacillus* được xem là có tính kháng *Clostridium perfringens* khi bán kính vòng kháng khuẩn ít nhất bằng 5mm. Tốt hơn nếu, bán kính vòng kháng khuẩn ít nhất bằng 6mm, tốt hơn nữa nếu bán kính vòng kháng khuẩn ít nhất bằng 7mm. Chủng *Bacillus* theo sáng chế có khả năng ức chế sự sinh trưởng của *Clostridium perfringens*, đặc biệt ức chế sự sinh trưởng của các loài được thử nghiệm. Đã kiểm chứng thấy rằng khi một chủng *Bacillus* không có tính kháng một loài *Clostridium perfringens* thì thường cũng không có tính kháng các loài *Clostridium perfringens* khác và ngược lại, tức là khi một chủng *Bacillus* có tính kháng một loài *Clostridium perfringens* thì thường cũng có tính kháng các loài *Clostridium perfringens* khác.

Thuật ngữ “tế bào *Bacillus*” được dùng trong bản mô tả để chỉ cả bào tử *Bacillus* lẫn tế bào sinh dưỡng *Bacillus*.

Thuật ngữ “bào tử *Bacillus*” được dùng trong bản mô tả để chỉ bào tử có cấu trúc

không hoạt động, bền vững, không có khả năng sinh sản được tạo ra bởi vi khuẩn *Bacillus*. Nhìn chung, chức năng chủ yếu của bào tử là để đảm bảo sự sống sót của vi khuẩn trong các môi trường khắc nghiệt. Do đó, các bào tử có khả năng kháng tia cực tím và bức xạ gama, điều kiện mất nước, lysozym, nhiệt độ, môi trường ít chất dinh dưỡng, và chất khử trùng. Bào tử thường được tìm thấy trong đất và nước, nơi chúng có thể tồn tại trong thời gian dài. Nhiều chất độc không thể thấm qua được áo bào tử là cơ quan có thể chứa các enzym tham gia vào quá trình nảy mầm. Nhân bào tử có cấu trúc tế bào bình thường, như ADN và ribosom, nhưng không có hoạt động trao đổi chất. Khi vi khuẩn nhận thấy điều kiện môi trường đang trở nên khắc nghiệt, thì quá trình tạo bào tử có thể bắt đầu, trong khoảng tám giờ.

Thuật ngữ “tế bào sinh dưỡng *Bacillus*” được dùng trong bản mô tả để chỉ các tế bào *Bacillus* có chức năng dinh dưỡng, có thể phân chia để tạo ra nhiều tế bào sinh dưỡng.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus* có tỷ lệ tạo bào tử ít nhất bằng 80% khi đo ở ngày thứ 2. Theo sáng chế, tỷ lệ tạo bào tử được xác định như sau:

Bổ sung 50 μ L chủng *Bacillus* cần thử nghiệm vào 700 μ L môi trường canh thang bê trong đĩa giếng sâu (Deep well - DW), ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc qua đêm ở tốc độ 175 vòng/phút. Cấy chuyển 50 μ L dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm vào 700 μ L môi trường tạo bào tử chứa 95% (khối lượng/khối lượng) nước; 1,5% nguồn nitơ (nấm men); 3% su-croza; 0,06% vi khoáng; 0,1% di kali hydrophosphat trong các đĩa DW. Đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc ở tốc độ 175 vòng/phút trong 3 ngày. Quá trình tạo bào tử được quan sát bằng kính hiển vi và tỷ lệ tạo bào tử (số lượng bào tử so với tổng số lượng tế bào *Bacillus*) được đếm bằng mắt thường sau 1 ngày (24 giờ), 2 ngày (48 giờ) và 3 ngày (72 giờ) ủ.

Thuật ngữ “có tỷ lệ tạo bào tử ít nhất bằng 80% khi đo ở ngày thứ 2” được dùng trong bản mô tả có nghĩa là ít nhất 80% tế bào đã tạo bào tử sau 2 ủ. Tốt hơn nếu, tỷ lệ tạo bào tử có thể cao hơn, ví dụ ít nhất bằng 85%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95% hoặc ít nhất bằng 99%. Mục đích chính của sáng chế là để chọn lọc chủng *Bacillus* có tỷ lệ tạo

bào tử cao và tạo ra chủng hữu ích trong sản xuất thức ăn chăn nuôi. Thuật ngữ “tỷ lệ tạo bào tử cao” được dùng trong bản mô tả cũng để chỉ chủng *Bacillus* có tỷ lệ tạo bào tử cao để thu được năng suất cao như trên.

Như nêu trên, các tài liệu trước đây đã mô tả phương pháp chọn lọc chủng *Bacillus*, nhưng phương pháp sàng lọc của các tài liệu này không tập trung vào tỷ lệ tạo bào tử. Theo đó, chủng *Bacillus* chọn lọc được trong các tài liệu này không có tỷ lệ tạo bào tử tương đương với tỷ lệ tạo bào tử của chủng *Bacillus* theo sáng chế.

Ba chủng *Bacillus* theo sáng chế có đặc tính sinh trưởng mạnh, tỷ lệ tạo bào tử cao, không kháng kháng sinh và kháng khuẩn mạnh được chọn và đăng ký. Tuy nhiên, các chủng còn lại của sáng chế, đặc biệt là chủng thuộc loài *Bacillus amyloliquefaciens* (xem các chủng D-J trong Bảng 2 và Bảng 3) hoàn toàn đáp ứng các tiêu chuẩn bảo hộ và nằm trong phạm vi của sáng chế.

Như thể hiện trên Fig.1, đặc biệt là nhiều chủng thuộc loài *Bacillus amyloliquefaciens* nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngạc nhiên là, nhiều chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có tính kháng vi sinh vật, do đã được giả định đến ngày mà tính kháng vi sinh vật của chi *Bacillus* là chủng đặc hiệu và không có mối liên hệ di truyền với loài này.

Dựa trên phần mô tả chi tiết các thử nghiệm của sáng chế, chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này có thể lặp lại các thử nghiệm này để xác định liệu chủng *Bacillus* theo sáng chế có tính miễn cảm kháng sinh theo mục (i), tính kháng vi sinh vật theo mục (ii) và tỷ lệ tạo bào tử theo mục (iii) hay không. Theo đó, chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra các chủng có các đặc tính nêu trên một cách hữu hiệu nhất. Tốt hơn nữa, phương pháp chọn lọc này cũng sẽ bao gồm các bước (iv) đánh giá tính miễn cảm của tế bào sinh dưỡng ở độ pH = 4, và (v) đánh giá tính kháng muối mật để đảm bảo rằng các chủng này có thể sống sót và sinh trưởng tốt ở đường tiêu hóa. 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 này nếu chúng hoàn toàn không đáp ứng tiêu chuẩn.

Đã biết rằng muối mật có một số tác động tiêu cực đến sự sống sót, nảy mầm và sinh trưởng của bào tử *Bacillus* thành tế bào sinh dưỡng ở đường ruột của động vật. Do đó, các lợi khuẩn thường có thể sống sót và sinh trưởng ở đường ruột của động vật do

chúng có khả năng chịu được độ pH thấp và kháng muối mật và hữu ích để sản xuất chế phẩm lợi khuẩn bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Thử nghiệm *in vitro* để đánh giá tính kháng axit và muối mật của chủng *Bacillus theo sáng chế* được thể hiện trong phần *Ví dụ thực hiện sáng chế*. Các thử nghiệm để đánh giá tính miễn cảm với độ pH thấp (giống điều kiện môi trường dạ dày) chủ yếu đánh giá tính kháng với độ pH = 4 của tế bào sinh dưỡng *Bacillus theo sáng chế*. Đã biết rằng bào tử có tính kháng pH nằm trong khoảng từ 2 đến 3 và tế bào sinh dưỡng sẽ chết ở độ pH = 2. Tuy nhiên, độ pH của dạ dày thường bằng 4, đặc biệt khi ăn. Bào tử có thể nảy mầm ở điều kiện này, do đó tính miễn cảm của tế bào sinh dưỡng được thử nghiệm ở độ pH = 4. Tốt hơn nữa, các chủng được chọn có tính kháng axit ở độ pH = 4. Kết quả đánh giá đặc tính của các chủng được chọn được thể hiện trong Bảng 2.

Chủng của sáng chế là các loài thuộc chi *Bacillus*, tốt hơn nếu một trong số đó thuộc loài *Bacillus amyloliquefaciens*, như *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* hoặc *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *Bacillus simplex*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mojavenensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus metylo-trophicus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus vallismortis* hoặc *Bacillus tequilensis*.

261 chủng phân lập theo sáng chế được xác định bằng phương pháp giải trình tự ADN ribosom 16S. Phương pháp này không thể phân biệt được giữa một số loài *Bacillus* có mối liên hệ di truyền gần. Do đó, chủng theo sáng chế có thể được xác định là có mối liên hệ di truyền với nhóm bao gồm *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus metylo-trophicus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus vallismortis* hoặc nhóm bao gồm *Bacillus mojavenensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*. Cả hai nhóm bao gồm nhiều chủng đáp ứng tiêu chuẩn của sáng chế và là phương án quan trọng của sáng chế.

Khi cần thiết, các chủng theo sáng chế được xác định tiếp bằng phương pháp giải trình tự gen *gyr B*. Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 2 và Bảng 3 chủ yếu dựa trên *Bacillus amyloliquefaciens* (được xác định bằng gen *gyr B*). Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* phân lập được xác định tiếp bằng cách giải trình tự gen tiểu đơn vị ARN polymeraza (*rpo B*) và các phân loài này được thể hiện trong Bảng 4, Bảng 5 và Bảng 6.

Đặc tính mong muốn của các chủng theo sáng chế là có độ ổn định nhiệt. Kết quả đánh giá đặc tính của các chủng được chọn được thể hiện trong Bảng 4. Độ ổn định ở nhiệt độ 99,5°C được đánh giá bằng cách đo số lượng đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU) giảm sau 2 phút, 5 phút và 10 phút so với thời điểm 0 (log/log). Các chế phẩm bào tử *Bacillus* có bán trên thị trường có số lượng đơn vị tạo khuẩn lạc giảm dưới 2. Tốt hơn nữa, các chủng theo sáng chế có số lượng đơn vị tạo khuẩn lạc giảm bằng 0,5 hoặc nhỏ hơn sau 2 phút, tốt hơn nữa nếu bằng 0,25 hoặc nhỏ hơn, tốt nhất nếu bằng 0,05 hoặc nhỏ hơn. Theo các phương án ưu tiên, tốt hơn nếu các chủng theo sáng chế có số lượng đơn vị tạo khuẩn lạc giảm sau 5 phút bằng 2,5 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 1 hoặc nhỏ hơn, tốt nhất nếu bằng 0,5 hoặc nhỏ hơn và tốt hơn nếu các chủng theo sáng chế có số lượng đơn vị tạo khuẩn lạc giảm sau 10 phút cũng bằng 2,5 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 1 hoặc nhỏ hơn, tốt nhất nếu bằng 0,5 hoặc nhỏ hơn. Toàn bộ các chủng thử nghiệm theo sáng chế đều có độ ổn định nhiệt cao. Như đã được kiểm chứng, chủng B, chủng D và chủng F có độ ổn định nhiệt rất cao thậm chí sau 10 phút. Đáng chú ý là cả chủng B lẫn chủng F đều là *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* và phân loài này là phương án ưu tiên của sáng chế.

Sự sản sinh enzym được nghiên cứu ở Ví dụ 4. Kết quả nghiên cứu cho thấy cho toàn bộ các chủng thử nghiệm có hoạt tính xenlulaza bằng 50mU/mL hoặc cao hơn. Hoạt tính này được xem đặc tính có lợi của chủng *Baccillus theo* sáng chế. Theo phương án cụ thể, tốt hơn nếu chủng này có hoạt tính xenlulaza mạnh hơn, ví dụ bằng 100mU/mL hoặc cao hơn, như được phát hiện đối với chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* và phân loài này là phương án ưu tiên của sáng chế. Tốt hơn nữa, các chủng theo sáng chế có hoạt tính xenlulaza bằng 50mU/mL hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 100mU/mL hoặc cao hơn, tốt nhất nếu bằng 250mU/mL hoặc cao hơn, còn tốt hơn nữa nếu bằng 400mU/mL hoặc cao hơn.

Một số chủng theo sáng chế có hoạt tính xylanaza bằng 70mU/mL hoặc cao hơn. Như được thể hiện trong Bảng 5, các chủng có hoạt tính xenlulaza mạnh không nhất thiết cũng phải có hoạt tính xylanaza hoặc hoạt tính proteaza mạnh được xác định bằng 40000 RFU/OD hoặc cao hơn. Toàn bộ các chủng G, chủng I và chủng J đều là *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* được kiểm chứng có hoạt tính mạnh đối với cả ba enzym này.

Theo phương án ưu tiên, chủng *Bacillus* theo sáng chế là *Bacillus subtilis*, *Bacillus mojavensis* hoặc *Bacillus amyloliquefaciens*. Tốt nhất nếu, chủng này được chọn từ nhóm bao gồm: (a) chủng *Bacillus mojavensis* có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 25839; (b) các chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức lần lượt là DSM 25840, DSM 27032 hoặc DSM 27033, và (c) chủng *Bacillus subtilis* có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 25841; và các thể đột biến của chúng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp thu nhận chủng đột biến của:

(a) chủng *Bacillus mojavensis* có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 25839;

(b) các chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có số đăng ký lần lượt tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 25840, DSM 27032 hoặc DSM 27033; hoặc

(c) chủng *Bacillus subtilis* có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 25841;

Phương pháp này bao gồm bước gây đột biến các chủng vi khuẩn này và chọn lọc các chủng đột biến có các đặc tính sau:

(i) tính miễn cảm với ampicilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin và chloramphenicol;

(ii) tính kháng *E. coli* và *Clostridium perfringens*, và

(iii) tỷ lệ tạo bào tử ít nhất bằng 80% khi đo ở ngày thứ 2.

Các chủng nêu trên có thể được đột biến để thu được chủng đột biến, sau đó thực hiện quá trình chọn lọc. Theo cách khác, quá trình chọn lọc được thực hiện cho các chủng đột biến tự nhiên.

Phương pháp thu nhận chủng đột biến có thể bao gồm bước (iv) đánh giá tính miễn cảm với độ pH = 4 của tế bào sinh dưỡng, và bước (v) đánh giá tính kháng muối mật để đảm bảo rằng chủng này có thể sống sót và sinh trưởng tốt ở đường tiêu hóa. Các thử nghiệm này có thể được thực hiện theo thứ tự bất kỳ và một số chủng có thể được loại bỏ trong quá trình chọn lọc do chúng không đáp ứng đủ các tiêu chuẩn.

Thuật ngữ “chủng vi khuẩn” được dùng trong bản mô tả để chỉ vi khuẩn không bị biến đổi di truyền khi sinh trưởng hoặc phát triển. Thuật ngữ này cũng được dùng để chỉ sự sinh trưởng của các vi khuẩn giống nhau.

Thuật ngữ “chủng thể tự nhiên” được dùng trong bản mô tả để chỉ vi khuẩn không bị đột biến tìm thấy trong tự nhiên.

Thuật ngữ “vi khuẩn đột biến” hoặc “chủng đột biến” được dùng trong bản mô tả để chỉ vi khuẩn đột biến tự nhiên (tự phát, xuất hiện trong tự nhiên) hoặc vi khuẩn đột biến cảm ứng chứa một hoặc nhiều gen đột biến trong bộ gen của nó (ADN) không có ở AND tự nhiên. Thuật ngữ “đột biến cảm ứng” được dùng để chỉ vi khuẩn được đột biến bởi người bằng các phương pháp đột biến thông thường bao gồm đột biến bằng hóa chất, như hóa chất đột biến được chọn từ (i) hóa chất đột biến được liên kết với hoặc cài nhập vào ADN như chất tương tự bazơ nitơ, ví dụ 2-aminopurin hoặc chất cài xen như ICR-191, (ii) hóa chất đột biến phản ứng với ADN bao gồm 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 bức xạ gama v.v. Ngược lại, thuật ngữ “đột biến tự phát” hoặc “đột biến xuất hiện trong tự nhiên” được dùng để chỉ vi khuẩn không được đột biến bởi người.

Chủng đột biến có thể được đột biến nhiều lần (quá trình đột biến duy nhất được hiểu là một bước đột biến, sau đó thực hiện bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng tốt hơn nếu số lượng bước đột biến (hoặc các bước sàng lọc/chọn lọc) được thực hiện không lớn hơn 20, hoặc không lớn hơn 10, hoặc không lớn hơn. Tốt hơn nếu, so với chủng mẹ, chủng đột biến có số nucleotit nhỏ hơn 1%, nhỏ hơn 0,1%, nhỏ hơn 0,01%, nhỏ hơn 0,001% hoặc thậm chí nhỏ hơn 0,0001% ở bộ gen đã được thay thế bằng một nucleotit khác hoặc được loại bỏ.

Vi khuẩn đột biến như nêu trên là vi khuẩn không - GMO, tức là không được cải biến bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Theo cách khác, phương pháp ưu tiên để tạo ra chủng đột biến là phương pháp đột biến ngẫu nhiên, có thể tạo ra chủng đột biến bằng phương pháp đột biến điểm có định hướng, ví dụ bằng các kỹ thuật PCR được thiết kế thích hợp hoặc bằng cách sử dụng yếu tố chuyển gen có thể tích hợp vào quá trình tái bản của vi khuẩn.

Khi đột biến được tạo ra dưới dạng đột biến tự phát, chủng thể tự nhiên nêu trên được chọn lọc mà không cần sử dụng bước đột biến gen trước bất kỳ.

Một số loài *Bacillus* được cấp chứng nhận GRAS, tức là chúng được chứng nhận an toàn. Toàn bộ các chủng *B. subtilis* được cấp chứng nhận GRAS. Chủng *Bacillus* theo sáng chế là loài tạo bào tử kị khí không bắt buộc. Các loài *Bacillus* là loài tạo bào tử duy nhất được cấp chứng nhận GRAS. Các vi sinh vật dùng làm thức ăn chăn nuôi được cấp chứng nhận GRAS thực tế được chấp nhận bởi hầu hết các nhà sản xuất, bác sĩ thú y, và chuyên gia trong ngành chăn nuôi.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm *Bacillus* chứa các tế bào của chủng *Bacillus* theo sáng chế. Chế phẩm này có thể chứa tế bào của ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn chủng *Bacillus* hoặc nhiều hơn được chọn từ ít nhất một chủng theo sáng chế. Tốt hơn nếu, tế bào của chế phẩm *Bacillus* là bào tử.

Các chủng *Bacillus* của chế phẩm theo sáng chế có thể ở dạng thương mại đã biết đối với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này. Theo đó, theo một phương án, chủng *Bacillus* của chế phẩm này ở dạng tế bào khô (ví dụ, tế bào được phun khô) hoặc tế bào đông khô. Chế phẩm này có thể được điều chế ở dạng thích hợp như dung dịch, hỗn dịch đặc, thuốc bột hoặc hạt nhỏ.

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm *Bacillus* này chứa từ 10^5 đến 10^{12} CFU/g, tốt hơn nữa nếu từ 10^6 đến 10^{12} CFU/g, và tốt nhất nếu từ 10^7 đến 10^{12} CFU/g.

Thuật ngữ “CFU/g” được dùng trong bản mô tả để chỉ trọng lượng tính bằng gam của chế phẩm này, bao gồm cả các chất phụ gia thích hợp có trong chế phẩm này. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này đã biết rằng chế phẩm vi sinh có bán trên thị trường

thường cũng chứa các chất phụ gia, ví dụ chất mang hoặc chất hỗ trợ được chọn từ nhóm bao gồm nước sữa, váng sữa, canxi carbonat/limestone và chất chống đông vón như nhôm silicat và kieselgur (đất diatomit). Thuật ngữ này không dùng để chỉ trọng lượng của bình chứa dùng để đóng gói chế phẩm *Bacillus* này. Theo một phương án, chế phẩm này được đóng gói vào bình chứa thích hợp.

Chế phẩm theo này có thể chứa chủng *Bacillus* theo sáng chế bao gồm cả các chủng đột biến, và chất mang thích hợp để chăn nuôi động vật, như chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia bổ sung vào nước uống. Theo cách khác, chủng *Bacillus* theo sáng chế bao gồm cả các chủng đột biến có thể được trộn với các thức ăn chăn nuôi động vật, bao gồm cả protein và/hoặc carbohydrat dùng làm thức ăn chăn nuôi. Chế phẩm này có thể được điều chế ở dạng hạt nhỏ được ép đùn bằng các phương pháp chuẩn.

Chế phẩm *Bacillus* theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất phụ gia thức ăn chăn nuôi. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp thức ăn sơ chế, bao gồm bước bổ sung chế phẩm *Bacillus* theo sáng chế vào thức ăn chăn nuôi.

Thuật ngữ “hỗn hợp thức ăn sơ chế” được dùng trong bản mô tả để chỉ chủng *Bacillus* được bổ sung vào chất mang để tạo ra hỗn hợp thức ăn sơ chế, sau đó bổ sung vào thức ăn chăn nuôi ở tỷ lệ mong muốn và sử dụng cho động vật.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp chăn nuôi động vật, bao gồm bước cho động vật này sử dụng chế phẩm *Bacillus* hoặc thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp thức ăn sơ chế theo sáng chế.

Kết quả thử nghiệm của chủng B và chủng C trong Ví dụ 5 cho thấy cả hai chủng *Bacillus* này khi bổ sung vào thức ăn chăn nuôi đã cải thiện đặc tính sinh sản của lợn so với nhóm đối chứng âm. Các đặc tính sinh sản của lợn có thể được cải thiện đáng kể trong thử nghiệm. Tỷ lệ phần trăm lợn chết đã giảm ở cả hai chủng *Bacillus* và cả hai địa điểm thử nghiệm.

Ở một trong số các địa điểm thử nghiệm, số lượng lợn được điều trị bằng Enrofloxacin để khắc phục tình trạng tiêu chảy nặng là cao hơn đáng kể ($P > 0,05$) ở các lợn

được cho ăn thức ăn đối chứng so với các lợn được cho ăn chế phẩm *Bacillus* theo sáng chế.

Do đó, ví dụ này đã kiểm chứng được rằng chế phẩm *Bacillus* theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị và phòng ngừa bệnh ở động vật, ví dụ để ức chế các tác nhân gây bệnh, như *E. coli* và *Clostridium*. Chế phẩm *Bacillus* này có thể được sử dụng ở dạng vi khuẩn hoặc chất phụ gia chăn nuôi. Chế phẩm theo sáng chế được sử dụng làm thức ăn cho động vật ở lượng hữu hiệu để giảm sự sinh trưởng của các vi khuẩn gây bệnh như *Clostridia* và *Escherichia coli* ở đường ruột của động vật.

Động vật theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm gia cầm, gia súc, bê, lợn, thỏ, ngựa, cá và vật nuôi. Theo phương án ưu tiên, động vật này là động vật trang trại nuôi để lấy thịt, như lợn, hoặc vật nuôi làm thực phẩm, như gà thịt và gà nuôi lấy trứng.

Phương pháp sử dụng một hoặc nhiều chủng *Bacillus* theo sáng chế cho lợn con cũng được mô tả. Phương pháp này bao gồm việc cho lợn mẹ ăn một hoặc nhiều chủng *Bacillus* theo sáng chế. Các chủng này có thể được cho lợn ăn trong giai đoạn có chữa, cho lợn con bú hoặc cả hai. Một hoặc nhiều chủng *Bacillus* theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm thức ăn cho lợn sữa và lợn trưởng thành.

Thuật ngữ “một”, “duy nhất” và “cái này” và các thuật ngữ tương tự được dùng trong bản mô tả (đặc biệt là trong bộ yêu cầu bảo hộ) để chỉ các danh từ số ít lẫn số nhiều, trừ khi có quy định khác hoặc trừ khi có chỉ dẫn khác. Thuật ngữ “bao gồm”, “có”, “có chứa” và “chứa” được xem là các thuật ngữ “khoảng trị số” được dùng trong bản mô tả chỉ nhằm mục đích thể hiện cách viết tắt đề cập đến từng trị số riêng biệt thuộc khoảng trị số đó, trừ khi có quy định khác, và mỗi trị số riêng biệt được kết hợp vào bản mô tả nếu nó được viện dẫn. Toàn bộ các phương pháp được thể hiện trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo cách thức thích hợp bất kỳ trừ khi có quy định khác hoặc trừ khi có chỉ dẫn khác. Việc sử dụng bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ (ví dụ “như”) được đề cập đến trong bản mô tả, chỉ nhằm mục đích thể hiện chứa không giới hạn phạm vi của sáng chế, trừ khi có quy định khác. Không có ngôn ngữ trong bản mô tả này được hiểu là chỉ ra bất kỳ yếu tố không cần yêu cầu bảo hộ là cần thiết cho việc thực hành của sáng chế.

Đăng ký các chủng vi khuẩn

Chủng *Bacillus mojavensis* CHCC 15510 đã được Chr. Hansen A/S, Denmark đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) với số đăng ký là DSM 25839 vào ngày 3/4/2012. Quá trình đăng ký được thực hiện theo Thỏa thuận Budapest về đăng ký vi sinh vật cho mục đích nộp sáng chế.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15516 đã được Chr. Hansen A/S, Denmark đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) với số đăng ký là DSM 25840 vào ngày 3/4/2012. Quá trình đăng ký được thực hiện theo Thỏa thuận Budapest về đăng ký vi sinh vật cho mục đích nộp sáng chế.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15536 đã được Chr. Hansen A/S, Denmark đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) với số đăng ký là DSM 27032 vào ngày 21/03/2013. Quá trình đăng ký được thực hiện theo Thỏa thuận Budapest về đăng ký vi sinh vật cho mục đích nộp sáng chế.

Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15539 đã được Chr. Hansen A/S, Denmark đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) với số đăng ký là DSM 27033 vào ngày 21/03/2013. Quá trình đăng ký được thực hiện theo Thỏa thuận Budapest về đăng ký vi sinh vật cho mục đích nộp sáng chế.

Chủng *Bacillus subtilis* CHCC 15541 đã được Chr. Hansen A/S, Denmark đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) với số đăng ký là DSM 25841 vào ngày 3/4/2012. Quá trình đăng ký được thực hiện theo Thỏa thuận Budapest về đăng ký vi sinh vật cho mục đích nộp sáng chế.

Đối với tất cả các vi sinh vật đăng ký nêu trên, các chỉ dẫn bổ sung sau đây được áp dụng: Đối với các Văn phòng Bằng sáng chế tương ứng của các quốc gia được chỉ định tương ứng, người nộp đơn yêu cầu một mẫu của các vi sinh vật gửi nêu trên chỉ được cung cấp cho một chuyên gia được đề cử bởi các yêu cầu cho đến ngày mà các bằng sáng chế được cấp hoặc ngày mà các ứng dụng đã bị từ chối hoặc bị thu hồi hoặc được coi là bị thu hồi

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương án của sáng chế được mô tả bằng các ví dụ không hạn chế dưới đây.

Vật liệu

Môi trường canh thang bê (Veal Infusion Broth - VIB) (Difco, 234420)

Môi trường thạch canh thang bê (VIB và 1,5% aga nguyên chất (Aga số 1), Oxoid LP0011)

Môi trường đĩa thạch T3 (trypton 3g/L, tryptosa 2g/L, chiết xuất nấm men 1,5g/L, natri dihydro phosphat 0,05M, $MnCl_2$ 0,005g/L (pH = 6,8), và aga 15g/L)

Môi trường canh thang LB (Laura-Bertani - LB) (trypton nguyên chất 10g/L (Difco 0123), chiết xuất nấm men 5g/L (Oxoid L21), NaCl 10g/L (Merck nr. 106404))

Môi trường canh thang chiết xuất từ não và tim của bò hoặc lợn (Brain Heart Infusion - BHI) (Oxoid CM225)

Môi trường thạch canh thang BHI (Oxoid CM375)

Muối mật (chiết xuất mật lợn; Sigma B8631)

Đĩa thử nghiệm sinh học (Nunc 240845)

Đĩa petri (Procudan 140096, đĩa petri có gờ)

Môi trường tạo bào tử: nước 95% kl/kl; nguồn nitơ (nấm men) 1,5% kl/kl; sacarit 3% kl/kl; vi khoáng 0,06 % kl/kl; đi kali hydrophosphat 0,1% kl/kl.

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

Đĩa chế tạo sẵn VetMIC Lact-1 và Lact-2 (SVA, Uppsala, Sweden)

Môi trường canh thang ISO-SENSITEST (Oxoid CM0473)

Chủng vi khuẩn

Các chủng *Bacillus* được phân lập từ phân lợn, đất, thực phẩm đã lên men và thu thập từ các ngân hàng giống vi sinh vật, bảo quản trong môi trường canh thang bê chứa 20% glycerol trong các đĩa MTP ở nhiệt độ -80°C.

Kháng sinh

Ampicilin (Sigma, A9518-5G)

Vancomycin (Sigma, V1764-250MG)

Gentamicin (Sigma, G1264-50MG)

Kanamycin (Sigma, K1377-1G)

Streptomycin (Sigma, S6501-5G)

Erythromycin (Sigma E-5389)

Clindamycin (Sigma, C2569-10MG)

Tetracyclin (Sigma T-7660)

Cloramphenicol (Sigma, C0378-5G)

Tác nhân gây bệnh

E. coli O101 F5 (State Serum Institute, Copenhagen, Denmark)

E. coli O147:K89 F4 (State Serum Institute, Copenhagen, Denmark)

E. coli O149:k91, k88a (NCTC 10650) National Collection of Type Cultures

Các chủng *E. coli* được bảo quản trong môi trường canh thang LB chứa 20% glycerol trong các đĩa MTP ở nhiệt độ -80°C

Clostridium perfringens typ A, DSM 756, được bảo quản trong môi trường canh thang BHI chứa 20% glycerol ở nhiệt độ -80°C

Ví dụ 1

Sàng lọc sơ bộ

261 chủng vi khuẩn phân lập được từ đất, phân lợn và thực phẩm đã lên men được sàng lọc sơ bộ về tính miễn cảm với kháng sinh, tính kháng tác nhân gây bệnh, tính kháng muối mật và tính miễn cảm với độ pH thấp.

1.1 Sàng lọc tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng *Bacillus* theo sáng chế

Bổ sung 50µL dịch cấy các chủng *Bacillus* từ các đĩa MTP vào các đĩa DW chứa 700µL môi trường canh thang bê, ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc qua đêm ở tốc độ 175 vòng/phút. Các mẫu thử ISO, có bổ sung các kháng sinh ở hai nồng độ được thể hiện trong Bảng 1 và các mẫu đối chứng ISO không chứa kháng sinh được bổ sung vào các đĩa MTP ở thể tích bằng 180µL. Dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm được pha loãng 100 lần và chuyển 20µL vào các mẫu thử ISO và các mẫu đối chứng ISO. Các đĩa MTP được ủ ở nhiệt độ 37°C. Mật độ quang ở bước sóng 620nm được đo ở các đĩa có cấy chủng và các đĩa thử MTP sau 24 giờ và 48 giờ ủ. Tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn này được xác định bằng tỷ lệ phần trăm mật độ quang ở các mẫu thử ISO so với mật độ quang ở các mẫu đối chứng ISO.

1.2 Sàng lọc tính kháng tác nhân gây bệnh của các chủng *Bacillus* theo sáng chế

Bổ sung 50µL dịch cấy các chủng *Bacillus* từ các đĩa MTP vào các đĩa DW chứa 700µL môi trường canh thang bê, ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc qua đêm ở tốc độ 175 vòng/phút.

Trước khi thử nghiệm, chủng *E. coli* được sinh trưởng trên môi trường LB qua đêm ở nhiệt độ 30°C. *C. perfringens* CHCC14372 được sinh trưởng trên môi trường BHI qua đêm trong bình kỵ khí ở nhiệt độ 37°C.

1.2.1 Đánh giá tính kháng *E.coli* bằng phương pháp chấm thạch

Trộn 2mL dịch nuôi cấy *E. coli* qua đêm với 200mL môi trường thạch lỏng canh thang bê ở nhiệt độ 50°C, và đổ vào mỗi đĩa thử nghiệm sinh học. Các đĩa này được làm khô trên bàn vô trùng. Chấm 2mL dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm lên bề mặt đĩa thạch canh thang bê được trộn với *E. coli* và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 ngày. Bán kính vòng kháng khuẩn trong suốt bao quanh các vết chấm được đo và ghi lại là “cao” khi bán kính vòng kháng khuẩn lớn hơn 2,0mm, “trung bình” khi bán kính vòng kháng khuẩn nằm trong khoảng từ 0,5mm đến 2,0mm và “thấp” khi bán kính vòng kháng khuẩn nhỏ hơn 0,5mm.

1.2.2 Đánh giá tính kháng *C. perfringens* bằng phương pháp chấm thạch

Môi trường thạch canh thang bê được rót vào đĩa thử nghiệm sinh học (200mL/đĩa) và làm khô trên bàn vô trùng. Chấm 2mL dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm lên bề mặt đĩa thạch canh thang bê và ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Bổ sung 2mL dịch cấy *C. perfringens* Typ A CHCC14372 vào 200mL môi trường thạch lỏng BHI, trộn và cấy phủ từ từ vào đĩa thử nghiệm sinh học chứa các vết chấm *Bacillus*. Các đĩa được ủ kỵ khí ở nhiệt độ 37 °C trong 1 ngày. Bán kính vòng kháng khuẩn trong suốt bao quanh các vết chấm được đo và ghi lại là “cao” khi bán kính vòng kháng khuẩn lớn hơn 2,0mm, “trung bình” khi bán kính vòng kháng khuẩn nằm trong khoảng từ 1,0mm đến 2,0mm và “thấp” khi bán kính vòng kháng khuẩn nhỏ hơn 1,0mm.

1.2.3 Đánh giá tính kháng *C. perfringens* bằng phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch

Trộn 2mL dịch nuôi cấy *C. perfringens* CHCC14372 qua đêm với 200mL môi trường thạch lỏng BHI và đổ vào mỗi đĩa thử nghiệm sinh học. Sau khi đông rắn, các lỗ có đường kính 10mm được tạo ra trên đĩa thạch BHI bằng đũa vô trùng và 80μL dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm được đổ vào mỗi lỗ thạch. Các đĩa được ủ kỵ khí ở nhiệt độ 37°C trong 1 ngày. Bán kính vòng kháng khuẩn trong suốt bao quanh các lỗ thạch được đo và ghi lại là “cao” khi bán kính vòng kháng khuẩn lớn hơn 2,0mm, “trung bình” khi bán kính vòng kháng khuẩn nằm trong khoảng từ 0,5mm đến 2,0mm và “thấp” khi bán kính vòng kháng khuẩn nhỏ hơn 0,5mm.

1.3 Đánh giá tính kháng muối mật

Bổ sung 50 μ L dịch cấy các chủng *Bacillus* từ các đĩa MTP vào các đĩa DW chứa 700 μ L môi trường canh thang bê, ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc qua đêm ở tốc độ 175 vòng/phút. Cấy chuyển 50 μ L các dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm vào các đĩa DW chứa 800 μ L môi trường canh thang bê có bổ sung 0,3% muối mật (các mẫu thử) và các đĩa DW chứa 800 μ L môi trường canh thang bê không chứa muối mật (các mẫu đối chứng). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc ở tốc độ 175 vòng/phút. Mật độ quang ở bước sóng 620nm (OD₆₂₀) được đo ở các thời điểm 0 giờ, 6 giờ và 24 giờ trên môi trường canh thang bê có bổ sung muối mật và trừ đi các trị số mật độ quang ở bước sóng 620nm trên môi trường canh thang bê của các mẫu đối chứng. Các chủng được phân loại theo sự khác biệt về trị số mật độ quang ở bước sóng 620nm thành các nhóm A (OD < 0,1), nhóm B (OD = 0,1 đến 0,4) và nhóm C (OD > 0,4). Các chủng ở nhóm A có tính kháng muối mật mạnh nhất. Các chủng được chọn là các chủng ở nhóm A hoặc nhóm B. Kết quả đánh giá đặc tính của các chủng được chọn được thể hiện trong Bảng 2.

1.4 Đánh giá tính miễn cảm với độ pH thấp (giống điều kiện axit dạ dày)

Đổ 800 μ L môi trường canh thang bê được điều chỉnh đến độ pH = 4 bằng axit HCl 1,0M và 800 μ L môi trường canh thang bê ở các mẫu đối chứng (độ pH = 7) vào các đĩa DW. Bổ sung 50 μ L dịch cấy các chủng *Bacillus* từ các đĩa MTP vào các đĩa DW, ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc ở tốc độ 175 vòng/phút trong 24 giờ. Mật độ quang (OD₆₂₀) được đo trong 200 μ L hỗn dịch tế bào ở thời điểm 0 giờ và sau 24 giờ ủ. Các chủng vi khuẩn sinh trưởng ở độ pH = 4 được xác định bằng cách lấy các trị số mật độ quang ở bước sóng 620nm sau khi ủ trừ đi các trị số mật độ quang ở bước sóng 620nm trước khi ủ. Các chủng có mật độ quang ở bước sóng 620nm lớn hơn 0,1 được phân loại thành nhóm có tính kháng độ pH = 4 (được chỉ ra bằng ký hiệu “Kháng” trên Bảng 2), trong khi đó các chủng có mật độ quang ở bước sóng 620nm nhỏ hơn 0,1 (không sinh trưởng hoặc có các trị số âm tính) được phân loại thành nhóm có tính miễn cảm với độ pH = 4 (được chỉ ra bằng ký hiệu “Miễn cảm” trên Bảng 2).

1.5 Kết quả sàng lọc sơ bộ

Dựa trên kết quả thử nghiệm sàng lọc sơ bộ, 32 chủng được chọn được sàng lọc lần thứ hai. Các chủng được chọn mẫn cảm với kháng sinh và có tính kháng cả *E.coli* lẫn *Clostridium perfringens* và các đặc tính thích hợp trong các thử nghiệm còn lại.

Trong số 261 chủng phân lập được từ đất, phân lợn và thực phẩm đã lên men, phân lập được 161 chủng có tính kháng kháng sinh trong thử nghiệm sàng lọc sơ bộ. Trong số 100 chủng phân lập có tính mẫn cảm với kháng sinh, 56 chủng có tính kháng *Clostridium perfringens* và chỉ 22 chủng có tính kháng cả *E. coli* lẫn *Clostridium perfringens*. Trong số 22 chủng này, 12 chủng phân lập được là loài *B.amyloliquefaciens*. Các chủng phân lập còn lại là các loài *B.subtilis* và *B.mojavensis*. Đặc tính của 22 chủng trong số 32 chủng được chọn từ thử nghiệm sàng lọc lần hai được thể hiện trong Bảng 2 và Bảng 3.

Ví dụ 2

Thử nghiệm sàng lọc lần hai

Dựa trên kết quả thử nghiệm sàng lọc sơ bộ, 40 chủng phân lập được chọn và các chủng đối chiếu được đánh giá tính kháng tác nhân gây bệnh bằng cách lặp lại các thử nghiệm chấm thạch và đánh giá tỷ lệ tạo bào tử. 32 chủng được đánh giá tính mẫn cảm với kháng sinh bằng thử nghiệm MIC.

2.1 Sàng lọc tính kháng tác nhân gây bệnh của các chủng *Bacillus*

Trước khi thử nghiệm, cấy 9mL môi trường canh thang bê với các chủng *Bacillus*, ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc qua đêm ở tốc độ 175 vòng/phút. Đồng thời, cấy 9mL môi trường canh thang BHI với chủng *E. coli*, và ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C. *Clostridium perfringens* được sinh trưởng ở cùng điều kiện trong bình kỵ khí.

2.1.1 Đánh giá tính kháng *E. coli* bằng phương pháp chấm thạch

Bổ sung mỗi 2mL các dịch nuôi cấy *E.coli* qua đêm vào 200mL môi trường thạch lỏng canh thang bê ở nhiệt độ 50°C, và đổ vào mỗi đĩa thử nghiệm sinh học. Các đĩa được làm khô trên bàn vô trùng. Chấm các dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm lên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường canh thang bê đã được trộn với chủng *E. coli* và ủ ở nhiệt độ 37°C trong

2 ngày. Bán kính vòng kháng khuẩn bao quanh các vết chấm và đường kính các vết chấm được đo.

2.1.2 Đánh giá tính kháng *C. perfringens* bằng phương pháp chấm thạch

Chấm các dịch nuôi cấy *Bacillus* lên bề mặt các đĩa petri chứa môi trường thạch canh thang bê và ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Trộn 2mL dịch nuôi cấy *C. perfringens* qua đêm với 200mL môi trường thạch lỏng BHI, và rót vào môi trường thạch canh thang bê chứa các vết chấm *Bacillus*. Các đĩa này được ủ kỵ khí ở nhiệt độ 37°C trong 1 ngày. Bán kính vòng kháng khuẩn trong suốt bao quanh các vết chấm được đo.

2.2 Đánh giá khả năng sinh trưởng trên môi trường canh thang bê và môi trường tạo bào tử

Bổ sung 50μL dịch cấy các chủng *Bacillus* từ các đĩa MTP vào các đĩa DW chứa 700μL môi trường canh thang bê hoặc môi trường tạo bào tử, ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc ở tốc độ 175 vòng/phút trong 24 giờ. Sự sinh trưởng của các vi khuẩn *Bacillus* được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 620nm (OD₆₂₀) trong 200μL hỗn dịch tế bào. Do độ đục của môi trường tạo bào tử *cao* và độ lệch giữa các giếng, nên mật độ quang được xác định bằng cách lấy trị số OD₆₂₀ ở các giếng tương ứng sau khi trừ đi trị số OD₆₂₀ trước khi ủ. Các chủng có OD₆₂₀ lớn hơn 0,4 được phân loại thành nhóm A (sinh trưởng mạnh) và các chủng có OD₆₂₀ nhỏ hơn 0,4 được phân loại thành nhóm B (sinh trưởng yếu).

2.3 Xác định tỷ lệ tạo bào tử trong môi trường tạo bào tử

Bổ sung 50μL dịch cấy các chủng *Bacillus* từ các đĩa MTP vào các đĩa DW chứa 700μL môi trường canh thang bê, ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc qua đêm ở tốc độ 175 vòng/phút. Cấy chuyển 50μL các dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm vào các đĩa DW chứa 700μL môi trường tạo bào tử (sporulation medium - SM). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C và lắc ở tốc độ 175 vòng/phút trong 3 ngày. Sự hình thành bào tử được quan sát bằng kính hiển vi và tỷ lệ phần trăm bào tử (số lượng bào tử so với tổng số tế bào) được xác định bằng mắt thường sau 1 ngày (24 giờ), 2 ngày (48 giờ) và 3 ngày (72 giờ) ủ.

2.4 Đánh giá tính miễn cảm với kháng sinh bằng cách xác định nồng độ ức chế tối

thiếu

Các chủng theo sáng chế được đánh giá tính miễn cảm với kháng sinh bằng cách đo nồng độ ức chế tối thiểu của một số kháng sinh. Phương pháp được sử dụng là phương pháp pha loãng dịch nuôi cấy vi sinh vật theo tiêu chuẩn của CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute M07-A8 and M45-A2).

Hỗn dịch chứa các chủng nuôi cấy qua đêm cần thử nghiệm được cấy vào các vi đĩa chứa môi trường canh thang ISO-SENSITEST (Oxoid CM0473) ở nồng độ bằng khoảng 10^5 đơn vị tạo khuẩn lạc/mL (CFU/mL - colony forming units/ml) theo tỷ lệ pha loãng hai lần liên tiếp của kháng sinh được thử nghiệm (tổng thể tích bằng 100 μ L/giếng) và ủ kỵ khí trong 20 đến 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các đĩa chế tạo sẵn VetMIC Lact-1 và Lact-2 chứa các kháng sinh ampicilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin, và chloramphenicol có thể được sử dụng. Nồng độ ức chế sinh trưởng tối thiểu của kháng sinh được đo sau 24 giờ. Thử nghiệm được lặp lại hai lần độc lập.

2.5 Kết quả thử nghiệm

Kết quả thử nghiệm thu được từ 32 chủng được chọn cho thấy *Bacillus amyloliquefaciens* có tính miễn cảm với kháng sinh tốt nhất, tính kháng vi sinh vật mạnh nhất và tỷ lệ tạo bào tử cao nhất. Đặc tính của 22 chủng trong số 32 chủng được chọn được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

Cơ sở dữ liệu của các chủng *Bacillus* được chọn:

Nguồn phân lập, phân loại loài xác định bằng cách giải trình tự gen *gyrB*, sinh trưởng trên môi trường canh thang bê, môi trường tạo bào tử và tỷ lệ tạo bào tử.

Chủng A = 15510; Chủng B = 15516; Chủng C = 15541; Chủng H = 15536; Chủng I = 15539.

				Sinh trưởng		Tỷ lệ % tạo bào tử		
Chủng	Nguồn phân lập	Loài	Tính kháng kháng sinh	VIB	SM	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
A	Phân	<i>B.mojavensis</i>	Mẫn cảm	A	B	5	95	90
B	Phân	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Mẫn cảm	A	A	10	99	99
C	Phân	<i>B.subtilis</i>	Mẫn cảm	B	A	0	80	95
D	Phân	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Mẫn cảm	B	A	40	99	99
E	Phân	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Mẫn cảm	B	A	20	99	99
F	Phân	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Mẫn cảm	B	A	50	99	99
G	Phân	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Mẫn cảm	B	A	95	95	95
H	Phân	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Mẫn cảm	A	A	99	99	99
I	Phân	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Mẫn cảm	B	A	80	99	99
J	Phân	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Mẫn cảm	B	A	50	99	99
K	LMG	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Mẫn cảm	A	A	2	99	99
L	Phân	<i>B.licheniformis</i>	Mẫn cảm	B	A	90	99	NA
M	Đất	<i>B. licheniformis</i>	Kháng	B	A	0	1	80
N	Đất	<i>B. megaterium</i>	Kháng	B	A	0	0	0
O	Phân	<i>B.subtilis</i>	Mẫn cảm	A	B	0	60	10
P	Phân	<i>B. pumilus</i>	Kháng	A	A	0	10	99
Q	Phân	<i>B. licheniformis</i>	Kháng	A	A	0	1	5
R	Phân	<i>B. licheniformis</i>	Kháng	A	A	0	Rất nhỏ	40
S	Phân	<i>B. pumilus</i>	Mẫn cảm	A	A	0	10	95
T	Đất	<i>B. megaterium</i>	Kháng	B	A	0	0	0
U	Đất	<i>B. licheniformis</i>	Kháng	A	A	0	Rất nhỏ	70
V	Phân	<i>B.subtilis</i>	Kháng	A	B	95	99	90

Bảng 3

Tính kháng *E. coli* và *Clostridium perfringens* (bán kính vòng kháng khuẩn, mm), tính kháng muối mật và axit của các chủng *Bacillus* được chọn:

Chủng A = CHCC15510; Chủng B = 15516; Chủng C = 15541; Chủng H = 15536; Chủng I = 15539.

Các tác nhân gây bệnh ở lợn là ba chủng *E. coli* O149, O147 và O101.

		Muối mật		Axit	Tính kháng <i>E.coli</i> (mm)			<i>Cl. perfringens</i> (mm)
Chủng	Loài	6 giờ	24 giờ		O149	O147	O101	mm
A	<i>B. mojavensis</i>	C	A	S	1,5	1,7	2,3	7
B	<i>B. amyloliquefaciens</i>	A	A	S	2,5	2,3	3,5	8
C	<i>B. subtilis</i>	A	B	R	1,8	1,5	2,7	7
D	<i>B. amyloliquefaciens</i>	A	A	R	2	1,7	2,5	6
E	<i>B. amyloliquefaciens</i>	B	A	S	3	3	3,5	6
F	<i>B. amyloliquefaciens</i>	B	A	S	2,5	2,5	3,3	7
G	<i>B. amyloliquefaciens</i>	B	B	R	2	1,7	2	7

H	<i>B. amyloliquefaciens</i>	A	A	R	3,5	3	4,5	7
I	<i>B. amyloliquefaciens</i>	B	A	R	2	2	2	8
J	<i>B. amyloliquefaciens</i>	B	A	S	2	2,5	2,5	8
K	<i>B. amyloliquefaciens</i>	B	A	S	0,3	<1	1	4
L	<i>B. licheniformis</i>	A	B	S	< 1	<1	1,3	8
M	<i>B. licheniformis</i>	B	A	S	0	0	0	4
N	<i>B. megaterium</i>	B	A	S	0	0	0	0
O	<i>B. subtilis</i>	B	A	S	1	<1	1,3	7
P	<i>B. pumilus</i>	A	A	R	1	0	1,7	8
Q	<i>B. licheniformis</i>	B	B	S	0	0	0	2
R	<i>B. licheniformis</i>	B	B	S	0	0	0	2
S	<i>B. pumilus</i>	A	A	R	<1	0	<1	6
T	<i>B. megaterium</i>	A	A	S	0	0	0	0
U	<i>B. licheniformis</i>	B	B	S	0	0	0	3
V	<i>B. subtilis</i>	C	A	S	2,5	1	2,5	10

Ví dụ 3

Độ ổn định nhiệt

3.1 Phương pháp đánh giá độ ổn định nhiệt

Các chủng *Bacillus* được sinh trưởng qua đêm trên môi trường canh thang bê ở nhiệt độ 37°C và lắc ở tốc độ 220 vòng/phút. Các dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm được cấy trải lên các đĩa chứa môi trường thạch T3 (100μL ở độ pha loãng từ 10⁵ đến 10⁶) và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 đến 2 ngày cho đến khi quá trình tạo bào tử kết thúc. Các bào tử được tách ra khỏi các đĩa, hỗn dịch hóa trong dung dịch FKP và ủ ở nhiệt độ 80°C trong 15 phút để bất hoạt các tế bào sinh dưỡng. Các hỗn dịch bào tử được đặt vào nước đá ngay sau khi gia nhiệt. Các chế phẩm bào tử được rửa hai lần bằng FKP, tái hỗn dịch hóa trong FKP chứa 20% glycerol và bảo quản ở nhiệt độ 80°C trước khi sử dụng. Tính kháng nhiệt của các bào tử vi khuẩn được đánh giá bằng cách giữ các ống chứa 500μL hỗn dịch bào tử trong FKP (ở nồng độ bằng khoảng 1×10⁶ CFU/mL) ở nhiệt độ 99,5°C trong 2 phút, 5 phút và 10 phút. Số lượng đơn vị tạo khuẩn lạc được đếm ở các độ pha loãng của các hỗn dịch đã được gia nhiệt được cấy phủ lên môi trường thạch canh thang bê sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm.

3.2 Kết quả đánh giá độ ổn định nhiệt

Dữ liệu đánh giá độ ổn định nhiệt được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4 Độ ổn định nhiệt ở nhiệt độ 99,5°C của các chủng *Bacillus* được chọn;

được đo theo số lượng CFU giảm sau 2 phút, 5 phút và 10 phút so với thời điểm 0 (log/log).

Chủng B = 15516; Chủng C = 15541, Chủng H = 15536.

Chủng	Loài	Số lượng CFU giảm sau khi gia nhiệt		
		2 phút	5 phút	10 phút
B	<i>B. amyloliquefaciens subsp amyloliquefaciens</i>	0,05	0	0
C	<i>B. subtilis</i>	0,25	2,5	3,8
D	<i>B. amyloliquefaciens /siamensis related</i>	0	0	0,05
E	<i>B. amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	0,34	3,8	5,3
F	<i>B. amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens</i>	0	0	0
H	<i>B. amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	0,19	2,5	5

Nhìn chung, số lượng CFU giảm nhỏ hơn 2 (log/log) sau 2 phút so với thời điểm 0 thích hợp cho bào tử được bổ sung vào viên thức ăn chăn nuôi và các kết quả nhỏ hơn 2 đạt được với các chế phẩm bào tử *Bacillus* có bán trên thị trường. Do đó toàn bộ các chủng được thử nghiệm và thể hiện trong Bảng 4 có độ ổn định nhiệt cao. Một số chủng cũng có độ ổn định nhiệt cao sau 5 phút và 10 phút, tức là chủng B và chủng F, cả hai chủng này đều thuộc loài *B. amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens*, không có số lượng CFU giảm.

Ví dụ 4

Sự sản sinh enzym

4.1 Phương pháp định lượng xenlulaza

Các chủng *Bacillus* được sinh trưởng trên môi trường chứa carboxymetyl xenluloza (Abou-Taleb et al. 2009) (carboxymetyl xenluloza (C9481) 10,0g/L, trypton nguyên chất 2,0g/L (mã số 211705, Becton Dickinson A/S, Denmark), KH_2PO_4 4g/L, Na_2HPO_4 4,0g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,001g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,004g/L, pH = 7) ở nhiệt độ 37°C và khuấy mạnh bằng thanh từ trong 24 giờ. Sự sản sinh xenlulaza được xác định bằng Kit cơ chất xenlulaza EnzChek (mã số E33953, Life Technologies) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, ly tâm thu lấy các phân dịch nổi nuôi cấy và đổ vào các đĩa MTP (200µL/giếng) theo các tỷ lệ pha loãng liên tiếp. Đường chuẩn được xây dựng bằng cách sử dụng xenlulaza từ *Aspergillus niger* (C1184) bắt đầu từ 2U/mL. Dung dịch cơ chất EnzChek được bổ sung vào phân dịch nổi nuôi cấy trong các đĩa Nunc 96 giếng Black FluoroNunc (mã số 237105, Thermo Fisher Scientific, NUNC Inc.). Mật độ huỳnh

quang được đo ở bước sóng kích thích 360nm và bước sóng phát xạ 420nm sau 30 phút ủ (Enspire 2300 Multilabel Reader, Perkin Elmer Inc.). Hoạt tính xylanaza được tính toán từ đường chuẩn theo hai thử nghiệm độc lập và biểu diễn theo đơn vị U/mL.

4.2 Phương pháp định lượng xylanaza

Các chủng *Bacillus* được sinh trưởng trên môi trường chứa xylan từ gỗ sồi (Cordeiro et al. 2002) (xylan (X4252) 5,0g/L, chiết xuất nấm men 2,0g/L (mã số 288620, Becton Dickinson A/S, Denmark), pepton nguyên chất 5,0g/L (mã số 211677, Becton Dickinson A/S, Denmark), NaCl 0,5g/L, MgSO₄·7H₂O 0,5g/L, CaCl₂·2H₂O 0,15g/L, pH = 7,5) ở nhiệt độ 37°C và khuấy mạnh bằng thanh từ trong 24 giờ. Hoạt tính xylanaza được định lượng bằng Kit EnzChek Ultra Xylanaza (mã số E33650, Life Technologies) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, ly tâm thu lấy các phần dịch nổi nuôi cấy, đổ vào các đĩa MTP (200µL/giếng), theo các tỷ lệ pha loãng liên tiếp và bổ sung dung dịch cơ chất xylanaza. Mật độ huỳnh quang của các phần dịch nổi nuôi cấy được đo ở bước sóng kích thích 360nm và bước sóng phát xạ 420nm sau 30 phút ủ (Enspire 2300 Multilabel Reader, Perkin Elmer Inc.). *Thermomyces lanuginosus* (X2753) được sử dụng làm chất chuẩn và bổ sung vào các đĩa MTP theo các tỷ lệ pha loãng liên tiếp, bắt đầu từ 25mU/mL. Hoạt tính xylanaza của chủng *Bacillus* được tính toán từ đường chuẩn theo hai thử nghiệm độc lập và biểu diễn theo đơn vị U/mL.

4.3 Phương pháp định lượng proteaza

Cấy chuyển các dịch nuôi cấy *Bacillus* qua đêm (sinh trưởng trên môi trường canh thang bê ở nhiệt độ 37°C) vào hỗn hợp phản ứng chứa cơ chất là fluorescein isothioxyanat - casein (Sigma C3777) và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 3 giờ. Sau khi kết tủa, lượng peptit hòa tan được đo bằng mật độ huỳnh quang ở bước sóng kích thích 497nm, bước sóng phát xạ 515nm. Phương pháp này phát hiện được nhiều proteaza (serin proteaza, aspartic proteaza, cysteine proteaza và kim loại proteaza).

4.4 Phương pháp đánh giá khả năng sản sinh màng sinh học

Chủng *Bacillus* được bổ sung vào môi trường canh thang bê (khoảng 10⁷ CFU/mL), đổ vào các đĩa polypropylen MTP 96 giếng (Conical Btm PP Plt Natural;

NUNC Inc., Denmark) và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ kết hợp không lắc. Quá trình sinh trưởng được kiểm soát bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 620nm. Sự hình thành màng sinh học được đánh giá bằng phương pháp nhuộm với tím tinh thể (Auger et al. 2009). Cụ thể, sau khi rửa các giếng tế bào bằng nước cất, dung dịch tím tinh thể 0,1% (kl/tt) được bổ sung vào các đĩa PP-MTP và các đĩa này được ủ trong 30 phút. Sau đó, quá trình rửa được lặp lại và etanol 96% (thể tích/thể tích) được bổ sung vào các đĩa này. Độ hấp thụ ở bước sóng 570nm được đo sau 15 phút ủ (máy quang phổ Wallac Victor2, Perkin Elmer Inc.). Các chủng *Bacillus* spp. này được phân loại là các chất tạo màng sinh học cao (Độ hấp thụ ở bước sóng 570nm > 2,0), trung bình (Độ hấp thụ ở bước sóng 570nm nằm trong khoảng từ 1,0 đến 2,0) hoặc thấp (Độ hấp thụ ở bước sóng 570nm < 1,0). Thử nghiệm này được lặp lại hai lần.

4.5. Kết quả định lượng enzym

Bảng 5 Sự sản sinh enzym và màng sinh học, RFU = Đơn vị huỳnh quang tương đối (RFU - relative fluorescence unit).

Chủng A = 15510; Chủng B = 15516; Chủng C = 15541; Chủng H = 15536; Chủng I = 15539.

Chủng	Loài	Xenlulaz, mU/ml	Xylanaza, mU/ml	Proteaza, RFU/OD	Màng sinh học
A	<i>B.mojavensis</i>	1734	50	142117	+
B	<i>B.amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens</i>	67	47	599919	+
C	<i>B.subtilis</i>	1037	24	445091	+
D	<i>B. amyloliquefaciens/siamensis related</i>	2196	70	291908	+++
E	<i>B. amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	612	28	381459	+++
F	<i>B. amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens</i>	54	57	400456	+++
G	<i>B. amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	371	71	453158	+++
H	<i>B. amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	631	30	252377	++
I	<i>B. amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	466	121	411206	+++
J	<i>B. amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	469	72	421338	+++

Kết quả trên Bảng 5 cho thấy toàn bộ các chủng E, chủng G, chủng H, chủng I và chủng J đều thuộc loài *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* có hoạt tính xenlulaza mạnh, trong khi đó các chủng B và chủng F thuộc loài *B. amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens* có hoạt tính xenlulaza thấp.

Ví dụ 5

Thử nghiệm trên lợn con

Hai chủng *Bacillus* được chọn (chủng B hoặc chủng C) được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi để đánh giá tác dụng của chúng đến sự phát triển và tỷ lệ chết của các lợn con sau cai sữa. Do *E.coli* là một trong các tác nhân gây bệnh chủ yếu trong giai đoạn lợn sữa có ảnh hưởng lớn đến các thông số năng suất và tỷ lệ lợn chết, nên các thử nghiệm này có thể cung cấp thông tin về tác dụng ức chế *E.coli* ở lợn con. Các thử nghiệm được thực hiện ở hai địa điểm khác nhau; địa điểm 1 là tại trang trại và địa điểm 2 là ở viện chăn nuôi. Các điều kiện thử nghiệm là giống nhau ở cả hai địa điểm.

Bảng 6

Các địa điểm được sử dụng trong thử nghiệm trên lợn con

	Tổng số lợn	Số chuồng lặp lại	Trọng lượng	Ngày thử nghiệm
Địa điểm 1	576	96	28, 35, 42, 63	35
Địa điểm 2	720	24	28, 35, 49, 63	35

5.1.1 Thực hiện thử nghiệm ở địa điểm 1

Vào ngày cai sữa, 576 lợn con (28 ngày tuổi) từ hai đợt cai sữa liên tiếp (288 lợn con mỗi đợt), từ trang trại thử nghiệm, được sử dụng. Các con lợn con thử nghiệm là các con lai nội dòng (ACMC x Pietrain). Các lợn con được chọn đều khỏe mạnh và không được tiêm chủng trong giai đoạn bú sữa. Trang trại thử nghiệm là dương tính với hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive & Respiratory Syndrome - PRRS), nhưng được kiểm soát, và có một số vấn đề nhiễm trùng ở giai đoạn sau cai sữa. Các lợn con được phân chia theo trọng lượng và sau đó nhốt vào 48 chuồng ở cả hai đợt cai sữa (tổng cộng 96 chuồng) sao cho mỗi chuồng chứa 6 lợn con, 3 lợn đực và 3 lợn cái, có trọng lượng tương đương ở cả hai thử nghiệm. Các đợt điều trị được thực hiện với các chuồng chứa các con lợn con có trọng lượng lớn và các con lợn có trọng lượng nhẹ theo từng khu, sao cho mỗi đợt điều trị được thực hiện với 24 chuồng gồm 6 lợn con (6 chuồng mỗi khu và mỗi đợt điều trị; 12 chuồng mỗi đợt cai sữa và mỗi đợt điều trị). Các chế phẩm *Bacillus* được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi ở hàm lượng 400g/tấn thức ăn chăn nuôi hoặc $1,28 \times 10^7$ CFU g/thức ăn chăn nuôi.

Các lợn được cân riêng ở 28 ngày (ngày 0 là ngày cai sữa), 35 ngày, 42 ngày và 63 ngày tuổi để tính toán trọng lượng tăng hàng ngày (average daily weight gain - ADWG). Lượng thức ăn được tiêu thụ hàng ngày và tỷ lệ giữa lượng thức ăn tiêu thụ và trọng lượng tăng được đo ở cùng các giai đoạn (28 đến 35 ngày; 35 đến 42 ngày; 42 đến 63 ngày) và trong các giai đoạn chính (trước cai sữa: 28 đến 42 ngày tuổi; bắt đầu cai sữa: 42 đến 63 ngày tuổi; và tổng thời gian cai sữa). Tỷ lệ lợn chết và tỷ lệ lợn mắc bệnh được kiểm soát hàng ngày, bao gồm cả phương pháp điều trị bằng kháng sinh.

Bảng 7

Các thông số thử nghiệm ở địa điểm 1.

Các trị số P so với đối chứng (A: $P \leq 0,1$; a $\leq 0,05$)

Chủng B = 15516; Chủng C = 15541

SE = Độ lệch chuẩn

	Trọng lượng, (kg)		28 đến 42 ngày tuổi (14 ngày thử nghiệm)			42 đến 63 ngày tuổi			Tổng số (28 đến 63 ngày)		
	28 ngày	63 ngày	ADG	ADFI	FCR	ADG	ADFI	FCR	ADG	ADFI	FCR
Đối chứng	7,7	20,7	179	254	1,43	493	697	1,42	371	522	1,40
Chủng B	7,7	21,1	196 ^A	264	1,37 ^A	513	723 ^A	1,41	383	535	1,40
Chủng C	7,8	21,0	199 ^a	267 ^A	1,37 ^A	501	710	1,42	380	532	1,40
SE	0,150	0,254	0,007	0,006	0,024	0,010	0,010	0,008	0,007	0,007	0,009

5.1.2 Kết quả thử nghiệm

Cả hai chủng *Bacillus* được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi đã cải thiện đặc tính sinh sản của lợn so với nhóm đối chứng âm, mà không có sự khác biệt giữa chúng. Cả ADG lẫn FU đều đã tăng đáng kể ở giai đoạn sau cai sữa (28 đến 42 ngày tuổi). Tỷ lệ phần trăm lợn chết đã giảm ở cả hai nhóm *Bacillus* (Tỷ lệ lợn chết: Đối chứng (3,47%), Chủng B (1,39%), Chủng C (2,08%))

5.2.1 Thực hiện thử nghiệm ở địa điểm 2

Ngay sau khi cai sữa, toàn bộ các lợn con được chọn được nhốt vào khu cai sữa gồm 24 chuồng với ba mươi con lợn mỗi chuồng. Khu cai sữa được trang bị hệ thống sưởi ấm trung tâm và thông gió cưỡng bức với hệ thống làm mát và sàn hoàn toàn làm bằng gạch. Mỗi chuồng được trang bị máng cung cấp thức ăn ướt - khô hai mặt để đảm bảo phân phối thức ăn và nước uống đầy đủ cho ba con lợn cùng một lúc. Thức ăn đã được phân phối đầy đủ do trong toàn bộ giai đoạn thử nghiệm.

Tổng số 720 lợn con lai cai sữa [Pietrain x (Landrace x Large White)] được sử dụng. Các con lợn được thu gom từ cùng trang trại vào ngày cai sữa và chuyển đến các cơ sở thử nghiệm (không vận chuyển). Các lợn con đực và lợn con cái 26 ngày tuổi có trọng lượng bằng 7,0kg (SD =1,64kg thể trọng) được sử dụng. Thẻ đánh dấu với số thứ tự lợn được sử dụng. Các con lợn được nhốt vào 3 khu theo trọng lượng ban đầu. Bên trong mỗi khu, các lợn con được nhốt vào chuồng để phân bố trọng lượng cân bằng. Do đó, mỗi khu gồm 8 chuồng mỗi chuồng 30 con lợn để khẩu phần thức ăn thử nghiệm được phân phối ngẫu nhiên.

Thử nghiệm bắt đầu lúc cai sữa ở 28 ngày tuổi. Các con lợn được cân riêng vào ngày 0 và ngày 7 và cân theo nhóm vào ngày 21 và ngày 35 thử nghiệm. Lượng thức ăn được tiêu thụ khỏi mỗi máng ăn được đo trong thử nghiệm. Do đó, lượng thức ăn được tiêu thụ hàng ngày (Average daily feed intake - ADFI), trọng lượng tăng hàng ngày (average daily gain - ADG) và tỷ lệ giữa lượng thức ăn tiêu thụ và trọng lượng tăng (feed:gain ratio - FCR) theo tổng lượng thức ăn tiêu thụ được tính toán. Tình trạng sức khỏe của lợn con được đánh giá thường xuyên và dấu hiệu bất thường hoặc thuốc được sử dụng bất kỳ được ghi lại. Tỷ lệ lợn chết và tỷ lệ phần trăm sống sót cũng được tính.

Bảng 8

Các thông số thử nghiệm ở địa điểm 2

Trị số bình phương cực tiểu, các trị số P so với đối chứng (A: $P \leq 0,1$)

Chủng B = 15516; Chủng C = 15541

	28 đến 35 ngày tuổi			49-63 ngày tuổi			Tổng số (28 đến 63 ngày)		
	ADG	ADFI	FCR	ADG	ADFI	FCR	ADG	ADFI	FCR
Đối chứng	73,8	157	2,26	345	602	1,76	227	388	1,72
Chủng B	80,9	174	2,26	375 ^A	584	1,58 ^A	235	383	1,64
Chủng C	87,1	166	1,96	379	586	1,60	232	389	1,69
SE	0,010	0,008	0,0002	0,019	0,025	0,0001	0,0091	0,0066	0,00065

5.2.2 Kết quả thử nghiệm

Cả hai chủng *Bacillus* được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi đã cải thiện đặc tính sinh sản của lợn so với nhóm đối chứng âm, và không có sự khác biệt giữa chúng. Cả ADG lẫn FU đều đã tăng đáng kể trong giai đoạn thử nghiệm.

Số lượng lợn cần điều trị trong mỗi chuồng bằng Enrofloxacin để khắc phục tình trạng tiêu chảy nặng là cao hơn đáng kể ($P > 0,05$) ở nhóm lợn được cho ăn thức ăn đối chứng so với nhóm lợn được cho ăn *Bacillus* trong tuần đầu tiên sau cai sữa. Các kết quả tương tự ($P < 0,05$) được quan sát trong toàn bộ giai đoạn thử nghiệm (0 ngày đến 35 ngày sau cai sữa). Tỷ lệ phần trăm lợn chết đã giảm ở cả hai nhóm *Bacillus* (Tỷ lệ lợn chết: Đối chứng (4,17%), Chủng B (0,04%), Chủng C (2,65%))

Tài liệu tham khảo

Barbosa et al., 2005, Screening for *Bacillus* Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract, Applied and Environmental Microbiology, 968-978

Benitez et al., 2011, Antimicrobial Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is enhanced in the Presence of Escherichia Coli, Curr Microbiol 62, 1017-1022

Chaiyawan et al., 2010, Characterization and probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from broiler, The Thai Journal of Veterinary Medicine, 40, 2, 207-214

Cutting, S. M. 2011. *Bacillus* probiotics. Food Microbiology 28 (2):214-20.

EFSA 2008. Technical Guidance. Update of antibiotic resistance criteria. The EFSA Journal 732, 9-15

Guo et al, 2006, Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subse-

quent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs, Antonie van Leeuwenhoek 90:139-146

Klose et al., 2010. In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. Vet. Microbiology 144: 515-521.

López, D., and R. Kolter. 2010. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Rev. 34(2): 134-149.

Spiehs, M. J., G. C. Shurson, and L. J. Johnston. 2008. Effects of two direct-fed microbial on the ability of pigs to resist an infection with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. Journal of Swine Health and Production. 16(1): 27-36.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Bacillus* được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) chủng *Bacillus mojavensis* CHCC 15510 có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 25839;

(b) chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15516 có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 25840, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15536 có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 27032, và chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15539 có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 27033; và

(c) chủng *Bacillus subtilis* CHCC 15541 có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 25841; và chủng đột biến của các chủng (a), chủng (b) hoặc chủng (c), khác biệt ở chỗ chủng này có:

(i) tính miễn cảm với ampicilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin và cloramphenicol;

(ii) ức chế sinh trưởng của *E. coli* và *Clostridium perfringens*; và

(iii) tỷ lệ tạo bào tử bằng ít nhất 80% khi được đo sau 2 ngày ủ.

2. Phương pháp chọn lọc chủng *Bacillus* có:

(i) tính miễn cảm với ampicilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin và cloramphenicol;

(ii) ức chế sinh trưởng của *E. coli* và *Clostridium perfringens*; và

(iii) tỷ lệ tạo bào tử bằng ít nhất 80% khi được đo sau 2 ngày ủ,

phương pháp này bao gồm các bước sau:

(i) chọn lọc và phân lập chủng *Bacillus* có tính miễn cảm với ampicilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin và cloramphenicol, từ nguồn chứa các chủng *Bacillus*;

(ii) chọn lọc và phân lập chủng *Bacillus* ức chế sinh trưởng của *E. coli* và *Clostridium perfringens*, từ nguồn chứa các chủng *Bacillus*;

(iii) chọn lọc và phân lập chủng *Bacillus* có tỷ lệ tạo bào tử ít nhất bằng 80% khi được đo sau 2 ngày ủ, từ nguồn chứa các chủng *Bacillus*;

(iv) đánh giá nguồn chứa các chủng *Bacillus* về tính miễn cảm của tế bào sinh dưỡng ở độ pH = 4, và

(v) đánh giá nguồn chứa các chủng *Bacillus* về tính kháng muối mật.

3. Phương pháp thu nhận chủng đột biến của:

(a) chủng *Bacillus mojavensis* CHCC 15510 có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 25839;

(b) chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15516 có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 25840, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15536 có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 27032, hoặc chủng *Bacillus amyloliquefaciens* CHCC 15539 có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 27033; hoặc

(c) chủng *Bacillus subtilis* CHCC 15541 có số đăng ký tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Cộng hòa liên bang Đức là DSM 25841;

phương pháp này bao gồm các bước gây đột biến chủng vi khuẩn (a), chủng vi khuẩn (b) hoặc chủng vi khuẩn (c), và chọn lọc chủng đột biến của chủng vi khuẩn (a), chủng vi khuẩn (b) hoặc chủng vi khuẩn (c) có các đặc tính sau:

(i) tính miễn cảm với ampicilin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin và cloramphenicol;

(ii) ức chế sinh trưởng của *E. coli* và *Clostridium perfringens*, và

(iii) tỷ lệ tạo bào tử bằng ít nhất 80% khi được đo sau 2 ngày ủ.

4. Chế phẩm *Bacillus* chứa các tế bào của ít nhất một chủng *Bacillus* theo điểm 1.
5. Chế phẩm *Bacillus* theo điểm 4, trong đó chế phẩm này chứa các tế bào của ít nhất hai chủng *Bacillus* theo điểm 1.
6. Chế phẩm *Bacillus* theo điểm 4 hoặc 5, trong đó chế phẩm này chứa các tế bào của ít nhất ba chủng *Bacillus* theo điểm 1.
7. Chế phẩm *Bacillus* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 6, trong đó các tế bào của chủng *Bacillus* hoặc các chủng này ở dạng bào tử.
8. Phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi bao gồm bước bổ sung chế phẩm *Bacillus* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 7 vào thức ăn chăn nuôi.
9. Phương pháp sản xuất hỗn hợp thức ăn sơ chế bao gồm bước bổ sung chế phẩm *Bacillus* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 7 vào chất mang.
10. Phương pháp chăn nuôi động vật bao gồm bước cho động vật này sử dụng chế phẩm *Bacillus* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 7 hoặc thức ăn chăn nuôi được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 8 hoặc hỗn hợp thức ăn sơ chế được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 9.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó động vật này được chọn từ nhóm bao gồm gia cầm, gia súc, bê, lợn, thỏ, ngựa, cá và vật nuôi.

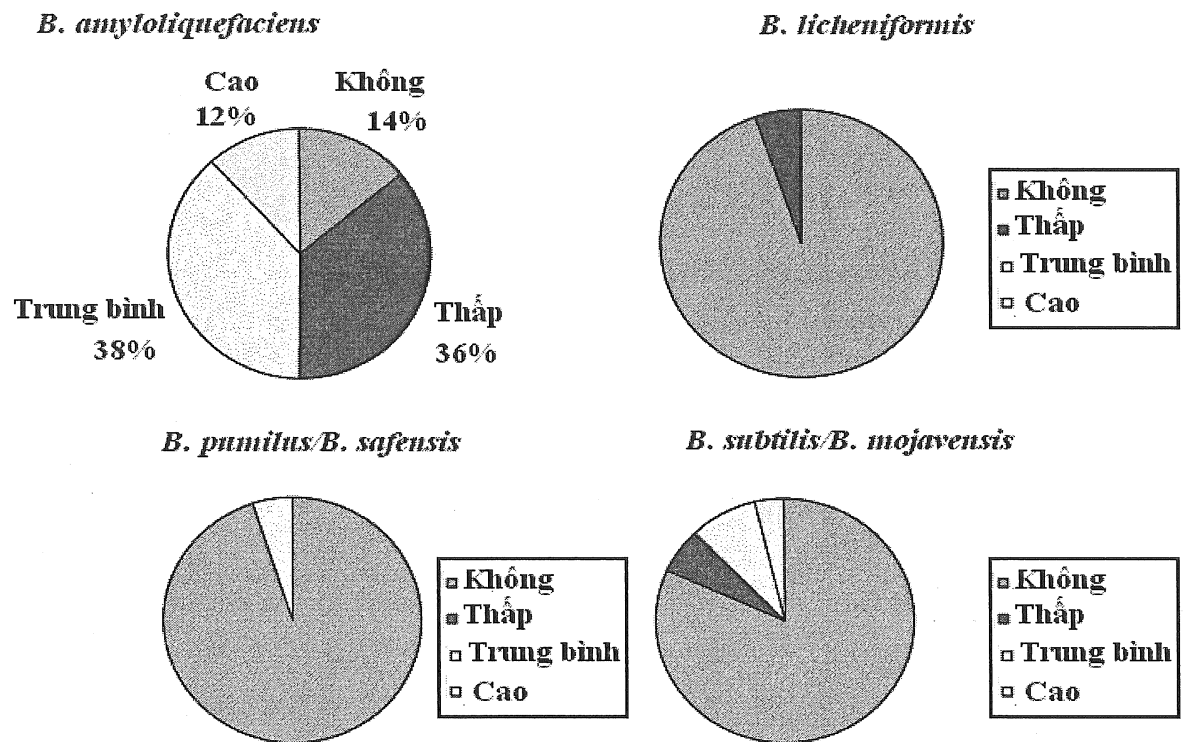


Fig.1