



(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)



1-0024131

(51)⁷ C12R 1/07; A23L 1/03; A61K 35/74

(13) B

(21) 1-2013-03030

(22) 28/02/2012

(86) PCT/US2012/026999 28/02/2012

(87) WO2012/118845A1 07/09/2012

(30) 61/447,703 01/03/2011 US; 13/406,202 27/02/2012 US

(45) 25/06/2020 387

(43) 27/01/2014 310A

(73) MYGALAXY Limited Company (US)

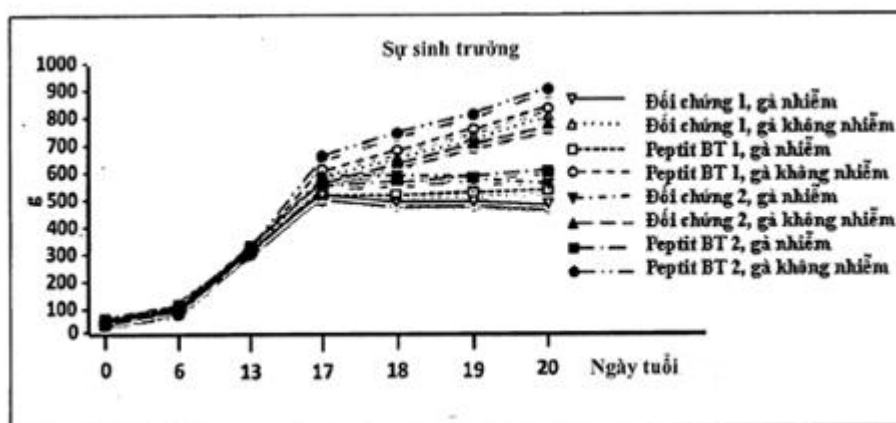
3801 Mattison Avenue, #B Fort Worth, Texas 76107, United States of America

(72) JIANG, Yiwei (US).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)

(54) CHỦNG BREVIBACILLUS TEXASPORUS KHÔNG TẠO BÀO TỬ VÀ PHƯƠNG PHÁP LÀM BẤT HOẠT CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng B. texasporus không tạo bào tử. Cụ thể, thức ăn và các dạng sản phẩm dùng theo đường miệng khác hoặc cách thức trị liệu chứa chủng B. texasporus không tạo bào tử mà khi được đưa vào cơ thể đối tượng có thể ức chế hoặc làm giảm số lượng vi sinh vật gây bệnh trong đối tượng và cải thiện sức khỏe của đối tượng. Ngoài ra sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm bất hoạt chủng B. texasporus không tạo bào tử này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể hơn sáng chế đề cập đến chủng *Brevibacillus texasporus* nhạy cảm với áp lực môi trường hoặc không tạo bào tử, phương pháp bất hoạt tế bào chủng sinh vật *B. texasporus* có hiệu quả với chi phí thấp, và phụ gia thực phẩm hoặc nước uống thu được từ chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các động vật khoẻ mạnh hoặc động vật không bị nhiễm sinh vật gây bệnh, như vi khuẩn gây bệnh, sinh trưởng nhanh hơn và tăng trọng tốt hơn trên mỗi kilogam thức ăn. Kết quả là, các hợp chất kháng khuẩn đã được sử dụng làm chất kích thích sinh trưởng ở các trang trại vật nuôi từ những năm 1940. Thông thường, các hợp chất kháng khuẩn được đưa vào cơ thể qua thức ăn ở liều thấp hoặc dưới mức có tác dụng điều trị bệnh.

Trong khi liều dưới mức có tác dụng điều trị bệnh các hợp chất kháng khuẩn đã được dùng từ lâu để giúp động vật trang trại giữ trạng thái khoẻ mạnh và sinh trưởng nhanh hơn, các báo cáo gần đây đã chỉ ra mối liên quan giữa việc sử dụng kháng sinh và sự có mặt các chủng vi khuẩn kháng thuốc trong sản phẩm thịt từ các động vật này. Kết quả là Ủy ban châu Âu (European Commission – EC), Bộ Nông nghiệp Mỹ (U.S. Department of Agriculture – USDA) cũng như Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ (U.S. Food and Drug Administration – FDA) đưa ra các lệnh cấm và hướng dẫn về việc sử dụng một số loại kháng sinh nhất định làm chất kích thích sinh trưởng. Hiện nay, các thông tư hướng dẫn chủ yếu tập trung vào việc sử dụng các loại kháng sinh tương tự hoặc giống với các loại kháng sinh được dùng để điều trị bệnh ở người. Tuy nhiên, đã có sự phản đối ngày càng tăng đối với việc sử dụng tất cả các loại

thuốc kháng sinh nói chung để kích thích sự sinh trưởng ở vật nuôi trang trại. Ngoài ra, thị trường cho loại thịt từ động vật được nuôi theo quy trình hữu cơ đang tăng lên và để được chứng nhận là được nuôi theo quy trình hữu cơ, thịt ở Mỹ phải được thu từ động vật được nuôi không dùng kháng sinh. Kết quả là cần có dạng thuốc kích thích sinh trưởng mới cho thức ăn cho vật nuôi trang trại.

Ngoài ra, thị trường chăm sóc sức khỏe vật nuôi trong nhà đang tăng trưởng rất nhanh. Việc duy trì tình trạng sức khỏe cho vật nuôi trong nhà (ví dụ, vật nuôi trong nhà đã già) bằng cách kích thích hệ miễn dịch bẩm sinh là một hướng phát triển hấp dẫn trong việc duy trì tình trạng sức khỏe cho vật nuôi trong nhà và chất kích thích miễn dịch dùng theo đường miệng sẽ được đánh giá cao.

Brevibacillus texasporus (BT) (ví dụ, ATCC PTA-5854) là chủng vi khuẩn trong đất mới được xác định gần đây mà tạo ra nhóm các peptit NRPS cation (xem, WO 2005/074626 và WU và các đồng tác giả, 2005). Các peptit cation từ BT thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn phổ rộng *in vitro*, tiêu diệt vi khuẩn gram âm và gram dương, nấm và động vật nguyên sinh (WO 2005/074626).

Mặc dù có hoạt tính kháng vi khuẩn *in vitro*, các peptit BT có vẻ như thiếu hoạt tính kháng khuẩn *in vivo*. Cầu tràng khuẩn kháng vancomycin rất nhạy cảm với các peptit BT *in vitro*. Tuy nhiên, các peptit BT ở nồng độ cao hơn nhiều so với nồng độ ức chế tối thiểu lại không loại bỏ được VRE hội sinh trong đường dạ dày - ruột chuột.

Tuy nhiên, một peptit phân lập được đã thể hiện hoạt tính kháng bệnh trực khuẩn coli và bệnh vi khuẩn xanmon ở gà khi được dùng làm chất phụ gia thức ăn. Thêm vào đó, peptit phân lập được này cũng thể hiện là có hoạt tính trong việc kích thích sinh trưởng và làm tăng sự chuyển hoá thức ăn ở gà.

Có thể quan trọng hơn nữa là, hoạt tính *in vivo* của các peptit BT có vẻ như không phụ thuộc vào hoạt tính kháng sinh *in vitro* của chúng, vì chúng kháng có hiệu quả sự nhiễm khuẩn *E. coli* và *Salmonella* ở gà ở nồng độ thấp

hơn nồng độ ức chế tối thiểu *in vitro* của chúng (JIANG và các đồng tác giả 2005; KOGUT và các đồng tác giả 2007; KOGUT và các đồng tác giả 2010). Cũng nhận thấy rằng bạch cầu trung tính và bạch cầu đơn nhân trong máu là các đối tượng được hoạt hoá chính ở gà được cho ăn các peptit BT, việc này chỉ ra rằng có vẻ như phương thức hoạt động của chúng là kích thích miễn dịch bẩm sinh. Các tính chất này khiến cho các peptit BT là dạng chất phụ gia thức ăn và chất thay thế cho các hợp chất kháng sinh lý tưởng trong việc nuôi động vật trang trại.

Ngoài ra, đã biết rằng miễn dịch bẩm sinh đóng vai trò chủ chốt trong việc không chế sự nhiễm virus và nấm, cũng như trong việc kháng các bệnh không truyền nhiễm như béo phì/ hội chứng chuyển hoá và bệnh đái tháo đường typ 2 (VIJAY-KUMAR và các đồng tác giả 2010), chất điều biến miễn dịch bẩm sinh BT cũng có thể có ứng dụng quan trọng trong các lĩnh vực điều trị bệnh này.

Tuy nhiên, giá trị kinh tế của các peptit BT làm phụ gia thức ăn bị hạn chế đáng kể vì cần phải phân lập được peptit, việc này làm tăng chi phí sản xuất tới mức mà việc sản xuất này trở nên không có giá trị sản xuất trong thực tiễn. Để thay thế cho việc tinh chế peptit, có thể sử dụng sinh vật nguyên (PTA-5854), như được bộc lộ trong công bố patent quốc tế số WO 2005/074626, có thể được sử dụng trực tiếp để sản xuất chất phụ gia thức ăn.

Thông thường, chủng vi khuẩn được cho ăn trực tiếp (direct-fed microbial – DFM) hoặc chủng probiotic cần phải tới được đường ruột ở dạng còn hoạt động và với số lượng đủ, việc này đòi hỏi chủng này phải sống sót qua quá trình ăn vào và quá trình tiêu hoá (xem, patent Mỹ số 5480641 và công bố đơn patent Mỹ số U.S 20040247568). Do việc tạo hạt thức ăn thường cần dùng nhiệt đủ để làm giảm đáng kể sức sống, phần lớn các chủng probiotic được chọn dựa trên khả năng kháng nhiệt độ và độ pH có trong dạ dày. Hiện nay, các chủng probiotic ổn định nhất là bào tử *Bacillus*, do bào tử vi khuẩn kháng nhiệt độ và giữ được sức sống cao trong quá trình lưu giữ trong thời gian dài.

Tuy nhiên, do sinh vật BT được cho là không phải sinh vật cộng sinh thường được tìm thấy trong đường ruột của vật nuôi trang trại, cần phải/muốn bất hoạt sinh vật này trước khi sử dụng. Tuy nhiên, ở các chủng tạo bào tử, việc này rất khó khăn. Thêm vào đó, ít nhất một cơ quan chức năng chính phủ đã xem xét đến chỉ tiêu sau đây khi đánh giá các loại thức ăn mới có liên quan đến nguồn vi khuẩn: độ an toàn trong việc sản xuất vi sinh vật; độ an toàn của sản phẩm vi sinh đó đối với người, động vật và môi trường; tác động tiềm tàng của việc chuyển gen ngang; sự tương tác với hệ vi khuẩn có sẵn trong dạ dày - ruột; khả năng tồn tại trong ruột; tác động tiềm tàng tới con người và môi trường khi vi sinh vật sống bị lọt ra ngoài, cụ thể là cần xem xét tới các tác động tới sức khoẻ do sự nhiễm khuẩn vào thịt (Directive on Guidelines for the Assessment of Novel Feeds: Microbial Sources, Draft - June 2007, The Canadian Food Inspection Agency). Vì vậy, khi sử dụng vi sinh vật làm chất phụ gia thức ăn, có hai kết quả mong muốn thu được mâu thuẫn nhau. Đầu tiên là sự duy trì sinh vật đó ở trình trạng hoạt động qua suốt quá trình chế biến và quá trình tiêu hoá; và mong muốn thứ hai hoàn toàn mâu thuẫn với điều này là cần phải bất hoạt hoàn toàn hoặc gần như hoàn toàn sinh vật đó mà không làm bất hoạt peptit hoạt tính. Lợi ích của việc bất hoạt đó là nó loại bỏ hoặc làm giảm nguy cơ của việc chuyển gen ngang giữa *B. texasporus* và các vi sinh vật trong ruột vào ngoài môi trường; loại trừ hoặc giới hạn sự tương tác tiềm tàng của nó với hệ sinh vật có sẵn trong dạ dày - ruột (gastrointestinal – GI); loại trừ hoặc làm giảm nguy cơ tiềm tàng đối với con người và môi trường do tế bào hoạt động lọt ra ngoài; và/hoặc loại trừ hoặc làm giảm sự nhiễm khuẩn thịt thu được từ các động vật được nuôi bằng thức ăn này. Do đó, sự tạo bào tử liên tục của PTA-5854 đã giới hạn nghiêm trọng khả năng dùng chủng này làm DFM, do bào tử kháng mạnh mẽ gần như tất cả các phương pháp được dùng để bất hoạt tế bào sinh dưỡng, đòi hỏi phải dùng các phương pháp mạnh và đắt tiền để loại bỏ chúng.

Kết quả là, trong lĩnh vực này, cần phải có chủng *Brevibacillus texasporus* mà có có thể được dùng làm DFM bất hoạt một cách hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng *B. texasporus* không tạo bào tử, trong đó chủng là MYG11 (PTA-12310), MYG107 (PTA-12309), MYG110 (PTA-12308) hoặc MYG 113 (PTA-12307).

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp làm bất hoạt chủng *B. texasporus* không tạo bào tử, gồm cho canh trường chứa tế bào *B. texasporus* tiếp xúc với áp lực đủ để làm bất hoạt tế bào.

Sáng chế cũng đề cập đến chủng *B. texasporus* không tạo bào tử dùng trong việc ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ở động vật.

Sáng chế đề cập đến chất phụ gia dạng thức ăn hoặc nước uống chứa tế bào bất hoạt hoặc canh trường chứa bất hoạt chủng vi khuẩn *B. texasporus* không tạo bào tử. Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng tế bào hoặc canh trường khô bất hoạt (ví dụ, tế bào hoặc canh trường được làm khô lạnh hoặc sấy phun) theo sáng chế mà có thể được bổ sung vào thức ăn hoặc nước uống cho một hoặc nhiều loài động vật, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gia cầm, thú nuôi, gia súc, lợn, gà, ngựa, gà tây, cừu, dê, vịt, chim cút, gà mái tơ Cornish, bò câu, cá nuôi, cua, tôm, rùa nước ngọt, chó và mèo. Ví dụ, tế bào hoặc canh trường chủng *B. texasporus* không tạo bào tử có thể được bất hoạt bằng cách thanh trùng, không cung cấp chất dinh dưỡng, thay đổi nhiệt độ (làm nóng, làm lạnh hoặc đông lạnh), loại nước (ví dụ, làm khô nhiệt, làm lạnh khô, sấy phun, phơi khô, thổi khô hoặc hút khô), axit hoá, kiềm hoá, dùng rượu, dùng chất tẩy, dùng lysozym, dùng lực cơ học, dùng cation amoni hoá trị bốn, dùng tác nhân oxy hoá (ví dụ, clo oxit, hydro peroxit, hypochlorite hoặc ozon) và/hoặc chiếu xạ (ví dụ, UV, tia X hoặc tia gama), tế bào hoặc canh trường bất hoạt này sau đó có thể được bổ sung vào nước uống hoặc thức ăn cho động vật, như thức ăn từ ngũ cốc, ví dụ, thức ăn chứa ít nhất một loại ngũ cốc được chọn từ nhóm bao gồm lúa mạch, đậu nành, lúa mì, tiểu hắc mạch, lúa mạch đen, ngô và hỗn hợp của chúng. Thực tế, đối tượng này của sáng chế có thể được thêm vào nhiều loại thức ăn khác nhau. Tế bào bất hoạt theo sáng chế hoặc peptit phân lập được có

thể được trộn vào nước uống hoặc thức ăn cho động vật được chọn từ nhóm bao gồm chất thay thế sữa, thức ăn thúc đẩy sinh trưởng, thức ăn hoàn thiện, thức ăn trước tập ăn, thức ăn tập ăn, nước và hỗn hợp của chúng.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp làm tăng sự tăng thể trọng và chuyển hoá thức ăn ở động vật trang trại và vật nuôi trong nhà, bằng cách bất hoạt (ví dụ, xử lý nhiệt hoặc loại nước) tế bào hoặc canh trường tế bào *B. texasporus* không tạo bào tử và đưa tế bào hoặc canh trường chứa môi trường và tế bào *B. texasporus* không tạo bào tử bất hoạt này vào cơ thể động vật với lượng đủ để làm tăng sự sinh trưởng. Tuy chọn, lượng hiệu quả tế bào môi trường canh trường chứa tế bào *B. texasporus* không tạo bào tử này có thể được làm khô (loại nước) và/hoặc tạo hạt (một dạng xử lý nhiệt) thành thức ăn vật nuôi hoặc được thêm vào nước uống.

Ví dụ về nguyên liệu thức ăn cũng bao gồm ngũ cốc, thức ăn từ đậu nành, protein đậu nành phân lập được, dầu đậu nành phân lập được, chất béo đậu nành phân lập được, sữa tách béo, thức ăn từ cá, thức ăn từ thịt, thức ăn từ xương, thức ăn từ máu, protein huyết thanh máu, nước sữa, cám gạo, cám lúa mì và có thể còn bao gồm chất tạo ngọt, chất khoáng, vitamin, muối và cở.

Theo một phương án ví dụ, tế bào *B. texasporus* không tạo bào tử được nuôi cấy trong môi trường chứa huyền phù nguyên liệu thức ăn (như bột ngô và bột đậu nành). Canh trường này sau đó có thể được xử lý bất hoạt tế bào và/hoặc làm khô/loại nước để tạo ra chất phụ gia thức ăn (trong đó các hạt trong canh trường hoạt động như chất mang đối với các peptit BT) hoặc thức ăn bổ sung.

Sáng chế cũng đề cập tới phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị sự nhiễm khuẩn ở động vật, bằng cách cho động vật dùng tế bào hoặc canh trường *B. texasporus* không tạo bào tử bất hoạt với lượng hữu hiệu để điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự nhiễm khuẩn ở động vật.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp làm tăng sự tăng thể trọng và chuyển hoá thức ăn ở động vật đang lớn, bằng cách cho chúng dùng tế bào hoặc

canh trường *B. texasporus* không tạo bào tử bất hoạt với lượng hữu hiệu để điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự nhiễm khuẩn ở động vật.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng tế bào không tạo bào tử này làm chất phụ gia thực phẩm hoặc đồ uống cho người.

Theo một phương án ví dụ, sáng chế đề cập đến chủng không tạo bào tử của *B. texasporus* có tỷ lệ sống sót thấp hơn khoảng $3,5 \times 10^{-3}$, thấp hơn khoảng 1×10^{-4} , thấp hơn khoảng 1×10^{-5} , thấp hơn khoảng 1×10^{-6} , thấp hơn khoảng 1×10^{-7} , thấp hơn khoảng 1×10^{-8} , hoặc thấp hơn khoảng 1×10^{-9} , tỷ lệ sống sót này có thể được xác định bằng cách cho canh trường chịu nhiệt độ khoảng 50°C trong khoảng thời gian 5 phút và xác định tỷ lệ sống sót hoặc khả năng tạo khuẩn lạc.

Theo một phương án ví dụ, chủng *B. texasporus* không tạo bào tử cũng thể hiện sức sống giảm, như tỷ lệ sống sót thấp hơn khoảng 1×10^{-9} , khi canh trường được xử lý bất hoạt, như không cung cấp chất dinh dưỡng, đông lạnh (mà không có lượng hữu hiệu chất bảo vệ bảo quản lạnh (cryoprotectant), loại nước (bằng cách hút nhanh ở nhiệt độ 23°C), tạo độ pH khắc nghiệt (ví dụ, độ pH=1,0 hoặc độ pH=13,0), dùng butanol bão hòa, bổ sung chất tẩy (ví dụ, 1% SDS) hoặc tác nhân dung giải (ví dụ, lysozym), siêu âm, dùng lực cơ học (ví dụ, bộ phận ép trong thiết bị tạo hạt thức ăn động vật) hoặc dùng hydro peroxit (ví dụ, nhiều hơn hoặc bằng 1% H₂O₂).

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp làm tăng sản lượng peptit BT trong chế phẩm *B. texasporus* bằng cách dùng tế bào thu được từ chủng *B. texasporus* không tạo bào tử. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp làm tăng sự ổn định và hiệu quả kinh tế của các peptit BT trong chế phẩm *B. texasporus* bằng cách dùng tế bào thu được từ chủng *B. texasporus* không tạo bào tử mà không phân lập hoặc tinh chế peptit BT.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào *B. texasporus* dạng bột, trong đó bột này về cơ bản là không chứa bào tử. Theo một phương án ví dụ, canh trường *B.*

texasporus không tạo bào tử được nuôi cấy trong môi trường lỏng tới khi thu được mật độ tế bào đủ và canh trường được loại nước hoặc sấy để tạo thành dạng bột về cơ bản là không chứa bào tử. Bột này sau đó có thể được hoà vào nước hoặc trộn vào nguyên liệu sản xuất thức ăn để tạo ra thức ăn hoặc nước uống được tăng cường cho động vật mà không chứa lượng đáng kể bào tử sống của vi khuẩn *B. texasporus*.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp loại bỏ hoặc tẩy trùng tế bào *B. texasporus* khỏi thiết bị và/hoặc hệ thống được dùng để sản xuất *B. texasporus* bao gồm bước xử lý thiết bị và/hoặc hệ thống này để bất hoạt hoặc tiêu diệt chủng *B. texasporus* không tạo bào tử, sau đó tế bào có thể được rửa trôi đi một cách đơn giản. Ví dụ, hơi hoặc nước ở nhiệt độ cao có thể được dùng để rửa các thiết bị và/hoặc hệ thống này, trong đó nước sẽ vừa loại bỏ tế bào vừa tiêu diệt chúng (do nhiệt độ cao), qua đó loại bỏ hiệu quả tế bào *B. texasporus* khỏi thiết bị và/hoặc hệ thống này.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kích thích hệ miễn dịch ở động vật hoặc người, bao gồm bước đưa vào cơ thể động vật hoặc người lượng hữu hiệu chủng *B. texasporus* không tạo bào tử. Ví dụ, chủng *B. texasporus* không tạo bào tử có thể được nuôi cấy, tế bào có thể được thu cùng hoặc không cùng với môi trường nuôi cấy và tế bào thu được có thể được trộn với nước hoặc nguyên liệu thức ăn bổ sung để tạo ra thức ăn hoặc nước uống tăng cường mà kích thích hệ miễn dịch ở động vật được cấp thức ăn hoặc nước uống này. Ví dụ, chủng *B. texasporus* không tạo bào tử có thể được bất hoạt và cho động vật hoặc người ăn trực tiếp để kích thích hệ miễn dịch ở động vật hoặc người. Theo một phương án ví dụ khác, sáng chế đề cập đến thức ăn tăng cường kích thích hệ miễn dịch ở động vật hoặc người bằng cách đưa vào cơ thể động vật hoặc người lượng hữu hiệu chủng *B. texasporus* không tạo bào tử và chất mang thực phẩm.

Chủng *B. texasporus* không tạo bào tử có thể được nuôi cấy và trộn với nước hoặc nguyên liệu thức ăn để tạo ra thức ăn hoặc đồ uống tăng cường kích thích hệ miễn dịch, ví dụ, nó có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch với vaccin

được đưa vào cơ thể động vật hoặc người kết hợp với thức ăn hoặc đồ uống tăng cường hoặc sau khi thức ăn hoặc nước uống tăng cường được dùng. Ngoài ra, chủng *B. texasporus* không tạo bào tử có thể được bất hoạt và cho động vật hoặc người ăn, ví dụ, tế bào bất hoạt có thể được sấy, chuyển đến địa điểm xử lý và/hoặc địa điểm đưa vào cơ thể và trộn với thức ăn hoặc nước uống mà sẽ được người hoặc động vật dùng, trong đó thức ăn hoặc nước uống không chứa bào tử sống của chủng *B. texasporus*.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm kích thích hệ miễn dịch động vật, bao gồm người, bằng cách đưa vào cơ thể động vật lượng hiệu quả chủng *B. texasporus* không tạo bào tử kết hợp với một hoặc nhiều vaccin. Ví dụ, chủng không tạo bào tử có thể được nuôi cấy, tế bào được thu (cùng hoặc không cùng với môi trường nuôi cấy, ví dụ, tế bào có thể được rửa sau khi ly tâm) và được đưa vào có thể động vật trước hoặc cùng lúc với vaccin, trong đó tế bào tối đa hoá hoặc tăng cường đáp ứng của hệ miễn dịch với vaccin.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ở động vật, bằng cách đưa vào cơ thể động vật chủng *B. texasporus* không tạo bào tử. Ví dụ, việc điều trị có thể bao gồm bước làm giảm quần thể vi sinh vật gây bệnh trong động vật. Tác nhân gây bệnh để làm ví dụ cần làm giảm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, *Acinetobacter*, *Bacilli*, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Clostridia*, *E. coli*, *Enterococcus*, virus gây bệnh chân miệng, *Gonorrhea*, *Haemophilus*, virus cúm, *Mannheimia*, *Mycobacteria*, *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus* và *Streptococcus*. Các bệnh để làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh trực khuẩn coli, bệnh vi khuẩn xanmon, bệnh viêm ruột hoại tử, bệnh cầu trùng, bệnh cúm, bệnh chân miệng, hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn, bệnh viêm phổi sốt do vận chuyển ở bò, bệnh nhiễm khuẩn đường tiết niệu, bệnh béo phì/hội chứng chuyển hoá và bệnh đái tháo đường typ 2.

Chủng *B. texasporus* không tạo bào tử, được đăng ký với ký hiệu là PTA-12307 (Chủng MYG113), PTA-12308 (Chủng MYG110), PTA-12309 (Chủng

MYG107) và PTA-12310 (Chủng MYG11) được nộp lưu ngày 07/12/2011. Tất cả các chủng này đều được nộp lưu theo quy định của Hiệp ước Budapest, tại Cơ quan lưu giữ canh trường các typ Mỹ (American Type Culture Collection – ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, USA).

Sáng chế cũng đề cập đến ít nhất một chủng vi khuẩn thuộc chi *Brevibacillus* được chọn từ nhóm bao gồm ít nhất một chủng trong số các chủng PTA-12307, PTA-12308, PTA-12309 và PTA-12310.

Có thể thực hiện bất hoạt tế bào theo sáng chế theo cách liên quan đến việc nuôi cấy tế bào trong môi trường thích hợp, sau đó bổ sung nguyên liệu thức ăn vào canh trường này hoặc bổ sung canh trường này vào nguyên liệu thức ăn để loại nước tế bào.

Một cách khác (ngoài cách sốc nhiệt) có thể được dùng để bất hoạt tế bào theo sáng chế liên quan đến việc cho tế bào này tiếp xúc với độ pH khắc nghiệt, như độ pH khoảng bằng 1, khoảng bằng 2, khoảng bằng 3, khoảng bằng 4, khoảng bằng 5, khoảng bằng 9, khoảng bằng 10, khoảng bằng 11, khoảng bằng 12, khoảng bằng 13 hoặc khoảng bằng 14.

Sự thay đổi độ pH đủ để bất hoạt tế bào theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách bổ sung bazơ, axit và/hoặc các chế phẩm khác mà thay đổi độ pH một cách hiệu quả vượt ra ngoài khoảng có thể chịu được về mặt sinh lý học. Ví dụ, cacbon dioxit có thể được hoà tan vào trong nước để tạo ra axit cacbonic và làm giảm độ pH để bất hoạt tế bào.

Một cách khác có thể được dùng để bất hoạt tế bào theo sáng chế là xử lý bằng áp lực cao (còn được gọi là "tác động bằng áp lực cao" hoặc "xử lý bằng áp lực rất cao" hoặc "tiệt trùng bằng áp lực rất cao"), là quy trình mà có thể liên quan đến việc tạo áp lực nằm trong khoảng 100 đến 1000MPa (14500 đến 145000psi), hoặc 150 đến 600MPa (25000 đến 90000psi) để tiêu diệt tế bào sinh dưỡng vi khuẩn, nấm mốc và các loại tương tự khỏi các sản phẩm mà các tế bào này có mặt.

Một ví dụ về việc xử lý áp lực cao là cách dùng bộ phận ép (tạo áp lực bằng bộ phận ép), mà phá vỡ tế bào bằng cách tạo áp lực lên huyền phù tế bào (lên đến 275,8MPa) và sau đó đột ngột giảm áp lực. Do đó, chúng không tạo bào tử theo sáng chế có thể bị bất hoạt bởi việc tạo và giảm áp lực với mức áp lực là khoảng 275,8MPa, 137,9, 68,95, 34,48, 17,24, 8,62MPa và mọi tổ hợp của chúng.

Một cách khác nữa có thể được dùng để bất hoạt tế bào theo sáng chế liên quan đến việc cho tế bào này tiếp xúc với rượu ở nồng độ cuối là khoảng 70%, khoảng 60%, khoảng 50%, khoảng 40%, khoảng 30%, khoảng 20%, khoảng 10%, khoảng 5%, khoảng 2% hoặc khoảng 1% (v/v).

Một cách khác nữa có thể được dùng để bất hoạt tế bào theo sáng chế liên quan đến việc cho tế bào này tiếp xúc với chất tẩy ở nồng độ cuối là khoảng 10%, khoảng 5%, khoảng 2%, khoảng 1%, khoảng 0,5%, khoảng 0,2% hoặc khoảng 0,1% (w/v).

Một cách khác nữa có thể được dùng để bất hoạt tế bào theo sáng chế liên quan đến việc loại nước tế bào bằng cách làm giảm hàm lượng nước trong môi trường quanh tế bào *B. texasporus* tới mức dưới khoảng 80%, khoảng 70%, khoảng 60%, khoảng 50%, khoảng 45%, khoảng 40%, khoảng 35%, khoảng 30%, khoảng 25%, khoảng 20%, khoảng 15%, khoảng 10%, khoảng 5%, khoảng 2% hoặc khoảng 1%.

Theo một phương án ví dụ, canh trường tế bào không tạo bào tử theo sáng chế được tạo ra, xử lý bằng một hoặc nhiều cách bất hoạt và được bổ sung vào thức ăn động vật. Ví dụ, canh trường tế bào không tạo bào tử có thể được nuôi cấy bằng cách dùng hệ thống sản lượng cao và sau đó được sấy phun để thu dạng bột. Trong trường hợp này, quy trình sấy phun được dùng để bất hoạt tế bào và tạo ra sản phẩm mà sau đó có thể được bổ sung vào nguồn thức ăn khô. Theo cách khác, canh trường tế bào có thể được bất hoạt bằng cách tăng nhiệt độ và/hoặc áp lực, như những cách được dùng khi sản xuất thức ăn dạng hạt.

Theo một phương án ví dụ khác, canh trường tế bào không tạo bào tử theo sáng chế, như MYG107, MYG110 hoặc MYG113, được nuôi cấy trong môi trường lỏng và sau đó được bổ sung vào hỗn hợp về căn bản là khô các nguyên liệu thức ăn động vật hoặc vào hạt thức ăn động vật để tạo hỗn hợp có hàm lượng ẩm cuối nằm trong khoảng từ khoảng 10% đến khoảng 25% (theo lượng chất rắn), hỗn hợp được làm ẩm sau đó được cho đi qua thiết bị tạo hạt để tạo hạt có kích thước thích hợp, hạt này sau đó được sấy đến hàm lượng ẩm cuối bằng, ví dụ, khoảng 5%. Trong ví dụ này, việc bổ sung tế bào theo sáng chế vào hỗn hợp về cơ bản là khô các nguyên liệu thức ăn động vật đóng vai trò làm mất nước và việc này sau đó được tăng thêm bằng cách tăng nhiệt và quá trình làm khô các hạt thức ăn. Trong các điều kiện này, có thể tin rằng tất cả hoặc gần như tất cả tế bào sẽ bị bất hoạt.

Theo một phương án ví dụ khác, nguyên liệu thức ăn, bao gồm ngô vàng #2, thức ăn từ đậu nành, rá, sản phẩm protein hoàn nguyên, muối, phosphat đá vôi dạng bột, chất béo động vật dạng lỏng và cholin dạng lỏng được dùng để sản xuất thức ăn chứa tế bào bất hoạt theo sáng chế. Một mẻ thức ăn thường được sản xuất bằng cách trộn nguyên liệu dạng bột hoặc được nghiền nhỏ thành hỗn hợp đồng nhất và sau đó bổ sung nguyên liệu dạng lỏng, nguyên liệu dạng lỏng này có thể là canh trường tế bào *B. texasporus* không tạo bào tử (một cách loại nước). Hỗn hợp được làm ẩm này được chuyển vào buồng điều hoà, là nơi tạo hơi (tạo ra một dạng sốc nhiệt) và thức ăn chuyển sang dạng bột nhão. Bột nhão này được trộn kỹ trước khi tạo hạt và được đưa vào thiết bị tạo hạt. Trong thiết bị tạo hạt, bột nhão nóng mềm này được ép qua khuôn và được tạo thành dạng hạt hình trụ. Các hạt này được chuyển vào thiết bị làm mát/thiết bị làm khô, là nơi quạt sẽ thổi khí xung quanh nền xếp hạt để loại bỏ hơi ẩm (loại nước tiếp) và nhiệt khỏi hạt. Sau đó có thể dùng băng chuyền và thiết bị nâng dạng xô để chuyển thức ăn sang quá trình phủ lỏng, là quá trình phun chất béo động vật vào thức ăn với lượng khoảng 2% trọng lượng. Thức ăn thành phẩm sau đó đã sẵn sàng để sử dụng.

Theo một phương án ví dụ khác, khoảng $1,0 \times 10^{10}$, $1,0 \times 10^{11}$, $1,0 \times 10^{12}$, $1,0 \times 10^{13}$, $1,0 \times 10^{14}$ hoặc $1,0 \times 10^{15}$ tế bào bất hoạt của chủng *B. texasporus* không tạo bào tử được bổ sung vào khoảng 1000kg thức ăn động vật.

Theo một phương án ví dụ khác nữa, liều lượng hữu hiệu của tế bào *B. texasporus* không tạo bào tử được đưa vào cơ thể động vật. Theo phương án ví dụ khác, liều lượng hữu hiệu tế bào *B. texasporus* không tạo bào tử chứa các peptit BT trong thức ăn hoặc trong nước uống nằm trong khoảng từ khoảng 5ppm đến khoảng 1000ppm, nằm trong khoảng từ khoảng 15ppm đến khoảng 1000ppm, nằm trong khoảng từ khoảng 20ppm đến khoảng 1000ppm, nằm trong khoảng từ khoảng 5ppm đến khoảng 100ppm, nằm trong khoảng từ khoảng 10ppm đến khoảng 100ppm, nằm trong khoảng từ khoảng 20ppm đến khoảng 100ppm, nằm trong khoảng từ khoảng 5ppm đến khoảng 75ppm, nằm trong khoảng từ khoảng 10ppm đến khoảng 75ppm, nằm trong khoảng từ khoảng 20ppm đến khoảng 75ppm, nằm trong khoảng từ khoảng 5ppm đến khoảng 50ppm, nằm trong khoảng từ khoảng 10ppm và khoảng 50ppm hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 20ppm và khoảng 50ppm.

Theo một phương án ví dụ khác, việc loại nước của chủng *B. texasporus* không tạo bào tử theo sáng chế được thực hiện bằng cách: sấy lạnh khô, sấy chân không, sấy phun, loại nước thẩm thấu, loại nước tăng sôi, loại nước bay hơi dung môi, loại nước được hỗ trợ bởi siêu âm, loại nước được hỗ trợ bởi vi sóng, loại nước được hỗ trợ bởi RF và/hoặc tổ hợp của chúng.

Theo phương án ví dụ khác, việc loại nước của các tế bào hoặc canh trường *B. texasporus* không tạo bào tử được thực hiện bằng cách bổ sung hợp chất hút nước (ví dụ, nguyên liệu thức ăn), nhiệt (như được thực hiện trong quá trình tạo hạt thức ăn cho động vật) và/hoặc làm bay hơi.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa sự tiêu thụ các peptit BT bởi bào tử của PTA-5854. PTA-5854 được cấy vào môi trường LB và nuôi trong thiết bị lắc khí ở nhiệt độ 37°C.

Các mẫu được lấy hàng ngày và các peptit BT được chiết và phân tích hoạt tính. Một đơn vị nhân tạo là 0,8ug/ml các peptit BT. Vào ngày 3, canh trường được chia thành ba mẫu phân tích (#1, #2 và #3). Mẫu phân tích #1 không được xử lý. Mẫu phân tích #2 được chiếu tia UV trong thiết bị liên kết chéo UV trong thời gian 10 phút. Mẫu phân tích #3 được đun sôi trong thời gian 10 phút. Các mẫu phân tích sau đó được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị lắc khí.

Fig.2 thể hiện sự sinh trưởng của gà trong thử nghiệm thứ nhất (1) và thứ hai (2).

Fig.3 thể hiện cân nặng trung bình của gà kết hợp từ cả hai thử nghiệm vào ngày 20 (giá trị trung bình $\pm$ SE). N= 39 đến 42 gà được gây nhiễm mỗi lần trị liệu và N= 16 đến 19 gà không được gây nhiễm mỗi lần trị liệu. * $p \leq 0,05$

Fig.4 thể hiện tỷ lệ chuyển hoá thức ăn trung bình từ cả hai thử nghiệm được xác định cho cả quá trình trị liệu bằng cách cho ăn (giá trị trung bình $\pm$ SE, N= 3 chuồng/lần trị liệu/gà được gây nhiễm thử nghiệm, N=1 chuồng/lần trị liệu/gà không được gây nhiễm thử nghiệm) (1= thử nghiệm 1, 2= thử nghiệm 2). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Fig.5 thể hiện độ dài trung bình của ruột non (giá trị trung bình $\pm$ SE) ở gà được gây nhiễm bằng *Eimeria* (N= 20 đến 24) và gà không được gây nhiễm (N=8) từ cả hai thử nghiệm (1= thử nghiệm 1, 2= thử nghiệm 2).

Fig.6 thể hiện tỷ lệ trung bình giữ trọng lượng túi hoạt dịch và trọng lượng chịt (giá trị trung bình $\pm$ SE) ở gà được gây nhiễm bằng *Eimeria* (N= 10 đến 12) và gà không được gây nhiễm (N= 4).

Fig.7 thể hiện kết quả xác định mức thương tổn *Eimeria* (giá trị trung bình $\pm$ SE) của nhóm đối chứng (N= 8) và nhóm BT nhỏ (N= 12). Có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê giữa các trị liệu ($p=0,098$).

Fig.8 thể hiện giá trị phần trăm trung bình chất khô chất tiêu hoá của hồi tràng (giá trị trung bình $\pm$ SE) ở gà được gây nhiễm (N= 5 đến 6 nhóm trên mỗi trị liệu) và gà không được gây nhiễm (N= 2 nhóm trên mỗi trị liệu).

Fig.9 thể hiện giá trị phần trăm trung bình chất khô chất tiêu hoá của manh tràng (giá trị trung bình $\pm$ SE) ở gà được gây nhiễm (N= 4 đến 6 nhóm trên mỗi trị liệu) và gà không được gây nhiễm (N= 2 nhóm trên mỗi trị liệu).

Fig.10 thể hiện số lượng vi sinh vật tổng (giá trị trung bình $\pm$ SE) trong hồi tràng từ gà được gây nhiễm (N= 5 đến 6 nhóm trên mỗi trị liệu) và từ gà không được gây nhiễm (N= 2 nhóm trên mỗi trị liệu).

Fig.11 thể hiện số lượng vi sinh vật tổng trong manh tràng (giá trị trung bình $\pm$ SE) từ gà được gây nhiễm (N= 5 đến 6 nhóm trên mỗi trị liệu) và từ gà không được gây nhiễm (N= 2 nhóm trên mỗi trị liệu).

Fig.12 thể hiện lượng vi sinh vật khác nhau ở hồi tràng gà được gây nhiễm bằng *Eimeria* ở cả hai thử nghiệm (N=5 đến 6 nhóm trên mỗi trị liệu). giá trị P đối chứng so với BT, thử nghiệm 1 = 0,037.

Fig.13 thể hiện lượng vi sinh vật khác nhau ở hồi tràng gà không được gây nhiễm ở cả hai thử nghiệm (N=2 nhóm trên mỗi trị liệu). Không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Fig.14 thể hiện lượng vi sinh vật khác nhau ở manh tràng gà được gây nhiễm bằng *Eimeria* từ cả hai thử nghiệm (N=5 đến 6 nhóm trên mỗi trị liệu). Không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Fig.15 thể hiện lượng vi sinh vật khác nhau ở manh tràng gà không được gây nhiễm từ cả hai thử nghiệm (N=2 nhóm trên mỗi trị liệu). Không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng ở đây và trong phần yêu cầu bảo hộ đính kèm, các dạng thể hiện số ít, ví dụ, "một" là bao gồm cả dạng số nhiều, trừ khi trong phần nội dung thể hiện sự khác biệt rõ rệt. Ví dụ, khi đề cập tới "một vi khuẩn *B. texasporus*" bao gồm cả dạng số nhiều vi khuẩn này và khi đề cập tới "một tế bào" là cũng đề cập đến dạng nhiều tế bào tương tự và các cách thể hiện tương tự.

Như được sử dụng ở đây, "khoảng" có nghĩa là rất gần với, xấp xỉ, ít hơn hoặc nhiều hơn một chút số hoặc khoảng được nêu.

Như được sử dụng ở đây, "động vật" có nghĩa là loài có xương sống hoặc không xương sống bất kỳ, bao gồm ngựa, dê, cừu, gia súc, lợn, gà, gà tây, gà mái tơ, ngỗng, vịt, chó, mèo, vẹt, cá, cua, tôm, rùa nước ngọt, người và các loài tương tự.

Như được sử dụng ở đây, "thức ăn" hoặc "thực phẩm" là hợp chất hoặc hỗn hợp hợp chất bất kỳ chứa mixture of substances containing axit amin, chất chống oxy hoá, cacbon hydrat, đồ gia vị, enzym, chất béo, chất khoáng, chế phẩm chứa nitơ không phải protein, protein, vitamin và/hoặc chất gắn và có thể chứa tác nhân tạo hạt, tạo màu, tạo bột và/hoặc tạo mùi, được sản xuất, bán hoặc được dùng cho động vật tiêu thụ, như vật nuôi và vật nuôi trong nhà, hoặc người, để cung cấp ít nhất là một phần của nhu cầu dinh dưỡng của động vật hoặc người và/hoặc với mục đích ngăn ngừa hoặc điều trị chứng rối loạn dinh dưỡng ở động vật. Do là một nhân tố dinh dưỡng quan trọng, nước được coi là nguyên liệu thức ăn và nước uống chứa nước là thức ăn hoặc thực phẩm.

Như được sử dụng ở đây, "bất hoạt" hoặc "sự bất hoạt" là mọi cách xử lý hoặc áp lực, như không cấp chất dinh dưỡng, sốc nhiệt, loại nước/làm khô lạnh/sấy (ví dụ, sấy bằng nhiệt, làm đông khô, sấy phun, phơi nắng, hong khô và/hoặc hút khô), thay đổi độ pH (ví dụ, axit hoá hoặc kiềm hoá), xử lý bằng rượu, xử lý bằng chất tẩy, lọc, xử lý bằng kim loại như bạc và kẽm, xử lý áp lực như quá trình xử lý áp lực cao, phá vỡ bằng enzym (ví dụ, xử lý bằng lysozym), lực cơ học (ví dụ, siêu âm), xử lý bằng cation amoni hoá trị bốn, tác nhân oxy hoá (ví dụ, clo oxit, hydro peroxit, hypoclorit và/hoặc ozon), muối hoá, xử lý trong điện trường, xử lý bằng vi sóng, xử lý bằng chùm tia điện tử, chiếu xạ và/hoặc tổ hợp của chúng, là những phương pháp thường không tiêu diệt được bào tử và làm giảm khả năng tạo khuẩn lạc tương đối (tỷ lệ sống sót) của canh trường xuống thấp hơn khoảng 1×10^{-3} , thấp hơn khoảng 1×10^{-4} , thấp hơn

khoảng 1×10^{-5} , thấp hơn khoảng 1×10^{-6} , thấp hơn khoảng 1×10^{-7} , thấp hơn khoảng 1×10^{-8} hoặc thấp hơn khoảng 1×10^{-9} .

Như được sử dụng ở đây, “tế bào hoặc canh trường bất hoạt” chủng *B. texasporus* không tạo bào tử là hỗn hợp của tế bào *B. texasporus* không sống, ít nhất là phần tế bào được giải phóng một phần và/hoặc thành phần môi trường nuôi cấy. Cần phải biết rằng sự bất hoạt của chủng không tạo bào tử theo sáng chế có thể gây ra sự phân giải của nhiều, phần lớn hoặc tất cả các tế bào, tùy thuộc vào điều kiện bất hoạt được áp dụng. Do đó, “tế bào bất hoạt”, “canh trường bất hoạt” và các thuật ngữ tương tự, ý nghĩa của chúng bao gồm cả sản phẩm phân giải tế bào được tạo ra, ít nhất là một phần, bởi quá trình bất hoạt.

Như được sử dụng ở đây, “đột biến” là để chỉ mọi sự thay đổi trong trình tự axit nucleic, bao gồm thêm đoạn, mất đoạn, chuyển đoạn và đảo đoạn ở một hoặc nhiều nucleotit. Kích thước của đoạn mất hoặc thêm có thể thay đổi từ một nucleotit đến nhiều gen.

Như được sử dụng ở đây, “kiểu hình” là các đặc điểm sinh hoá, sinh lý và/hoặc hình thái quan sát được của tế bào hoặc canh trường tế bào.

Như được sử dụng ở đây, “không tạo bào tử” là để chỉ chủng vi khuẩn thể hiện mọi sự thiếu sót có thể nhận biết được trong việc tạo bào tử hoặc sản phẩm bào tử khi so với các chủng tương ứng kiểu dại (wild-type – wt) có khả năng tạo bào tử hoàn chỉnh. Thuật ngữ “không tạo bào tử” do đó là để chỉ chủng bất kỳ có sự nhạy cảm với áp lực như không có chất dinh dưỡng, sốc nhiệt, loại nước, axit hoá, kiềm hoá, rượu, chất tẩy, lysozym, lực cơ học, cation amoni hoá trị bốn, tác nhân oxy hoá và/hoặc chiếu xạ mà làm giảm khả năng tạo khuẩn lạc tương đối (tỷ lệ sống sót) của canh trường xuống tới thấp hơn khoảng $8,1 \times 10^{-7}$, thấp hơn khoảng $3,5 \times 10^{-3}$, thấp hơn khoảng 1×10^{-4} , thấp hơn khoảng 1×10^{-5} , thấp hơn khoảng 1×10^{-6} , thấp hơn khoảng 1×10^{-7} , thấp hơn khoảng 1×10^{-8} hoặc thấp hơn khoảng 1×10^{-9} , điều này là bao gồm cả những tế bào không có khả năng tạo bào tử và tế bào về cơ bản là có khiếm khuyết trong việc tạo bào tử, hoặc thể hiện theo một cách khác là tế bào trong đó bào tử không được hình

thành do chủng đó không có khả năng đó hoặc tế bào có khả năng tạo bào tử bị làm yếu hoặc tế bào trong đó bào tử được tạo ra, nhưng bào tử đó có thể không sống hoặc bào tử này nhạy cảm với áp lực bất hoạt và trở thành không hoạt động do tiếp xúc với các áp lực này. Sự thiếu hụt quá trình tạo bào tử có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ được thể hiện ở đây, ví dụ, canh trường sinh trưởng hoạt động có thể được cho sốc nhiệt với nhiệt độ khoảng 50°C hoặc khoảng 70°C trong khoảng năm phút và khả năng tạo khuẩn lạc tương đối được xác định so với canh trường không được xử lý hoặc mẫu phân tích của canh trường đó nhưng không bị làm sốc nhiệt.

"Không cấp chất dinh dưỡng" là sự thiếu hụt chất dinh dưỡng mà khiến cho số lượng tế bào sinh dưỡng hoặc hoạt động giảm đi (và kích thích sự tạo thành bào tử và/hoặc sự chết tế bào). Tế bào *B. texasporus* kiểu dại trải qua sự tạo bào tử ít nhất là trong quá trình sống sót qua việc không cấp chất dinh dưỡng, nhưng tế bào *B. texasporus* không tạo bào tử không thể tránh khỏi sự chết tế bào do việc không cấp chất dinh dưỡng. Do đó, canh trường bất hoạt chủng *B. texasporus* không tạo bào tử chủng có thể thu được một cách đơn giản bằng cách cấy chủng vào môi trường nuôi cấy và nuôi chủng này trong một khoảng thời gian kéo dài khiến cho tế bào chết vì không được cấp chất dinh dưỡng sau pha sinh trưởng ban đầu.

Như được sử dụng ở đây "sốc nhiệt" là tăng nhiệt độ đến giá trị nằm trong khoảng từ khoảng 50°C đến khoảng 100°C, làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 0°C đến khoảng 16°C hoặc đông lạnh.

"Loại nước" được định nghĩa là quá trình hoặc việc xử lý bất kỳ mà dẫn đến sự giảm hàm lượng nước trong môi trường xung quanh tế bào *B. texasporus*, sốc thẩm thấu, ví dụ, làm giảm hàm lượng nước trong môi trường xung quanh tới mức thấp hơn khoảng 80%, khoảng 70%, khoảng 60%, khoảng 50%, khoảng 45%, khoảng 40%, khoảng 35%, khoảng 30%, khoảng 25%, khoảng 20%, khoảng 15%, khoảng 10%, khoảng 5%, khoảng 2% hoặc khoảng 1%.

Tốt hơn nếu lượng hữu hiệu tế bào theo sáng chế được xác định bởi được sỹ hoặc bác sỹ thú y dựa trên các yếu tố như kích thước, tuổi, trọng lượng và/hoặc tình trạng sức khoẻ của động vật.

Sự tạo thành bào tử ở PTA-5854 giới hạn mức sản lượng của các peptit BT, do bào tử PTA-5854 có vẻ như làm phân huỷ các peptit BT. Không muốn bị phụ thuộc vào giả thuyết, điều này có vẻ như là sự tạo thành bào tử và/hoặc sự hoạt hoá bào tử làm giảm sự tạo ra các peptit BT bởi PTA-5854. Như được thể hiện trên Fig.1, canh trường được nuôi cấy tiếp của PTA-5854 trong môi trường LB sau ngày 3 ở 37°C, là thời điểm sự thiếu hụt chất dinh dưỡng ít nhất đã bắt đầu, khiến cho các peptit BT giảm đi (#1). Sự giảm peptit BT này có thể tránh được bằng cách chiếu tia UV vào ngày 3, cách này sẽ tiêu diệt cả tế bào (sinh dưỡng) và bào tử hoạt động (#2). Tuy nhiên, sự giảm BT này có thể tránh được bằng cách đun sôi vào ngày 3, cách này chỉ tiêu diệt tế bào hoạt động nhưng không bất hoạt bào tử (#3).

Ngoài việc làm giảm mức peptit BT, sự tạo thành bào tử ở PTA-5854 còn ngăn cản việc thực hiện phương pháp tiết kiệm nhất trong việc dùng chủng này làm phụ gia thức ăn. Cụ thể, việc sử dụng các peptit BT làm phụ gia thức ăn cần phải có chi phí sản xuất thấp, điều này loại bỏ mọi bước tinh chế peptit. Kết quả là, phụ gia thức ăn trên cơ sở BT chi phí thấp nhất sẽ là canh trường *B. texasporus* loại nước. Việc loại nước chỉ có thể làm bất hoạt tế bào sinh dưỡng chứ không làm bất hoạt được bào tử *B. texasporus*, do đó, việc loại nước không thể làm bất hoạt chủng có khả năng tạo bào tử. Ngoài ra, bào tử từ chủng có thể nảy mầm và phân huỷ các peptit BT ở xung quanh, và sự phân huỷ các peptit BT do sự nảy mầm bào tử cũng sẽ trở thành một vấn đề nghiêm trọng đối với sự ổn định của sản phẩm thức ăn bất kỳ.

Cuối cùng, phụ gia thực phẩm chứa bào tử *B. texasporus* có thể không đáp ứng được các quy định về quản lý và gây ra nguy cơ phát tán chủng sản xuất. Kết quả là việc có thể loại bỏ bào tử một cách hiệu quả rất được mong muốn.

Tuy nhiên, *B. texasporus* liên tục tạo bào tử mà rất khó để loại bỏ hoặc bất hoạt. Các kỹ thuật thông thường mà có thể dùng để bất hoạt *B. texasporus* và bào tử thu được bao gồm, chiếu xạ gama, hấp khử trùng và các hình thức xử lý tạo điều kiện khắc nghiệt khác. Mặc dù việc chiếu xạ gama là hiệu quả trong việc loại bỏ bào tử mà không phá huỷ các peptit BT trong một số chế độ vật lý cụ thể, phương thức này thường được coi là không khả thi và không hiệu quả về mặt chi phí trong công nghiệp. Hấp khử trùng cũng là một phương thức hiệu quả khác để loại bỏ bào tử, nhưng quá trình này phá huỷ các peptit BT, điều này khiến cho phương thức này không được ứng dụng.

Phương thức khả khi và có chi phí thích hợp nhất để bất hoạt tế bào trong quy mô công nghiệp là cách xử lý trong thời gian ngắn với nhiệt độ trung bình (như thanh trùng, ví dụ, ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 30 phút) và/hoặc loại nước, là các phương thức mà các peptit BT có thể chịu được. Do bào tử *B. texasporus* kháng nhiệt khá tốt (bào tử có thể chịu được mức áp lực đáng kể, như đun sôi ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 60 phút, Bảng 1, và loại nước, Bảng 2), chúng không tạo bào tử nhạy cảm với nhiệt độ trung bình và/hoặc loại nước là cần thiết để ứng dụng thực tiễn và/hoặc với chi phí hợp lý *B. texasporus*, như để làm DFM. Sáng chế đề xuất chủng *B. texasporus* không tạo bào tử mà có thể được làm bất hoạt bằng các phương thức an toàn với peptit BT, như thanh trùng, tạo hạt, làm khô lạnh và/hoặc sấy, trong đó các điều kiện bất hoạt có khả năng làm bất hoạt tế bào sinh dưỡng, nhưng thường không làm bất hoạt bào tử kiểu dại.

Các ví dụ về phương thức hữu ích để bất hoạt tế bào sinh dưỡng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, không cấp chất dinh dưỡng, sốc nhiệt (dạng nóng như thanh trùng hoặc dạng lạnh như đông lạnh), loại nước/làm khô lạnh/sấy (ví dụ, sấy bằng nhiệt, làm đông khô, sấy phun, phơi nắng, hong khô và/hoặc hút khô), thay đổi độ pH (ví dụ, axit hoá hoặc kiềm hoá), xử lý bằng rượu, xử lý bằng chất tẩy, lọc, xử lý bằng kim loại như bạc và kẽm, xử lý áp lực như quá trình xử lý áp lực cao, phá vỡ bằng enzym (ví dụ, xử lý bằng lysozym), lực cơ học (ví dụ, siêu

âm), xử lý bằng cation amoni hoá trị bốn, tác nhân oxy hoá (ví dụ, clo oxit, hydro peroxit, hypoclorit và/hoặc ozon), muối hoá, (xung điện) xử lý trong điện trường bằng năng lượng tần số radio (radio frequency – RF), xử lý bằng vi sóng, xử lý bằng chùm tia điện tử, chiếu xạ (ví dụ, tia UV, tia X hoặc tia gama) và tổ hợp của chúng. Theo một phương án ví dụ, có thể dùng một hoặc nhiều kỹ thuật này để bất hoạt tế bào không tạo bào tử theo sáng chế.

Theo các tác giả sáng chế được biết, chưa có công bố nào ghi nhận sự thiếu khả năng tạo bào tử đáp ứng được các tiêu chuẩn quản lý đã biết đối với DFM bất hoạt với tỷ lệ sống sót khi chịu áp lực là $<10^{-6}$, $<10^{-7}$, $<10^{-8}$, or $<10^{-9}$. Ví dụ, trong các ấn phẩm học thuật, tỷ lệ sống sót khi chịu áp lực của bacillus ở mức 10^{-2} được gọi là không tạo bào tử (LEE và các đồng tác giả, 2001); trong khi các phương pháp được công bố trong các patent Mỹ đã cấp số 4302544, 4450235, 4450236, 4465773, 6284490 và 7655452 cũng chỉ có thể tạo ra các chủng bacillus không tạo bào tử (“không sinh bào tử” hoặc “có tính không tạo bào tử”) với tỷ lệ sống sót khi chịu áp lực là ở mức 10^{-7} . Do đó, có vẻ như chưa có các tài liệu kỹ thuật đã biết đề cập đến việc tạo chủng bacillus không có khả năng tạo bào tử với tỷ lệ sống sót khi chịu áp lực là $<10^{-9}$. Nhu cầu đối với chủng này trong lĩnh vực là cao do việc tìm ra phương thức loại bỏ gen hiệu quả hơn không phải là một lựa chọn thích hợp trong thực tế (và phương thức duy nhất có thể sử dụng để tạo đột biến là phương thức hoá học mà phương thức này chủ yếu chỉ tạo ra các đột biến “câm” hoặc đột biến điểm “xen kẽ”) vì hai lý do. Thứ nhất, *B. texasporus* là sinh vật khó kiểm soát về mặt di truyền và có thể không thực hiện việc loại bỏ gen được. Thứ hai, chủng loại bỏ gen thu được sẽ là sinh vật biến đổi gen (genetically modified organism – GMO), là dạng bị cấm có mặt trong thức ăn cho người ở nhiều vùng như cộng đồng châu Âu. Theo phương án ví dụ khác, phương pháp bất hoạt là đủ để làm giảm tỷ lệ sống sót chủng không tạo bào tử theo sáng chế xuống thấp hơn khoảng 1×10^{-4} , thấp hơn khoảng 1×10^{-5} , thấp hơn khoảng 1×10^{-6} , thấp hơn khoảng 1×10^{-7} , thấp hơn khoảng 1×10^{-8} , hoặc thấp hơn khoảng 1×10^{-9} , nhưng trong đó phương pháp

bất hoạt này là không đủ để làm giảm tỷ lệ sống sót của chủng có khả năng tạo bào tử PTA-5854 xuống thấp hơn khoảng $3,3 \times 10^{-1}$ hoặc thấp hơn khoảng $4,3 \times 10^{-1}$.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Một nỗ lực phân lập chủng đột biến không tạo bào tử của PTA-5854 được thực hiện như sau. Tế bào PTA-5854 được tạo đột biến bằng EMS và sau đó cấy lên môi trường thạch LB. Khoảng 50000 khuẩn lạc đã được kiểm tra sự nhạy cảm đối với việc xử lý ở nhiệt độ 75°C trong thời gian 1 giờ, và đã phân lập được 42 chủng ứng cử nhạy cảm nhiệt độ. Các chủng ứng cử ban đầu này được tinh chế khuẩn lạc và thử nghiệm lại về tính nhạy cảm nhiệt độ. Chủng PTA-5854 và các chủng ứng cử nhạy cảm nhiệt độ được nuôi trong môi trường LB lỏng ở nhiệt độ 37°C trong ba ngày. Tế bào sau đó được chia vào các ống thiết bị ly tâm nhỏ tiệt trùng làm các mẫu phân tích 100 μl và ủ ở các nhiệt độ khác nhau (75, 70, 65, 60, 55, 50 hoặc 37°C) trong các khoảng thời gian khác nhau (5, 15, 30 hoặc 60 phút). Tế bào được xử lý được cấy lên đĩa thạch LB và nuôi ở nhiệt độ 37°C qua đêm để xác định khả năng cấy. Tỷ lệ sống sót sau khi xử lý sốc nhiệt được xác định bằng khả năng cấy sau khi sốc nhiệt chia cho khả năng cấy ở nhiệt độ 37°C khi không sốc nhiệt.

Trong số 42 thể phân lập đầu tiên, đã xác định được là có một số chủng đột biến nhạy cảm nhiệt độ. Chủng B7 thể hiện kiểu hình nhạy cảm nhiệt độ tốt nhất (Bảng 1). Sau khi xử lý trong thời gian ngắn là 5 phút ở nhiệt độ 50°C thu được tỷ lệ sống sót là $8,1 \times 10^{-7}$ (khoảng 1×10^{-6}), và nhiệt độ cao hơn và thời gian ủ dài hơn không làm giảm tỷ lệ sống sót một cách đáng kể. Mức bất hoạt tế bào này được xem là đủ đối với mục đích dùng *B. texasporus* làm DFM. Tạo đột biến và phân lập thể đột biến lặp lại đối với chủng PTA-5854 không tạo ra chủng có kiểu hình nhạy cảm nhiệt độ tốt hơn B7. Điều này được giải thích là do có thể cần phải có nhiều hơn một đột biến để thu được kiểu hình nhạy cảm nhiệt độ cao hơn để thu được sự bất hoạt tế bào hiệu quả hơn. Tuy nhiên, việc tạo đột biến

chủng B7 không thu được thể đột biến với kiểu hình nhạy cảm nhiệt độ được cải thiện, có thể là do sức sống thấp của chủng B7 (tương tự với chủng bố mẹ PTA-5854).

Bảng 1. Sự nhạy cảm nhiệt độ của tế bào *B. texasporus* (trong canh trường L-Broth sau hai ngày)

Chủng	Kiểu gen	Sự nhạy cảm nhiệt độ		
		Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Tỷ lệ sống sót
PTA-5854	Spo+++	100	60	$3,3 \times 10^{-1}$
PTA-5854	Spo+++	75	60	$4,3 \times 10^{-1}$
B7	Spo-	50	5	$8,1 \times 10^{-7}$
B7	Spo-	75	5	$1,2 \times 10^{-6}$
MYG11 (PTA-12310)	Spo+/-	50	5	$3,5 \times 10^{-3}$
MYG11(PTA-12310)	Spo+/-	75	5	$3,7 \times 10^{-3}$
MYG107(PTA-12309)	Spo---	50	5	$<10^{-9}$
MYG110(PTA-12308)	Spo---	50	5	$<10^{-9}$
MYG113(PTA-12307)	Spo---	50	5	$<10^{-9}$

Một chủng vi khuẩn mới (MYG11, số hiệu lưu giữ PTA-12310) được phân lập từ mẫu đất. Việc giải trình tự gen 16S rADN chủng này thể hiện rằng chủng này cùng loài với PTA-5854, nhưng lại sở hữu kiểu hình hoàn toàn khác khi được xử lý nhiệt. MYG11 sinh trưởng nhanh trong môi trường L-Broth ở nhiệt độ 37°C và chủng này thể hiện sự nhạy cảm ban đầu với nhiệt độ cao, hoặc sự không tạo bào tử. Việc xử lý ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 5 phút giúp thu được tỷ lệ sống sót là $3,5 \times 10^{-3}$ (Bảng 1). Do đó, MYG11 đã được tạo đột biến và khoảng 50000 khuẩn lạc đã được kiểm tra thể đột biến thể hiện sự nhạy cảm nhiệt độ tăng. Ít nhất ba thể đột biến, MYG107 (số hiệu lưu giữ PTA-12309), MYG110 (số hiệu lưu giữ PTA-12308) và MYG113 (số hiệu lưu giữ PTA-12307), phân lập được bằng phương pháp này và thể hiện sự không tạo bào tử cao. Trái ngược hẳn với PTA-5854 và B7, việc xử lý ở nhiệt độ 50°C trong thời

gian 5 phút thu được tỷ lệ sống sót ở các chủng MYG107, MYG110 và MYG113 thấp hơn 10^{-9} . Do đó, sáng chế đề xuất chủng *B. texasporus* có tỷ lệ sống sót thấp hơn khoảng 10^{-8} hoặc khoảng 10^{-9} khi được cho tiếp xúc với nhiệt độ thấp nhất là 50°C trong ít nhất 5 phút.

MYG107 được trải qua khoảng thời gian gấp đôi là khoảng 45 phút trong pha log trong môi trường nuôi cấy L-Broth và được xác định đặc điểm kỹ hơn. Do tỷ lệ sống sót của MYG107, MYG110 và MYG113 là bằng hoặc thấp hơn giới hạn phát hiện được ở canh trường được dùng trong thử nghiệm này, có thể tin rằng MYG107, MYG110 và MYG113 có lỗi cơ bản trong sự tạo thành bào tử, có khả năng cao là chủng không tạo bào tử, điều này được củng cố thêm bởi việc sản lượng BT thu được từ MYG107 được cho là gấp hơn ba lần so với PTA-5854.

Hơn nữa, thường phát hiện thấy nội bào tử phụ trong canh trường PTA-5854 gần như ở tất cả các trạng thái. Các nội bào tử phụ này không được phát hiện ở canh trường MYG107 ở mọi trạng thái, điều này hỗ trợ cho giả thuyết rằng MYG107 có lỗi về mặt cơ bản trong sự tạo bào tử. Ngoài ra, MYG107 thể hiện sự nhạy cảm với cả các dạng áp lực khác mà làm bất hoạt tế bào sinh dưỡng nhưng không làm bất hoạt bào tử (Bảng 2).

Bảng 2. Sự nhạy cảm áp lực ở tế bào *B. texasporus* (trong canh trường L-Broth sau hai ngày)

Áp lực	Chủng	Tỷ lệ sống sót
Đông lạnh (ở nhiệt độ -20°C trong thời gian 1 giờ)	PTA-5854	$4,2 \times 10^{-1}$
	MYG107	$<10^{-9}$
độ pH = 1,0 (trong thời gian ngắn, ở nhiệt độ trong phòng)	PTA-5854	$4,5 \times 10^{-1}$
	MYG107	$<10^{-9}$
độ pH = 13,0 (trong thời gian ngắn, ở nhiệt độ trong phòng)	PTA-5854	$5,1 \times 10^{-1}$
	MYG107	$<10^{-9}$
1% Butanol (trong thời gian ngắn, ở nhiệt độ trong phòng)	PTA-5854	$5,6 \times 10^{-1}$
	MYG107	$<10^{-9}$
1% SDS (trong thời gian ngắn, ở nhiệt độ trong phòng)	PTA-5854	$3,3 \times 10^{-1}$
	MYG107	$<10^{-9}$
1% hydro peroxit (trong thời gian ngắn, ở nhiệt độ trong phòng)	PTA-5854	$3,3 \times 10^{-1}$

Áp lực	Chủng	Tỷ lệ sống sót
độ trong phòng)	MYG107	$<10^{-9}$
Lysozym (1mg/ml ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ)	PTA-5854	$7,2 \times 10^{-1}$
	MYG107	$<10^{-9}$
ép (ba lần, ở nhiệt độ trong phòng)	PTA-5854	$1,5 \times 10^{-1}$
	MYG107	$<10^{-9}$
không cấp chất dinh dưỡng (trong thời gian 7 ngày ở nhiệt độ 37°C)	PTA-5854	$3,3 \times 10^{-3}$
	MYG107	$<10^{-9}$
Loại nước (bằng cách hút nhanh ở nhiệt độ 23°C trong thời gian 1 giờ)	PTA-5854	$3,9 \times 10^{-1}$
	MYG107	$<10^{-9}$

Trong thử nghiệm sự nhạy cảm với việc đông lạnh, chủng PTA-5854 kiểu dại và MYG107 được nuôi trong môi trường LB lỏng ở nhiệt độ 37°C trong hai ngày và tế bào sau đó được chia vào các ống của thiết bị ly tâm nhỏ tiết trùng thành các mẫu phân tích 100μl và đặt ở nhiệt độ -20°C trong thời gian 60 phút (hoặc tùy theo sự tạo đá). Các tế bào được xử lý đông lạnh và không được xử lý được cấy vào môi trường thạch LBr và nuôi ở nhiệt độ 37°C qua đêm để xác định khả năng cấy. Tỷ lệ sống sót khi đông lạnh được xác định bằng (khả năng cấy đối với tế bào được xử lý/ khả năng cấy của tế bào không được xử lý). Việc đông lạnh thu được tỷ lệ sống sót là khoảng thấp hơn 10^{-9} đối với chủng MYG107 khi so với tỷ lệ sống sót của PTA-5854 là vào khoảng $4,2 \times 10^{-1}$.

Trong thử nghiệm sự nhạy cảm với việc axit hoá, chủng PTA-5854 kiểu dại và MYG107 được nuôi trong môi trường LB lỏng ở nhiệt độ 37°C trong hai ngày và tế bào sau đó được chia vào các ống của thiết bị ly tâm nhỏ tiết trùng thành các mẫu phân tích 100μl. Độ pH được chỉnh xuống còn khoảng 1,0 (ở nhiệt độ trong phòng) bằng cách bổ sung 10μl HCl 1M vào mỗi mẫu phân tích và sau đó lập tức trung hoà axit bằng cách bổ sung 10μl NaOH 1M. Các tế bào được xử lý bằng axit và không được xử lý được cấy vào môi trường thạch LBr và nuôi ở nhiệt độ 37°C qua đêm để xác định khả năng cấy. Việc axit hoá thu được tỷ lệ sống sót là khoảng thấp hơn 10^{-9} đối với MYG107 khi so với tỷ lệ sống sót của PTA-5854 là khoảng $4,5 \times 10^{-1}$.

Thử nghiệm sự nhạy cảm với việc kiềm hoá được thực hiện theo cách tương tự như trên chỉ khác ở điểm NaOH được bổ sung vào trước để điều chỉnh độ pH lên 13,0 và sau đó HCl được bổ sung để trung hoà. Việc kiềm hoá thu được tỷ lệ sống sót là khoảng thấp hơn 10^{-9} đối với MYG107 khi so với tỷ lệ sống sót của PTA-5854 là khoảng $5,1 \times 10^{-1}$.

Thử nghiệm sự nhạy cảm với rượu được thực hiện theo cách tương tự như trên chỉ khác ở điểm butanol được bổ sung vào với lượng 1% (v/v). Việc xử lý bằng butanol thu được tỷ lệ sống sót là khoảng thấp hơn 10^{-9} đối với MYG107 khi so với tỷ lệ sống sót của PTA-5854 là khoảng $5,6 \times 10^{-1}$.

Thử nghiệm sự nhạy cảm với chất tẩy được thực hiện theo cách tương tự như trên chỉ khác ở điểm SDS được bổ sung vào với lượng 1% (v/v). Việc xử lý bằng SDS thu được tỷ lệ sống sót là khoảng thấp hơn 10^{-9} đối với MYG107 khi so với tỷ lệ sống sót của PTA-5854 là khoảng $3,3 \times 10^{-1}$.

Thử nghiệm sự nhạy cảm với sự oxy hoá được thực hiện theo cách tương tự như trên chỉ khác ở điểm hydro peroxit được bổ sung vào với lượng 1% (w/v). Việc xử lý bằng hydro peroxit thu được tỷ lệ sống sót là khoảng thấp hơn 10^{-9} đối với MYG107 khi so với tỷ lệ sống sót của PTA-5854 là khoảng $3,3 \times 10^{-1}$.

Trong thử nghiệm sự nhạy cảm với lysozym, chủng PTA-5854 kiểu dại và MYG107 được nuôi trong môi trường LB lỏng ở 37°C trong hai ngày và tế bào sau đó được chia vào các ống của thiết bị ly tâm nhỏ tiệt trùng thành các mẫu phân tích 100 μl . Lysozym được bổ sung vào với nồng độ 1mg/ml và tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 60 phút. Các tế bào được xử lý bằng lysozym và không được xử lý được cấy vào môi trường thạch LBr và nuôi ở nhiệt độ 37°C qua đêm để xác định khả năng cấy. Việc xử lý bằng lysozym thu được tỷ lệ sống sót là khoảng thấp hơn 10^{-9} đối với MYG107 khi so với tỷ lệ sống sót của PTA-5854 là khoảng $7,2 \times 10^{-1}$.

Trong thử nghiệm sự nhạy cảm với lực ép, chủng PTA-5854 kiểu dại và MYG107 được nuôi trong môi trường LB lỏng ở nhiệt độ 37°C trong thời gian hai ngày. Một phần canh trường này được xử lý bằng lực ép (ở 275,8MPa) trong thiết bị ép ba lần ở nhiệt độ trong phòng. Tỷ lệ sống sót sau khi ép được xác định bằng (khả năng cấy của tế bào được xử lý / khả năng cấy của tế bào không được xử lý). Việc xử lý bằng lực ép thu được tỷ lệ sống sót là khoảng thấp hơn 10^{-9} đối với chủng MYG107 khi so với tỷ lệ sống sót của PTA-5854 là khoảng $1,5 \times 10^{-1}$.

Trong thử nghiệm sự nhạy cảm với việc không cấp chất dinh dưỡng, chủng PTA-5854 kiểu dại và MYG107 được nuôi trong môi trường LB lỏng ở nhiệt độ 37°C trong thời gian bảy ngày. Tỷ lệ sống sót khi không cấp chất dinh dưỡng được xác định bằng (khả năng cấy ở ngày 7 / khả năng cấy ở ngày 2). Việc không cấp chất dinh dưỡng thu được tỷ lệ sống sót là khoảng thấp hơn 10^{-9} đối với chủng MYG107 khi so với tỷ lệ sống sót của PTA-5854 là khoảng $3,3 \times 10^{-1}$.

Trong thử nghiệm sự nhạy cảm với việc loại nước, chủng PTA-5854 kiểu dại và MYG107 được nuôi trong môi trường LB lỏng ở nhiệt độ 37°C trong hai ngày, tế bào sau đó được chia vào các ống của thiết bị ly tâm nhỏ tiết trùng thành các mẫu phân tích 100μl và được hút nhanh trong thời gian 60 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tế bào được hút khô (được cấp nước lại bằng 100μl nước cất) và tế bào không được xử lý được cấy vào môi trường thạch LBr và nuôi ở nhiệt độ 37°C qua đêm để xác định khả năng cấy. Tỷ lệ sống sót khi hút khô được xác định bằng (khả năng cấy của tế bào được xử lý / khả năng cấy của tế bào không được xử lý). Việc hút khô thu được tỷ lệ sống sót là khoảng thấp hơn 10^{-9} đối với MYG107 khi so với tỷ lệ sống sót của PTA-5854 là khoảng $3,9 \times 10^{-1}$.

Trong thử nghiệm sự nhạy cảm với việc loại nước khác, chủng PTA-5854 kiểu dại và tế bào MYG107 được nuôi trong môi trường chứa 10% và 20% thức ăn từ đậu nành theo thứ tự. Có sự sinh trưởng tế bào đối với cả hai chủng trong môi trường chứa 10% thức ăn từ đậu nành nhưng không có trong môi trường

chứa 20% thức ăn từ đậu nành. Pha loãng canh trường 20% thức ăn từ đậu nành bằng nước cất (1:1) để nuôi cấy lại với chủng PTA-5854 nhưng không thực hiện với MYG107, việc này thể hiện rằng tế bào của chủng *B. texasporus* không tạo bào tử cần có mức hàm lượng nước ít nhất là khoảng 80% trong môi trường để có thể duy trì được sự sống.

Các đặc tính của MYG107, MYG110 và MYG113; và phương pháp tạo ra các chủng này, cho phép chủng không tạo bào tử của *B. texasporus* được sử dụng làm DFM khả thi về mặt kinh tế. Cụ thể, chủng theo sáng chế giúp cho có thể ứng dụng được nhiều phương pháp bất hoạt thích hợp để làm bất hoạt tế bào *B. texasporus* kiểu đại (ví dụ, thanh trùng và/hoặc loại nước), việc này sẽ tạo ra các chủng có thể được dùng làm DFM khả thi về mặt kinh tế.

Tế bào *B. texasporus* bất hoạt được so sánh với peptit tinh chế để chứng minh rằng tế bào bất hoạt có chức năng tương đương với peptit tinh chế. Các peptit BT được tạo ra bởi tế bào *B. texasporus* phân chia hoạt động, điều này thể hiện rằng các peptit BT không phải là “sản phẩm trao đổi chất bậc hai” được tạo ra trong đáp ứng với việc không được cấp chất dinh dưỡng. Trong canh trường LB, 10^6 tế bào BT chứa khoảng 10 microgam các peptit BT. Nói cách khác, 10^{11} tế bào BT sẽ chứa khoảng 1 gam các peptit BT.

Nồng độ peptit BT trong tế bào *B. texasporus* bất hoạt được xác định và lượng tế bào bất hoạt tương đương với nồng độ mong muốn của peptit tinh chế được dùng trong thử nghiệm này. Gà con mới nở được nuôi bằng thức ăn chứa nồng độ các peptit BT tinh chế khác nhau hoặc tế bào *B. texasporus* bất hoạt tổng hai ngày. Vào ngày 3, gà được cấy chủng *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) xâm lấn. Vào ngày 4, giết chết số gà này. Thu và nghiền nhuyễn đồng nhất gan và lá lách. Xác định sự có mặt hoặc không có mặt của chủng SE trong thể đồng nhất này. Các con gà không được cấp peptit BT hoặc tế bào có tỷ lệ nhiễm SE là 60%, các con gà được cấp 12ppm peptit tinh chế hoặc lượng tế bào bất hoạt tương đương với 12ppm này có tỷ lệ nhiễm SE là 28% và 52% đối với peptit tinh chế và 35 % đối với tế bào bất hoạt. Các con gà được cấp 24ppm

hoặc lượng tế bào bất hoạt tương đương có tỷ lệ nhiễm là 36% và 16% đối với peptit tinh chế và 25% đối với tế bào bất hoạt. Các con gà được cấp 48ppm hoặc lượng tế bào bất hoạt tương đương có tỷ lệ nhiễm là 27% và 24% đối với peptit tinh chế và 10% đối với tế bào bất hoạt.

Các peptit BT không tinh chế trong tế bào bất hoạt thể hiện hiệu quả in vivo tương đương trong việc ngăn chặn sự xâm nhập các cơ quan bởi *Salmonella* tương đương với protein tinh chế. Do đó, tế bào *B. texasporus* bất hoạt là tương đương với peptit tinh chế.

Ví dụ 2

Để đánh giá tác dụng của các peptit BT ở trạng thái sinh dưỡng (bao gồm tế bào *B. texasporus* bất hoạt chứa các peptit cation BT điều chỉnh miễn dịch) trong việc phòng ngừa bệnh viêm ruột hoại tử được gây ra bởi sự gây nhiễm *Clostridium perfringens* (typ A) qua đường miệng, các thương tổn bệnh viêm ruột hoại tử và/hoặc số tử vong ở các con gà được gây nhiễm.

Trong thử nghiệm 1, BT ở trạng thái sinh dưỡng ở nồng độ khoảng 24ppm và khoảng 48ppm được cấp theo đường thức ăn đã làm giảm các tỷ lệ thương tổn bệnh viêm ruột hoại tử từ 2,3 xuống 0,6 và 0,5 theo thứ tự, số tử vong từ 17% xuống 6% và 7%, theo thứ tự, và sự phục hồi đường ruột đối với *C. perfringens* từ 3,60 xuống 236 và 2,48 ($\log_{10}$ cfu/g) theo thứ tự ($p \leq 0,05$).

Trong thử nghiệm 2, BT ở trạng thái sinh dưỡng ở nồng độ khoảng 24ppm và khoảng 48ppm được cấp theo đường thức ăn đã làm giảm các tỷ lệ thương tổn bệnh viêm ruột hoại tử từ 2,8 xuống 0,8 và 0,6 theo thứ tự, số tử vong từ 21% xuống 5% và 1%, theo thứ tự, và sự phục hồi đường ruột đối với *C. perfringens* từ 3,12 xuống 1,88 và 1,31 ($\log_{10}$ cfu/g) theo thứ tự ($p \leq 0,05$).

Các kết quả này thể hiện việc cấp tế bào *B. texasporus* bất hoạt theo đường miệng là hiệu quả trong việc ngăn ngừa bệnh viêm ruột hoại tử ở gà giò.

Kết quả:

Bảng 3. Sự ngăn ngừa bệnh viêm ruột hoại tử ở gà giò khi cấp tế bào *B. taylori* bắt hoạt theo đường miệng

Chế độ điều trị	Liều dùng	Tỷ lệ thương tổn	Số tử vong	Log ₁₀ cfu/g ⁴
Thử nghiệm 1:				
Chế độ dinh dưỡng đối chứng	NA	2,3	17/100 (17%)	3,60 ^A
BT ở trạng thái sinh dưỡng	24ppm	0,6	10/150* (6%)	2,36 ^B
BT ở trạng thái sinh dưỡng	48ppm	0,5	11/150* (7%)	2,48 ^B
Thử nghiệm 2:				
Chế độ dinh dưỡng đối chứng	NA	2,8	21/100 (21%)	3,12 ^A
BT ở trạng thái sinh dưỡng	24ppm	0,8	5/100* (5%)	1,88 ^B
BT ở trạng thái sinh dưỡng	48ppm	0,6	1/100* (1%)	1,31 ^B

1 Các nhóm chế độ điều trị được thể hiện theo dạng 24 và 48ppm là nồng độ BT được cấp từ ngày 1.

2 Tỷ lệ thương tổn được thể hiện theo số lượng cá thể điều trị trung bình (*n = 25) với sai số bình phương trung bình.

3 Số tử vong được thể hiện theo dữ liệu nguy cơ so sánh với mẫu đối chứng dương (chế độ dinh dưỡng đối chứng) ($p < 0,05$).

4 Log₁₀cfu/g được thể hiện theo số lượng cá thể điều trị trung bình (n = 10).

A-B Nghĩa là thuộc cùng một cột và không có khác biệt chỉ số trên chung rõ rệt ($p < 0,05$).

NA: không xác định

Nguyên liệu và phương pháp:

Vào ngày nở, gà được thu nhận từ Trang trại Sanderson (Bryan) và được chia ngẫu nhiên thành các nhóm thử nghiệm và được đưa vào các chuồng nuôi ở tầng riêng biệt bằng gỗ thông sạch. Tất cả được cho ăn thức ăn làm quen từ lúa mì nguyên được bán trên thị trường mà đáp ứng hoặc thừa tiêu chuẩn theo quy định của NRC và nước theo nhu cầu. Gà được cho ăn theo chế độ dinh dưỡng đối chứng, hoặc thức ăn chứa 24ppm hoặc 48ppm các peptit BT ở trạng thái sinh dưỡng từ ngày 1 đến ngày 24.

Các mẫu phân lập *C. perfringens* (typ A) thu được từ các trường hợp thực tế ở Virginia, Bắc Carolina và Georgia được dùng trong thử nghiệm này. Mẫu phân lập được nuôi cấy trong môi trường thioglycollat. Môi trường thioglycollat tiệt trùng được dùng để truyền cho gà; gà được gây nhiễm một lần một ngày trong ba ngày (các ngày 17 đến 19 sau khi nở) bằng cách nhồi qua ống thông qua đường miệng (1,5 ml/lần gây nhiễm).

Mỗi mẻ *C. perfringens* được tạo ra để gây nhiễm được pha loãng hàng loạt và cấy trên đĩa thạch SFP và sau đó đặt vào tủ ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Các đĩa này sau đó được đếm và ghi lại số liệu để xác định lượng *C. perfringens* được truyền cho gà. Để định lượng *C. perfringens* khôi phục, lấy một phần ruột non; phần ruột non này ở phần đầu của túi thừa Meckel. Ngay khi phần ruột non này được thu, nó được đặt vào trong túi Whirl-Pak cùng 10ml thioglycollat và ngâm trong đó trong thời gian 30 giây. Sau đó lấy 0,5 ml và cấy vào thioglycollat yếm khí và pha loãng hàng loạt và cấy trên thạch SFP. Thạch SFP được tạo ra theo như hướng dẫn được in trên nhãn. Môi trường này là dạng môi trường theo lớp, lớp đầu tiên được đổ khuôn vài ngày trước khi thực hiện thử nghiệm và ủ để kiểm tra sự nhiễm khuẩn. Lớp thứ hai được đổ thêm vào ngày mổ xác gà để khám nghiệm trong điều kiện hiếu khí, sau khi mẫu được cấy. Các đĩa sau đó được chuyển vào hộp cách biệt và các đĩa được ủ trong thời gian 24 giờ và đọc kết quả vào ngày tiếp theo.

Để xác định sự thương tổn tổng đi kèm với NE, phần hồng tràng và hồi tràng của ruột non được khám nghiệm. Tỷ lệ thương tổn được ghi theo các chỉ tiêu sau:

0 = Hoàn toàn không có thương tổn, ruột có hình dạng bình thường.

1 = Thành mỏng hoặc bờ, màu xám

2 = Thành mỏng, hoại tử ổ, màu xám, tạo ra lượng khí nhỏ.

3 = Thành mỏng, hoại tử thành mảng, ruột trướng hơi, có đốm máu nhỏ.

4 = Hoại tử nặng, chảy máu rõ, trong ruột có lượng khí lớn.

Nghiên cứu này thể hiện tính hiệu quả của tế bào *B. texasporus* bất hoạt trong việc củng cố hệ miễn dịch của động vật trước khi gây nhiễm và hệ miễn dịch được củng cố đáp ứng nhanh hơn hoặc hiệu quả hơn với cùng một việc gây nhiễm.

Ví dụ 3

BT ở trạng thái sinh dưỡng (tế bào *B. texasporus* bất hoạt) thực ra không phải là kháng sinh, mặc dù tế bào này mang các peptit BT tự nhiên mà có vẻ như có hoạt tính kháng sinh khi xác định bằng thử nghiệm *in vitro*. Các peptit không tan trong nước và chỉ có thể được tách bằng dung môi hữu cơ hoặc không phân cực, điều này có thể là do các peptit BT này được tạo ra bởi tế bào *B. texasporus* hoạt động sinh trưởng và được lưu trữ trong vi khuẩn chứ không được tiết. Sự giải phóng các peptit BT trong tự nhiên từ tế bào *B. texasporus* không được cấp chất dinh dưỡng, nuôi cấy trong thời gian dài có thể là bước chủ chốt của sự tự tiêu thụ các tế bào cùng loại, một chiến lược sinh tồn của vi sinh vật đã được ghi nhận đầu tiên đối với tế bào *Bacillus subtilis* liên quan. Sự tự tiêu thụ các tế bào cùng loại là chương trình phát triển hoạt hoá, bao gồm sự tiết có chủ đích các nhân tố tiêu diệt đặc hiệu từ một phần nhỏ trong quần thể tế bào để cho phép chúng tiêu thụ các tế bào cùng loại ở xung quanh (GONZALEZ-PASTOR và các đồng tác giả 2003). Các peptit BT có thể chính là các nhân tố tiêu diệt này trong sự tự tiêu thụ các tế bào cùng loại ở *B. texasporus*. Chương trình tự tiêu thụ các

tế bào cùng loại được ngắt ở các tế bào đang hoạt động sinh trưởng và ở trong môi trường giàu chất dinh dưỡng, và việc bất hoạt các tế bào này bằng các phương thức vật lý (như khi tạo ra BT ở trạng thái sinh dưỡng) không làm cho các peptit BT được giải phóng có thể là do không có tín hiệu liên quan đến sự tự tiêu thụ các tế bào cùng loại. Tuy nhiên, thử nghiệm *in vitro* được cho là tạo ra kết quả nhân tạo. BT không hoạt động như chất kháng sinh *in vivo*, thay vào đó, nó được cho là làm tăng cường/củng cố hệ miễn dịch ở động vật, điều này giải thích tại sao mức vi khuẩn hội sinh và có lợi gần như không bị ảnh hưởng nhưng mức vi khuẩn có hại lại giảm ở động vật được điều trị bằng các peptit BT hoặc tế bào này. Điều này cũng giải thích cho việc tại sao BT ở trạng thái sinh dưỡng (trong tế bào bất hoạt) được cấp theo đường miệng ở nồng độ 96ppm không có tác động *in vivo* đối với các vi khuẩn được coi là vi khuẩn đường ruột hội sinh và có lợi (xem ví dụ 4)

Ví dụ 4

Mục đích của thử nghiệm này là để đánh giá mức độ an toàn của việc cho gà giò ăn BT ở trạng thái sinh dưỡng (tế bào *Brevibacillus texasporus* bất hoạt chứa các peptit BT, được gọi là “peptit BT”) ở mức cao 96ppm khi có hoặc không có áp lực từ việc gây nhiễm *Eimeria maxima*. Thử nghiệm cho ăn này được thực hiện dưới dạng hai thử nghiệm riêng rẽ nối tiếp nhau.

Nguyên liệu và phương pháp:

Gà giò Ross 508 được ấp nở vào hai ngày cách nhau khoảng một tháng ở xưởng ấp công nghiệp. Ở cả hai thử nghiệm, 66 gà trống con được chuyển đến nhà nuôi. Các con gà được cân và chia vào các lồng theo nhóm bốn hoặc năm con. Vào ngày 13 sau khi chuyển vào chuồng nuôi, các con gà được chuyển vào bốn phòng, mỗi phòng có hai chuồng và mỗi chuồng nuôi tám con. Một nhóm đối chứng và một nhóm peptit BT được đặt trong mỗi phòng. Sau khi gà đã được chuyển vào chuồng, chúng được cho ăn qua ống kén hợp tử *E. maxima* (nước máy đối với nhóm gà đối chứng).

Nhiệt độ và độ ẩm tương đối được đo tự động 24 giờ mỗi ngày. Trong ngày thử nghiệm thứ nhất và thứ hai, nhiệt độ là trên 30°C và sau đó được giảm xuống khoảng 0,5°C mỗi ngày cho đến khi còn ở nhiệt độ 20°C. Chương trình chiếu sáng là chiếu sáng suốt 24 giờ mỗi ngày trong suốt quá trình thử nghiệm.

Bảng 4. Số lượng gà trong mỗi thử nghiệm

	Đối chứng	Peptit BT
Thử nghiệm 1	32+2 gà thêm	32
Thử nghiệm 2	32+2 gà thêm	32

Chế độ ăn gồm lúa mì, thức ăn từ đậu nành, lúa mạch, thức ăn từ hạt cải, dầu hạt cải, vitamin, chất khoáng và axit amin. Thức ăn không được biến đổi được mua từ Agrifood Research Finland MTT, Jokioinen. Thức ăn ở dạng trộn lẫn vào không bổ sung coccidiostat hoặc enzym. BT ở trạng thái sinh dưỡng được bổ sung vào thức ăn với lượng tương đương với nồng độ peptit BT là 96ppm. Các nhóm thử nghiệm được ăn cùng một chế độ thức ăn trong suốt thử nghiệm. Thức ăn và nước uống được cung cấp theo nhu cầu.

Bảng 5. Thành phần chế độ ăn

Thành phần thức ăn thử nghiệm	g/kg thức ăn	Thành phần hoá học tính toán	g/kg thức ăn
lúa mì	549,8	DM	890,00
lúa mạch	40,00	Protein thô	220,80
thức ăn từ đậu nành	288,00	Chất béo thô	60,45
thức ăn từ hạt cải	39,00	Sợi thô	31,31
canxi đơn phosphat	39,00	Tro	59,44
Ca	19,00	Ca	10,11
Muối	14,00	P	8,32
Đá vôi	4,20	P tiêu hoá được	4,79
Vit/khoáng	2,00	Na	1,72
Methionin	2,00	Lys	11,91
Lysin	1,60	Met	4,82
		Cys	3,87
		Thr	8,24

Hàm lượng năng lượng tính toán	MJ / kg DM
ME	12,20

Thức ăn 1= thức ăn đối chứng

Thức ăn 2= thức ăn đối chứng + BT ở trạng thái sinh dưỡng với lượng tương đương với 0,096 g peptit trên kg

Tất cả các con gà ở ba trong số bốn phòng được cấp kén hợp tử *E. maxima* vào ngày 13, trong khi phòng thứ tư là phòng đối chứng thì gà không được gây nhiễm. Liều kích thích là khoảng 25000 kén hợp tử tạo bào tử trên một con gà. Kén bào tử được cho ăn bằng ống thông vào điều trong 2ml nước máy. Kén hợp tử *Eimeria* được mua từ Veterinary Laboratories Agency, Surrey, United Kingdom. Một phòng không được gây nhiễm.

Gà được cân theo chuồng khi được mang đến và 6, 13, 17, (18 và 19 ở thử nghiệm 2) và 20 ngày tuổi. Lượng thức ăn ăn vào được xác định vào thời điểm 6, 13 và 20 ngày tuổi. Lượng thức ăn ăn vào được xác định theo chuồng hoặc lồng. Tình trạng gà được kiểm tra ít nhất hai lần một ngày. Tỷ lệ chết và khối lượng các con gà chết đều được ghi lại. Các con gà bệnh rất nặng hoặc bị thương tổn nặng được giết chết một cách nhân đạo. Khi 20 ngày tuổi, gà được giết chết bằng cách bẻ gãy cổ và thu mẫu hồi tràng và manh tràng, thu được 32 mẫu chất tiêu hoá trên mỗi thử nghiệm và cách thức trị liệu.

Phân tích vi sinh vật mẫu chất tiêu hoá và sản phẩm phân giải tế bào và phân tách ADN nhiễm sắc thể

ADN vi khuẩn thu được được phân tích bằng PCR định lượng, cho phép tính toán số lượng nhóm vi khuẩn khác nhau. Các vi khuẩn sau được phân tích *Bifidobacterium* spp, *E. coli*, *Lactobacillus* spp. và nhóm *C. perfringes* cụm I. Để xác định ADN, sử dụng ba mẫu và số lượng vi khuẩn trung bình trên gam trọng lượng chất tiêu hoá tươi được xác định.

Số lượng tế bào vi khuẩn tổng trong mẫu chất tiêu hoá được xác định bằng lưu bào ký.

Xác định mức thương tổn *Eimeria* chỉ được thực hiện ở thử nghiệm đầu tiên và các thương tổn được xác định bởi các chuyên gia một cách vô tư. Việc

xác định các thương tổn *Eimeria* được thực hiện đến phần cuối cùng của hồi tràng và toàn bộ hồi tràng. Sự thương tổn được đánh giá theo thang điểm từ 0 đến 4, trong đó 0 thể hiện ruột bình thường và 4 thể hiện ruột bị thương tổn trầm trọng.

Xác định khối lượng của túi hoạt dịch từ hai con gà từ mỗi nhóm. Túi hoạt dịch chỉ được cân ở thử nghiệm thứ hai.

Xác định độ dài tổng của ruột non (hồi tràng + hồi tràng) ở tất cả các con gà.

Tính toán theo thuật toán T-test và sử dụng thuật toán này để xác định sự khác biệt thống kê giữa các trị liệu.

Kết quả:

Việc gây nhiễm *Eimeria* đã làm giảm đáng kể sự sinh trưởng ở gà đối chứng. Tuy nhiên, thức ăn được bổ sung peptit BT đã phần nào thể hiện sự tăng trưởng tăng ở gà, cả ở nhóm được gây nhiễm và không được gây nhiễm *Eimeria* khi so sánh với nhóm đối chứng (Fig.2). Vào ngày 20, gà thuộc nhóm peptit BT có vẻ nặng hơn một chút nhưng không xác định thấy có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê nào (Fig.3). Nếu trọng lượng của gà không được gây nhiễm vào ngày 20 được xác định riêng rẽ trong thử nghiệm thứ nhất và thứ hai, trọng lượng gà trong thử nghiệm thứ hai tăng lên một cách đáng kể ($p=0,026$) nhờ thức ăn bổ sung peptit BT khi so sánh với nhóm đối chứng.

Trong suốt thử nghiệm gây nhiễm *Eimeria* (nằm trong khoảng từ ngày 13 và 20) tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (feed conversion ratio – FCR) được cải thiện ở nhóm peptit BT khi so với nhóm đối chứng ($p= 0,02$ trong thử nghiệm thứ nhất và $p=0,006$ trong thử nghiệm thứ hai) (Fig.4).

Việc gây nhiễm *Eimeria* làm tăng độ dài ruột non đúng như dự đoán. Độ dài ruột non tăng lên có thể là do sự sinh trưởng bổ sung cho sự hấp thụ chất dinh dưỡng giảm. Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê ở độ dài trung bình của ruột non giữa các trị liệu (Fig.5).

Túi hoạt dịch là cơ quan biểu mô dạng bạch huyết chỉ được tìm thấy ở chim. Túi hoạt dịch là nơi tạo máu và là cơ quan chuyên hoá cần thiết cho việc phát triển tế bào B. Túi hoạt dịch phát triển thành túi thừa ở sống lưng ở vùng tiền mấu môn của lỗ huyết. Trong thử nghiệm thứ hai, thể túi hoạt dịch được cân và so sánh với trọng lượng sống của gà. Phần trọng lượng túi hoạt dịch khi so với trọng lượng sống của gà có vẻ như lớn hơn một chút so với gà không được gây nhiễm so với gà được gây nhiễm *Eimeria*. Không ghi nhận được sự khác biệt giữa nhóm được bổ sung peptit BT và nhóm đối chứng. Tuy nhiên, túi hoạt dịch của gà không được gây nhiễm ở nhóm đối chứng có vẻ như lớn hơn so với nhóm peptit BT (Fig.6).

E. maxima chủ yếu ảnh hưởng đến vùng giữa của ruột non, phần xa của hồi tràng và gần gốc hồi tràng. Không ghi nhận được mức nhiễm trùng cao có thể là do đỉnh điểm của sự nhiễm trùng đã trôi qua, khi việc ghi nhận tỷ lệ thương tổn được thực hiện, vào ngày thứ bảy sau khi nhiễm *E. maxima*. Chu kỳ sống trung bình của *E. maxima* nằm trong khoảng từ năm đến sáu ngày. Tỷ lệ trung bình là thấp hơn ở gà được bổ sung peptit BT ($p=0,098$) như được thể hiện qua sự hồi phục nhanh hơn hoặc sự nhiễm trùng giảm (Fig.7).

Không có tử vong ở gà không được gây nhiễm ở cả hai chế độ ăn ở cả hai thử nghiệm. Số tử vong ở gà được gây nhiễm *Eimeria* là tương đối cao. Trong thử nghiệm lần thứ nhất, số tử vong là cao nhất ở nhóm đối chứng và thấp nhất ở nhóm peptit BT ($p = 0,011$), trong khi điều này lại là ngược lại ở thử nghiệm thứ hai. Khi kết hợp số tử vong ở cả hai thử nghiệm, số tử vong tổng ở nhóm peptit BT có vẻ như thấp hơn so với nhóm đối chứng, nhưng sự khác biệt này là không rõ rệt (Bảng 6). Lý do tại sao tỷ lệ tử vong khác nhau giữa các việc trị liệu trong thử nghiệm 1 cao hơn so với trong thử nghiệm 2 có thể là do trong thử nghiệm 2, những con gà ốm quá nặng sẽ được giết chết một cách nhân đạo ngay lập tức. Trong thử nghiệm 1, trong toàn bộ số gà thuộc nhóm peptit BT và ba con gà thuộc nhóm thức ăn đối chứng không có con gà nào bị loại bỏ trước khi thử

nghiệm kết thúc. Trong thử nghiệm 2, hai con gà thuộc nhóm peptit BT và một con gà thuộc nhóm thức ăn đối chứng bị loại bỏ trước khi kết thúc thử nghiệm.

Bảng 6. Tỷ lệ tử vong (%)

Hình thức trị liệu	Thử nghiệm 1	Thử nghiệm 2	Tỷ lệ tử vong ở cả hai thử nghiệm
Đối chứng	23,5	11,8	17,6
BT	3,13	15,6	9,4

Tỷ lệ chất khô chất tiêu hoá là một thông số nền quan trọng do nó thể hiện mức độ khoẻ mạnh của ruột và sự cân bằng của hệ sinh vật vùng ruột. Việc gây nhiễm *Eimeria* khiến gà bị tiêu chảy và làm giảm hàm lượng chất khô trong chất tiêu hoá của hồi tràng và manh tràng. Các kết quả này gợi ý rằng gà được gây nhiễm có vấn đề về sức khoẻ đường ruột và việc gây nhiễm *Eimeria* ảnh hưởng tới sự cân bằng của hệ sinh vật vùng ruột. Tác động của peptit BT lên chất khô trong hồi khi gây nhiễm *Eimeria* và gà không được gây nhiễm là không đáng kể (Fig.8).

Hàm lượng chất khô chất tiêu hoá trong manh tràng ở gà được gây nhiễm là thấp hơn so với gà không được gây nhiễm. Chất khô trong manh tràng gà được gây nhiễm *Eimeria* có thể tăng lên một chút so với giá trị trung bình do việc bổ sung peptit BT (Fig.9).

Số lượng vi sinh vật tổng trong manh tràng là cao hơn trong hồi tràng. Việc gây nhiễm *Eimeria* làm tăng tổng số vi sinh vật trong hồi tràng ở cả nhóm đối chứng và nhóm bổ sung peptit BT. Số lượng vi sinh vật trong manh tràng bị giảm ở cả hai thử nghiệm và cả hai nhóm trị liệu do bị gây nhiễm *Eimeria*. Không xác định thấy có sự khác biệt đáng kể về mật thống kê nào giữa hai việc trị liệu bằng thức ăn ở cả hai thử nghiệm (Fig.10 và 11).

Trong cả hai thử nghiệm này, việc gây nhiễm *Eimeria* đều có xu hướng làm tăng số lượng *Lactobacillus* spp. và *Bifidobacteria* spp. ở cả hồi tràng và manh tràng ở cả hai nhóm thức ăn đối chứng và bổ sung peptit BT. Trong thử

thử nghiệm 2, có xu hướng không đáng kể nhưng có ý nghĩa về mặt thống kê về sự giảm mức độ vi khuẩn trong hồi tràng ở nhóm peptit BT, nhưng trong thử nghiệm 1, có sự tăng mức các nhóm *C. coccoides-E. rectale* trong hồi tràng thuộc nhóm peptit BT (Fig.12). Không quan sát thấy sự khác biệt ở nhóm gà không được gây nhiễm (Fig.13 và 15). Hàm lượng vi khuẩn trong manh tràng không bị ảnh hưởng bởi BT (Fig.14 và 15). Không phát hiện thấy *Salmonella* spp. trong tất cả các thử nghiệm. Kết hợp tất cả lại, việc phân tích hệ vi khuẩn vùng ruột gợi ý rằng với liều hiện nay, peptit BT không có ảnh hưởng hoặc có ảnh hưởng rất ít tới quần thể vi khuẩn tại chỗ (không gây bệnh), điều này thể hiện rằng các peptit BT các động vật được trị liệu có sức chịu đựng cao đối với peptit BT và chúng không thể hiện hoạt tính kháng sinh.

Thử nghiệm này thể hiện rằng không quan sát thấy có tác động có hại đối với vi khuẩn đường ruột tại chỗ hoặc mong muốn ở gà được bổ sung peptit BT 96ppm. FCR được cải thiện một cách đáng kể ở nhóm bổ sung peptit BT khi gây nhiễm *Eimeria* gà giò so với nhóm đối chứng ($p=0,02$ và $p=0,006$ đối với thử nghiệm thứ nhất và thứ hai, theo thứ tự). Trọng lượng của gà trong thử nghiệm thứ hai được cải thiện đáng kể nhờ chế độ ăn bổ sung peptit BT ($p=0,026$) khi so với nhóm đối chứng. Số tử vong của gà giò được gây nhiễm *Eimeria* trong thử nghiệm thứ nhất được giảm một cách đáng kể ($p=0,011$) nhờ việc trị liệu bằng peptit BT khi so với nhóm đối chứng. Ngoài ra, việc bổ sung vào thức ăn peptit BT làm giảm mức độ thương tổn trung bình ở mô nhiễm khuẩn ($p=0,098$).

Ví dụ 5

Nghiên cứu này là để thử nghiệm việc sử dụng BT ở trạng thái sinh dưỡng (tế bào *B. texasporus* bất hoạt) làm phụ gia thức ăn ở lợn đối với việc tăng trọng lượng, tạo khuẩn lạc *Salmonella* colonization và chức năng bạch cầu.

Nguyên liệu và phương pháp:

Mô hình thử nghiệm: Sau khi cai sữa (17 đến 21 ngày tuổi), lợn con được chia ngẫu nhiên vào các chuồng có đèn sưởi để giữ ấm bổ sung thành từng nhóm

5 con. Lợn con được cho uống nước và ăn theo chế độ ăn pha I không bổ sung thuốc theo nhu cầu và đáp ứng quy định của National Research Council (1994). Ghi thể trọng vào các ngày 0, 3, 5, và 7 sau khi cai sữa. Lợn được chia thành 4 nhóm thử nghiệm. Nhóm 1 và 2, mỗi nhóm gồm 5 con lợn được cho ăn theo chế độ ăn trên cơ sở ngô và thức ăn từ đậu nành không bổ sung thuốc cân bằng đối chứng chứa 0ppm hoặc 12ppm (nhắc lại lần 1) hoặc 24ppm (nhắc lại lần 2, 3) các peptit BT, theo thứ tự. Nhóm 3 và 4 được cho ăn thức ăn chứa 0 hoặc 12 (hoặc 24) ppm các peptit BT, nhưng lợn thuộc các nhóm này được gây nhiễm bằng *Salmonella typhimurium* (ST). Lợn được nuôi theo các chế độ thức ăn này trong suốt thử nghiệm. Các peptit BT được cấp dưới dạng tế bào *B. texasporus* bất hoạt được chuẩn bị trước.

Salmonella enterica serovar *Typhimurium* (ST): Sử dụng một mẫu phân lập *S. enterica* serovar *typhimurium* (ST) (National Veterinary Sciences Laboratory [NVSL]), Ames, IA (PT 24), đây là chủng đã được chọn lọc tính kháng carbenixilin và novobioxin (CN) và được lưu giữ trong môi trường TSB hoặc thạch tryptxin đậu nành ở nhiệt độ 4°C. Brilliant Green Agar (BGA), là môi trường nuôi cấy chọn lọc đối với *Salmonella*, được dùng để nuôi cấy mẫu phân lập kháng trong các nghiên cứu thử nghiệm và chứa 100µg/ml carbenixilin và 25µg/ml novobioxin (tức là BGA + CN) để hạn chế sự sinh trưởng của các vi khuẩn khác. Mẫu cấy cho việc gây nhiễm được chuẩn bị trong khoảng thời gian từ 18 đến 24 giờ (môi trường TSB + CN được giữ ở nhiệt độ 41°C và pha loãng trong PBS tiệt trùng (độ pH = 7,2). Dung dịch nguồn (1×10^9 cfu/ml) được bào chế để dùng trong các thử nghiệm gây nhiễm.

Vào ngày 3 sau khi cai sữa, lợn con thuộc nhóm gây nhiễm được đưa vào cơ thể bằng ống thông qua đường miệng 10^7 cfu ST. Năm ngày sau khi gây nhiễm (7 ngày sau khi cai sữa), lợn được giết chết một cách nhân đạo và 1,0g mẫu chất trong manh tràng từ mỗi con lợn được thu trong điều kiện vô trùng. Mẫu manh tràng được pha loãng hàng loạt và cấy quét trên đĩa môi trường brilliant green agar (BGA). Các đĩa này sau đó được nuôi trong thời gian 24 giờ

ở nhiệt độ 37°C và xác định số lượng cfu ST trên gam chất trong manh tràng. Ngoài ra, mô (gan, lách, hạch bạch huyết hồi-manh tràng, manh tràng và trực tràng sẽ được nuôi cấy kiểm tra sự có mặt của ST bằng các phương pháp đã biết. Các khuẩn lạc bị nghi ngờ là *Salmonella* được kiểm tra bằng các thử nghiệm hoá sinh trên thạch ba loại đường và thạch sắt lysin và được kiểm tra tiếp xem có phải là ST bằng kháng huyết thanh *Salmonella* O. Số lượng khuẩn lạc *Salmonella* trên đĩa được thể hiện dưới dạng $\log_{10}$ *Salmonella* trên gam thành phần chứa trong manh tràng.

Đáp ứng miễn dịch bẩm sinh ở lợn đã cai sữa: Bạch cầu được phân tách bằng cách phân tách gradien nồng độ như đã được mô tả trước đây (KOGUT và các đồng tác giả 2010). Các thử nghiệm chức năng được thực hiện để đánh giá khả năng của bạch cầu trung tính thu được từ lợn được trị liệu theo nhiều cách khác nhau. Hai phương pháp tiêu diệt vi sinh vật được thực hiện bởi bạch cầu trung tính được kiểm tra. Cụ thể là thực hiện thử nghiệm sự mất hạt nhỏ bạch cầu trung tính, sự giải phóng các sản phẩm trừ vi sinh vật từ các hạt bên trong bạch cầu trung tính và sự tăng đột ngột tác nhân oxy hoá, sự sản xuất các dạng oxy hoạt tính trừ vi sinh vật reactive oxygen species – ROS). Tóm lại, các thử nghiệm được mô tả dưới đây.

Thử nghiệm chức năng: Sự tăng đột ngột tác nhân oxy hoá bạch cầu được xác định theo sự oxy hoá DCFH-DA thành DCF huỳnh quang như được mô tả bởi HE và các đồng tác giả 2003. Bạch cầu được kích thích bằng phorbol A-myristat 13 axetat (PMA [2,0 µg/ml], Sigma) hoặc môi trường RPMI 1640 trong 60 phút trước khi đo. Tế bào được đặt vào đĩa 96-giếng và sự phát huỳnh quang được đo bằng đầu đọc vi đĩa huỳnh quang GENios Plus Fluorescence Microplate Reader [(485/530nm) Tecan US Inc., Research Triangle Park, NC].

Phân tích thống kê: Các phân tích thống kê được thực hiện trên các dữ liệu bằng phần mềm thống kê SigmaStat® (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Sự khác biệt giữa các nhóm thử nghiệm sẽ được xác định bằng thử nghiệm T Student. $P \leq 0,05$ được xem là đáng kể về mặt thống kê.

Kết quả.

Từ các dữ liệu được trình bày dưới đây, có vẻ như lợn được cho ăn tế bào BT có sự tăng trọng hàng ngày trung bình (average daily gains – ADG) lớn hơn lợn được cho ăn theo chế độ dinh dưỡng đối chứng, ngay có khi bị nhiễm khuẩn *Salmonella* (ở 24ppm) (Bảng 7).

Bảng 7: mức tăng hàng ngày trung bình. Nhắc lại 3, 24ppm BT. Giá trị được tính theo đơn vị pound (lbs). Dữ liệu từ trọng lượng đo được vào các ngày 0, 3, 5, và 7 sau khi cai sữa từ từng con lợn được gộp lại trong từng thời điểm. Dữ liệu thể hiện mức tăng hàng ngày +/- sai số chuẩn.

Trị liệu	Mức tăng hàng ngày trung bình (lbs)	
	Nhắc lại 2	Nhắc lại 3
Đối chứng	1,7 $\pm$ 0,3	0,04 $\pm$ 0,12
Đối chứng peptit 24ppm	4,2 $\pm$ 0,7	0,15 $\pm$ 0,06
Đối chứng ST	3,2 $\pm$ 0,4	0,14 $\pm$ 0,09
Peptit ST 24ppm	4,6 $\pm$ 0,5	0,18 $\pm$ 0,06

Một số sự giảm lượng phân thải ra ở ST quan sát được là như được thể hiện trong dữ liệu quét trực tràng (Bảng 8). Ở lần nhắc lại 1, không thấy có khác biệt ở lượng phân thải ra ở nồng độ 12ppm BT, trừ vào ngày 5. Ở lần nhắc lại 2, đối chứng và BT ở nồng độ 24ppm thì lượng phân thải là tương tự với ST, trừ vào ngày 4, trong đó nhóm BT 24ppm có nhiều lợn dương tính hơn nhóm đối chứng. Ở lần nhắc lại 3, nhóm BT ở nồng độ 24ppm có lượng phân lợn thải ra ở ST ít hơn so với nhóm đối chứng vào tất cả các ngày được đo. Ở lần nhắc lại 3, lợn được trị liệu theo chế độ 7 ngày sau khi nhiễm thay vì 5 ngày, như ở lần nhắc lại 1 và 2.

Bảng 8: Dữ liệu quét trực tràng hàng ngày

Ngày sau nhiễm	Số lượng lợn dương tính với ST					
	Lần nhắc lại 1		Lần nhắc lại 2		Lần nhắc lại 3	
	Đối chứng	BT 12ppm	Đối chứng	BT 24ppm	Đối chứng	BT 24ppm
1	2	3	4	3	5	2
2	5	5	4	4	3	1
3	5	5	3	4	4	2
4	4	5	2	5	4	1
5	3	1	1	1	5	2
6	-	-	-	-	5	1
7	-	-	-	-	4	3

Lợn được cho ăn peptit có ít *Salmonella* hơn trong các cơ quan– hạch bạch huyết, gan, lách– so với lợn đối chứng nói chung, nhưng không thể hiện sự giảm này ở mô ruột– hồi tràng (trừ lần nhắc lại 3), manh tràng, trực tràng. Ở lần nhắc lại 1, nhóm BT ở nồng độ 12ppm có ít lợn dương tính ST hơn ở cả gan và lách, nhưng lượng ST khôi phục là tương đương ở hạch bạch huyết, manh tràng và trực tràng (Bảng 9). Ở lần nhắc lại 2, nhóm BT có ít lợn dương tính hơn ở tất cả các mô, trừ manh tràng. Ở lần nhắc lại 3, có ít lợn ở nhóm BT dương tính với ST hơn ở hạch bạch huyết, lách, hồi tràng, manh tràng và trực tràng. Dữ liệu tạo khuẩn lạc (CFUs) không được xác định do tỷ lệ khôi phục ST thấp (không thể hiện dữ liệu). Có vẻ như peptit đã có hiệu quả dương tính đối với sự xâm nhiễm và tạo khuẩn lạc *Salmonella* ở lợn cai sữa.

Bảng 9: *Salmonella* phân lập được từ mô

Mô	Số lượng lợn dương tính ST					
	Lần nhắc lại 1		Lần nhắc lại 2		Lần nhắc lại 3	
	Đối chứng	BT 12ppm	Đối chứng	BT 24ppm	Đối chứng	BT 24ppm
hạch bạch huyết hồi-manh tràng	3	3	5	1	4	2
gan	3	1	5	1	2	2
lách	2	0	3	1	1	2
Hồi tràng	-	-	5	4	4	0
Manh tràng	4	4	5	5	5	4
Trực tràng	5	5	5	4	4	3

Bạch cầu từ lợn được cho ăn chủng BT không tạo bào tử có đáp ứng tăng đột ngột tác nhân oxy hoá cao hơn đáng kể (Bảng 10) so với bạch cầu từ lợn đối chứng vào ngày 3, 5, và 7 được cho ăn peptit BT ($P < 0,05$).

Bảng 10: Hoạt tính tăng đột ngột tác nhân oxy hoá bạch cầu lợn. Lợn được cho ăn chế độ ăn tương ứng trong suốt quá trình nghiên cứu (24ppm BT). Lợn được chích máu vào ngày 3, 5, và 7 sau khi cai sữa. Dữ liệu được thể hiện hai lần nhắc lại, gộp từ 10 lợn/nhóm. Dữ liệu thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn. RFU = reflective fluorescent units (đơn vị huỳnh quang phản xạ) (ở 1000).

Trị liệu	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 7
Đối chứng	0,8 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,3
Peptit	1,5 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,2
Đối chứng PMA	23,0 $\pm$ 1,3	14,2 $\pm$ 1,0	30,4 $\pm$ 3,3
Peptit PMA	39,2 $\pm$ 4,8	38,0 $\pm$ 3,5	40,5 $\pm$ 5,3

Dữ liệu này gợi ý rằng các tế bào *B. texasporus* bất hoạt là tác nhân kích thích miễn dịch hiệu quả ở lợn với những tác động có lợi tiềm tàng lên sự tăng trọng lượng và sự chuyển *Salmonella* trong ruột và các mô.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *B. texasporus* không tạo bào tử, trong đó chủng này là MYG11(PTA-12310), MYG107 (PTA-12309), MYG110 (PTA-12308) hoặc MYG113 (PTA-12307).
2. Chủng *B. texasporus* không tạo bào tử theo điểm 1, trong đó chủng này có hàm lượng ẩm là nhỏ hơn 10% khối lượng.
3. Phương pháp làm bất hoạt chủng *B. texasporus* không tạo bào tử theo điểm 1, trong đó phương pháp bao gồm bước cho canh trường chứa tế bào *B. texasporus* tiếp xúc với áp lực đủ để làm bất hoạt tế bào.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó áp lực này được chọn từ nhóm bao gồm không cấp chất dinh dưỡng, sốc nhiệt, loại nước, thay đổi độ pH, cho tiếp xúc với rượu, xử lý bằng chất tẩy, xử lý áp lực, phá vỡ bằng enzym, lực cơ học, gia nhiệt tế bào đến nhiệt độ ít nhất 50 °C trong thời gian ít nhất 5 phút, đông lạnh tế bào khi không có mặt chất bảo vệ bảo quản lạnh, loại nước tế bào đến hàm lượng nước thấp hơn khoảng 80%, bổ sung chất tẩy, sấy phun tế bào, tác động lực cơ học và tổ hợp của chúng.
5. Phương pháp theo điểm 3, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước làm giảm tỷ lệ sống sót của canh trường chứa tế bào *B. texasporus* xuống thấp hơn khoảng 1×10^{-8} .

