



(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)



1-0024839

(51)⁷ C12N 1/00; C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2014-00570

(22) 24/08/2012

(86) PCT/US2012/052360 24/08/2012

(87) WO2013/029013 28/02/2013

(30) 61/526,881 24/08/2011 US; 61/527,371 25/08/2011 US

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/06/2014 315A

(73) DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (DK)

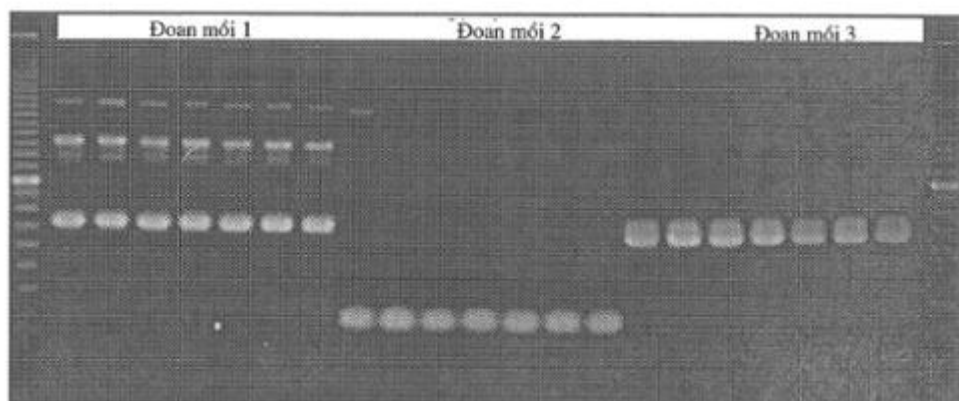
Langebrogade 1, DK-1001 Copenhagen, Denmark

(72) DAVIS Mari Ellen (US); SAWALL Justin (US); NEUMANN Anthony (US);
SIRAGUSA Greg (US); ROMERO Luis (GB).

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

(54) CHỦNG BACILLUS SẢN XUẤT ENZYM, CHẾ PHẨM VÀ THỨC ĂN CHO
ĐỘNG VẬT CHỨA CÁC CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng Bacillus sản xuất enzym có lợi cho các động vật và các phương pháp sử dụng các chủng này. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa chủng Bacillus sản xuất enzym. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến thức ăn cho động vật chứa chủng Bacillus sản xuất enzym.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus* sản xuất enzyme có lợi cho động vật và phương pháp sử dụng chủng này. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện hiệu suất tăng trưởng của động vật. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật ăn trực tiếp, và thức ăn cho động vật có bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp này. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện nơi giữ phân lợn. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến các phương pháp làm thuyên giảm đáp ứng viêm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngành công nghiệp chăn nuôi lợn toàn cầu đã sử dụng ngày càng gia tăng các thức ăn từ các sản phẩm phụ (các bã rượu khô cùng với các chất tan (DDGS), bã lúa mì, v.v.) ban đầu từ 0-10% cho tới hiện thời là 30-60%. Các tiết kiệm chi phí thức ăn này là một cơ hội lớn cho ngành công nghiệp trong việc tiết kiệm chi phí đầu vào cho thức ăn, cho dù có dẫn đến một số khó khăn. Quy trình lên men để chiết xuất etanol từ ngô phân hủy phần lớn các tinh bột, để lại sản phẩm phụ thức ăn DDGS thu được chứa khoảng 40% chất xơ. Hàm lượng chất xơ cao như vậy trong ngô dẫn đến làm giảm khả năng tiêu hóa chất khô và đơn vị tiêu hóa các axit amin chủ yếu trong DDGS là thấp hơn khoảng 10% so với ngô (Stein and Shurson, 2009).

Do đó, việc bổ sung DDGS trong các thức ăn chăn nuôi có thể có tác động bất lợi tới hiệu suất tăng trưởng của động vật và các đặc tính thân thịt. Ngoài ra, các tác động bất lợi cho sự tăng trưởng động vật và chất lượng thịt, các thay đổi về khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng do việc bổ sung DDGS có hàm lượng chất xơ cao ảnh hưởng đến việc xử lý, lưu trữ, và phân hủy phân lợn. Ngành công nghiệp chăn nuôi lợn thương mại đã chỉ ra rằng khả năng lưu giữ phân là kém ở các bể chứa phân lợn kiểu hố sâu, và phân lợn ăn quá nhiều DDGS sẽ có sự tích tụ

chất rắn nhiều hơn, cũng như có sự phát thải các khí amoniac, metan, và hydro sulfua.

Vì có các vấn đề với quan điểm nêu trên, điều có thể được mong muốn nếu tạo ra các chủng *Bacillus* sản xuất các enzym có lợi cho các động vật và các phương pháp sử dụng các chủng này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các chủng *Bacillus* sản xuất enzym. Theo một phương án, các chủng này gồm *Bacillus subtilis*. Theo một phương án khác, chủng này là *Bacillus pumilus*.

Theo ít nhất một số phương án, các chủng *B. subtilis* gồm *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, và *Bacillus subtilis* AGTP 944, và các chủng có toàn bộ đặc tính của nó, dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, các chủng *B. pumilus* gồm *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 và *Bacillus pumilus* KX11-1, và các chủng có toàn bộ đặc tính của nó, dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm việc cung cấp lượng hữu hiệu của (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều chủng này ở dạng hỗn hợp, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy chủng này, thức ăn chứa một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng cho động vật, trong đó việc cung cấp này cải thiện ít nhất một trong số các dấu hiệu thể trọng, tăng trọng trung bình ngày, lượng ăn trung bình ngày, hiệu quả thức ăn, các đặc tính thân thịt, khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng và các vấn đề về phân thải.

Theo một phương án khác, các chủng sản xuất enzym có thể được cung cấp cho động vật để cải thiện ít nhất là một trong số các hậu quả gây ra từ các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, các vấn đề về phân thải, hiệu quả sản xuất, các đặc tính thân thịt, và năng suất khi cho ăn DDGS ở mức độ cao.

Theo một phương án, một hoặc nhiều chủng sản xuất enzym được cung cấp dưới dạng vi sinh vật ăn trực tiếp (DFM). Vi sinh vật ăn trực tiếp bao gồm

một hoặc nhiều chủng *Bacillus*. Các chủng sản xuất enzym này là có hiệu quả cho việc làm biến chất các thức ăn khó tiêu hóa như DDGS. Điều này cho phép làm tăng độ khả dụng dinh dưỡng, dẫn đến việc cải thiện đáp ứng tăng trưởng động vật. Ngoài ra, (các) chủng sản xuất enzym này làm giảm bớt mùi phân, nhờ đó cải thiện chất lượng không khí môi trường hoạt động. Theo ít nhất một số phương án, sự giảm bớt mùi là do việc làm giảm sự tạo ra các khí axit béo dễ bay hơi, amoniac, và/hoặc metan và hydro sulfua.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm việc cung cấp lượng hữu hiệu của (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng cho lợn với lượng hữu hiệu để cải thiện cho bể chứa phân. Theo các phương án nhất định, bể chứa phân lợn này là hầm phân. Theo ít nhất một số phương án, việc cung cấp này cải thiện ít nhất một trong số các dấu hiệu: ít tạo bọt, ít tích tụ các chất rắn, và các hàm lượng nitơ, lưu huỳnh, phospho, nitơ gắn với chất xơ, tổng protein, chất béo, và chất xơ ít hơn khi so với hầm phân đối chứng.

Theo các phương án nhất định, (các) chủng sản xuất enzym được cấp thẳng vào bể chứa phân, như hầm phân. Các cải thiện thu được từ việc tiếp xúc (các) chủng sản xuất enzym trực tiếp với bể chứa phân bao gồm ít nhất một trong số các dấu hiệu ít tạo bọt, ít tích tụ các chất rắn, và các hàm lượng nitơ, lưu huỳnh, phospho, nitơ gắn với chất xơ, tổng protein, chất béo, và chất xơ ít hơn so với các hầm phân đối chứng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi thành phần axit béo dễ bay hơi trong hầm phân bao gồm bước cung cấp lượng hữu hiệu của (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng cho các động vật mà phân của chúng được chứa trong hầm phân. Theo một phương án khác, các chủng sản xuất enzym có thể được cho tiếp xúc trực tiếp với hầm phân.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp thay đổi sự phát thải khí tích tụ trong chuồng nuôi động vật bao gồm việc cung cấp (các)

chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng cho các động vật với lượng hữu hiệu để làm giảm sự phát thải khí.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp làm thuyên giảm đáp ứng viêm bao gồm việc cung cấp (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng cho các động vật với lượng hữu hiệu để làm thuyên giảm đáp ứng viêm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các phương án điển hình theo sáng chế được minh họa trong các hình vẽ kèm theo.

Fig.1 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5.

Fig.2 là trình tự rADN 16S không hoàn toàn của *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5.

Fig.3 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus subtilis* AGTP BS442.

Fig.4 là trình tự rADN 16S không hoàn toàn của *Bacillus subtilis* AGTP BS442.

Fig.5 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus subtilis* AGTP BS521.

Fig.6 là trình tự rADN 16S không hoàn toàn của *Bacillus subtilis* AGTP BS521.

Fig.7 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus subtilis* AGTP BS918.

Fig.8 là trình tự rADN 16S không hoàn toàn của *Bacillus subtilis* AGTP BS918.

Fig.9 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus subtilis* AGTP BS1013.

Fig.10 là trình tự rADN 16S không hoàn toàn của *Bacillus subtilis* AGTP BS1013.

Fig.11 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068.

Fig.12 là trình tự rADN 16S không hoàn toàn của *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068.

Fig.13 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus subtilis* AGTP BS1069.

Fig.14 là trình tự rADN 16S không hoàn toàn của *Bacillus subtilis* AGTP BS1069.

Fig.15 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus subtilis* AGTP 944.

Fig.16 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus subtilis* AGTP 944.

Fig.17 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus subtilis* AGTP 944.

Fig.18 là trình tự rADN 16S không hoàn toàn của *Bacillus subtilis* AGTP 944.

Fig.19 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus pumilus* KX11-1.

Fig.20 là ảnh chụp của gel thể hiện profin RAPD PCR của *Bacillus pumilus* KX11-1.

Fig.21 là trình tự rADN 16S không hoàn toàn của *Bacillus pumilus* KX11-1.

Fig.22 là sơ đồ đại diện của thiết kế đĩa nuôi cấy tế bào để sàng lọc các chủng *Bacillus* đối với các tác dụng kháng viêm. LPS được sử dụng gây ra đáp ứng viêm mặc dù tác nhân bất kỳ gây đáp ứng viêm đều có thể được sử dụng.

Fig.23 là biểu đồ dạng cột mô tả các tác dụng kháng viêm của chủng *Bacillus* khi được thể hiện trong dòng tế bào đại thực bào đại diện (HD11 ở gà). Tác nhân được sử dụng để gây ra đáp ứng viêm là LPS. Các tác động tới sự biểu hiện gen IL-1 β được thể hiện bởi các thanh màu trắng ($P < 0,01$). Các tác động tới

sự biểu hiện gen IL-8 thể hiện bởi các thanh màu đen ($P < 0,01$). Các ký tự khác nhau (a, b, c) biểu thị cho các giá trị khác nhau về mặt thống kê ($P < 0,01$).

Fig.24 là sơ đồ đại diện của một thiết kế đĩa cho việc sàng lọc nuôi cấy tế bào đối với một vi sinh vật ăn trực tiếp được nghiên cứu. LPS được sử dụng làm tác nhân để gây ra đáp ứng viêm.

Fig.25 là biểu đồ dạng cột mô tả các tác dụng kháng viêm của chủng *Bacillus* trong dòng tế bào động vật có vú (dòng tế bào biểu mô ruột của chuột (IEC-6)). LPS được sử dụng để gây ra đáp ứng viêm. Sự biểu hiện gen của yếu tố gây hoại tử khối u- α (TNF- α) được xác định. Các ký tự khác nhau (a hoặc b) biểu thị cho các giá trị khác nhau về mặt thống kê ($P < 0,10$).

Fig.26 là đồ thị thể hiện các đặc tính bọt trong hàm cho 3 mẫu lấy trong khoảng thời gian thử nghiệm 170 ngày.

Fig.27 là sơ đồ mô tả phép đo BioLuminescence trong mỗi chuồng trong vùng được đánh dấu “x.”

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi mô tả chi tiết các phương án của sáng chế, điều sẽ phải hiểu là sáng chế không chỉ giới hạn ở các chi tiết của các phương án và các thành phần được nêu trong Phần mô tả dưới đây hoặc được minh họa trong các hình vẽ. Sáng chế có thể bao gồm các phương án khác hoặc được thực hiện hoặc được tiến hành theo nhiều cách khác nhau. Ngoài ra, điều cần phải hiểu rằng các thuật ngữ và các khái niệm được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả và sẽ không được xem là để giới hạn sáng chế.

Nội dung của phần mô tả sẽ không được xem là để giới hạn các phương án hoặc khía cạnh bất kỳ theo sáng chế. Điều được dự liệu là các thành phần và các ứng dụng theo mỗi phương án, có thể được áp dụng cho các phương án khác của sáng chế.

Các khoảng giá trị số trong phần mô tả này có nghĩa là tương đối, và do vậy có thể bao gồm các giá trị nằm ngoài khoảng được nêu trừ khi có quy định khác được chỉ ra cụ thể. Các khoảng giá trị số bao gồm tất cả các giá trị nằm trong khoảng của giá trị dưới và giá trị trên, với các số gia là một đơn vị, với điều kiện

có sự tách biệt giữa ít nhất là hai đơn vị nằm trong khoảng giá trị dưới bất kỳ và giá trị trên bất kỳ. Ví dụ, nếu một đặc tính về thành phần, vật lý hoặc một đặc tính khác như, ví dụ, trọng lượng phân tử, độ nhớt, v.v., nằm trong khoảng từ 100 đến 1000, thì điều sẽ được dự liệu là tất cả các giá trị riêng, như 100, 101, 102, v.v., và các khoảng con, như từ 100 tới 144, từ 155 tới 170, từ 197 tới 200, v.v., đều có thể được đưa ra một cách rõ ràng. Đối với các khoảng chứa các giá trị dưới một hoặc chứa các phân số lớn hơn một (ví dụ 1,1, 1,5, v.v.), thì một đơn vị như 0,0001, 0,001, 0,01 hoặc 0,1 sẽ được xem là thích hợp. Đối với các khoảng chứa các số đếm dưới mười (ví dụ từ 1 tới 5), thì một đơn vị thường được xem là 0,1. Đây chỉ là các ví dụ cụ thể được dự định, và tất cả các kết hợp của các giá trị số nằm giữa giá trị thấp nhất và giá trị cao nhất được đưa ra, sẽ được xem là được tuyên bố rõ ràng trong Phần mô tả. Không kể những vấn đề khác, các khoảng số được đưa ra trong Phần mô tả cho các hàm lượng tương đối của các thành phần trong một hỗn hợp, và các khoảng nhiệt độ khác nhau và các khoảng thông số khác được đề cập trong Phần mô tả.

Thuật ngữ "cung cấp" chỉ tác động đưa ít nhất một chủng và/hoặc dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy của ít nhất một chủng theo sáng chế vào đường dạ dày ruột của động vật. Cụ thể hơn, việc cung cấp này là cung cấp qua đường miệng. Đặc biệt, việc cung cấp này có thể được tiến hành bằng cách bổ sung vào thức ăn cho động vật ít nhất một chủng, thức ăn đã được bổ sung như vậy sau đó được tiêu hóa bởi động vật này. Việc cung cấp cũng có thể được tiến hành nhờ sử dụng ống thông dạ dày hoặc cách thức khác bất kỳ để có thể đưa trực tiếp ít nhất một chủng vào đường dạ dày ruột của động vật.

Thuật ngữ "ít nhất một chủng" chỉ cho một chủng duy nhất nhưng cũng có thể là để chỉ cho hỗn hợp của các chủng gồm ít nhất hai chủng vi khuẩn. Thuật ngữ "hỗn hợp của ít nhất hai chủng" chỉ hỗn hợp của hai, ba, bốn, năm, sáu chủng hoặc thậm chí là nhiều hơn nữa. Theo một số phương án về hỗn hợp của các chủng, các tỷ lệ có thể thay đổi nằm trong khoảng từ 1% đến 99%. Theo các phương án nhất định, tỷ lệ của một chủng được sử dụng trong hỗn hợp này ít nhất là 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95%. Các phương án khác về hỗn hợp của các chủng

là nằm trong khoảng từ 25% đến 75%. Các phương án bổ sung về hỗn hợp của các chủng là khoảng 50% cho mỗi chủng. Khi hỗn hợp chứa trên hai chủng, thì các chủng có thể có mặt với tỷ lệ gần như tương đương trong hỗn hợp này hoặc với các tỷ lệ khác nhau.

Thuật ngữ “tiếp xúc” chỉ tác động mang ít nhất một chủng và/hoặc dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy của ít nhất một chủng được mô tả ở đây vào sát với chất nền, vật chứa, hoặc chất nền, chúng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bề chứa phân. Theo một số phương án, bề chứa phân là hầm phân. Việc tiếp xúc này có thể là theo kiểu trực tiếp hoặc gián tiếp. Khi được sử dụng trong Phần mô tả, việc tiếp xúc bao gồm phủ, phun, tiêm, phân tán, rót, và các thuật ngữ tương tự khác.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" chỉ lượng chủng và/hoặc dịch nổi trên bề mặt đủ để cho phép cải thiện ít nhất một trong số các dấu hiệu: hiệu quả sản xuất động vật, các đặc tính thân thịt, hiệu suất tăng trưởng của động vật, hiệu suất tăng trưởng khi cho động vật ăn DDGS ở mức độ cao, khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng, các hậu quả do các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, hiệu suất tăng trưởng của gia cầm, hiệu suất tăng trưởng của lợn, hiệu quả thức ăn, tăng trọng trung bình ngày, lượng ăn trung bình ngày, chỉ số tăng trọng:thức ăn theo thể trọng hoặc hấp thụ chỉ số thức ăn:tăng trọng, và đạo đức.

Theo các phương án khác, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” chỉ lượng chủng và/hoặc dịch nổi trên bề mặt đủ để cho phép cải thiện về ít nhất một trong số các dấu hiệu: các vấn đề về phân thải, lượng tạo bọt trong bề chứa phân, sinh thái học vi sinh của bề chứa phân, hàm lượng các axit béo dễ bay hơi trong bề chứa phân, hàm lượng sinh khí trong chuồng nuôi các động vật hoặc bề chứa phân, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở metan và hydro sulfua.

Theo một phương án khác, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” chỉ lượng chủng giống và/hoặc dịch nổi trên bề mặt đủ để cho phép cải thiện về ít nhất một trong số các dấu hiệu: sự biểu hiện của gen được bao gồm trong đáp ứng viêm, sự biểu hiện của protein được bao gồm trong đáp ứng viêm, và hoạt tính protein được bao gồm trong đáp ứng viêm.

Khi được sử dụng trong Phần mô tả, thuật ngữ "năng suất" dùng để chỉ sự tăng trưởng của một động vật, như lợn hoặc gia cầm, được đo bằng một hoặc nhiều thông số sau: tốc độ tăng trưởng bình quân ngày (ADG), thể trọng, mức bài tiết, tỷ lệ tử vong, sự chuyển hóa thức ăn, chúng bao gồm cả các chỉ số chỉ số thức ăn:tăng trọng và chỉ số tăng trọng:thức ăn, và hấp thụ thức ăn. Thuật ngữ "cải thiện về năng suất" hoặc "năng suất được cải thiện" khi được sử dụng trong Phần mô tả, được dùng để chỉ sự cải thiện ít nhất là một trong số các dấu hiệu đã liệt kê khi xác định năng suất.

Khi được sử dụng trong Phần mô tả, thuật ngữ "thể biến dị" có độ tương đồng của các trình tự di truyền ít nhất là 80% với các chủng được đề cập bằng cách áp dụng phép phân tích phản ứng chuỗi polymeraza ADN đa hình được khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD-PCR). Mức độ tương đồng của các trình tự di truyền này có thể thay đổi. Theo một số phương án, thể biến dị có độ tương đồng của các trình tự di truyền ít nhất là 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với các chủng được đề cập nhờ sử dụng phép phân tích RAPD-PCR. Sáu đoạn môi có thể được sử dụng cho phép phân tích RAPD-PCR bao gồm các đoạn môi sau đây: đoạn môi 1 (5'-GGTGCGGGAA-3') (SEQ ID NO. 1); đoạn môi 2 (5'-GTTTCGCTCC-3') (SEQ ID NO. 2); đoạn môi 3 (5'-GTAGACCCGT-3') (SEQ ID NO. 3); đoạn môi 4 (5'-AAGAGCCCGT-3') (SEQ ID NO. 4); đoạn môi 5 (5'-AACGCGCAAC-3') (SEQ ID NO. 5); và đoạn môi 6 (5'-CCCGTCAGCA-3') (SEQ ID NO. 6). Phép phân tích RAPD có thể được thực hiện bằng cách sử dụng Ready-to-GoTM RAPD Analysis Beads (Amersham Biosciences, Sweden), nó được thiết kế dưới dạng các phản ứng trộn trước, phân tán trước cho việc thực hiện phân tích RAPD.

Các tác giả sáng chế đã thấy rằng các chủng *Bacillus* nhất định có hoạt tính enzym để phá vỡ các sợi, lipid, hydrat cacbon, và protein. Các chủng này được nhắc đến trong Phần mô tả là các "chủng sản xuất enzym", "chủng *Bacillus*" hoặc "chủng". Theo một số phương án, có hoạt tính enzym gồm celulaza, α -amylaza, xylanaza, esteaza, casein proteaza, amylaza bột ngô, β -mannanaza, lipaza, và/hoặc proteaza, ví dụ zeinaza và proteaza đậu tương.

Các tác giả sáng chế đã thấy rằng các vi sinh vật nhất định có thể được sử dụng để giải quyết các vấn đề liên quan tới các thành phần trong các hạt bã rượu khô cùng với chất tan (DDGS).

Các tác giả sáng chế cũng đã thấy rằng các chủng sản xuất enzym có thể cải thiện ít nhất một trong số các dấu hiệu: (1) các hậu quả do các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, (2) các vấn đề về phân thải; (3) hiệu quả sản xuất động vật; (4) các đặc tính thân thịt động vật, (5) hiệu suất tăng trưởng của động vật. Sáng chế cũng mô tả các tác dụng đáp ứng viêm.

Các chủng sản xuất enzym

Các chủng sản xuất enzym bao gồm các chủng *Bacillus*, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chủng *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. brevis*, *B. alkalophilus*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis* và *B. lentus*, và các chủng có toàn bộ đặc tính của nó, dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

Theo ít nhất một số phương án, chủng *B. subtilis* là *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, và *Bacillus subtilis* AGTP 944, và các chủng có toàn bộ đặc tính của nó, dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, chủng *B. pumilus* là *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 và *Bacillus pumilus* KX11-1, và các chủng có toàn bộ đặc tính của nó, dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

Các chủng này đã được lưu ký bởi Danisco USA, Inc. of Waukesha, Wisconsin at the Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Ill., 61604. Ngày lưu ký ban đầu và số truy cập là như sau: *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, Ngày 13/5/2011 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442, Tháng 4, 2011 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521, Tháng 4, 2011 (NRRL B-50545), *Bacillus subtilis* AGTP BS918, Ngày 13/5/2011 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, Ngày

13/5/2011 (NRRL B-50509), *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, Tháng 4, 2011 (NRRL B-50544), *Bacillus subtilis* AGTP 944, Ngày 11/8/2011 (NRRL B-50548), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068, Tháng 4, 2011 (NRRL B-50543), and *Bacillus pumilus* KX11-1, Ngày 5/8/2011 (NRRL B-50546). Tất cả các lưu ký này được nộp theo quy định của Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms cho quy trình xét nghiệm patent.

Theo một số phương án, các chủng sản xuất enzym có hoạt tính enzym bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở celulaza, α -amylaza, xylanaza, esteraza, casein proteaza, amylaza tinh bột ngũ cốc, β -mananaza, lipaza, và/hoặc proteaza, ví dụ zeinaza và proteaza đậu tương.

Theo ít nhất một số phương án, nhiều chủng được mô tả ở đây được kết hợp.

Dẫn xuất hoặc thể biến dị *Bacillus* bất kỳ cũng được đề xuất và là hữu ích cho các phương pháp theo sáng chế. Theo một số phương án, các chủng có toàn bộ đặc tính của *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 và *Bacillus pumilus* KX11-1 cũng được đề xuất và là hữu ích cho các phương pháp theo sáng chế.

Theo các phương án nhất định, dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068, và *Bacillus pumilus* KX11-1 cũng được đề xuất và là hữu ích cho các phương pháp theo sáng chế.

Theo ít nhất một số phương án, (các) chủng sản xuất enzym được sử dụng ở dạng kết hợp. Theo một phương án, các chủng sản xuất enzym có thể được sử dụng kết hợp với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, và các chủng vi khuẩn khác thuộc một chi khác.

Theo ít nhất một số phương án, (các) chủng sản xuất enzym và các phương pháp được đề xuất theo sáng chế để cải thiện một hoặc nhiều dấu hiệu sau: các

hậu quả do các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, các vấn đề về phân thải, hiệu quả sản xuất, các đặc tính thân thịt, và năng suất khi cho ăn DDGS ở mức độ cao khi so sánh với đối chứng.

Các vấn đề về phân thải bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thành phần vi sinh và chất dinh dưỡng trong phân không được mong muốn, và sự phát thải khí không được mong muốn từ bể chứa phân, như các hầm phân. Sự cải thiện về các vấn đề về phân thải bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất một trong số (1) ít chất dinh dưỡng tích tụ trong phân, (2) làm thay đổi các cộng đồng vi sinh vật trong phân thành các quần thể có lợi cho sự phân hủy phân, và (3) giảm về sự phát thải khí amoniac, metan, và hydro sulfua.

Sự cải thiện về các đặc tính thân thịt có thể được đánh giá bởi ít nhất là một trong số các dấu hiệu tăng phần trăm năng suất, tỷ lệ phần trăm thịt mót hàm, và giảm các giá trị iot trong chất béo. Năng suất có thể được xác định bởi sự tăng trọng trung bình ngày, lượng ăn trung bình ngày, và thức ăn cần thiết cho một đơn vị tăng trọng, và các số đo khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Khi được tiêu hóa, (các) chủng sản xuất enzym tạo ra các enzym. Theo một số phương án, (các) chủng sản xuất enzym tạo ra các enzym *in vivo*. Theo các phương án khác, (các) chủng sản xuất enzym tồn tại trong phân của các động vật mà chủng này được cung cấp và tạo ra các enzym trong phân được bài tiết.

Các phương pháp nuôi cấy chủng

Các chủng *Bacillus* được tạo ra bởi quá trình lên men các chủng vi khuẩn. Quá trình lên men có thể được bắt đầu bởi việc nhân giống giống nuôi cấy mầm. Công đoạn này bao gồm việc biến đổi lặp lại và vô trùng giống nuôi cấy thành một thể tích ngày càng lớn hơn để dùng làm nguyên liệu nuôi cấy cho quá trình lên men, quá trình lên men này được tiến hành trong bình lên men bằng thép không gỉ lớn trong môi trường chứa các protein, các hydrat cacbon, và các khoáng chất cần thiết cho sự phát triển tối ưu. Môi trường điển hình được lấy làm ví dụ là TSB. Sau khi nguyên liệu nuôi cấy được bổ sung vào bình lên men, nhiệt độ và sự khuấy được đối chứng để cho phép phát triển tối đa. Sau khi giống nuôi cấy đạt mật độ quần thể tối đa, giống nuôi cấy được thu hoạch bằng cách tách các tế bào

ra khỏi môi trường lên men. Việc này thường được thực hiện bằng cách quay ly tâm.

Số đếm của giống nuôi cấy có thể sau đó được xác định. CFU hoặc đơn vị tạo khuẩn lạc là số đếm tế bào có thể thấy được của mẫu được tạo ra từ các phương pháp phủ đĩa vi sinh tiêu chuẩn. Thuật ngữ này có nguồn gốc từ thực tế là một tế bào đơn khi được dàn trên môi trường thích hợp sẽ tăng trưởng và trở thành một khuẩn có thể thấy được trong môi trường agar. Do nhiều tế bào có thể tạo nên một khuẩn lạc có thể thấy được, nên thuật ngữ đơn vị tạo khuẩn lạc là một đơn vị đo lường hữu dụng hơn so với số đếm tế bào.

Theo một phương án, mỗi chủng *Bacillus* được lên men với mức độ nằm trong khoảng từ 5×10^8 CFU/ml đến 4×10^9 CFU/ml. Theo ít nhất một phương án, mức độ 2×10^9 CFU/ml được sử dụng. Vi khuẩn được thu hoạch bằng cách quay ly tâm, và dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ. Dịch nổi trên bề mặt có thể được sử dụng theo các phương pháp được mô tả ở đây. Theo ít nhất một số phương án, vi khuẩn được tạo viên tròn. Theo ít nhất một số phương án, vi khuẩn được làm đông khô nhanh. Theo ít nhất một số phương án, vi khuẩn được trộn với chất mang. Tuy nhiên, không nhất thiết phải làm đông khô nhanh *Bacillus* trước khi sử dụng chúng. Các chủng này cũng có thể được sử dụng cùng với hoặc không cùng với các chất bảo quản, và ở dạng đã cô, không được cô, hoặc đã được pha loãng.

DFM và các phương pháp điều chế DFM

Chế phẩm gồm một hoặc nhiều chủng được mô tả ở đây được đề xuất. Chế phẩm này có thể được cho động vật ăn ở dạng vi sinh vật ăn trực tiếp (DFM). Một hoặc nhiều chất mang hoặc thành phần khác có thể được bổ sung vào DFM. DFM có thể được trình bày dưới các dạng vật lý khác nhau, ví dụ, ở dạng vỏ bọc ngoài, dưới dạng cô đặc tan trong nước để sử dụng ở dạng tấm chất lỏng hoặc để bổ sung vào sữa thay thế, bao nang gelatin, hoặc gel. Theo một phương án của dạng vỏ bọc ngoài, sản phẩm lên men bằng vi khuẩn đông khô được bổ sung vào chất mang, như nước sữa, maltodextrin, sucroza, đextroza, đá vôi (canxi cacbonat), vỏ trấu, giống nuôi cấy men, tinh bột khô, và/hoặc natri silico aluminat.

Theo một phương án về dạng cô đặc tan trong nước để tẩm chất lỏng hoặc bổ sung chất thay thế sữa, sản phẩm lên men bằng vi khuẩn đông khô được bổ sung vào chất mang tan trong nước, như nước sữa, maltodextrin, sucroza, đextroza, tinh bột khô, natri silico aluminat, và chất lỏng được bổ sung để tạo ra chất tẩm ướt hoặc chất bổ sung được bổ sung vào sữa hoặc chất thay thế sữa. Theo một phương án về dạng bao nang gelatin, sản phẩm lên men bằng vi khuẩn đông khô được bổ sung vào chất mang, như nước sữa, maltodextrin, đường, đá vôi (canxi cacbonat), vỏ trấu, giống nuôi cấy men tinh bột khô, và/hoặc natri silico aluminat. Theo một phương án, vi khuẩn và chất mang được bọc trong bao nang gelatin có thể phân hủy được. Theo một phương án về dạng gel, sản phẩm lên men bằng vi khuẩn đông khô được bổ sung vào chất mang, như dầu thực vật, sucroza, silic đioxit, polysorbat 80, propylen glycol, hydroxylanisol đã butyl hóa, axit xitric, etoxyquin, và/hoặc chất màu nhân tạo để tạo ra gel.

Tùy ý, các chủng này có thể được trộn với chế phẩm khô gồm các chất phụ gia bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các chất tăng trưởng, enzym, đường, hydrat cacbon, các phần chiết và các thành phần vi lượng thúc đẩy tăng trưởng. Đường có thể bao gồm các đường sau: lactoza; maltoza; đextroza; malto-dextrin; glucoza; fructoza; manosa; tagatoza; sorboza; rafinoza; và galactoza. Đường này với lượng nằm trong khoảng 50-95%, hoặc là riêng biệt hoặc ở dạng kết hợp. Các phần chiết có thể bao gồm men hoặc các chất tan quá trình lên men bằng nấm men khô với lượng nằm trong khoảng 5-50%. Các chất tăng trưởng có thể bao gồm: trypticaza, với lượng nằm trong khoảng 5-25%; natri lactat, với lượng nằm trong khoảng 5-30%; và, Tween 80, với lượng nằm trong khoảng 1-5%. Các hydrat cacbon có thể bao gồm manitol, sorbitol, adonitol và arabitol. Các hydrat cacbon này với lượng nằm trong khoảng 5-50% ở dạng riêng biệt hoặc dưới dạng kết hợp. Các thành phần vi lượng có thể bao gồm các thành phần sau: canxi cacbonat, với lượng nằm trong khoảng 0,5-5,0%; canxi clorua, với lượng nằm trong khoảng 0,5-5,0%; đikali phosphat, với lượng nằm trong khoảng 0,5-5,0%; canxi phosphat, với lượng nằm trong khoảng 0,5-5,0%; mangan proteinat, với lượng nằm trong khoảng 0,25-1,00%; và, mangan, với lượng nằm trong khoảng 0,25-1,0%.

Để điều chế các DFM theo sáng chế, các giống nuôi cấy và các chất mang (khi được sử dụng) có thể được bổ sung vào máy trộn kiểu băng truyền hoặc kiểu mái chèo và được trộn trong khoảng 15 phút, mặc dù khoảng thời gian này có thể là dài hơn hoặc ngắn hơn. Các thành phần này được trộn để sao cho tạo ra hỗn hợp đồng nhất của giống nuôi cấy và các chất mang. Tốt hơn, nếu sản phẩm cuối là bột có thể chảy được, khô. Sau đó, các chủng này có thể được bổ sung vào thức ăn cho động vật hoặc hỗn hợp sơ chế thức ăn, được bổ sung vào nước uống của động vật, hoặc được cấp các cách khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thức ăn cho động vật có thể được bổ sung một hoặc nhiều chủng theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế.

DFM được đề xuất theo sáng chế có thể được cấp, ví dụ, dưới dạng dung dịch nuôi cấy chứa chủng vi khuẩn, dịch nổi trên bề mặt sản xuất chủng vi khuẩn, hoặc sản phẩm vi khuẩn của dung dịch nuôi cấy.

Việc cung cấp DFM được đề xuất theo sáng chế cho động vật có thể làm tăng năng suất của động vật. Theo một phương án, việc cung cấp DFM được đề xuất theo sáng chế cho động vật có thể làm tăng lượng ăn trung bình ngày (ADFI), tốc độ tăng trưởng bình quân ngày (ADG), hoặc hiệu quả thức ăn (chỉ số tăng trọng:thức ăn; G:F hoặc chỉ số thức ăn:tăng trọng; F:G) (tập hợp lại là, “thang đo năng suất”). Một hoặc nhiều thang đo năng suất có thể được cải thiện.

DFM có thể được cung cấp cho động vật theo một trong nhiều cách. Ví dụ, các chủng có thể được cung cấp ở dạng rắn như một được phẩm thú y, có thể được phân bổ trong một tá được, tốt hơn là nước, và cho động vật ăn trực tiếp, có thể được trộn vật lý vật liệu thức ăn ở dạng khô, hoặc các chủng có thể được tạo ra thành một dung dịch và sau đó được phun lên vật liệu thức ăn. Phương pháp cung cấp các chủng cho động vật được xem là nằm trong phạm vi hiểu biết của chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các phương pháp cung cấp cho động vật

Theo một phương án, các chủng có thể được cung cấp với lượng hữu hiệu cho các động vật. Theo ít nhất một số phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm việc cung cấp cho động vật lượng hữu hiệu của (các) chủng sản

xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, hoặc thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một phương án, động vật này là lợn. Theo một phương án khác, động vật này là gia cầm. Theo một phương án khác nữa, động vật này là động vật nhai lại.

Việc cung cấp một hoặc nhiều chủng sản xuất enzym cho các động vật được thực hiện bởi phương pháp thông thường bất kỳ, bao gồm việc bổ sung các chủng vào nước uống của động vật, vào thức ăn của chúng, hoặc vào ổ nằm, hoặc bởi việc ăn thẳng qua đường miệng, như bởi sự khí dung hoặc bằng cách tiêm.

Theo một phương án khác, việc cung cấp một hoặc nhiều chủng sản xuất enzym bằng cách phun xịt các chủng sản xuất enzym vào động vật. Động vật này có thể liếm hoặc rửa lông và ăn vào bụng các chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án, các chủng *Bacillus* được cung cấp dưới dạng các bào tử.

Khi được trong Phần mô tả, thuật ngữ “động vật” bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, người, động vật có vú, động vật lưỡng cư, chim, loài bò sát, heo, lợn, bò, gia súc, dê, ngựa, cừu, gia cầm, và các động vật khác được nuôi giữ hoặc chăn thả trong trang buồng hoặc buồng gia súc, cừu, cừu sừng lớn, trâu, linh dương, bò, lừa, la, hươu, hươu sừng tấm, tuần lộc, trâu nước, lạc đà, llama, anpaca, thỏ, chuột nhắt, chuột, chuột lang, chuột đồng, chồn, chó, mèo, và các vật nuôi khác, động vật linh trưởng, khỉ, vượn, và khỉ đột.

Theo một số phương án, động vật là các loài chim ở các độ tuổi khác nhau, như mới sinh, ra ràng và già. Theo các phương án nhất định, động vật gồm gia cầm và chim lạ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gà, gà tây, ngỗng, vịt, gà sao, gà mái tơ, gà mái, gà trống (còn được gọi là gà nòi), gà trống, và gà trống thiên.

Theo một số phương án, các động vật gồm lợn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lợn con, lợn giống, lợn nái, lợn cái, lợn đực giống, lợn con đang bú, và lợn thành phẩm. Các chủng này có thể được cho lợn nái ăn trong thời kỳ đang cho con bú, mặc dù các chủng này có thể được cho ăn trong các thời kỳ khác nhau và ở các thời điểm khác nhau. Theo các phương án nhất định, các chủng này được

cung cấp cho lợn con bởi việc cho cho lợn nái hoặc lợn nái tơ ăn chủng này. Điều được tin chắc là sự chuyển giao từ sang lợn con từ lợn nái là đạt được qua đường miệng-bú và/hoặc qua các đường khác.

Các chủng sản xuất enzym có thể được cung cấp cho động vật để cải thiện ít nhất một trong số khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng, năng suất tăng trưởng của lợn, các đáp ứng hiệu suất tăng trưởng của gia cầm, hiệu quả thức ăn (chỉ số tăng trọng:thức ăn hoặc chỉ số thức ăn:tăng trọng), thể trọng, hấp thụ thức ăn, tăng trọng trung bình ngày, lượng ăn trung bình ngày, các hậu quả do các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, hiệu quả sản xuất gia cầm, hiệu quả sản xuất lợn, và tỷ lệ tử vong. Các lợi ích này có thể đặc biệt hữu ích khi khẩu phần ăn chứa DDGS ở mức độ cao được cho ăn. Vào lúc đầu, DDGS chiếm từ 0% tới 10% khẩu phần ăn của động vật. Hiện thời, DGGS chiếm từ 30% tới 60%.

Mức độ cải thiện có thể được xác định như được mô tả ở đây hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Lượng hữu hiệu có thể được cung cấp cho động vật bằng cách cung cấp cho ăn tự do thức ăn chứa DFM. DFM cũng có thể được cung cấp với một hoặc nhiều liều.

Theo các phương án nhất định, mức độ cải thiện ít nhất là 1-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc lớn hơn 99% so với đối chứng không được xử lý.

Theo ít nhất một số phương án, mức độ cải thiện trong các phép đo mà trong đó động vật được cung cấp các chủng này ít nhất là 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, và lớn hơn 99% so với động vật đối chứng.

Theo các phương án khác, mức độ cải thiện trong các phép đo ở động vật được cung cấp các chủng này là 2-8% so với động vật đối chứng. Theo một vài phương án khác, mức độ cải thiện trong các phép đo ở động vật được cung cấp các chủng này ít nhất là 8% so với động vật đối chứng.

Theo một số phương án, động vật đối chứng là động vật không được cung cấp các chủng sản xuất enzym.

Lượng hữu hiệu có thể được cung cấp cho động vật với một hoặc nhiều liều. Theo một số phương án, một hoặc nhiều chủng *Bacillus* được bổ sung vào thức ăn của động vật với tỷ lệ ít nhất là 1×10^4 CFU/động vật/ngày.

Theo một phương án, việc cung cấp này cải thiện ít nhất một trong số khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng, các đáp ứng hiệu suất tăng trưởng, ví dụ, hiệu quả thức ăn, các hậu quả do các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, hiệu quả sản xuất, sự tăng cân, hấp thụ thức ăn, và tỷ lệ tử vong.

Theo các phương án nhất định của phương pháp theo sáng chế, các chủng được cung cấp với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1×10^5 CFU/động vật/ngày đến 1×10^{11} CFU/động vật/ngày. Theo một số phương án, động vật này là lợn. Theo một phương án khác, động vật này là gia cầm.

Theo ít nhất một số phương án, phương pháp được sử dụng khi động vật được ăn mức độ cao các bã rơm khô cùng với các chất tan (DDGS). DDGS ở mức độ cao có thể là với tỷ lệ trên 10% khẩu phần ăn của động vật. DDGS ở mức độ cao cũng có thể là với tỷ lệ trên 30% khẩu phần ăn của động vật.

Theo ít nhất một số phương án, lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng vi khuẩn được cung cấp cho động vật bởi việc bổ sung vào thức ăn được dự liệu để cho động vật với lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng vi khuẩn. Khi được sử dụng trong Phần mô tả, thuật ngữ "bổ sung" chỉ tác động kết hợp lượng hữu hiệu của vi khuẩn theo sáng chế trực tiếp vào thức ăn được dự liệu để cho động vật. Vì vậy, động vật, khi cho ăn, sẽ tiêu hóa vi khuẩn được đề xuất theo sáng chế.

Các chủng sản xuất enzym có thể được cung cấp dưới dạng chủng đơn hoặc dưới dạng nhiều chủng. Dịch nổi trên bề mặt của một hoặc nhiều các chủng sản xuất enzym có thể được cung cấp cho động vật. Khi được tiêu hóa, các chủng sản xuất enzym tạo ra các enzym.

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều chủng sản xuất enzym được cho lợn ăn. Một hoặc nhiều chủng sản xuất enzym giải quyết các vấn đề liên quan đến các thành phần trong các bã rượu khô cùng với các chất tan (DDGS).

Theo một phương án, (các) chủng sản xuất enzym được bổ sung vào thức ăn cho động vật với tỷ lệ 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} và lớn hơn 1×10^{13} CFU trên 1 gam thức ăn cho động vật.

Theo một phương án khác, (các) chủng sản xuất enzym được bổ sung vào thức ăn cho động vật với tỷ lệ 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} và lớn hơn 1×10^{13} CFU cho động vật mỗi ngày.

Theo một phương án, một hoặc nhiều chủng *Bacillus* được bổ sung vào thức ăn cho lợn với tỷ lệ khoảng $3,75 \times 10^5$ CFU trên 1 gam thức ăn. Cũng có thể cho ăn với tỷ lệ khoảng 1×10^4 to khoảng 1×10^{11} CFU/động vật/ngày. Theo một số phương án, cho ăn một hoặc nhiều chủng *Bacillus* với tỷ lệ khoảng 1×10^8 CFU/động vật/ngày.

Đối với động vật nhai lại, cho ăn một hoặc nhiều chủng *Bacillus* với tỷ lệ khoảng 5×10^9 CFU/hd/ngày.

Đối với gia cầm, một hoặc nhiều chủng *Bacillus* được bổ sung vào thức ăn với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1×10^4 CFU/g thức ăn đến 1×10^{10} CFU/g thức ăn. Theo ít nhất một số phương án, cho ăn một hoặc nhiều chủng *Bacillus* với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1×10^5 CFU/chim/ngày đến 1×10^8 CFU/chim/ngày.

Vật liệu thức ăn

Theo một phương án khác, thức ăn cho động vật chứa ít nhất một chủng vi khuẩn được đề xuất theo sáng chế. Theo ít nhất một số phương án, thức ăn được bổ sung lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng vi khuẩn. Khi được sử dụng trong Phần mô tả, thuật ngữ "bổ sung" chỉ tác động kết hợp lượng hữu hiệu vi khuẩn được đề xuất theo sáng chế trực tiếp vào thức ăn được dự liệu để cho động vật. Vì vậy, động vật, khi cho ăn, sẽ tiêu hóa vi khuẩn được đề xuất theo sáng chế.

Khi được sử dụng kết hợp với vật liệu thức ăn, cho các khẩu phần năn qua đường dạ dày, vật liệu thức ăn này có thể bao gồm ngô, bột đậu tương, các sản phẩm phụ như bã rượu khô cùng với các chất tan (DDGS), và các chất bổ sung vitamin/khoáng chất. Vật liệu thức ăn cho động vật nhai lại có thể là ngô hoặc cỏ khô hoặc thức ăn ủ chua hoặc cỏ, hoặc sự kết hợp của chúng. Bao gồm trong số các vật liệu thức ăn như vậy gồm ngô, hạt khô, cỏ linh lăng, thành phần thức ăn bất kỳ và các sản phẩm phụ công nghiệp thực phẩm hoặc thức ăn cũng như các sản phẩm phụ công nghiệp nhiên liệu sinh học và bột ngô và hỗn hợp của chúng. Các vật liệu thức ăn khác cũng có thể được sử dụng.

Thời gian cung cấp có thể thay đổi miễn là có sự cải thiện được chỉ ra trên một hoặc nhiều dấu hiệu sau: (1) các hậu quả do các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, (2) khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng, (3) các vấn đề về phân thải, (4) hiệu quả sản xuất, (5) các đặc tính thân thịt, (6) hiệu suất tăng trưởng, (7) hiệu suất tăng trưởng khi cho ăn DDGS ở mức độ cao, (8) các đáp ứng hiệu suất tăng trưởng của gia cầm, (9) các đáp ứng hiệu suất tăng trưởng của lợn, (10) hiệu quả sản xuất gia cầm, (11) hiệu quả sản xuất lợn, (12) sự tăng cân, (13) hấp thụ thức ăn, (14) hiệu quả thức ăn, và (15) tỷ lệ tử vong. Việc cung cấp có thể với thời gian bất kỳ cùng với hoặc không cùng với thức ăn. Tuy nhiên, tốt hơn nếu vi khuẩn được cung cấp cùng với hoặc ngay trước khi ăn.

Các phương pháp cải thiện hiệu suất tăng trưởng của động vật

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện hiệu suất tăng trưởng của động vật bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều các chủng sản xuất enzyme hoặc dịch nổi trên bề mặt của nó để cải thiện hiệu suất tăng trưởng của động vật so với động vật không được cung cấp các chủng sản xuất enzyme. Theo một phương án, động vật này là lợn. Theo một phương án khác, động vật này là gia cầm. Theo một phương án khác, động vật này là động vật nhai lại.

Theo một phương án, hiệu suất tăng trưởng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng, các đáp ứng hiệu suất tăng trưởng của gia cầm, hiệu suất tăng trưởng của lợn các đáp ứng, hiệu quả thức ăn, các hậu quả do các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, tăng trọng trung bình ngày, hấp thụ

thức ăn trung bình ngày, sự tăng cân, hấp thụ thức ăn, các đặc tính thân thịt và tỷ lệ tử vong. Theo một phương án khác nữa, các phương pháp theo sáng chế được sử dụng để cải thiện hiệu suất tăng trưởng của động vật ăn thức ăn cho động vật chứa DDGS.

Theo các phương án nhất định, mức độ cải thiện về hiệu suất tăng trưởng ít nhất là 1-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc lớn hơn 99% so với đối chứng không được xử lý.

Theo ít nhất một số phương án, mức độ cải thiện về hiệu suất tăng trưởng của động vật được cấp chủng này ít nhất là 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, và lớn hơn 99% so với động vật đối chứng.

Theo một phương án, các chủng sản xuất enzym để cải thiện hiệu suất tăng trưởng của động vật bao gồm chủng *Bacillus*. Theo một phương án, chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis*. Theo một phương án khác, chủng *Bacillus* là *Bacillus pumilus*.

Theo một phương án khác, các chủng sản xuất enzym để cải thiện hiệu suất tăng trưởng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 và *Bacillus pumilus* KX11-1, và các chủng có toàn bộ đặc tính của nó, dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

Các chủng sản xuất enzym để cải thiện hiệu suất tăng trưởng của động vật có thể được cung cấp dưới dạng chủng đơn, một hoặc nhiều sự kết hợp của các

chúng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng.

A. Khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng khả năng tiêu hóa của thức ăn cho động vật bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzyme cho động vật với lượng có hiệu quả để làm tăng khả năng tiêu hóa của thức ăn cho động vật so với động vật không được cung cấp chủng sản xuất enzyme này. Theo một phương án khác, phương pháp này còn bao gồm việc xác định lượng các chất dinh dưỡng tích tụ trong hàm phân của động vật được cung cấp chủng sản xuất enzyme này và so sánh lượng các chất dinh dưỡng này với lượng các chất dinh dưỡng trong hàm phân của động vật không được cung cấp chủng sản xuất enzyme. Theo một phương án khác nữa, thức ăn cho động vật chứa DDGS.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng khả năng tiêu hóa của thức ăn cho động vật bao gồm việc cung cấp cho động vật thức ăn có bổ sung chủng sản xuất enzyme với lượng có hiệu quả để làm tăng khả năng tiêu hóa của thức ăn cho động vật so với động vật không được cung cấp chủng sản xuất enzyme này.

Theo một phương án, các phương pháp cải thiện hiệu suất tăng trưởng của động vật bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzyme cho động vật, và làm giảm lượng các chất dinh dưỡng không được tiêu hóa bởi động vật so với động vật không được cung cấp chủng sản xuất enzyme này.

Theo một phương án khác, các phương pháp cải thiện hiệu suất tăng trưởng của động vật bao gồm việc làm giảm lượng các chất dinh dưỡng không được tiêu hóa bởi động vật bằng cách cho động vật sử dụng chủng sản xuất enzyme so với động vật không được cung cấp chủng sản xuất enzyme này.

Theo một phương án khác, các phương pháp cải thiện hiệu suất tăng trưởng của động vật bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzyme cho động vật, xác định lượng các chất dinh dưỡng tích tụ trong hàm phân của động vật được cung cấp chủng sản xuất enzyme này, và so sánh lượng các chất dinh dưỡng trong hàm phân của động vật được cung cấp các chủng sản xuất enzyme với lượng các chất

dinh dưỡng trong hàm phân thứ hai của động vật không được cung cấp chủng sản xuất enzym.

Theo một phương án, khả năng tiêu hóa của thức ăn cho động vật có thể được đánh giá bởi lượng các chất dinh dưỡng trong hàm phân. Chất dinh dưỡng bất có thể được xác định trong hàm phân bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chất khô, tro, tổng nitơ, amoni nitơ, phospho và canxi.

Các chủng sản xuất enzym để cải thiện khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng có thể được cung cấp dưới dạng chủng đơn, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng.

B. Hiệu suất tăng trưởng của gia cầm

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng hiệu suất tăng trưởng của gia cầm bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho gia cầm với lượng có hiệu quả để làm tăng hiệu suất tăng trưởng của gia cầm so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này. Các phương pháp được đề xuất theo sáng chế có thể được sử dụng để cải thiện hiệu suất tăng trưởng không phụ thuộc vào thức ăn hoặc khẩu phần ăn của gia cầm.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng hiệu suất tăng trưởng ở gia cầm được cho ăn khẩu phần ăn có hàm lượng sản phẩm phụ xơ cao bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho gia cầm, nó được cho ăn khẩu phần ăn có hàm lượng sản phẩm phụ xơ cao, với lượng có hiệu quả để làm tăng hiệu suất tăng trưởng của gia cầm so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng mức tăng trọng trung bình ngày ở gia cầm bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho gia cầm với lượng có hiệu quả để làm tăng mức tăng trọng trung bình ngày của gia cầm so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng lượng ăn trung bình ngày ở gia cầm bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym

cho gia cầm với lượng có hiệu quả để làm tăng lượng ăn trung bình ngày so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện hiệu quả thức ăn của thức ăn cho động vật ở gia cầm bao gồm việc cung cấp cho gia cầm thức ăn cho động vật có bổ sung chủng sản xuất enzym với lượng có hiệu quả để làm tăng hiệu quả thức ăn ở gia cầm so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện các đặc tính thân thịt bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho gia cầm với lượng có hiệu quả để cải thiện các đặc tính thân thịt của gia cầm so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này. Các đặc tính thân thịt có thể được cải thiện bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở độ dày mỡ, trọng lượng các cơ quan, các đặc tính vòng ngực, trọng lượng móc hàm, loại thân thịt, và giá trị thân thịt.

Theo một phương án, giá trị của các đặc tính thân thịt xác định được có thể tăng lên hoặc giảm xuống.

Theo một phương án khác nữa, giá trị của một hoặc nhiều trong số các đặc tính thân thịt xác định được được tăng lên: độ dày mỡ, trọng lượng các cơ quan, các đặc tính vòng ngực, trọng lượng móc hàm, loại thân thịt, và giá trị thân thịt.

Theo một phương án khác nữa, giá trị của một hoặc nhiều trong số các đặc tính thân thịt xác định được được giảm xuống: độ dày mỡ, trọng lượng các cơ quan, các đặc tính vòng ngực, trọng lượng móc hàm, loại thân thịt, và giá trị thân thịt.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm tỷ lệ tử vong ở gia cầm bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho gia cầm với lượng có hiệu quả để làm giảm tỷ lệ tử vong của gia cầm nêu trên so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng tiêu hóa lignin bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho gia cầm với lượng có hiệu quả để cải thiện khả năng tiêu hóa lignin so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng tiêu hóa lignin trong các khẩu phần ăn có hàm lượng xơ cao bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho gia cầm với lượng có hiệu quả để cải thiện khả năng tiêu hóa lignin của các khẩu phần ăn có hàm lượng xơ cao so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này. Theo một phương án khác, các khẩu phần ăn có hàm lượng xơ cao bao gồm các khẩu phần ăn trên cơ sở sản phẩm phụ. Theo một phương án khác nữa, khẩu phần ăn chứa DDGS.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng tiêu hóa biểu kiến trong ruột hồi bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho gia cầm với lượng có hiệu quả để cải thiện khả năng tiêu hóa biểu kiến trong ruột hồi so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng tiêu hóa biểu kiến suốt ống tiêu hóa bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho gia cầm với lượng có hiệu quả để cải thiện khả năng tiêu hóa biểu kiến suốt ống tiêu hóa so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp hạ thấp độ pH của digesta trong ruột hồi bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho gia cầm với lượng có hiệu quả để hạ thấp độ pH của digesta trong ruột hồi so với gia cầm không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác nữa, các phương pháp đề cập ở trên còn bao gồm việc cung cấp thức ăn có bổ sung chủng sản xuất enzym.

Các chủng sản xuất enzym để cải thiện hiệu suất tăng trưởng của gia cầm có thể được cung cấp dưới dạng chủng đơn, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng.

C. Hiệu suất tăng trưởng của lợn

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng hiệu suất tăng trưởng của lợn bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho lợn với lượng có hiệu quả để làm tăng hiệu suất tăng trưởng của lợn so với lợn không

được cung cấp chủng sản xuất enzym này. Các phương pháp được đề xuất theo sáng chế có thể được sử dụng để cải thiện hiệu suất tăng trưởng không phụ thuộc vào thức ăn hoặc khẩu phần ăn của lợn.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng hiệu suất tăng trưởng ở lợn được cho ăn khẩu phần ăn có hàm lượng sản phẩm phụ xơ cao bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho lợn, nó được cho ăn khẩu phần ăn có hàm lượng sản phẩm phụ xơ cao, với lượng có hiệu quả để làm tăng hiệu suất tăng trưởng của lợn so với lợn không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng mức tăng trọng trung bình ngày ở lợn bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho lợn với lượng có hiệu quả để làm tăng mức tăng trọng trung bình ngày của lợn so với lợn không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng lượng ăn trung bình ngày ở lợn bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho lợn với lượng có hiệu quả để làm tăng lượng ăn trung bình ngày so với lợn không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện hiệu quả thức ăn của thức ăn cho động vật ở lợn bao gồm việc cung cấp cho lợn thức ăn cho động vật có bổ sung chủng sản xuất enzym với lượng có hiệu quả để làm tăng hiệu quả thức ăn ở lợn so với lợn không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện các đặc tính thân thịt của lợn bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho lợn với lượng có hiệu quả để cải thiện các đặc tính thân thịt của lợn so với lợn không được cung cấp chủng sản xuất enzym này. Các đặc tính thân thịt có thể được cải thiện bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở độ dày mỡ, độ dày thăn; tỷ lệ phần trăm thịt móc hàm; trọng lượng móc hàm, trọng lượng các cơ quan, loại thân thịt, và giá trị thân thịt.

Theo một phương án, giá trị của các đặc tính thân thịt xác định được có thể tăng lên hoặc giảm xuống.

Theo một phương án khác nữa, giá trị của một hoặc nhiều trong số các đặc tính thân thịt xác định được được tăng lên: độ dày mỡ, độ dày thăn; tỷ lệ phần trăm thịt móc hàm; trọng lượng móc hàm, trọng lượng các cơ quan, loại thân thịt, và giá trị thân thịt.

Theo một phương án khác nữa, giá trị của một hoặc nhiều trong số các đặc tính thân thịt xác định được được giảm xuống: độ dày mỡ, độ dày thăn; tỷ lệ phần trăm thịt móc hàm; trọng lượng móc hàm, trọng lượng các cơ quan, loại thân thịt, và giá trị thân thịt.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm tỷ lệ tử vong ở lợn bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho lợn với lượng có hiệu quả để làm giảm tỷ lệ tử vong ở lợn nêu trên so với lợn không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng tiêu hóa lignin bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho lợn với lượng có hiệu quả để cải thiện khả năng tiêu hóa lignin so với lợn không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng tiêu hóa lignin trong các khẩu phần ăn có hàm lượng xơ cao bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho lợn với lượng có hiệu quả để cải thiện khả năng tiêu hóa lignin của các khẩu phần ăn có hàm lượng xơ cao so với lợn không được cung cấp chủng sản xuất enzym này. Theo một phương án khác, các khẩu phần ăn có hàm lượng xơ cao bao gồm các khẩu phần ăn trên cơ sở sản phẩm phụ. Theo một phương án khác nữa, khẩu phần ăn chứa DDGS.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng tiêu hóa biểu kiến trong ruột hồi bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho lợn với lượng có hiệu quả để cải thiện khả năng tiêu hóa biểu kiến trong ruột hồi ở lợn so với lợn không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng tiêu hóa biểu kiến suốt ống tiêu hóa bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho lợn với lượng có hiệu quả để cải thiện khả năng tiêu hóa biểu kiến

suốt ống tiêu hóa ở lợn so với lợn không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp hạ thấp độ pH của digesta trong ruột hồi bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho lợn với lượng có hiệu quả để hạ thấp độ pH của digesta trong ruột hồi ở lợn so với lợn không được cung cấp chủng sản xuất enzym này.

Theo một phương án khác nữa, các phương pháp đề cập ở trên còn bao gồm việc cung cấp thức ăn có bổ sung chủng sản xuất enzym.

Theo một phương án khác, các chủng sản xuất enzym trong các phương pháp đề cập ở trên liên quan tới hiệu suất tăng trưởng của lợn là chế phẩm chứa các chủng *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) và AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510).

Các chủng sản xuất enzym để cải thiện hiệu suất tăng trưởng của lợn có thể được cung cấp dưới dạng chủng đơn, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng.

Các phương pháp để cải thiện cho bê chứa phân

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp để cải thiện cho bê chứa phân bao gồm việc cung cấp (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng cho động vật với lượng hữu hiệu để cải thiện cho bê chứa phân. Theo một phương án, động vật này là lợn. Theo các phương án nhất định, bê chứa phân là hàm phân.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện chất lượng không khí trong chuồng nuôi động vật bao gồm việc cung cấp (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng cho động vật với lượng hữu hiệu để cải thiện chất lượng không khí trong chuồng này. Theo một phương án, việc cải thiện

chất lượng không khí bao gồm việc giảm bớt các mùi trong chuồng. Theo một phương án khác, việc cải thiện chất lượng không khí bao gồm làm giảm sự sinh ra của một hoặc nhiều chất sau: các axit béo dễ bay hơi, amoniac, metan, hoặc hydro sulfua.

Theo ít nhất một số phương án, việc cung cấp này cải thiện ít nhất một trong số các dấu hiệu: ít tạo bọt, ít tích tụ các chất rắn, và các hàm lượng nitơ, lưu huỳnh, phospho, nitơ gắn với chất xơ, tổng protein, chất béo, và chất xơ ít hơn khi so với hàm phân đối chứng.

Theo một phương án, các chủng sản xuất enzym để cải thiện cho bể chứa phân bao gồm chủng *Bacillus*. Theo một phương án, chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis*. Theo một phương án khác, chủng *Bacillus* là *Bacillus pumilus*.

Theo một phương án khác, các chủng sản xuất enzym để cải thiện bể chứa phân bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 và *Bacillus pumilus* KX11-1, và các chủng có toàn bộ đặc tính của nó, dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện bể chứa phân bao gồm bước cho tiếp xúc (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, chế phẩm chứa một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng trực tiếp với bể chứa phân, như hầm phân. Các cải thiện thu được từ việc tiếp xúc (các) chủng sản xuất enzym trực tiếp với bể chứa phân bao gồm ít nhất một trong số các dấu hiệu ít tạo bọt, ít tích tụ các chất rắn, và các hàm lượng nitơ, lưu huỳnh, phospho, nitơ gắn với chất xơ, tổng protein, chất béo, và chất xơ ít hơn so với các hầm phân đối chứng.

Theo một phương án khác, các phương pháp được mô tả ở trên có thể được sử dụng để cải thiện các vấn đề về phân thải, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, sự tạo bọt trong hầm phân, sự tích tụ các chất rắn, sự gia tăng về các hàm lượng

(a) nitơ, (b) lưu huỳnh, (c) phospho, (d) nitơ gắn kết xơ, (e) tổng protein, (f) chất béo, và (g) xơ.

A. Các phương pháp kiểm soát hoặc khử bọt trong bể chứa phân

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát hoặc khử bọt trong bể chứa phân bao gồm bước cung cấp lượng hữu hiệu của (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng cho động vật với lượng hữu hiệu để đối chứng hoặc khử bọt trong bể chứa phân so với bể chứa phân cho các động vật không được cung cấp các chủng sản xuất enzym. Theo một phương án khác nữa, tỷ lệ bọt:chất lỏng của bể chứa phân được giảm xuống.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát hoặc khử bọt trong hầm chứa bao gồm bước cho tiếp xúc (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, chế phẩm chứa một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng trực tiếp với hầm chứa phân với lượng hữu hiệu để đối chứng hoặc khử bọt trong hầm chứa phân so với hầm chứa phân không có các chủng sản xuất enzym. Theo một phương án khác, tỷ lệ bọt:chất lỏng của bể chứa phân được giảm xuống.

Lượng bọt trong bể chứa phân có liên quan tới hàm lượng các chất rắn trong bể chứa phân. Bể chứa phân có tỷ lệ phần trăm chất rắn cao nói chung sẽ có tỷ lệ bọt:chất lỏng lớn, và vì vậy nhiều bọt hơn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát hoặc khử bọt trong bể chứa phân bao gồm bước cung cấp lượng hữu hiệu của (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng cho động vật với lượng hữu hiệu để làm giảm lượng các chất rắn, và nhờ đó làm giảm lượng bọt, trong bể chứa phân so với bể chứa phân cho các động vật không được cung cấp các chủng sản

xuất enzym. Theo một phương án khác nữa, tỷ lệ bọt:chất lỏng của bể chứa phân được giảm xuống.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát hoặc khử bọt trong bể chứa phân bao gồm bước cho tiếp xúc (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, chế phẩm chứa một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng trực tiếp với bể chứa phân với lượng hữu hiệu để làm giảm lượng các chất rắn trong bể chứa phân so với bể chứa phân không có các chủng sản xuất enzym. Theo một phương án khác, tỷ lệ bọt:chất lỏng của bể chứa phân được giảm xuống.

B. Các phương pháp làm thay đổi hệ sinh thái vi sinh vật trong bể chứa phân

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi hệ sinh thái vi sinh vật trong bể chứa phân bao gồm việc cung cấp (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng cho động vật với lượng hữu hiệu để làm thay đổi sinh thái học vi sinh vật trong bể chứa phân so với bể chứa phân cho các động vật không được cung cấp các chủng sản xuất enzym.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi hệ sinh thái vi sinh vật trong bể chứa phân bao gồm bước cho tiếp xúc (các) chủng sản xuất enzym, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, chế phẩm chứa một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng trực tiếp với bể chứa phân với lượng hữu hiệu để làm thay đổi sinh thái học vi sinh vật trong bể chứa phân so với bể chứa phân mà trong đó các chủng sản xuất enzym không được sử dụng.

Theo một phương án, các chủng sản xuất enzym có thể làm thay đổi, hoặc là trực tiếp hoặc gián tiếp, sinh thái học vi sinh vật trong bể chứa phân và gây ra sự gia tăng về quần thể của các loài vi khuẩn nhất định và sự giảm về quần thể của các loài vi khuẩn khác. Các loài vi khuẩn có thể được làm thay đổi, hoặc là trực tiếp hoặc gián tiếp, bởi các chủng sản xuất enzym bao gồm nhưng không chỉ

giới hạn ở methanogens, bacteroides, Clostridium cluster I, clostridium cluster IV, clostridium cluster XIVa, và vi khuẩn khử sulfat.

Theo một phương án, các chủng sản xuất enzym có khả năng dịch chuyển sự sử dụng chất dinh dưỡng bởi quần thể vi sinh vật và sau đó làm thay đổi sinh thái học vi sinh vật để sao cho các hiện tượng tạo bọt kết tụ được giảm bớt, hoặc là bởi việc giảm bớt sản lượng khí có thể bị bẫy trong mạng bọt, làm thay đổi khả năng sẵn có của các hợp chất phân tử tạo thành mạng bọt, hoặc là ức chế trực tiếp sự phát triển của vi khuẩn đi kèm với các hiện tượng tạo bọt.

C. Các phương pháp làm thay đổi thành phần axit béo dễ bay hơi

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi thành phần axit béo dễ bay hơi trong phân bao gồm bước cung cấp chủng sản xuất enzym cho động vật với lượng hữu hiệu để làm thay đổi thành phần axit béo trong phân của động vật nêu trên so với phân của động vật thứ hai không được cung cấp chủng sản xuất enzym. Theo một phương án, việc làm thay đổi thành phần axit béo có thể dẫn đến sự gia tăng của các axit béo nhất định và sự giảm của các axit béo khác. Theo một phương án khác, việc làm thay đổi thành phần axit béo có thể xảy ra theo kiểu trực tiếp hoặc kiểu gián tiếp.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi thành phần axit béo dễ bay hơi trong bể chứa phân bao gồm bước cung cấp chủng sản xuất enzym cho động vật với lượng hữu hiệu để làm thay đổi thành phần axit béo trong phân của động vật nêu trên được chứa trong bể chứa phân nêu trên so với phân của động vật thứ hai không được cung cấp chủng sản xuất enzym. Theo một phương án, động vật này là lợn. Theo một phương án khác, bể chứa phân là hầm phân.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi thành phần axit béo dễ bay hơi trong bể chứa phân bao gồm các bước cung cấp chủng sản xuất enzym cho động vật; xác định lượng axit béo dễ bay hơi trong phân của động vật được cho ăn các chủng sản xuất enzym; và điều chỉnh nồng độ của chủng sản xuất enzym được cho động vật ăn để đạt được nồng độ axit béo dễ bay hơi được mong muốn trong phân được chứa trong hầm phân.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi thành phần axit béo dễ bay hơi trong bể chứa phân bao gồm bước cho tiếp xúc chủng sản xuất enzym trực tiếp với bể chứa phân với lượng hữu hiệu để làm thay đổi thành phần axit béo trong bể chứa phân so với bể chứa phân không có chủng sản xuất enzym.

Theo một phương án khác, các axit béo dễ bay hơi có thể được làm thay đổi bởi các phương pháp được đề xuất theo sáng chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở axetat, propionat, butyrat, I-butytrat, 4-metyl-valerat. Theo một phương án khác, các phương pháp theo sáng chế làm tăng lượng axit butyrat béo trong phân. Theo một phương án khác nữa, các phương pháp theo sáng chế làm giảm lượng axit 4-metyl-valert béo trong phân.

Theo một phương án khác, tổng các axit béo dễ bay hơi có thể được làm thay đổi. Theo một phương án khác, các phương pháp được đề xuất theo sáng chế làm giảm tổng các axit béo dễ bay hơi trong phân.

Các phương pháp làm thay đổi các phát thải khí

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi các phát thải khí bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho động vật với lượng hữu hiệu để làm thay đổi các phát thải khí so với động vật không được cung cấp chủng sản xuất enzym. Theo một phương án, việc làm thay đổi các phát thải khí có thể dẫn đến sự gia tăng của các phát thải khí nhất định và sự giảm của các phát thải khí khác. Theo một phương án khác, việc làm thay đổi các phát thải khí có thể xảy ra theo kiểu trực tiếp hoặc kiểu gián tiếp.

Theo một phương án, các chủng sản xuất enzym để làm thay đổi các phát thải khí bao gồm chủng *Bacillus*. Theo một phương án, chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis*. Theo một phương án khác, chủng *Bacillus* là *Bacillus pumilus*.

Theo một phương án khác, các chủng sản xuất enzym để làm thay đổi các phát thải khí bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 và

Bacillus pumilus KX11-1, các chủng có toàn bộ đặc tính của nó, dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

Các chủng sản xuất enzym để làm thay đổi các phát thải khí có thể được cung cấp dưới dạng chủng đơn, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng.

Các chất khí có thể được làm thay đổi bởi các chủng sản xuất enzym bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở amoniac, cacbon đioxit, metan, và hydro sulfua.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi các phát thải khí trong chuồng nuôi động vật bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho động vật với lượng hữu hiệu để làm thay đổi các phát thải khí trong chuồng nuôi so với chuồng nuôi các động vật không được cung cấp các chủng sản xuất enzym. Theo một phương án, động vật này là lợn. Theo một phương án khác, chuồng này nằm trong chuồng gia súc. Theo một phương án, sự phát thải khí metan và hydro sulfua được khử trong chuồng nuôi các động vật được cung cấp các chủng sản xuất enzym.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi các phát thải khí trong chuồng nuôi các động vật bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho động vật với lượng hữu hiệu để làm thay đổi các phát thải khí trong chuồng nuôi động vật này; và xác định lượng khí trong chuồng này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi các phát thải khí trong bể chứa phân bao gồm bước cung cấp chủng sản xuất enzym cho động vật với lượng hữu hiệu để làm thay đổi các phát thải khí trong bể chứa phân so với bể chứa phân của các động vật không được cung cấp các chủng sản xuất enzym. Theo một phương án, động vật này là lợn. Theo một phương án khác, bể chứa phân là hầm phân.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm thay đổi các phát thải khí trong bể chứa phân bao gồm bước cho tiếp xúc chủng sản xuất enzym trực tiếp với bể chứa phân với lượng hữu hiệu để làm thay đổi các phát thải khí so với bể chứa phân không có các chủng sản xuất enzym. Theo một phương án, động vật này là lợn. Theo một phương án khác, bể chứa phân là hầm phân.

Theo một phương án, sự phát thải khí metan và hydro sulfua được làm giảm.

Các phương pháp làm thuyên giảm đáp ứng viêm

Sáng chế cũng mô tả phương pháp làm thuyên giảm các tác động viêm ở động vật bao gồm việc cung cấp chủng sản xuất enzym cho động vật với lượng có hiệu quả để làm thuyên giảm hoặc ức chế đáp ứng viêm. Theo một ví dụ, động vật là động vật có vú. Theo một ví dụ khác, động vật này là gia cầm. Theo một ví dụ khác, động vật là gà. Theo một ví dụ khác nữa, động vật này là lợn.

Các chủng sản xuất enzym có thể làm thuyên giảm hoặc ức chế đáp ứng viêm ở mức 2-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, và lớn hơn 95% so với đối chứng tham chiếu (ví dụ, tác nhân không có đặc tính kháng viêm, như nước muối được đệm hoặc chủng không có các đặc tính kháng viêm).

Theo một ví dụ, các chủng sản xuất enzym để làm thuyên giảm các tác động viêm ở động vật bao gồm chủng *Bacillus*. Theo một ví dụ, chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis*. Theo một ví dụ khác, chủng *Bacillus* là *Bacillus pumilus*.

Theo một ví dụ khác, các chủng sản xuất enzym để làm thuyên giảm các tác động viêm ở động vật bao gồm *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, *Bacillus subtilis* AGTP BS918, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 và *Bacillus pumilus* KX11-1, các chủng có toàn bộ đặc tính của nó, dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

Theo một ví dụ khác, các chủng sản xuất enzym để làm thuyên giảm các tác động viêm ở động vật là chế phẩm chứa *Bacillus subtilis* AGTP BS1013, *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5, và *Bacillus subtilis* AGTP 944.

Các chủng sản xuất enzym có thể làm thuyên giảm hoặc ức chế đáp ứng viêm bởi việc làm giảm sự biểu hiện của các gen được bao gồm trong đáp ứng viêm. Theo một ví dụ, các chủng sản xuất enzym có thể làm giảm sự biểu hiện của

gen ở mức 2-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, và lớn hơn 95% so với đối chứng tham chiếu (ví dụ, tác nhân không có các đặc tính kháng viêm, như nước muối được đệm hoặc chủng không có các đặc tính kháng viêm).

Theo một ví dụ khác, các chủng sản xuất enzym có thể làm thuyên giảm hoặc ức chế đáp ứng viêm bởi việc làm giảm sự biểu hiện của protein được bao gồm trong đáp ứng viêm.

Theo một ví dụ khác nữa, các chủng sản xuất enzym có thể làm thuyên giảm hoặc ức chế đáp ứng viêm bởi việc làm giảm hoạt tính protein được bao gồm trong đáp ứng viêm.

Theo một ví dụ khác, các chủng sản xuất enzym có thể làm giảm sự biểu hiện hoặc hoạt tính protein ở mức 2-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, và lớn hơn 95% so với đối chứng tham chiếu (ví dụ, tác nhân không có các đặc tính kháng viêm, như nước muối được đệm hoặc chủng không có các đặc tính kháng viêm).

Theo một ví dụ khác, các chủng sản xuất enzym có thể làm giảm sự biểu hiện của gen hoặc làm giảm hoạt tính của protein trong đường bất kỳ liên quan tới đáp ứng viêm bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở sự bám dính-thoát mạch-di trú; truyền tín hiệu chết theo chương trình; truyền tín hiệu canxi; thác bổ trợ; xytokin, và truyền tín hiệu xytokin; tổng hợp và truyền tín hiệu eicosanoid; truyền tín hiệu glucocorticoid/PPAR; truyền tín hiệu thụ thể ngẫu hợp G-protein; phát hiện tác nhân gây bệnh bẩm sinh; truyền tín hiệu bạch cầu; truyền tín hiệu MAPK; truyền tín hiệu tế bào giết tự nhiên; truyền tín hiệu NK-kappa B; trình bày kháng nguyên; truyền tín hiệu PI3K/AKT; ROS/glutathion/hạt gây độc tế bào; và truyền tín hiệu và siêu họ TNF.

Theo một ví dụ, các chủng sản xuất enzym có thể làm giảm hoạt tính hoặc sự biểu hiện của xytokin bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở interleukin, interferon, yếu tố gây hoại tử khối u, erythropoietin, Tpo, Fit-3L, SCF, M-CSF, và MSP.

Theo một ví dụ, interleukin bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở interleukin (IL)-1, IL-1 α , tương tự IL-1, IL- β , IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, tương tự IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, tương tự IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, GM-CSF, và OSM.

Theo một ví dụ khác, interferon bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở IFN- α , IFN- β , và IFN-gama.

Theo một ví dụ khác, yếu tố gây hoại tử khối u bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, CD154, LT- β , TNF- α , TNF- β , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, và TRANCE.

Theo một ví dụ khác, các chủng sản xuất enzym có thể được sử dụng để làm giảm hoạt tính hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chemokin bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các chemokin C, các chemokin CC, các chemokin CXC, và các chemokin CXC3.

Theo một ví dụ, các chemokin C bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở XCL1, và XCL2.

Theo một ví dụ khác, các chemokin CC bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở CCL1, CCL 2, CCL 3, CCL 4, CCL 5, CCL 6, CCL 7, CCL 8, CCL 9, CCL 10, CCL 11, CCL 12, CCL 13, CCL 14, CCL 15, CCL 16, CCL 17, CCL 18, CCL 19, CCL 20, CCL 21, CCL 22, CCL 23, CCL 24, CCL 25, CCL 26, CCL 27, và CCL 28.

Theo một ví dụ khác, các chemokin CXC bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, và CXCL14.

Các chủng sản xuất enzym để làm thuyên giảm đáp ứng viêm có thể được cung cấp dưới dạng chủng đơn, một hoặc nhiều sự kết hợp của các chủng này, một hoặc nhiều dịch nổi trên bề mặt từ giống nuôi cấy các chủng này, thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng hoặc hỗn hợp của chúng.

Các chủng, các phương pháp và các chế phẩm được đề xuất bởi sáng chế có thể được mô tả tiếp bởi các khía cạnh được đánh số dưới đây.

1. Chủng *Bacillus* được phân lập có hoạt tính có enzym.

2. Chủng như được xác định ở khía cạnh 1, trong đó hoạt tính enzym được chọn từ nhóm gồm hoạt tính xenlulaza, hoạt tính α -amylaza, hoạt tính xylanaza, esteraza, β -mannanaza, hoạt tính lipaza, hoạt tính proteaza, và các kết hợp của chúng.

3. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó hoạt tính enzym được chọn từ nhóm gồm hoạt tính zeinaza và hoạt tính proteaza đậu tương, và các kết hợp của chúng.

4. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó, khi chủng này được cung cấp cho động vật, thì chủng này tạo ra sự cải thiện không trị liệu về ít nhất một trong số các hậu quả gây ra từ các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, các vấn đề về phân thải, hiệu quả sản xuất lợn, các đặc tính thân thịt, và năng suất lợn khi cho ăn DDGS ở mức độ cao khi so với động vật đối chứng.

5. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó, khi chủng này được cung cấp cho động vật, thì chủng này tạo ra sự cải thiện không trị liệu về ít nhất một trong số các hậu quả gây ra từ các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, các vấn đề về phân thải, hiệu quả sản xuất lợn, các đặc tính thân thịt, và năng suất lợn khi cho ăn DDGS ở mức độ cao ít nhất là 2% so với động vật đối chứng.

6. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó, khi chủng này được cung cấp cho động vật, thì chủng này tạo ra sự cải thiện không trị liệu về ít nhất một trong số các dấu hiệu: thể trọng, tăng trọng trung bình ngày, lượng ăn trung bình ngày, hiệu quả thức ăn, các đặc tính thân thịt, khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng và các vấn đề về phân thải khi so với động vật đối chứng.

7. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó, khi chủng này được cung cấp cho động vật, thì chủng này tạo ra sự cải thiện không trị liệu về ít nhất một trong số các dấu hiệu: thể trọng, tăng trọng trung bình ngày, lượng ăn trung bình ngày, hiệu quả thức ăn, các đặc tính thân thịt, khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng và các vấn đề về phân thải ít nhất là 2% so với đối chứng.

8. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng này được chọn từ nhóm gồm các loài *B. subtilis* và *B. pumilus*, các chủng có toàn bộ đặc tính của nó, dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

9. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng này được chọn từ nhóm gồm *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544), *Bacillus subtilis* AGTP 944 (NRRL B-50548), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 (NRRL B-50543), và *Bacillus pumilus* KX11-1 (NRRL B-50546), và các chủng có toàn bộ đặc tính của nó và dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

10. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng này được chọn từ nhóm gồm *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544), *Bacillus subtilis* AGTP 944 (NRRL B-50548), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 (NRRL B-50543), và *Bacillus pumilus* KX11-1 (NRRL B-50546) dẫn xuất hoặc thể biến dị bất kỳ của chúng, và hỗn hợp của chúng.

11. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510).

12. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (NRRL B-50542).

13. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545).

14. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508).

15. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509).

16. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 (NRRL B-50543).

17. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544).

18. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP 944 (NRRL B-50548).

19. Chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus pumilus* KX11-1 (NRRL B-50546).

20. Chế phẩm chứa dịch nổi bên trên bề mặt từ một hoặc nhiều giống nuôi cấy của một hoặc nhiều chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, và hỗn hợp của chúng.

21. Chế phẩm chứa một hoặc nhiều chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, và hỗn hợp của chúng.

22. Chế phẩm như được xác định ở khía cạnh 20 hoặc 21, trong đó các chủng gồm *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), và *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509).

23. Chế phẩm như được xác định ở khía cạnh 20 hoặc 21, trong đó các chủng gồm *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), *Bacillus subtilis* AGTP BS944 (NRRL B-50509), và *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509).

24. Thức ăn cho động vật, trong đó thức ăn này được bổ sung chủng đã phân lập như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19 hoặc chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23 hoặc hỗn hợp của chúng.

25. Phương pháp không trị liệu bao gồm việc cung cấp cho động vật lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19 hoặc chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24 hoặc hỗn hợp của chúng, trong đó việc cung cấp

phá vỡ bằng enzym ít nhất một trong số xơ, protein, hydrat cacbon, và lipit trong khẩu phần ăn cho động vật khi cho động vật ăn DDGS ở mức độ cao.

26. Phương pháp không trị liệu bao gồm việc cung cấp cho động vật lượng hữu hiệu của chúng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng, trong đó việc cung cấp này cải thiện ít nhất là một trong số các hậu quả gây ra từ các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, các vấn đề về phân thải, hiệu quả sản xuất lợn, các đặc tính thân thịt, và năng suất lợn.

27. Phương pháp không trị liệu bao gồm việc cung cấp cho động vật lượng hữu hiệu của chúng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng, trong đó việc cung cấp này cải thiện ít nhất một trong số các dấu hiệu thể trọng, tăng trọng trung bình ngày, lượng ăn trung bình ngày, hiệu quả thức ăn, các đặc tính thân thịt, khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng và các vấn đề về phân thải khi so với động vật đối chứng.

28. Phương pháp không trị liệu bao gồm việc cung cấp cho gia cầm lượng hữu hiệu của chúng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng, trong đó việc cung cấp này cải thiện ít nhất một trong số các dấu hiệu thể trọng, tăng trọng trung bình ngày, lượng ăn trung bình ngày, hiệu quả thức ăn, các đặc tính thân thịt, khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng và các vấn đề về phân thải khi so với động vật đối chứng.

29. Phương pháp không trị liệu bao gồm việc cung cấp cho lợn lượng hữu hiệu của chúng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng, trong đó việc cung cấp này cải thiện ít nhất một trong số các dấu hiệu thể trọng, tăng trọng trung bình ngày, lượng ăn trung bình ngày, hiệu quả thức ăn, các đặc tính thân thịt, khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng và các vấn đề về phân thải khi so với động vật đối chứng.

30. Phương pháp không trị liệu như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 25-29, trong đó chế phẩm là chế phẩm như được xác định ở khía cạnh 22 hoặc 23.

31. Phương pháp không trị liệu như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 25-30, trong đó chủng được cung cấp với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1×10^5 đến 1×10^{11} CFU/động vật/ngày.

32. Phương pháp không trị liệu như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 25-27, và 29-31, trong đó động vật này là lợn.

33. Phương pháp không trị liệu như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 25-32, trong đó động vật được ăn mức độ cao các bã rượu khô cùng với các chất tan (DDGS).

34. Phương pháp không trị liệu như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 25-33, trong đó động vật được ăn các bã rượu khô cùng với các chất tan (DDGS) với tỷ lệ trên 10% của khẩu phần ăn của động vật.

35. Phương pháp không trị liệu như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 25-34, trong đó động vật được ăn các bã rượu khô cùng với các chất tan (DDGS) với tỷ lệ trên 30% của khẩu phần ăn của động vật.

36. Phương pháp không trị liệu bao gồm việc cung cấp lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19 hoặc chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23 cho bể chứa phân lợn.

37. Phương pháp không trị liệu như được xác định ở khía cạnh 36, trong đó bể chứa phân lợn này là hầm phân.

38. Phương pháp không trị liệu như được xác định ở khía cạnh 36 hoặc 37, còn bao gồm việc cải thiện ít nhất một trong số các dấu hiệu: ít tạo bọt, ít tích tụ các chất rắn, và các hàm lượng nitơ, lưu huỳnh, phospho, nitơ gắn với chất xơ, tổng protein, chất béo, và chất xơ ít hơn khi so với hàm phân đối chứng.

39. Phương pháp tạo ra chế phẩm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) phát triển trong canh lỏng giống nuôi cấy bao gồm một trong số các chủng đã phân lập như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19; và (b) tách chủng này ra khỏi canh lỏng.

40. Phương pháp như được xác định ở khía cạnh 39, còn bao gồm bước đông khô nhanh chủng đã được tách này và bổ sung chủng đã được đông khô nhanh vào chất mang.

41. Phương pháp như được xác định ở khía cạnh 39 hoặc 40, còn bao gồm lưu giữ canh lỏng sau khi chủng này đã được tách ra khỏi nó để tạo ra dịch nổi trên bề mặt.

42. Phương pháp không trị liệu để cải thiện hiệu suất tăng trưởng của động vật bao gồm việc cung cấp cho động vật lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng khi so với động vật đối chứng.

43. Phương pháp không trị liệu như được xác định ở khía cạnh 42 trong đó việc cung cấp này cải thiện ít nhất một trong số các dấu hiệu thể trọng, tăng trọng trung bình ngày, lượng ăn trung bình ngày, hiệu quả thức ăn, các đặc tính thân thịt, khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng và các vấn đề về phân thải.

44. Phương pháp không trị liệu để cải thiện cho bể chứa phân bao gồm việc cung cấp cho động vật lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng với lượng hữu hiệu để cải thiện cho bể chứa phân so với phân của động vật đối chứng, được chứa trong bể chứa phân thứ hai.

45. Phương pháp không trị liệu để cải thiện cho bể chứa phân bao gồm bước cho tiếp xúc lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng trực tiếp với bể chứa phân.

46. Phương pháp không trị liệu như được xác định ở khía cạnh 44 hoặc 45 trong đó sự cải thiện bao gồm ít nhất một trong số các dấu hiệu: ít tạo bọt, ít tích tụ các chất rắn, và các hàm lượng nitơ, lưu huỳnh, phospho, nitơ gắn với chất xơ, tổng protein, chất béo, và chất xơ ít hơn so với các hàm phân đối chứng.

47. Phương pháp không trị liệu để kiểm soát hoặc khử bọt trong hàm phân bao gồm bước cung cấp lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng cho các động vật mà phân của chúng được chứa trong hàm phân.

48. Phương pháp không trị liệu để kiểm soát hoặc khử bọt trong hàm phân bao gồm tiếp xúc lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng trực tiếp vào hàm phân.

49. Phương pháp không trị liệu để làm thay đổi sinh thái học vi sinh vật trong hàm phân bao gồm bước cung cấp lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng cho các động vật mà phân của chúng được chứa trong hàm phân.

50. Phương pháp không trị liệu để làm thay đổi sinh thái học vi sinh vật trong hàm phân bao gồm tiếp xúc lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng trực tiếp vào hàm phân.

51. Phương pháp không trị liệu để làm thay đổi thành phần axit béo dễ bay hơi trong hàm phân bao gồm bước cung cấp lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng cho các động vật mà phân của chúng được chứa trong hàm phân.

52. Phương pháp làm thay đổi thành phần axit béo dễ bay hơi trong hàm phân bao gồm tiếp xúc lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng trực tiếp vào hàm phân.

53. Phương pháp không trị liệu để thay đổi sự phát thải khí trong chuồng nuôi động vật bao gồm việc cung cấp lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng cho các động vật với lượng hữu hiệu để làm giảm sự phát thải khí.

54. Phương pháp không trị liệu để thay đổi sự phát thải khí trong bể chứa phân bao gồm bước cung cấp lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng cho các động vật với lượng hữu hiệu để làm giảm sự phát thải khí.

55. Phương pháp thay đổi sự phát thải khí trong bể chứa phân bao gồm bước cho tiếp xúc lượng hữu hiệu của chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng trực tiếp với bể chứa phân với lượng hữu hiệu để làm giảm sự phát thải khí.

56. Theo một ví dụ, chủng như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19, chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23, thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24, hoặc hỗn hợp của chúng để sử dụng trong phương pháp làm thuyên giảm đáp ứng viêm bao gồm việc cung cấp lượng hữu hiệu để làm thuyên giảm đáp ứng viêm.

57. Chủng đã được phân lập như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19 hoặc chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23 hoặc thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24 để sử dụng làm thuốc để cải thiện ít nhất là một trong số các hậu quả gây ra từ các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, các vấn đề về phân thải, hiệu quả sản xuất lợn, các đặc tính thân thịt, và năng suất lợn khi cho ăn DDGS ở mức độ cao.

58. Sử dụng chủng đã được phân lập như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19 hoặc chế phẩm như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 20-23 hoặc hoặc thức ăn như được xác định ở khía cạnh 24 để bào chế thuốc để tạo ra một hoặc nhiều enzym.

60. Chủng đã được phân lập của *Bacillus* như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19 để sử dụng cho việc cải thiện các hậu quả do các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, các vấn đề về phân thải, hiệu quả sản xuất lợn, các đặc tính thân thịt, và năng suất lợn khi cho ăn DDGS ở mức độ cao.

61. Sử dụng chủng đã được phân lập của *Bacillus* như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19 để bào chế thuốc để tạo ra hoạt tính enzym.

62. Sử dụng chủng đã được phân lập của *Bacillus* như được xác định ở bất kỳ trong số các khía cạnh 1-19 để bào chế thuốc để cải thiện ít nhất là một trong số các hậu quả gây ra từ các thành phần phức tạp của khẩu phần ăn, các vấn đề về phân thải, hiệu quả sản xuất lợn, các đặc tính thân thịt, và năng suất lợn khi cho ăn DDGS ở mức độ cao.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa. Các ví dụ được đưa ra ở đây chỉ nhằm mục đích hỗ trợ cho việc hiểu rõ hơn sáng chế. Các ví dụ này không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế được mô tả hoặc được yêu cầu bảo hộ dưới bất kỳ hình thức nào.

Ví dụ 1

Phân lập vi khuẩn môi trường và nhận diện các hoạt tính enzym.

Các mẫu chất thải nông nghiệp và môi trường được thu gom từ nhiều nguồn đa dạng trong khoảng thời gian vài năm. Sau khi tập kết, tất cả các mẫu được pha loãng trong dung dịch 1% pepton, bào tử được xử lý trong 35 phút ở 65°C và được pha loãng hàng loạt vào các đĩa aga thạch đầu nành (BD Difco, Franklin Lakes, NJ). Sau khi ủ ở 32°C trong 48 giờ, sự phát triển của các khuẩn lạc môi trường chưa được biết đa dạng được nuôi cấy từ các đĩa vào nước canh đầu nành tryptxin (TSB), được tái ủ tương tự và được cất giữ đông lạnh ở -85°C cho việc phân tích sau.

Khoảng 4000 phân lập *Bacillus* giả định có nguồn gốc môi trường được thu gom và được sàng lọc về khả năng của chúng làm thoái biến nhiều chất nền nghiên cứu khác nhau. Các giống nuôi cấy môi trường được lấy từ ngân hàng

đông lạnh nguyên liệu gốc và được ủ trong 0,5ml TSB ở 32°C trong 24 giờ trong tủ áp có lắc hành tinh, với tốc độ được đặt là 130 (Gyromax 737R). Việc sàng lọc năng suất cao các chủng thử nghiệm này được thực hiện bởi việc dàn mỏng vết sao chép 2 microlit giống nuôi cấy lỏng lên trên 15,0ml của các loại môi chất nền khác nhau của đối tượng nghiên cứu trong các đĩa lưới 100x100x15mm. Các hoạt tính xelulaza, α -amylaza, zeinaza, proteaza đậu nành, esteraza, lipaza, và xylanaza được xác định trên cơ sở sử dụng chất nền cụ thể bởi các chủng cá thể. Các thành phần môi chất được sử dụng để xét nghiệm các đặc tính sử dụng chất nền do hoạt tính enzyme của các chủng có nguồn gốc môi trường được đưa ra trong Bảng 1. Các đĩa thử nghiệm được giữ khô trong 30 phút sau khi áp dụng nuôi cấy, và sau đó được ủ ở 32°C trong 24 giờ. Hoạt tính enzyme cho mỗi chủng được xác định bằng cách xác định vùng thoái biến chất nền theo milimét, như được chỉ ra bởi việc tách riêng mép xung quanh của sự phát triển khuẩn lạc. Các giá trị trung bình từ các đĩa lặp lại được ghi nhận.

Chín chủng được chọn từ khoảng 4000 phân lập đã được sàng lọc làm chủng vi sinh vật ăn trực tiếp ứng viên cho thấy khoảng hoạt tính nền đại diện cho top 10% và top 2% của các hoạt tính enzyme của tất cả các chủng được sàng lọc (Bảng 2). Trên cơ sở về khả năng của chúng để sử dụng hoặc làm thoái biến một loạt các chất nền có liên quan đi kèm với việc kết hợp các DDG trong các thức ăn, chín phân lập được chọn làm ứng viên cho một hoặc nhiều vi sinh vật ăn trực tiếp (DFM). Các profin RAPD PCR và các trình tự rADN 16S không hoàn toàn của mỗi chủng được xác định. Việc xác định giống và loài giả định cho mỗi chủng được thực hiện bởi việc khuếch đại rADN 16S bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi 8F và 1541R. Các sản phẩm PCR đã tinh chế được lập trình tự từ cả phía trước lẫn phía đuôi, và một trình tự liên tiếp được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình lắp ráp CAP3. Chín chủng được chọn gồm: *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (Fig.1 & Fig.2), *Bacillus subtilis* AGTP BS442 (Fig.3 & Fig.4), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (Fig.5 & Fig.6), *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (Fig.7 & Fig.8), *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (Fig.9 & Fig.10), *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 (Fig.11 & Fig.12), *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (Fig.13 & Fig.14), *Bacillus subtilis* AGTP 944, (Fig.15-18), và *Bacillus pumilus* KX11-1 (Fig.19-21).

Bảng 1

Các thành phần môi chất được sử dụng để thử nghiệm các hoạt tính enzym được minh họa bởi các đặc tính sử dụng chất nền của *Bacillus* có nguồn gốc môi trường.

Thử nghiệm đĩa	Thành phần môi chất	Các yêu cầu đánh giá thêm
α -Amylaza	Aga dinh dưỡng, tinh bột ngô 2%	Dung dịch nhuộm iot 0,05%
Proteaza đậu nành	Aga dinh dưỡng, protein đậu nành đã tinh chế 2%	Không; Vùng xác định trừ môi chất đục
Xelulaza	Amoni Sulfat 0,1%, Kali Phosphat hai bazơ 0,1%, phần chiết nấm men 0,1%, Polypepton 1,0%, Aga 1,5%, Carboxymetyl Xenluloza 0,75% (CMC)	30 phút nhuộm bằng Congo Red 0,05%, tiếp đó rửa bằng NaCl 1M.
Esteraza/Lipaza	Polypepton 1,0%, Aga 1,5%, phần chiết nấm men 0,5%, Tween 80 1,5%, Tributyrin 1,5%, Victoria Bluei B Dye 0,01% (được lọc).	Không; Vùng xác định trừ môi chất đục
Zeinaza	Aga dinh dưỡng, Zein 2% đã tinh chế, được hòa tan trong 70% metanol	Không; Vùng xác định trừ môi chất đục
Xylanaza	Aga dinh dưỡng, Xylan 2%	Không; Vùng xác định trừ môi chất đục

Bảng 2

Tóm tắt hoạt tính enzym của chủng nghiên cứu vi sinh vật ăn trực tiếp.^a

Phân lập số ^b	CMCase (Xelulaza)	Esteraza	Amylaza tinh bột ngô	Proteaza đậu nành	Proteaza Zein	Xylanaza
BS442	1,67	3,92 ¹	0,92	2,00	3,00	2,50
BS521	7,00 ¹	2,00 ²	1,00	1,75	3,69 ²	4,00
BS918	3,25	3,25 ¹	0,50	4,00 ¹	5,00 ¹	5,50
BS1013	6,50 ¹	2,00 ²	2,50 ²	2,75 ²	4,38 ²	4,00
BP1068	3,00	0,50	4,00 ¹	4,00 ¹	4,25 ²	6,00
BS1069	4,00 ²	0,50	2,00 ²	4,00 ¹	5,00 ¹	4,00
BS9444	6,5	2,25	3,25	0,50	4,50	3,5
KX11-1	2,5	----	---	2,00	---	5
BS3BP5	3,25	2,58 ²	2,00 ²	1,50	4,00 ¹	3,00

^a Các giá trị thể hiện cho vùng thoái biến chất nền theo milimét (mm), như được chỉ ra bởi việc tách riêng mép xung quanh của sự phát triển khuẩn lạc cho mỗi chủng.

^b Các ký hiệu cho phân lập chủng, BS=*Bacillus subtilis*; BP=*Bacillus pumilus*

¹ Giá trị đại diện cho top 2% hoạt tính enzym trong lớp cụ thể của tất cả 4000 chủng đã sàng lọc.

² Giá trị đại diện cho top 10% hoạt tính enzym trong lớp cụ thể của tất cả 4000 chủng đã sàng lọc.

Ví dụ 2

So sánh hoạt tính enzym giữa các chủng *Bacillus* mới và vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* thương phẩm loại ba chủng, Microsource® S.

Ba chủng *Bacillus Microsource® S* (*B. subtilis* 27 (BS 27), *B. licheniformis* (trước đây gọi là *B. amyloliquefaciens*) 842, và *B. licheniformis* 21 (B1 21)) được lấy từ ngân hàng đông lạnh nguyên liệu gốc riêng rẽ và được ủ trong 0,5ml TSB ở 32°C trong 24 giờ trong tủ áp có lắc hành tinh, với tốc độ được đặt là 130 (Gyromax 737R). Việc sàng lọc năng suất cao các chủng sản phẩm này được thực hiện bởi việc dàn mỏng vết sao chép 2 microlit giống nuôi cấy lỏng lên trên 15,0ml của các loại môi chất nền khác nhau của đối tượng nghiên cứu trong các đĩa lưới 100x100x15mm. Xenlulaza, proteaza đậu nành, và Esteraza/Lipaza các hoạt độ được xác định trên cơ sở sử dụng chất nền cụ thể bởi các chủng cá thể. Các thành phần môi chất được sử dụng để xét nghiệm các đặc tính sử dụng chất nền do hoạt tính enzym của các chủng có nguồn gốc môi trường được đưa ra trong Bảng 3. Các đĩa thử nghiệm được giữ khô trong 30 phút sau khi áp dụng nuôi cấy, và sau đó được ủ ở 32°C trong 24 giờ. Hoạt tính enzym cho mỗi chủng được xác định bằng cách xác định vùng thoái biến chất nền theo milimét, như được chỉ ra bởi việc tách riêng mép xung quanh của sự phát triển khuẩn lạc. Các giá trị trung bình từ các đĩa lặp lại được ghi nhận và so sánh với các giá trị có nguồn gốc từ các chủng *Bacillus* mới được nhận diện trong Ví dụ 1 (Bảng 4). Duy nhất một chủng trong số ba chủng *Bacillus Microsource® S* đã chứng minh hoạt tính enzym gần như tương đương với chủng *Bacillus* mới được chọn về hoạt tính thoái biến chất nền của chúng; được lấy làm ví dụ bởi hoạt tính proteaza đậu tương của chủng *Bacillus subtilis* Microsource® S BS27.

Bảng 3

Các thành phần môi chất được sử dụng để thử nghiệm các hoạt tính enzym được minh họa bởi các các đặc tính sử dụng chất nền của *Bacillus* có nguồn gốc môi trường.

Thử nghiệm đĩa	Thành phần môi chất	Các yêu cầu đánh giá thêm
Proteaza đậu nành	Aga dinh dưỡng, protein đậu nành đã tinh chế 2%	Không; Vùng xác định trừ môi chất đục
Xenlulaza	Amoni Sulfat 0,1%, Kali Phosphat hai bazơ 0,1%, phần chiết nấm men 0,1%, Polypepton 1,0%, Aga 1,5%, Carboxymetyl Xenluloza 0,75% (CMC)	30 phút nhuộm bằng Congo Red 0,05%, tiếp đó rửa bằng NaCl 1M.
Esteraza/Lipaza	Polypepton 1,0%, Aga 1,5%, phần chiết nấm men 0,5%, Tween 80 1,5%, Tributyrin 1,5%, Victoria Bluei B Dye 0,01% (được lọc).	Không; Vùng xác định trừ môi chất đục

Bảng 4

Hoạt tính enzym của các chủng sản phẩm *Bacillus* Microsource® S được so sánh với chủng *Bacillus* mới được chọn để tăng cường thoái biến chất nền.^a

Tên phân lập	CMCase (Xenlulaza)	Esteraza	Proteaza đậu nành
Các chủng sản phẩm MicroSource® S			
BS27	0,00	0,60	2,50 ²
BL21	0,30	0,50	0,80
BL842	0,00	0,30	0,00
BS3BP5	3,25	2,58 ²	1,50
BS442	1,67	3,92 ¹	2,00
BS521	7,00 ¹	2,00 ²	1,75
BS918	3,25	3,25 ¹	4,00 ¹
BS1013	6,50 ¹	2,00 ²	2,75 ²
BP1068	3,00	0,50	4,00 ¹
BS1069	4,00 ²	0,50	4,00 ¹

^a Các giá trị thể hiện cho vùng thoái biến chất nền theo milimét (mm), như được chỉ ra bởi việc tách riêng mép xung quanh của sự phát triển khuẩn lạc cho mỗi chủng.

¹ Giá trị đại diện cho top 2% hoạt tính enzym trong lớp cụ thể của tất cả 4000 chủng đã sàng lọc.

² Giá trị đại diện cho top 10% hoạt tính enzym trong lớp cụ thể của tất cả 4000 chủng đã sàng lọc.

Ví dụ 3

Thử nghiệm thức ăn cho động vật cho thấy cải thiện về hiệu suất tăng trưởng đáp ứng chủng *Bacillus subtilis* 3BP5 được bổ sung vào các khẩu phần ăn cho lợn

Thử nghiệm thức ăn cho lợn được tiến hành để đánh giá các hiệu quả của chất phụ gia thức ăn vi sinh vật ăn trực tiếp trên cơ sở *Bacillus* (DFM) tới sự tăng cân, sự hấp thụ thức ăn, và hiệu quả thức ăn của lợn đang trong giai đoạn tăng trưởng-vỗ béo. Khoảng 180 con lợn (lợn cái Monsanto Choice Genetics GPK 35 đã giao phối với các con đực EB Ultra) đã được phân thành ba nhóm theo thể trọng ban đầu và được nhốt với các nhóm 5 con/chuồng khi hết giai đoạn sơ sinh. Các con lợn này được chuyển vào trang trại chăn nuôi từ cai sữa tới vỗ béo và nhốt 5 con/chuồng trong các chuồng được lợp toàn bộ (1,52 m x 3,05m) có trang bị một máng ăn dạng hồ đơn, và các bộ tưới nước dạng cốc cho giai đoạn cai sữa tới vỗ béo. Nhiệt độ môi trường tối thiểu ban đầu được duy trì ở khoảng 78°F (25,5°C). Trong giai đoạn vỗ béo, nhiệt độ tối thiểu được giảm xuống 70°F (21,1°C). Thức ăn và nước được cho ăn tự do trong toàn bộ quá trình nghiên cứu.

Một trong hai chế độ khẩu phần ăn được áp dụng cho mỗi chuồng (18 con/chế độ khẩu phần ăn) cho mỗi nhóm, và được cung cấp trong Giai đoạn 1 (từ 50 tới 90 pao (22,6 kg-40,8kg)), Giai đoạn 2 (từ 90 tới 130 pao (40,8kg-58,9kg)), Giai đoạn 3 (từ 130 tới 180 pao (58,9kg-81,6kg)), Giai đoạn 4 (từ 180 tới 230 pao (81,6kg-104,3kg)) và Giai đoạn 5 (từ 230 pao (104,3kg) tới lúc đưa ra thị trường khoảng 270 pao (122,4kg)). Hai chế độ khẩu phần ăn gồm một chế độ khẩu phần ăn đối chứng cơ bản không có DFM 3BP5 và một chế độ khẩu phần ăn cơ bản có DFM 3BP5 trong nghiên cứu tăng trưởng-vỗ béo lợn 5 giai đoạn. Các khẩu phần ăn được điều chế để đáp ứng hoặc vượt quá các tiêu chuẩn NRC (1988) và chủ yếu gồm ngô, bột đậu tương, và DDGS lần lượt với lượng 47%, 18,6%, và 30% của khẩu phần ăn. Chủng *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 được bổ sung vào khẩu

phần ăn này với lượng $7,3 \times 10^7$ CFU/kg thức ăn và được cấp với mức khoảng 1×10^8 CFU/đầu/ngày trên cơ sở lượng ăn trung bình ngày (ADFI). Các dữ liệu được thu thập gồm tăng trọng trung bình ngày, lượng ăn trung bình ngày, và thức ăn cần thiết cho một đơn vị tăng trọng trong mỗi giai đoạn trong 5 giai đoạn tăng trưởng-vỗ béo. Các lợn được loại ra khỏi nghiên cứu khi khối lượng lợn trung bình của toàn bộ chuồng đạt mức khoảng 270 pao (122,4kg).

Dữ liệu hiệu suất được phân tích dưới dạng thiết kế khối hoàn toàn ngẫu nhiên với chuồng là đơn vị thử nghiệm và các khối dựa trên cơ sở thể trọng ban đầu. Phép phân tích biến số được thực hiện bằng cách áp dụng các phương pháp GLM của SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Lợn được cho ăn các khẩu phần ăn chứa chủng *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 có tốc độ tăng trưởng bình quân ngày (ADG) và chỉ số tăng trọng:thức ăn trong giai đoạn tăng trưởng Giai đoạn 1 là lớn ($P < 0,01$) và có xu hướng ($P < 0,08$) tăng ADG và chỉ số tăng trọng:thức ăn trong các giai đoạn Giai đoạn 1 và Giai đoạn 2 kết hợp so với lợn được cho ăn khẩu phần ăn đối chứng (Bảng 5). Sự gia tăng ADG trong giai đoạn tăng trưởng đầu tiên làm cho lợn đã được cho ăn chủng *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 có sự lớn hơn ($P < 0,01$) về thể trọng khi kết thúc khoảng thời gian Giai đoạn 1 so với lợn được cho ăn khẩu phần ăn đối chứng.

Bảng 5

Các đáp ứng hiệu suất tăng trưởng của lợn được cho ăn *Bacillus subtilis* AGTP 3BP5 so với lợn được cho ăn khẩu phần ăn đối chứng.

Tính trạng	Chế độ		SE ¹	Trị số P
	Đối chứng	3BP5		
ADG, g				
Giai đoạn 1	704	766	10	< 0,01
Giai đoạn 2	1020	1017	19	0,92
Giai đoạn 1-2	861	890	11	0,08
Giai đoạn 3	1114	1103	18	0,68
Giai đoạn 1-3	942	958	8	0,15
Giai đoạn 4	983	959	28	0,55
Giai đoạn 1-4	952	958	9	0,67

Giai đoạn 5	881	858	19	0,39
Giai đoạn 1-5	939	939	8	0,97
ADFI, kg				
Giai đoạn 1	1,571	1,604	0,028	0,42
Giai đoạn 2	2,591	2,562	0,042	0,64
Giai đoạn 1-2	2,074	2,077	0,032	0,95
Giai đoạn 3	3,331	3,291	0,033	0,41
Giai đoạn 1-3	2,475	2,464	0,029	0,80
Giai đoạn 4	3,120	3,130	0,055	0,90
Giai đoạn 1-4	2,640	2,647	0,032	0,94
Giai đoạn 5	3,503	3,426	0,049	0,28
Giai đoạn 1-5	2,801	2,788	0,032	0,78
Chỉ số tăng trọng:thức ăn				
Giai đoạn 1	0,445	0,477	0,008	< 0,01
Giai đoạn 2	0,393	0,396	0,006	0,67
Giai đoạn 1-2	0,413	0,428	0,005	0,07
Giai đoạn 3	0,333	0,336	0,007	0,75
Giai đoạn 1-3	0,379	0,388	0,005	0,14
Giai đoạn 4	0,314	0,306	0,005	0,30
Giai đoạn 1-4	0,359	0,363	0,003	0,32
Giai đoạn 5	0,252	0,250	0,005	0,77
Giai đoạn 1-5	0,334	0,337	0,002	0,45
Thể trọng, kg				
Ban đầu	24,85	24,71	0,04	0,02
Giai đoạn 1	39,63	40,80	0,22	< 0,01
Giai đoạn 2	61,07	62,14	0,49	0,13
Giai đoạn 3	83,40	84,21	0,56	0,31
Giai đoạn 4	105,04	105,30	0,86	0,83
Giai đoạn 5	123,04	122,46	0,88	0,65

¹ SE = sai số tiêu chuẩn

Ví dụ 4

Thử nghiệm cân bằng khẩu phần thức ăn cho động vật và khối lượng hàm phân chứng minh các hiệu quả của sự kết hợp chủng được bổ sung vào các khẩu phần ăn của lợn

Thử nghiệm khẩu phần ăn cho lợn được tiến hành để đánh giá các hiệu quả của vi sinh vật ăn trực tiếp trên cơ sở *Bacillus* (DFM) được cung cấp trong khẩu

phần ăn để tăng trưởng-vỗ béo lợn tới các đáp ứng hiệu suất tăng trưởng (tốc độ tăng trưởng bình quân ngày (ADG), lượng ăn trung bình ngày (ADFI), và chỉ số tăng trọng:thức ăn), hiệu suất thân thịt và các số đo chất lượng, thành phần chất dinh dưỡng trong phân, thành phần vi sinh vật của hàm phân, và các phát thải khí (amoniac, metan, và hydro sulfua) từ hàm phân. Tổng cộng 720 con lợn (kiểu gen Yorkshire-Landrace x Duroc) được nhốt trong 12 buồng với 12 chuồng/buồng và 5 con/chuồng. Mỗi buồng có hai hàm phân có khả năng lưu trữ phân cho giai đoạn từ khi cai sữa đến kết thúc. Mỗi hàm phân nằm dưới 6 chuồng có một tường ngăn nằm dưới đường đi ở giữa chia thành hai hàm trong mỗi buồng. Mỗi trong số 12 buồng này được trang bị để giám sát các phát thải khí từ mỗi buồng được thông gió độc lập. Lợn được cai sữa và được đưa vào trong các chuồng trước khi bắt đầu nghiên cứu và bắt đầu cho ăn thức ăn thử nghiệm khi chúng đã đạt thể trọng trung bình là 29,5kg. Lợn được cho ăn trong năm giai đoạn kéo dài ba tuần mỗi giai đoạn, và kết thúc khi các con lợn đạt trọng lượng giết mổ trung bình 120kg.

Hai chế độ khẩu phần ăn được cung cấp cho lợn trong thử nghiệm, gồm một khẩu phần ăn đối chứng và một khẩu phần ăn có bổ sung hỗn hợp của các chủng *Bacillus* (các chủng BS1013, BS918, và BS3BP5). Các khẩu phần ăn được điều chế để đáp ứng hoặc vượt quá các tiêu chuẩn NRC (1988) và gồm chủ yếu là ngô, bột đậu tương, và DDGS với hàm lượng lần lượt là 50%, 20%, và 30% của khẩu phần ăn. Ba chủng trong hỗn hợp *Bacillus* DFM được trình bày bình đẳng trong chất liệu thử nghiệm chứa $1,47 \times 10^8$ CFU của DFM trên 1 gam chất liệu. Hỗn hợp các chủng *Bacillus* DFM được bổ sung vào khẩu phần ăn với tỷ lệ $7,3 \times 10^7$ CFU/kg thức ăn và được cấp với lượng khoảng 1×10^8 CFU/đầu/ngày trên cơ sở lượng ăn trung bình ngày.

Các số đo hiệu suất của lợn (tốc độ tăng trưởng bình quân ngày (ADG), lượng ăn trung bình ngày (ADFI), chỉ số tăng trọng:thức ăn) được xác định khi kết thúc mỗi giai đoạn cho ăn. Các dữ liệu này được đại diện bởi 72 lần lặp lại/chế độ). Các hàm phân được lấy mẫu bằng cách hút chân không ở tuần 0 (vào lúc đầu và trước khi bắt đầu thử nghiệm), tuần 9, và tuần 15 và sự phân tích nhanh được thực hiện đối với các chất dinh dưỡng có trong chất thải phân lợn (12 lần lặp lại/chế độ). Một mẫu phụ hàng ngày cũng được lấy để xác định hàm lượng axit

béo dễ bay hơi và phân tích cộng đồng vi sinh vật (12 lần lặp lại/chế độ). Hơn thế nữa, ở tuần 15 lấy mẫu vào cuối thử nghiệm, các hàm được hút sạch vào các bình trộn để làm đồng nhất toàn bộ các chất trong hàm phân, xác định thể tích hàm phân và lấy mẫu để phân tích hàm lượng chất dinh dưỡng. Các phát thải khí được đo trong mỗi buồng để xác định sự tạo khí amoniac, metan, và hydro sulfua (6 lần lặp lại/chế độ). Khi kết thúc nghiên cứu, các con lợn được gửi đến cơ sở giết mổ thương mại và các dữ liệu thân thịt như tỷ lệ sản lượng nạc, tỷ lệ phần trăm thịt mót hàm, và trị số iot được thu thập (72 lần lặp lại/chế độ).

Liên quan tới Bảng 6, dữ liệu hiệu suất sơ bộ từ nghiên cứu này cho thấy rằng các con lợn được cho ăn thức ăn kết hợp các chủng *Bacillus* DFM có sự tăng cao ($P \leq 0,05$) về ADG và chỉ số tăng trọng:thức ăn trong giai đoạn vỗ béo của thử nghiệm. Hơn thế nữa, các con lợn được cho ăn DFM có xu hướng ($P = 0,15$) tăng cân nhiều hơn 4,4 pao (1,9kg) vào cuối thử nghiệm so với lợn được cho ăn khẩu phần ăn đối chứng. Sự phân tích dữ liệu về các đặc tính thân thịt, thành phần dinh dưỡng và vi sinh vật trong phân, và các phát thải khí từ bể chứa phân bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hàm phân chưa hoàn thành, nhưng được kỳ vọng là chế độ DFM sẽ làm tăng tỷ lệ sản lượng nạc và tỷ lệ phần trăm thịt mót hàm, làm giảm các trị số iot trong chất béo, dẫn tới ít chất dinh dưỡng tích tụ trong phân, làm thay đổi các cộng đồng vi sinh vật trong phân thành các quần thể có lợi cho việc phân hủy các chất rắn, và làm giảm các phát thải khí amoniac, metan, và hydro sulfua.

Bảng 6

Hiệu quả của sự kết hợp ba chủng *Bacillus* DFM được cung cấp dưới dạng chất bổ sung cho khẩu phần ăn tới về các đáp ứng hiệu suất tăng trưởng của lợn đang tăng trưởng-vỗ béo so với lợn được cho ăn khẩu phần đối chứng. *

Item	Khẩu phần ăn			Trị số P
	CTL	DFM	MSE ¹	
<i>ADG, pao</i>				
Giai đoạn 1 (tuần 1-3)	1,81	1,82	0,104	0,71
Giai đoạn 2 (tuần 3-6)	1,67	1,70	0,165	0,51
Giai đoạn 3 (tuần 6-9)	1,93	1,95	0,127	0,58
Giai đoạn 4 (tuần 9-12)	1,98	2,01	0,172	0,64

Giai đoạn 5 (tuần 12-15)	1,88	1,99	0,190	0,054
<i>ADFI, pao</i>				
Giai đoạn 1 (tuần 1-3)	3,71	3,7	0,230	0,87
Giai đoạn 2 (tuần 3-6)	4,61	4,56	0,385	0,65
Giai đoạn 3 (tuần 6-9)	5,75	5,75	0,391	0,95
Giai đoạn 4 (tuần 9-12)	6,52	6,58	0,506	0,64
Giai đoạn 5 (tuần 12-15)	6,68	6,71	0,611	0,87
<i>Chỉ số tăng trọng: thức ăn</i>				
Giai đoạn 1 (tuần 1-3)	0,493	0,495	0,023	0,742
Giai đoạn 2 (tuần 3-6)	0,362	0,378	0,035	0,127
Giai đoạn 3 (tuần 6-9)	0,343	0,337	0,025	0,369
Giai đoạn 4 (tuần 9-12)	0,305	0,307	0,024	0,780
Giai đoạn 5 (tuần 12-15)	0,282	0,298	0,021	0,011
<i>Thể trọng, pao</i>				
Ban đầu	63,7	63,9	1,06	0,48
Tuần 9	175,5	177,0	6,10	0,38
Tuần 15	258,5	262,9	10,51	0,15

* Dữ liệu là giá trị trung bình của 24 chuồng/chế độ.

¹ MSE = sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình

Ví dụ 5

Chứng minh hiệu lực của việc xử lý bổ sung hàm phân lợn trên cơ sở *Bacillus* để cải thiện cho việc lưu trữ, quản lý và xử lý chất thải phân lợn

Một nghiên cứu sẽ được tiến hành để đánh giá hiệu quả của phụ gia hàm phân lợn trên cơ sở *Bacillus* tới sự tích tụ các chất rắn, thành phần chất dinh dưỡng, và các đặc tính tạo bọt trong phân. Nhiều vị trí sản xuất sẽ được sử dụng khi có chứa ít nhất là ba chuồng gia súc có các bể chứa và xử lý phân tách biệt. Các hàm phân ở mỗi vị trí sẽ được xử lý bằng chất phụ gia trên cơ sở *Bacillus* với hai liều lượng và một hàm phân sẽ để nguyên không được xử lý. Việc xử lý hàm phân ở liều thấp sẽ được thực hiện cho một hàm phân tại mỗi vị trí sản xuất với 500g chất liệu thử nghiệm cho 100000 galon phân đã được điều chế để chứa 4×10^{10} CFU trên 1 gam chất liệu thử nghiệm. Việc xử lý với liều cao sẽ được thực hiện với một hàm phân khác với hàm phân liều thấp ở mỗi vị trí sản xuất với 500g chất liệu thử nghiệm cho 100000 galon phân đã được điều chế để chứa 1×10^{11}

CFU trên 1 gam chất liệu thử nghiệm. Hàm phân thứ ba tại mỗi vị trí sẽ để nguyên không được xử lý làm đối chứng.

Các mẫu sẽ được lấy từ mỗi hàm phân ở mỗi vị trí sản xuất vào lúc trước khi bắt đầu xử lý bất kỳ và một cách định kỳ (khoảng một tháng một lần) trong khoảng thời gian từ ba tới sáu tháng. Dữ liệu từ các hàm phân sẽ được thu thập để đánh giá khả năng tạo bột và các mẫu phân sẽ được phân tích để đánh giá sự tích tụ các chất rắn và thành phần chất dinh dưỡng. Điều sẽ được kỳ vọng là các hàm phân lợn đã được xử lý sẽ ít tạo bột, ít tích tụ các chất rắn, và các hàm lượng nitơ, lưu huỳnh, phospho, nitơ gắn với chất xơ, tổng protein, chất béo, và chất xơ ít hơn so với các hàm phân đối chứng.

Ví dụ 6

Thử nghiệm khẩu phần ăn gia cầm cho thấy cải thiện về hiệu suất tăng trưởng đáp ứng sự kết hợp các chủng *Bacillus subtilis* 3BP5 được bổ sung vào các khẩu phần ăn cho gia cầm

Các thử nghiệm khẩu phần thức ăn cho gia cầm sẽ được tiến hành để đánh giá các hiệu quả của chất phụ gia thức ăn vi sinh vật ăn trực tiếp (DFM) trên cơ sở *Bacillus* tới sự tăng cân, hấp thụ thức ăn, hiệu quả thức ăn và tỷ lệ tử vong của gà tây, gà thịt, và gà đẻ trứng. Trong các nghiên cứu này, khoảng 22 con gia cầm cho một lần lặp lại chế độ sẽ được thiết kế một cách ngẫu nhiên cho các chế độ khẩu phần ăn. Các chế độ khẩu phần ăn có thể chứa một vài sự kết hợp của các chủng *Bacillus* được cung cấp làm DFM và các chế độ DFM thử nghiệm kết hợp với các enzym, so sánh với nhóm gia cầm đối chứng tương đối. Các chế độ *Bacillus* DFM sẽ được bổ sung cho khẩu phần ăn với mức $1,5 \times 10^5$ CFU/g thức ăn và được cung cấp với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^7 đến 5×10^7 CFU/đầu/ngày trên cơ sở lượng ăn trung bình ngày của các hệ sản xuất khác nhau (gà tây, gà thịt, gà đẻ trứng). Các khẩu phần ăn gồm các khẩu phần ăn trên cơ sở ngô-bột đậu tương-DDGS. Năng lượng và tất cả các hàm lượng chất dinh dưỡng khác sẽ được điều chế để đáp ứng hoặc vượt quá các điều kiện của các gia cầm thử nghiệm. Các khẩu phần ăn sẽ được cho ăn trong khoảng thời gian thử nghiệm khoảng 42 ngày và sẽ được cho ăn trong ba giai đoạn thức ăn: ban đầu (các ngày 1-20) và phát

triển (các ngày 21-38) và cuối (các ngày 38-42). Các khẩu phần ăn sẽ được tạo viên tròn (khoảng 75°C), và thức ăn ban đầu sẽ được bẻ vụn.

Dữ liệu từ các nhóm được xử lý sẽ so với các dữ liệu của nhóm đối chứng có liên quan bằng cách sử dụng các thử nghiệm thống kê thích hợp. Thể trọng, sự tăng cân, hấp thụ thức ăn, FCR, FCE và tỷ lệ tử vong sẽ được phân tích bởi phép phân tích phương sai (ANOVA) và các kiểm tra sự khác biệt đáng kể nhất.

Khi hoàn thành, điều được dự liệu là các dữ liệu này sẽ chứng minh cho hiệu quả của các chế độ DFM. Đặc biệt, điều được dự liệu là chế độ DFM sẽ làm tăng tỷ lệ sản lượng nạc và tỷ lệ phần trăm thịt móc hàm, làm thay đổi các cộng đồng vi sinh vật đường dạ dày ruột thành các quần thể có lợi cho việc sử dụng dinh dưỡng, và cải thiện năng suất phát triển gia cầm, và cải thiện khối lượng vỏ trứng.

Ví dụ 7

Hiệu quả của vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* tới hiệu suất tăng trưởng của lợn, các số đo thân thịt, các đặc tính hàm phân, và các phát thải khí vào môi trường

Tổng cộng 444 con lợn (200 con lợn thiến và 244 lợn nái) được sử dụng trong nghiên cứu tăng trưởng-vỗ béo trong 15 tuần để nghiên cứu việc sử dụng chất bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* tới hiệu suất tăng trưởng, các số đo thân thịt, các đặc tính hàm phân và các phát thải khí. Các con lợn được nhốt trong các buồng được kiểm soát môi trường, gồm 12 buồng giống nhau với 12 chuồng mỗi buồng. Có hai hàm phân trong mỗi buồng với dưới mỗi trong số 12 buồng có 6 chuồng trên mỗi hàm phân. Trước khi bắt đầu thử nghiệm, các hàm phân đều được làm sạch kỹ. Sau đó, các hàm phân được nạp một lượng nhỏ nước (khoảng 600 gallon).

Các con lợn được phân bổ cho các thử nghiệm đã được cai sữa, được quy định về thể trọng và giới tính, và được phân một cách ngẫu nhiên cho các chế độ khẩu phần ăn (đối chứng và *Bacillus* DFM) với 4-5 con mỗi chuồng (2-3 lợn thiến và 2-3 lợn nái mỗi chuồng). Trước khi bắt đầu các chế độ khẩu phần ăn, lợn được cho ăn khẩu phần ăn điều chỉnh trong hai tuần để tạo ra phân vào các hàm. Sau đó, lợn được cho ăn hoặc là khẩu phần ăn đối chứng hoặc là khẩu phần đối chứng

có bổ sung *Bacillus* DFM. Vi sinh vật *Bacillus* DFM chứa các tỷ lệ ngang bằng của các chủng *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) và AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) được bổ sung để đảm bảo $3,0 \times 10^8$ cfu/g của sản phẩm DFM, và bao gồm tỷ lệ 1 pao/tấn trong thức ăn thu được nồng độ $1,5 \times 10^5$ cfu/g trong thức ăn.

Các chế độ khẩu phần ăn được duy trì trong suốt thử nghiệm, nhưng các khẩu phần ăn được điều chỉnh với ba tuần một lần để đáp ứng tốt hơn các nhu cầu dinh dưỡng cho lợn, dẫn đến 5 giai đoạn khẩu phần ăn (3 giai đoạn đầu, 2 giai đoạn vỗ béo) được điều chế để đáp ứng hoặc vượt quá các yêu cầu dinh dưỡng của lợn ở mỗi giai đoạn sản xuất trong số năm giai đoạn (NRC, 1998). Các chế phẩm của khẩu phần ăn là dựa trên cơ sở ngô và bột đậu tương với các mức thay đổi của các bã rượu khô trên cơ sở ngô cùng với các chất tan (DDGS) trong năm giai đoạn. Đặc biệt, các khẩu phần ăn cho các giai đoạn 1, 2, và 3 đã được điều chế để chứa 25% DDGS, khẩu phần ăn Giai đoạn 4 cuối chứa 20% DDGS, và khẩu phần ăn Giai đoạn 5 cuối thứ hai chứa 10% DDGS.

Thể trọng của lợn và sự hấp thụ thức ăn của lợn được ghi chép mỗi ba tuần ở thời điểm cuối mỗi giai đoạn. Các hàm phân được lấy mẫu vào lúc bắt đầu và kết thúc của mỗi giai đoạn tăng trưởng và giai đoạn vỗ béo bằng cách sử dụng bộ lấy mẫu lõi chân không được thiết kế cùng với một bơm chân không được nối với hai bình chân không bằng ống chất dẻo trong có các đầu lấy mẫu lõi bằng chất dẻo cứng. Các mẫu lõi của hàm phân được tạo ra bằng cách lấy mẫu bốn vị trí dưới mỗi ngăn trong mỗi hàm khi thử nghiệm. Các vị trí lấy mẫu trong hàm phân so với chuồng gồm: (1) ở dưới chính giữa chuồng; (2) dưới nước của chuồng; (3) dưới mặt trước của bộ cấp thức ăn của chuồng; và (4) dưới góc xa của chuồng đối diện bộ cấp thức ăn. Các chất trong phân được phân tích về tổng hàm lượng N, amoni N, chất khô (DM), tro, Ca và P (AOAC 2007). Trong suốt thử nghiệm, các nồng độ khí trong đường thông khí hàm phân và phía trước quạt thổi tường được kiểm tra bằng cách sử dụng thiết bị đo theo thời gian thực liên tục. Các dữ liệu này được kết hợp với các tốc độ thông gió để xác định tốc độ phải thải trong buồng mỗi ngày đối với khí amoniac, metan, và hydro sulfua. Các dữ liệu này được biểu hiện dưới dạng gam khí trên pao tăng cân của lợn. Các nồng độ metan

và hydro sulfat cũng được đo trong 10 ngày liên tiếp (các ngày 70 - 80 đối với CH_4 , các ngày 80 - 90 đối với H_2S) và được tính trung bình trên cơ sở một buồng để phân tích tổng khí tạo ra ($n = 12$).

Các mẫu hàm phân được phân tích về các thành phần chất dinh dưỡng (AOAC 2007) và axit béo dễ bay hơi (VFA). Cho việc phát hiện bằng sắc ký lỏng áp lực cao (HPLC) các axit béo dễ bay hơi, 10mL mỗi mẫu được phân vào ống falcon loại 15mL và được cất giữ ở -20°C cho đến khi phân tích HPLC. Sau khi rã đông, các mẫu được ly tâm với tốc độ 16,1 rad trong 15 phút. Một mililít (1mL) dịch nổi trên bề mặt được pha loãng trong 9mL dung dịch nước axit phosphoric 16,8 mM/axetonitril (98:2, thể tích/thể tích). Dịch nổi trên bề mặt đã pha loãng này được tạo xoáy trong 10 giây và sau đó được ly tâm với tốc độ 16,1 rad trong 15 phút. Dịch nổi trên bề mặt này được lọc ($0,22\mu\text{m}$) và được phân tích về axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit I-butyric, axit I-valeric, axit valeric, 4-metylvalerat bằng cách sử dụng modul tách Waters 2695 (Waters Corp., Milford, MA) được lắp cùng với cột 300 X 7,8 mm Aminex HPX-87H (Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Phương pháp isocratic được áp dụng với dung môi pha động chứa dung dịch nước axit phosphoric 16,8mM/axetonitril (98:2, thể tích/thể tích) với lưu lượng 0,85mL/phút và nhiệt độ cột 65°C . Tất cả các chất phân tích được phát hiện bằng bộ dò 2996 PDA (Waters) với độ hấp thụ 211nm.

Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp General Linear Model của SAS cho thử nghiệm để xử lý và lặp lại các khác biệt. Chuồng là đơn vị thử cho hiệu suất tăng trưởng và các dữ liệu thân thịt, hàm phân là đơn vị thử nghiệm cho các dữ liệu bài tiết và VFA và buồng là đơn vị thử nghiệm cho dữ liệu phát thải khí.

Các kết quả

Lợn có cân nặng trung bình 64,5 pao (29,2kg) vào lúc bắt đầu thử nghiệm và có cân nặng trung bình 257,1 (116,6kg) pao sau 15 tuần cho ăn. Lợn được cho ăn khẩu phần ăn chứa DFM bổ sung có thể trọng nặng hơn 4 pao (1,9kg) ($P = 0,10$) vào cuối thử nghiệm so với lợn được cho ăn đối chứng (Bảng 7). Đáp ứng này là do sự phát triển nhanh hơn khi lợn được cho ăn chất bổ trợ DFM so với lợn

đối chứng (2,01 so với 1,93 pao (0,87kg)/ngày, một cách tương ứng; $P < 0,03$; Bảng 8). Lượng ăn trung bình ngày (ADFI) không bị ảnh hưởng bởi chế độ khẩu phần ăn (Bảng 9). Việc không khác nhau giữa các chế độ khẩu phần ăn này đối với sự hấp thụ thức ăn, kết hợp với sự tăng trọng trung bình ngày cao ở lợn được cho ăn DFM, dẫn đến cải thiện hiệu quả thức ăn ($P < 0,08$) trong hai giai đoạn vỗ béo (Giai đoạn 4 và 5) và trong toàn bộ thử nghiệm 15 tuần khi lợn được cho ăn khẩu phần ăn có bổ sung DFM so với lợn được cho ăn khẩu phần ăn đối chứng. (Bảng 10).

Bảng 7

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) trong khẩu phần ăn tới thể trọng của lợn

Mục	Khẩu phần		MSE	trị số P
	CTL	DFM		
<i>Thể trọng, pao</i>				
Ban đầu	64,30	64,73	1,21	0,17
tuần 3	97,96	98,74	2,96	0,20
tuần 6	132,44	132,95	5,96	0,68
tuần 9	172,07	172,6	7,74	0,74
tuần 12	212,82	215,51	10,14	0,20
tuần 15	255,05	259,13	12,17	0,10

Bảng 8

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) trong khẩu phần ăn tới tốc độ tăng trưởng bình quân ngày (ADG).

Mục	Khẩu phần		MSE	Trị số P
	CTL	DFM		
<i>ADG, pao</i>				
tuần 0-3	1,72	1,74	0,129	0,39
tuần 3-6	1,64	1,63	0,224	0,78
tuần 0-6	1,68	1,68	0,145	0,90
tuần 6-9	1,89	1,89	0,182	0,98
tuần 0-9	1,75	1,75	0,123	0,91
tuần 9-12	1,94	2,04	0,327	0,13
tuần 0-12	1,8	2,01	0,119	0,25
tuần 6-12	1,91	1,97	0,198	0,20
tuần 12-15	1,92	1,98	0,292	0,30

tuần 0-15	1,82	1,86	0,114	0,13
tuần 9-15	1,93	2,01	0,176	0,03

Bảng 9

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) trong khẩu phần ăn tới lượng ăn trung bình ngày (ADFI).

Mục	Khẩu phần		MSE	Trị số P
	CTL	DFM		
<i>ADFI, pao</i>				
tuần 0-3	3,28	3,31	0,243	0,55
tuần 3-6	4,56	4,46	0,432	0,24
tuần 0-6	3,93	3,9	0,292	0,64
tuần 6-9	5,51	5,49	0,528	0,88
tuần 0-9	4,46	4,44	0,336	0,86
tuần 9-12	6,41	6,21	0,75	0,21
tuần 0-12	4,94	4,89	0,393	0,52
tuần 6-12	5,96	5,85	0,591	0,38
tuần 12-15	6,65	6,78	0,646	0,325
tuần 0-15	5,29	5,28	0,395	0,9
tuần 9-15	6,53	6,5	0,6	0,82

Bảng 10

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) trong khẩu phần ăn tới hiệu quả thức ăn (pao tăng cân trên pao thức ăn đã tiêu thụ).

Item	Khẩu phần		MSE	Trị số P
	CTL	DFM		
Chỉ số tăng trọng:thức ăn				
tuần 0-3	0,536	0,535	0,036	0,86
tuần 3-6	0,360	0,368	0,039	0,32
tuần 0-6	0,430	0,435	0,030	0,45
tuần 6-9	0,345	0,347	0,032	0,80
tuần 0-9	0,396	0,398	0,024	0,68
tuần 9-12	0,306	0,337	0,066	0,03
tuần 0-12	0,367	0,377	0,028	0,06
tuần 6-12	0,324	0,340	0,040	0,05
tuần 12-15	0,289	0,293	0,036	0,55
tuần 0-15	0,347	0,355	0,022	0,08
tuần 9-15	0,297	0,311	0,028	0,01

Trọng lượng móc hàm là nặng hơn 4,5 pao (2,0kg) ($P < 0,01$) đối với lợn được cho ăn các khẩu phần ăn có bổ sung DFM so với lợn được cho ăn đối chứng (Bảng 11). Hơn thế nữa, các chất lượng thân thịt có xu hướng cao hơn ($P = 0,15$) khi lợn được bổ trợ cùng với DFM. Sự gia tăng về trọng lượng thân thịt do việc bổ sung DFM dẫn tới giá trị thân thịt tăng 0,39 đô la so với thân thịt đối chứng.

Bảng 11

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) trong khẩu phần ăn tới các đặc tính thân thịt.

Mục	Khẩu phần		MSE	Trị số P
	CTL	DFM		
Các đặc tính thân thịt				
độ dày mỡ, in/s	0,92	0,93	0,11	0,69
độ dày thăn, in/s	2,94	2,92	0,09	0,34
Nạc, %	54,9	54,77	0,86	0,45
Trọng lượng thịt móc hàm, pao	202,7	207,2	7,84	0,01
Chất lượng thân thịt	5,41	5,70	0,96	0,15
Giá trị thân thịt (\$/cwt)	94,44	94,83	1,58	0,23

Các giá trị chất dinh dưỡng trong phân được đo từ các mẫu được lấy trong toàn bộ khoảng thời gian thử nghiệm được đưa ra trong Bảng 12. Chất khô ($P = 0,20$), tro ($P = 0,11$), và amoni nitơ ($P = 0,15$) có xu hướng giảm trong các hàm phân liên quan tới lợn được ăn DFM *Bacillus* so với lợn đối chứng. Việc bổ sung DFM *Bacillus* làm giảm 7% chất khô, 8% tro, và 5% amoni nitơ trong phân của lợn được xử lý so với lợn đối chứng. Sự giảm được quan sát về chất khô và sự bài tiết tro có thể góp phần cải thiện hiệu quả thức ăn.

Bảng 12

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) trong khẩu phần ăn tới sự tích tụ chất dinh dưỡng trong hàm phân (g/pao sự tăng cân) trong toàn bộ thử nghiệm.

Mục	Khẩu phần		MSE	Trị số P
	CTL	DFM		
Tổng cộng				
DM	296,8	276,4	36,31	0,20

Tro	55,06	50,79	5,89	0,11
Tổng N	19,25	18,98	2,82	0,83
Amoni N	14,71	13,94	1,21	0,15
P	5,65	5,29	0,73	0,26
Ca	8,50	8,03	2,09	0,63

Việc không có sự khác nhau về sự bài tiết tổng nitơ trong phân giữa các xử lý chứng minh rằng sự giảm quan sát được về amoniac nitơ từ xử lý bằng DFM là do sự thay đổi về sinh thái học vi sinh và hoạt tính trong các hàm phân liên quan tới xử lý bằng DFM so với đối chứng. Khi được biểu hiện dưới dạng gam trên pao thể trọng của lợn, sự phát thải khí metan có xu hướng giảm ($P = 0,16$; giảm 17%) khi lợn được cho ăn các khẩu phần ăn có bổ sung DFM (Bảng 13). Sự phát thải khí hydro sulfua, được biểu hiện dưới dạng gam trên pao thể trọng của lợn, là không khác đáng kể so với đối chứng, nhưng giảm 10% khi lợn được cho ăn các khẩu phần ăn có bổ sung DFM. Sự phát thải amoniac là luôn thấp hơn đối với lợn đã được cho ăn DFM ở tất cả các thời điểm. Tổng phát thải khí metan và hydro sulfua (gam/ngày) giảm ($P = 0,08$) lần lượt là 14% và 19% ở các buồng nuôi lợn được cho ăn bổ sung DFM so với lợn đối chứng (Bảng 14).

Bảng 13

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) trong khẩu phần ăn tới các phát thải khí vào môi trường (g/pao tăng cân BW).

Mục	Khẩu phần		MSE	Trị số P
	CTL	DFM		
<i>Tổng cộng</i>				
NH ₃	4,31	4,14	0,821	0,74
CO ₂	1,36	1,37	0,137	0,97
CH ₄	8,07	6,72	1,43	0,16
H ₂ S	0,61	0,55	0,133	0,51

Bảng 14

Hiệu quả của việc bổ sung DFM trong khẩu phần ăn tới sự phát thải khí metan (CH₄) và hydro sulfua (H₂S).¹

Phát thải	Chế độ khẩu phần ăn		SEM	Trị số P
	Đối chứng	DFM thử nghiệm		

Metan (CH ₄)	1072,8	922,6	47,1	0,086
Hydro sulfua (H ₂ S)	95,3	77,3	7,8	0,149

¹ Dữ liệu theo g/ngày; SEM=sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình.

Tổng các axit béo dễ bay hơi (VFA) giảm ($P = 0,01$) trong phân của lợn được cho ăn các khẩu phần ăn có bổ sung DFM *Bacillus* so với phân của lợn đối chứng (Bảng 15). Đặc biệt, việc giảm này là do ít tạo ra 1-butytrat ($P = 0,04$), 4-metyl-valerat ($P = 0,05$), và propionat ($P = 0,12$) trong quá trình lên men vi sinh yếm khí trong phân. Ngược lại, việc bổ sung DFM dẫn đến tạo ra butytrat nhiều hơn ($P = 0,06$).

Bảng 15

Hiệu quả của việc bổ sung DFM trong khẩu phần ăn tới thành phần axit béo dễ bay hơi (VFA) trong phân. ¹

Axit béo dễ bay hơi (VFA)	Chế độ khẩu phần ăn			
	Đối chứng	DFM	SEM	Trị số P
Axetat	15,46	15,09	0,74	0,724
Propionat	6,92	5,79	0,50	0,120
Butytrat	2,89	4,06	0,42	0,062
I-Butytrat	1,54	1,19	0,11	0,042
4-metyl-Valerat	16,29	11,66	1,61	0,053
Tổng VFA	45,71	40,18	1,52	0,017

¹ Dữ liệu tính theo ppm chất khô tính theo sự tăng cân.

Dữ liệu từ thử nghiệm này cho thấy rằng lợn được cho ăn các khẩu phần ăn có bổ sung DFM *Bacillus* trong các giai đoạn sản xuất tăng trưởng và vỗ béo dẫn đến cải thiện về mức tăng trưởng, hiệu quả thức ăn, và trọng lượng mót hàm cuối. Việc bổ sung cùng với DFM cũng có thể làm giảm chất khô, tro, và amoni N trong hàm phân. Hơn thế nữa, sự giảm phát thải metan và hydro sulfua từ phân lợn được lưu trữ xảy ra khi DFM *Bacillus* được bổ sung vào các khẩu phần ăn cho lợn.

Ví dụ 8

Hiệu quả của vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* tới sinh thái học vi sinh trong phân lợn được lưu trữ

Các mẫu hàm phân được tạo ra từ nghiên cứu tăng trưởng-vỗ béo 15 tuần được mô tả ở Ví dụ 7. Các mẫu phân để phân tích vi sinh được thu thập vào cuối thử nghiệm như được mô tả ở trên trong Ví dụ 7, từ mỗi trong số hai hàm phân cho mỗi buồng và được phân tích riêng biệt tạo ra tổng cộng 24 quan sát. Archaea tạo metan (Spence *et al.*, 2008) và các nhóm vi khuẩn nghiên cứu được liệt kê thông qua phép phân tích phản ứng chuỗi polymeraza định lượng (qPCR) (Metzler-Zebeli *et al.*, 2010, Yu *et al.*, 2005). Dữ liệu được phân tích bằng cách ANOVA một đường nhờ phương pháp Proc Mixed của SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC) với mức sai khác $\alpha = 0,10$. Xu thế được biểu thị đối với 0,20, $P > 0,10$.

Việc bổ sung DFM *Bacillus* vào lợn được cho ăn các khẩu phần ăn dẫn đến sự thay đổi về các quần thể vi sinh vật trong phân lợn được lưu trữ. Nhóm phân giải protein cụm *Clostridium* I của vi khuẩn giảm xuống ($P < 0,01$) trong phân được lưu trữ thu được từ lợn đã được cho ăn DFM so với phân của lợn đối chứng (Bảng 16). Việc cung cấp DFM *Bacillus* cho lợn dẫn đến sự gia tăng cụm phân hủy fibrin *Clostridium* XIVa ($P = 0,09$) đi kèm với sự tạo butyrat. Sự gia tăng cụm *Clostridium* XIV hỗ trợ sự gia tăng quan sát được về sự tạo butyrat liên quan tới việc xử lý bằng DFM, như đã nêu trong Bảng 15 ở Ví dụ 7. Các loài *Bacteroides* và *Prevotella*, sản xuất một phổ rộng của VFA, được giảm một đáng kể ($P = 0,08$) trong phân của lợn được cho ăn bổ sung DFM. Sự sinh metan có xu hướng giảm ($P = 0,13$) trong phân được lưu trữ của lợn được cho ăn DFM *Bacillus* so với phân của lợn đối chứng, và vi khuẩn khử sulfat được giảm xuống. Sự giảm quan sát được về archaea và vi khuẩn khử sulfat hỗ trợ cho sự giảm quan sát được về sự tạo khí metan và hydro sulfua với sự bổ sung DFM đã liệt kê trong Bảng 13 và Bảng 14 trong Ví dụ 7.

Bảng 16

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) trong khẩu phần ăn tới các quần thể vi sinh vật trong phân lợn được lưu trữ.¹

Nhóm vi sinh vật	Chế độ khẩu phần ăn		SEM	Trị số P
	Đối chứng	DFM		
Sinh metan (Archaea)	0,181	0,103	0,03	0,132
<i>Bacteroides / Prevotella</i>	1,193	0,626	0,19	0,083
<i>Clostridium</i> cluster I	0,386	0,079	0,04	0,002
<i>Clostridium</i> cluster IV	2,551	1,200	0,62	0,176
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	3,525	4,835	0,47	0,097
Vi khuẩn khử sulfat	0,027	0,017	0,01	0,379

¹ Dữ liệu theo Δct so với tổng vi khuẩn và được hiệu chỉnh theo chất khô của phân (DM) và được tính theo sự tăng cân; SEM = sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình.

Ví dụ 9

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) cho lợn được nuôi tại các trại chăn nuôi từ giai đoạn cai sữa tới giai đoạn vỗ béo thương mại và được cho ăn các khẩu phần ăn được điều chế với mức cao các sản phẩm phụ và các mức năng lượng tối thiểu

Để xác định hiệu suất tăng trưởng của lợn được cho ăn các khẩu phần ăn trên cơ sở ngô-đậu nành thương phẩm với các lượng gia tăng của sản phẩm phụ, nghiên cứu từ giai đoạn cai sữa tới giai đoạn vỗ béo được tiến hành. Tổng cộng 1024 lợn đã cai sữa ở khoảng 3 tuần tuổi, được chia theo giới tính và hạng cân, được phân bổ trong 32 chuồng thử khi thử nghiệm và giai đoạn cho ăn trong 105 ngày. Lợn được cân hai tuần một lần trong ba giai đoạn sau cai sữa đầu tiên. Các khẩu phần ăn giai đoạn đầu chứa tới 20% bã rượu ngô khô và các chất tan (cDDGS). Lợn được tiếp tục trong hai giai đoạn tăng trưởng và một giai đoạn vỗ béo kéo dài 21 ngày mỗi giai đoạn. Các khẩu phần ăn trong hai giai đoạn tăng trưởng cũng như giai đoạn vỗ béo đều chứa 35% cDDGS và 15% bột lúa mì thô thay thế cho ngô trong khẩu phần ăn (Bảng 17).

Bảng 17

Các giai đoạn khẩu phần ăn và thành phần của khẩu phần ăn.¹

Giai đoạn -->	1) Ban đầu trước	2) Ban đầu cuối	3) Tăng trưởng ban đầu	4) Tăng trưởng cuối	5) Vỗ béo ban đầu
Khoảng thời gian (Ngày) -->	0 - 28	28 - 42	42 - 63	63 - 84	84 - 105

Thành phần (%)					
Ngô	53,1	48,6	28,2	31,9	35,4
SBM (46,5% CP)	25,0	27,2	18,2	14,5	11,3
Nước sữa đã sấy phun	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bột cá Sel. menh.	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0
cDDGS	0,0	20,0	35,0	35,0	35,0
Hạt lúa mỳ thô	0,0	0,0	15,0	15,0	15,0
chất béo	3,000	1,000	1,000	1,000	1,000
MCP (21% P)	1,200	0,800	0,000	0,000	0,000
Đá vôi (CaCO ₂)	0,800	1,115	1,475	1,470	1,450
Muối	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
Hỗn hợp trộn	0,150	0,150	0,090	0,090	0,075
vitamin					
Hỗn hợp trộn	0,125	0,125	0,125	0,125	0,085
khoáng chất					
Lysin HCl	0,150	0,450	0,470	0,400	0,350
DL-Metionin	0,050	0,075	0,000	0,000	0,000
L-Threonin	0,250	0,100	0,055	0,020	0,000
Phyzyme 2500TPT	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
Kẽm Oxit	0,350	0,000	0,000	0,000	0,000
Mecadox 2.5	1,000	0,500	0,000	0,000	0,000

[†] SBM, bột đậu tương; CP, protein thô; cDDGS, hạt bã rượu chung cất ngô cùng với các chất tan có hàm lượng dầu khoảng 10%; việc xử lý bao gồm chi phí cho ngô.

Các khẩu phần ăn được điều chế để mô phỏng cho các khẩu phần ăn thương phẩm tiêu chuẩn có lượng dư protein thô nhưng hạn chế về mặt năng lượng. Trừ 6 tuần đầu tiên của thử nghiệm, các chất thúc đẩy tăng trưởng có tính kháng sinh sẽ không được cho ăn. Chế độ ăn bao gồm việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp (DFM) so với khẩu phần ăn đối chứng không có DFM. Vi sinh vật ăn trực tiếp bao gồm các tỷ lệ tương đồng của các chủng *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) và AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) để đảm bảo mức $3,0 \times 10^8$ cfu/g của sản phẩm DFM, bao gồm với tỷ lệ 1 bao/tấn trong thức ăn, tạo ra nồng độ $1,5 \times 10^5$ cfu/g trong khẩu phần ăn. Các thiệt hại và hiệu suất tăng trưởng được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp Proc Mixed của SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC) với mức sai biệt $\alpha = 0,10$. Xu thế được biểu thị đối với 0,15, $P > 0,10$. Dữ liệu được thống kê theo giới tính và loại cân nặng cân đối với thể trọng ban đầu.

Tăng trọng trung bình ngày của lợn được cho ăn DFM là lớn hơn ($P < 0,05$) từ ngày 0 tới ngày 14 và từ ngày 14 tới ngày 28 của thử nghiệm khi so với lợn đối chứng (Bảng 18), dẫn đến có sự lớn hơn ($P < 0,05$) về thể trọng của lợn đã được cho ăn bổ sung DFM ở ngày 14 và ngày 28 của nghiên cứu (Bảng 19). Điều này làm gia tăng về sự tăng cân được thể hiện bởi các lợn được cho ăn bổ sung DFM, do có lượng ăn trung bình ngày lớn hơn ($P < 0,10$) trong các giai đoạn từ ngày 0 tới ngày 14 và từ ngày 14 tới ngày 28 (Bảng 20). Hiệu quả thức ăn cũng được cải thiện ($P = 0,03$) trong hai tuần đầu tiên của thử nghiệm (Bảng 20b).

Bảng 18

Tốc độ tăng trưởng bình quân ngày (adg) theo khoảng thời gian nghiên cứu.

	Đối chứng	DFM	SEM	Trị số P
adg0-14	0,419	0,474	0,012	0,003
adg14-28	1,067	1,133	0,022	0,041
adg28-42	1,414	1,370	0,022	0,169
adg0-42	0,967	0,992	0,016	0,268
adg42-63	1,798	1,837	0,016	0,097
adg63-84	1,996	1,964	0,024	0,335
adg42-84	1,897	1,900	0,012	0,857
adg0-84	1,432	1,446	0,013	0,432
adg84-105	1,994	2,045	0,016	0,027
adg42-105	1,447	1,461	0,007	0,150
adg0-105	1,287	1,305	0,009	0,143

¹ SEM=sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình.

Bảng 19

Thể trọng của lợn (lb) và tỷ lệ tổn thất sức khỏe (tỷ lệ tử vong và loại ra) trong toàn bộ khoảng thời gian nghiên cứu.

	Đối chứng	DFM	SEM ¹	Trị số P
d0	13,46	13,57	0,19	0,699
d14	19,38	20,23	0,29	0,051
d28	34,32	36,09	0,54	0,027
d42	54,11	55,27	0,79	0,308
d63	91,87	93,84	0,96	0,155
d84	133,80	135,08	1,19	0,447
d105	175,67	178,03	1,18	0,167

% tỷ lệ tử vong 2,95 1,37 0,61 0,076

¹ SEM=sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình.

Bảng 20

Lượng ăn trung bình ngày (adfi) theo khoảng thời gian nghiên cứu.

	Đối chứng	DFM	SEM	Trị số P
adfi0-14	0,624	0,671	0,013	0,017
adfi14-28	1,634	1,726	0,038	0,102
adfi28-42	2,544	2,510	0,045	0,600
adfi0-42	1,601	1,636	0,028	0,385
adfi42-63	3,747	3,873	0,049	0,077
adfi63-84	5,061	5,044	0,053	0,823
adfi42-84	4,404	4,459	0,043	0,373
adfi0-84	3,002	3,047	0,032	0,322
adfi84-105	6,191	6,099	0,048	0,180
adfi42-105	3,750	3,754	0,028	0,912
adfi0-105	3,034	3,048	0,026	0,691

¹ SEM=sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình.

Bảng 20b

Sự chuyển hóa thức ăn (chỉ số thức ăn:tăng trọng, fg) theo khoảng thời gian nghiên cứu.

	Đối chứng	DFM	SEM	Trị số P
fg0-14	1,499	1,424	0,024	0,038
fg14-28	1,533	1,524	0,021	0,769
fg28-42	1,801	1,831	0,019	0,255
fg0-42	1,611	1,593	0,010	0,235
fg42-63	2,082	2,108	0,022	0,408
fg63-84	2,539	2,571	0,032	0,486
fg42-84	2,311	2,340	0,018	0,258
fg0-84	1,961	1,966	0,011	0,721
fg84-105	3,107	2,982	0,031	0,008
fg42-105	1,932	1,915	0,013	0,369
fg0-105	1,825	1,808	0,010	0,222

¹ SEM=sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình.

Việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp dẫn đến tăng cao ($P < 0,10$) ADG và ADFI trong giai đoạn tăng trưởng ban đầu (ngày 42 tới ngày 63 của thử nghiệm). Trong giai đoạn vỗ béo của thử nghiệm, ADG tăng cao ($P = 0,02$) từ ngày 84 tới 105 khi lợn được cho ăn các khẩu phần có bổ sung DFM so với lợn đối chứng, và có xu hướng tăng cao ($P = 0,14$) trong toàn bộ khoảng thời gian từ ngày 0 tới ngày 105. Việc đáp ứng ADG được cải thiện với chế độ ăn DFM từ ngày 84 tới ngày 105 và không có đáp ứng ADFI, dẫn đến cải thiện ($P < 0,01$) sự chuyển hóa thức ăn trong khoảng thời gian này. Các cải thiện về ADG từ việc bổ sung DFM trong toàn bộ thử nghiệm dẫn đến sự nặng hơn của lợn khoảng 3 pao khi kết thúc nghiên cứu (ngày 105) so với lợn đối chứng (Bảng 19). Hơn thế nữa, các tổn thất về sức khỏe do tử vong và loại ra bởi sự nhiễm khuẩn *Streptococcus suis* v.v. giảm xuống ($P = 0,07$; Bảng 19).

Ví dụ 10

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp Bacillus (DFM) cho lợn được nuôi trong trại chăn nuôi từ giai đoạn cai sữa tới giai đoạn vỗ béo thương mại và cho ăn các khẩu phần ăn có mức cao các sản phẩm phụ và các mức năng lượng tối thiểu on hiệu quả của sự chuyển hóa thức ăn

Hiệu quả của vi sinh vật ăn trực tiếp Bacillus tới hiệu quả của việc sử dụng thức ăn của lợn, được nuôi trong trại chăn nuôi từ giai đoạn cai sữa tới giai đoạn vỗ béo được đánh giá. Tổng cộng 2160 con lợn đã cai sữa ở khoảng 3 tuần tuổi, được chia theo giới tính và được cân đối theo thể trọng ban đầu, và được phân bổ trong 68 chuồng trong hai vuông ở cùng vị trí thử nghiệm. Các động vật này ở giai đoạn cho ăn trong 105 ngày. Lợn được cân hai tuần một lần trong giai đoạn sau cai sữa đầu tiên kéo dài 42 ngày, sau khi cai sữa. Các khẩu phần ăn giai đoạn đầu chứa tới 20% bã chung cất rượy ngô khô và các chất tan (cDDGS). Lợn được tiếp tục thử nghiệm qua hai giai đoạn tăng trưởng và một giai đoạn vỗ béo, mỗi giai đoạn kéo dài 21 ngày. Các khẩu phần ăn trong giai đoạn tăng trưởng cũng như giai đoạn vỗ béo chứa 35% cDDGS và 15% bột lúa mì thô thay thế cho ngô trong khẩu phần ăn (Bảng 21). Các khẩu phần ăn được điều chế để mô phỏng cho các khẩu phần ăn thương phẩm tiêu chuẩn có protein thô và năng lượng hạn chế.

Bảng 21

Các giai đoạn cho ăn và thành phần của khẩu phần ăn.¹

Giai đoạn -->	1) Ban đầu trước	2) Ban đầu cuối	3) Tăng trưởng ban đầu	4) Tăng trưởng cuối	5) Vô béo ban đầu
Khoảng thời gian (ngày) -->	0 - 28	28 - 42	42 - 63	63 - 84	84 - 105
Thành phần (%)					
Ngô	46,5	49,6	36,7	39,6	41,5
SBM (46,5% CP)	37,0	27,0	10,0	7,0	5,0
Nước sữa đã sấy phun	10,0	-	-	-	-
Huyết tương đã sấy phun khô	2,2	-	-	-	-
cDDGS	-	20,0	35,0	35,0	35,0
Hạt lúa mỳ thô	-	-	15,0	15,0	15,0
chất béo	2,000	1,000	1,000	1,000	1,000
MCP (21% P)	0,800	-	-	-	-
đá vôi (CaCO ₂)	0,800	1,000	1,350	1,350	1,350
Muối	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
Hỗn hợp trộn	0,150	0,150	0,090	0,090	0,075
vitamin					
Hỗn hợp trộn	0,125	0,125	0,125	0,125	0,085
khoáng chất					
Lysin HCl	-	0,250	0,350	0,450	0,550
DL-Metionin	0,080	0,060	0,020	0,010	0,030
L-Threonin	-	0,100	0,020	0,060	0,100
Kẽm Oxit	0,350	-	-	-	-
Mecadox 2,5	0,400	0,400	-	-	-
Tổng cộng	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

¹ SBM, bột đậu tương; CP, protein thô; cDDGS, hạt bã rượu chưng cất ngô cùng với các chất tan cùng với khoảng 10% dầu; việc xử lý bao chi phí ngô.

Trừ 6 tuần đầu tiên của thử nghiệm, các chất thúc đẩy tăng trưởng có tính kháng sinh sẽ không được cho ăn. Chế độ khẩu phần ăn bao gồm việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp (DFM) được so sánh với khẩu phần ăn đối chứng không có DFM. Vi sinh vật ăn trực tiếp bao gồm các tỷ lệ tương đồng của các chủng *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) và AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) để đảm bảo mức $3,0 \times 10^8$ cfu/g của

sản phẩm DFM, bao gồm với tỷ lệ 1 pao/tấn trong thức ăn, tạo ra nồng độ $1,5 \times 10^5$ cfu/g trong khẩu phần ăn. Sự chuyển hóa thức ăn được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp Proc Mixed của SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC) với mức sai biệt $\alpha = 0,10$. Xu thế được biểu thị đối với 0,15, $P > 0,10$. Dữ liệu được phân khối theo phòng và giới tính cho việc phân tích.

Ít thức ăn hơn ($P = 0,02$) được đòi hỏi cho một pao tăng cân từ ngày 0 tới ngày 14 của thử nghiệm khi lợn được cho ăn các khẩu phần ăn có bổ sung DFM *Bacillus*, và đáp ứng hiệu quả thức ăn có xu hướng ($P = 0,13$) rõ rệt trong toàn bộ giai đoạn sau cai sữa từ ngày 0 tới ngày 42 của nghiên cứu. (Bảng 22). Việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp cũng cải thiện ($P = 0,08$) hiệu quả thức ăn trong giai đoạn vỗ béo (ngày 84 tới ngày 105).

Bảng 22

Sự chuyển hóa thức ăn (chỉ số thức ăn:tăng cân, fg) theo khoảng thời gian nghiên cứu

	Đối chứng	DFM	SEM	Trị số P
fg0-14	1,599	1,455	0,045	0,027
fg14-28	1,360	1,389	0,015	0,191
fg28-42	1,674	1,656	0,011	0,267
fg0-42	1,537 ¹	1,520	0,008	0,134
fg42-63	2,020	2,015	0,009	0,707
fg63-84	2,311	2,336	0,016	0,267
fg42-84	2,177	2,187	0,009	0,445
fg0-84	1,960	1,957	0,007	0,797
fg84-105	2,740	2,677	0,025	0,081
fg42-105	2,376	2,361	0,010	0,294

¹ SEM=sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình.

Ví dụ 11

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) tới đáp ứng hiệu quả thức ăn của lợn con được cho ăn các khẩu phần ăn được điều chế với mức độ cao các sản phẩm phụ dạng xơ

Tổng cộng 480 con lợn (thể trọng ban đầu: khoảng 6,0 kg) đã được cai sữa ở 21 ngày tuổi và nhốt 10 con/chuồng trong trại chăn nuôi lợn con có kiểm soát môi trường. Lợn được đưa vào thử nghiệm từ 21 ngày tuổi tới 63 ngày tuổi và cho ăn theo chương trình trình ăn hai giai đoạn với các khẩu phần ăn được điều chế trên cơ sở ngô, bột đậu tương, và 40% DDGS ngô (Bảng 23) và để đáp ứng các yêu cầu dinh dưỡng của lợn ở mỗi trong số hai giai đoạn sản xuất (Bảng 24).

Bảng 23

Thành phần khẩu phần ăn cơ bản của lợn được cho ăn các khẩu phần ăn con Giai đoạn 1 và 2

Khẩu phần sau cai sữa:	<u>NC - Sau cai sữa 1</u>	<u>NC - Sau cai sữa 2</u>
Thể trọng, pao	15 tới 25	25 tới 45
Thành phần, % trong khẩu phần		
Ngô, răng vàng	38,66	43,76
DDGS ngô	20	20
Bột đậu tương, 46,5% CP	27,2	27,2
Bột lúa mì thô, <9,5% fi	5	5
Bột cá, cá mòi dầu	2	0
Whey khô	3	0
Choice white grease	1	1
Đicanxi phosphat 18,5%	0,4	0,35
Đá vôi	1,08	1,16
Muối	0,3	0,3
NSNG Nursery Vit. Premix	0,5	0,5
L-lysin HCl	0,53	0,48
DL-metionin	0,16	0,12
L-threonin	0,17	0,13
L-tryptophan	0,01	0,01

Bảng 24

Thành phần theo tính toán của các khẩu phần ăn cơ bản, %.

	<u>Giai đoạn 1</u>	<u>Giai đoạn 2</u>
	(15 tới 25 pao)	(25 tới 45 pao)
Chất khô %	89,73	89,45
DE - kcal/pao.	1604,2	1603,43
ME - kcal/pao.	1520,6	1523,19
NE - kcal/pao.	1078	1078,46
Protein thô %	24,47	23,18

Lys %	1,45	1,31
Thr %	0,91	0,82
Met %	0,52	0,45
Met+Cys%	0,84	0,77
Trp %	0,24	0,22
Canxi %	0,74	0,64
% photpho - tổng	0,63	0,55
% photpho - có sẵn	0,33	0,25
% photpho - có thể tiêu hóa được	0,32	0,25

Tất cả các khẩu phần đều chứa phytaza (500 FTU/kg thức ăn). Một trong ba chế độ khẩu phần ăn được phân một cách ngẫu nhiên vào các chuồng để sao cho mỗi khẩu phần ăn được đại diện bởi tám chuồng lặp lại. Các chế độ khẩu phần ăn có bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp (DFM) với hai mức đưa vào (0,5 và 1,0 pao/tấn thức ăn) được so sánh với khẩu phần ăn đối chứng không bổ sung DFM (Bảng 25).

Vi sinh vật ăn trực tiếp bao gồm các tỷ lệ tương đồng của các chủng *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) và AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) để đảm bảo mức $3,0 \times 10^8$ cfu/g của sản phẩm DFM, bao gồm với tỷ lệ 0,5 hoặc 1,0 pao/tấn thức ăn để lần lượt tạo ra nồng độ $7,5 \times 10^4$ cfu/g hoặc $1,5 \times 10^5$ cfu/g trong khẩu phần ăn. Sự tăng cân của lợn và sự hấp thụ thức ăn của lợn được xác định vào ngày 21 và ngày 42 của thử nghiệm để tính toán hiệu quả thức ăn dưới dạng chỉ số tăng trọng:thức ăn. Hiệu quả thức ăn cũng có thể được tính toán dưới dạng chỉ số thức ăn:tăng trọng.

Bảng 25

Các chế độ khẩu phần ăn và tỷ lệ kết hợp DFM

Chế độ khẩu phần	Khẩu phần	Điều kiện chế biến ¹	Tỷ lệ kết hợp DFM, pao/tấn	Phyzyme XP, FTU/kg ²
T-1	Đối chứng	Cám	0,0	500
T-2	Đối chứng + DFM	Cám	0,5	500
T-3	Đối chứng + DFM	Cám	1,0	500

¹ Các khẩu phần ăn được biến dưới dạng thức ăn chưa tạo viên, dạng cám.

² Tất cả các khẩu phần đều chứa 500 FTU/kg thức ăn Phytaza.

Lợn được cho ăn các khẩu phần ăn đã được xử lý bằng DFM *Bacillus* có sự tăng cao ($P = 0,03$) về sự tăng cân trên một đơn vị hấp thụ thức ăn so với lợn được cho ăn khẩu phần ăn đối chứng trong giai đoạn sau cai sữa thứ nhất (ngày 0 tới ngày 21, sau khi cai sữa; Bảng 26).

Bảng 26

Thể trọng và hiệu quả thức ăn của lợn sau cai sữa được cho ăn các khẩu phần trên cơ sở mức xơ cao có bổ sung DFM *Bacillus* với hai mức kết hợp trong khẩu phần ăn.

Phytaza, FTU/kg	500	500	500		
<i>Bacillus</i> DFM, pao/tấn	0	0,5	1,0		
Khẩu phần	1	3	4		
Thể trọng, kg				SEM	Trị số P
ban đầu	6,79	6,79	6,79	0,021	0,378
ngày 21	11,60	11,92	11,93	0,135	0,270
ngày 42	26,0	26,7	26,5	0,38	0,482
Chỉ số tăng trọng:thức ăn					
ngày 0_21	0,656b	0,721a	0,729a	0,0192	0,039
ngày 21_42	0,655	0,661	0,641	0,0124	0,808
ngày 0_42	0,651	0,675	0,662	0,0106	0,286
Số chuồng*/khẩu phần	8	8	8		

*số lợn mỗi chuồng = 10

Ví dụ 12

Hiệu quả của vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* tới năng lượng và khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng ở lợn đang tăng trưởng được cho ăn các khẩu phần ăn chứa 40% DDGS ngô

Nghiên cứu về khả năng tiêu hóa được tiến hành trên lợn đang tăng trưởng để đánh giá các hiệu quả của vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) trong ruột hồi và tỷ lệ tiêu hóa suốt ống tiêu hóa năng lượng và các chất dinh dưỡng trong các khẩu phần ăn chứa 40% bã rượu ngô bao gồm các chất tan (DDGS). Hai mươi bốn con lợn (BW ban đầu: khoảng 25 kg) có nguồn gốc từ sự giao phối của lợn

đực G-Performer với lợn cái F-25 (Genetiporc, Alexandria, MN) đã được phẫu thuật để lắp ống thông T trong ruột hồi ngoại biên. Sau khi phẫu thuật, lợn được để hồi phục trong 21 ngày. Khẩu phần ăn trên cơ sở ngô-bột đậu tương tiêu chuẩn được cho ăn tùy thích trong khoảng thời gian này. Ba tuần sau khi phẫu thuật, các con lợn này được cho phân bổ vào hai chế độ khẩu phần ăn gồm khẩu phần ăn cơ bản đối chứng và DFM *Bacillus*. Lợn được nuôi trong các chuồng riêng (1,2 x 1,5m) trong buồng có kiểm soát môi trường. Mỗi chuồng được trang bị một bộ cấp thức ăn và ống cho uống nước dạng kẹp và toàn bộ sàn được lát bê tông.

Khẩu phần ăn cơ bản tiêu chuẩn được điều chế trên cơ sở ngô, bột đậu tương, và 40% DDGS ngô (Bảng 27). Các chế độ khẩu phần ăn gồm (1) khẩu phần ăn cơ bản không có DFM ; hoặc (2) khẩu phần ăn cơ bản có 0,05% DFM được bổ sung trên cơ sở bột ngô. Vi sinh vật ăn trực tiếp bao gồm các tỷ lệ tương đồng của các chủng *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) và AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) để đảm bảo mức $3,0 \times 10^8$ cfu/g của sản phẩm DFM, bao gồm với tỷ lệ 1,0 pao/tấn thức ăn tạo ra nồng độ $1,5 \times 10^5$ cfu/g trong khẩu phần ăn. Tất cả các khẩu phần ăn được điều chế để đáp ứng hoặc vượt quá các tiêu chuẩn chất dinh dưỡng cho lợn đang tăng trưởng (NRC, 1998).

Bảng 27

Thành phần khẩu phần cơ bản thử nghiệm¹

Thành phần, %	
Ngô	32,60
DDGS	40,00
Bột lúa mì thô	10,00
SBM, 48% CP	14,00
Bột ngô	0,60
Đá vôi	1,30
Lysin HCl	0,40
Muối	0,40
Titan đioxit	0,40
Hỗn hợp trộn khoáng chất-vitamin ³	0,30
Tổng cộng	100,00
Thành phần theo tính toán, %	
CP (N x 6,25)	21,9
ME, kcal/kg	3.295

SID Lys	1,19
ADF	8,7
NDF	14,9
Ca	0,64
Tổng P	0,59
P có thể tiêu hóa được	0,29

¹Vì sinh vật ăn trực tiếp được bổ sung với lượng 0,05% khẩu phần ăn trên cơ sở bột ngô bột ngô.

³Hỗn hợp trộn vi khoáng chất-vitamin tạo ra các lượng vitamin và các khoáng chất sau đây trên một kilôgam khẩu phần ăn đầy đủ: Vitamin A, 10990 IU; vitamin D₃, 1648 IU; vitamin E, 55 IU; vitamin K, 4,4mg; thiamin, 3,3mg; riboflavin, 9,9mg; pyridoxin, 3,3mg; vitamin B₁₂, 0,044mg; axit D-pantothenic, 33mg; niacin, 55mg; axit folic, 1,1mg; biotin, 0,17mg; Cu, 16mg ở dạng đồng sulfat; Fe, 165mg ở dạng sắt sulfat; I, 0,36mg ở dạng kali iốtat; Mn, 44mg ở dạng mangan sulfat; Se, 0,3mg ở dạng natri selenit; Zn, 165mg ở dạng oxit kẽm.

Titan đioxit được sử dụng làm chất đánh dấu có thể tiêu hóa được trong tất cả các khẩu phần thức ăn. Các khẩu phần thức ăn được cho 12 con lợn ăn, với 6 con trên một khẩu phần trong 17 ngày. Lợn được để cho ăn và uống nước tùy thích trong suốt thử nghiệm. Để làm giảm đến mức tối thiểu sự nhiễm chéo các chuồng đối chứng bằng DFM, các chuồng được cấp các khẩu phần ăn không có DFM được cho ăn trước, sau đó là các chuồng có bổ sung DFM. Sau mỗi lần cho ăn, các xe phân phối thức ăn được làm sạch hoàn toàn. Lợn được cho ăn các khẩu phần ăn không có DFM cũng được cân và được thu thập mẫu đầu tiên trước lợn được cho ăn các khẩu phần ăn chứa DFM.

Các mẫu phân được thu thập vào ngày 12 qua việc lấy mẫu ngẫu nhiên và các mẫu ruột hồi được thu thập vào ngày 13 và 14. Các mẫu ruột hồi được thu thập liên tục trong 9 giờ bắt đầu vào lúc 8 giờ vào mỗi ngày thu thập. Các ống thông được mở và các túi chất dẻo loại 225-mL chất dẻo được gắn vào ruột ống thông này bằng cách sử dụng các khóa cáp, cho phép digesta (phần thức ăn được tiêu hóa và hấp thu) chảy từ ống thông vào túi chứa. Các túi này được thay đổi khi đầy digesta hoặc ít nhất là sau mỗi 30 phút. Độ pH trong digesta được đo trong túi đầu tiên được thu thập sau 9 giờ, 11 giờ, 13 giờ và 15 giờ ở mỗi ngày thu thập. Sau lần thu thập ruột hồi cuối cùng, lợn được cho ăn các khẩu phần ăn thử nghiệm tương ứng của chúng thêm 3 ngày nữa. Bữa ăn sáng (vào lúc 7 giờ) được cho ăn

vào ngày sau ngày thu thập ruột hồi cuối cùng có chứa chất đánh dấu xanh lá cây. Trong vòng 36 giờ sau đó, digesta trong ruột hồi và phân được ghi chép mỗi 30 phút từ tất cả các con lợn, và lần đầu tiên chất đánh dấu xuất hiện ở bất kỳ trong số các vị trí này được ghi lại và được sử dụng làm một số đo tốc độ chuyển qua của khẩu ăn cụ thể này.

Khi kết thúc thử nghiệm, các mẫu được giã đông và được trộn trong động vật và khẩu phần ăn và một mẫu phụ được thu thập để phân tích hóa học. Tất cả các mẫu được làm đông khô nhanh và được nghiền trước khi Phân tích. Tất cả các mẫu cũng được phân tích về chất khô (DM), xơ tủy axit (ADF), xơ tủy trung tính (NDF), và lignin.

Các giá trị về sự tiêu hóa ruột hồi biểu kiến (AID) và tỷ lệ tiêu hóa suốt ống (ATTD) của các chất dinh dưỡng được tính toán như được mô tả trước đó (Stein et al., 2007). Tính đồng nhất của các biến được xác nhận và các giá trị ngoại lai được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp UNIVARIATE (SAS Institute Inc., Cary, NC). Không phát hiện được các giá trị ngoại lai. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp MIXED. Mô hình này bao gồm chế độ khẩu phần ăn dưới dạng tác động cố định trong khi lợn là tác động ngẫu nhiên. Các giá trị trung bình hình vuông nhỏ nhất được tính toán cho mỗi biến độc lập. Lợn là một đơn vị thử nghiệm cho tất cả các tính toán, và mức α được sử dụng để xác định tầm quan trọng và xu hướng giữa các giá trị trung bình là 0,05 và 0,10, một cách tương ứng.

Giá trị độ pH ruột hồi là thấp hơn ($P = 0,03$) ở lợn được cho ăn khẩu phần ăn có chứa DFM Bacillus so với giá trị độ pH ruột hồi của lợn đối chứng (Bảng 28). Tỷ lệ chuyển qua và giá trị độ pH của phân không bị ảnh hưởng bởi chế độ khẩu phần ăn. Mặc dù ADF và NDF không bị ảnh hưởng, song việc bổ sung DFM Bacillus vào khẩu phần ăn tạo ra sự cải thiện ($P < 0,03$) AID (Bảng 29) và ATTD (Bảng 30) của lignin so với khẩu phần ăn đối chứng.

Các dữ liệu này cho thấy DFM Bacillus làm giảm độ pH của digesta trong ruột hồi và cải thiện khả năng tiêu hóa lignin trong các khẩu phần ăn trên cơ sở sản phẩm phụ có mức xơ cao.

Bảng 28

Hiệu quả của DFM *Bacillus* tới giá trị độ pH và tỷ lệ chuyển qua của digesta trong ruột hồi và phân ở lợn đang tăng trưởng được cho ăn các khẩu phần ăn bột ngô-đậu tương chứa 40% DDGS¹

Mục	Đối chứng	DFM <i>Bacillus</i>	SEM	Trị số <i>P</i>
<u>Độ pH</u>				
Digesta ruột hồi	6,78	6,64	0,04	0,03
Phân	6,05	6,14	0,08	0,48
<u>Tỷ lệ chuyển qua, giờ</u>				
Digesta ruột hồi	5,29	4,82	0,25	0,19
Phân	30,67	29,29	1,03	0,36

Bảng 29

Hiệu quả của DFM *Bacillus* tới khả năng tiêu hóa biểu kiến trong ruột hồi (AID, %) của các chất dinh dưỡng dạng xơ ở lợn đang tăng trưởng được cho ăn các khẩu phần ăn bột ngô-đậu tương chứa 40% DDGS¹

	Đối chứng	<i>Bacillus</i> DFM	SEM	Trị số <i>P</i>
ADF	10,0	6,5	2,6	0,35
NDF	25,4	19,7	2,7	0,80
Lignin	30,9	37,0	1,8	0,02

¹Dữ liệu là các giá trị trung bình hình vuông nhỏ nhất của 6 quan sát cho tất cả các xử lý.

Bảng 30

Hiệu quả của DFM *Bacillus* tới khả năng tiêu hóa biểu kiến suốt ống tiêu hóa (ATTD, %) của các chất dinh dưỡng dạng sợi ở lợn đang tăng trưởng được cho ăn các khẩu phần ăn bột ngô-đậu tương chứa 40% DDGS¹

	đối chứng	DFM <i>Bacillus</i>	SEM	<i>P</i> giá trị
ADF	32,4	32,8	2,5	0,92
NDF	42,2	39,3	2,3	0,39
Lignin	10,4	28,5	3,0	< 0,001

¹Dữ liệu là các giá trị trung bình hình vuông nhỏ nhất của 6 quan sát cho tất cả các xử lý.

Ví dụ tham chiếu 13

Hiệu quả kháng viêm của các chủng của *Bacillus* trên dòng tế bào đại thực bào HD11 của gà

Dòng tế bào đại thực bào HD11 của gà được sử dụng để xác định đáp ứng viêm với LPS và xác định hiệu lực của chủng vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* để làm thuyên giảm viêm liên quan tới nhiễm khuẩn gram âm. Các chủng *Bacillus* được sàng lọc trong thử nghiệm nuôi cấy tế bào để xác định các biến đổi về các đáp ứng biểu hiện gen xytokin gây viêm với LPS và mỗi trong số các chủng *Bacillus* (*Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), và *Bacillus subtilis* AGTP BS944 (NRRL B-50548)).

Các tế bào HD11 được ủ hoặc là: (1) một mình (không được kích thích); (2) cùng với LPS; (3) cùng với mỗi chủng *Bacillus*, và (4) cùng với LPS + chủng *Bacillus*. Thiết kết mẫu hình đĩa được minh họa trong Fig.22.

Các tế bào HD11 được phát triển tới hợp lưu và được giàn trong các đĩa nuôi cấy mô 24 lỗ cùng với môi trường Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) không có chất kháng sinh chứa 10% bào thai bò (FBS; Atlanta Biologicals, Inc., Lawrenceville, GA). Sau khi hợp lưu, môi trường được loại bỏ và việc xử lý được cung cấp trong môi trường không chất kháng sinh và sau đó được ủ trong 1 giờ ở 41°C. Sau khi ủ, các tế bào được rửa hai lần bằng PBS và được ủ trong 380µL TRIzol (Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) trong 5 phút. Các mẫu được lấy ra khỏi các đĩa, được đưa vào trong các ống vi ly tâm loại 2mL, được làm đông lạnh nhanh, và lưu trữ ở -80°C cho đến khi phân lập ARN. Để phân lập ARN từ pha hữu cơ, ống gel khóa pha nặng loại 2mL được sử dụng (Five Prime, Inc., Gaithersburg, MD). Việc dọn dẹp ARN được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit mini RNeasy (Qiagen, Inc., Valencia, CA) và sự tiêu hóa ADNza được thực hiện bằng cách sử dụng bột kit the RNase-Free DNase (Qiagen). cADN được tổng hợp nhờ sử dụng qScript cDNA SuperMix (VWR, Radnor, PA) ngay sau khi phân lập ARN.

PCR thời gian thực được sử dụng để xác định sự biểu hiện gen của các tế bào HD11 sử dụng bộ đoạn mồi được thể hiện trong Bảng 31. β -actin được sử

dụng làm gen tham chiếu. ANOVA một đường được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp Proc Mixed của SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Các giá trị trung bình được phân tách bằng Thử nghiệm Student-Newman-Keuls, mức ý nghĩa $\alpha = 0,10$.

Bảng 31

Bộ đoạn môi đặc thù của gà được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

Tên đoạn môi	Trình tự đoạn môi	Sản phẩm PCR (bp)
IL-1 β	F: 5'-AGGTCAACATCGCCACCTAC-3' (SEQ ID NO.7) R: 5'-CAACGGGACGGTAATGAAAC-3' (SEQ ID NO. 8)	196
IL-8	F: 5'-GCTCTGTCGCAAGGTAGGAC-3' (SEQ ID NO. 9) R: 5'-GGCCATAAGTGCCTTTACGA-3' (SEQ ID NO. 10)	231
β -actin	F: 5'- ATGAAGCCCAGAGCAAAAGA-3' (SEQ ID NO. 11) R: 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3' (SEQ ID NO. 12)	223

Việc thử thách lipopolysaccharit trong dòng tế bào đại thực bào của gà HD11 tạo ra sự gia tăng ($P < 0,01$) về sự biểu hiện gen của xytokin gây viêm, Interleukin (IL)-1 β và IL-8, so với các tế bào HD11 không được kích thích (Fig.23). Khi giống AGTP BS1013 được bổ sung vào các tế bào HD11 cùng với LPS ở trạng thái bào tử, chủng *Bacillus* này làm giảm ($P < 0,01$) sự biểu hiện gen của xytokin gây viêm, IL-1 β và IL-8, do việc cung cấp một mình LPS và rất giống với profin biểu hiện gen của các tế bào HD11 không được kích thích. Hơn thế nữa, đáp ứng tế bào ở gà đối với LPS với sự có mặt của chủng *Bacillus* thực vật BS1013 về mặt định lượng là thấp hơn, nh chủng *Bacillus* AGTP BS3BP5 ở trạng thái bào tử, và các bào tử và các tế bào thực vật của chủng *Bacillus* AGTP BS944.

Các dữ liệu này chứng minh ảnh hưởng của các chủng DFM *Bacillus* để làm thuyên giảm viêm gắn liền với bệnh nhiễm khuẩn, và của chúng hiệu lực trong các loài gia cầm. Chủng DFM *Bacillus* có thể được sử dụng để làm thuyên viêm đại thực bào. Ngoài ra, các chủng DFM *Bacillus* có thể được sử dụng để làm thuyên các bệnh nhiễm khuẩn gram âm, và các ảnh hưởng của các nhiễm khuẩn này.

Ví dụ tham chiếu 14

Hiệu quả kháng viêm của các chủng *Bacillus* trong dòng tế bào biểu mô ruột của chuột (IEC-6)

Dòng tế bào biểu mô ruột của chuột IEC-6 được sử dụng để xác định đáp ứng viêm với LPS và xác định hiệu lực của các chủng vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* để làm thuyên giảm viêm liên quan tới nhiễm khuẩn gram âm. Các chủng *Bacillus* được sàng lọc trong thử nghiệm nuôi cấy tế bào để xác định các biến đổi về các đáp ứng biểu hiện gen xytokin gây viêm với LPS và mỗi chủng *Bacillus* (*Bacillus subtilis* AGTP BS1013 (NRRL B-50509), *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510), và *Bacillus subtilis* AGTP BS944 (NRRL B-50548), *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 (NRRL B-50544), *Bacillus subtilis* AGTP BS 442 (NRRL B-50542), *Bacillus subtilis* AGTP BS521 (NRRL B-50545), và *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508)). Các chủng *Bacillus* bổ sung có thể được sử dụng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068, (NRRL B-50543) và *Bacillus pumilus* KX11-1 (NRRL B-50546).

Các tế bào IEC-6 được ủ hoặc là: (1) một mình (không được kích thích); (2) cùng với LPS; (3) cùng với mỗi chủng DFM *Bacillus*, và (4) cùng với LPS + chủng *Bacillus*. Thiết kế mẫu hình đĩa được minh họa trong Fig.24.

Các tế bào IEC-6 được phát triển tới hợp lưu và được giàn trong các đĩa nuôi cấy mô 24 lỗ cùng với môi trường Eagle đã cải biến của Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) chứa 10% FBS (Atlanta Biologicals, Inc., Lawrenceville, GA) và 1% chất kháng sinh-kháng nấm (Atlanta Biologicals). Sau khi các đĩa đã hợp dòng, các tế bào IEC-6 được rửa ba lần bằng nước muối được đệm đệm phosphat (PBS). Việc xử lý được cung cấp trong môi trường không chất kháng sinh và sau đó được ủ trong 1 giờ ở 37°C. Sau khi ủ, các tế bào được rửa hai lần bằng PBS và được ủ trong 380µL TRIzol (Invitrogen) trong 5 phút.

Các mẫu được lấy ra khỏi các đĩa, được đưa vào trong các ống vi ly tâm loại 2mL, được làm đông lạnh nhanh, và lưu trữ ở -80°C cho đến khi phân lập ARN. Để phân lập ARN từ pha hữu cơ, ống gel khóa pha nặng loại 2mL được sử

dụng (Five Prime, Inc., Gaithersburg, MD). Việc dọn dẹp ARN được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit mini RNeasy (Qiagen, Inc., Valencia, CA) và sự tiêu hóa ADNza được thực hiện bằng cách sử dụng bột kit the RNase-Free DNase (Qiagen). cADN được tổng hợp nhờ sử dụng qScript cDNA SuperMix (VWR, Radnor, PA) ngay sau khi phân lập ARN.

PCR thời gian thực được sử dụng để xác định sự biểu hiện gen của các tế bào IEC-6 sử dụng bộ đoạn môi được thể hiện trong Bảng 32. β -actin được sử dụng làm gen tham chiếu. ANOVA một đường được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp Proc Mixed của SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Các giá trị trung bình được phân tách bằng Thử nghiệm Student-Newman-Keuls, mức ý nghĩa $\alpha = 0,10$.

Bảng 32

Bộ đoạn môi đặc thù của chuột được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

Tên đoạn môi	Trình tự đoạn môi	Sản phẩm PCR (bp)
TNF- α	F: 5'-GGCAGCCTTGTCCTGAAGAG-3' (SEQ ID NO. 13)	171
	R: 5'-GTAGCCACGTCGTAGCAAACC-3' (SE ID NO. 14)	
β -actin	F: 5'-TGACGAGGCCAGAGCAAGA-3' (SEQ ID NO. 15)	331
	R: 5'-ATGGGCACAGTGTGGGTGAC-3' (SEQ ID NO. 16)	

Việc thử thách lipopolysacarit trong dòng tế bào biểu mô ruột của chuột IEC-6 tạo ra sự gia tăng ($P < 0,01$) về sự biểu hiện gen của xytokin gây viêm, TNF- α , so với các tế bào IEC-6 không được kích thích (Fig.25). Chủng Bacillus BS1013 và BS1069 làm giảm ($P < 0,10$) sự biểu hiện gen của TNF- α do việc cung cấp một mình LPS khi ở trạng thái bào tử hoặc trạng thái thực vật. Các chủng Bacillus BS3BP5, BS442, và BS521 cũng làm giảm ($P < 0,10$) sự biểu hiện gen của TNF- α do việc cung cấp một mình LPS, nhưng chỉ khi ở dạng bào tử. Ngược lại, chủng Bacillus BS918 làm giảm ($P < 0,10$) sự biểu hiện gen của TNF- α do việc cung cấp một mình LPS, nhưng chỉ dạng thực vật của nó.

Các dữ liệu này chứng minh ảnh hưởng của các chủng Bacillus DFM để làm thuyên giảm viêm gắn liền với bệnh nhiễm khuẩn, và của chúng hiệu lực ở các loài động vật có vú. Các chủng DFM Bacillus có thể được sử dụng để làm

thuyên viêm đại thực bào. Ngoài ra, các chủng DFM *Bacillus* có thể được sử dụng để làm thuyên các bệnh nhiễm khuẩn gram âm, và các ảnh hưởng của các nhiễm khuẩn này.

Ví dụ 15

Hiệu quả của DFM *Bacillus* để làm giảm sự tạo bọt trong các hệ thống chứa phân lợn dạng hầm sâu thương mại

Hệ thống hầm phân lợn sâu là phổ biến ở Trung tây Hoa kỳ và dễ bị tạo bọt. Điều này được tin là do kết quả của kết hợp gia tăng đều đặn của các sản phẩm phụ dạng xơ trong thức ăn cho lợn và hậu quả là sự thay đổi về sinh thái học và các đặc tính lên men trong phân được lưu trữ. Hiệu quả của ba chủng DFM *Bacillus* được đánh giá để xác định xem liệu rằng ứng dụng của nó trong các hầm phân lợn có thể làm thay đổi theo hướng tích cực hay không đối với profin quá trình lên men vi sinh trong hầm phân và tạo ra một công cụ để kiểm soát bọt trong hầm phân. Năm vị trí sản xuất với mỗi vị trí có ba trại tăng trưởng-vỗ béo giống hệt nhau (1400 đầu lợn mỗi trại) trên các hệ thống hầm sâu riêng rẽ được chọn cho việc đánh giá. Tất cả các vị trí đều có truyền thống có nguy cơ cao về sự tạo bọt dựa trên cơ sở các mức kết hợp cao của các bã rượu khô chứa các chất tan (DDGS) và các thành phần sản phẩm phụ dạng xơ khác trong các khẩu phần ăn và từ các tỷ lệ mắc phải sự tạo bọt trong quá khứ.

Đối với mỗi trong số 3 hầm cho một vị trí, việc lấy mẫu đường nên được thiết lập trước khi bắt đầu thử nghiệm bằng cách sử dụng ống dẫn PVC 1' được lắp cùng với van kiểu phao để lấy mẫu. Đối với mỗi lần lấy mẫu, độ sâu chất lỏng và độ sâu bọt được đo và tỷ số chất lỏng:bọt được tính toán để dung nạp sự thay đổi các thể tích hầm trong toàn bộ khoảng thời gian nghiên cứu do thể tích của hầm thay đổi đáng kể sau 21 ngày lấy mẫu. Sản phẩm được thử nghiệm bao gồm các tỷ lệ tương đồng của các chủng AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) và AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) như các ví dụ 9 và 10. Các chủng khác có thể được sử dụng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, và *Bacillus*

subtilis AGTP BS1069, và *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 và *Bacillus pumilus* KX11-1.

Hai mức tỷ lệ kết hợp sản phẩm *Bacillus* được cấp trực tiếp vào hầm phân và được thử nghiệm để so sánh với các hầm đối chứng không được xử lý. Inoculant hầm *Bacillus* được áp dụng với tỷ lệ $5,3 \times 10^4$ cfu/mL phân tương đương với tỷ lệ chủng nếu cho động vật ăn ở mức $1,5 \times 10^5$ cfu/g thức ăn và liều dùng gấp 2,5 lần (2,5X) được áp dụng cho hầm phân với tỷ lệ $1,3 \times 10^6$ cfu/mL phân. Sản phẩm *Bacillus* được tái áp dụng mỗi 60 ngày trong khoảng thời gian đầy đủ là 170 ngày. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng ANOVA một đường theo phương pháp Proc mixed của SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC) với các biện pháp lặp lại để phát hiện theo thời gian. Mức ý nghĩa $\alpha = 0,10$, các số trung bình được tách bằng cách sử dụng trắc nghiệm Least Square Difference (LSD).

Không có sự khác nhau về độ sâu bột, độ sâu chất lỏng, hoặc tỷ số bột:chất lỏng giữa các hầm ở các vị trí được nhận diện cho thử nghiệm (Bảng 33). Tuy nhiên, ba tuần sau khi áp dụng xử lý xử lý, độ sâu bột giảm xuống ($P = 0,03$) trong các hầm được xử lý bằng inoculant hầm *Bacillus* với mức tương đương như các hầm không được xử lý. Độ sâu chất lỏng không khác nhau giữa ba chế độ xử lý ba tuần sau khi áp dụng inoculant hầm *Bacillus*, dẫn đến làm giảm ($P = 0,01$) tỷ số bột:chất lỏng khi inoculant hầm *Bacillus* được cung cấp với dùng tương đương với các hầm không được xử lý. Tỷ số bột:chất lỏng cũng giảm xuống ($P < 0,10$) inoculant *Bacillus* với mức dùng tương đương với các hầm đối chứng, khi các giá trị được lấy trung bình trên tổng số ba điểm lấy mẫu trong tiến trình thử nghiệm 170 ngày (Bảng 34). Dữ liệu này cho thấy rằng tỷ lệ bổ sung inoculant *Bacillus* cao dẫn đến làm giảm bột nhất quán hơn trong tiến trình nghiên cứu (Fig.26).

Các dữ liệu này cho thấy rằng việc sử dụng inoculant gồm ba chủng *Bacillus* được cung cấp trực tiếp vào các bộ phận chứa phân lợn dạng hầm sâu để kiểm soát sự tích tụ của bột.

Bảng 33

So sánh các đặc tính bột giữa đường nền và mẫu lấy ngày 21 trung bình trên 5 vị trí thử nghiệm

Xử lý hàm	Trước khi áp dụng			Ngày 21 sau khi áp dụng lần thứ nhất		
	độ sâu	độ sâu	bột:chất	độ sâu	độ sâu chất	bột:chất
	bột (ft)	chất lỏng (ft)	lỏng	bột (ft)	lỏng (ft)	lỏng
đối chứng	0,41	1,94	0,21	1,16 ^b	2,92	0,26 ^b
1,0x <i>Bacillus</i>	0,22	1,83	0,12	0,70 ^a	2,87	0,14 ^a
2,5x <i>Bacillus</i>	0,17	2,08	0,09	0,60 ^a	2,99	0,13 ^a
Trị số <i>P</i>	0,378	0,856	0,311	0,031	0,945	0,011
SEM ¹	0,08	0,09	0,04	0,10	0,14	0,02

^{a, b} các trung bình số với các số mũ khác nhau có sự khác nhau đáng kể ($P \leq 0,10$), các giá trị trung bình được tách nhờ sử dụng LSD; ¹ SEM, sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình.

Bảng 34

So sánh các đặc tính bột trung bình trên 3 lần lấy mẫu trong khoảng thời gian thử nghiệm 170 ngày.

Xử lý hàm	Trung bình Bột:chất lỏng
đối chứng	0,23 ^b
1,0x <i>Bacillus</i>	0,15 ^a
2,5x <i>Bacillus</i>	0,10 ^a
Trị số <i>P</i>	0,049
SEM ¹	0,03

^{a, b} các trung bình số với các số mũ khác nhau có sự khác nhau đáng kể ($P, 0,10$), các giá trị trung bình được tách nhờ sử dụng LSD; ¹ SEM, sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình.

Ví dụ 16

Việc áp dụng trực tiếp sản phẩm *Bacillus* cho các hàm phân trong các vị trí tăng trưởng-vỗ béo thương mại làm thay đổi các đặc tính phân

Để so sánh hiệu quả của sản phẩm hàm phân ba chủng *Bacillus* chứa các chủng AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) và AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) với các tỷ lệ tương đồng với sản phẩm xử lý chất thải phân lợn thương mại (MicroSource S®; DSM), sản phẩm ba chủng *Bacillus* được áp dụng trực tiếp cho các hàm phân của ba vị trí sản xuất thương mại ở US Midwest hiện được cho ăn MicroSource S®. Các chủng khác có thể được sử dụng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, và *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 và *Bacillus pumilus* KX11-1.

Sản phẩm *Bacillus* được thử nghiệm tại ba vị trí sản xuất trong khoảng thời gian 60 ngày để xác định xem liệu có thể cải thiện được các đặc tính quản lý phân dựa trên tác động từ việc cung cấp MicroSource S® trong thức ăn cho lợn. Mỗi vị trí gồm hai buồng giống nhau có các hàm phân riêng rẽ và có sức chứa cho 2250 heo thị trường. Với mỗi vị trí, một chuồng được sử dụng làm đối chứng không được xử lý trong khi các chuồng còn lại được tiếp nhận xử lý hàm bằng *Bacillus*. Đối với các hàm được xử lý, tỷ lệ kết hợp sản phẩm *Bacillus* dựa trên cơ sở thể tích phân, với mức dùng $5,3 \times 10^4$ cfu/mL phân. Thể tích ban đầu của các hàm phân lợn trong thử nghiệm được ước tính là 120000 galon phân, do đó tổng cộng $2,4 \times 10^{13}$ cfu của sản phẩm *Bacillus* được cung cấp trực tiếp vào hàm phân.

Các hàm phân đối chứng và hàm phân xử lý được lấy mẫu trước và 60 ngày sau khi áp dụng sản phẩm *Bacillus*. Việc lấy mẫu trên toàn bộ độ sâu hàm được thực hiện bằng cách sử dụng một ống dẫn PVC 1' được lắp cùng với van kiểu phao để lấy mẫu. Chỉ số xét nghiệm các đặc tính phân được cải thiện được xác định là % chất rắn giảm sau 60 ngày xử lý. Thử nghiệm phi tham số One-tailed Jonckheere-Terpstra với số liệu thống kê chính xác và mức ý nghĩa $\alpha = 0,10$ được thực hiện nhờ sử dụng phần mềm thống kê SPSS (v. 17.0, IBM Corp., Armonk, NY), để phân tích sự khác biệt giữa các % chất rắn trước và sau khi áp dụng xử lý kiểm tra các sự khác biệt có ý nghĩa.

Không có sự khác biệt về trung bình các chất rắn trong phân giữa bất kỳ trong số các vị trí thử nghiệm, trong đó MicroSource S® được bao gồm làm quy

trình vận hành tiêu chuẩn trong tất cả (Bảng 35). Tuy nhiên, có sự giảm 24,3% ($P = 0,10$) về các chất rắn trên 3 vị trí được kiểm tra khi inoculant gồm ba chủng *Bacillus* được bổ sung vào hàm phân. Các dữ liệu này cho thấy rằng việc áp dụng inoculant gồm ba chủng *Bacillus* cải thiện các đặc tính quản lý phân như được chỉ ra bởi sự giảm về tỷ lệ chất rắn vượt quá sản phẩm thương mại MicroSource S®.

Bảng 35

Sự giảm chất rắn sau 60 ngày dùng sản phẩm hàm *Bacillus* để xử lý các hàm phân so với hàm phân đối chứng ở cùng vị trí sản xuất

Vị trí chuồng	Xử lý	Rắn (%)		% khác biệt (trước so với sau khi áp dụng)
		trước áp dụng	khi 60 ngày sau khi áp dụng	
1 - Bắc	đối chứng	9,58	10,02	+4,6
1 - Nam	<i>Bacillus</i>	10,21	5,70	-44,2
2 - Bắc	đối chứng	7,03	7,68	+9,3
2 - Nam	<i>Bacillus</i>	8,31	8,35	+0,5
3 - Bắc	đối chứng	8,44	7,27	-13,9
3 - Nam	<i>Bacillus</i>	7,26	5,14	-29,2
Trung bình	đối chứng			+/-0,0 ^a
	<i>Bacillus</i>			-24,3 ^b
Trị số P (SEM ¹)				0,100 (8,60)

¹ SEM, Sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình.

Ví dụ 17

So sánh ảnh hưởng của vi sinh vật ăn trực tiếp ba chủng *Bacillus* và MicroSource S® tới hiệu suất tăng trưởng của lợn đang tăng trưởng

Nghiên cứu được tiến hành để so sánh hiệu quả giữa DFM ba chủng *Bacillus* mới và MicroSource S® (DSM) để cải thiện hiệu suất tăng trưởng của lợn đang tăng trưởng. Tổng cộng 144 con lợn (thể trọng ban đầu: khoảng 23 kg) được đưa vào thử nghiệm và được nhốt trong 36 chuồng với bốn con/chuồng trong trại chăn nuôi lợn tăng trưởng có kiểm soát môi trường. Một trong ba chế độ khẩu phần ăn được phân cho mỗi chuồng (12 lần lặp lại/chế độ) và được cho ăn trong khoảng thời gian 6 tuần nghiên cứu của nghiên cứu. Các chế độ khẩu phần ăn gồm khẩu phần ăn cơ bản đối chứng, vi sinh vật ăn trực tiếp ba chủng *Bacillus*

(DFM), và MicroSource S® (DSM), là DMF xử lý chất thải của lợn thương mại trên cơ sở *Bacillus*.

Khẩu phần ăn cơ bản được điều chế để chứa 50% sản phẩm phụ (35% DDGS và 15% bột lúa mì thô; Table 36). Phytase (500 FTU/kg) được bổ sung vào tất cả các khẩu phần ăn. DFM *Bacillus* mới bao gồm các tỷ lệ tương đồng của các chủng *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) và AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) để đảm bảo mức $3,0 \times 10^8$ cfu/g của sản phẩm DFM, bao gồm với tỷ lệ 0,25 pao/tấn thức ăn tạo ra nồng độ $3,75 \times 10^4$ cfu/g trong khẩu phần ăn. Các chủng khác có thể được sử dụng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, và *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 và *Bacillus pumilus* KX11-1.

Bảng 36

Các thành phần của khẩu phần ăn cơ bản

Thành phần, %	
Ngô, %	26,510
DDGS, %	35,00
Bột lúa mì thô	15,00
SBM, 48%	19,00
HP DDG	0,00
Dầu đậu tương	1,00
Ngô thiếc bột	1,00
Đá vôi	1,25
DCP	0,00
Lysin HCL	0,45
DL-Met	0,04
L-Threonin	0,03
L-Tryptophan	0,00
Muối	0,40
Hỗn hợp trộn vitamin	0,30
Phytaza	0,02
Tổng cộng	100,00
Thành phần theo tính toán, %	
ME, kcal/kg	3315

CP	23,20
Dig Lys	1,17
Dig Met	0,39
Dig M+C	0,74
Dig Thr	0,73
Dig Tryp	0,20
Ca	0,63
Tổng P	0,61
P có thể tiêu hóa được	0,35

MicroSource S® được bao gồm trong khẩu phần ăn với mức 1 pao/tấn thức ăn, tạo ra $7,5 \times 10^4$ cfu/g trong khẩu phần ăn. Sự tăng cân của lợn và sự hấp thụ thức ăn của lợn được xác định vào ngày 21 và ngày 42 của thử nghiệm, và tốc độ tăng trưởng bình quân ngày (ADG), lượng ăn trung bình ngày (ADFI), và chỉ số tăng trọng:thức ăn (G:F) được tính toán.

Lợn được cho ăn các khẩu phần ăn có bổ sung DFM *Bacillus* mới có sự tăng cao ADG từ ngày 0 tới ngày 21 của thử nghiệm so với lợn được cho ăn khẩu phần ăn đối chứng hoặc các khẩu phần có bổ sung DFM thương mại, Microsource S® (Bảng 37). Sự gia tăng này về sự tăng cân hàng ngày có xu hướng tạo ra sự tăng cao ($P < 0,10$) về thể trọng ở lợn được cho ăn DFM *Bacillus* mới vào ngày 21 của nghiên cứu so với hai xử lý còn lại. Các dữ liệu này cho thấy rằng DFM *Bacillus* mới cải thiện sự tăng cân ở lợn đang tăng trưởng so với thương phẩm hiện có DFM trên cơ sở *Bacillus* (MicroSource S®).

Bảng 37

Hiệu suất tăng trưởng của lợn được cho ăn DFM *Bacillus* mới so với MicroSource S®

Mục	Khẩu phần				Trị số P
	Đối chứng	DFM Bacillus	Microsource S®	SEM	
<u>d 0-21</u>					
BW ban đầu, kg	23,89	23,87	23,77	1,04	0,6317
ADG, kg	0,77 ^b	0,82 ^a	0,77 ^b	0,02	0,0435
ADFI, kg	1,47	1,53	1,43	0,05	0,0640
G:F, kg/kg	0,53	0,54	0,54	0,02	0,1602
BW cuối , kg	40,09 ^d	41,09 ^c	39,94 ^d	1,19	0,0673

ngày 21-42

ADG, kg	0,96	0,94	0,88	0,04	0,4593
ADFI, kg	1,45	1,38	1,23	0,12	0,5022
G:F, kg/kg	0,66	0,69	0,75	0,05	0,6712
BW cuối, kg	60,17	60,75	58,32	1,64	0,2348

^{a,b}Các giá trị trung bình không có số mũ thông thường là khác nhau, $P < 0,05$.^{c,d}Các giá trị trung bình không có số mũ thông thường là khác nhau, $P < 0,10$.

Ví dụ 18

Nhận biết hoạt tính enzym của các chủng *Bacillus* mới

Các thử nghiệm *In vitro* được tiến hành để xét nghiệm về hoạt tính enzym của các chủng *Bacillus* mới đối với các chất nền thức ăn dạng xơ thường thấy trong các thành phần thức ăn được sử dụng để điều chế các khẩu phần ăn cho lợn và gia cầm. Việc sàng lọc năng suất cao các chủng thử nghiệm này được thực hiện bởi việc dàn mỏng vết sao chép 2 microlit giống nuôi cấy lỏng lên trên 15,0ml của các loại môi chất nền khác nhau của đối tượng nghiên cứu trong các đĩa lưới 100x100x15mm. Các hoạt tính xenlulaza, xylanaza, và β -mannanaza được xác định trên cơ sở sử dụng chất nền cụ thể bởi các chủng cá thể.

Các thành phần môi chất được sử dụng để xét nghiệm các đặc tính sử dụng chất nền do hoạt tính enzym của các chủng có nguồn gốc môi trường được đưa ra trong Bảng 38. Các đĩa thử nghiệm được giữ khô trong 30 phút sau khi áp dụng nuôi cấy, và sau đó được ủ ở 32°C trong 24 giờ. Hoạt tính enzym cho mỗi chủng được xác định bằng cách xác định vùng thoái biến chất nền theo milimét, như được chỉ ra bởi việc tách riêng mép xung quanh của sự phát triển khuẩn lạc. Các giá trị trung bình từ các đĩa lặp lại được ghi nhận.

Bảng 38

Các thành phần môi chất được sử dụng để thử nghiệm các hoạt tính enzym được minh họa bởi các đặc tính sử dụng chất nền của *Bacillus* có nguồn gốc môi trường.

Thử nghiệm đĩa	Thành phần môi chất	Các yêu cầu đánh giá thêm
----------------	---------------------	---------------------------

Xenlulaza	Amoni Sulfat 0,1%, Kali Phosphat hai bazơ 0,1%, phần chiết nấm men 0,1%, Polypepton 1,0%, Aga 1,5%, Carboxymetyl Xenluloza 0,75% (CMC)	30 phút nhuộm bằng Congo Red 0,05%, tiếp đó rửa bằng NaCl 1M.
Xylanaza	Aga dinh dưỡng, Xylan 2%	Không; Vùng xác định trừ môi chất đục
β -Mannanaza	Aga dinh dưỡng, Locust Bean Gum 0,6%	Dung dịch nhuộm iot 0,05%

Hoạt tính enzym làm thoái biến xơ của một vài chủng *Bacillus subtilis* và *Bacillus pumilus* được nêu trong Bảng 39. Tất cả các chủng đều biểu hiện hoạt tính làm thoái biến đối với ít nhất là hai trong số ba chất nền dạng xơ được đánh giá. Các dữ liệu này cho thấy rằng các chủng *Bacillus* mới này có khả năng làm thoái biến enzym đối với xenluloza, xylan, và β -manoza.

Bảng 39

Các hoạt tính xenlulaza, xylanaza, và β -mannanaza của các chủng *Bacillus*.

Tên phân lập	CMCase (Xenlulaza)	Xylanaza	β -Mannanaza
BS3BP5	3,3	3,0	N/A
BS442	1,8	2,5	2,0
BS521	6,0	4,0	2,0
BS918	4,0	5,5	3,3
BS1013	6,5	4,0	2,5
BP1068	3,0	6,0	4,5
BS1069	4,0	4,0	2,5
BS944	6,5	3,5	1,0
KXII-1	2,5	5,0	N/A

Ví dụ 19

Hiệu quả của việc bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp *Bacillus* (DFM) trong thức ăn tới mức chất vi khuẩn tồn dư sau khi rửa trong trang trại tăng trưởng-vỗ béo thương mại

Để xác định hiệu suất tăng trưởng của lợn được cho ăn các khẩu phần ăn trên cơ sở ngô-đậu nành thương phẩm với các lượng gia tăng của sản phẩm phụ, nghiên cứu tăng trưởng-vỗ béo được tiến hành. Tổng cộng 1040 lợn đã cai sữa ở khoảng 3 tuần tuổi và được cai sữa bằng cách sử dụng khẩu phần thức ăn khởi đầu

thương mại tiêu chuẩn. Các động vật được tách riêng theo giới tính, được phân bổ trong 40 chuồng trong thử nghiệm và giai đoạn cho ăn. Từ ngày 42, vi sinh vật ăn trực tiếp gồm các tỷ lệ tương đồng của các chủng *Bacillus subtilis* AGTP BS918 (NRRL B-50508), AGTP BS1013 (NRRL B-50509) và AGTP BS3BP5 (NRRL B-50510) để đảm bảo mức $3,0 \times 10^8$ cfu/g của sản phẩm DFM, bao gồm với tỷ lệ 1 bao/tấn trong thức ăn, tạo ra nồng độ $1,5 \times 10^5$ cfu/g trong khẩu phần ăn (Bảng 40). Các chủng khác có thể được sử dụng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở *Bacillus subtilis* AGTP BS442, *Bacillus subtilis* AGTP BS521, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1069, và *Bacillus subtilis* AGTP 944, *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 và *Bacillus pumilus* KX11-1.

Bảng 40

Các giai đoạn cho ăn và thành phần của khẩu phần ăn.¹

Giai đoạn -->	3) Tăng trưởng ban đầu	4) Tăng trưởng cuối	5) Vỗ béo ban đầu	6) Vỗ béo giữa	7) Vỗ béo cuối	8) Xuất chuồng
Khoảng thời gian (Ngày) -->	42 - 63	63 - 84	84 - 105	105-126	126 - 151	151+
Thành phần (%)						
Ngô	28,2	31,9	35,4	37,4	41,0	71,5
SBM (46,5% CP)	18,2	14,5	11,3	9,4	5,8	6,0
Nước sữa đã sấy phun	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bột cá Sel. menh.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
cDDGS	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	20,0
Hạt lúa mì thô	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	0,0
chất béo	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,050
MCP (21% P)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,550
đá vôi (CaCO ₂)	1,475	1,470	1,450	1,415	1,400	1,150
Muối	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,300
Hỗn hợp trộn vitamin	0,090	0,090	0,075	0,150	0,150	0,150
Hỗn hợp trộn khoáng chất	0,125	0,125	0,085	0,150	0,150	0,150
Lysin HCl	0,470	0,400	0,350	0,200	0,200	0,150
DL-Metionin	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
L-Threonin	0,055	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
Phyzyme 2500TPT	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020

¹ SBM, bột đậu tương; CP, protein thô; cDDGS, hạt bã rượu chung cất ngô cùng với các chất tan có hàm lượng dầu khoảng 10%; việc xử lý bao chi phí ngô.

Sau khi xuất chuồng các động vật, rửa và hong khô bằng không khí trong 24 giờ trang trại, mức vi khuẩn tồn dư được xác định như một chỉ báo về độ sạch của chuồng. Các mẫu được thu gom ở khu vực nằm ở phía sau mỗi chuồng ở góc sát với bộ cấp thức ăn, cách vách bên và vách sau khoảng 1 mét (Fig.27).

Vùng 16 inơ vuông của sàn trang trại được cọ sạch bằng cách sử dụng chổi cọ vô trùng đã được làm ẩm trước (PocketSwab Plus, Charm Sciences, Lawrence, MA). Vùng lấy mẫu được chà 10 lần cho mỗi lần cọ và được phân tích ba lần. Trong vòng 15 giây sau khi cọ, chổi cọ được đặt trong máy đọc LUMT Bioluminescence (Charm Sciences, Lawrence, MA). Các giá trị đơn vị ánh sáng tương đối (RLU) thu được được ghi lại và được lấy trung bình theo chuồng trước khi phân tích thống kê.

Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp NPAR1WAY của SAS (v. 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC) với mức sai biệt $\alpha = 0,05$. Dữ liệu chỉ ra sự giảm đáng kể ($P < 0,05$) mức chất vi khuẩn trong các chuồng được cho ăn các khẩu phần ăn có chứa DFM so với các khẩu phần ăn đối chứng sau khi xuất chuồng các động vật, rửa và làm khô (Bảng 41).

Bảng 41

So sánh đơn vị ánh sáng tương đối (RLU) thể hiện mức vi khuẩn tồn dư trong các chuồng thương mại được cho ăn các khẩu phần ăn đối chứng hoặc các khẩu phần ăn có bổ sung vi sinh vật ăn trực tiếp (DFM) sau khi rửa và làm khô bằng không khí cho chuồng.

Xử lý	RLU
Đối chứng	558324 ^b
DFM	421388 ^a
Trị số P	0,025
SEM ¹	39231

^{a, b} các trung bình số với các số mũ khác nhau có sự khác nhau đáng kể ($P \leq 0,05$);

¹ SEM, sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình.

Mặc dù các phương án cụ thể đã minh họa và được mô tả ở đây, song chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sự bố trí bất kỳ được tính toán để đạt

được cùng mục đích có thể được thay thế cho các phương án cụ thể đã chỉ ra. Sáng chế này được dự liệu để bao trùm các các thích ứng hoặc biến thể bất kỳ thực hiện theo các khía cạnh của sáng chế như được mô tả. Do đó, điều được dự liệu là sáng chế không chỉ được giới hạn bởi Yêu cầu bảo hộ.

Tài liệu tham khảo

- Association of Analytical Chemists (AOAC) (2007). Official methods of analysis, 18th ed. AOAC, Washington, D.C.
- Liu K. 2011. Chemical composition of distillers grains, a review. *J. Agric. Food Chem* 59:1508-1526.
- Metzler-Zebeli, B. U., Hooda, S., Pieper, R., Zijlstra, R. T., Van Kessel, A. G., Mosenthin, R. and G. Gönzle (2010). Polysaccharides Modulate Bacterial Microbiota, Pathways for Butyrate Production, and Abundance of Pathogenic *Escherichia coli* in the Pig Gastrointestinal Tract; *J Appl Env Microbiol* 76(11), 3692-3701.
- NRC. 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Stein, H. H. and G. C. Shurson. 2009. The use and application of distillers dried grains with solubles in swine diets. *J. Anim. Sci.* 87:1292-1303.
- Stein, H. H., B. Seve, M. F. Fuller, P. J. Moughan, and C. F. M. de Lange. 2007. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *J. Anim. Sci.* 85:172-180.
- Spence, C., Whitehead, T. R. and M. A. Cotta (2008). Development and comparison of SYBR Green quantitative real-time PCR assays for detection and enumeration of sulfate reducing bacteria in stored swine manure. *J Appl Microbiol* 105, 2143-2152.
- Yegani M., and D. R. Korver. 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poult. Sci* 87:2052-2063.

Yu, Y., Lee, C., Kim, J. and S. Hwang (2005). Group-Specific Primer and Probe Sets to Detect Methanogenic Communities Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Biotechnol Bioeng* 89, 670-679.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Bacillus* đã được phân lập có hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm: *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50510, *Bacillus subtilis* AGTP BS442 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50542, *Bacillus subtilis* AGTP BS521 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50545, *Bacillus subtilis* AGTP BS918 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50508, *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50509, *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50544, *Bacillus subtilis* AGTP 944 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50548 và *Bacillus pumilus* AGTP BS 1068 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50543.
2. Chế phẩm chứa dịch nổi bên trên bề mặt được tạo ra bằng cách tách ly tâm một hoặc nhiều chủng theo điểm 1.
3. Chế phẩm chứa hai hoặc nhiều chủng theo điểm 1.
4. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này chứa *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50510, *Bacillus subtilis* AGTP BS944 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50548, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50509.
5. Chế phẩm chứa *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50510, *Bacillus subtilis* AGTP BS918 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50508, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50509.
6. Thức ăn cho động vật, trong đó thức này được bổ sung *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50510, *Bacillus subtilis* AGTP

BS918 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50508, và *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50509.

7. Chủng theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS3BP5 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50510.

8. Chủng theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS442 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50542.

9. Chủng theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS521 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50545.

10. Chủng theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS918 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50508.

11. Chủng theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS1013 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50509.

12. Chủng theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS 1068 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50543.

13. Chủng theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP BS1069 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50544.

14. Chủng theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* là *Bacillus subtilis* AGTP 944 được nộp lưu với số truy cập NRRL B-50548.

Danh mục trình tự

120> CHŨNG BACILLUS SẢN XUẤT ENZYM, CHẾ PHẨM VÀ THỨC ĂN CHO ĐỘNG VẬT CHỨA CÁC CHŨNG NÀY

<130> AGP-36010-A

<140> PCT/US2012/052360

<141> 2012-08-24

<150> 61/526881

<151> 2011-08-24

<150> 61/527371

<151> 2011-08-25

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi cho phép phân tích RAPD PCR

<400> 1

ggtgcgggaa

10

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi cho phép phân tích RAPD PCR

<400> 2

gtttcgctcc

10

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi cho phép phân tích RAPD PCR

<400> 3

gtagacccgt

10

<210> 4

<211> 10

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi cho phép phân tích RAPD PCR

<400> 4

aagagcccggt

10

<210> 5

<211> 10

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi cho phép phân tích RAPD PCR

<400> 5

aacgcgcaac

10

<210> 6

<211> 10

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi cho phép phân tích RAPD PCR

<400> 6

cccgtcagca

10

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

<400> 7

aggtcaacat cgccacctac

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

<400> 8

caacgggacg gtaatgaaac

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

<400> 9

gctctgtcgc aaggtaggac

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

<400> 10

ggccataagt gcctttacga

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

<400> 11

atgaagccca gagcaaaaga

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

<400> 12

gggggtgttga aggtctcaaa

20

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

<400> 13

ggcagccttg tcccttgaag ag

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

<400> 14

gtagcccacg tcgtagcaaa cc

22

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

<400> 15

tgacgaggcc cagagcaaga

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc

<400> 16

atgggcacag tgtgggtgac

20



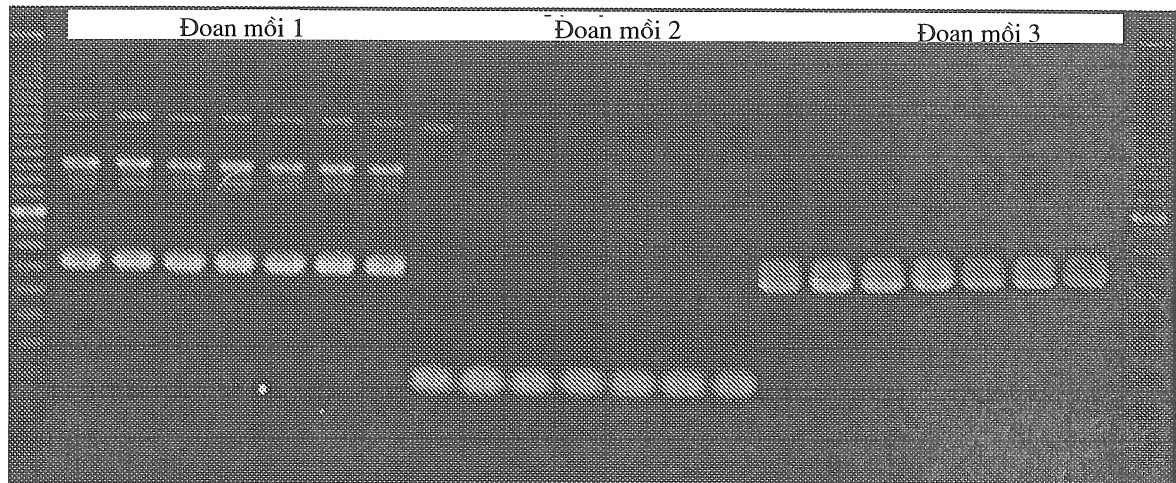
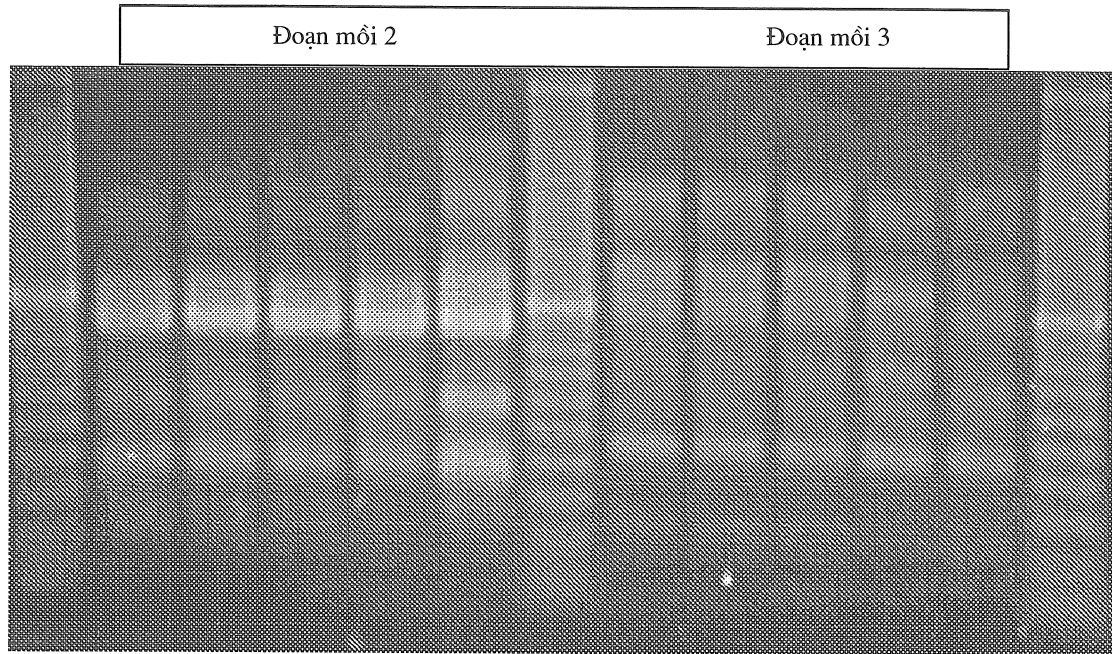


Fig.1

CTATACNTGCNAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGA
 TGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTC
 CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGT
 GGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
 CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
 ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG
 GAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT
 GGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCG
 GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTG
 TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT
 GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA
 ACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
 CAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGA
 CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCA
 CAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCT
 AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCCG
 TCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCG
 CCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGC
 GGTGG

Fig.2

**Fig.3**

ACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTT
 AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
 AAACCGGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCT
 TCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
 CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
 GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAG
 AACAAAGTCCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC
 GTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGA
 GGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGC
 GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA
 CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGC
 ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
 GCGCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
 TCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTCGGGGGCAGAGTGACAGG
 TGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
 AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACA
 CGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCAATCCCACAAA
 TCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTA
 ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAC
 ACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGA
 AGGTGGGACAGATGATTGGGGNGAAGTC

Fig.4

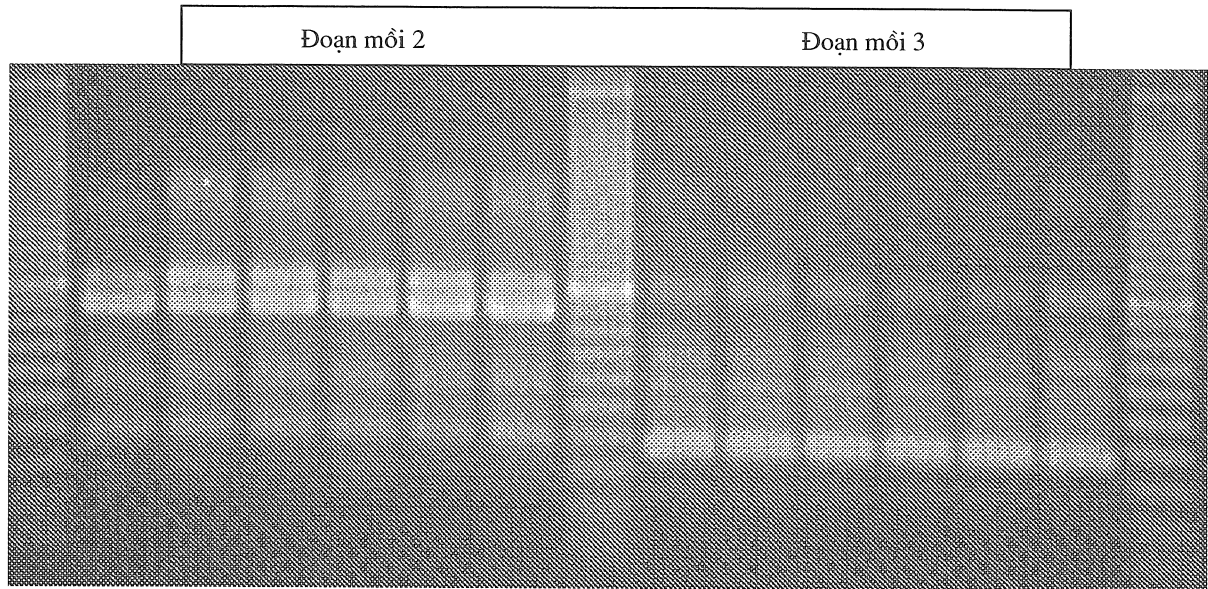
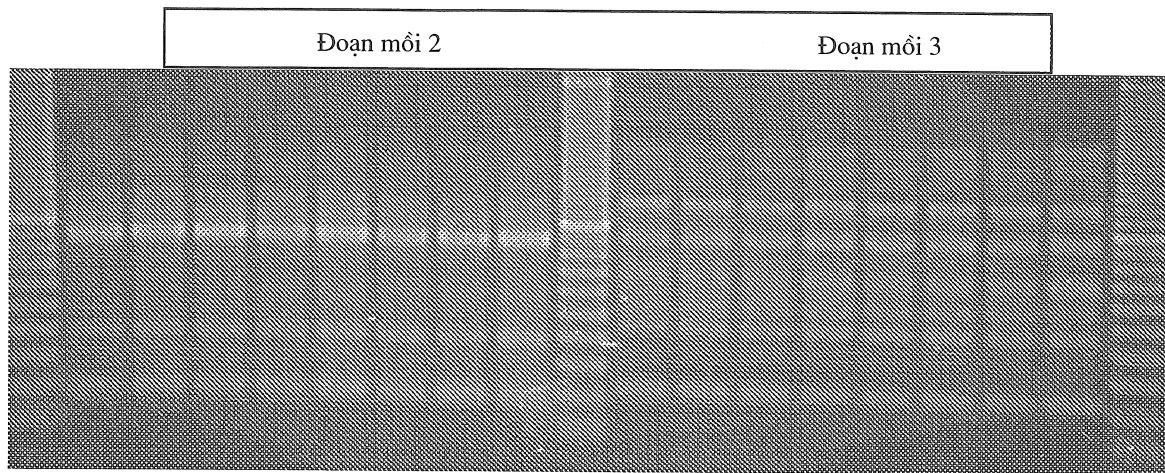


Fig.5

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGAT

GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
 GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTG
 GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGGAATTAT
 TGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACC
 GGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTC
 TGTAAC TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCT
 AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGA
 CGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA
 CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGTG
 ACAGGTGGTGATGGGTNGTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTNNGGTTAAGTCCCGCA
 ACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCC
 GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
 CTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTAAAGCCAATC
 CCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATC
 GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGC
 CCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAG
 CCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGNGAAGT

Fig.6

**Fig.7**

CNATACNTGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGAT
 GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
 GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTG
 GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCANCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCNGGAATTAT
 TGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACC
 GGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTC
 TGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC
 TAACGCANTTAAGCACTCCGCNCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAT
 TGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
 TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGGGGCAGA
 GTGACAGGTGGTGATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
 AACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG
 GCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTTAAGCCAAT
 CCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAAT
 CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCG
 CCCGTACACACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCA
 GCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGNGAAGTC

Fig.8

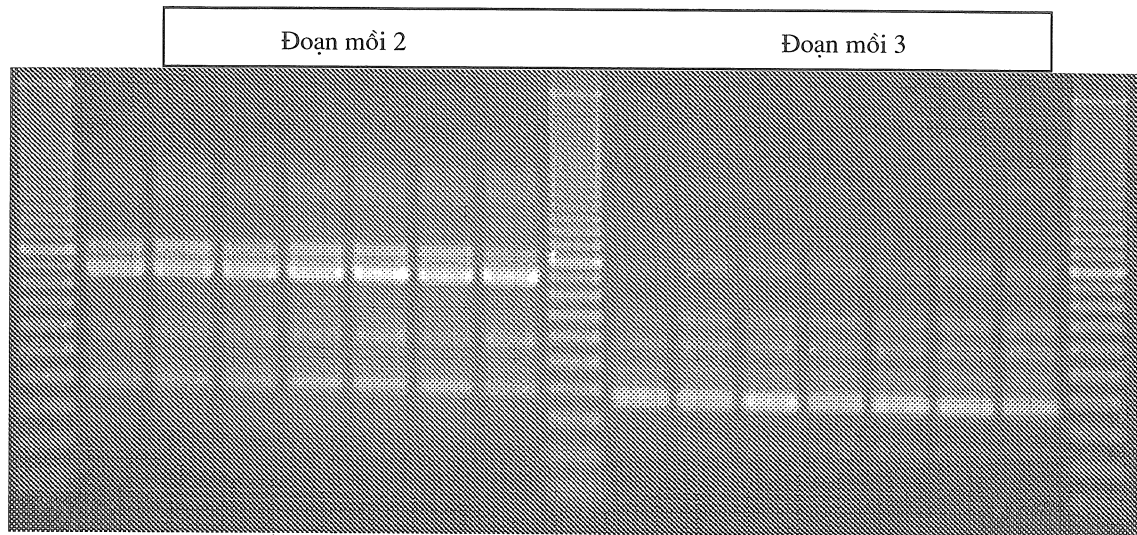


Fig.9

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGT

TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
 GAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGC
 TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
 GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGGAATTATTGG
 GCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGG
 GAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTA
 GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT
 AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCA
 CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAAC
 GCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGG
 GGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGNAAGAACCTTACC
 AGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGTGAC
 AGGTGGTNGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCA
 CAAATCTGTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCT
 AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
 TCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCG
 CCGAAGGTGGGACAGATGATNGGGNGAAGTCG

Fig.10

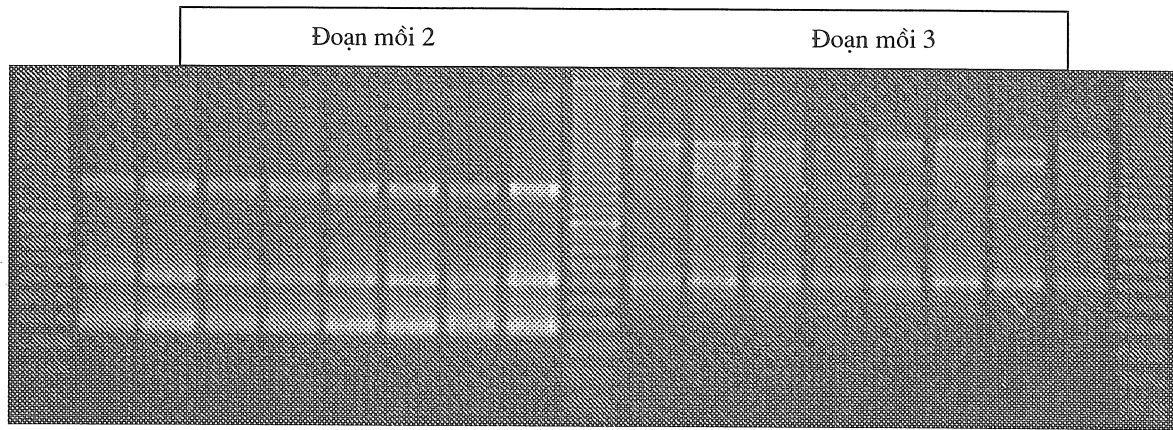
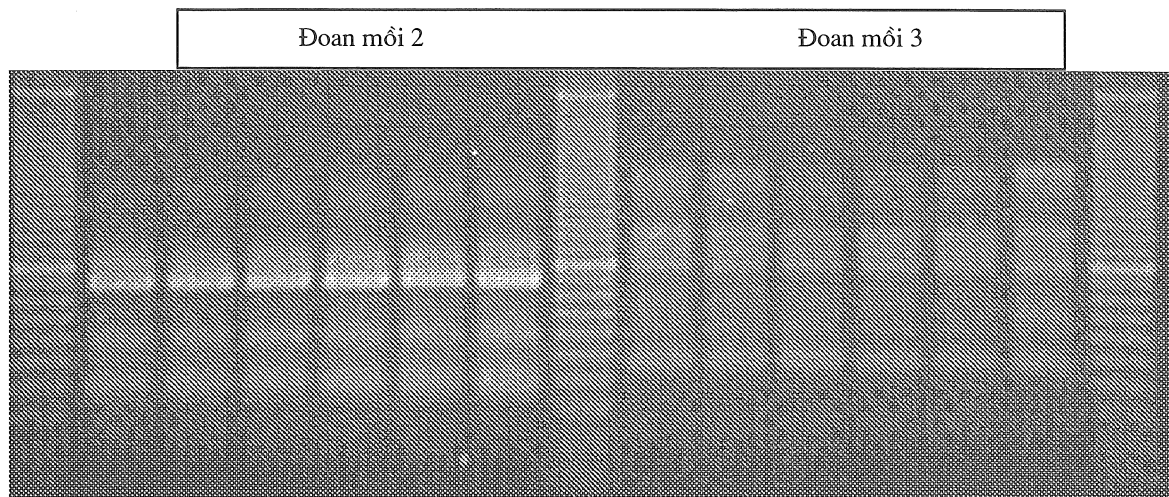


Fig.11

TATACNTGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGT
 TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
 GAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAAGACGGT
 TTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTC
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACA
 CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
 GAACAAGTGCGAGAGTAACCTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCNGGAATTATTGGG
 CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGG
 AGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAG
 CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
 ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
 GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG
 CATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
 GGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAAAACCTTACCAG
 GTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAG
 GTGGTGCAATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
 CGCAACCTTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACA
 CACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCAT
 AATCTGTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAG
 TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
 ACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACNTTATGGAGCCAGCCGCC
 GAAGGTGGGGCAGATGATNNGGGNGAAGTC

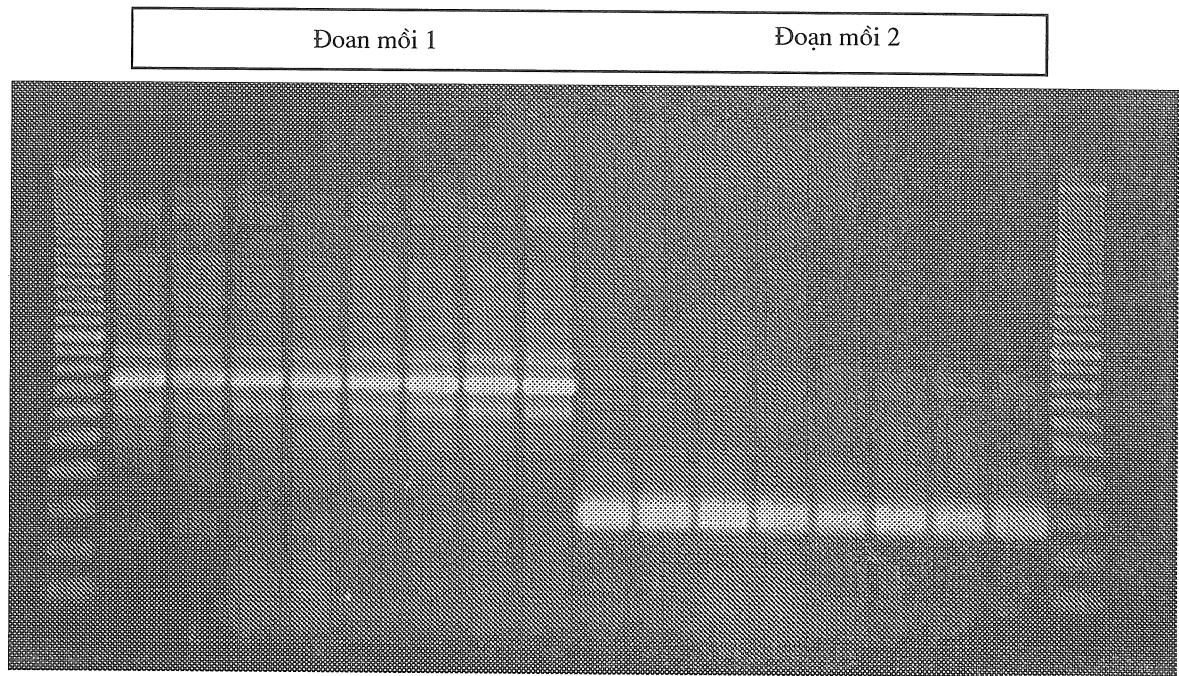
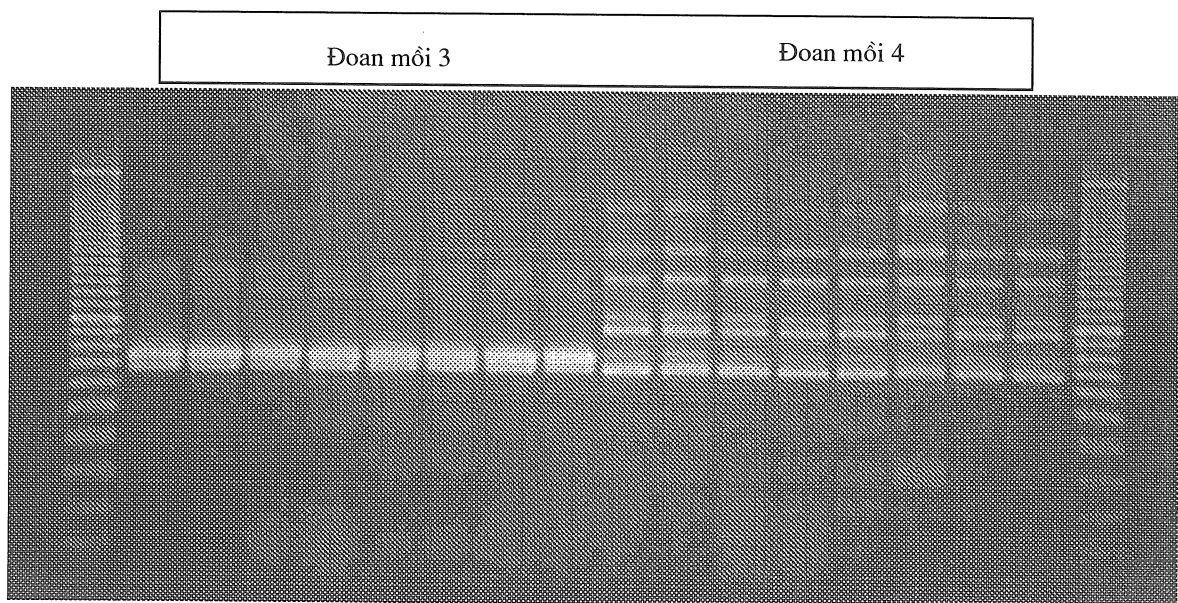
Fig.12

**Fig.13**

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATG

TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAAATCCG
 GGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGG
 CTTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
 CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAACCGGC
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGGAATTATTG
 GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGG
 GGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGT
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTG
 TAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC
 ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAA
 CGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG
 GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
 AGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTTTCGGGGGCAGAGTGA
 CAGGTGGTNGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG
 GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
 TACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC
 CACAAATCTGTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCG
 CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGC
 CGCCGAAGGTGGGACAGATGANGGGNNAAGT

Fig.14

**Fig.15****Fig.16**

Đoan mỗi 5

Đoan mỗi 6

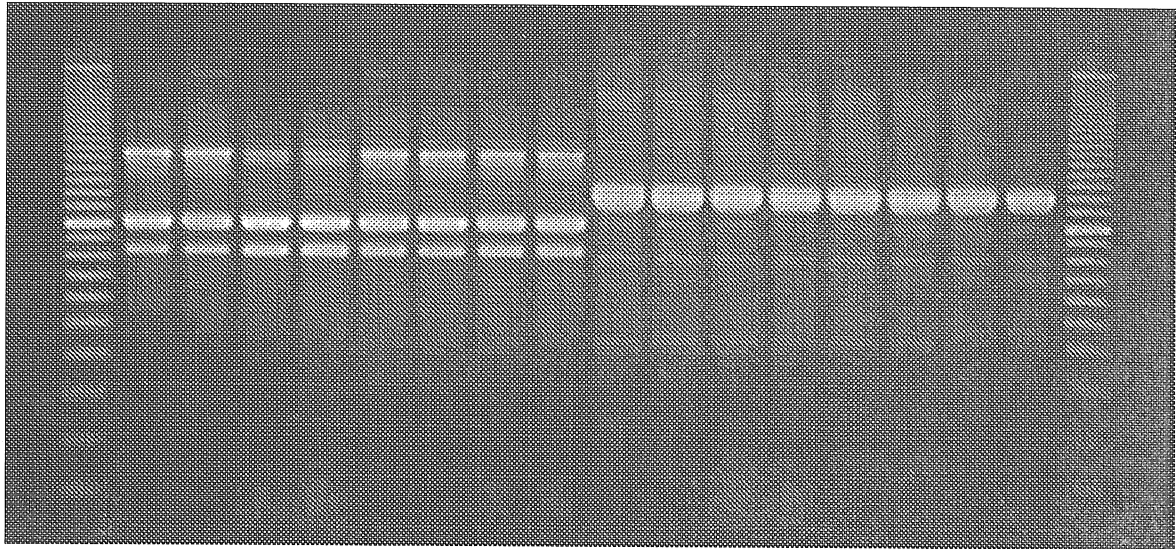
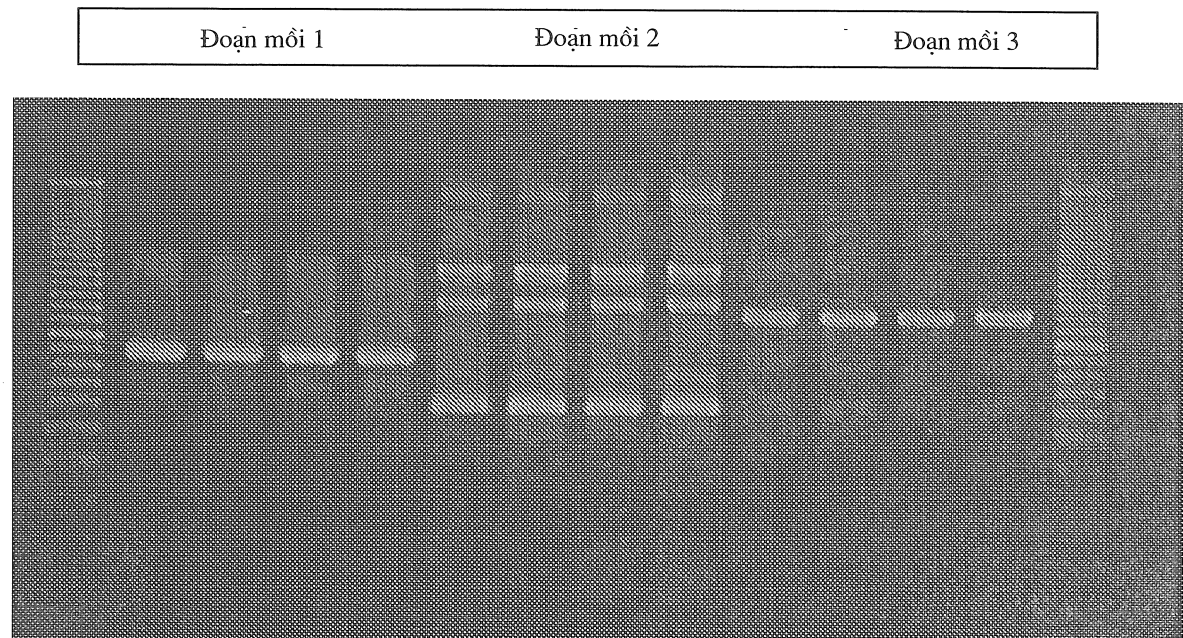
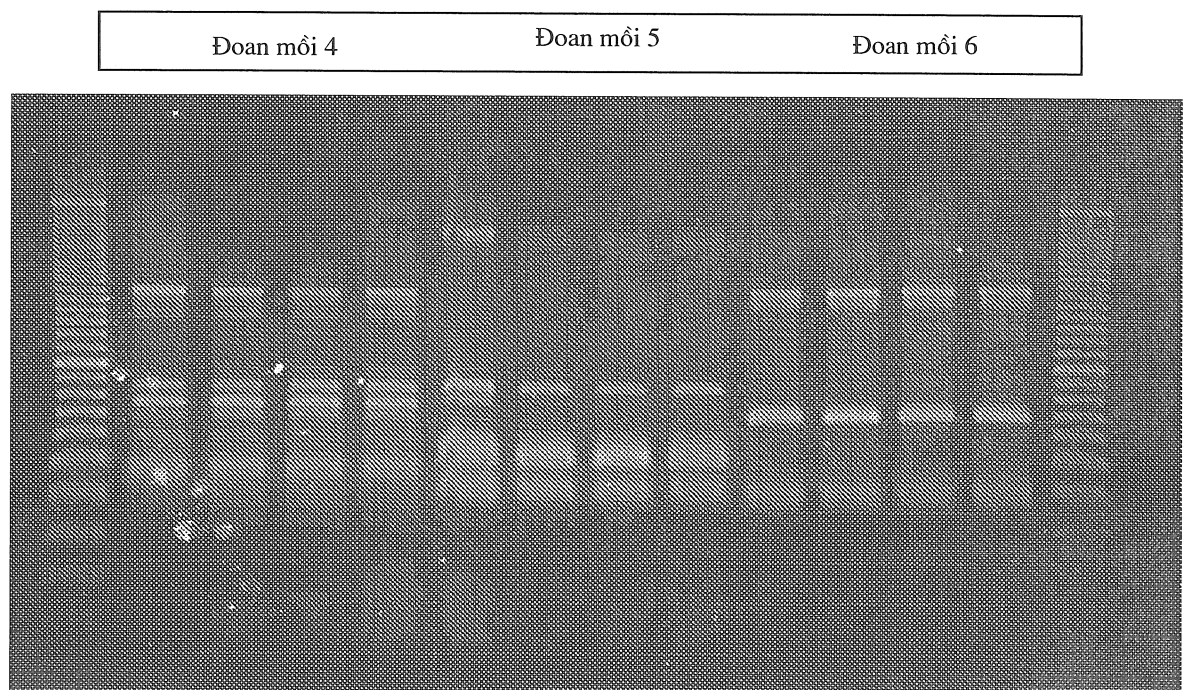


Fig.17

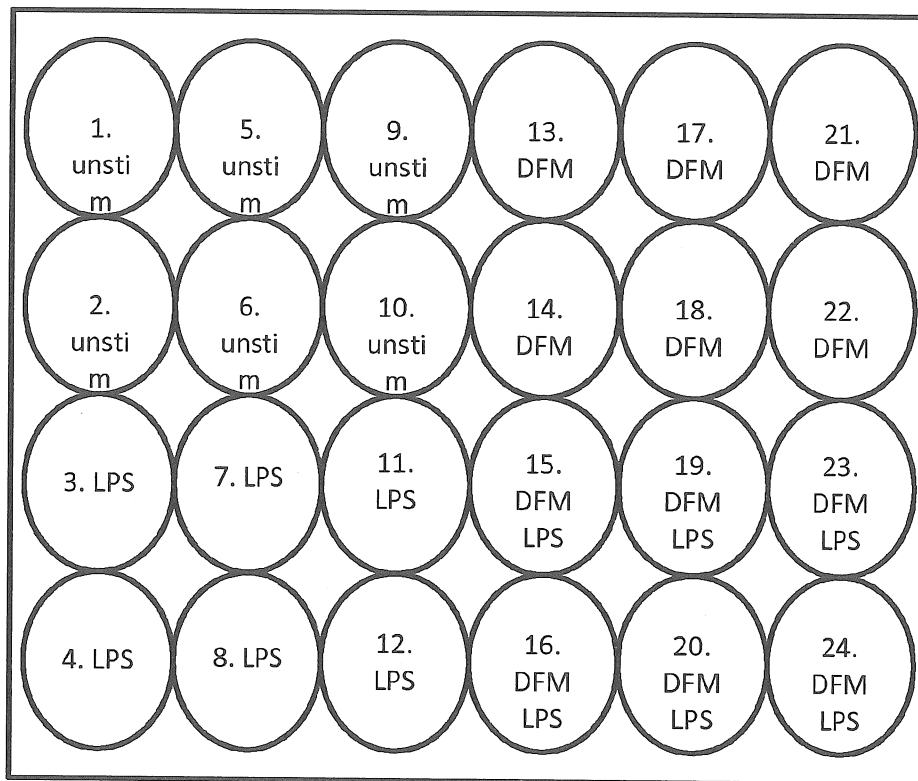
GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTG
 CTCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA
 ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGT
 GGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
 CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
 GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGT
 TCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGT
 TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTT
 GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA
 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCC
 GCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGC
 GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGGGG
 CAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC
 AACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACA
 CGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTG
 TTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGA
 TCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT
 TGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGAT
 TGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTG

Fig.18

**Fig.19****Fig.20**

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCT
 CCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAAC
 TCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCCTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGG
 TTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACC
 AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
 CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAG
 TAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
 GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTT
 TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAG
 TGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACC
 AGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCC
 CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT
 CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
 GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAG
 AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC
 AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
 GCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTC
 TCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
 GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGC
 AACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGG
 GGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAG

Fig.21

**Fig.22**

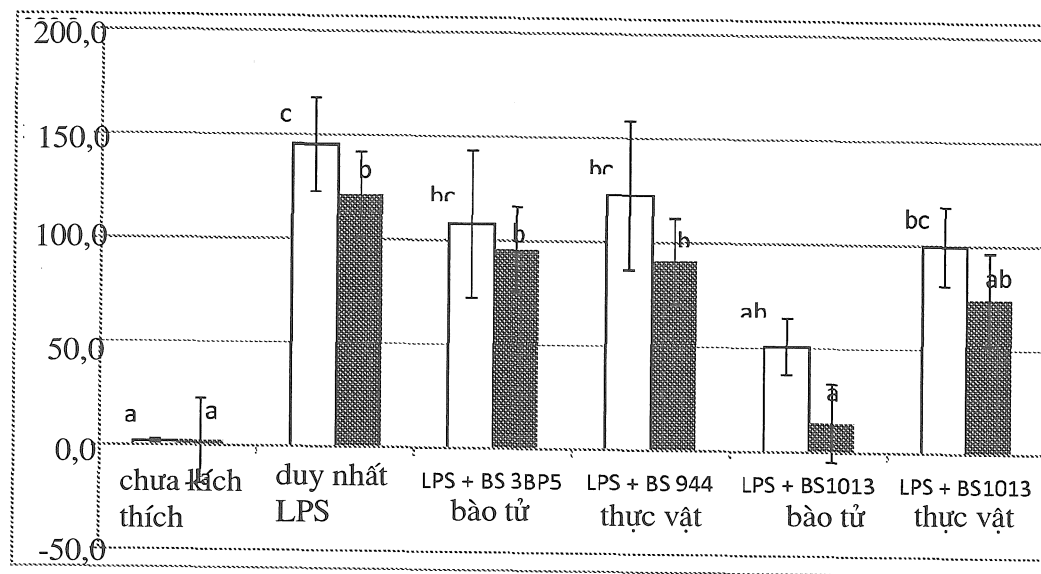
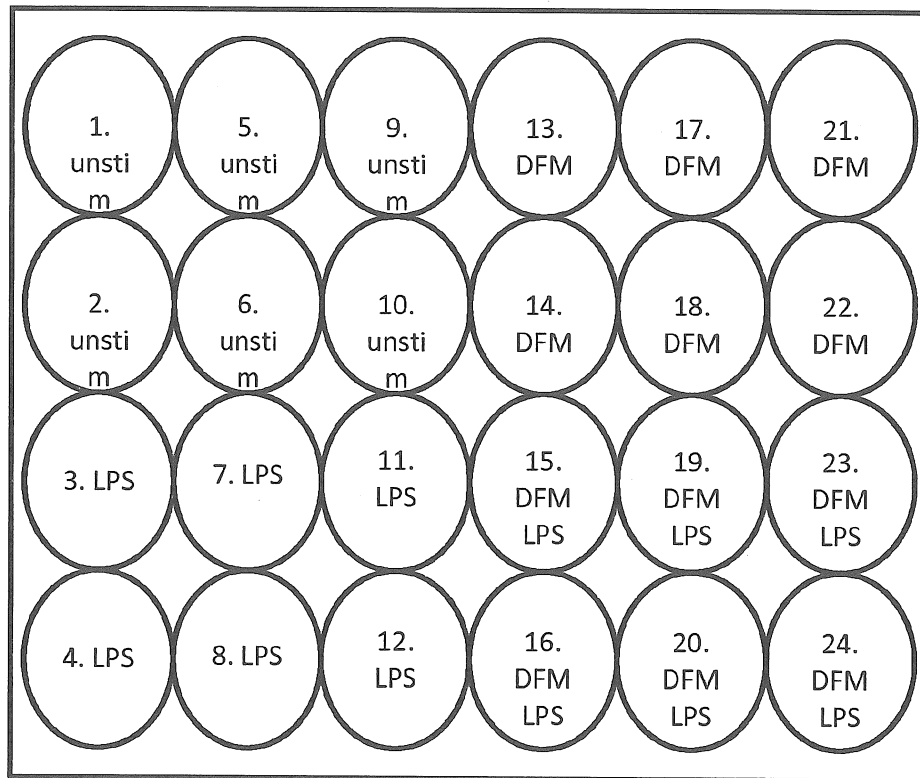


Fig.23

**Fig.24**

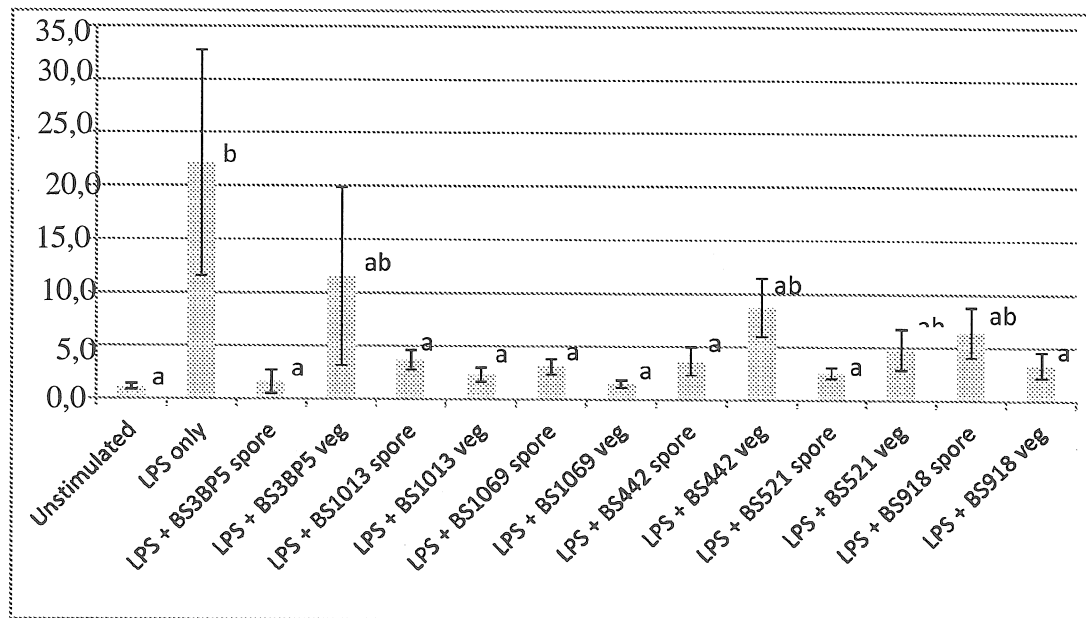


Fig.25

Unstimulated: chưa kích thích

LPS only: duy nhất LPS

spore: bào tử

veg: thực vật

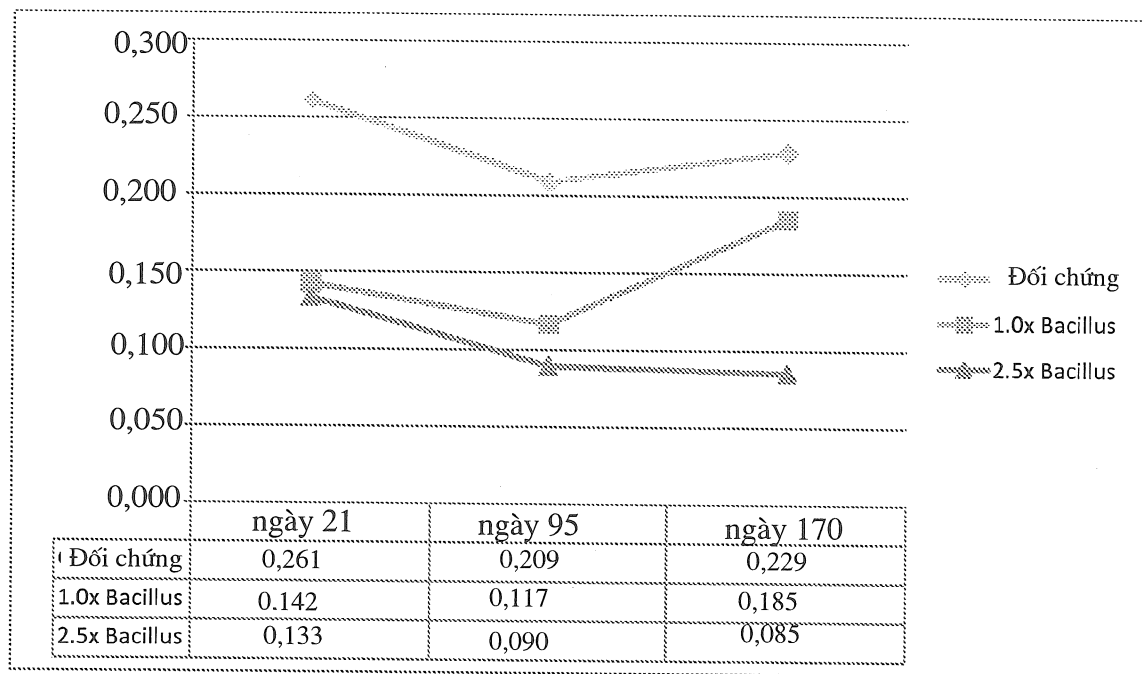
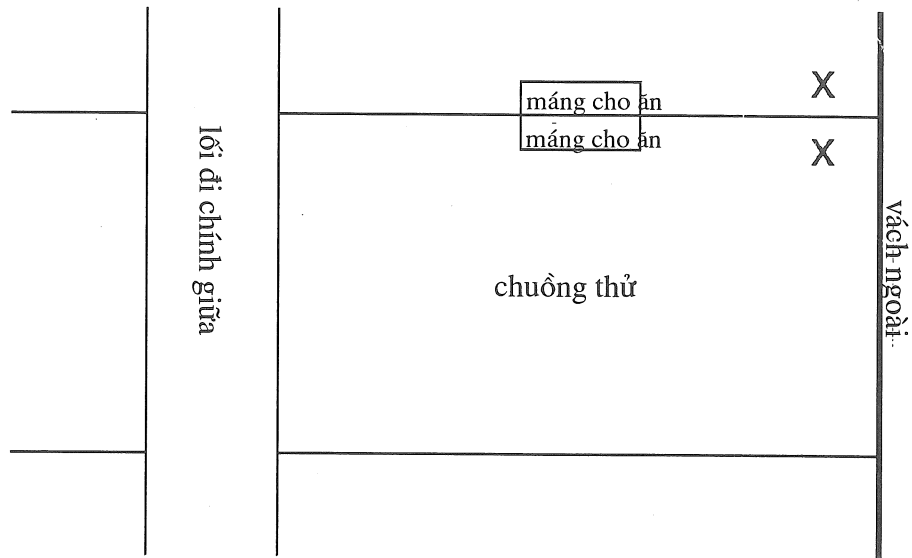


Fig.26

**Fig.27**