

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 043066

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.24

(21) Номер заявки
201991944

(22) Дата подачи заявки
2018.03.14

(51) Int. Cl. C12R 1/125 (2006.01)
A61K 35/742 (2015.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A23K 10/16 (2016.01)
A23K 10/18 (2016.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ИЛИ КОНТРОЛИРОВАНИЯ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ ИЛИ ИНФЕКЦИИ В КИШЕЧНИКЕ
ДОМАШНЕЙ ПТИЦЫ

(31) 17160843.3; 18154862.9

(32) 2017.03.14; 2018.02.02

(33) EP

(43) 2020.02.21

(86) PCT/EP2018/056442

(87) WO 2018/167171 2018.09.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

(56) US-A1-2012128827
WO-A2-2012009712
WO-A1-2010033714
WO-A1-2016118840
EP-A2-0287699
WO-A1-2013153159

(72) Изобретатель:
Сандванг Дорте, Стюрисхаве Тина
(DK)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

(57) Изобретение относится к композиции для предупреждения или контроля бактериальной колонизации или инфекции в кишечнике домашней птицы, содержащей по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis*, выбранный из группы, состоящей из а) штамма, депонированного как DSM32324; и б) штамма, депонированного как DSM32325.

043066

B1

043066

B1

Область изобретения

В настоящем изобретении предложен штамм *Bacillus subtilis*, выбранный из группы, состоящей из а) штамма, депонированного как DSM32324, б) штамма, депонированного как DSM32325, и в) мутантного штамма по (а) или (б), обладающий чувствительностью к ампициллину, ванкомицину, гентамицину, канамицину, стрептомицину, эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и хлорамфениколу и обладающий ингибирующей активностью в отношении *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens*.

Дополнительно изобретение относится к композициям *Bacillus*, содержащим по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по изобретению, предпочтительно штамм *Bacillus subtilis* DSM32324 и/или штамм *Bacillus subtilis* DSM32325, в качестве пробиотика (Direct Fed Microbial, DFM), премикса, кормовой добавки для животных или корма для животных.

В данном изобретении предложен способ улучшения одного или более показателей продуктивности животного, выбранных из группы, состоящей из 1) увеличенного прироста массы (WG), 2) пониженного коэффициента кормоотдачи (FCR), 3) пониженной балльной оценки поражения при некротическом энтерите, 4) пониженной частоты некротического энтерита, 5) пониженной смертности от некротического энтерита, 6) повышенного Европейского фактора эффективности производства (EPEF) и 7) пониженной смертности, путем кормления животного штаммом или композицией по настоящему изобретению.

Предшествующий уровень техники

Прекращение производства стимуляторов роста на основе антибиотиков в Европейском Союзе в 2006 г. привело к увеличению потребности в экономически выгодных пищевых добавках с высокой эффективностью и чувствительностью к ингибиторам, важных для человека и ветеринарии.

Известно, что кормовые пробиотические добавки на основе *Bacillus* оказывают положительные эффекты в отношении здоровья и продуктивности свиней и домашней птицы. Эти продукты важны для пищевой промышленности, так как споры являются термоустойчивыми и могут выживать в процессе гранулирования при температурах вплоть до 90-95°C. Управление США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) рассматривает бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, образующие эндоспоры, как безопасные (GRAS), и Американская ассоциация работников государственных органов контроля за качеством кормов (Association of American Feed Control Officials, AAFCO) считает их приемлемыми для включения в рацион животных или воду.

В WO 2013/153159 описан способ отбора штамма *Bacillus*, обладающего чувствительностью к антибиотикам, ингибирующей активностью в отношении *E.coli* и *Clostridium perfringens* и высокой степенью спорообразования.

Многие из исследованных изолятов демонстрировали нежелательную устойчивость к антибиотикам, превышающую контрольные точки, определенные Европейским ведомством по безопасности пищевых продуктов (European Food Safety Authority, EFSA), и были отбракованы из соображений безопасности. Несколько изолятов демонстрировали ингибирование *Clostridium perfringens*, в то время как только немногие изоляты ингибировали *E. coli*. Наилучшее ингибирование патогенов демонстрировали главным образом штаммы вида *B. amyloliquefaciens*.

В табл. 7 в WO 2016/060934 показана активность 10 штаммов *Bacillus* против *E. coli*. Пять из шести штаммов *B. amyloliquefaciens* демонстрируют активность против *E. coli*, в то время как только один из двух штаммов *B. subtilis*, штамм, выделенный из продукта "Clostet" от Kemin, демонстрировал активность против *E. coli*. Интересно, что этот штамм, как было впоследствии обнаружено, представляет собой *B. amyloliquefaciens*, для сравнения см. WO 2016/118840 (строка 23 на странице 46).

В WO 2016/118840 описаны различные штаммы *Bacillus* для улучшения здоровья и продуктивности сельскохозяйственных животных, в частности, два штамма *B. amyloliquefaciens* и два штамма *B. subtilis* (см. табл. 3.1). Было обнаружено, что только два из этих штаммов, штамм *B. subtilis*, депонированный как DSM29870, и штамм *B. amyloliquefaciens*, депонированный как DSM29869, являются чувствительными ко всем восьми протестированным антибиотикам. Результаты по ампициллину не были предоставлены.

Было обнаружено, что штамм *B. subtilis*, депонированный как DSM29870, ингибирует рост штаммов *E. coli* ATCC10535 и ATC25922 *in vitro* (Пример 4). В Примере 7 приведены результаты трех экспериментов с заражением *Clostridium perfringens*. Не было обнаружено существенного различия между группой, получавшей с пищей DSM29870 (T4), и группой, получавшей с пищей бацитрацин (T3), по всем параметрам, измеренным в этих экспериментах. Результаты по BWG (прирост живой массы), FCR и смертности птиц с поражениями от некротического энтерита были промежуточными между неинфицированной необработанной группой (T1) и инфицированной необработанной группой (T2).

Однако все еще существует необходимость в пробиотических штаммах, которые можно использовать для улучшения здоровья и продуктивности сельскохозяйственных животных.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложен штамм *Bacillus subtilis*, выбранный из группы, состоящей из а) штамма, депонированного как DSM32324, б) штамма, депонированного как DSM32325, и в) мутантного штамма по (а) или (б), обладающий чувствительностью к ампициллину, ванкомицину, гентамицину, канамицину, стрептомицину, эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и хлорамфениколу и обладающий ингибирующей активностью в отношении *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens*.

дающий ингибирующей активностью в отношении *E. coli* и *Clostridium perfringens*.

Термин "бактериальный штамм" относится к бактерии, которая остается генетически неизменной при выращивании или размножении. Множество таких идентичных бактерий включено, когда дается ссылка на штамм.

Композициями, содержащими по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по настоящему изобретению, например, такими как пробиотик (DFM), кормовая добавка для животных или премикс или корм для животных, можно кормить животных.

По меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по настоящему изобретению может быть добавлен в корм во время производства, после производства поставщиком или сотрудником, который кормит животное, непосредственно до предоставления корма животному. Бактерии *Bacillus subtilis*, используемые в способах и композициях, описанных здесь, являются особенно подходящими, потому что они способны выживать (в виде спор) в условиях высокой температуры и давления в процессе производства сухого гранулированного кормового продукта.

Некротический энтерит, вызываемый *Clostridium perfringens*, стал серьезной экономической проблемой в современном производстве домашней птицы. Задача некоторых из исследований *in vivo*, описанных в примерах, заключалась в изучении действия кормовых добавок, содержащих штамм *Bacillus subtilis* по настоящему изобретению, на патогенез некротического энтерита (NE) в исследованиях на бройлерах в клетках. Другие исследования *in vivo* на домашней птице сосредоточены на продуктивности с контрольным заражением *Clostridium perfringens* или без такового.

Отдельные исследования на базе клеточных батарей/загонов для напольного содержания цыплят были выполнены для оценки влияния *Bacillus subtilis* DSM32324 и DSM32325 на развитие субклинического некротического энтерита. Использовали две различные независимые исследовательские базы, одну, расположенную в Европе (Пример 3, DSM32324), и другую - в США (Пример 4, DSM32325), что означает, что немного отличающиеся параметры оценки были использованы для оценки эффекта этих двух штаммов.

Для *Bacillus subtilis* DSM3234 такие показатели продуктивности, как коэффициент кормоотдачи (FCR) и средний прирост массы (AWG), измеренные на сутки 21, сутки 35 и сутки 42, демонстрировали значительное увеличение для всех контрольных точек при рассмотрении *Bacillus subtilis* DSM3234 в качестве пищевой добавки по сравнению с необработанной инфицированной контрольной группой. Неожиданно группа, получавшая *Bacillus*, не показала никаких существенных отличий от неинфицированной не получавшей лекарственной обработки контрольной группы, даже несмотря на то, что последнюю группу не подвергали заражению и считали здоровой (табл. 7).

В эксперименте *in vivo* с провокацией индуцированного субклинического энтерита *Bacillus subtilis* DSM3234 значительно снижал степень поражения от некротического энтерита у цыплят и уменьшал смертность от некротического энтерита (табл. 8).

Bacillus subtilis DSM32325 уменьшал частоту некротического энтерита у цыплят по сравнению с инфицированным необработанным контролем статистически значимым образом при объединении данных за сутки 25 и 26. Неожиданно частота некротического энтерита была даже ниже в группе, получавшей *Bacillus*, чем в контрольной группе, получавшей амоксициллин (табл. 9).

Кроме того, *Bacillus subtilis* DSM32325 уменьшал тяжесть некротического энтерита (средний балл) по сравнению с инфицированным необработанным контролем статистически значимым образом при объединении данных за сутки 25 и 26. Неожиданно средний балл был даже ниже в группе, получавшей *Bacillus*, чем в группе, получавшей амоксициллин (табл. 10).

Два штамма *B. subtilis* также оценивали в двух экспериментах по продуктивности кормления, в Примере 5 (DSM32324 и DSM32325) и Примере 6 (DSM32324).

В Примере 5 приведены результаты эксперимента на 1800 самцах бройлерах Ross 308, в котором было обнаружено, что в течение всего периода откорма (возраст 0-42 суток) бройлеры, получавшие добавку штаммов DSM32324 или DSM32325 *Bacilli*, выросли значительно больше, чем контрольные животные. Коэффициент кормоотдачи (FCR) и EPEF (Европейский фактор эффективности производства) для всех бройлеров, получавших добавку DSM19489, DSM32324 и DSM32325, существенно улучшились по сравнению с таковыми контрольных животных.

В Примере 6 представлены результаты эксперимента на 1300 самцах бройлерах Ross 308 на группу обработки, которые показывают, что DSM19489 имел тенденцию к снижению смертности ($p=0,096$), а *Bacillus subtilis* DSM32324 - к заметному и значительному снижению смертности, особенно в заключительный период, который также служил для оценки статистической значимости смертности для всего эксперимента.

В Примере 7 исследовали действие трех выбранных штаммов *Bacilli* (DSM32324, DSM32325 и DSM25840) на продуктивность и наблюдаемую кишечную усвояемость и сделали заключение о том, что все три штамма демонстрировали неожиданно хорошие и значительно улучшенные результаты.

Птицы, получавшие добавку DSM32324, демонстрировали более высокие суточный прирост массы (табл. 16), суточное потребление пищи и коэффициент кормоотдачи в начальный период (данные не показаны) и более высокую усвояемость белков на сутки 42 (табл. 17) по сравнению с птицами, не полу-

чавшими добавку.

Птицы, получавшие добавку DSM25840, демонстрировали более высокие суточный прирост массы (табл. 16) и суточное потребление пищи в начальный период (данные не показаны), более высокую массу тела на сутки 42 (табл. 16) и более высокую усвояемость золь, белка и энергии на сутки 42 (табл. 17) по сравнению с птицами, не получавшими добавку.

Птицы, получавшие добавку DSM32325, демонстрировали более высокие суточный прирост массы (табл. 16) и суточное потребление пищи в начальный период (данные не показаны) и более низкую усвояемость Са и фосфора на сутки 42 (табл. 17) по сравнению с птицами, не получавшими добавку.

В заключение, эти исследования показали, что штаммы *Bacillus subtilis*, депонированные как DSM32324 и DSM32325, демонстрируют действие по уменьшению некротического энтерита в провокационных тестах *in vivo* и положительный эффект в отношении показателей продуктивности домашней птицы. Важные обнаружения заключались в значительном увеличении прироста массы (WG), значительном уменьшении коэффициента кормоотдачи (FCR), значительном уменьшении смертности и значительном увеличении Европейского фактора эффективности производства (EPEF).

В Примере 8 показано, что композиция *Bacillus* по изобретению, EPB5, содержащая DSM32324, DSM25840 и DSM32325 в соотношении 8:3:5, улучшала продуктивность бройлеров по сравнению с птицами, получавшими соответствующий рацион без добавления пробиотика. Положительные ответы были показаны в отношении коэффициента кормоотдачи и среднего прироста массы. Неожиданно группы, получавшие EPB5, демонстрировали значительное улучшение по некоторым показателям продуктивности по сравнению с группами, получавшими один штамм *Bacillus*, что снова показывает значительные различия в показателях продуктивности по сравнению с не получавшей лекарственной обработки инфицированной контрольной группой. Кроме того, как отдельные штаммы *Bacillus subtilis* DSM32234, *Bacillus subtilis* DSM32235 и *Bacillus amyloliquefaciens* DSM25840, так и комбинация EPB5 значительно уменьшали балльную оценку поражения от некротического энтерита у цыплят и уменьшали смертность от некротического энтерита в провокационном тесте *in vivo*.

В Примере 9 показано, что композиция *Bacillus* по изобретению улучшала продуктивность индюков возрастом от 1 до 147 суток (период кормления 147 суток) при уровне доз от 250 до 2000 мг/кг по сравнению с птицами, получавшими соответствующий рацион без добавления пробиотика. Положительные ответы были показаны в отношении прироста массы тела, коэффициента кормоотдачи и содержания сухого вещества в экскрементах.

В Примере 10 показано, что композицию *Bacillus* по изобретению можно объединять с вакциной, такой как живая вакцина *Salmonella Typhimurium*, без влияния на начальную колонизацию вакциной *Salmonella* и ее последующую способность защищать от заражения *Salmonella Heidelberg* у цыплят бройлеров. Это исследование показывает, что может присутствовать даже аддитивный эффект в совместном действии этой вакцины и композиции *Bacillus* (табл. 20).

Определения

Как правило, термины и выражения, используемые здесь, имеют значения, известные в данной области техники, которые могут быть найдены по ссылке на стандартные тексты, статьи в журналах, и из контекста, известного специалистам в данной области техники. Следующие определения приведены для пояснения их специфического использования в контексте настоящего изобретения.

Как их используют здесь, формы единственного числа предназначены включать также формы множественного числа, если в контексте ясно не указано иное.

Корм для животных: термин "корм для животных" относится к любому соединению, препарату или смеси, подходящим для употребления животным или предназначенным для этого. Корм для животных для животного с однокамерным желудком содержит концентраты, а также, например, витамины, минералы, ферменты, аминокислоты и/или другие кормовые ингредиенты (такие как в премиксе). Корм для животных может дополнительно содержать фураж. Примеры корма для домашней птицы приведены в Примерах 3-7.

Композиция: термин "композиция" относится к композиции, содержащей носитель и по меньшей мере один бактериальный штамм, как описано здесь. Композиции, описанные здесь, могут представлять собой пробиотик (Direct Fed Microbial, DFM), кормовую добавку для животных, или премикс, или корм для животных.

Концентрат: термин "концентрат" означает корм с высокими концентрациями белка и энергетических субстратов, такой как рыбная мука, меласса, олигосахариды, сорго, семена и зерно (либо цельное, либо приготовленное путем измельчения, перемалывания и т.д., например, из кукурузы, овса, ржи, ячменя, пшеницы), жмых семян масличных культур (например, из семян хлопчатника, сафлора, подсолнечника, соевых бобов (такой как соевый жмых), семян рапса/канола, арахиса или земляного ореха), кокосовый жмых, материал, полученный из дрожжей, и барда (такая как влажная зерновая барда (WDS) и сухая зерновая барда с растворимыми компонентами (DDGS)).

Контроль над инфекцией *C. perfringens* и/или некротическим энтеритом: выражение "контроль над инфекцией *C. perfringens* и/или некротическим энтеритом" означает способ и/или композицию, которые частично или полностью подавляют инфекции *C. perfringens* и/или некротический энтерит у животного.

Соответственно, выражение "контроль над инфекцией *C. perfringens* и/или некротическим энтеритом" означает, что инфекции *C. perfringens* и/или некротический энтерит подавляются или полностью устранены.

Пробиотик (Direct Fed Microbial): термин "пробиотик" или "DFM" означает живые микроорганизмы, включая споры, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу хозяину, такую как улучшенное пищеварение или здоровье.

Ферментативная активность в анаэробных условиях: выражение "ферментативная активность в анаэробных условиях" означает активность ферментов, продуцируемых штаммом *Bacillus* во время роста в анаэробных условиях. В Примере 4 WO 2013/153159 описан способ тестирования штаммов *Bacillus* в отношении продуцирования ферментов ксиланазы, целлюлазы и протеазы.

Европейский фактор эффективности производства (EPEF): "Европейский фактор эффективности производства" представляет собой способ сравнения продуктивности стад живой птицы. Одночисловой формат облегчает сравнение продуктивности в пределах фермы и между фермами, и его можно использовать для оценки переменных окружающей среды, климатических условий и условий содержания. EPEF рассчитывают как $[(\text{жизнеспособность (\%)} \times \text{живая масса (кг)}) / (\text{Возраст истощения (в сутках)} \times \text{FCR})] \times 100$, где жизнеспособность представляет собой долю в процентах живых птиц в конце исследования, живая масса представляет собой средний прирост массы в конце исследования, возраст истощения представляет собой возраст птиц в конце исследования и FCR представляет собой коэффициент кормоотдачи в конце исследования.

Эффективное количество/концентрация/дозировка: термины "эффективное количество", "эффективная концентрация" или "эффективная дозировка" определены как количество, концентрация или дозировка бактериального(ых) штамма(ов), достаточные для улучшения пищеварения или производительности животного. Истинная эффективная дозировка в абсолютных числах зависит от факторов, включая: состояние здоровья рассматриваемого животного, наличие других ингредиентов. "Эффективное количество", "эффективную концентрацию" или "эффективную дозировку" бактериальных штаммов можно определить рутинными методиками, известными специалисту в данной области техники. Пример эффективного количества для домашней птицы приведен в Примерах 3-7.

Коэффициент кормоотдачи (FCR): FCR представляет собой меру эффективности животного по преобразованию массы корма в увеличение желаемой продукции. Для животных, которых разводят для мяса, таких как свиньи, домашняя птица, крупный рогатый скот, овцы и рыба, продукция представляет собой массу, достигнутую животным. В частности, FCR представляет собой массу съеденной пищи, деленную на продукцию, в течение всего определенного периода. FCR можно определить, как описано в Примере 7. "Улучшение FCR" означает уменьшение величины FCR.

Кормление животного: выражения "кормление животного" или "скармливаемый животному" означают, что композицию по настоящему изобретению вводят животному перорально в эффективном количестве. Пероральное введение можно повторять, например, один или более чем один раз в сутки в течение определенного периода времени, такого как несколько суток, одна неделя, несколько недель, один месяц или несколько месяцев. Кормление домашней птицы может, например, быть выполнено, как описано в Примерах 3-7. Соответственно, термины "кормление" или "скармливаемый" означают любой тип перорального введения, такой как введение с кормом для животных, или с водой для питья, или в определенных обстоятельствах через желудочный зонд или спрей-аэрозоль.

Фураж: термин "фураж", как он определен здесь, также включает грубые корма. Фураж представляет собой свежий растительный материал, такой как сено и силос из кормовых растений, трава и другие кормовые растения, морские водоросли, проросшее зерно и бобовые растения или любая их комбинация. Примеры кормовых растений представляют собой люцерну (*Alfalfa*, *lucerne*), лядвенец рогатый, растения рода капуста (например, капусту листовую, рапс (канола), брюкву (*rutabaga*, *swede*), репу), клевер (например, клевер шведский, клевер луговой, клевер подземный, клевер ползучий), травы (например, бермудскую траву, костер, райграс высокий, овсяницу, трехзубку, мятлик луговой, ежу сборную, плевел, тимopheевку луговую), кукурузу (маис), просо, ячмень, овес, рожь, сорго, сою и пшеницу, и овощи, такие как свекла. Дополнительно фураж включает растительные остатки от продукции зерна (такие как кукурузная солома, солома пшеницы, ячменя, овса, ржи и других зерновых), остатки от овощей, такие как свекольная ботва, отходы масложитного производства, такие как стебли и листья сои, рапса и других бобовых растений, и фракции от очистки зерна для употребления животными или человеком или производства топлива или других отраслей промышленности.

Ингибирующая активность в отношении *Clostridium perfringens*: выражение "ингибирующая активность в отношении *Clostridium perfringens*" означает, что рост *Clostridium perfringens* ингибирован и/или что некоторые или все *Clostridium perfringens* убиты. Это можно определить путем проведения исследования, описанного в Примере 1.

Ингибирующая активность в отношении *E. coli*: выражение "ингибирующая активность в отношении *E. coli*" означает, что рост *E. coli* ингибирован и/или что некоторые или все *E. coli* убиты. Это можно определить путем проведения исследования, описанного в Примере 1.

Выделенный: термин "выделенный" означает, что бактериальные штаммы, описанные здесь, нахо-

дятся в форме или в окружении, которые не встречаются в природе, т.е. штамм по меньшей мере частично отделен от одного, или более чем одного, или от всех природных компонентов, с которыми он связан в природе.

Пеллета: термины "пеллета" и/или "гранулирование" относятся к твердым округлым, сферическим и/или цилиндрическим таблеткам или пеллетам и процессам получения таких твердых форм, в частности кормовых пеллет и твердого экструдированного корма для животных. Как их используют здесь, термины "экструзия" или "экструдирование" являются терминами, хорошо известными в данной области техники, и относятся к процессу продавливания композиции, как описано здесь, через отверстие под давлением.

Домашняя птица: термин "домашняя птица" означает одомашненных птиц, которых люди держат ради яиц, которые они производят, и/или их мяса, и/или их перьев. Домашняя птица включает производителей, бройлеров и несушек. Домашняя птица включает представителей надотряда *Galloanserae* (птицы), в частности отряда *Galliformes* (который включает кур, цесарок, перепелов и индюков) и семейства *Anatidae*, отряда *Anseriformes*, общеизвестных как "водоплавающие птицы" и включающих домашних уток и домашних гусей. Домашняя птица также включает других птиц, которых убивают ради их мяса, таких как голуби и страусы. Примеры домашней птицы включают кур (включая несушек, бройлеров и цыплят), уток, гусей, голубей, индюков и перепелов.

Предупреждать инфекции *C. perfringens* и/или некротический энтерит: выражение "предупреждать инфекции *C. perfringens* и/или некротический энтерит" означает способ и/или композицию, которые предупреждают развитие инфекции *C. perfringens* и/или некротического энтерита у животного.

Восстанавливающий сахар: "восстанавливающий сахар" представляет собой любой сахар, который либо имеет реакционноспособную альдегидную группу, либо обладает способностью образовывать ее, обеспечивая способность сахара действовать в качестве восстановителя. Восстанавливающие концы образуются в результате ферментативного расщепления гликозидной связи между полимерными углеводородами. Восстанавливающие сахара включают глюкозу, глицеральдегид и галактозу, а также дисахариды, такие как лактоза и мальтоза, и могут быть измерены методом Нельсона-Сомоджи (NS) или с использованием динитросалициловой кислоты (DNS). DNS представляет собой ароматическое соединение, которое вступает в реакцию с восстанавливающими сахарами и другими восстанавливающими молекулами с образованием 3-амино-5-нитросалициловой кислоты, которая сильно поглощает свет при 540 нм. Это исследование моделирует ситуацию, когда корм проглатывается животным и переваривается в пищеварительном тракте. Способность различных штаммов *Bacillus* разлагать некрахмалистые полисахариды (NSP) до восстанавливающих сахаров была исследована в Примере 2.

Грубые корма: термин "грубые корма" означает сухой растительный материал с высоким содержанием волокон, такой как волокно, отруби, оболочки семян и зерен и растительные остатки (такие как сухой корм для скота, копра, солома, мякина, отходы производства свекловичного сахара).

Чувствительный к антибиотикам: выражение "чувствительный к антибиотикам" означает такое фенотипическое свойство бактериального штамма, что рост указанного бактериального штамма ингибирован в условиях, в которых иначе бы этот бактериальный штамм рос. В этом контексте чувствительность к антибиотикам тестируют в соответствии с рекомендациями CLSI (Институт клинических и лабораторных стандартов) (M07-A8 и M45-A2). Штамм *Bacillus* рассматривают как чувствительный, если рост определяется только при пороговой концентрации, определенной в EFSA Journal 2012; 10(6):2740 для ванкомицина, гентамицина, канамицина, стрептомицина, эритромицина, клиндамицина, тетрациклина и хлорамфеникола, или при более низкой концентрации. В отношении ампициллина нет порогового уровня, данного EFSA для *Bacillus*; пороговый уровень 4 мг/л был выбран для штамма, который рассматривали как чувствительный.

Силос: термин "силос" означает ферментированный заготовленный корм с высоким содержанием влаги, которым можно кормить травоядных животных, таких как лошади, и жвачных животных, например верблюдов, лам, крупный рогатый скот и овец, или использовать в качестве сырья для производства биотоплива для анаэробных ферментеров. Он ферментируется и хранится в процессе, называемом силосование (*ensilage*, *ensiling* или *silaging*), и обычно его получают из травы или зерновых культур (например, кукурузы, сорго, овса, ржи, тимopheевки, фуражных травянистых растений) или бобовых культур, таких как клевера (*clovers/trefoils*), люцерны, горошек, используя целое зеленое растение (не только зерно). Силос может быть получен из многих полевых культур, и специальные термины могут быть использованы в зависимости от типа ("oatlage" для овса, сенаж для люцерны). Силос получают либо путем помещения скошенных зеленых растений в силосное хранилище путем складывания их в большую кучу, покрытую полимерной пленкой, либо путем заворачивания больших рулонов в пластиковую пленку.

Спора: термины "спора" и "эндоспора" являются взаимозаменяемыми и используются в своем обычном значении, которое хорошо известно и понятно специалисту в данной области техники. Как его используют здесь, термин "спора" относится к микроорганизму в его покоящемся, защищенном непродуктивном состоянии.

Стабильный: термин "стабильный" представляет собой термин, известный в данной области техники, и в предпочтительном аспекте термин "стабильный" предназначен для обозначения способности микроорганизма сохраняться в живой форме до введения его животному для улучшения здоровья жи-

вотного.

Свинья: термины "свинья" или "свиньи" означают одомашненных свиней, которых люди держат ради пищи, такой как их мясо. Термин "свинья" включает таких представителей рода *Sus*, как *Sus scrofa domestica* или *Sus domesticus*, и включает поросят, отъемышей, молодняк, откормочных поросят, свиней hocks, свиней polts, подвинков, свиноматок и супоросных свиноматок.

Растительный белок: термин "растительный белок" относится к любому соединению, препарату или смеси, которые включают по меньшей мере один белок, полученный из растения или имеющий происхождение из растения, включая модифицированные белки и производные белков.

Растительные белки могут быть получены из источников растительного белка, таких как бобовые и злаки, например из материала растений семейств *Fabaceae* (*Leguminosae*), например сои, люпина, гороха или фасоли; *Cruciferae*, *Chenopodiaceae*, например свеклы, сахарной свеклы, шпината или лебеды кино; и *Roaceae*. Другие примеры источников растительного белка представляют собой злаки, такие как ячмень, пшеница, рожь, овес, маис (кукуруза), рис и сорго.

Прирост массы: "прирост массы" животного представляет собой увеличение массы животного в течение определенного периода времени. Пример определения среднего прироста массы приведен в Примере 3, и пример определения суточного прироста массы приведен в Примере 7.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предложен штамм *Bacillus subtilis*, выбранный из группы, состоящей из штамма, депонированного как DSM32324; штамма, депонированного как DSM32325, и мутантного штамма DSM32324 или DSM32325, обладающий чувствительностью к ампициллину, ванкомицину, гентамицину, канамицину, стрептомицину, эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и хлорамфениколу; и обладающий ингибирующей активностью в отношении *E. coli* и *Clostridium perfringens*.

Бактериальные штаммы, описанные здесь, являются выделенными, т.е. находятся в форме или в окружении, которые не встречаются в природе.

Термины "мутантная бактерия" или "мутантный штамм" относятся к природной (спонтанной, естественной) мутантной бактерии или бактерии с индуцированными мутациями, в геноме (ДНК) которой присутствует одна или более чем одна мутация, которая отсутствует в ДНК родительского штамма. "Индуцированный мутант" представляет собой бактерию, где мутация была индуцирована обработкой при участии человека, такой как любая традиционно используемая мутагенная обработка, включая обработку химическими мутагенами, такими как химические мутагены, выбранные из:

(1) мутагена, который связывается с ДНК или включается в ДНК, такого как аналог оснований, например 2-аминопурина, или интеркалирующий агент, такой как ICR-191,

(2) мутагена, который вступает в реакцию с ДНК, включая алкилирующие агенты, такие как нитрозогуанидин, или гидроксилламин, или этанметилсульфонат (EMS), или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), UV- или гамма-излучение и т.д. Напротив, "спонтанный мутант" или "природный мутант" не подвергался мутагенному воздействию при участии человека.

Мутант может быть подвергнут нескольким мутагенным обработкам (одну обработку следует понимать как одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), но в настоящем изобретении предпочтительно, чтобы проводилось не более чем 20, или не более чем 10, или не более чем 5 обработок (или стадий скрининга/отбора). У мутанта, предпочтительного в настоящем изобретении, менее чем 1%, менее чем 0,1, менее чем 0,01, менее чем 0,001% или даже менее чем 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме заменены на другие нуклеотиды, или deletированы, по сравнению с материнским штаммом.

Мутантные бактерии, как описано выше, не являются ГМО (генетически модифицированный организм), т.е. не модифицированы с помощью технологии рекомбинантных ДНК. В качестве альтернативы вышеизложенному предпочтительному способу получения мутанта путем случайного мутагенеза также можно получить такого мутанта путем сайт-направленного мутагенеза, например путем использования подходящим образом разработанных методик клонирования.

Когда предложенный мутант представляет собой "спонтанный мутант", штамм подвергают стадии отбора без какой-либо предшествующей мутагенной обработки.

В одном воплощении штамм *Bacillus subtilis* по изобретению имеет по меньшей мере 98% (например по меньшей мере 98,5%, например по меньшей мере 99%, например по меньшей мере 99,5%, например по меньшей мере 99,6%, например по меньшей мере 99,7%, например по меньшей мере 99,8%, например по меньшей мере 99,9%) идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью DSM32324.

В одном воплощении штамм *Bacillus subtilis* по настоящему изобретению имеет по меньшей мере 98% (например по меньшей мере 98,5%, например по меньшей мере 99%, например по меньшей мере 99,5%, например по меньшей мере 99,6%, например по меньшей мере 99,7%, например по меньшей мере 99,8%, например по меньшей мере 99,9%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью DSM32324.

В одном воплощении штамм *Bacillus subtilis* по настоящему изобретению имеет по меньшей мере 98% (например по меньшей мере 98,5%, например по меньшей мере 99%, например по меньшей мере

99,5%, например по меньшей мере 99,6%, например по меньшей мере 99,7%, например по меньшей мере 99,8%, например по меньшей мере 99,9%) идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью DSM32325.

В одном воплощении штамм *Bacillus subtilis* по настоящему изобретению имеет по меньшей мере 98% (например, по меньшей мере 98,5%, например по меньшей мере 99%, например по меньшей мере 99,5%, например по меньшей мере 99,6%, например по меньшей мере 99,7%, например по меньшей мере 99,8%, например по меньшей мере 99,9%) идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью DSM32325.

Штамм *Bacillus* рассматривают как проявляющий ингибирующую активность в отношении *E. coli*, если зона ингибирования составляет по меньшей мере 0,5 мм (низкая степень ингибирования). Предпочтительно зона ингибирования составляет по меньшей мере от 0,5 до 2 мм (средняя), более предпочтительно более чем 2 мм (высокая). Зона ингибирования может отличаться для разных штаммов *E. coli*. Чтобы штамм рассматривали как проявляющий ингибирующую активность в отношении *E. coli* согласно настоящему изобретению, он должен обеспечивать зону ингибирования по меньшей мере 0,5 мм для всех протестированных штаммов *E. coli*. Предпочтительно зона ингибирования для двух, трех, четырех штаммов *E. coli* или даже более предпочтительно зона ингибирования для всех пяти штаммов *E. coli*, составляет по меньшей мере от 0,5 до 2 мм. Еще более предпочтительно зона ингибирования для двух, трех, четырех штаммов *E. coli* или даже более предпочтительно зона ингибирования для всех пяти штаммов *E. coli* составляет более 2 мм.

Штамм *Bacillus* рассматривают как проявляющий ингибирующую активность в отношении *Clostridium perfringens*, если зона ингибирования составляет по меньшей мере 0,5 мм (низкая степень ингибирования). Предпочтительно зона ингибирования составляет по меньшей мере от 0,5 до 2 мм (средняя), более предпочтительно более чем 2 мм (высокая). Зона ингибирования может отличаться для разных штаммов *Clostridium perfringens*. Чтобы штамм рассматривали как проявляющий ингибирующую активность в отношении *Clostridium perfringens* согласно настоящему изобретению, он должен обеспечивать зону ингибирования по меньшей мере 0,5 мм для всех протестированных штаммов *Clostridium perfringens*. Предпочтительно зона ингибирования для двух, трех, четырех штаммов *Clostridium perfringens* или даже более предпочтительно зона ингибирования для всех пяти штаммов *Clostridium perfringens* составляет по меньшей мере от 0,5 до 2 мм. Еще более предпочтительно зона ингибирования для двух, трех, четырех штаммов *Clostridium perfringens* или даже более предпочтительно зона ингибирования для всех пяти штаммов *Clostridium perfringens* составляет более 2 мм.

Предпочтительно штамм *Bacillus* должен также обладать способностью увеличивать количество восстанавливающих сахаров, образующихся в результате расщепления некрахмалистых полисахаридов (NSP). Способность различных штаммов *Bacillus* расщеплять NSP до восстанавливающих сахаров была изучена в Примере 2, и результаты представлены в табл. 4. Штаммы, обладающие способностью увеличивать количество доступных сахаров по меньшей мере до 500 кДж/кг корма при тестировании как описано в этом примере, рассматривают как предпочтительные.

На основании подробных описаний исследований специалист в данной области техники может повторить эти исследования для того, чтобы определить, соответствует ли определенный штамм *Bacillus* таким параметрам как чувствительность к антибиотикам, ингибирующая активность и способность расщеплять NSP. Таким образом, специалист в данной области техники может постоянно получать штаммы с определенными свойствами. Предпочтительно специалист в данной области техники также может включить исследование на чувствительность вегетативных клеток при pH 4 и исследование на устойчивость к желчи, чтобы убедиться, что штаммы способны выживать в достаточной степени в желудочно-кишечном тракте, например, как описано в WO 2013/153159. Очевидно, эти исследования можно выполнять в любом порядке, и некоторые штаммы могут быть исключены в процессе исследования, если они не удовлетворяют критериям.

Дополнительно в изобретении предложена композиция *Bacillus*, содержащая по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по изобретению. В одном воплощении композиция *Bacillus* содержит один штамм *Bacillus subtilis* по изобретению. В другом воплощении композиция *Bacillus* содержит два штамма *Bacillus subtilis* по изобретению, например комбинацию *Bacillus subtilis* DSM32324 и *Bacillus subtilis* DSM32325.

Композиции *Bacillus* по настоящему изобретению могут содержать комбинацию по меньшей мере одного штамма *Bacillus subtilis* по изобретению и по меньшей мере одного другого штамма *Bacillus*. Композиция *Bacillus* может содержать по меньшей мере два штамма, например по меньшей мере три, например по меньшей мере четыре, например по меньшей мере пять штаммов *Bacillus*, по меньшей мере один из которых представляет собой штамм *Bacillus subtilis* по настоящему изобретению.

Штаммы *Bacillus* можно использовать в любой комбинации в композиции *Bacillus*. Например, композиция *Bacillus* может содержать по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по изобретению, и/или по меньшей мере один штамм *Bacillus licheniformis*, и/или по меньшей мере один штамм *Bacillus amyloliquefaciens*, например два штамма *Bacillus subtilis* по изобретению и по меньшей мере один штамм *Bacillus amyloliquefaciens*. Композиция может содержать *Bacillus subtilis* DSM32324, и/или *Bacillus*

subtilis DSM32325 в комбинации с *Bacillus amyloliquefaciens* DSM25840, и/или *Bacillus licheniformis* DSM17236, и/или *Bacillus subtilis* DSM19489. Также можно получать любые другие возможные комбинации штаммов *Bacillus* по настоящему изобретению с другими штаммами *Bacillus*. В качестве конкретного примера композиция *Bacillus* содержит *Bacillus subtilis* DSM32324, *Bacillus subtilis* DSM32325 и *Bacillus amyloliquefaciens* DSM25840. В другом конкретном примере композиция *Bacillus* содержит *Bacillus subtilis* DSM32324, *Bacillus subtilis* DSM32325 и *Bacillus licheniformis* DSM17236. Еще в одном дополнительном конкретном примере композиция *Bacillus* содержит *Bacillus subtilis* DSM32324, *Bacillus subtilis* DSM32325 и *Bacillus subtilis* DSM19489.

Если используют более одного штамма, подразумевают, что доля каждого штамма в композиции составляет от 1 до 99%, в частности от 20 до 80%, например от 30 до 70%, более конкретно 20, 33, 40 или 50% от общего количества бактериальных изолятов, рассчитанного в КОЕ/г композиции. Отдельные штаммы могут присутствовать почти в равных количествах или не в равных количествах.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения предложена композиция *Bacillus*, содержащая DSM32324, DSM25840 и DSM32325 в соотношении 8:3:5.

Подходящие штамм или штаммы *Bacillus* предложены в подходящей для использования в промышленных масштабах форме, известной специалисту в данной области техники. Соответственно, в одном воплощении штамм или штаммы *Bacillus* находятся в композиции в высушенной (например, высушенной распылением) или замороженной форме. Композиция может быть предоставлена в любой подходящей форме, в частности в форме жидкости, например, геля, суспензии, порошка или пеллеты.

В предпочтительном воплощении композиция *Bacillus* содержит от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г, в частности от 5×10^5 до 10^{12} КОЕ/г, более предпочтительно от 10^6 до 10^{12} КОЕ/г и наиболее предпочтительно от 10^7 до 10^{12} КОЕ/г, в частности от 10^8 до 10^{11} КОЕ/г, например от 10^9 до 10^{10} КОЕ/г, каждого из бактериальных штаммов в композиции. Композиция *Bacillus* содержит по меньшей мере 5×10^4 КОЕ каждого штамма на 1 г композиции, что отличает композицию по настоящему изобретению, например, от корма для животных с природными штаммами.

Термин "КОЕ/г" относится к массе (в граммах) композиции, включая носители, такие как карбонат кальция, противослеживающие агенты, такие как силикаты алюминия и кизельгур (диатомовая земля), и другие компоненты, присутствующие в композиции.

Композиции по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один штамм *Bacillus* по изобретению и по меньшей мере один носитель и/или другой компонент, который делает композицию подходящей для кормления животного или в качестве добавки в питьевую воду.

Как его используют здесь, термин "премикс" относится к штамму *Bacillus*, добавленному к носителю с получением премикса, который затем добавляют в корм для животных с желаемым процентом ввода.

Альтернативно, по меньшей мере один штамм *Bacillus* по изобретению может быть приготовлен в смеси с ингредиентами корма для животных, как подробно обсуждается ниже. Такие комбинации могут находиться в форме пеллет, которые экструдированы путем стандартных процессов гранулирования.

Также в изобретении предложен способ получения корма для животных, кормовой добавки для животных или премикса, содержащих добавку по меньшей мере одного штамма *Bacillus* по изобретению в корм для животных или его подходящие компоненты.

Бактерии *Bacillus* существуют в форме спор и вегетативных клеток, которые могут делиться с образованием большего количества вегетативных клеток. Когда здесь дана ссылка на *Bacillus*, это относится как к спорам, так и к вегетативным клеткам, если в контексте не указано иное.

В композиции *Bacillus* по настоящему изобретению штамм или штаммы *Bacillus* предпочтительно предоставлены в форме спор. Основная функция спорообразования как правило заключается в обеспечении выживания бактерии во время периодов стресса, обусловленного воздействием внешней среды. Следовательно, они являются устойчивыми к ультрафиолетовому и гамма-излучению, высыханию, лизоциму, температуре, голоданию и химическим дезинфицирующим средствам. Оболочка споры является непроницаемой для многих токсичных молекул и также может содержать ферменты, которые вовлечены в прорастание. Сердцевина имеет нормальные клеточные структуры, такие как ДНК и рибосомы, но спора является метаболически неактивной.

Вегетативная форма бактерий продуцирует эффекторы, которые могут подавлять бактериальные патогены или проявлять другие благоприятные эффекты в желудочно-кишечном тракте животного. Таким образом, реактивация и прорастание спор после введения животному являются важными.

Из литературных источников известно, что желчь обладает определенным отрицательным действием на выживаемость и прорастание и развитие в вегетативные клетки в ЖКТ животных. Следовательно, пробиотические бактерии в целом должны обладать способностью выживать и размножаться в кишечнике животных благодаря способности выдерживать низкий pH и устойчивости к соли желчных кислот для того, чтобы быть полезными в качестве пробиотических композиций *Bacillus* для добавления в корм для животных. В примерах предложены полезные в этом отношении тесты *in vitro*. Тест на чувствительность к низкому pH (имитирующий среду желудка) сосредоточен на устойчивости вегетативных клеток к pH 4.

Хорошо известно, что споры являются устойчивыми при значениях pH 2-3 и что вегетативные клетки погибают при pH 2. Однако pH в желудке может принимать значения вплоть до 4, особенно в условиях кормления. Это может приводить к прорастанию спор, и следовательно актуальным является тестирование на чувствительность вегетативных клеток к pH 4. Выбранные штаммы предпочтительно должны быть устойчивы к pH 4.

Штаммы *Bacillus subtilis*, депонированные как DSM32324 и DSM32325, были исследованы на чувствительность вегетативных клеток к pH 4 и устойчивость к желчи для того, чтобы обеспечить, что эти штаммы являются подходящими.

Композиция *Bacillus* может содержать один или два различных штамма *B. subtilis* и/или один или два штамма *B. licheniformis* и/или один или два штамма *Bacillus amyloliquefaciens*, где каждый штамм независимо выбран для выполнения определенной роли и/или функции. Комбинацию этих штаммов можно объединять с кормом для животных, таким как корм для домашней птицы, и в конечном счете использовать для улучшения здоровья и продуктивности сельскохозяйственных животных (например, домашнего скота и/или домашней птицы). Например, штаммы и/или комбинированные штаммы могут снижать количество патогенов в кишечнике у домашней птицы и увеличивать прирост массы промышленной домашней птицы.

В дополнительном воплощении композицию *Bacillus* по изобретению можно объединять с вакциной, такой как живая вакцина *Salmonella Typhimurium*, для подавления инфекции *Salmonella* и/или увеличения FCR.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс, содержащие по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по настоящему изобретению и дополнительно содержащие один или более чем один концентрат, витамин, минерал, фермент, аминокислоту и/или другой кормовой ингредиент. В одном воплощении корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс содержат штамм *Bacillus subtilis* DSM32324. В другом воплощении корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс содержат штамм *Bacillus subtilis* DSM32325. Корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс может содержать как *Bacillus subtilis* DSM32324, так и *Bacillus subtilis* DSM32325.

В определенном воплощении корм для животных содержит фураж. Обычно фураж содержит источник растительного белка. В определенном воплощении источник растительного белка представляет собой материал из одного или более чем одного растения семейства Fabaceae. В другом определенном воплощении источник растительного белка представляет собой материал из одного или более чем одного растения семейства Chenopodiaceae. Другие примеры источников растительного белка представляют собой семена рапса и капусту. В другом определенном воплощении соевый белок представляет собой предпочтительный источник растительного белка. В качестве примера фураж содержит 0-80% кукурузы, и/или 0-80% сорго, и/или 0-70% пшеницы, и/или 0-70% ячменя, и/или 0-30% овса, и/или 0-40% соевой муки, и/или 0-10% рыбной муки, и/или 0-20% сыворотки.

В одном воплощении фураж и по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по изобретению смешивают с концентратом. В другом воплощении фураж и по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по изобретению смешивают с премиксом. В дополнительном воплощении фураж и по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по изобретению смешивают с витаминами и/или минералами. В дополнительном воплощении фураж и по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по изобретению смешивают с одним и более чем одним ферментом. В дополнительном воплощении фураж и по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по изобретению смешивают с другими кормовыми ингредиентами, такими как красители, стабилизаторы, добавки, улучшающие рост, и ароматические соединения/ароматизаторы, полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA); вещества, генерирующие активные формы кислорода, антимикробные пептиды, противогрибковые полипептиды и аминокислоты.

В определенном воплощении корм для животных состоит из молока (например, от свиньи, коровы, козы, овцы) или содержит его, например, для кормления поросят. В другом конкретном воплощении корм для животных состоит из заменителя молока или содержит его, например, для кормления поросят.

В другом воплощении корм для животных может включать один или более чем один витамин, такой как один или более чем один жирорастворимый витамин и/или один или более чем один водорастворимый витамин. В другом воплощении корм для животных дополнительно может включать одно или более чем одно минеральное вещество, такое как один или более чем один микроэлемент и/или один или более чем один макроэлемент. Обычно жирорастворимые и водорастворимые витамины, а также микроэлементы образуют часть так называемого премикса, предназначенного для добавления к корму, тогда как макроэлементы обычно добавляют к корму отдельно. Неограничивающие примеры жирорастворимых витаминов включают витамин А, витамин D3, витамин Е и витамин К, например витамин К3. Неограничивающие примеры водорастворимых витаминов включают витамин В12, биотин и холин, витамин В1, витамин В2, витамин В6, ниацин, фолиевую кислоту и пантотенат, например Са-D-пантотенат. Неограничивающие примеры микроэлементов включают бор, кобальт, хлорид, хром, медь, фторид, йод, железо, марганец, молибден, селен и цинк. Неограничивающие примеры макроэлементов включают кальций, магний, калий и натрий.

Корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс по изобретению также может содержать по меньшей мере один фермент, выбранный из группы, включающей фитазу (ЕС 3.1.3.8 или 3.1.3.26); ксиланазу (ЕС 3.2.1.8); галактаназу (ЕС 3.2.1.89); альфа-галактозидазу (ЕС 3.2.1.22); протеазу (ЕС 3.4); фосфолипазу А1 (ЕС 3.1.1.32); фосфолипазу А2 (ЕС 3.1.1.4); лизофосфолипазу (ЕС 3.1.1.5); фосфолипазу С (3.1.4.3); фосфолипазу D (ЕС 3.1.4.4); амилазу, такую как, например, альфа-амилаза (ЕС 3.2.1.1); лизоцим (ЕС 3.2.1.17) и бета-глюканазу (ЕС 3.2.1.4 или ЕС 3.2.1.6) или любую их смесь.

Корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс по изобретению могут дополнительно содержать добавку одной или более чем одной аминокислоты. Примеры аминокислот, которые используют в составе корма для животных, представляют собой лизин, аланин, бета-аланин, треонин, метионин и триптофан. Корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс по изобретению могут дополнительно содержать красители, стабилизаторы, добавки, улучшающие рост, и ароматические соединения/ароматизаторы, полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA); вещества, генерирующие активные формы кислорода, антимикробные пептиды и противогрибковые полипептиды. Примеры красителей представляют собой каротиноиды, такие как бета-каротин, астаксантин и лютеин. Примеры ароматических соединений/ароматизаторов представляют собой креозол, анетол, дека-, ундека- и/или додека-лактоны, иононы, ирон, гингерол, пиперидин, пропилиден-фталид, бутилиден-фталид, капсаицин и танин. Примеры полиненасыщенных жирных кислот представляют собой полиненасыщенные жирные кислоты C18, C20 и C22, такие как арахидоновая кислота, докозагексаеновая кислота, эйкозапентаеновая кислота и гамма-линолевая кислота. Примеры веществ, генерирующих активные формы кислорода, представляют собой химические соединения, такие как перборат, персульфат или перкарбонат, и ферменты, такие как оксидаза, оксигеназа или синтетаза.

В одном воплощении корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс содержит один или более чем один кокцидиостатик.

Корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс дополнительно содержат носитель. Носитель может содержать одно или более чем одно из следующих соединений: вода, глицерин, этиленгликоль, 1,2-пропиленгликоль или 1,3-пропиленгликоль, хлорид натрия, бензоат натрия, сорбат калия, сульфат натрия, сульфат калия, сульфат магния, тиосульфат натрия, карбонат кальция, цитрат натрия, декстрин, мальтодекстрин, глюкоза, сахароза, сорбит, лактоза, сыворотка, сывороточный пермеат, пшеничная мука, пшеничные отруби, кукурузная глютенная мука, крахмал и целлюлоза.

В одном воплощении один или более чем один бактериальный штамм является стабильным, когда его подвергают давлению, которое применяется/достигается во время процесса экструзии для гранулирования. В определенном воплощении один или более чем один бактериальный штамм является стабильным при давлении в диапазоне от 1 бар (1×10^5 Па) до 40 бар (4×10^6 Па).

В определенном воплощении один или более чем один бактериальный штамм является стабильным при высоких температурах. В частности, бактериальные штаммы являются стабильными, когда их подвергают воздействию температур, достигаемых во время процесса экструзии для гранулирования. Еще в одном определенном воплощении один или более чем один бактериальный штамм является стабильным в диапазоне температур от 70 до 120°C.

В одном воплощении корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс дополнительно содержит один или более чем один дополнительный микроорганизм. В определенном воплощении корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс дополнительно содержит бактерию из одного или более чем одного из следующих родов: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* и *Megasphaera* или любую их комбинацию.

В определенном воплощении корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс дополнительно содержат бактерию из одного или более чем одного из следующих видов: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus simplex*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus safensis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus tequilensis* или любую их комбинацию.

В определенном воплощении корм для животных, кормовая добавка для животных или премикс дополнительно содержат один или более чем один тип дрожжей. Один или более чем один тип дрожжей может быть выбран из группы, состоящей из *Saccharomycetaceae*, *Saccharomyces* (в частности, *S. cerevisiae* и/или *S. boulardii*), *Kluyveromyces* (в частности, *K. marxianus* и *K. lactis*), *Candida* (в частности, *C. utilis*, также называемый дрожжами Торула), *Pichia* (в частности, *P. pastoris*), *Torulaspora* (в частности, *T. delbrueckii*), дрожжей *Phaffia* и *Basidiomycota*.

Рацион для животных может, например, быть изготовлен в форме мешанки (не гранулированной) или гранулированного корма. Обычно измельченные пищевые продукты перемешивают и достаточные количества незаменимых витаминов и минеральных веществ добавляют согласно техническим условиям для рассматриваемых видов. Бактериальные культуры и возможно ферменты можно добавлять в форме твердых или жидких композиций. Например, для мешанки культуральную композицию в твердой или жидкой форме можно добавлять до стадии смешивания ингредиентов или во время таковой. Для грану-

лированного корма (жидкого или твердого) композицию *Bacillus* также можно добавлять до стадии смешивания ингредиентов корма или во время таковой. Обычно жидкая композиция *Bacillus* по изобретению содержит бактериальный(е) штамм(ы), возможно с полиолом, таким как глицерин, этиленгликоль или пропиленгликоль, и добавляют после стадии гранулирования, например путем распыления жидкой композиции на пеллеты. Бактерии также могут быть включены в кормовую добавку для животных или премикс.

Композицию по настоящему изобретению можно использовать для предупреждения или контроля бактериальной колонизации или инфекции, например *E. coli* и/или *Clostridium*, в частности *Clostridium difficile*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens* или *Clostridium septicum*.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ предупреждения или контроля бактериальной колонизации или инфекции, например *E. coli* и/или *Clostridium*, в частности *Clostridium difficile*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens* или *Clostridium septicum*, включающий введение эффективного количества штамма по настоящему изобретению или композиции по настоящему изобретению животному, которое нуждается в таком введении.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ кормления животного, включающий введение композиции *Bacillus* по изобретению животному, в частности животному с однокамерным желудком.

Животные с однокамерным желудком включают домашнюю птицу, такую как бройлеры, производители, несушки, индюки, страусы, перепела, утки и гуси, травоядных животных, таких как лошади и жвачные, например, верблюды, ламы, крупный рогатый скот и овцы, телята, свиньи, такие как поросята, отъемыши, молодняк, откормочные поросята, свиньи hocks, свиньи polts, подсвинки, свиноматки, опоросные свиноматки, грызунов, таких как кролики, домашних питомцев, таких как кошки и собаки, и рыб (включая лосося, форель, тилапию, сома и карпов, но не ограничиваясь ими, и ракообразных (включая, без ограничения, мелких ракообразных и креветок), но не ограничиваются ими. Свиньи и/или домашняя птица являются предпочтительными животными с однокамерным желудком.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено применение по меньшей мере одного штамма *Bacillus subtilis* по изобретению или корма для животных, кормовой добавки для животных или премикса, содержащих по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis* по настоящему изобретению для улучшения продуктивности животного, в частности животного с однокамерным желудком.

Как показано в примерах, введение штамма *Bacillus subtilis* по изобретению улучшает состояние желудочно-кишечного тракта животного, например, предупреждает или контролирует энтерит, и обеспечивает улучшенные показатели продуктивности животного у животных, получавших обработку, по сравнению с контролем. Показатели продуктивности животного включают прирост массы (WG), коэффициент кормоотдачи (FCR), уменьшение смертности и увеличение Европейского фактора эффективности производства (EPEF), но не ограничиваются ими.

Дополнительно в изобретении предложен способ увеличения усвояемости корма для животных, в частности усвояемости белков, включающий кормление животного штаммом по настоящему изобретению или композицией по настоящему изобретению.

Соответственно, изобретение относится к применению штамма по настоящему изобретению или композиции по настоящему изобретению для улучшения одного или более показателей продуктивности животного, выбранных из группы, состоящей из:

- 1) увеличенного прироста массы (WG),
- 2) пониженного коэффициента кормоотдачи (FCR),
- 3) пониженной степени поражения от некротического энтерита,
- 4) пониженной частоты некротического энтерита,
- 6) пониженной смертности от некротического энтерита,
- 7) повышенного Европейского фактора эффективности производства (EPEF) и
- 8) пониженной смертности.

В предпочтительном воплощении изобретения "продуктивность животного" определяют по приросту массы тела животного и/или по коэффициенту кормоотдачи. Под выражением "улучшенная продуктивность животного" понимают, что имеет место увеличенный прирост массы тела, и/или пониженный коэффициент кормоотдачи, и/или улучшенная усвояемость питательных веществ или усвояемая энергия корма, и/или метаболизируемая энергия, и/или увеличенная эффективность корма в результате использования корма для животных, кормовой добавки для животных или премикса по настоящему изобретению в корме для животных по сравнению с кормом для животных, который не содержит указанные корм для животных, кормовую добавку для животных или премикс. Предпочтительно под выражением "улучшенная продуктивность животного" понимают, что имеет место увеличенный прирост массы тела и/или пониженный коэффициент кормоотдачи.

Выражение "увеличенный прирост массы" относится к животному, имеющему увеличенную массу тела, которое кормят кормом, содержащим кормовую композицию, по сравнению с животным, которое кормят кормом без указанной кормовой композиции по изобретению. В частности, прирост массы (WG) животного представляет собой увеличение массы животного в течение определенного периода времени.

В одном воплощении улучшение в приросте массы тела составляет по меньшей мере 0,5%, например по меньшей мере 1%, например по меньшей мере 2%, например по меньшей мере 2,5%, например по меньшей мере 3%, например по меньшей мере 4%, например по меньшей мере 5%, например по меньшей мере 6%, например по меньшей мере 7%, например по меньшей мере 8%, например по меньшей мере 9%, например по меньшей мере 10%.

В одном воплощении улучшение в приросте массы приводит к приросту массы тела, составляющему по меньшей мере 0,5%, например по меньшей мере 0,8%, например по меньшей мере 1,2%, например по меньшей мере 1,5%, например по меньшей мере 1,8%, например по меньшей мере 2,0%, например по меньшей мере 2,5%, например по меньшей мере 3,0%, например по меньшей мере 4,0%, например по меньшей мере 5,0%, например по меньшей мере 6,0%, например по меньшей мере 7,0%. В предпочтительном воплощении улучшение в приросте массы приводит к приросту массы, выбранному из группы, состоящей из: от 1,8 до 2,0%, от 2,0 до 2,2%, от 2,2 до 2,4%, от 2,4 до 2,6%, от 2,6 до 2,8%, от 2,8 до 3,0%, от 3,0 до 3,2%, от 3,2 до 3,4%, от 3,4 до 3,6%, от 3,6 до 3,8%, от 3,8 до 4,0%, от 4 до 5%, от 5 до 7%, от 7 до 10% или любой их комбинации.

Под выражениями "пониженный коэффициент кормоотдачи" или "улучшенный коэффициент кормоотдачи" понимают, что использование композиции кормовой добавки в корме приводит к тому, что требуется меньшее количество корма для кормления животного для увеличения массы животного на определенную величину по сравнению с количеством корма, которое требуется для увеличения массы животного на такую же величину, когда корм не содержит указанной композиции кормовой добавки.

В одном воплощении улучшение коэффициента кормоотдачи (FCR) приводит к FCR -2,5% или менее чем -2,5%, в частности менее чем -2,6%, в частности менее чем -2,7%, в частности менее чем -2,8%, в частности менее чем -2,9%, в частности менее чем -3,0%. В предпочтительном воплощении улучшение FCR приводит к FCR от -5 до -2%, в частности FCR от -4 до -2%, в частности FCR от -3,5 до -2,5%. В определенном воплощении улучшение FCR приводит к FCR в пределах интервала, выбранного из группы, состоящей из: от -5 до -4,5%, от -4,5 до -4%, от -4 до -3,8%, от -3,8 до -3,6%, от -3,6 до -3,4%, от -3,4 до -3,2%, от -3,2 до -3,0%, от -3,0 до -2,8% и от -2,8 до -2,5% или любой комбинации этих интервалов.

Выражение "усвояемость питательного вещества", как его используют здесь, означает долю питательного вещества, которая всасывается в желудочно-кишечном тракте или определенном сегменте желудочно-кишечного тракта, например, в тонкой кишке. Усвояемость питательных веществ можно измерить как разницу между тем, что введено субъекту, и тем, что выходит с фекалиями субъекта, или между тем, что введено субъекту, и тем, что остается в области переваривания определенного сегмента желудочно-кишечного тракта, например подвздошной кишки. Усвояемость питательного вещества, как ее используют здесь, можно измерить как разницу между потреблением питательного вещества и экскрецией питательного вещества путем полного сбора экскрета в течение периода времени; или с использованием инертного маркера, который не усваивается животным и дает исследователю возможность вычислить количество питательного вещества, которое абсорбировалось на протяжении всего желудочно-кишечного тракта или в сегменте желудочно-кишечного тракта. Такой инертный маркер может представлять собой диоксид титана, оксид хрома или нерастворимую в кислоте золу. Усвояемость можно выражать как процентное содержание питательного вещества в корме или число единиц массы усваиваемого питательного вещества на число единиц массы питательного вещества в корме. Термин "усвояемость питательных веществ", как его используют здесь, охватывает усвояемость крахмала, усвояемость жиров, усвояемость белков, усвояемость минеральных веществ и усвояемость аминокислот.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ улучшения одного или более показателей продуктивности животного, выбранных из группы, состоящей из:

- 1) увеличенного прироста массы (WG),
- 2) пониженного коэффициента кормоотдачи (FCR),
- 3) пониженной степени поражения от некротического энтерита,
- 4) пониженной частоты некротического энтерита,
- 5) пониженной смертности от некротического энтерита,
- 6) повышенного Европейского фактора эффективности производства (EPEF) и
- 7) пониженной смертности,

включающий кормление животного штаммом по настоящему изобретению или композицией по настоящему изобретению.

Композицию по настоящему изобретению также можно использовать в "гибкой" кормовой композиции (FFF), когда животное кормят кормом, имеющим пониженную "метаболизируемую энергию", и композицией по изобретению, посредством чего получают приемлемую продуктивность животного и/или коэффициент кормоотдачи, несмотря на пониженную "метаболизируемую энергию" корма. Пониженная "метаболизируемая энергия" может быть на уровне от 97 до 99% от "метаболизируемой энергии" стандартного корма для рассматриваемого животного, в частности от 97 до 98% или от 98 до 99%.

Депонирование и экспертное решение

Штамм *Bacillus licheniformis* DSM17236 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) 7 апреля 2005 г. Chr. Hansen

A/S, Denmark. Депонирование было произведено в соответствии с требованиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Bacillus subtilis* DSM19489 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) 27 июня 2007 г. Chr. Hansen A/S, Denmark. Депонирование было произведено в соответствии с требованиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Bacillus mojavensis* DSM25839 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) 3 апреля 2012 г. Chr. Hansen A/S, Denmark. Депонирование было произведено в соответствии с требованиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Bacillus amyloliquefaciens* DSM25840 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) 3 апреля 2012 г. Chr. Hansen A/S, Denmark. Депонирование было произведено в соответствии с требованиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Bacillus subtilis* DSM25841 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) 3 апреля 2012 г. Chr. Hansen A/S, Denmark. Депонирование было произведено в соответствии с требованиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Bacillus amyloliquefaciens* DSM27032 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) 21 марта 2013 г. Chr. Hansen A/S, Denmark. Депонирование было произведено в соответствии с требованиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Bacillus subtilis* DSM32324 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) 8 июня 2016 г. Chr. Hansen A/S, Denmark. Депонирование было произведено в соответствии с требованиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Bacillus subtilis* DSM32325 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) 8 июня 2016 г. Chr. Hansen A/S, Denmark. Депонирование было произведено в соответствии с требованиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Для всех вышеупомянутых депонированных микроорганизмов применяют следующие дополнительные указания:

в отношении соответствующих Патентных бюро соответствующих указанных государств авторы изобретения просят, чтобы образец депонированных микроорганизмов, определенных выше, был доступен только для эксперта, назначенного запрашивающей стороной, вплоть до даты выдачи патента или даты, когда данная заявка отклонена, или отозвана, или считается отозванной.

Примеры *in vitro*

Пример 1.

Скрининг на ингибирование патогенов и чувствительность к антибиотикам.

Материалы:

Бульон с настоем телятины (VIB) (Difco, 234420).

Агар на бульоне с настоем телятины (VIB) (VIB + 1,5% бактериологический агар (Агар no. 1), Oxoid LP0011).

Среда Мюллера-Хинтона 2 со стандартизированным содержанием катионов (Fluka).

Чашки с агаром Т3 (на 1 л: 3 г триптона, 2 г триптозы, 1,5 г дрожжевого экстракта, 0,05 М дигидрофосфата натрия и 0,005 г $MnCl_2$ [pH 6,8] и 15 г агара).

Среда Лурия-Бертани (Laura-Bertani, LB) (г/л: Бактотриптон 10 (Difco 0123), Дрожжевой экстракт 5 (Oxoid L21), NaCl 10 (Merck nr. 106404).

Агар с сердечно-мозговой вытяжкой (ВН) (Oxoid CM375).

Соли желчных кислот (экстракт желчи, свиной; Sigma B8631).

Чашки для биоанализа (Nunc 240845).

Чашки Петри (Procudan 140096, чашка Петри с разделителями).

Физиологический раствор с пептоном (0,9% хлорид натрия, 1% пептон) FKP.

Среда ISO-SENSITEST (Oxoid CM0473).

Микротитрационные планшеты (МТР) NUNC, Denmark.

Прямоугольные чашки Петри (Omni tray)/однолуночные планшеты N 242811 Thermo Scientific/NUNC Denmark.

Микротитрационные 96-луночные планшеты с глубокими лунками (DW), не содержащие РНКаз/не содержащие ДНКаз (Thermo Fisher Science).

Ампициллин (Sigma, A9518-5G).

Ванкомицин (Sigma, V1764-250MG).

Гентамицин (Sigma, G1264-50MG).

Канамицин (Sigma, K1377-1G).

Стрептомицин (Sigma, S6501-5G).

Эритромицин (Sigma E-5389).

Клиндамицин (Sigma, C2569-10MG).

Тетрациклин (Sigma T-7660).

Хлорамфеникол (Sigma, C0378-5G).

Escherichia coli O101 H-, K99 F5 (State Serum Institute, Copenhagen, Denmark).

Escherichia coli O147:K89 F4 H19 (State Serum Institute, Copenhagen, Denmark).

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

E. coli ATCC11775 (American type culture collection).

E. coli Cp6salp3 (Copenhagen Veterinary University).

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

Clostridium perfringens тип C, NCTC3180, National Collection of Type Cultures (England).

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

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

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

Все патогенные штаммы, упомянутые выше, сохраняли в среде LB с 20% глицерином в ВНИ при -80°C.

Культуры *Bacillus*:

Штаммы *Bacillus*, выделенные из экскрементов, почвы, пищевых источников и полученные из коллекций банка штаммов, сохраняли в ВИБ с 20% глицерином в МТР эталонных планшетах при -80°C.

Проводили идентификацию изолятов спорообразующих аэробных бактерий по последовательности рибосомной РНК 16S и *gyrB* (Wang et al., 2007), скрининг на чувствительность к антибиотикам согласно "Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to inhibitors of human and veterinary importance", EFSA Journal 2012; 10(6):2740, как описано ниже, и устойчивость к желчи и чувствительность к низким pH, ферментативную активность, рост в различных средах, устойчивость к нагреванию и спорообразование, как описано в WO 2013/153159.

Чувствительность к антибиотикам путем измерения MIC.

Штаммы *Bacillus* анализировали на чувствительность к антибиотикам путем измерения минимальной ингибирующей концентрации (MIC) для нескольких антибиотиков. Применяемый способ представлял собой метод микроразведения в бульоне, как изложено в стандарте CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute M07-A8 и M45-A2).

Суспензию ночной культуры штамма, подлежащего тестированию, инокулировали в среду ISO-SENSITEST (Oxoid CM0473) в микротитрационных планшетах при концентрации приблизительно 10^5 КОЕ/мл (колониеобразующих единиц/мл) в двукратных серийных разведениях тестируемого антибиотика (общий объем 100 мкл/лунка) и инкубировали в аэробных условиях в течение 20-24 ч при 37°C. Результаты записывали через 20 ч инкубации как самую низкую концентрацию антибиотика, которая ингибирует видимый рост. Тест проводили дважды в двух независимых биологических повторях.

Только штаммы *Bacillus*, которые были чувствительны к ингибиторам согласно EFSA Guidance, были включены в скрининг на ингибирование патогенных *E. coli* и *Clostridium perfringens*.

Скрининг штаммов *Bacillus* в отношении ингибирования патогенной *E. coli*.

Штаммы *Bacillus* добавляли в объеме 50 мкл из эталонных планшетов МТР в 700 мкл ВИБ в планшетах DW (с глубокими лунками) и инкубировали при 37°C и 175 об/мин в течение ночи. Штаммы *E. coli* выращивали в LB при 30°C в течение ночи. 2 мл ночной культуры *E. coli* смешивали с 200 мл жидкого агар ВИБ при 50°C и вливали в каждую чашку для биологических проб. Чашки сушили в стерильном ламинарном шкафу. Ночные культуры *Bacillus*, по 2 мкл каждой, наносили каплями на поверхность агара ВИБ, перемешанного с *E. coli* в чашках для биологических проб, и инкубировали при 37°C в течение 1 суток.

Радиусы осветленных зон ингибирования вокруг *Bacillus* измеряли и записывали как "3 означает сильное", т.е. более чем 2 мм, "2 означает среднее", т.е. от 0,5 до 2 мм, "1 означает слабое", т.е. менее чем 0,5 мм, и 0 означает отсутствие ингибирования.

Ингибирование *Clostridium perfringens* согласно капельному тесту на агаре.

Агар ВИБ вливали в чашки для биологических проб (200 мл на чашку) и полностью высушивали в

стерильном ламинарном шкафу. Ночные культуры *Bacillus*, по 2 мкл каждой, наносили каплями на поверхность чашек с агаром "VTB и инкубировали при 37°C в течение ночи. Штаммы *Clostridium perfringens* выращивали в анаэробных условиях на агаре ВНИ при 37°C в течение ночи. Ночную культуру *Clostridium perfringens* добавляли в объеме 2 мл в 200 мл жидкого агара ВНИ, перемешивали и осторожно на-слаивали на чашки для биологических проб с каплями *Bacillus*. Чашки инкубировали в анаэробных условиях при 37°C в течение 1 суток.

Радиусы осветленных зон ингибирования вокруг *Bacillus* измеряли и записывали как "3 означает сильное", т.е. более чем 2 мм, "2 означает среднее", т.е. от 0,5 до 2 мм, "1 означает слабое", т.е. менее чем 0,5 мм, и 0 означает отсутствие ингибирования.

Все данные были получены повторно в разные дни.

Результаты.

Таблица 1

Результаты по ингибированию *E. coli* выбранными штаммами *Bacillus*

Ингибирование		Ингибирование <i>E. coli</i>				
Номер DSM, если доступен		<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
		O101 F5	O147:K89 F4	O149:k91,k88a	ATCC 11775	Cp6salp3
<i>Bacillus licheniformis</i>		0	0	0	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	17236	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	19489	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>		0	0	1	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	32324	3	3	3	3	3
<i>Bacillus subtilis</i>		0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>		0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	32325	2	2	3	2	2
<i>Bacillus subtilis</i>	25841	2	2	2	2	2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	25840	1	1	2	1	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	27032	2	3	3	2	2

Таблица 2

Результаты по ингибированию Clostridium выбранными штаммами Bacillus

Ингибирование		Ингибирование				
Номер DSM, если доступен		DSM756	NCTC3180	CCUG2036	CCUG2037	CCUG44727
<i>Bacillus licheniformis</i>		1	2	1	0	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	17236	1	1	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	19489	0	0	0	1	0
<i>Bacillus subtilis</i>		0	2	0	0	1
<i>Bacillus subtilis</i>	32324	3	3	3	3	3
<i>Bacillus subtilis</i>		1	0	1	2	1
<i>Bacillus subtilis</i>		1	0	0	1	0
<i>Bacillus subtilis</i>	32325	3	3	3	2	3
<i>Bacillus subtilis</i>	25841	2	3	2	2	3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	25840	2	3	3	2	3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	27032	3	3	3	2	3

Результаты из табл. 1 и 2 по ингибированию *E. coli* и *Clostridium* показывают, что протестированные штаммы *Bacillus licheniformis* и многие из протестированных штаммов *Bacillus subtilis* не демонстрировали какого-либо ингибирования *E. coli* и демонстрировали слабое ингибирование *Clostridium*. Однако два штамма *B. subtilis*, DSM32324 и DSM32325, демонстрировали впечатляющие результаты в отношении как ингибирования *E. coli*, так и ингибирования *Clostridium*.

Пример 2.

Измерение количества восстанавливающих сахаров в корме, инкубированном с композицией *bacillus*.

Задача настоящего эксперимента заключалась в том, чтобы исследовать способность различных штаммов *Bacillus* расщеплять NSP в доступном в продаже стартерном корме для домашней птицы и увеличивать количество доступных сахаров.

Таблица 3

Состав комплексного корма, используемого в исследовании

Ингредиент	% от кормового рациона
Молотая кукуруза	30,0
Пшеница	27,0
Соевая мука	22,5
Семена рапса	6,0
Подсолнечник	5,0
Овес	4,0
Рыбная мука	2,0
Известняк	1,24
Дигидрофосфат кальция	0,78
Растительное масло	0,54
Бикарбонат натрия	0,28
пре-МИКС из витаминов, минеральных веществ, аминокислот	0,25
Хлорид натрия (0,17%)	0,17

Комплексный корм на основе пшеницы-кукурузы-сои (табл. 3) автоклавировали при 121°C в течение

ние 15 мин для стерилизации. Затем образец корма разводили в 20 раз буфером фосфата натрия для обеспечения pH примерно 6-6,5 на протяжении всего эксперимента. Продукты *Bacillus* получали путем инокуляции 2% ночной культуры штаммов *Bacillus*, выращенной в бульоне с настоем телятины (VIB) (Difco, 234420). Образец брали для анализа на восстанавливающий сахар (DNS) (T=0). После инкубации при 37°C в течение 24 ч образец брали на определение КОЕ. Другой образец центрифугировали и супернатант использовали для определения DNS.

Восстанавливающий сахар подвергали анализу с 3,5-динитросалициловой кислотой (DNS) следующим образом.

Na-ацетатный буфер (100 мМ, pH 6) перемешивали со стерильным профильтрованным супернатантом образца *Bacillus* и инкубировали при 40°C в течение 10 мин. Реактив DNS добавляли в тестируемую пробирку, перемешивали и инкубировали на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения измеряли поглощение при 540 нм с помощью спектрофотометра.

Стандартную кривую строили с использованием концентрированного раствора глюкозы для представления результатов по восстанавливающему сахару или в единицах активности фермента (количество фермента, необходимое для высвобождения 1 мкмоль восстанавливающего глюкозного эквивалента в 1 мл на единицу времени).

Результаты представлены в табл. 4.

Результаты.

Таблица 4

	Образец	кДж/кг корма
	Номер DSM, если доступен	
Контроль		214
<i>Bacillus aryabhattai</i>		237
<i>Bacillus licheniformis</i>	17236	340
<i>Bacillus licheniformis</i>	15326	541
<i>Bacillus subtilis</i>	19489	403
<i>Bacillus subtilis</i>	25841	458
<i>Bacillus subtilis</i>	32325	642
<i>Bacillus subtilis</i>	32324	723
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	16734	515
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	27032	515
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	14623	517
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	15509	853
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	25840	1142
<i>Bacillus mojavensis</i>	25839	939

В табл. 4 представлены результаты по нескольким различным штаммам.

Bacillus и показано, что все протестированные штаммы *Bacillus* поставляли больше питательных веществ животному путем предоставления большего количества восстанавливающих сахаров по сравнению с контролем, но также существует значительный разброс между отдельными штаммами.

На основании результатов по ингибированию *E. coli* и *Clostridium perfringens* в сочетании с результатами по способности обеспечивать увеличенное количество восстанавливающих сахаров, два наиболее продуктивных штамма, т.е. штаммы *B. subtilis* DSM32324 и DSM32325, были выбраны для исследований *in vivo*.

Примеры *in vivo*

Пример 3.

Эффективность штамма *Bacillus subtilis* DSM32324 при заражении *Clostridium perfringens* в исследованиях *in vivo*.

Таблица 5

Название ингредиента % (масс./масс.)	Рацион		
	стартер	гроуер	финишер
Кукуруза, зерно	58,509	64,054	69,218
Соевая мука, отшелушенная, растворитель	35,550	29,771	24,511
Жир растительный	2,100	2,585	2,748
Гидрофосфат кальция	1,734	1,780	1,693
Карбонат кальция	1,150	0,910	0,873
Соль, (NaCl)	0,386	0,390	0,393

Метионин МНА, L - лизин, микроэлементы, витаминный премикс и L-треонин были включены в соответствии с рекомендациями заводчика.

Использовали рацион на основании не обработанной лекарственным средством кукурузы/соевой муки (табл. 5). $1,2 \times 10^6$ КОЕ/г *Bacillus subtilis* DSM32324 добавляли к корму одной из групп. Корм и вода были в свободном доступе на протяжении всех исследований. Весь корм был на загон. Стартерным кормом кормили от суток 0 до суток 21. На сутки 21 непотребленный стартерный корм взвешивали и выбрасывали. Гроуерным кормом кормили вплоть до суток 35 и непотребленный гроуерный корм взвешивали и выбрасывали. Также финишным кормом кормили до суток 42, после чего непотребленный финишный корм взвешивали и выбрасывали.

Таблица 6

Обработка	Инокуляция <i>Clostridium</i>		
	<i>perfringens</i> CP-6	Загоны/Trt	птицы/Trt
Без обработки	Не инфицировали	8	320
лекарственным средством			
Без обработки	Сутки 19, 20 и 21	8	320
лекарственным средством			
DSM32324	Сутки 19, 20 и 21	8	320

Эксперимент начинали с 40 самцами цыплят бройлеров Ross 308 на загон. Обработки проводили в повторях в восьми блоках, рандомизировали в пределах блоков по шесть загонов в каждом.

На сутки 19, 20 и 21 птиц во всех загонах, кроме не получавшей лекарственной обработки неинфицированной группы обработки 1, заражали бульонной культурой *C. perfringens* CP-6 (Кнап I., et al., 2010). Этот штамм представляет собой полевой изолят *C. perfringens*, известный как вызывающий NE, полученный в результате операции на промышленных бройлерах и используемый в настоящем исследовании в качестве организма для заражения. Свежий инокулят использовали каждые сутки. Каждый загон получал одинаковое количество инокулята, соответствующее приблизительно от 1×10^8 до 1×10^9 КОЕ *C. perfringens* CP-6. Инокулят вводили путем смешивания его с кормом в основании трубчатых кормушек.

На сутки 21 выбирали по три птицы из каждого загона, умерщвляли, взвешивали группу и исследовали на степень присутствующих повреждений от некротического энтерита. Оценивали по шкале от 0 до 3, где 0 означает норму и 3 означает наиболее тяжелые повреждения. Оценивали следующим образом: 0 - для нормального кишечника, 1 - для небольшого слизистого покрытия и потери тонуса, 2 - для тяжелого некротического энтерита и 3 - для крайне тяжелого некротического энтерита с наличием крови в просвете.

Всех птиц взвешивали на сутки 31, 35 и 42, чтобы оценить вклад некротического энтерита в показатели продуктивности: средние для живой массы, средний прирост массы (AWG), потребление корма, коэффициент кормоотдачи (FCR), балльная оценка поражения от некротического энтерита и смертность (общая и от NE) рассчитывали для всех загонов.

Статистический анализ данных выполняли с помощью SAS Stat Version 9.2 с использованием анализа ANOVA с полностью рандомизированным дизайном для установки различий между группами обработки. Загон рассматривали как статистическую экспериментальную единицу с рационом в качестве фиксированного эффекта. Результаты записывали как среднеквадратичные средние и считали их отличающимися при $P < 0,05$.

Результаты.

Таблица 7

Сутки 21		
Обработка	FCR	AWG (кг)
Без обработки лекарственным средством, неинфицированные	1,447в	0,562а
Без обработки лекарственным средством, инфицированные	1,652а	0,501б
DSM32324, инфицированные	1,575б	0,567а
Сутки 35		
Обработка	FCR	AWG (кг)
Без обработки лекарственным средством, неинфицированные	1,569б	1,735аб
Без обработки лекарственным средством, инфицированные	1,634а	1,679б
DSM32324, инфицированные	1,593б	1,756а
Сутки 42		
Обработка	FCR	AWG (кг)
Без обработки лекарственным средством, неинфицированные	1,627б	2,272а
Без обработки лекарственным средством, инфицированные	1,731а	2,155б
DSM32324, инфицированные	1,645б	2,303а

Буквы, добавленные к результатам, представляют группы обработки, статистически значимо отличающиеся от не получавшего лекарственной обработки контроля ($P \leq 0,05$) или друг от друга.

Таблица 8

Обработка	Балльная оценка повреждений от NE	Смертность от NE %
Без обработки лекарственным средством, неинфицированные	0,05б	0,0б
Без обработки лекарственным средством, инфицированные	0,58а	4,3а
DSM32324, инфицированные	0,18б	0,7б

Буквы, добавленные к результатам, представляют группы обработки, статистически значимо отличающиеся от не получавшего лекарственной обработки контроля ($P \leq 0,05$) или друг от друга.

Закключение.

Для таких показателей продуктивности, как коэффициент кормоотдачи (FCR) и средний прирост массы (AWG), измеренных на сутки 21, сутки 35 и сутки 42, значительное улучшение наблюдали для всех контрольных точек при рассмотрении *Bacillus subtilis* DSM3234 в качестве кормовой добавки по сравнению с необработанной инфицированной контрольной группой. Неожиданно, группа, получавшая обработку *Bacillus*, не показала каких-либо существенных различий с неинфицированной не получавшей лекарственной обработки контрольной группой, даже несмотря на то, что последняя группа не была заражена и ее рассматривали как здоровую (табл. 7).

В отношении субклинического энтерита, индуцированного в исследовании по заражению *in vivo*, результаты показывают, что *Bacillus subtilis* DSM3234 уменьшал балльную оценку поражения от некротического энтерита у цыплят и значительно снижал смертность от некротического энтерита (табл. 8).

Пример 4.

Эффективность штамма *Bacillus subtilis* DSM32325 при заражении *Clostridium perfringens* в исследованиях *in vivo*.

Исследование проводили для оценки эффекта штамма DSM32325 *Bacillus subtilis* в отношении частоты возникновения некротического энтерита и балльной оценки поражения от некротического энтерита у цыплят.

Самцов бройлеров Ross 308 распределяли на три группы по 48 птиц на группу:

инфицированный контроль без обработки;

группа инфицированных, обработанных антибиотиком 20 мг амоксициллина/кг массы тела; и

группа инфицированных, получающих обработку *Bacillus subtilis* DSM32325 $1,2 \times 10^6$ КОЕ/г корма.

Всех животных кормили *ad libitum* во время всех фаз и всех животных вакцинировали путем опры-

скивания по прибытии на место исследования (сутки 1) от инфекционного бронхита и от Ньюкаслской болезни. До суток 9 птиц кормили стартерным кормом "Kip 1-3", приобретенным на промышленном комбинате по производству кормов (Cibus, Kaaistraat 49; 8800 Roeselare, Belgium). Количественный состав стартерного корма был одинаковым для всех животных, за исключением включения соответствующего продукта в каждой группе. От суток 9 до суток 26 птицы получали гроуерный корм с высоким содержанием белка и рыбную муку, включенную в количестве 40%. Гроуерный корм "Teler2" приобретали на промышленном комбинате по производству кормов (Cibus, Kaaistraat 49; 8800 Roeselare, Belgium). Состав гроуерного корма для различных групп обработки был в точности одинаковым, за исключением включения соответствующего продукта в каждой группе. Корма получали код группы и затем премикс для обработки смешивали с количеством корма, предназначенного для каждой партии корма.

На сутки 19, 20, 21 и 22, приблизительно 10^9 КОЕ штамма 56 *Clostridium perfringens* (Timbermont et al. 2009) вводили перорально три раза в сутки всем птицам, как описано в Timbermont et al. 2009. Повреждения от некротического энтерита оценивали на сутки 25 и 26 (баллы от 0 до 6) (Johnson & Reid 1970). Частоту NE и баллы NE анализировали с использованием логистической модели и модели линейной регрессии, соответственно. Статистическую значимость оценивали при $P \leq 0,05$.

Результаты.

Доля птиц, положительных по макроскопическим повреждениям от некротического энтерита (степень поражения ≥ 2) в каждые сутки взятия проб, представлена в табл. 9. На каждые сутки строили модель линейной регрессии для анализа различий между группами обработки и IUC (инфицированный необработанный контроль). Дополнительную модель строили по комбинации данных на сутки 25 и сутки 26. По этой модели сутки 25 и 26 и группу добавляли как фиксированный эффект.

Таблица 9

	Сутки 25	Сутки 26	Сутки 25 и 26	
Группа	%NE	%NE	%NE	$P \leq 0,05$
Инфицированный Необработанный контроль	50	23	36,5	Реф.
Амоксициллин	44	14	29	
<i>Bacillus subtilis</i> DSM32325	25	7	16	**

**Отмеченные числа представляют группы обработки, статистически значимо отличающиеся от необработанного контроля IUC ($P \leq 0,05$).

Реф. - референсное значение.

Средние баллы NE по группе и суткам рассчитывали сходным образом.

Таблица 10

	Сутки 25	Сутки 26	Сутки 25 и 26	
Группа	Средний балл	Средний балл	Средний балл	$P \leq 0,05$
Инфицированный необработанный контроль	1,75	1,15	1,450	Реф.
Амоксициллин	1,56	1,07	1,315	
<i>Bacillus subtilis</i> DSM32325	1,25	1,00	1,125	**

**Отмеченные числа представляют группы обработки, статистически значимо отличающиеся от необработанного контроля IUC ($P \leq 0,05$).

Результаты показывают, что *Bacillus subtilis* DSM32325 уменьшал частоту некротического энтерита у цыплят по сравнению с инфицированным необработанным контролем статистически значимым образом при объединении данных за сутки 25 и 26. Неожиданно было обнаружено, что частота некротического энтерита была даже меньше в группе, получавшей обработку *Bacillus*, чем в группе, обработанной амоксициллином (табл. 9).

Далее, *Bacillus subtilis* DSM32325 уменьшал тяжесть некротического энтерита (средний балл) по сравнению с инфицированным необработанным контролем статистически значимым образом при объединении данных за сутки 25 и 26. Неожиданно было обнаружено, что средний балл некротического энтерита был даже ниже в группе, получавшей обработку *Bacillus*, чем в группе, обработанной амоксициллином (табл. 10).

Пример 5.

Эксперимент по продуктивности кормления.

Животные:

Суточных самцов бройлеров Ross 308 распределяли случайным образом по 72-уровневым загонам, каждый из которых содержал по 25 цыплят в каждом загоне, таким образом, что каждую обработку повторяли 12 раз.

Экспериментальные группы представляли собой отрицательный контроль (NC), *Bacillus subtilis* DSM19489, *Bacillus subtilis* DSM32324 и *Bacillus subtilis* DSM32325.

Рацион:

Трехфазную мешанку (сутки 1-14, сутки 15-28 и сутки 29-42), не содержащую каких-либо соединений-антибиотиков, ингибиторов, усилителей продуктивности, других пробиотиков, ферментов или подкислителей, предоставляли *ad libitum*. Основу рациона составляли кукуруза, пшеница, ячмень, рожь и соевая мука.

Таблица 11

Состав композиции основного рациона

ИНГРЕДИЕНТЫ, %	Стартер сутки 0-14	Гроуер сутки 15-28	Финишер сутки 29-42
Кукуруза	19,647	19,574	20,207
Соевая мука 44%СР	30,147	24,190	20,210
Пшеница	15,000	15,000	15,000
Полножирная соя	12,000	15,000	15,000
Ячмень	10,000	10,000	10,000
Рожь	5,000	7,5000	10,000
Соевое масло	4,141	4,833	--
Животный жир (сало)	--	--	5,905
Карбонат кальция	1,139	1,067	1,045
Дигидрофосфат кальция	1,546	0,462	1,286
Соль	0,327	0,302	0,303
Бикарбонат натрия	0,100	0,100	0,100
DL-Метионин	0,295	0,326	0,289
L-Лизин HCl	0,186	0,168	0,176
L-Треонин	0,071	0,077	0,078
Vit&Min Премикс	0,400	0,400	0,400

Тестируемые продукты:

Тестируемые продукты *Bacillus subtilis* DSM19489, *Bacillus subtilis* DSM32324 и *Bacillus subtilis* DSM32325 давали с кормом на протяжении 42 суток эксперимента в дозировке $1,2 \times 10^6$ КОЕ/г корма.

Наблюдения:

Измеряли средний суточный прирост (ADG), массу тела (BW), потребление пищи как среднее суточное потребление пищи (ADF1) и эффективность кормления; коэффициент кормоотдачи (FCR) в возрасте 1, 14, 28, 35 и 42 суток. Общее состояние здоровья, медицинскую обработку и смертность оценивали ежесуточно. Рассчитывали Европейский фактор эффективности производства (EPEF):

$$[(\text{жизнеспособность, \%} \times \text{прирост BW, кг}) / (\text{Продолжительность исследования в сутках} \times \text{FCR})] \times 100.$$

Статистический анализ и интерпретация:

Дисперсионный анализ представлял собой основной используемый статистический метод. Данные анализировали как полностью рандомизированный дизайн по GLM SPSS v. 19.0 с последующим тестом среднего по Таки (Tukey's mean test). $P < 0,05$ рассматривали как статистически значимое различие, в то время как $0,05 < P < 0,10$ рассматривали как тенденцию, близкую к значимой.

Результаты.

Здоровье животных считали нормальным на протяжении исследования и никаких неблагоприятных явлений не было замечено. Произошло 23 смерти/отбраковки (1,27%) в период от 0 до 14 суток, 19 смертей/отбраровок (1,07%) в период от 14 до 28 суток и 16 смертей/отбраровок (0,91%) в период от 28 до 42 суток, и они не имели отношения к обработке. Общий коэффициент смертности/отбраковки 58/1800 птиц (3,22%) на сутки 42 считали нормальным.

Таблица 12

Обработка	Вся фаза откорма, сутки 0-42			
	ADG, г/сутки	ADFI, г/сутки	FCR	EPEF
1 Отрицательный контроль	68,6 ^b	116,2	1,69 ^b	386 ^b
2 DSM19489 (<i>B. subtilis</i>)	70,4 ^{ab}	116,1	1,65 ^a	420 ^a
3 DSM32324 (<i>B. subtilis</i>)	71,9 ^a	116,6	1,62 ^a	424 ^a
5 DSM32325 (<i>B. subtilis</i>)	70,9 ^a	115,9	1,64 ^a	416 ^a
SEM (n=12)	0,53	0,79	0,006	5,3
P (Вероятность)	0,0002	0,7429	< 0,0001	< 0,0001

Продуктивность животных находилась в соответствии с условиями эксперимента (самцов бройлеров кормили мешанкой и выращивали в загонах для напольного содержания). В возрасте 28 суток бройлеры, получавшие DMS32324, были на 3,77% тяжелее, чем контрольные птицы ($P < 0,05$). В возрасте 35 и 42 суток бройлеры, получавшие добавку штаммов *Bacillus* DSM32324 или DSM32325, были значительно тяжелее, чем контрольные животные, при этом группа бройлеров DSM19489 демонстрировала промежуточные массы. Во время стартового периода (возраст от 0 до 14 суток) никаких существенных различий между группами обработки не наблюдали в отношении роста, потребления корма или кормоотдачи. Во время периода приема гроуера (возраст от 15 до 28 суток) цыплята, получавшие DSM32324, росли значительно быстрее, чем контрольные бройлеры. Кормоотдача у всех бройлеров, получавших добавку пробиотиков, была значительно улучшена по сравнению с контрольными животными. Никаких существенных различий между группами обработки не наблюдали в отношении роста, потребления пищи или кормоотдачи на протяжении последней недели эксперимента (возраст от 35 до 42 суток).

Для периода откорма в целом (возраст 0-42 суток), бройлеры, получавшие добавку штаммов *Bacillus* DSM32324 или DSM32325, росли значительно быстрее, чем контрольные животные. Коэффициент кормоотдачи (FCR) и EPEF всех бройлеров, получавших добавку пробиотиков, были значительно улучшены по сравнению с таковыми контрольных животных.

Пример 6.

Эксперимент по продуктивности кормления.

Задача данного исследования заключалась в оценке добавки *Bacillus subtilis* DSM32324 и торгового продукта *Bacillus subtilis* DSM19489 в рационе бройлеров. Задача заключалась в том, чтобы оценить эффект этих продуктов в отношении показателей продуктивности при рационе, основанном на пшенице, включающем кокцидиостатики и кормовые ферменты.

Для каждой обработки брали 1300 суточных цыплят (самцов) ROSS 308, распределенных в 10 загон по 130 цыплят. Цыплят кормили *ad libitum* трехфазным кормом в гранулированной форме на протяжении всех фаз и питьевую воду предоставляли *ad libitum* в капельных поилках. Состав рациона показан в таблице ниже. Корм был предоставлен Mezinárodní testování drůbeže, s.p., комбикормовый завод Lysá nad Labem.

Пробиотические пищевые добавки распределяли следующим образом:

T1: Контрольная группа, без добавок;

T2: *Bacillus subtilis* DSM19489 $1,2 \times 10^6$ КОЕ/г корма;

T3: *Bacillus subtilis* DSM32324 $1,2 \times 10^6$ КОЕ/г корма.

Таблица 13

Состав рациона

Компоненты	Стартерный рацион	Гроуерный рацион	Финишерный рацион
	Сутки 1-13	Сутки 14-28	Сутки 29-42
Пшеница	40,000	51,880	56,450
Кукуруза	19,460	10,000	10,000
Экстр. соевая мука	32,800	29,500	24,600
Соевое масло	4,000	5,000	5,800
L-лизин HCl	0,170	0,220	0,200
DL-метионин	0,060	0,100	0,120

L-треонин	0,060	0,080	0,060
Известняк	1,500	1,500	1,400
Соль	0,250	0,250	0,240
Дигидрофосфат кальция	1,000	0,770	0,500
Бикарбонат натрия	0,200	0,200	0,130
AMV BR1 Plus	0,500	-	-
AMV BR2 Plus	-	0,500	-
AMV BR3 Plus	-	-	0,500

Живую массу измеряли на сутки 1 (всех птиц из каждого загона взвешивали вместе), 13 и 28 (каждую птицу взвешивали индивидуально, без периода голодания) и 42 (каждую птицу взвешивали индивидуально после 12 ч голодания).

Потребление пищи на 1 кг живой массы записывали на загон на сутки 13, 28 и 42 и рассчитывали коэффициент кормоотдачи.

Статистический анализ:

Результаты продуктивности по живой массе на сутки 13, 28 и 42 и смертности статистически оценивали с использованием однофакторной модели ANOVA основного эффекта обработки по критерию Даннетта (все рационы с добавками против контроля без добавок (T1)).

Результаты.

Коэффициент вариации (CV) для кормоотдачи и коэффициента кормоотдачи в среднем составил 2,7%. CV для конечной массы тела и прироста массы тела составил 3,7%, и средняя вариация для обработки в пределах загона по конечному BW (как мера однородности стада) находилась в диапазоне от 10,3 до 15,3%.

Смертность в стаде была низкой (в целом 3,4% для птиц, не получавших добавки) и неожиданно низкой для первых 13 суток.

Таблица 14

Обработка	Смертность за период								
	Сутки 1-13		Сутки 14-28		Сутки 29-42		Сутки 1-42		
	Число птиц	G	Число птиц	g	Число птиц	g	Число птиц	g	%
Без добавок	2	514	18	14421	24	45212	44	60147	3,38
DSM19489	4	1459	10	7074	14	25049	28	33582	2,15
DSM32324	3	1048	14	11295	7	11473	24	23816	1,85

Заключение.

DSM19489 проявлял тенденцию к снижению смертности ($p=0,096$), и *Bacillus subtilis* DSM32324 вызывал заметное и значительное снижение смертности, особенно в заключительный период, что также служило критерием статистической значимости смертности для всего эксперимента.

Пример 7.

Эффект различных штаммов *bacillus* в отношении показателей роста, усвояемости и здоровья кишечника у бройлеров.

Птиц содержали по 15 животных на загон размером 1,2 м на 0,8 м от суток 1 до окончания эксперимента (сутки 42). Пол в каждом загоне был покрыт слоем древесной стружки толщиной примерно 5 см. Одна торговая кормушка-лоток с резервуаром для корма была подвешена внутри загона, и четыре капельные поилки были установлены сбоку от загона.

Птиц кормили субоптимальным рационом с включением ржи в качестве источника некрахмальных белков и без кормовых ферментов. До суток 22 птиц кормили стартерным кормом. От суток 22 до суток 42 птиц кормили гроуерным кормом. Количественный состав корма был одинаковым для всех животных, за исключением включения соответствующего штамма в каждой группе. Подробное описание состава корма приведено в табл. 15. Тестируемые штаммы DSM32324, DSM25840 и DSM32325 смешивали с кормом в соотношении $1,2 \times 10^6$ КОЕ/г корма.

Таблица 15

Состав композиции основного рациона

ИНГРЕДИЕНТЫ, %	Стартер, сутки 0-21	Финишер, сутки 22-42
Кукуруза	41,6	31,6
Соевая мука 47,3%СР	26,0	24,0
Рапсовая мука 32,5СР	4,0	5,0
Рыбная мука 70,0СР	2,0	-
Пшеница	15,0	20,0
Рожь	5,0	10,0
Соевое масло	1,0	1,0
Животный жир (сало)	1,5	5,0
Карбонат кальция	1,359	1,10
Дигидрофосфат кальция	1,2	0,85
Соль	0,18	0,21
Бикарбонат натрия	0,27	0,23
DL-Метионин	0,195	0,195
L-Лизин HCl	0,15	0,21
L-Треонин	0,045	0,065
L-валин	0,015	0,035
Vit&Min Премикс	0,500	0,500

К началу эксперимента (сутки 1) 960 животных помещали в 64 загон (т.е. по 15 животных на загон). Как упомянуто выше, стартерный корм давали всем птицам от суток 1 до суток 22. От суток 22 до суток 42 гроуерный корм давали всем птицам.

На сутки 12, сутки 22 и сутки 42 образцы тканей брали из двенадцатиперстной кишки, тонкой кишки и подвздошной кишки от 1 птицы на загон.

На сутки 1, сутки 12, сутки 22, сутки 33 и сутки 42 птиц и корм взвешивали для анализа эффектов пробиотиков в отношении показателей роста (прирост массы, потребление пищи и кормоотдачу) во время различных периодов.

На сутки 22 и сутки 42, 6 птиц на загон умерщвляли. Содержимое подвздошной кишки и слепой кишки из одного загона объединяли. Дополнительные образцы содержимого подвздошной кишки и слепой кишки замораживали и хранили при -80°C.

На сутки 19-22 и сутки 40-42, 3 образца фекалий на загон собирали ежесуточно. Образцы фекалий из одного загона объединяли.

Показатели здоровья записывали ежесуточно. От суток 1 до окончания исследования на сутки 42 опытный персонал проводил общие наблюдения за состоянием здоровья и записывал их ежесуточно. Если животные проявляли признаки заболевания, общие наблюдения за состоянием здоровья проводили по меньшей мере дважды в сутки. Смертность фиксировали ежесуточно.

Массу тела (BW) измеряли на загон на сутки 1. Массу животных BW измеряли индивидуально на сутки 12, сутки 22, сутки 33 и сутки 42. Суточный прирост массы (DWG) рассчитывали на загон за периоды сутки 1 - сутки 12, сутки 1 - сутки 22 и сутки 1 - сутки 42. Суточный прирост массы (DWG) рассчитывали на животное для периодов сутки 12 - сутки 22, сутки 22 - сутки 33, сутки 33 - сутки 42 и сутки 22 - сутки 42.

Разница в BW между началом и окончанием каждого периода исследования представляла собой прирост массы (WG) для этого периода. Суточный прирост массы (DWG) рассчитывали как WG, деленный на число суток в соответствующем периоде. DWG мертвых животных включали, когда считали среднее DWG для каждой группы, рассматривая дату смерти птицы как окончание периода исследования для этой птицы.

Суточное потребление корма (FC) и коэффициент кормоотдачи (FCR) рассчитывали на уровне загон для периодов сутки 1 - сутки 12, сутки 12 - сутки 22, сутки 1 - сутки 22, сутки 22 - сутки 33, сутки 33 - сутки 42, сутки 22 - сутки 42 и сутки 1 - сутки 42.

Корм, предоставленный животным ("Feed IN"), взвешивали на сутки 1, сутки 12, сутки 22 и сутки 33. Когда на любые следующие сутки в загоне заканчивался корм, и было необходимо обеспечить большее количество корма, добавленный корм также взвешивали и записывали как "Feed IN". Оставшийся корм в каждом загоне ("Feed OUT") взвешивали на сутки 12, сутки 22, сутки 33 и сутки 42. Разницу в массе корма в начале и в конце каждого периода исследования рассчитывали для определения по-

ребления корма (FC) на загон. Разница между массой корма в начале и в конце каждого периода исследования ("Feed IN" - "Feed OUT") представляла собой FC соответствующего загона для этого периода. Среднее суточное FC на птицу рассчитывали как FC, деленное на число суток в соответствующем периоде, умноженное на число животных, которые употребляли корм в течение этого периода в соответствующем загоне.

Содержание сухого вещества, общего белка, общего жира, Ca, P, энергии и диоксида титана определяли в объединенном содержимом подвздошной кишки и слепой кишки, собранном на сутки 22 и сутки 42, и в корме. Оксид титана добавляли в корм (0,3%) в качестве инертного маркера. Наблюдаемую усвояемость в подвздошной кишке рассчитывали, как описано в Waititu et al., 2014.

Образцы анализировали в Department of Animal Sciences, Subdivision Animal Nutrition of Wageningen University под руководством Leon de Jonge. Использовали следующие методики:

Сухое вещество: высушивание в течение 3 ч при 103°C на основании ISO 6496 (1999).

Зола: прогревание в течение 3 ч при 550°C на основании ISO 5984 (2002).

Белок: метод Кьельдаля на основании ISO 5983 (2005).

Жир: Экстракция петролейным эфиром после обработки кислотой на основании ISO 6492 (1999).

Кальций: Абсорбционная спектроскопия на основании ISO 6869 (2000).

Фосфор: Спектрометрическое определение на основании ISO 6869 (2000).

Энергия: метод калориметрической бомбы на основании ISO 9831 (1998).

Титан: спектрометрическое определение на основе расщепления по Кьельдалю с последующим окрашиванием пероксидом и измерением поглощения при 408 нм.

Содержание сухого вещества, общего белка, общего жира, Ca, энергии и диоксида титана определяли в объединенных фекалиях, собранных на сутки 19 - сутки 22 и сутки 40 - сутки 42, и корме. Оксид титана добавляли в корм (0,3%) в качестве инертного маркера. Общее видимое удержание тракта рассчитывали, как описано в Waititu et al., 2014.

Данные анализировали с помощью RStudio (Version 0.99.467, RStudio, Inc.). Все данные, кроме массы тела и суточного прироста массы на уровне птицы, анализировали с использованием моделей линейной регрессии с группой обработки в качестве фиксированного эффекта (процедура "lm" основного пакета). Массу тела и суточный прирост массы на уровне птицы анализировали с использованием моделей линейной смешанной регрессии с группой обработки в качестве фиксированного эффекта и загона в качестве случайного эффекта для введения поправки на кластеризацию птиц в пределах загона (процедура "lme" пакета "nlme") (Отклонение от протокола n°1). Статистическую значимость оценивали при $P \leq 0,05$.

Результаты.

Восемь птиц умерли во время исследования (0,8%).

В табл. 16 показана средняя масса тела по суткам исследования и группе обработки. Различия анализировали по моделям линейной смешанной регрессии с обработкой в качестве безусловного фиксированного эффекта и загона в качестве случайного эффекта для введения поправки на кластеризацию птиц в пределах загонов.

Таблица 16

Средняя масса тела

Название группы	Сутки 12		Сутки 22		Сутки 33		Сутки 42	
	Среднее	P-значение	Среднее	P-значение	Среднее	P-значение	Среднее	P-значение
NC	266	Реф.	687	Реф.	1569	Реф.	2390	Реф.
DSM32324	272	0,220	730	0,010	1613	0,208	2459	0,176
DSM25840	286	<0,001	759	<0,001	1672	0,003	2525	0,009
DSM32325	283	0,001	744	0,001	1632	0,070	2476	0,087

В табл. 17 показана средняя видимая усвояемость в подвздошной кишке (AID) по питательному веществу и группе обработки. Различия анализировали по моделям линейной регрессии с обработкой в качестве безусловного фиксированного эффекта (процедура "lm" основного пакета).

Таблица 17

Средняя видимая усвояемость в подвздошной кишке (AID)

Название группы	Сухое вещество		Зола		Белок		Жир		Ca		Фосфор		Энергия	
	Среднее	P-значение	Среднее	P-значение	Среднее	P-значение	Среднее	P-значение	Среднее	P-значение	Среднее	P-значение	Среднее	P-значение
NC	57,6	Реф.	38,2	Реф.	74,1	Реф.	61,6	Реф.	36,6	Реф.	53,8	Реф.	65,0	Реф.
DSM32324	58,8	0,233	38,7	0,697	76,3	0,050	59,5	0,515	36,3	0,900	53,6	0,879	66,5	0,160
DSM25840	59,5	0,075	40,8	0,039	76,3	0,050	64,0	0,458	33,4	0,190	54,0	0,842	67,2	0,043
DSM32325	57,4	0,862	37,5	0,568	74,6	0,639	63,1	0,640	31,3	0,031	51,0	0,039	65,4	0,677

Закключение.

Задача настоящего исследования заключалась в том, чтобы оценить эффект разных штаммов *Bacillus* в отношении показателей роста и усвояемости у бройлеров.

Протестированные штаммы показали значимые эффекты в отношении продуктивности и видимой усвояемости в подвздошной кишке:

птицы, получавшие добавку DSM32324, демонстрировали более высокие суточный прирост массы (табл. 16), суточное потребление пищи и коэффициент кормоотдачи в стартовый период (данные не показаны) и более высокую усвояемость белка на сутки 42 (табл. 17) по сравнению с птицами, не получавшими добавку;

птицы, получавшие добавку DSM25840, демонстрировали более высокий суточный прирост массы (табл. 16) и суточное потребление пищи в стартовый период (данные не показаны), более высокую массу тела на сутки 42 (табл. 16) и большую усвояемость золы, белка и энергии на сутки 42 (табл. 17) по сравнению с птицами, не получавшими добавку;

птицы, получавшие добавку DSM32325, демонстрировали более высокий суточный прирост массы (табл. 16) и суточное потребление пищи в стартовый период (данные не показаны) и меньшую усвояемость Са и фосфора на сутки 42 (табл. 17) по сравнению с птицами, не получавшими добавку.

В заключение, все три штамма показали неожиданно хорошие и значительно улучшенные результаты.

Пример 8.

Сравнительная эффективность четырех разных пробиотиков, введенных в составе корма для контроля некротического энтерита, вызванного *Clostridium perfringens*, у цыплят-бройлеров.

Задача этого исследования заключалась в том, чтобы оценить эффект DSM32324, DSM25840 и DSM32325, а также композиции из них всех в соотношении 8:3:5, EPB5, в отношении продуктивности бройлеров Cobb 500, зараженных NE, и сравнить эффект каждого штамма с эффектом композиции.

В сутки вылупления цыплят самцов Cobb 500 получали с инкубаторной станции Cobb Vantress, Cleveland, GA. 2250 цыплят были доставлены на исследование. Все птицы были вакцинированы путем опрыскивания вакциной против кокцидий в дозировке, рекомендованной в инструкции для суток вылупления.

Стандартные процедуры для напольного содержания в загонах использовали на протяжении всего эксперимента. Загоны ежедневно проверяли на смертность. Массу птиц (кг) на загон записывали в начале исследования и на сутки обработки (DOT) 21, 35 и 42.

Рацион бройлеров скармливали в виде крошек (стартерный корм) или гранул (гроуер и финишер). Количественный состав корма был одинаковым для всех животных, за исключением включения штаммов *Bacillus* или композиции для групп обработки.

Состав рациона:

Название ингредиента	% (масс./масс.)	Таблица 18		
		стартер	гроуер	финишер
Кукуруза, зерно		58,509	64,054	69,218
Соевая мука, отшелушенная, растворитель		35,550	29,771	24,511
Жир растительный		2,100	2,585	2,748
Гидрофосфат кальция		1,734	1,780	1,693
Карбонат кальция		1,150	0,910	0,873
Соль, (NaCl)		0,386	0,390	0,393

Метионин МНА, L - лизин, микроэлементы, витаминный премикс и L-треонин включали в соответствии с рекомендациями заводчика.

Весь корм рассчитывали на загон. Предоставляли стартерный корм и кормили им от суток обработки 0 до 21. На сутки обработки 21 непотребленный стартер взвешивали и выбрасывали. Предоставляли гроуерный корм и кормили им до суток обработки 35. На сутки обработки 35 непотребленный гроуер взвешивали и выбрасывали. Предоставляли финишный корм и кормили им до суток обработки 42. На сутки обработки 42 непотребленный финишер взвешивали и выбрасывали.

В эксперименте входило 45 загон по 50 цыплят самцов бройлеров на загон в начале исследования. Обработки повторяли в девяти блоках, рандомизировали в пределах блоков по пять загон в каждом.

Таблица 19

Обработка	Описание	Целевой корм (КОЕ/г корма)	<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	Загоны/Trt
T1	Контроль без пробиотика	0	Сутки обработки 19, 20 и 21	9
T2	<i>Bacillus subtilis</i> DSM32324	8 X 10 ⁵	Сутки обработки 19, 20 и 21	9
T3	<i>Bacillus subtilis</i> DSM32325	5 X 10 ⁵	Сутки обработки 19, 20 и 21	9
T4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM25840	3 X 10 ⁵	Сутки обработки 19, 20 и 21	9
T5	EBP5	1,6 X 10 ⁶	Сутки обработки 19, 20 и 21	9

На сутки 19, 20 и 21 птиц во всех загонах заражали бульонной культурой *C. perfringens*. Полевой изолят *C. perfringens*, известный как вызывающий NE, использовали в качестве организма для заражения. Каждые сутки использовали свежий инокулят. Уровни титрования составляли приблизительно 10⁸⁻⁹ КОЕ/загон. Каждый загон получал одинаковое количество инокулята. Инокулят вводили путем смешивания с кормом в основании трубчатых кормушек.

На сутки 21 по пять птиц из каждого загона выбирали, умерщвляли, группу взвешивали и исследовали на степень присутствия повреждений, вызванных некротическим энтеритом. Оценку проводили по шкале от 0 до 3 баллов, где 0 означает норму и 3 означает наиболее тяжелые повреждения. Оценивали следующим образом: 0 - для нормального кишечника, 1 - для небольшого слизистого покрытия и потери тонуса, 2 - для тяжелого некротического энтерита и 3 - для крайне тяжелого некротического энтерита с наличием крови в просвете.

Никакой сопутствующей лекарственной терапии не использовали во время этого исследования. Загон использовали в качестве статистической единицы. Рассчитывали средние значения для живой массы, прироста массы, потребления корма, коэффициента кормоотдачи (FCR), балльной оценки поражения от NE и смертности (общей и от NE). Проводили статистический анализ необработанных данных (ANOVA) с использованием рандомизированного полноблочного плана. Тест Таки HSD ($p \leq 0,05$) использовали для отделения средних, когда величины F ANOVA являются значимыми ($p \leq 0,05$).

Различные индексы в строках показывают уровни значимости при $P < 0,05$.

Результаты.

Таблица 20

Сутки 21 Обработка	Потребление корма	FCR	AWG (кг)
1. Без обработки лекарственным средством	44,70a	1,903a	0,430б
2. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32324	43,48a	1,694в	0,476a
3. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32325	44,92a	1,649в	0,509a
4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM25840	42,32a	1,786б	0,436б
5. EBP5	43,14a	1,646в	0,488a

Таблица 21

Сутки 35 Обработка	Потребление корма	FCR	AWG (кг)
1. Без обработки лекарственным средством	143,17a	1,909a	1,606б
2. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32324	141,29a	1,802б	1,667a
3. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32325	145,73a	1,816б	1,695a
4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM25840	140,13a	1,801б	1,641aб
5. EBP5	142,33a	1,774б	1,689a

Таблица 22

Сутки 42 Обработка	Потребление корма	FCR	AWG (кг)	Процент смертности
1. Без обработки лекарственным средством	199,77a	1,957a	2,237б	4,2a
2. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32324	197,67a	1,873бв	2,291aб	3,1a
3. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32325	203,61a	1,896б	2,322a	2,7a
4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM25840	196,86a	1,898б	2,244б	3,3a
5. EBP5	199,87a	1,841в	2,342a	2,7a

Таблица 23

Обработка	Повреждения от NE	Смертность от NE %
1. Без обработки лекарственным средством		
средством	1,0a	4,2a
2. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32234	0,5в	0,4б
3. <i>Bacillus subtilis</i> DSM32235	0,5в	0,9б
4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM25840	0,7б	1,6б
5. EBP5	0,5в	0,4б

Обсуждение и заключение

Для таких показателей продуктивности как коэффициент кормоотдачи (FCR) и средний прирост массы (AWG), измеренных на сутки 21, сутки 35 и сутки 42, значительное улучшение наблюдали для всех контрольных точек при рассмотрении пробиотических пищевых кормовых добавок из одного штамма и EBP5, в особенности по сравнению с необработанной инфицированной контрольной группой.

Неожиданно, группы, получавшие обработку EBP5, показали существенное улучшение для некоторых показателей продуктивности по сравнению с группами, получавшими обработку одним штаммом *Bacillus*, которые, с другой стороны, показали значимые различия по показателям продуктивности с необработанной лекарственным средством инфицированной контрольной группой.

В отношении субклинического энтерита, индуцированного в эксперименте по заражению *in vivo*, результаты показывают, что как отдельные штаммы *Bacillus subtilis* DSM32234, *Bacillus subtilis* DSM32235 и *Bacillus amyloliquefaciens* DSM25840, так и комбинация EBP5 уменьшали балльную оценку поражения от некротического энтерита у цыплят и значительно уменьшали смертность от некротического энтерита.

Пример 9.

Композиция *bacillus* с тремя штаммами *bacillus* у самцов индюков.

В эксперименте участвовало 300 суточных здоровых самцов индюшат (Kartzfeln Premium), которых распределяли случайным образом по 60 загонам по 5 птиц на загон (10 повторов на каждую группу обработки).

Рацион состоял из необработанного лекарственным средством коммерческого рациона для индюков, имеющего состав ингредиентов как описано в таблице 24 для индюков в возрасте от суток 01 до суток 63 и в табл. 25 для индюков в возрасте от суток 64 до суток 147. Количественный состав корма был одинаковым для всех животных, за исключением включения композиции *Bacillus* для групп обработки.

Композицию *Bacillus* EBP5, содержащую $1,6 \times 10^9$ КОЕ/г DSM32324, $0,6 \times 10^9$ КОЕ/г DSM25840 и $1,0 \times 10^9$ КОЕ/г DSM32325, т.е. в соотношении 8:3:5, смешивали с кормом.

Таблица 24

Ингредиенты композиции в рационах Р1, Р2 и Р3 для индюков

Фаза кормления		Р1 (возраст от суток 01 до суток 14)	Р2 (возраст от суток 15 до суток 35)	Р3 (возраст от суток 36 до суток 63)
Ингредиенты				
Соевая мука (общий белок:49%)	г/кг	470,00	442,80	369,00
Кукуруза	г/кг	352,40	389,40	455,70
Пшеница	г/кг	79,30	79,30	79,30
Соевое масло	г/кг	35,00	35,00	41,00
Дигидрофосфат кальция	г/кг	25,00	17,90	17,90
Известняк	г/кг	20,20	17,80	18,80
Премикс *)	г/кг	12,00	12,00	12,00
Метионин	г/кг	2,50	2,20	2,20
Лизин	г/кг	1,60	1,60	2,10
Известняк	г/кг	2,00;1,90;1,75; 1,50;1,00;0	2,00;1,90;1,75; 1,50;1,00;0	2,00;1,90;1,75; 1,50;1,00;0
EPB5	г/кг	0;0,1;0,25;0,50; 1,00;2,00	0;0,1;0,25;0,50; 1,00;2,00	0;0,1;0,25;0,50; 1,00;2,00

* Содержание на 1 кг Премикса: 600000 МЕ Вит. А (ацетат); 120000 МЕ Вит. D3; 6000 мг Вит. Е (α-токоферола ацетат); 200 мг Вит. К3 (MSB); 250 мг Вит. В1 (мононитрат); 420 мг Вит. В2 (крист. рибофлавин); 300 мг Вит. В6 (пиридоксин-НCl); 1500 мкг Вит. В12; 3000 мг ниацина (ниацинамид); 12500 мкг биотина (промышленный, кормовой); 100 мг фолиевой кислоты (крист., промышленная, кормовая); 1000 мг пантотеновой кислоты (Са d-пантотенат); 60000 мг холина (хлорид); 5000 мг железа (карбонат железа); 5000 мг цинка (сульфат цинка); 6000 мг марганца (оксид марганца); 1000 мг меди (оксид меди); 45 мг йода (иодат кальция); 20 мг селена (селенит натрия); 140 г натрия (NaCl); 55 г магния (сульфат магния); носитель: карбонат кальция (кальций мин. 38%); Monteban G100: 5833 мг.

Таблица 25

Ингредиенты композиции в рационах Р4, Р5 и Р6 для индюков

Фаза кормления		Р4 (возраст от суток 64 до суток 91)	Р5 (возраст от суток 92 до суток 119)	Р6 (возраст от суток 120 до суток 147)
Ингредиенты				
Кукуруза	г/кг	524,60	606,80	658,00
Соевая мука (общий белок:49%)	г/кг	303,00	225,00	173,00
Пшеница	г/кг	79,30	79,30	79,30
Соевое масло	г/кг	37,80	35,00	38,00
Дигидрофосфат кальция	г/кг	19,00	16,00	14,90
Известняк	г/кг	18,70	17,00	15,30
Премикс *	г/кг	12,00	12,00	12,00
L-Лизин	г/кг	2,00	2,80	3,50
DL-Метионин	г/кг	1,60	1,50	1,50
L-Треонин	г/кг		0,50	0,30
L-Триптофан	г/кг		0,10	0,20
Известняк	г/кг	2,00;1,90;1,75; 1,50;1,00;0	2,00;1,90;1,75; 1,50;1,00;0	2,00;1,90;1,75; 1,50;1,00;0
Пробиотик	г/кг	0;0,1;0,25;0,50; 1,00;2,00	0;0,1;0,25;0,50; 1,00;2,00	0;0,1;0,25;0,50; 1,00;2,00

* Содержание на 1 кг Премикса: 600000 МЕ Вит. А (ацетат); 120000 МЕ Вит. D3; 6000 мг Вит. Е (α-токоферола ацетат); 200 мг Вит. К3 (MSB); 250 мг Вит. В1 (мононитрат); 420 мг Вит. В2 (крист. рибофлавин); 300 мг Вит. В6 (пиридоксин-НCl); 1500 мкг Вит. В12; 3000 мг ниацина (ниацинамид); 12500 мкг биотина (промышленный, кормовой); 100 мг фолиевой кислоты (крист., промышленная, кормовая); 1000 мг пантотеновой кислоты (Са d-пантотенат); 60000 мг холина (хлорид); 5000 мг железа (карбонат железа); 5000 мг цинка (сульфат цинка); 6000 мг марганца (оксид марганца); 1000 мг меди (оксид меди); 45 мг йода (иодат кальция); 20 мг селена (селенит натрия); 140 г натрия (NaCl); 55 г магния (сульфат магния); носитель: карбонат кальция (кальций мин. 38%); Monteban G100: 5833 мг

Эффект ЕВР5 в отношении продуктивности самцов индюков
в течение всего периода откорма (Р1-Р6)

В течение всего периода откорма (П 1-6)								
Группы обработки		T1	T2	T3	T4	T5	T6	Р-значения
Всего птиц	n ⁰	50	50	50	50	50	50	
Повторы	n ⁰	10	10	10	10	10	10	
ЕВР5	мг/кг		100	250	500	1000	2000	
	Р 1 - Р 6 (возраст от суток 01 до суток 147)							
Птицы	n ⁰	48	49	48	48	49	49	
Начальная масса тела	г	61,2 ± 1,0	61,2 ± 0,8	61,3 ± 1,0	61,2 ± 1,0	61,3 ± 0,8	61,2 ± 1,0	1,000
Конечная масса тела	г	24169,3 ± 321,6 ^a	24522,9 ± 335,0 ^{ab}	24721,4 ± 252,2 ^{ab}	24917,7 ± 251,2 ^b	25333,3 ± 311,2 ^г	25759,3 ± 282,2 ^г	<0,001
Прирост массы тела	г	24108,1 ± 320,9 ^a	24461,7 ± 334,6 ^{ab}	24660,2 ± 252,0 ^{ab}	24856,5 ± 251,1 ^b	25272,0 ± 310,9 ^г	25698,1 ± 282,4 ^г	<0,001
Прирост массы тела/сутки	г/сутки	164,0 ± 2,2 ^a	166,4 ± 2,3 ^{ab}	167,8 ± 1,7 ^{ab}	169,1 ± 1,7 ^b	171,9 ± 2,1 ^г	174,8 ± 1,9 ^a	<0,001
Потребление пищи	г	51538,2 ± 735,3 ^{ab}	51309,4 ± 408,7 ^{ab}	51294,0 ± 377,0 ^{ab}	50941,6 ± 598,1 ^{ab}	51049,7 ± 404,7 ^a	51737,8 ± 581,9 ^б	0,016
Потребление пищи/сутки	г/сутки	350,6 ± 5,0 ^{ab}	349,0 ± 2,8 ^{ab}	348,9 ± 2,6 ^{ab}	346,5 ± 4,1 ^{ab}	347,3 ± 2,8 ^a	352,0 ± 4,0 ^б	0,016
Кормоотдача		2,138 ± 0,024 ^г	2,098 ± 0,035 ^б	2,080 ± 0,026 ^{ab}	2,050 ± 0,025 ^{ab}	2,020 ± 0,032 ^a	2,013 ± 0,025 ^a	<0,001

^{ab} Различные индексы в строках показывают уровни значимости при P<0,05.

Прирост массы тела.

Начальная масса тела индюшат составляла примерно 61,2 г и была почти одинаковой во всех группах обработки. Общий прирост массы тела на рационе для кормления индюков, не содержащем ЕВР5 (контрольная группа), составлял 24,11 кг; в отношении 147-суточного периода кормления суточный прирост массы тела достигал в среднем 164 г. Общий прирост массы тела показывал значимое улучшение при добавлении ЕВР5 в дозе на уровне 250 или более (250 мг/кг: +2,3%; 500 мг/кг: +3,1%; 1,000 мг/кг: +4,8%; 2000 мг/кг: +6,6%) по сравнению с контролем, в то время как у индюков, которые получали рацион, содержащий ЕВР5 в дозе на уровне 100 мг/кг, никаких значимых изменений обнаружено не было (+1,0%) по сравнению с контролем.

Коэффициент кормоотдачи.

Общий коэффициент кормоотдачи (корм:прирост) индюков, получавших рацион без использования ЕВР5, достигал 2,138, что указывает на превосходный уровень продуктивности и даже превышает контрольные цифры, данные заводчиком (2,540). Благодаря положительному влиянию на прирост массы тела у индюков, получавших рацион, содержащий ЕВР5, повышенные уровни доз были связаны со значительно сниженными общими коэффициентами кормоотдачи (250 мг/кг: 2,080; 500 мг/кг: 2,050; 1000 мг/кг: 2,020; 2000 мг/кг: 2,013) по сравнению с контролем.

Заключение.

Общая смертность (включая выбраковку) составила 2,7%, показывая превосходное состояние здоровья стада.

Данный эксперимент показал значительное улучшение показателей продуктивности у птиц, получавших рацион, содержащий от 250 до 2000 мг/кг мультиштаммового пробиотика ЕВР5 на основе Bacillus. Прирост массы тела к возрасту 147 суток был значительно увеличен посредством ЕВР5 вплоть до 6,6% (2000 мг/кг) по сравнению с контролем.

В кормовых рационах индюков, содержащих мультиштаммовый пробиотик ЕВР5 на основе Bacillus, повышенные уровни доз были связаны со значительно улучшенными по сравнению с контролем общими коэффициентами кормоотдачи, составившими вплоть до 5,8% (2000 мг/кг).

Заслуживает внимания тот факт, что при уровне доз от 250 до 2000 мг/кг усредненное общее содержание сухого вещества в фекалиях было значительно увеличено по сравнению с контролем.

Пример 10.

Комбинация композиции bacillus с тремя штаммами bacillus и живой ослабленной вакциной salmonella у цыплят.

120 суточных цыплят бройлеров Ross x Ross, не разделенных по полу, распределяли по трем различным изолированным помещениям, в каждом из которых содержали 40 цыплят бройлеров на начало исследования. Каждый загон содержал приблизительно 4 дюйма свежей сосновой стружки, одну трубчатую кормушку и одну поилку колокольного типа для предоставления корма и питья ad libitum.

Все птицы были вакцинированы от кокцидий в первые сутки, и не использовали никакую сопутствующую лекарственную терапию. Загоны ежедневно проверяли на смертность.

Композиции стартерного рациона (крошка) и гроуерного рациона (гранулы) от суток 22 до окончания исследования состояли из необработанного лекарственными средствами промышленного корма для

бройлеров. Количественный состав корма был одинаковым для всех животных за исключением включения композиции Bacillus для группы обработки. Композицию Bacillus, содержащую DSM32324, DSM25840 и DSM32325 в соотношении 8:3:5, смешивали с кормом в соотношении $1,6 \times 10^6$ КОЕ/г корма.

AviPro® Megan® Vac 1, живую вакцину Salmonella Typhimurium, произведенную Lohmann Animal Health, Maine, USA, далее называемую "Megan Vac", распыляли крупнокапельной струей на цыплят возрастом 1 сутки для групп обработки T2 и T3 одной дозой на птицу в объеме 0,25 мл на цыпленка.

Таблица 27

Группы обработки (по 40 птиц в каждой группе)

Группа	Megan Vac	Композиция Bacillus в рационе
T1	Нет	Нет
T2	Да	Нет
T3	Да	$1,6 \times 10^6$ КОЕ/грамм корма

На сутки 3 четыре отрезка слепой кишки и четыре селезенки на каждую группу обработки взвешивали и собирали для подтверждения колонизации вакциной. Всем оставшимся птицам перорально вводили дозу (через желудочный зонд) 3×10^7 КОЕ Salmonella Heidelberg (Alali et al., 2013) на сутки 4.

На сутки 40, непосредственно перед забоем, десять птиц на группу обработки брали из каждого отдельного загона, умерщвляли и отрезки слепой кишки извлекали в стерильных условиях. Образцы отрезков слепой кишки тестировали на Salmonella.

Результаты.

Результаты по распространенности Salmonella в образцах отрезков слепой кишки и печени/селезенки, собранных от четырех птиц на сутки 3 (см. табл. 28), подтверждают колонизацию вакциной.

Таблица 28

Распространенность Salmonella в образцах отрезков слепой кишки и печени/селезенки

Тип образца	Обработка	No.	Число положительных (%)
Отросток слепой кишки	T1	4	0
	T2	4	0
	T3	4	0
Печень/селезенка	T1	4	0
	T2	4	3
	T3	4	4

Предполагаемые изоляты Salmonella были подтверждены специфической антисывороткой Poly-O Salmonella (MiraVista, Indianapolis, IN).

Megan Vac в отдельности или с композицией Bacillus имела численно наименьшее количество Salmonella в отростках слепой кишки на сутки 40 по сравнению с необработанными птицами (данные не показаны).

Как следует из табл. 29, FCR птиц, которых кормили Megan Vac плюс композицией Bacillus (T3), был ниже чем у птиц, не получавших обработку (T1), и птиц, получавших только Megan Vac (T2).

Таблица 29

Продуктивность на сутки 40

Обработка	Потребление пищи (кг/загон)	Прирост массы (кг/живая птица)	FCR
T1	95,86	1,86	1,47
T2	110,32	2,16	1,50
T3	106,70	2,15	1,38

Заключение.

Задача заключалась в том, чтобы оценить эффект пробиотика на основе Bacillus на колонизацию живой вакциной Salmonella Typhimurium и последующую способность композиции Bacillus защищать от заражения Salmonella Heidelberg у цыплят-бройлеров.

Образцы на сутки 3 показали, что композиция Bacillus не влияла на изначальную колонизацию вакциной Salmonella.

Также в данном исследовании показано, что может присутствовать аддитивный эффект при совместном действии вакцины и композиции Bacillus.

Литература

WO2013/153159

WO2016/060934

WO2016/118840

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

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

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

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

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

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для предупреждения или контролирования бактериальной колонизации или инфекции в кишечнике домашней птицы, содержащая по меньшей мере один штамм *Bacillus subtilis*, выбранный из группы, состоящей из:

а) штамма *Bacillus subtilis*, депонированного как DSM32324, и

б) штамма *Bacillus subtilis*, депонированного как DSM32325.

2. Композиция по п.1, содержащая штамм *Bacillus subtilis* DSM32324.

3. Композиция по п.1 или 2, содержащая штамм *Bacillus subtilis* DSM32325.

4. Композиция по любому из пп.1-3, содержащая *Bacillus subtilis* DSM32324 и *Bacillus subtilis* DSM32325.

5. Композиция по любому из пп.1-4, где штамм или штаммы *Bacillus* находятся в форме спор.

6. Композиция по любому из пп.1-5, представляющая собой пробиотик, премикс, кормовую добавку для животных или корм для животных.

7. Композиция по любому из пп.1-6, где бактериальная колонизация или инфекция представляет собой бактериальную колонизацию или инфекцию *E. coli* и/или *Clostridium perfringens*.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2