



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0618652-1 A2**

(22) Data de Depósito: 05/10/2006
(43) Data da Publicação: 03/07/2012
(RPI 2165)



(51) *Int.Cl.:*

A61K 35/74
A01N 63/00
A23K 1/16
A23L 1/30
A61P 1/10
A61P 31/04
A61P 43/00
C12N 1/20
C12R 1/07

(54) **Título:** AGENTE DE CONTROLE DE BACTÉRIA PREJUDICIAL, PRODUTO FARMACÊUTICO, ALIMENTO, RAÇÃO, E, MÉTODO PARA CRIAR UM ANIMAL

(30) **Prioridade Unionista:** 18/11/2005 JP 2005-334553, 16/02/2006 JP 2006-039439, 29/03/2006 JP 2006-090766, 05/04/2006 JP 2006-104349

(73) **Titular(es):** IDEMITSU KOSAN CO., LTD.

(72) **Inventor(es):** Masami Mochizuki

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

(86) **Pedido Internacional:** PCT JP2006319957 de 05/10/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/058027 de 24/05/2007

(57) **Resumo:** AGENTE DE CONTROLE DE BACTÉRIA PREJUDICIAL, PRODUTO FARMACÊUTICO, ALIMENTO, RAÇÃO, E, MÉTODO PARA CRIAR UM ANIMAL. Através de inibição da multiplicação de bactérias patogênicas e inativação de fatores bacterianos auto-induzidos, o equilíbrio de flora intestinal é melhorado para com isso promover regulação de funções intestinais animais e possibilitar prevenção/tratamento de doença infecciosa causada por tais bactérias patogênicas. Por conseguinte, um produto farmacêutico contendo *Bacillus thuringiensis* é administrado a animais, e animais são deixados para ingerir alimento ou ração contendo *Bacillus thuringiensis*.

“AGENTE DE CONTROLE DE BACTÉRIA PREJUDICIAL, PRODUTO FARMACÊUTICO, ALIMENTO, RAÇÃO, E, MÉTODO PARA CRIAR UM ANIMAL”

Campo Técnico

5 A presente invenção se refere a um agente de controle de bactéria prejudicial contendo *Bacillus thuringiensis*, e também se refere a um produto farmacêutico, um alimento, e uma ração cada contendo o agente de controle de bactéria prejudicial.

Fundamentos da Técnica

10 Cada uma das floras microbianas em um estômago e um intestino desempenha um papel diverso extremamente importante ao manter funções de um estômago e um trato intestinal e saúde fisiológica de um corpo inteiro. Uma terapia probiótica inclui uso positivo de um microorganismo que é benéfico para saúde. Probióticos vivos atingem um intestino de um
15 hospedeiro, intensificam uma flora microbiológica no intestino, e auxiliam uma atividade digestiva do intestino. Ações e propriedades dos probióticos tal como "ação antagonística bacteriana", "interferência bacteriana", "efeito de barreira", "inibição de colonização", e "exclusão competitiva" melhoram um equilíbrio de uma flora microbiológica em um trato intestinal e inibem
20 multiplicação de uma linhagem prejudicial de microorganismos. Estes probióticos podem não formar constantemente uma colônia em um trato digestivo de um hospedeiro. Assim, os probióticos necessitam ser periodicamente ingeridos para a sustentação de uma ação dos probióticos. Nos anos recentes, uma bactéria de ácido láctico e uma bifidobactéria foram
25 amplamente usadas como probióticos, e estas bactérias foram extensivamente utilizadas em iogurte e outros produtos lácteos. Em adição, uso de bactérias probióticas também está se expandindo em indústrias tal como indústrias agropecuárias e indústrias de animais domésticos, pois as bactérias probióticas auxiliam uma atividade digestiva de um animal, intensificam

bactérias intestinais, e inibem multiplicação de bactérias intestinais prejudiciais, com isso resultando em promoção de crescimento de um animal.

Para uso de bactérias como probióticos, é requerido que bactérias tenham resistência a fluido gástrico, ácido biliar, e os semelhantes, tenham uma capacidade de atingir um intestino vivo, tenham uma capacidade de se multiplicar não apenas em uma seção superior de um intestino delgado tendo uma condição aeróbica mas também em uma seção superior do intestino delgado e um intestino grosso ambos tendo uma condição anaeróbica, tragam uma ação útil para um hospedeiro, tenham uma capacidade de preservar as próprias bactérias em um certo número ou mais em cada forma de um produto farmacêutico e um alimento, sejam seguras para uma administração, etc.

No Fundamento da técnica descrita acima, foram feitos estudos com outras bactérias do que bactérias de ácido láctico e bifidobactérias, que podem ser usados como probióticos. Por exemplo, é relatado que *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, e *Bacillus clausii*, que têm resistência a ácido biliar, são administradas a mamíferos (Documento de Patente 1). Como probióticos para humanos, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. polymyxa*, *B. vietnami*, e *B. polyfermenticus* são usadas (Documento de Não Patente 1). Adicionalmente, bactérias tal como aquelas pertencendo a *Bacillus* (Documento de Patente 2, Documento de Patente 3, e Documento de Não Patente 2) e *LactoBacillus* (Documento de Patente 4), ambas tendo resistência a ácido biliar, são conhecidas.

Por outro lado, também existem problemas de uma doença infecciosa intestinal e uma doença infecciosa infectada a partir de pele lesionada. Patógenos causando estas doenças infecciosas estão sempre tentando encontrar um local de nicho para se estabelecer em um organismo animal. Mesmo no caso onde patógenos invadem o organismo animal, os

patógenos normalmente são removidos por um mecanismo biológico de defesa de um hospedeiro, ou multiplicação dos patógenos normalmente é inibida por outras bactérias. Ao contrário, também existem alguns tipos de bactérias tal como *Helicobacter pylori* e *Pseudomonas aeruginosa*, que se multiplicam até um certo número de bactérias e se estabelecem em um intestino de um animal, com isso causando uma doença crônica a um hospedeiro. Estas bactérias não são detectadas por um mecanismo biológico de defesa do hospedeiro durante os processos iniciais de multiplicação tal como adesão à pele, adesão à mucosa, e invasão em um intestino. Depois que densidade bacteriana suficiente é atingida, as bactérias produzem vários fatores patogênicos de uma vez para destruir tecidos do hospedeiro. Um mecanismo das ações descritas acima é um mecanismo de sinalização célula a célula através de um fator auto-induzido produzido por cada uma das próprias bactérias, em outras palavras um mecanismo bacteriano auto-induzido (mecanismo bacteriano sensor de quorum). O mecanismo foi encontrado em uma descoberta de um fenômeno no qual uma substância fluorescente é produzida dependendo de multiplicação de bactérias em uma cultura de bactérias pertencendo a *Vibrio fischeri* (Documento de Não Patente 3). Depois, o mecanismo foi encontrado em muitos patógenos incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. A descoberta do mecanismo evidenciou o fato de que uma expressão de um fator patogênico é controlada pelo mecanismo. Em adição, é relatado que muitas outras bactérias clinicamente importantes do que aquelas pertencendo a *Pseudomonas* tal como aquelas pertencendo a *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Vibrio*, *Serratia*, e *Salmonella* têm o mecanismo auto-induzido (Documento de Não Patente 4).

Transmissão de sinal do mecanismo bacteriano auto-induzido é realizada por um fator bacteriano auto-induzido. Como um fator bacteriano auto-induzido de bactérias gram-negativas, acil homoserina lactona é extensivamente conservada. O fator bacteriano auto-induzido é uma molécula

que pode passar livremente pela membrana bacteriana externa. Uma concentração dos fatores auto-indutores é baixa no caso onde densidade bacteriana em um ambiente é baixa, então nenhuma atividade biológica é exibida. Por outro lado, com o aumento de densidade bacteriana em um ambiente por multiplicação de bactérias, a concentração dos fatores auto-indutores é aumentada tanto em bactérias de dentro como de fora. Quando a concentração atinge um certo valor de limiar, os fatores bacterianos auto-induzidos estimulam uma expressão de um gene alvo para vários fatores patogênicos e os semelhantes.

10 Como um método para prevenção ou tratamento de doenças infecciosas causadas por estes patógenos, o seguinte método é relatado (Documento de Patente 5). Uma proteína de inativação de fator bacteriano auto-induzido é administrada oralmente a um animal. Alternativamente, uma seqüência de ácidos nucleicos codificando a proteína de inativação de fator bacteriano auto-induzido é introduzida em células animais para expressar a seqüência de ácidos nucleicos. A proteína de inativação de fator bacteriano auto-induzido inativa o fator bacteriano auto-induzido dos patógenos, através do que a produção do fator patogênico é inibida. Entretanto, o método de administrar oralmente a proteína de inativação de fator bacteriano auto-induzido tem um problema de que a proteína é digerida e decomposta no processo de passar através de um estômago, com isso não atingindo um trato intestinal. Adicionalmente, é difícil conseguir introdução de seqüência de ácidos nucleicos nos humanos e em animais não humanos crescidos.

25 Em adição, existem problemas em *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, e *Streptococcus suis*. Por exemplo, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* são patógenos causando intoxicação alimentar a um humano ou causando diarreia a aves e gado. *Bacillus cereus* é um patógeno causando intoxicação alimentar a um humano. *Streptococcus suis* é um patógeno causando um sintoma nervoso a um

humano ou causando diarreia e um sintoma nervoso a aves e gado. Estas bactérias são patógenos pertencendo a uma bactéria gram-positiva. Contrarrecursos para as doenças infecciosas causadas por estes patógenos são requisitados.

5 Como bactérias tendo propriedade antagonística para bactérias gram-positivas, bifidobactéria efetiva para tratamento de diarreia relacionada a *Clostridium difficile* (Documento de Patente 6), e *B. subtilis* tendo uma ação antibacteriana para bactérias prejudiciais cada pertencendo a *Staphylococcus* ou *Clostridium* (Documento de Patente 7) é relatado. Entretanto, estas
10 bactérias não trabalham suficientemente para prevenir ou tratar as doenças infecciosas descritas acima. Nas circunstâncias do Fundamento da Técnica mencionada acima, novas espécies de bactéria têm sido procuradas como probióticos, que são excelentes em uma capacidade de multiplicação em um trato digestivo e efetivas para prevenção e tratamento de uma ampla variedade
15 de doenças infecciosas causadas por patógenos pertencendo a uma bactéria gram-positiva.

 É relatado que *Bacillus thuringiensis* inibe patogenicidade dependente de sensor de quorum de *Erwinia carotovora* que é um patógeno para uma planta (Documento de Não Patente 5). Especificamente, é relatado
20 que *Bacillus thuringiensis* produz AHL-lactonase que é uma enzima para decompor um fator de sinal de sensor de quorum bacteriano (acil homoserina lactona (AHL)) para inibir acumulação de AHL em um ambiente. Tal *Bacillus thuringiensis* é amplamente utilizada em uma produção agrícola como um pesticida de microorganismo seguro, mas administração deste a animais
25 incluindo um humano não foi investigada. Em adição, é relatado que uma proteína cristalina produzida por *Bacillus thuringiensis* tem uma atividade pesticida contra um nematódeo, um trematódeo, e um protozoário que parasita em um hospedeiro vegetal ou um hospedeiro animal (Documento de Patente 8 e Documento de Patente 9). Entretanto, estes documentos descrevem apenas

que *Bacillus thuringiensis* tem propriedade pesticida para o nematódeo e os semelhantes separada de um intestino de animal, e não confirmam o efeito e segurança de administração oral atual de *Bacillus thuringiensis* para animais incluindo um humano.

5 Isto é, nenhuma investigação foi feita até agora se aquelas doenças infecciosas causadas por patógenos são prevenidas ou tratadas usando um produto farmacêutico contendo *Bacillus thuringiensis*, e se a ingestão humana de um alimento contendo *Bacillus thuringiensis* ou ingestão por animais de uma ração contendo *Bacillus thuringiensis* inibe multiplicação
10 de bactérias prejudiciais que vivem em um trato intestinal e melhora um equilíbrio de uma flora intestinal para prevenir ou tratar as doenças infecciosas.

[Documento de Patente 1] Patente Japonesa 2005-507670 A

[Documento de Patente 2] Patente Japonesa 05-268944 A

15 [Documento de Patente 3] WO 96/024659

[Documento de Patente 4] Patente Japonesa 2004-523241 A

[Documento de Patente 5] Patente Japonesa 2003-504028 A

[Documento de Patente 6] Patente Japonesa 2005-508617 A

[Documento de Patente 7] Patente Japonesa 11-285378 A

20 [Documento de Patente 8] Patente Japonesa 2002-34582 A

[Documento de Patente 9] Patente Norte-Americana 5.468.483

[Documento de Não Patente 1] Senesi, S., *Bacillus* Spores as Probiotic Products for Human Use, Bacterial spore formers, 2004, pp. 131-141, Rica, E., Henriques, A.O., and Cutting, S.M.(eds), Horizon Bioscience,
25 Wymondham Norfolk NR18 OJA U.K.

[Documento de Não Patente 2] Hyronimus, B. et al., International Journal of Food Microbiology, 2000, 61, pp. 193-197

[Documento de Não Patente 3] Kaplan, H. et al. □ Journal of Bacteriology, 1985, 163, pp. 1210-1214

[Documento de Não Patente 4] Tateda,K., The Lung Perspectives, 2005, 13, pp. 261-265

[Documento de Não Patente 5] Yi-Hu Dong et al., Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70, pp. 954-960

5 **Descrição da invenção**

É um objetivo da presente invenção fornecer meios para melhorar um equilíbrio de uma flora intestinal, promover uma função intestinal, e prevenir e tratar uma doença infecciosa inibindo multiplicação de uma bactéria prejudicial, os meios sendo capazes de serem usados para um animal incluindo um humano seguramente e simplesmente. Especificamente, um objetivo da presente invenção é fornecer um produto farmacêutico para prevenção e tratamento de uma doença infecciosa causada por um patógeno por administração deste a um humano, aves, gado, e os semelhantes. Outro objetivo da presente invenção é fornecer um alimento e uma ração para inibir multiplicação de uma bactéria prejudicial para melhorar um equilíbrio de uma flora intestinal e para com isso prevenir e tratar uma doença infecciosa por ingestão regular do alimento ou ração.

Para atingir os objetivos mencionados acima, os requerentes da presente invenção procuraram uma espécie bacteriana capaz de controlar uma bactéria prejudicial e estudaram efetividade da espécie bacteriana e segurança desta para um animal. Como um resultado, os requerentes encontraram que *Bacillus thuringiensis* tinha uma capacidade de inibir multiplicação de uma bactéria prejudicial e propriedade útil como probiótico.

Assim, os requerentes encontraram os seguintes fatos: um esporo de uma bactéria pertencendo a *Bacillus thuringiensis* é administrado oralmente; o esporo bacteriano passa através de um estômago ativo, e então germina e se multiplica em um intestino sem ser morto por um ácido biliar; e as bactérias multiplicadas inibem multiplicação de um patógeno para melhorar um equilíbrio de uma flora intestinal e para prevenir e tratar uma

doença infecciosa em um intestino.

Isto, a presente invenção é como segue.

(1) um agente de controle de bactéria prejudicial, compreendendo *Bacillus thuringiensis*;

5 (2) um agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com o item (1), no qual a *Bacillus thuringiensis* tem uma resistência a ácido biliar;

(3) um agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com o item (1) ou (2), no qual a *Bacillus thuringiensis* tem uma capacidade de
10 inativação de fator bacteriano auto-induzido;

(4) um agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com qualquer um dos itens (1) a (3), no qual a *Bacillus thuringiensis* é uma linhagem BGSC 4A3 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*, uma
linhagem BGSC 4D1 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, uma linhagem
15 BGSC 4J4 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, uma linhagem BGSC 4Q7 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, ou variantes destas;

(5) um agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com qualquer um dos itens (1) a (4), no qual a bactéria prejudicial é um patógeno causando uma doença infecciosa;

20 (6) um agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com o item (5), no qual o patógeno é um patógeno pertencendo a uma bactéria gram-negativa;

(7) um agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com o item (6), no qual o patógeno pertencendo a uma bactéria gram-negativa
25 inclui pelo menos qualquer uma das bactérias pertencendo ao gênero *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibro*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, e *Shigella*;

(8) um agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com o item (5), no qual o patógeno é um patógeno pertencendo a uma

bactéria gram-positiva;

(9) um agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com o item (8), no qual o patógeno pertencendo a uma bactéria gram-positiva inclui pelo menos qualquer uma das bactérias pertencendo ao gênero
5 *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, e *Listeria*;

(10) um produto farmacêutico compreendendo o agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com qualquer um dos itens (1) a (9);

(11) um produto farmacêutico de acordo com o item (10), no qual o produto farmacêutico é para prevenir ou tratar uma doença infecciosa causada por um patógeno;

(12) um produto farmacêutico de acordo com o item (10) ou (11), no qual o produto farmacêutico é para humano;

(13) um produto farmacêutico de acordo com o item (10) ou
15 (11), no qual o produto farmacêutico é para um animal não humano;

(14) um alimento compreendendo o agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com qualquer um dos itens (1) a (9);

(15) uma ração compreendendo o agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com qualquer um dos itens (1) a (9);

(16) uma ração de acordo com o item (15), na qual a ração é
20 para prevenir ou tratar uma doença infecciosa intestinal de um animal; e

(17) um método de criar um animal compreendendo a etapa de introduzir a ração de acordo com o item (15) ou (16) para um animal.

Em adição, a presente invenção fornece o uso de *Bacillus thuringiensis* em uma produção do agente de controle de bactéria prejudicial e um método de controlar bactéria prejudicial compreendendo administrar a *Bacillus thuringiensis* a um animal requerendo o controle de bactérias prejudiciais. Uma forma de realização preferível do uso e método é a mesma que no caso do agente de controle de bactéria prejudicial.

Melhor Modo para Realizar a Invenção

O agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção é caracterizado incluindo *Bacillus thuringiensis*. Na presente invenção, a bactéria prejudicial é referida como fungos e bactérias afetando adversamente animais proliferando dentro de um órgão digestivo tal como um intestino do animal. Por exemplo, bactérias que causam dispepsia, diarreia, perda de fezes, constipação, ou os semelhantes proliferando dentro do intestino, e patógenos que causam uma doença infecciosa intestinal produzindo fatores patogênicos dentro do intestino são exemplificados. A inibição da proliferação bacteriana prejudicial corresponde a inibir a colonização e a proliferação de bactérias prejudiciais em organismos animais. A proliferação é inibida, por exemplo, por um antagonismo, uma interferência bacteriana, ou um efeito de barreira com uma bactéria *Bacillus thuringiensis*, ou pela inibição da colonização para uma célula de trato intestinal ou eliminação competitiva de bactérias prejudiciais com uma bactéria *Bacillus thuringiensis*.

A *Bacillus thuringiensis* usada no agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção é uma bactéria classificada em “*Bacillus thuringiensis*” em Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition (1994).

As subespécies da *Bacillus thuringiensis* usadas no agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção não são particularmente limitadas. Por exemplo, *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, e *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* são preferivelmente usadas. Destas, linhagem BGSC 4A3 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*, linhagem BGSC 4D1 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, linhagem BGSC 4J4 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, linhagem BGSC 4Q7 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, e as semelhantes são preferivelmente usadas.

BGSC 4A3, BGSC 4D1, BGSC 4J4, e BGSC 4Q7 são linhagens registradas em *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC) (The Department of Biochemist).

Em adição, os mutantes de BGSC 4A3, BGSC 4D1, BGSC 4J4, e BGSC 4Q7 podem ser usados no agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção. Os mutantes a serem usados podem ser um em que cada linhagem acima experimentou uma mutação natural ou um obtido mutando cada linhagem com um agente de mutação química, raios UV, ou os semelhantes. Destes mutantes, preferivelmente usado é um mutante tendo pelo menos uma das propriedades selecionadas a partir de uma resistência a ácido biliar, uma inativação de fator bacteriano auto-induzido, uma atividade de desinfecção, uma propriedade anaerobicamente facultativa, e uma resistência a ácido, que são as mesmas que em cada linhagem. Estas características microbiológicas serão descritas depois. Adicionalmente, um mutante tendo as mesmas características microbiológicas que cada linhagem em adição às características microbiológicas acima também é preferivelmente usado. Em adição, respectivos mutantes das linhagens acima exibindo a mesma capacidade de controle para bactérias prejudiciais que cada linhagem também são preferivelmente usados.

É preferível que a *Bacillus thuringiensis* usada no agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção tenha uma resistência a ácido biliar.

A frase “tem uma resistência a ácido biliar” corresponde a formar um esporo tendo uma capacidade de germinar e proliferar em um meio contendo um ácido biliar em alta concentração.

O ácido biliar é referido como um esteróide contendo estrutura de quarto anéis, que é amplamente encontrado na bile de mamíferos, aves, répteis, anfíbios, e peixes. Exemplos do ácido biliar incluem ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, e ácido ursodesoxicólico. Em organismos animais, o ácido biliar geralmente está

presente como conjugando uma ligação a glicina ou taurina com uma ligação amida em bile para formar um sal de sódio desta. No relatório da presente invenção, em um caso de indicar simplesmente “ácido biliar”, o ácido biliar inclui o ácido biliar mencionado acima, sais destes, e conjugados um destes.

5 Como o meio contendo um ácido biliar em alta concentração, é exemplificado um meio que contém um pó de bile (Oxgall, fabricado por Difco Laboratories) obtido condensando e secando uma bile fresca por 10 vezes e tem uma concentração de pó de bile de 0,3% em massa ou mais, preferivelmente 1% em massa ou mais, e mais preferivelmente 3% em massa
10 ou mais. Em adição, a frase “têm uma capacidade de germinar e proliferar” corresponde a um caso onde bactérias germinam e recomeçam proliferação e divisão para formar colônias quando os esporos são inoculados no meio contendo um ácido biliar em alta concentração como descrito acima e condições exceto para a concentração de ácido biliar são ajustadas para umas
15 adequadas para a cultura de *Bacillus thuringiensis*.

 Uma *Bacillus thuringiensis* tendo uma resistência a ácido biliar pode ser obtida como segue. Um espécime isolado contendo *Bacillus thuringiensis* é cultivado em uma condição adequada para que uma formação de esporo forme um esporo. O esporo assim obtido é inoculado ao meio
20 adicionado com ácido biliar em alta concentração, e cultivado, através do que colônias formadas são isoladas. Destas colônias, uma colônia tendo características micológicas de *Bacillus thuringiensis* é selecionada.

 A *Bacillus thuringiensis* usada no agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção preferivelmente tem uma capacidade
25 de inativação de fator bacteriano auto-induzido. “Fator bacteriano auto-induzido” é uma molécula sinal desempenhando um papel de uma transmissão intercelular em um mecanismo bacteriano auto-induzido. A molécula sinal promove uma expressão de um gene produzindo uma substância específica quando as bactérias são proliferadas. Como o fator

bacteriano auto-induzido, são exemplificados N-butanoil-L-homoserina lactona (BHL), N-(3-hidroxi-butanoil)-L-homoserina lactona (HBHL), N-(3-oxobutanoil)-L-homoserina lactona (OBHL), N-hexanoil-L-homoserina lactona (HHL), N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL), N-octanoil-L-homoserina lactona (OHL), N-(3-oxooctanoil)-L-homoserina lactona(OOHL), N-(3-oxodecanoil)-L-homoserina lactona (ODHL), e N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL). A frase “têm uma capacidade de inativação de fator bacteriano auto-induzido” corresponde a, por exemplo, ter uma capacidade de produzir uma enzima degradando um fator bacteriano auto-induzido. A frase “produzir uma enzima” corresponde a produzir uma enzima até um ponto em que uma atividade enzimática pode ser detectada no meio quando células bacterianas são cultivadas.

Em adição, a frase “ter uma capacidade de inativação de fator bacteriano auto-induzido” corresponde a inibir a produção de uma substância específica tal como um fator patogênico induzido por um fator bacteriano auto-induzido.

A inativação de fator bacteriano auto-induzido de *Bacillus thuringiensis* é confirmada, por exemplo, pelo seguinte método envolvendo: cultivar *Bacillus thuringiensis* como uma amostra em uma solução de cultura contendo um fator bacteriano auto-induzido; adicionar a solução de cultura a um meio ao qual uma bactéria tendo um mecanismo bacteriano auto-induzido é inoculada; cultivar a bactéria por um período pré-determinado; e confirmar com um marcador apropriado se a bactéria tendo um mecanismo bacteriano auto-induzido produz ou não uma substância específica por uma influência do fator bacteriano auto-induzido. Em um caso onde uma substância específica é detectada, é entendido que um fator bacteriano auto-induzido não está inativado, enquanto que em um caso onde nenhuma substância específica é detectada, é entendido que o fator bacteriano auto-induzido está inativado e um mecanismo bacteriano auto-induzido não está induzido. Como a bactéria

tendo um mecanismo bacteriano auto-induzido, por exemplo, uma espécie bacteriana que produz um pigmento quando uma quantidade de fator bacteriano auto-induzido atinge uma concentração pré-determinada pode ser usada. Existe, por exemplo, um método envolvendo: cultivar *Bacillus* 5 *thuringiensis* como uma amostra em uma solução de cultura contendo OHHL por um período pré-determinado; adicionar a solução de cultura a um meio onde uma linhagem com gene biossintético deletado de fator bacteriano auto-induzido de *Chromobacterium violaceum* sintetizando um pigmento violeta (violaceína) pelo mecanismo bacteriano auto-induzido cresce; e testar se uma 10 indução de violaceína é atingida ou não (McClellan, K. et al, Microbiology, 1997, 143, pp. 3073-3711).

Adicionalmente, a *Bacillus thuringiensis* usada no agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção é preferivelmente uma anaeróbica facultativa que pode se proliferar em uma condição anaeróbica. A 15 condição anaeróbica significa a condição com uma concentração de oxigênio igual a ou menor do que aquela no gás contido em intestinos animais. Em um laboratório, a condição anaeróbica significa a condição com um potencial de oxidação-redução de -10 mV ou menos, preferivelmente -50 mV ou menos quando medido a 20°C . O potencial de oxidação-redução pode ser medido 20 com um eletrômetro de oxidação-redução geralmente usado disponível no mercado. O trato digestivo do humano está em uma condição microaeróbica ou anaeróbica, de forma que a bactéria pode se proliferar satisfatoriamente mesmo na condição de trato intestinal.

A *Bacillus thuringiensis* usada no agente de controle de 25 bactéria prejudicial da presente invenção preferivelmente também tem uma resistência a ácido. Usando uma tal bactéria, mesmo dentro do estômago, a bactéria atinge o intestino sem morrer. A frase “ter uma resistência a ácido” corresponde a um caso onde a bactéria é administrada a um animal e atinge o intestino sem morrer em uma condição de interior de estômago (em um estado

de consumo alimentar, normalmente, com um pH de 3,5 a 6) e diversas células bacterianas são mantidas até um ponto em que a bactéria pode se proliferar se a bactéria atinge o intestino. O esporo de *Bacillus thuringiensis* geralmente tem uma resistência a ácido, de forma que não existe problema em um caso de usar o esporo.

O fato de que bactéria *Bacillus thuringiensis* atinge o intestino sem morrer dentro do estômago é confirmado, por exemplo, medindo uma concentração de células bacterianas em fezes.

O método de cultivar *Bacillus thuringiensis* usada no agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção não é particularmente limitado, e a *Bacillus thuringiensis* pode ser cultivada por um método convencional em uma condição apropriada de acordo com características bacterianas. Por exemplo, a bactéria pode ser cultivada em uma temperatura de cultura de 15 a 45°C, preferivelmente a 20 a 42°C, e mais preferivelmente 25 a 38°C. Em adição, como o método de cultura, um método de cultura líquida ou um método de cultura sólida por uma cultura estática, cultura de agitação alternante, uma cultura de agitação rotatória, ou uma cultura de fermentador em jarra pode ser usado.

O componente de meio a ser usado na cultura não é limitado. Como uma fonte de carbono, podem ser usados sacarídeos tal como glicose, galactose, lactose, arabinose, manose, sucrose, amido, hidrolisado de amido, e melão, ácidos orgânicos tal como ácido cítrico, e álcoois tal como glicerina. Como uma fonte de nitrogênio, podem ser usados sais de amônio e nitratos tal como amônia, sulfato de amônio, cloreto de amônio, e nitrato de amônio. Em adição, sais inorgânicos tal como cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, nitrato de cálcio, cloreto de manganês, e sulfato ferroso, e peptona, uma farinha de soja, uma torta de soja desengordurada, extrato de carne, e extrato de levedura podem ser usados.

A *Bacillus thuringiensis* usada no agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção preferivelmente está em uma forma de esporo em termos de estabilidade de armazenamento e resistência a ácido. A *Bacillus thuringiensis* na forma de esporo tem grande resistência a calor e secagem, de forma que ela pode ser seca satisfatoriamente quando produtos farmacêuticos, alimentos, ou rações são produzidos, com um resultado de que a estabilidade de armazenamento é estimulada. A fim de fazer a bactéria formar o esporo, as condições de cultura tal como composição de meio, pH de meio, temperatura de cultura, umidade de cultura, e concentração de oxigênio durante a cultura podem ser ajustadas para uma condição para formação de esporo em um período de cultura. Como um método de cultura para a formação de esporo, por exemplo, existe um método descrito em Schaeffer, P., J. Millet, J.P. Aubert, Proceedings of the National Academy of Science, US, 1965, 54, pp. 704 to 711.

A cultura ou células bacterianas assim obtidas pelo método acima preferivelmente é formada em polvilhos secos em termos de propriedade de armazenamento. É preferido secar estes de forma que o teor de água do agente de controle de bactéria prejudicial se torne 20% em massa ou menos.

O método a seco não é particularmente limitado, e são dadas uma secagem natural, uma secagem com ar forçado, uma secagem por pulverizador, uma liofilização, e as semelhantes. Destas, uma secagem por pulverizador e uma secagem com ar forçado são preferivelmente usadas. Um agente protetor tal como leite desnatado, glutamato de sódio, e sacarídeos podem ser usados em um momento de secagem. Como sacarídeos, glicose e trealose podem ser usadas. Adicionalmente, depois de secagem, é preferido colocar o produto seco em um saco de alumínio com barreira de gás com um desoxidante e um agente desidratante adicionados, vedar o saco, e preservá-lo em uma temperatura ambiente a uma temperatura inferior. Com o método,

uma bactéria viva pode ser preservada por um longo tempo.

O agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção preferivelmente é usado para particularmente controlar um patógeno causando uma doença infecciosa entre as bactérias prejudiciais. Exemplos do patógeno incluem patógenos que pertencem a bactérias gram-negativas causando uma doença infecciosa intestinal, tal como bactérias pertencendo a gênero *Vibrio*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, ou *Aeromonas*, *Escherichia coli*, e *Shigella*. Exemplos das bactérias pertencendo a gênero *Vibrio* incluem *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*. Exemplos das bactérias pertencendo a gênero *Salmonella* incluem *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. typhisuis*, *S. choleraesuis*, *S. derby*, e *S. dublin*. Exemplos das bactérias pertencendo a gênero *Campylobacter* incluem *C. jejuni*, *C. coli*, e *C. fetus*. Exemplos das bactérias pertencendo a gênero *Yersinia* incluem *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Exemplos das bactérias pertencendo a gênero *Aeromonas* incluem *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. jandaei*, e *A. schubertii*. Exemplos de *Escherichia coli* incluem *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produzindo toxina Shiga (STEC), e *E. coli* enteroagregadora (EAEC). Exemplos de *Shigella* incluem *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, e *S. sonnei*.

Em adição, como um patógeno proliferando na pele, cutícula, mucosa, ou os semelhantes e causando uma doença infecciosa, existem dadas bactérias pertencendo a gênero *Pseudomonas*. Um exemplo das bactérias inclui *P. aeruginosa*.

Em adição, o agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção preferivelmente é usado para patógenos pertencendo a uma bactéria gram-positiva. Exemplos dos patógenos incluem bactérias pertencendo a gênero *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, gênero *Streptococcus*, e gênero *Listeria*. Exemplos de bactérias pertencendo a gênero

Clostridium incluem *C. perfringens*, *C. difficile*, e *C. botulinum*. Um Exemplo de bactérias pertencendo a gênero *Bacillus* inclui *B. cereus*. Um exemplo de bactérias pertencendo a gênero *Staphylococcus* inclui *S. aureus*. Exemplos de bactérias pertencendo a gênero *Streptococcus* incluem *S. suis* e *S. pyogenes*.

5 O agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção pode ser usado como um produto farmacêutico para controlar uma bactéria prejudicial adicionando, como requerido, componentes apropriados tal como um carreador e um agente de diluição geralmente usados em produtos farmacêuticos e formar o agente de controle de bactéria prejudicial
10 em uma formulação. O produto farmacêutico da presente invenção é particularmente preferivelmente usado para prevenir e tratar uma doença infecciosa causada por patógenos. Uma forma de dosagem do produto farmacêutico pode ser selecionada como requerido de acordo com um sítio onde o produto farmacêutico é administrado, uma doença a ser direcionada para prevenção e tratamento, e os semelhantes. A seguir, uso específico e
15 forma de dosagem do produto farmacêutico serão descritos.

O produto farmacêutico da presente invenção pode ser usado como um regulador intestinal para melhorar o equilíbrio de flora intestinal ou usado para prevenir e tratar uma doença infecciosa intestinal causada por
20 patógenos. Neste caso, exemplos da forma de dosagem do produto farmacêutico incluem formulações sólidas tal como um comprimido, um grânulo, um pó, e uma cápsula, um pó solúvel em água, e xarope cada para uma administração oral, e uma injeção, supositório, e agente de absorção percutânea cada para uma administração parenteral. Em adição, o produto
25 farmacêutico pode ser formado em um pó solúvel em água para administração por enema para uma limpeza colônica. Neste caso, o pó solúvel em água pode ser produzido misturando *Bacillus thuringiensis* e uma salina fisiológica.

Em adição, o produto farmacêutico da presente invenção pode ser usado para inibir a proliferação da bactéria prejudicial na pele ou mucosa

e prevenir e tratar doenças infecciosas da pele ou mucosa.

Para ser específico, o produto farmacêutico da presente invenção pode ser usado para inibir uma proliferação de bactérias de cavidade, com isso prevenindo cáries dentais, doenças periodontais tal como gengivite, e halitose. Neste caso, exemplos da forma de dosagem do produto farmacêutico preferivelmente incluem um comprimido capaz de ser mastigado, uma pasta de dente, um anti-séptico bucal, e uma pastilha de cavidade.

Em adição, o produto farmacêutico da presente invenção também pode ser usado para controlar patógenos na pele ou na cutícula e particularmente preferivelmente usados para promover cura de uma lesão dérmica. Neste caso, exemplos da forma de dosagem do produto farmacêutico incluem uma pomada, um creme, um líquido pulverizável, uma loção, um gel, e um esparadrapo.

Em adição, o produto farmacêutico da presente invenção pode ser usado para melhorar uma flora intravaginal ou prevenir e tratar uma infecção intravaginal de patógenos. Melhorando a flora intravaginal, é esperado prevenir uma infecção por levedura na vagina e uma doença bacteriana vaginal. Neste caso, exemplos da forma de dosagem do produto farmacêutico incluem um creme, uma loção, e um gel.

O produto farmacêutico da presente invenção também pode ser usado para uma inflamação de olhos, cavidade nasal, e orelhas, e os semelhantes. A forma de dosagem neste caso também pode ser selecionada como requerido.

Em adição, o produto farmacêutico da presente invenção pode incluir adicionalmente outro componente tendo uma função de inibir uma proliferação de uma bactéria prejudicial em adição a *Bacillus thuringiensis*. O componente não é particularmente limitado contanto que o componente não leve a morte de *Bacillus thuringiensis* e a segurança para animais tenha sido

confirmada.

A concentração de célula bacteriana de *Bacillus thuringiensis* usada no produto farmacêutico da presente invenção pode ser ajustada para uma concentração adequada para administrar uma quantidade efetiva de *Bacillus thuringiensis* de acordo com o uso pretendido e forma de dosagem do produto farmacêutico. Em geral, a concentração pode ser ajustada para um intervalo de 1×10^4 a 1×10^{12} CFU/g, preferivelmente 1×10^5 a 1×10^{11} CFU/g, e mais preferivelmente 1×10^6 a 1×10^{10} CFU/g.

O produto farmacêutico da presente invenção pode ser administrado para o humano e animais não humanos. A administração pode ser realizada com um método apropriado a fim de administrar uma quantidade efetiva de *Bacillus thuringiensis* de acordo com a forma de dosagem e uso pretendido do produto farmacêutico, e a idade, sexo, peso corporal, e condição física de um alvo de administração, e estado de doença em um sítio de aplicação. Por exemplo, em um caso onde o produto farmacêutico é administrado oralmente para o propósito de promover uma regulação de uma função intestinal ou prevenir e tratar uma doença infecciosa intestinal, em geral, a *Bacillus thuringiensis* preferivelmente é administrada em um intervalo de 1×10^5 a 1×10^{10} CFU/kg de peso corporal/dia. Em adição, em um caso de usar o produto farmacêutico em uso externo para o propósito de controlar patógenos na pele, na cutícula, ou na mucosa, a quantidade de produto farmacêutico pode ser apropriadamente ajustada de acordo com um intervalo de aplicação, e geralmente é preferido administrar *Bacillus thuringiensis* em um intervalo de 1×10^5 a 1×10^{10} CFU/10 a 1,000 mg/dia.

O agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção pode ser formado em um alimento tendo um efeito de melhora de um equilíbrio de flora intestinal ou efeito de controle de uma regulação de uma função intestinal, ou um alimento tendo um efeito de prevenção e tratamento de uma doença infecciosa intestinal adicionando e misturando o

agente de controle em uma bebida e alimento ou misturando o agente de controle com um componente arbitrário geralmente usado em uma bebida e alimento, com isso processando-os. Uma forma de cada do componente arbitrário e do alimento não é particularmente limitada contanto que as células bacterianas de *Bacillus thuringiensis* não morram, e elas são geralmente usadas em alimentos. Por exemplo, o alimento pode ser processado em um suplemento tal como uma preparação bebível, um pó, um comprimido, ou uma cápsula. Em adição, o produto farmacêutico pode ser usado em pães, macarrões, pastelarias tal como um biscoito, um chocolate, e uma bala, sacos de chá, um cereal quente tal como flocos de aveia, sopas, bebidas quentes, adoçantes, agentes aromatizantes, temperos, um café instantâneo, um produto seco ou produto liofilizado tal como um creme seco, produtos de processamento de carne tal como presunto e salsicha, e produtos de processamento de peixe como uma torta de peixe e uma torta de linguado cozido. O alimento da presente invenção é particularmente preferivelmente formado em uma forma de um suplemento em termos de estabilidade de armazenamento.

Uma concentração de células bacterianas da *Bacillus thuringiensis* no alimento da presente invenção pode ser selecionada de acordo com uma forma do alimento contanto que a concentração esteja em um intervalo adequado para administração da quantidade efetiva de *Bacillus thuringiensis*. Por exemplo, a concentração preferivelmente, em geral, é ajustada para uma adequada para administrar *Bacillus thuringiensis* no intervalo de 1×10^5 a 1×10^{10} CFU/kg de peso corporal/dia. Para uma tal concentração, a concentração de células bacterianas de *Bacillus thuringiensis* é ajustada, por exemplo, 1×10^4 a 1×10^{12} CFU/g, preferivelmente 1×10^5 a 1×10^{11} CFU/g, e mais preferivelmente 1×10^6 a 1×10^{10} CFU/g.

Em adição, o alimento da presente invenção pode ser produzido por um método convencional de processamento alimentar exceto

para misturar o agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção. Quando a bactéria prejudicial da presente invenção está, por exemplo, em um estado de pó ou sólido, o agente de controle também pode ser usado formando em um líquido ou um gel para misturar facilmente com o

5 componente de alimento. Neste caso, água, óleos vegetais tal como um óleo de soja, um óleo de canola, e um óleo de milho, óleos animais líquidos, compostos de polímero solúvel em água tal como polivinil álcool, polivinil pirrolidona, e ácido poliacrílico podem ser usados como um carreador líquido. Em adição, a fim de manter a uniformidade da concentração de células

10 bacterianas no alimento, também é preferido misturar um polissacarídeo solúvel em água tal como ácido argínico, arginato de sódio, goma xantana, caseína de sódio, uma goma arábica, uma goma guar, e polissacarídeos de semente de tamarindo. A fim de prevenir uma multiplicação de saprófitos, um ácido orgânico tal como ácido propiônico, ácido ascórbico, ou ácido cítrico é

15 misturado para produzir um agente de célula viável em líquido ácido.

O agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção pode ser usado para um aditivo de ração a ser adicionado e misturado em uma ração. O aditivo de ração pode ser usado sendo adicionado e misturado em uma ração. Em adição, o agente de controle de bactéria

20 prejudicial da presente invenção pode ser formado em uma ração para melhorar um equilíbrio de flora intestinal, promover uma regulação de função intestinal, e promover crescimento (aumento em peso corporal) ou uma ração para prevenir e tratar uma doença infecciosa intestinal sendo processada com um componente arbitrário geralmente usado em rações. Neste caso, o

25 componente arbitrário e uma forma de ração não são particularmente limitados contanto que nenhuma célula bacteriana de *Bacillus thuringiensis* morra, e o componente ou forma geralmente usados em rações para animais, tal como rações para gado, alimentos de animais domésticos, e suplementos para animais, podem ser usados. O teor do agente de controle de bactéria

prejudicial na ração da presente invenção não é limitado contanto que o teor esteja em um intervalo adequado para ingestão de quantidade efetiva de *Bacillus thuringiensis*, e o teor pode ser ajustado, como requerido, dependendo do tipo, peso corporal, idade, sexo do animal, propósito de uso, condição de saúde do animal a ser administrado, e do componente de ração. Por exemplo, o teor preferivelmente, em geral, é ajustado para um adequado para ingerir *Bacillus thuringiensis* no intervalo de 1×10^5 a 1×10^{10} CFU/kg de peso corporal/dia. Para uma tal concentração, a concentração de células bacterianas de *Bacillus thuringiensis* é ajustada para um intervalo de, por exemplo, 1×10^4 a 1×10^{12} CFU/g, preferivelmente 1×10^5 a 1×10^{11} CFU/g, e mais preferivelmente 1×10^6 a 1×10^{10} CFU/g.

A ração da presente invenção pode ser produzida misturando o agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção como ele é. Entretanto, quando o agente de controle de bactéria prejudicial em um estado de pó ou sólido é adicionado e misturado na ração, o agente formado em um líquido ou gel também pode ser usado como em um processamento alimentar.

O tipo de animal a ser alimentado com a ração da presente invenção não é particularmente limitado, e mamíferos, aves, répteis, anfíbios, e peixes são exemplificados. Destes, a ração da presente invenção pode ser preferivelmente usada para aves domésticas selecionadas a partir de galinhas, patos, codornas, e perus, e gado selecionado a partir de porcos, vacas, ovelhas, e coelhos. Uma quantidade de ração a ser dada ao animal pode ser ajustada, como requerido, dependendo do tipo, peso corporal, idade, e sexo do animal, do propósito de uso, da condição de saúde do animal, do componente de ração, e dos semelhantes. O método de prevenir e tratar uma doença infecciosa intestinal de animais inclui alimentar o animal com a ração da presente invenção obtida misturando o agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção no componente de ração. O método de administração e um método de criação de animais podem ser conduzidos com

um método usado geralmente em animais de criação.

Exemplos

(1) Teste de resistência a ácido biliar e propriedade anaeróbica

5 A 1.000 ml de água deionizada foi adicionado 35 g de um meio de ágar normal “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), e o conjunto foi esterilizado em uma autoclave. Depois de esterilização, a mistura foi resfriada para 45°C, e pó de bile (Oxgall, fabricado por Difco Laboratories) foi esterilizado por filtração usando um filtro de membrana de tipo éster misto de celulose (tamanho de poro 0,45 µm, fabricado por Advantec Toyo Kaisha, Ltd.) e adicionado à mistura para preparar meios de placa de ágar normal suplementado com pó de bile com concentrações de pó de bile de 0,3% em massa, 1% em massa, e 3% em massa.

10 BGSC 4A3, BGSC 4D1, BGSC 4J4, e BGSC 4Q7 pertencendo a *Bacillus thuringiensis* foram separadamente inoculadas em um meio de placa de ágar normal não suplementado com pó de bile (1.000 ml de água deionizada, 35 g de “Nissui”) e cultivadas a 37°C durante a noite. Depois de cultura, células bacterianas foram separadas de colônias formadas no meio de placa e inoculadas nos meios de placa de ágar normal suplementado com pó de bile preparados acima usando laços descartáveis pré-esterilizados. As células foram cultivadas a 37°C por 2 dias para confirmar se colônias estavam formadas ou não (Exemplos 1 a 4).

20 A fim de confirmar capacidades de multiplicação de BGSC 4A3, BGSC 4D1, BGSC 4J4, e BGSC 4Q7 em condições anaeróbicas, as respectivas linhagens bacterianas foram inoculadas no meio de placa de ágar normal não suplementado com pó de bile preparado acima e cultivadas em condições anaeróbicas a 37°C por 2 dias usando Anaeropack Kenki (fabricado por Mitsubishi Gas. Chemical Co., Ltd.) para confirmar se colônias estavam formadas ou não.

Por outro lado, *Bacillus coagulans* ATCC8038, *Bacillus*

coagulans NBRC12583, *Bacillus coagulans* DSM2312, *Bacillus subtilis* NBRC3009, *Bacillus subtilis* NBRC3025, *Bacillus subtilis* NBRC3108, *Bacillus subtilis* NBRC3336, *Bacillus clausii* DSM2512, *Bacillus clausii* DSM2515, *Bacillus clausii* DSM2525, e *Bacillus clausii* DSM8716 foram separadamente inoculados nos meios suplementados com pó de bile da mesma maneira que acima e cultivados a 37°C por 2 dias. Enquanto isso, testes de multiplicação em condições anaeróbicas foram realizados da mesma maneira que acima (Exemplos Comparativos 1 a 11).

ATCC8038 é uma linhagem depositada na American Type Culture Collection (ATCC); NBRC12583, NBRC3009, NBRC3025, NBRC3108, e NBRC3336 são linhagens depositadas no Biological Resource Center of the National Institute of Technology and Evaluation (NBRC); e DSM2312, DSM2512, DSM2515, DSM2525, DSM8716 são linhagens depositadas no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

Os resultados são mostrados em Tabela 1.

Tabela 1

	Linhagem	Cultura anaeróbica	Teor de pó de bile em meio de ágar normal (%)			
			0	0,3	1	3
Exemplo 1	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> EGSC 4A3	+	+	+	+	+
Exemplo 2	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EGSC 4D1	+	+	+	+	+
Exemplo 3	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> EGSC 4J4	+	+	+	+	+
Exemplo 4	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> EGSC 4Q7	+	+	+	+	+
Exemplo Comparativo 1	<i>Bacillus coagulans</i> ATCC8038	+	+	±	-	-
Exemplo Comparativo 2	<i>Bacillus coagulans</i> NBRC12583	+	+	±	-	-
Exemplo Comparativo 3	<i>Bacillus coagulans</i> DSM2312	+	+	±	-	-
Exemplo Comparativo 4	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3009	-	+	+	+	+
Exemplo Comparativo 5	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3025	-	+	+	+	+
Exemplo Comparativo 6	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3108	-	+	+	+	+
Exemplo Comparativo 7	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3336	-	+	+	+	+
Exemplo Comparativo 8	<i>Bacillus clausii</i> DSM2512	-	+	+	+	+
Exemplo Comparativo 9	<i>Bacillus clausii</i> DSM2515	-	+	+	+	+
Exemplo Comparativo 10	<i>Bacillus clausii</i> DSM2525	-	+	+	+	+
Exemplo Comparativo 11	<i>Bacillus clausii</i> DSM8716	-	+	+	+	+

+ : Formação de colônias foi observada. ±: Formação de apenas umas poucas colônias foi observada. -: Formação de colônias não foi observada.

Foi confirmado que linhagens de *Bacillus thuringiensis* de Exemplos 1 a 4 podem formar colônias em todos os meios de placa de ágar normal com concentrações de pó de bile de 0,3% em massa, 1% em massa, e 3% em massa, e podem se multiplicar mesmo em condições anaeróbicas.

5 Por outro lado, embora tenha sido confirmado que linhagens de *Bacillus coagulans* de Exemplos Comparativos 1 a 3 se multiplicam em condições anaeróbicas, elas formaram apenas umas poucas colônias no meio de ágar normal com uma concentração de pó de bile de 0,3% em massa e não formaram nenhuma colônia nos meios com concentrações de pó de bile de 1%
10 em massa e 3% em massa, e elas revelaram serem inferiores em resistência a ácido biliar a linhagens de *Bacillus thuringiensis* de Exemplos 1 a 4. Em adição, linhagens de *Bacillus subtilis* de Exemplos Comparativos 4 a 7 revelaram ter resistência a ácido biliar mas não ter nenhuma capacidade de se multiplicar em condições anaeróbicas. *Bacillus clausii* DSM2512, DSM2515,
15 DSM2525, DSMS716 de Exemplos Comparativos 8 a 11 revelaram ter resistência a ácido biliar mas não ter nenhuma capacidade de se multiplicar em condições anaeróbicas.

(2) Teste de capacidade de inativação de fator bacteriano auto-induzido

20 *Chromobacterium violaceum* CV026 com um gene produtor de fator bacteriano auto-induzido interrompido foi usado para realizar um teste para confirmar indução de um mecanismo bacteriano auto-induzido (McClellan, K. et al., Microbiology, 143, 3703-3711 (1997)). A linhagem CV026 é uma linhagem com um gene biossintético interrompido de N-hexanoil-L-homoserina lactona (HHL), que é um fator bacteriano auto-
25 induzido, e no caso onde uma acil homoserina lactona (AHL) tal como HHL não é adicionada forma o exterior, a linhagem não pode expressar um mecanismo bacteriano auto-induzido e não pode sintetizar um pigmento violeta (violaceína). Também no caso onde N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL) é adicionada como uma AHL ao invés de HHL, a linhagem

pode expressar um mecanismo bacteriano auto-induzido. Um método específico do teste é como segue.

Chromobacterium violaceum CV026 foi inoculada em meio Luria-Bertani (LB) e cultivada com agitação a 28°C durante a noite. Subseqüentemente, 50 µl da solução de cultura de CV026 obtida acima e 50 µl de uma solução aquosa de 2% de canamicina esterilizada por filtração foram adicionados a 5 ml de um meio de ágar LB semifluido (0,3%) esterilizado em uma autoclave e resfriado para 45°C, e 5 ml do meio de ágar LB semifluido foi sobreposto em meio de ágar LB, que foi preparado antecipadamente em uma placa de petri com um diâmetro de 9 cm. O ágar foi solidificado, e poços com um diâmetro de 6 mm foram formados no meio de ágar LB usando uma broca de cortiça.

CV026 é uma linhagem depositada na National Collection of Type Cultures (NCTC) como NCTC13278.

A 10 ml de meio LB foi adicionado 0,5 ml de 500 µM de OHHL (fabricado por Sigma), e o conjunto foi deixado permanecer a 28°C por 4 horas e usado como um controle positivo. Enquanto isso, meio LB não suplementado com nenhum aditivo foi tratado da mesma maneira que acima e usado como um controle negativo. Os controles foram separadamente adicionados em uma quantidade de 50 µl aos poços do meio LB contendo CV026 preparado acima, cultura foi realizada a 28°C por 24 horas. Como um resultado, no meio onde o controle positivo contendo OHHL foi adicionado, indução de violaceína foi observada ao redor dos poços do meio, enquanto que no meio onde o controle negativo contendo nenhuma OHHL foi adicionado, indução de violaceína não foi observada. Os resultados revelam que CV026 pode expressar um mecanismo bacteriano auto-induzido e pode induzir violaceína quando cultivada na presença de OHHL mas não pode expressar um mecanismo bacteriano auto-induzido e não pode induzir violaceína quando cultivada na ausência de OHHL.

Subseqüentemente, a fim de avaliar a capacidade de inativação de OHHL de bactérias *Bacillus*, bactérias *Bacillus* foram permitidas reagir com OHHL em conformidade com o seguinte procedimento.

Bacillus thuringiensis BGSC 4A3, BGSC 4D1, BGSC 4J4, BGSC 4Q7 (Exemplos 1 a 4), e *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, e *Bacillus clausii* mostrados em Tabela 2 foram separadamente inoculados em meio LB e cultivados com agitação a 37°C durante a noite (Exemplos Comparativos 1 a 11). Posteriormente, 0,5 ml de OHHL foi adicionado a 10 ml de cada solução de cultura com uma absorbância (660 nm) ajustada para 1,0, seguido por uma reação a 28°C por 4 horas. Cada uma das soluções de reação foi adicionada em uma quantidade de 50 µl aos poços do meio LB contendo CV026, e cultura foi realizada a 28°C por 24 horas. Depois de cultura, indução de violaceína ao redor de cada poço foi observada.

Os resultados são mostrados em Tabela 2.

15

Tabela 2

	Linhagem	Indução de violaceína
Controle positivo	- (Suplementado com OHHL)	+
Controle negativo	- (Suplementado com no OHHL)	-
Exemplo 1	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> BGSC 4A3	-
Exemplo 2	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> BGSC 4D1	-
Exemplo 3	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i> aizawai</i> BGSC 4J4	-
Exemplo 4	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i> israelensis</i> BGSC 4Q7	-
Exemplo Comparativo 1	<i>Bacillus coagulans</i> ATCC8038	+
Exemplo Comparativo 2	<i>Bacillus coagulans</i> NBRC12583	+
Exemplo Comparativo 3	<i>Bacillus coagulans</i> DSM2312	+
Exemplo Comparativo 4	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3009	+
Exemplo Comparativo 5	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3025	+
Exemplo Comparativo 6	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3108	+
Exemplo Comparativo 7	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3336	+
Exemplo Comparativo 8	<i>Bacillus clausii</i> DSM2512	+
Exemplo Comparativo 9	<i>Bacillus clausii</i> DSM2515	+
Exemplo Comparativo 10	<i>Bacillus clausii</i> DSM2525	+
Exemplo Comparativo 11	<i>Bacillus clausii</i> DSM8716	+

+: Indução de violaceína foi observada. -: Indução de violaceína não foi observada.

Em todas as linhagens de *Bacillus thuringiensis* de Exemplos 1

a 4, a indução de violaceína não foi observada. Por outro lado, em todas as linhagens de *Bacillus coagulans* de Exemplos Comparativos 1 a 3, *Bacillus subtilis* de Exemplos Comparativos 4 a 7, e *Bacillus clausii* de Exemplos Comparativos 8 a 11, a indução de violaceína foi observada. Os resultados revelam que as linhagens de *Bacillus thuringiensis* podem produzir uma enzima que degrada OHHL para inativar OHHL e para inibir expressão do mecanismo bacteriano auto-induzido de CV026, enquanto que as bactérias *Bacillus* de Exemplos Comparativos 1 a 11 não podem inativar OHHL.

(3) Produção de agente de controle de bactéria prejudicial

O meio para formação de esporo, tendo a composição seguinte, foi usado para cultivar BGSC 4A3, BGSC 4D1, BGSC 4J4, e BGSC 4Q7 a 37°C por 72 horas em um líquido (Proceedings of the National Academy of Sciences, US, 1965, 54, pp. 704-711). As soluções de cultura resultantes foram centrifugadas para coletar células bacterianas. As células coletadas foram liofilizadas e pulverizadas, e lactose foi adicionada a estas de forma que a densidade de esporos atingiu 5×10^8 CFU/g para produzir agentes de controle de bactéria prejudicial, que foram usados em Exemplos de Produção 1 a 4, respectivamente. A densidade de esporos foi medida: diluindo cada um dos agentes de controle de bactéria prejudicial produzidos acima para uma concentração apropriada com água esterilizada; aquecendo o agente a 70°C por 30 minutos para matar apenas células vegetativas; inoculando as células em um meio de ágar normal; e contando o número de colônias formadas neste.

(Componente de meio para formação de esporo)

25	Caldo nutritivo (fabricado por Difco Laboratories)	8,0 g
	KCl	1,0 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,002 g
	Total, ajustado para pH 7,0	1.000 ml

Os componentes acima foram esterilizados em uma autoclave, e uma solução de CaCl_2 e uma solução de FeSO_4 , que haviam sido pré-esterilizadas, foram adicionadas de forma a estarem em quantidades de 5×10^{-4} M e 1×10^{-6} M, respectivamente.

5 Por outro lado, composições produzidas da mesma maneira que acima usando *Bacillus coagulans* NBRC12583 e *Bacillus subtilis* NBRC3009 designam Exemplos Comparativos de Produção 1 e 2, respectivamente.

(4) Teste de crescimento de pinto

10 Rações obtidas misturando os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos de Produção 1 a 4 em uma concentração de 0,2% em massa com respeito à massa total de uma ração para pinto (para frango SD em estágios precoces e avançados, fabricado por Nippon Formula Feed Mfg Co., Ltd., uma ração não suplementada com nenhuma substância antibacteriana)

15 foram usadas em Exemplos 5 a 8. Pintos dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 12 pintos eclodidos de ovos chocados derivados de frangos de corte (espécie: Chunky), foram permitidos ingerir as rações de Exemplos 5 a 8 por 56 dias para realizar um teste de crescimento. Por outro lado, uma ração obtida misturando as composições de Exemplos Comparativos de Produção 1

20 e 2 em uma concentração de 0,2% foi usada em Exemplos Comparativos 12 e 13. Uma ração obtida misturando lactose ao invés de um agente de controle de bactéria prejudicial em uma concentração de 0,2% foi designada Exemplo de Controle e usada em um teste de crescimento da mesma maneira que acima.

25 56 dias depois, os pesos corporais dos pintos dos respectivos grupos foram medidos, e valores médios para os respectivos grupos foram calculados. Enquanto isso, as concentrações celulares das bactérias adicionadas nas fezes durante o período de criação foram medidas, e concentrações médias para os respectivos grupos foram calculadas.

Os resultados são mostrados em Tabela 3.

Tabela 3

	Quantidade de agente adicionada (baseado em ração seca) (%)	Peso corporal médio de pinto no momento de início (g)	Peso corporal médio de pinto 56 dias depois (g)	Concentração celular de bactéria adicionada em fezes (CFU/g)
Exemplo 5	0,2	50	3.184	$12,1 \times 10^6$
Exemplo 6	0,2	50	3.101	$11,3 \times 10^6$
Exemplo 7	0,2	50	3.157	$20,9 \times 10^6$
Exemplo 8	0,2	50	3.074	$17,6 \times 10^6$
Exemplo Comparativo 12	0,2	50	2.686	$0,1 \times 10^6$
Exemplo Comparativo 13	0,2	50	2.824	$0,2 \times 10^6$
Exemplo de Controle	0,2	50	2.769	0

Os pesos corporais dos pintos alimentados com as rações de Exemplos 5 a 8 foram mais aumentados comparados com aqueles dos pintos alimentados com as rações de Exemplos Comparativos 12 e 13. Nas fezes dos pintos alimentados com as rações de Exemplos 5 a 8, as bactérias adicionadas foram detectadas em concentrações de $11,3 \times 10^6$ CFU/g (grama de fezes brutas de pinto) ou mais, e os números das células bacterianas foram significativamente maiores do que aqueles nas fezes dos pintos alimentados com as rações de Exemplos Comparativos 12 e 13. Os resultados revelam que os agentes de controle de bactéria prejudicial contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* da presente invenção podem promover o ganho de peso corporal de um animal pois a bactéria não é morta em um trato digestivo tal como estômago ou intestino e forma colônias no intestino.

15 (5) Teste de alimentação de porco

Rações obtidas misturando os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos de Produção 1 e 3 com uma ração padrão para porco (Premium Power, fabricado por Showa Sangyo Co., Ltd.) foram usadas em Exemplos 9 e 10, respectivamente, e filhotes de porco dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 30 porcos, foram permitidos ingerir as rações. Da mesma maneira que acima, uma ração obtida misturando a composição de Exemplo Comparativo de Produção 1 com a ração padrão para porco foi designada Exemplo Comparativo 14, e filhotes de porco foram permitidos

ingerir a ração. Uma ração obtida misturando lactose ao invés de um agente de controle de bactéria prejudicial foi designada Exemplo de Controle, e filhotes de porco foram permitidos ingerir a ração.

21 dias depois, os pesos corporais dos filhotes de porco dos respectivos grupos foram medidos, e valores médios para os respectivos grupos foram calculados. Em adição, a ocorrência de diarreia ou perda de fezes durante o período foi observada, e os dias quando um filhote de porco desenvolveu diarreia ou perda de fezes foram contados e somados como um ponto por dia. Os resultados foram avaliados como escores de diarreia ou perda de fezes.

Os resultados são mostrados em Tabela 4.

Tabela 4

	Quantidade de agente adicionada (baseado em ração seca) (%)	Peso corporal médio de porcos no momento de início (kg)	Peso corporal médio de porcos 21 dias depois (kg)	Escore de diarreia ou perda de fezes
Exemplo 9	0,5	13,0	32,9	4
Exemplo 10	0,5	17,9	32,4	7
Exemplo Comparativo 14	0,5	18,0	31,8	39
Exemplo de Controle	0,5	18,0	31,4	61

Os pesos corporais dos filhotes de porco alimentados com as rações de Exemplos 9 e 10 foram mais aumentados comparados com aqueles dos filhotes de porco alimentados com a ração de Exemplo Comparativo 14. Enquanto isso, nos casos dos filhotes de porco alimentados com as rações de Exemplos 9 e 10, os escores de diarreia ou perda de fezes foram significativamente menores do que o escore dos filhotes de porco alimentados com a ração de Exemplo Comparativo 14. Os resultados sugerem que os agentes de controle de bactéria prejudicial contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* da presente invenção podem promover o ganho de peso corporal de filhotes de porco e têm capacidade de prevenir ou melhorar diarreia ou perda de fezes.

(6) Teste de criação de bezerro

Bezerros machos de uma semana de idade (Holstein) dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 6 bezerros, foram criados. Rações obtidas misturando os agentes de controle de bactéria prejudicial em uma concentração de 2% em massa de Exemplos de Produção 1 e 3 com um leite substituto mostrado abaixo foram usadas em Exemplos 11 e 12, respectivamente, enquanto que uma ração obtida misturando a composição de Exemplo Comparativo de Produção 1 em uma concentração de 2% em massa foi designada Exemplo Comparativo 15. Uma ração obtida misturando lactose na mesma quantidade que acima foi designada Exemplo de Controle. Os bezerros foram permitidos ingerir o leite substituto e uma ração para bezerro em período de amamentação (Ushikko, fabricado por Snow Brand Seed Co., Ltd.) para criá-los até que os bezerros se tornassem de 35 dias de idade, e a ocorrência de diarreia ou perda de fezes durante o período foi observada.

15 (Composição de leite substituto)

	(% em massa)
Leite em pó desnatado	69
Soro	10
Sebo bovino	12,2
20 Lecitina	0,8
Vitaminas, minerais, e outros aditivos	8

(Critério de avaliação de ocorrência de diarreia ou perda de fezes)

25 Frequentemente: Número total de bezerros que desenvolveram diarreia no período de teste é 10 ou mais.

Difícilmente: Número total de bezerros que desenvolveram diarreia no período de teste é menor do que 10 e 5 ou mais.

Muito difícilmente: Número total de bezerros que desenvolveram diarreia no período de teste é menor do que 5.

Os resultados são mostrados em Tabela 5

Tabela 5

	Quantidade de agente adicionada (baseado em ração seca) (%)	Peso corporal médio de bezerros no momento de início (kg)	Peso corporal médio de bezerros 28 dias depois (kg)	Ocorrência de diarréia ou perda de fezes
Exemplo 11	2,0	49,8	70,2	Muito dificilmente
Exemplo 12	2,0	50,0	70,8	Muito dificilmente
Exemplo Comparativo 15	2,0	49,9	69,6	Dificilmente
Exemplo de Controle	2,0	50,1	69,0	Freqüentemente

Os pesos corporais dos bezerros alimentados com o leite substitutos de Exemplos 11 e 12 foram mais aumentados comparados com aqueles dos bezerros alimentados com o leite substituto de Exemplo Comparativo 15. Enquanto isso, nos casos dos bezerros alimentados com os leites substitutos de Exemplos 11 e 12, os escores de diarréia ou perda de fezes foram significativamente menores do que o escore dos bezerros alimentados com o leite substituto de Exemplo Comparativo 15. Os resultados sugerem que os agentes de controle de bactéria prejudicial contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* da presente invenção podem promover o ganho de peso corporal de bezerros e têm capacidade de prevenir ou melhorar diarréia ou perda de fezes.

Os resultados de crescimento/criação de pintos, filhotes de porco, e bezerros revelam que, se uma ração contendo um agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção é dada, *Bacillus thuringiensis* é colonizado no intestino em uma alta freqüência para melhorar digestão e absorção das rações e para promover o crescimento, e para prevenção/melhora de um sintoma indesejável tal como diarréia ou perda de fezes.

(7) Teste de efeito de melhorar qualidade de leite

Rações obtidas misturando os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos de Produção 1 e 3 com uma ração para vaca leiteira

(4,5 kg de milho, 2,5 kg de cevada, 1,1 a 1,8 kg de beterraba, 1,8 kg de semente de algodão, 1,4 to 1,6 kg de soja desengordurada, 0,6 kg a 1,2 kg de soja, 10 a 12 kg de capim seco, e 160 a 220 L de água) foram usadas em Exemplos 13 e 14, respectivamente, e separadamente dadas a vacas leiteiras (Holstein) dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 30 vacas. Uma ração obtida misturando a composição de Exemplo Comparativo de Produção 1 com uma ração para vaca leiteira foi designada Comparativo 16 e dada da mesma maneira que acima. Em adição, uma ração obtida misturando lactose ao invés de um agente de controle de bactéria prejudicial foi designada Exemplo de Controle e dada da mesma maneira que acima.

Para as vacas leiteiras dos respectivos grupos, ordenha foi realizada em intervalos de 10 dias 17 vezes, e as proporções de gordura de leite e proteína de leite e a proporção de sólido de leite desnatado de cada leite foram medidas para calcular valores médios.

Os resultados são mostrados em Tabela 6.

Tabela 6

	Quantidade de agente adicionada (baseado em ração seca) (%)	Proporção de gordura de leite (%)	Proporção de proteína de leite (%)	Proporção de sólido de leite sem gordura (%)
Exemplo 13	0,5	4,10	3,39	9,01
Exemplo 14	0,5	3,99	3,42	8,99
Exemplo Comparativo 16	0,5	3,92	3,26	8,84
Exemplo de Controle	0,5	3,89	3,18	8,79

O teor de gordura de leite, teor de proteína de leite, e teor de sólido de leite sem gordura em cada leite produzido pelas vacas leiteiras alimentadas com as rações de Exemplos 13 e 14 revelaram ser maiores do que aqueles em cada leite produzido pelas vacas leiteiras alimentadas com a ração de Exemplo Comparativo 16. Os resultados revelam que os agentes de controle de bactéria prejudicial contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* da presente invenção têm capacidade de melhorar a qualidade de leite de uma vaca leiteira.

(8) Estudo de desafio de *Salmonella enteritidis* para pinto

Rações obtidas misturando os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos de Produção 1 a 4 em uma concentração de 0,2% em massa com respeito à massa total de uma ração para pinto (para frango SD em estágio precoce, fabricado por Nippon Formula Feed Mfg Co., Ltd., uma ração não suplementada com nenhuma substância antibacteriana) foram usadas em Exemplos 15 a 18, respectivamente. Pintos dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 12 pintos eclodidos de ovos chocados derivados de frangos de corte (espécie: Chunky), foram permitidos ingerir as rações de Exemplos 15 a 18 por 12 dias. Por outro lado, rações obtidas misturando as composições de Exemplos Comparativos de Produção 1 e 2 em uma concentração de 0,2% em massa foram usadas em Exemplos Comparativos 17 e 18. Uma ração obtida misturando lactose ao invés de um agente de controle de bactéria prejudicial em uma concentração de 0,2% em massa foi designada Exemplo de Controle e alimentada aos pintos da mesma maneira que acima. Quando pintos chegaram aos 7 dias de idade, os pintos foram oralmente desafiados por *Salmonella enteritidis* (SE) a $1,2 \times 10^7$ CFU/pinto. E quando os pintos chegaram aos 12 dias de idade, o conteúdo cecal e as fezes foram coletados de cada pinto. As fezes foram coletadas limpando a cloaca com esfregões. A SE usada foi uma linhagem separada do conteúdo cecal e uma galinha que havia morrido em uma fazenda de um produtor aviário em distrito de Gunma.

As células viáveis de SE nos conteúdos cecais foram contadas pelo seguinte método para calcular índices de infecção e índices de defesa.

1 g de cada conteúdo cecal foi diluído 10 vezes com salina tamponada com fosfato esterilizada, e a solução foi bem misturada para preparar uma solução estoque de amostra. Subseqüentemente, a solução estoque de amostra foi serialmente diluída 10 vezes com salina fisiológica esterilizada para preparar soluções serialmente diluídas. A solução estoque de

amostra e soluções serialmente diluídas foram separadamente borradas em meio de placa de ágar SS “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) em um meio de placa de ágar verde brilhante (fabricado por Difco Laboratories) em uma quantidade de 0,1 ml e cultivados a 37°C por 24 horas, e o número de colônias típicas de SE multiplicadas em cada meio de placa foi medido. Além disso, células bacterianas foram coletadas das colônias e inoculadas em meio de ágar SIM para teste de descarboxilação de lisina “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) e meio de ágar TSI “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), e elas foram cultivadas a 37°C por 24 horas para confirmar suas propriedades.

O número de células viáveis de SE em 1 g do conteúdo cecal foi calculado multiplicando o número de colônias confirmadas de serem SE por um fator de diluição da solução diluída. Baseado nos resultados, índices de infecção e índices de defesa foram calculados como segue. O índice de infecção é um valor indicando a taxa de infecção de um patógeno, enquanto que o índice de defesa é um valor indicando a capacidade de cada ração de proteger a infecção de um patógeno, o que é comparado com o caso de administração de uma ração não contendo uma bactéria *Bacillus*.

Índice de infecção: valor médio de logaritmos dos números de células viáveis de SE em conteúdos cecais dos respectivos indivíduos (valor médio de log CFU/g)

Índice de defesa: índice de infecção de grupo de controle/índice de infecção de cada grupo de teste

Para cada excremento coletado da cloaca, cultura qualitativa foi realizada pelo seguinte método para observar as propriedades de SE. Isto é, se colônias de SE foram detectadas ou não em cada indivíduo foi confirmado por: suspendendo as fezes acopladas a um esfregão em 10 ml de salina tamponada com fosfato esterilizada para preparar uma solução estoque de amostra; borrar a solução em uma quantidade de 0,1 ml em meio de ágar

SS em um meio de placa de ágar verde brilhante; e realizar cultura a 37°C por 24 horas.

Além disso, foi determinado se homoserina lactona está presente nos conteúdos cecais dos respectivos grupos coletados acima.

5 Primeiro, o seguinte teste foi realizado para avaliar a relação entre a concentração de homoserina lactona e indução de um mecanismo bacteriano auto-induzido.

Chromobacterium violaceum CV026 foi inoculada em meio LB e cultivada com agitação a 28°C durante a noite. Subseqüentemente, 50 µl da solução de cultura de CV026 obtida acima e 50 µl de uma solução aquosa de 2% de canamicina esterilizada por filtração foram adicionados a 5 ml de um meio de ágar LB semifluido (0,3%), que havia sido esterilizado em uma autoclave e resfriado a 45°C, e 5 ml do meio de ágar LB semifluido foi disposto em meio de ágar LB que foi previamente preparado em uma placa de petri com um diâmetro de 9 cm. O ágar foi solidificado, e 50 µl de 500 µM, 10 50 µM, ou 5 µM de OHHL (fabricado por Sigma) foi adicionado em gotas à superfície do meio LB disposto com linhagem CV026 e seco por 30 minutos, seguido por cultura a 28°C por 24 horas. Como um resultado, no meio onde 500 µM ou 50 µM de OHHL foi adicionado em gotas, indução de violaceína foi observada ao redor da região onde OHHL foi adicionado em gotas, 20 enquanto que no meio onde 5 µM de OHHL foi adicionado em gotas, indução de violaceína não foi observada ao redor da região onde OHHL foi adicionado em gotas.

Posteriormente, a solução estoque de cada conteúdo cecal em salina tamponada com fosfato esterilizada preparada acima foi centrifugada a 25 4°C por 30 minutos a 20.000 × g, e um volume duplo de diclorometano (grau especial, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) foi adicionado ao sobrenadante resultante, seguido por agitação por 1 hora para realizar extração. A extração foi repetida duas vezes. As camadas orgânicas foram

combinadas, e água foi removida com sulfato de sódio anidro (grau especial, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Então, evaporação foi realizada para remover o solvente, e 50 µl de água esterilizada foi adicionado a isto. A solução assim preparada do conteúdo cecal de cada grupo foi adicionada em gotas em uma quantidade de 50 µl na superfície do meio LB disposta com CV026 e seca por 30 minutos, e cultura foi realizada a 28°C por 24 horas. Depois de cultura, indução de violaceína foi observada ao redor da região onde a solução descrita acima foi adicionada em gotas.

Enquanto isso, as concentrações de células bacterianas de *Bacillus thuringiensis* adicionado nas fezes durante o período de criação foram medidas, e as concentrações médias foram calculadas para os respectivos grupos.

Os resultados são mostrados em Tabela 7.

Tabela 7

	Número de células viáveis em conteúdo cecal		Número de indivíduos cujas fezes, coletadas a partir da cloaca, contêm SE Número de pintos de teste(12)	Indução de violaceína em conteúdo cecal	Concentração celular de bactéria <i>Bacillus</i> adicionada em fezes ($\times 10^6$ CFU/g)
	Índice de infecção	Índice de defesa			
Exemplo 15	1,2	7,1	2	-	16,3
Exemplo 16	2,1	4,0	3	-	9,9
Exemplo 17	0,8	10,6	1	-	18,5
Exemplo 18	1,9	4,5	2	-	11,0
Exemplo Comparativo 17	4,4	1,9	8	+	0,2
Exemplo Comparativo 18	5,1	1,7	9	+	0,3
Exemplo de Controle	8,5	-	12	+	0,0

15 +: Indução de violaceína foi observada. -: Indução de violaceína não foi observada.

No caso dos pintos administrados com as rações contendo *Bacillus thuringiensis* de Exemplos 15 a 18, as concentrações de células bacterianas de SE nos conteúdos cecais foram extremamente baixas, e os índices de infecção da bactéria *Salmonella* foram extremamente baixos. Em adição, uma inspeção visual das vísceras dos pintos mostrou que existem poucas lesões com sangramento no ceco. Como é claro a partir dos índices de

defesa, os índices de infecção revelaram ser cerca de 1/4 a 1/10 comparados com Exemplo de Controle.

5 Nos casos dos pintos alimentados com as rações de Exemplos Comparativos 17 e 18, multiplicação de SE foi ligeiramente inibida comparada com Exemplo de Controle. Uma inspeção visual das vísceras dos pintos mostrou que existem lesões com sangramento no ceco em uma alta frequência. Nas fezes dos pintos alimentados com as rações de Exemplo 15 a 18, a bactéria adicionada foi detectada a $9,9 \times 10^6$ CFU/g (grama de excremento bruto de pinto) ou mais, e os números de células viáveis foram significativamente maiores comparados com Exemplos 10 Comparativos.

Os resultados revelam que os agentes de controle de bactéria prejudicial para animais contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* da presente invenção podem inibir multiplicação de SE e podem inibir expressão 15 de fator bacteriano auto-induzidos pois a linhagem não é morta em um trato digestivo tal como estômago ou intestino e forma colônias no intestino. Isto é, adição de esporos de uma bactéria *Bacillus thuringiensis* da presente invenção a uma ração é efetiva em prevenção/tratamento de doenças infecciosas intestinais causadas por SE.

20 (9) Estudo de desafio de *Escherichia coli* para porco

Rações obtidas misturando os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos de Produção 1 e 3 em uma concentração de 0,5% em massa com respeito à massa total de uma ração para suíno (Premium Series, fabricado por Showa Sangyo Co., Ltd.) foram usadas em Exemplos 19 e 20, 25 respectivamente, e porcos dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 30 porcos (35 dias de idade), foram permitidos ingerir as rações por 19 dias. Da mesma maneira que acima, uma ração obtida misturando a composição de Exemplo Comparativo de Produção 1 em uma concentração de 0,5% em massa foi designada Exemplo Comparativo 19

e dada aos porcos. Em adição, uma ração obtida misturando lactose ao invés de um agente de controle de bactéria prejudicial em uma concentração de 0,5% em massa foi designada Exemplo de Controle e dada aos porcos. Quando os porcos chegaram aos 40 dias de idade, os porcos foram oralmente desafiados por uma bactéria de doença de edema (*Escherichia coli*) a 1.8×10^5 CFU/porco. A bactéria de doença de edema usada foi uma linhagem separada do conteúdo intestinal de um porco, que havia desenvolvido doença de edema e morreu em uma fazenda de engorda em Kitakyusyu. Os porcos foram criados até que os porcos chegassem aos 54 dias de idade, e as taxas de mortalidade de porcos do respectivo grupo foram calculadas.

Em adição, o número de células viáveis de *E. coli* no conteúdo de intestino delgado foi medido pelo seguinte método. 1 g do conteúdo de intestino delgado foi diluído 10 vezes com salina tamponada com fosfato esterilizada, e o conjunto foi bem misturado para preparar uma solução estoque de amostra. Subseqüentemente, a solução estoque de amostra foi serialmente diluída 10 vezes com salina fisiológica esterilizada. A solução estoque de amostra e soluções serialmente diluídas foram separadamente borradas em meio de placa de ágar DHL (grânulo) “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) em uma quantidade de 0,1 ml, e cultura foi realizada a 37°C por 24 horas, seguido por medida do número de colônias típicas de *E. coli* multiplicadas em cada meio de placa. O número de células viáveis de *E. coli* em 1 g do conteúdo de intestino delgado foi calculado multiplicando o número de colônias confirmadas de serem *E. coli* por um fator de diluição da solução diluída, e o índice de infecção foi calculado pelo seguinte método.

Índice de infecção: valor médio de logaritmos dos números de células viáveis de *E. coli* em intestinos delgados dos respectivos indivíduos (valor médio de log CFU/g)

Além disso, a fim de avaliar a presença ou ausência de

homoserina lactona no conteúdo de intestino delgado, indução de violaceína foi observada pelo mesmo método do que aquele descrito no item (8) usando linhagem CV026.

Os resultados são mostrados em Tabela 8.

5

Tabela 8

	Taxa de mortalidade 14 dias depois de infecção de bactéria de doença de edema (%)	Número de células viáveis em conteúdo de intestino delgado (log CFU/g) (índice de infecção)	Indução de violaceína em conteúdo de intestino delgado
Exemplo 19	10	0,9	-
Exemplo 20	6	1,1	-
Exemplo Comparativo 19	43	5,9	+
Exemplo de Controle	60	8,2	+

+: Indução de violaceína foi observada. -: Indução de violaceína não foi observada.

A taxa de mortalidade de Exemplo de Controle e a taxa de mortalidade do grupo de teste de Exemplo Comparativo 19 revelaram ser 60% e 43%, respectivamente, e uma fase de doença de edema tal como edema de pálpebra ou torcicolo foram observadas em porcos mortos. Em porcos sobreviventes, perda de vitalidade ou pele áspera foi observada. Nos casos dos porcos alimentados com os agentes de controle de bactéria prejudicial contendo *Bacillus thuringiensis* de Exemplos 19 e 20, as taxas de mortalidade revelaram ser 10% ou menos.

15

Nos casos de Exemplos 19 e 20, multiplicação de *E. coli* foi inibida nos conteúdos de intestino delgado dos porcos. Em adição, indução de fatores bacterianos auto-induzidos foi inibida. Os resultados revelam que administração dos agentes de controle de bactéria prejudicial contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* da presente invenção a porcos é efetiva em prevenção/tratamento de infecção por bactéria de doença de edema.

20

(10) Estudo de desafio de *Salmonella* para bezerro

Bezerros machos de uma semana de idade (Holstein) dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 8 bezerros, foram criados. Rações obtidas misturando os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos de Produção 1 e 3 em uma concentração de 2,0% em massa com

uma ração misturada para bezerro (Miracle Mate, fabricado por Scientific Feed Laboratory Co., Ltd.) foram usadas em Exemplos 21 e 22, respectivamente, enquanto que uma ração obtida misturando a composição de Exemplo Comparativo de Produção 1 em uma concentração de 2,0% foi designada Exemplo Comparativo 20. Em adição, uma ração obtida adicionando lactose ao invés de um agente de controle de bactéria prejudicial em uma quantidade igual foi designada Exemplo de Controle. Estas rações misturadas para bezerro foram dadas aos bezerros até que os bezerros chegassem a 4 semanas de idade. Quando os bezerros chegaram a 2 semanas de idade, os bezerros foram oralmente desafiados por uma *Salmonella typhimurium* (ST) a $8,9 \times 10^5$ CFU/bezerro. A ST usada foi uma linhagem separada de um excremento fresco de uma vaca, que havia desenvolvido diarreia na fazenda de um fazendeiro leiteiro em Kitakyusyu. Os bezerros foram criados até que os bezerros chegassem a 4 semanas de idade, e as taxas de mortalidade dos bezerros dos respectivos grupos foram calculadas.

Em adição, o número de células viáveis de ST no conteúdo de intestino delgado coletado foi medido pelo seguinte método. 1 g do conteúdo de intestino delgado foi diluído 10 vezes com salina tamponada com fosfato esterilizada, e o conjunto foi bem misturado para preparar uma solução estoque de amostra. Subseqüentemente, a solução estoque de amostra foi serialmente diluída 10 vezes com salina fisiológica esterilizada. A solução estoque de amostra e soluções serialmente diluídas foram separadamente borradas em meio de placa de ágar SS “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) em um meio de placa de ágar verde brilhante (fabricado por Difco Laboratories) em uma quantidade de 0,1 ml, e cultura foi realizada a 37°C por 24 horas, seguido por medida do número de colônias típicas de ST multiplicadas em cada meio de placa. A bactéria foi coletada das colônias e inoculada em meio de ágar SIM para teste de descarboxilação de lisina “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) e meio de ágar

TSI “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), e cultura foi realizada a 37°C por 24 horas para confirmar as propriedades da bactéria. Subseqüentemente, o número de células viáveis de ST em 1 g do conteúdo de intestino delgado foi calculado multiplicando o número de colônias por um fator de diluição da solução diluída.

Além disso, a fim de avaliar a presença ou ausência de homoserina lactona no conteúdo de intestino delgado, indução de violaceína foi observada pelo mesmo método do que aquele descrito no item (8) usando linhagem CV026.

Os resultados são mostrados em Tabela 9.

Tabela 9

	Taxa de mortalidade 14 dias depois de infecção de ST (%)	Número de células viáveis em conteúdo de intestino delgado (log CFU/g) (índice de infecção)	Indução de violaceína em conteúdo de intestino delgado
Exemplo 21	12,5	1,2	-
Exemplo 22	0,0	1,1	-
Exemplo Comparativo 20	50,0	5,0	+
Exemplo de Controle	50,0	5,3	+

+: Indução de violaceína foi observada. -: Indução de violaceína não foi observada.

Ambas as taxas de mortalidade de Exemplo de Controle e do grupo de teste de Exemplo Comparativo 20 revelaram ser 50%, e os bezerros mortos exibiram fases tal como fezes barrentas amarelas e amarronzadas, fezes mucosas e com sangue, desidratação, e astasia no momento de amamentação. Em bezerros sobreviventes, diarréia foi observada. As taxas de mortalidade dos bezerros alimentados com os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos 21 e 22 revelaram ser tão baixas quanto 12,5% ou menos, e em particular, a taxa de mortalidade dos bezerros alimentados com o agente de controle de bactéria prejudicial de Exemplo 22 revelou ser 0%.

Enquanto isso, nos conteúdos de intestino delgado dos bezerros de Exemplos 21 e 22, multiplicação de ST foi inibida. Em adição, indução de fatores bacterianos auto-induzidos foi inibida. Os resultados revelam que administração dos agentes de controle de bactéria prejudicial

contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* da presente invenção a bezerros é efetiva em prevenção/tratamento de infecção de ST.

(11) Estudo de desafio de *Clostridium* para pinto

Rações obtidas misturando os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos de Produção 1 a 4 em uma concentração de 0,2% em massa com respeito à massa total de uma ração para pinto (para frango SD em estágio precoce, fabricado por Nippon Formula Feed Mfg Co., Ltd., uma ração não suplementada com nenhuma substância antibacteriana) foram usadas em Exemplos 23 a 26, respectivamente. Pintos dos respectivos 12 grupos, cada grupo consistindo de 12 pintos eclodidos de ovos chocados derivados de frangos (espécie: Chunky), foram permitidos ingerir as rações de Exemplos 23 a 26 por 14 dias. Por outro lado, rações obtidas misturando as composições de Exemplos Comparativos de Produção 1 e 2 em uma concentração de 0,2% em massa foram usadas em Exemplos Comparativos 21 e 22 e alimentadas a 6 grupos. Uma ração obtida misturando lactose ao invés de um agente de controle de bactéria prejudicial em uma concentração de 0,2% em massa foi designada Exemplo de Controle e alimentada a 3 grupos dos pintos da mesma maneira que acima.

Quando os pintos chegaram aos 7 dias de idade, os pintos foram oralmente desafiados por *Clostridium perfringens* (CP) a $1,0 \times 10^6$ CFU/pinto, e $1,0 \times 10^7$ CFU/pinto, ou $1,0 \times 10^8$ /pinto. E quando os pintos chegaram aos 14 dias de idade, o conteúdo cecal e as fezes foram coletados de cada pinto. As fezes foram coletadas limpando a cloaca com esfregões.

As células viáveis de CP nos conteúdos cecais foram contadas pelo seguinte método para calcular índices de infecção e índices de defesa.

1 g de cada conteúdo cecal foi diluído 10 vezes com salina tamponada com fosfato esterilizada, e a solução foi bem misturada para preparar uma solução estoque de amostra. Subseqüentemente, a solução estoque de amostra foi serialmente diluída 10 vezes com salina fisiológica

esterilizada para preparar soluções serialmente diluídas. A solução estoque de amostra e soluções serialmente diluídas foram separadamente borradas em um meio para medir Clostridia (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) em uma quantidade de 0,1 ml e cultivadas anaerobicamente usando Anaeropak: Kenki a 35°C por 24 horas, e o número de colônias pretas multiplicadas em cada meio de placa foi medido. Além disso, células bacterianas foram coletadas das colônias e inoculadas em meio de ágar CW suplementado com gema de ovo (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), e elas foram cultivadas aerobicamente e anaerobicamente a 35°C por 24 a 48 horas para confirmar suas propriedades.

O número de células viáveis de CP em 1 g do conteúdo cecal foi calculado multiplicando o número de colônias confirmadas de serem CP por um fator de diluição da solução diluída. Baseado nos resultados, índices de infecção e índices de defesa foram calculados como segue.

Índice de infecção: valor médio de logaritmos dos números de células viáveis de CP em conteúdos cecais dos respectivos indivíduos (valor médio de log CFU/g)

Índice de defesa: índice de infecção de grupo de controle/índice de infecção de cada grupo de teste

Para cada excremento coletado da cloaca, cultura qualitativa foi realizada pelo seguinte método para observar as propriedades de CP. Isto é, se colônias de CP foram detectadas ou não na cloaca de cada indivíduo foi confirmado por: suspendendo as fezes acopladas a um esfregão em 10 ml de salina tamponada com fosfato esterilizada para preparar uma solução estoque de amostra; borrar a solução em uma quantidade de 0,1 ml em um meio para medir Clostridia; realizando cultura anaeróbica a 35°C por 24 horas usando Anaeropak: Kenki para avaliar formação de colônias pretas multiplicadas em cada meio de placa; coletando a bactéria das colônias; inoculando-as para meio de ágar CW suplementado com gema de ovo; e realizando cultura

aeróbica e cultura anaeróbica a 35°C por 24 a 48 horas.

Em adição, as concentrações celulares da bactéria *Bacillus* adicionada nas fezes durante o período de criação foram medidas para calcular concentrações médias para os respectivos grupos.

- 5 Os resultados de desafio de CP a $1,0 \times 10^6$ CFU são mostrados em Tabela 10; os resultados de desafio de CP a $1,0 \times 10^7$ CFU são mostrados em Tabela 11; e os resultados de desafio de CP a $1,0 \times 10^8$ CFU são mostrados em Tabela 12.

Tabela 10

Desafio de CP a $1,0 \times 10^6$ CFU

	Número de células viáveis em conteúdo cecal		Número de indivíduos cujas fezes, coletadas a partir da cloaca, contêm CP Número de pintos de teste (12)	Concentração celular de bactéria <i>Bacillus</i> adicionada em fezes ($\times 10^6$ CFU/g)
	Índice de infecção	Índice de defesa		
Exemplo 23	3,3	2,3	6	19,5
Exemplo 24	3,8	2,0	4	25,3
Exemplo 25	3,2	2,3	6	31,4
Exemplo 26	3,6	2,1	5	22,1
Exemplo Comparativo 21	5,3	1,4	11	0,6
Exemplo Comparativo 22	5,7	1,3	12	0,5
Exemplo de Controle	7,5	-	12	0,0

Tabela 11

Desafio de CP a $1,0 \times 10^7$ CFU

	Número de células viáveis em conteúdo cecal		Número de indivíduos cujas fezes, coletadas a partir da cloaca, contêm CP Número de pintos de teste (12)	Concentração celular de bactéria <i>Bacillus</i> adicionada em fezes ($\times 10^6$ CFU/g)
	Índice de infecção	Índice de defesa		
Exemplo 23	4,4	1,8	11	15,6
Exemplo 24	4,0	2,0	9	29,9
Exemplo 25	4,3	1,9	10	27,4
Exemplo 26	4,1	2,0	10	24,5
Exemplo Comparativo 21	6,2	1,3	12	0,4
Exemplo Comparativo 22	6,6	1,2	12	0,5
Exemplo de Controle	8,1	-	12	0,0

Tabela 12

Desafio de CP a $1,0 \times 10^8$ CFU

	Número de células viáveis em conteúdo cecal		Número de indivíduos cujas fezes, coletadas a partir da cloaca, contêm CP Número de pintos de teste (12)	Concentração celular de bactéria <i>Bacillus</i> adicionada em fezes ($\times 10^6$ CFU/g)
	Índice de infecção	Índice de defesa		
Exemplo 23	6,3	1,2	12	22,3
Exemplo 24	6,0	1,3	12	18,7
Exemplo 25	5,9	1,3	11	30,3
Exemplo 26	6,1	1,3	11	17,3
Exemplo Comparativo 21	7,7	1,1	12	0,5
Exemplo Comparativo 22	7,9	1,0	12	0,5
Exemplo de Controle	7,8	-	12	0,0

Nas fezes dos pintos alimentados com as rações contendo *Bacillus thuringiensis* de Exemplos 23 a 26 da presente invenção, a bactéria *Bacillus* adicionada foi detectada em concentrações de $1,5 \times 10^7$ CFU/g (grama de excremento bruto de pinto) ou mais, que foram significativamente maiores do que aquelas nas fezes dos pintos alimentados com as rações de Exemplos Comparativos. No caso de desafio de CP a $1,0 \times 10^6$ CFU, os índices de infecção de CP foram extremamente baixos, resultando em altos índices de defesa, enquanto que no caso de desafio de CP a $1,0 \times 10^7$ CFU, efeito de inibir multiplicação de CP foi diminuído. Em adição, no caso de desafio de CP a $1,0 \times 10^8$ CFU, efeito de inibir multiplicação de CP não foi suficiente. No caso onde os pintos alimentados com as rações de Exemplos Comparativos 21 e 22 foram desafiados por uma pequena quantidade de CP, multiplicação de CP foi ligeiramente inibida comparada com Exemplo de Controle.

Os resultados revelam que, quando as rações contendo os agentes de controle de bactéria prejudicial da presente invenção são dadas, a *Bacillus thuringiensis* não é morta no estômago e forma colônias no intestino. Os resultados revelam adicionalmente que, no caso onde o número de células de CP administradas é menor do que o número de células viáveis de *Bacillus thuringiensis* em 1 g do conteúdo cecal, o efeito de inibir multiplicação de CP

é particularmente alto. Portanto, *Bacillus thuringiensis* é considerado formar colônias no intestino e excluir competitivamente CP.

(12) Estudo de desafio de bactéria *Clostridium* para bezerro

5 Bezerros machos de uma semana de idade (Holstein) dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 8 bezerros, foram criados. Rações obtidas misturando os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos de Produção 2 e 3 em uma concentração de 2,0% em massa com uma ração misturada para bezerro (Miracle Mate, fabricado por Scientific Feed Laboratory Co., Ltd.) foram usadas em Exemplos 27 e 28, 10 respectivamente, enquanto que uma ração obtida misturando a composição de Exemplo Comparativo de Produção 1 em uma concentração de 2,0% foi designada Exemplo Comparativo 23. Em adição, uma ração obtida adicionando lactose ao invés de um agente de controle de bactéria prejudicial em uma quantidade igual foi designada Exemplo de Controle. Estas rações 15 misturadas para bezerro foram dadas aos bezerros até que os bezerros chegassem a 4 semanas de idade. Quando os bezerros chegaram a 2 semanas de idade, os bezerros foram oralmente desafiados por *Clostridium perfringens* (CP) a $3,1 \times 10^7$ CFU/bezerro. Os bezerros foram criados até que os bezerros chegassem a 4 semanas de idade, e as taxas de mortalidade dos bezerros dos 20 respectivos grupos foram calculadas.

Em adição, os conteúdos de intestino delgado foram coletados, e os números de células viáveis de CP foram medidos pelo mesmo método do que acima para calcular índices de infecção e índices de defesa.

Os resultados são mostrados em Tabela 13.

25

Tabela 13

	Taxa de mortalidade 14 dias depois de infecção de CP (%)	Número de células viáveis de CP em conteúdo de intestino delgado	
		Índice de infecção	Índice de defesa
Exemplo 27	0	4,2	2,1
Exemplo 28	0	3,5	2,5
Exemplo Comparativo 23	25	6,9	1,3
Exemplo de Controle	38	8,7	-

Embora a taxa de mortalidade de Exemplo de Controle e a taxa de mortalidade do grupo de teste de Exemplo Comparativo 23 tenham sido 38% e 25%, respectivamente, a taxa de mortalidade dos grupos de teste alimentados com a ração de Exemplo 27 e 28 foram 0%.

5 Nos bezerros alimentados com as rações de Exemplos 27 e 28, os índices de infecção de CP foram muito baixos, e os índices de defesa foram altos. Os resultados revelam que administração de uma ração contendo um agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção é efetiva em prevenção/tratamento de doença infecciosa de CP de bezerros.

10 (13) Estudo de desafio de *Clostridium* para filhote de porco

 Filhotes de porco machos de três semanas de idade (Large Yorkshire) dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 25 porcos, foram criados. Rações obtidas misturando os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos de Produção 2 e 3 em uma quantidade de 0,5% em
15 massa com respeito à massa total de uma ração para filhote de porco (para filhote de porco SD leite sintético em estágio precoce, fabricado por Nippon Formula Feed Mfg Co., Ltd., uma ração não suplementada com nenhuma substância antibacteriana) foram usadas em Exemplos 29 e 30, respectivamente, e elas foram dadas aos porcos até que os porcos chegassem a
20 6 semanas de idade. Por outro lado, uma ração obtida misturando a composição de Exemplo Comparativo de Produção 1 foi designada Exemplos Comparativos 24, e uma ração obtida misturando lactose ao invés de um agente de controle de bactéria prejudicial foi designada Exemplo de Controle. As rações foram dadas aos filhotes de porco da mesma maneira que acima.

25 Quando os porcos chegaram a 4 semanas de idade, os porcos foram oralmente desafiados por *Clostridium perfringens* (CP) a $1,8 \times 10^7$ CFU/porco. Os porcos foram criados até que eles chegassem a 6 semanas de idade, e as taxas de mortalidade de porcos dos respectivos grupos foram calculadas. Enquanto isso, os conteúdos de intestino delgado foram coletados,

e os números de células viáveis no conteúdo de intestino delgados foram medidos da mesma maneira que acima para calcular índices de infecção e índices de defesa.

Os resultados são mostrados em Tabela 14.

5

Tabela 14

	Taxa de mortalidade 14 dias depois de infecção de CP (%)	Número de células viáveis de CP em conteúdo de intestino delgado	
		Índice de infecção	Índice de defesa
Exemplo 29	12	3,9	2,3
Exemplo 30	8	4,1	2,2
Exemplo Comparativo 24	48	7,7	1,2
Exemplo de Controle	60	8,9	-

10

Embora a taxa de mortalidade de Exemplo de Controle e a taxa de mortalidade do grupo de teste alimentado com a ração de Exemplo Comparativo 24 tenham sido 60% e 48%, respectivamente, a taxa de mortalidade do grupo de teste alimentado com a ração de Exemplo 29 e a taxa de mortalidade do grupo de teste alimentado com a ração de Exemplo 30 foram 12% e 8%, respectivamente.

15

Nos casos dos grupos de teste alimentados com as rações de Exemplos 29 e 30, os índices de infecção de CP foram muito baixos, e os índices de defesa foram altos. Os resultados revelam que administração de uma ração contendo um agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção é efetiva em prevenção/tratamento de doença infecciosa de CP de porcos.

(14) Produção de agente de controle de bactéria prejudicial

20

O meio de formação de esporo usado no item (3) foi usado para cultivar BGSC 4A3, BGSC 4D1, BGSC 4J4, e BGSC 4Q7 a 37°C por 72 horas em um líquido. As soluções de cultura resultantes foram centrifugadas para coletar as células bacterianas. Água esterilizada foi adicionada a isto de forma que a densidade de esporos atingiu 1×10^9 CFU/ml para produzir agentes de controle de bactéria prejudicial, que foram usados como Exemplos 31 a 34, respectivamente. A densidade de esporos foi medida: diluindo um

25

agente de controle de bactéria prejudicial produzido para uma concentração apropriada usando água esterilizada; aquecendo o agente a 70°C por 30 minutos para matar apenas células vegetativas; inoculando as células para um meio de ágar normal; e contando o número de colônias formadas.

5 Por outro lado, composições produzidas da mesma maneira que acima usando *Bacillus coagulans* NBRC12583 e *Bacillus subtilis* NBRC3009 foram usadas em Exemplos Comparativos 25 e 26, respectivamente.

(15) Teste de criação de rato

10 Alimentação preliminar de ratos SD (Oriental Yeast Co., Ltd., machos, peso corporal inicial de 120 g) foi realizada permitindo-os ingerir livremente água e uma ração para animais experimentais, MF (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.) em uma temperatura de criação de 23°C por uma semana para confirmar a ausência de aparências e comportamentos anormais.

15 Subseqüentemente, a suspensão de esporos de Exemplo 31 foi diluída com água esterilizada para preparar agentes de controle de bactéria prejudicial com concentrações de esporos de 1×10^6 CFU/ml, 1×10^7 CFU/ml, e 1×10^8 CFU/ml. O agente de controle de bactéria prejudicial de Exemplo 31 foi oralmente administrado a ratos dos respectivos grupos, cada grupo

20 consistindo de 10 ratos, uma vez por dia em uma quantidade de 1 ml por rato usando um tubo de estômago. Da mesma maneira que acima, testes foram realizados para agentes de controle de bactéria prejudicial contendo as suspensões de esporos de Exemplos 32 a 34 e para as composições contendo as suspensões de esporos de Exemplos Comparativos 25 e 26. Em adição,

25 uma composição contendo água esterilizada ao invés de uma suspensão de esporos foi designada Exemplo de Controle, a qual foi usada em um teste da mesma maneira que acima.

3 semanas depois, os pesos corporais dos ratos dos respectivos grupos foram medidos, e os valores médios de ganhos de peso dos grupos

foram calculados. Além disso, fezes de um dia foram coletadas, e as concentrações de células da bactéria adicionada foram medidas para calcular os valores médios dos respectivos grupos.

Os resultados são mostrados em Tabela 15 e 16.

5

Tabela 15

	Aumento médio em peso corporal de ratos depois de 3 semanas (g)		
	Dose 1×10^6 CFU/rato/dia	Dose 1×10^7 CFU/rato/dia	Dose 1×10^8 CFU/rato/dia
Exemplo 31	156	166	172
Exemplo 32	155	169	171
Exemplo 33	155	167	169
Exemplo 34	157	168	170
Exemplo Comparativo 25	146	143	141
Exemplo Comparativo 26	142	144	138
Exemplo de Controle	130		

Tabela 16

	Concentração celular bacteriana de bactéria adicionada em fezes (CFU/rato/dia)		
	Dose 1×10^6 CFU/rato/dia	Dose 1×10^7 CFU/rato/dia	Dose 1×10^8 CFU/rato/dia
Exemplo 31	$6,5 \times 10^7$	$8,2 \times 10^7$	$9,7 \times 10^7$
Exemplo 32	$8,6 \times 10^7$	$8,9 \times 10^7$	$11,5 \times 10^7$
Exemplo 33	$8,4 \times 10^7$	$9,2 \times 10^7$	$12,1 \times 10^7$
Exemplo 34	$7,9 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$	$10,8 \times 10^7$
Exemplo Comparativo 25	$0,03 \times 10^7$	$0,5 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
Exemplo Comparativo 26	$0,06 \times 10^7$	$0,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
Exemplo de Controle	0		

Durante o período de teste, mudanças anormais tal como morte, doenças, e diarreia não foram observadas em todos os grupos. O ganho de peso corporal dos ratos alimentados com os agentes de controle de bactéria prejudicial contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* de Exemplos 31 a 34 foi maior do que aquele dos ratos alimentados com as composições de Exemplos Comparativos 25 e 26. Nas fezes dos ratos alimentados com os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos 31 a 34, a bactéria adicionada foi detectada em uma concentração de $6,5 \times 10^7$ CFU/rato/dia ou mais, que é significativamente maior do que aquelas de Exemplos Comparativos. Quando a bactéria foi administrada em uma alta concentração, o ganho de peso dos ratos se tornou maior. Os resultados revelam que esporos de *Bacillus thuringiensis* da presente invenção podem formar colônias no

10

15

intestino pois eles não são mortos nos tratos digestivos tal como estômago e intestinos de um rato e podem promover o ganho de peso do rato.

(16) Teste de defesa para infecção de bactéria *Salmonella*

Alimentação preliminar de camundongos SPF de 7 semanas de idade (BALB/c, Oriental Yeast Co., Ltd., machos) foi realizada permitindo-os ingerir livremente água e uma ração para animais experimentais, MF (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.) em uma temperatura de criação de 23°C por uma semana para confirmar a ausência de aparências e comportamentos anormais. O agente de controle de bactéria prejudicial contendo a suspensão de esporos de Exemplo 31 foi oralmente administrado a camundongos dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 10 camundongos, uma vez por dia em uma quantidade de 100 µl por camundongo usando um tubo de estômago. Da mesma maneira que acima, testes foram realizados para os agentes de controle de bactéria prejudicial contendo as suspensões de esporos de Exemplos 32 a 34 e as composições contendo as suspensões de esporos de Exemplos Comparativos 25 e 26. Em adição, uma composição contendo água esterilizada ao invés de uma suspensão de esporos foi designada Exemplo de Controle, a qual foi testada da mesma maneira que acima.

7 dias depois do começo de administração das suspensões de esporos, os camundongos foram oralmente desafiados por *Salmonella* Typhimurium (ST) a $1,4 \times 10^4$ /camundongo usando um tubo de estômago. Em dia 14 de desafio oral de ST, os conteúdos cecais foram coletados. As células viáveis de ST foram medidas pelo seguinte método. 1 g de cada conteúdo cecal foi diluído 10 vezes com salina tamponada com fosfato esterilizada, e a solução foi bem misturada para preparar uma solução estoque de amostra. Subseqüentemente, a solução estoque de amostra foi serialmente diluída 10 vezes com salina fisiológica esterilizada para preparar soluções serialmente diluídas. A solução estoque de amostra e soluções serialmente

diluídas foram separadamente borradas em meio de placa de ágar SS “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) em um meio de placa de ágar verde brilhante (fabricado por Difco Laboratories) em uma quantidade de 0,1 ml, e cultura foi realizada a 37°C por 24 horas, seguido por medida do número de colônias típicas de ST multiplicadas em cada meio de placa. Além disso, células bacterianas foram coletadas das colônias e inoculadas em meio de ágar SIM “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) e meio de ágar TSI para teste de descarboxilação de lisina “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), e elas foram cultivadas a 37°C por 24 horas para confirmar suas propriedades. O número de células viáveis de ST em 1 g de um excremento foi calculado multiplicando o número de colônias confirmadas de serem ST por um fator de diluição da solução diluída.

Além disso, a presença ou ausência de homoserina lactona no conteúdo cecal foi avaliada. Da mesma maneira que o método no item (S) acima, uma extração de um conteúdo cecal foi adicionada em gotas à superfície do meio LB disposto com CV026, e cultura foi realizada, seguido por observação de indução de violaceína ao redor das regiões onde o extrato foi adicionado em gotas.

Os resultados são mostrados em Tabela 17.

Tabela 17

	Taxa de mortalidade 14 dias depois de infecção de ST (%)	Número de células viáveis de ST em conteúdo cecal (log CFU/g)	Indução de violaceína
Exemplo 31	0	1,9	-
Exemplo 32	0	1,5	-
Exemplo 33	0	1,3	-
Exemplo 34	0	2,0	-
Exemplo Comparativo 25	0	6,7	+
Exemplo Comparativo 26	10	7,1	+
Exemplo de Controle	30	8,5	+

20 +: Indução de violaceína foi observada.

-: Indução de violaceína não foi observada.

Nos casos dos camundongos alimentados com o agente de controle de bactéria prejudicial contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* de Exemplos 31 a 34 da presente invenção, os números de células viáveis de ST nos conteúdos cecais foram muito menores do que aqueles dos camundongos

alimentados com as composições de Exemplos Comparativos 25 e 26, e formação de microgranulomas no baço e linfonodos mesentéricos e mudanças inflamatórias no ceco não foram observadas de maneira nenhuma. Nos casos dos camundongos alimentados com as composições de Exemplos Comparativos, multiplicação de ST foi apenas ligeiramente inibida comparada com Exemplo de Controle, e formação de microgranulomas no baço e linfonodos mesentéricos e mudanças inflamatórias no ceco foram observados. Enquanto isso, com os Exemplos de Controle, formação de microgranulomas no baço e linfonodos mesentéricos e mudanças inflamatórias no ceco foram observados. Os resultados revelam que administração de esporos de *Bacillus thuringiensis* pode inibir multiplicação de ST e inibir expressão de fatores bacterianos auto-induzidos. Isto é, administração de esporos de *Bacillus thuringiensis* é efetiva em prevenção/tratamento de doenças infecciosas intestinais causadas por ST.

(17) Teste de defesa para infecção de bactéria *Vibrio*

Alimentação preliminar de camundongos SPF de 7 semanas de idade (ICR, Oriental Yeast Co., Ltd., machos) foi realizada da mesma maneira que no item (16) acima para confirmar a ausência de aparências e comportamentos anormais. Um agente de controle de bactéria prejudicial contendo a suspensão de esporos de Exemplo 31 foi oralmente administrado a camundongos dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 10 camundongos, uma vez por dia em uma quantidade de 100 µl por camundongo usando um tubo de estômago. Da mesma maneira que acima, testes foram realizados para agentes de controle de bactéria prejudicial contendo as suspensões de esporos de Exemplos 32 a 34 e as composições contendo as suspensões de esporos de Exemplos Comparativos 25 e 26. Em adição, uma composição contendo água esterilizada ao invés de uma suspensão de esporos foi designada Exemplo de Controle, a qual foi testada da mesma maneira que acima.

7 dias depois do começo de administração das suspensões de esporos, os camundongos foram oralmente desafiados por *Vibrio parahaemolyticus*

(VP) a $2,1 \times 10^7$ / camundongo usando um tubo de estômago. Em dia 14 de desafio oral de VP, os conteúdos de intestino delgado foram coletados. As células viáveis de VP foram medidas pelo seguinte método. 1 g de cada conteúdo de intestino delgado foi diluído 10 vezes com Caldo Sal Polimixina “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), e a solução foi bem misturada para preparar uma solução estoque de amostra. Subseqüentemente, a solução estoque de amostra foi serialmente diluída 10 vezes com Caldo Sal Polimixina para preparar soluções serialmente diluídas. A solução estoque de amostra e soluções serialmente diluídas foram separadamente borradas em um meio de ágar TCBS “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) em uma quantidade de 0,1 ml, e cultura foi realizada a 37°C por 18 horas, seguido por medida do número de colônias típicas de VP multiplicadas em cada meio de placa. O número de células viáveis de VP em 1 g do conteúdo de intestino delgado foi calculado multiplicando o número de colônias por um fator de diluição da solução diluída.

Além disso, a presença ou ausência de homoserina lactona no conteúdo de intestino delgado foi avaliada. Da mesma maneira que o método no item (8) acima, uma extração de um conteúdo de intestino delgado foi adicionada em gotas à superfície do meio LB disposto com CV026, e cultura foi realizada, seguido por observação de indução de violaceína ao redor das regiões onde o extrato foi adicionado em gotas.

Os resultados são mostrados em Tabela 18.

Tabela 18

	Taxa de mortalidade 14 dias depois de infecção de VP (%)	Número de células viáveis de VP em conteúdo de intestino delgado (log CFU/g)	Indução de violaceína
Exemplo 31	10	4,7	-
Exemplo 32	0	3,9	-
Exemplo 33	10	4,2	-
Exemplo 34	0	4,8	-
Exemplo Comparativo 25	20	6,6	+
Exemplo Comparativo 26	40	6,4	+
Exemplo de Controle	40	7,2	+

+: Indução de violaceína foi observada.

-: Indução de violaceína não foi observada.

Nos casos dos camundongos alimentados com os agentes de controle de bactéria prejudicial contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* de Exemplos 31 a 34 da presente invenção, os números de células viáveis de VP nos conteúdos de intestino delgado foram menores, e inchaço do intestino delgado e plenitude de conteúdo de intestino foram dificilmente observados. Por outro lado, nos casos dos camundongos alimentados com as composições de Exemplos Comparativos 25 e 26, multiplicação de VP foi apenas ligeiramente inibida comparada com Exemplo de Controle, e intestino delgado inchado avermelhado e plenitude de conteúdo de intestino foram observados. Os resultados revelam que administração dos esporos de *Bacillus thuringiensis* pode inibir multiplicação de VP e inibir expressão de fatores bacterianos auto-induzidos. Isto é, administração de esporos de *Bacillus thuringiensis* é efetiva em prevenção/tratamento de doenças infecciosas intestinais causadas por VP.

(18) Teste de defesa para infecção de bactéria *Campylobacter*

Alimentação preliminar de camundongos SPF de 7 semanas de idade (BALB/c, Oriental Yeast Co., Ltd., machos) foi realizada da mesma maneira que no item (16) acima para confirmar a ausência de aparências e comportamentos anormais. Um agente de controle de bactéria prejudicial contendo a suspensão de esporos de Exemplo 31 foi oralmente administrado a camundongos dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 10 camundongos, uma vez por dia em uma quantidade de 100 µl por camundongo usando um tubo de estômago. Da mesma maneira que acima, testes foram realizados para agentes de controle de bactéria prejudicial contendo as suspensões de esporos de Exemplos 32 a 34 e as composições contendo as suspensões de esporos de Exemplos Comparativos 25 e 26. Em adição, uma composição contendo água esterilizada ao invés de uma suspensão de esporos foi designada Exemplo de Controle, a qual foi testada da mesma maneira que acima.

7 dias depois do começo de administração das suspensões de esporos, os camundongos foram oralmente desafiados por *Campylobacter*

jejuni (CJ) a $1,7 \times 10^7$ /camundongo usando um tubo de estômago. Em dia 14 de desafio oral de CJ, os conteúdos de intestino delgado foram coletados. As células viáveis de CJ foram medidas pelo seguinte método. 1 g de cada conteúdo de intestino delgado foi diluído 10 vezes com salina tamponada com fosfato esterilizada, e a solução foi bem misturada para preparar uma solução estoque de amostra. Subseqüentemente, a solução estoque de amostra foi serialmente diluída 10 vezes com salina tamponada com fosfato esterilizada para preparar soluções serialmente diluídas. A solução estoque de amostra e soluções serialmente diluídas foram separadamente borradas em um meio Skirrow modificado (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) em uma quantidade de 0,1 ml, e cultura foi realizada a 42°C por 2 ou 3 dias em condições microaeróbicas usando Anaeropack: Campylo (fabricado por Mitsubishi Gas. Chemical Co., Ltd.), seguido por medida do número de colônias típicas de CJ multiplicadas em cada meio de placa. O número de células de CJ em 1 g do conteúdo de intestino delgado foi calculado multiplicando o número de colônias confirmadas de serem CJ por um fator de diluição da solução diluída.

Além disso, a presença ou ausência de homoserina lactona no conteúdo de intestino delgado foi avaliada. Da mesma maneira que o método no item (8) acima, uma extração de um conteúdo de intestino delgado foi adicionada em gotas à superfície do meio LB disposto com CV026, e cultura foi realizada, seguido por observação de indução de violaceína ao redor das regiões onde o extrato foi adicionado em gotas.

Os resultados são mostrados em Tabela 19.

Tabela 19

	Taxa de mortalidade 14 dias depois de infecção de CJ (%)	Número de células viáveis de CJ em conteúdo de intestino delgado (log CFU/g)	Indução de violaceína
Exemplo 31	0	2,2	-
Exemplo 32	0	1,4	-
Exemplo 33	0	1,8	-
Exemplo 34	0	2,0	-
Exemplo Comparativo 25	0	2,8	+
Exemplo Comparativo 26	0	2,7	+
Exemplo de Controle	0	3,1	+

+: Indução de violaceína foi observada.

-: Indução de violaceína não foi observada.

Nos casos dos camundongos alimentados com o agente de controle de bactéria prejudicial contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* de Exemplos 31 a 34 da presente invenção, as concentrações de células de CJ nos conteúdos de intestino delgado foram baixas, e edema e lesões hemorrágicas na mucosa intestinal do intestino delgado não foram observados. Por outro lado, nos casos dos camundongos alimentados com as composições de Exemplos Comparativos 25 e 26, multiplicação de CJ foi apenas ligeiramente inibida comparada com Exemplo de Controle, e edema e lesões hemorrágicas na mucosa intestinal do intestino delgado foram observados. Enquanto isso, com o Exemplo de Controle, edema e lesões hemorrágicas na mucosa intestinal do intestino delgado foram observados. Os resultados revelam que administração dos esporos de *Bacillus thuringiensis* pode inibir multiplicação de CJ e pode inibir expressão de fatores bacterianos auto-induzidos. Isto é, administração dos esporos de *Bacillus thuringiensis* é efetiva em prevenção/tratamento de doenças infecciosas intestinais causadas por CJ.

(19) Estudo de desafio de *Bacillus* para camundongo

Alimentação preliminar de camundongos SPF de 7 semanas de idade (ICR, Oriental Yeast Co., Ltd., machos) foi realizada permitindo-os ingerir livremente água e uma ração para animais experimentais, MF (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.) em uma temperatura de criação de 23°C por uma semana para confirmar a ausência de aparências e comportamentos anormais. O agente de controle de bactéria prejudicial de Exemplo 31 foi oralmente administrado a camundongos dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 10 camundongos, uma vez por dia em uma quantidade de 100 µl por camundongo por 21 dias usando um tubo de estômago. Da mesma maneira que acima, testes foram realizados para os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos 32 a 34 e as composições de Exemplos Comparativos 25 e 26. Em adição, uma

composição contendo água esterilizada ao invés de uma suspensão de esporos foi designada Exemplo de Controle, a qual foi testada da mesma maneira que acima.

5 7 dias depois do começo de administração das suspensões de esporos, os camundongos foram oralmente desafiados por um mutante resistente a canamicina de *Bacillus cereus* (BC) (linhagem BC Km) a 1.0×10^8 CFU/camundongo administrando oralmente uma quantidade de 100µl de composição usando um tubo de estômago.

10 A linhagem BC Km foi preparada de acordo com o seguinte procedimento. Isto é, BC foi cultivada em um meio de caldo (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) a 37°C por 16 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 4°C, e elas foram lavadas com água esterilizada uma vez e suspensas em água esterilizada de novo. As células foram irradiadas com raios ultravioletas a uma distância 20 cm de uma luz UV e
15 suspensas no meio de caldo, e cultura foi realizada a 37°C por 4 horas. A solução de cultura (0,1 µl) foi borrada em um meio (NAKm) obtido adicionando sulfato de canamicina (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a um meio de ágar normal (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) em uma concentração de 200 ppm, e cultura foi
20 realizada a 37°C. Depois de cultura, colônias formadas em NAKm foram isoladas e usadas como uma linhagem BC Km.

Em dia 14 de desafio oral da linhagem BC Km (a seguir, referida como BC), as taxas de mortalidade dos respectivos grupos foram calculadas. Enquanto isso, o conteúdo de intestino grosso foi coletado, e o
25 número de células viáveis de BC no conteúdo de intestino grosso foi medido pelo seguinte método. 1 g do conteúdo de intestino grosso foi diluído 10 vezes com salina tamponada com fosfato esterilizada, e o conjunto foi bem misturado para preparar uma solução estoque de amostra. Subseqüentemente, a solução estoque de amostra foi serialmente diluída 10 vezes com salina

fisiológica esterilizada para preparar soluções serialmente diluídas. A solução estoque de amostra e soluções serialmente diluídas foram separadamente aplicadas em uma quantidade de 0,1 ml em um meio obtido adicionando sulfato de canamicina (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) em uma concentração de 200 ppm a meio de ágar NGKG suplementado com gema de ovo (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), e cultura foi realizada a 30°C por 18 horas, seguido por medida do número de colônias típicas de BC multiplicadas em cada meio de placa. O número de células viáveis de BC em 1 g do conteúdo de intestino grosso foi calculado multiplicando o número de colônias confirmadas de serem BC por um fator de diluição da solução diluída. Baseado nos resultados, os índices de infecção e índices de defesa foram calculados como segue.

Índice de infecção: Valor médio de logaritmos dos números de células viáveis de BC nos intestinos grossos dos respectivos indivíduos (valor médio de log CFU/g)

Índice de defesa: Índice de infecção de grupo de controle/Índice de infecção de cada grupo de teste

Os resultados são mostrados em Tabela 20.

	Taxa de mortalidade 14 dias depois de infecção de BC (%)	Número de células viáveis de BC em conteúdo de intestino grosso	
		Índice de infecção	Índice de defesa
Exemplo 31	0	4,3	1,6
Exemplo 32	0	4,4	1,5
Exemplo 33	0	4,5	1,5
Exemplo 34	0	4,2	1,6
Exemplo Comparativo 25	0	6,5	1,0
Exemplo Comparativo 26	0	6,7	1,0
Exemplo de Controle	0	6,8	-

Nos casos de todos os grupos de teste de Exemplos, Exemplos Comparativos, e Exemplo de Controle, as taxas de mortalidade revelaram ser 0%. Os grupos de teste alimentados com os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos 31 a 34 exibiram índices de infecção de BC menores e índices de defesa maiores do que aqueles dos grupos de teste alimentados

com as composições de Exemplos Comparativos. Os resultados revelam que os agentes de controle de bactéria prejudicial da presente invenção são efetivos em prevenção/tratamento de doenças infecciosas intestinais causadas por BC.

5 (20) Estudo de desafio de *Staphylococcus* para camundongo

Alimentação preliminar de camundongos SPF de 7 semanas de idade (ICR, Oriental Yeast Co., Ltd., machos) foi realizada da mesma maneira que no item (19) acima para confirmar a ausência de aparências e comportamentos anormais. *Staphylococcus aureus* (SA) foi colonizado no
10 trato intestinal de cada camundongo pelo seguinte método de Ida et al. (Takashi Ida, Atsushi Tamura, Katsumi Kawarajo, Jingoro Shimada, Chemotherapy, 42, pp. 923-930 (1994)). Primeiro, uma solução aquosa de 10 mg/ml de ampicilina sódica (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) foi preliminarmente administrada a todos os camundongos em uma
15 quantidade de 100 µl por camundongo usando um tubo de estômago uma vez por dia por 3 dias. No dia seguinte da conclusão de administração de ampicilina sódica, uma composição obtida adicionando SA ao agente de controle de bactéria prejudicial de Exemplo 31 a $5,0 \times 10^7$ CFU foi oralmente administrada a camundongos dos respectivos grupos, cada grupo consistindo
20 de 10 camundongos, uma vez por dia em uma quantidade de 100 µl por camundongo usando um tubo de estômago. A partir de 2 dias depois da conclusão de administração de ampicilina sódica, o agente de controle de bactéria prejudicial de Exemplo 31 foi oralmente administrado uma vez por dia em uma quantidade de 100 µl por 13 dias. Em adição, os agentes de
25 controle de bactéria prejudicial de Exemplos 32 a 34, as composições de Exemplos Comparativos 25 e 26, e uma composição de Exemplo de Controle, que foi produzida usando água esterilizada ao invés de uma suspensão de esporos, foram oralmente administrados da mesma maneira que acima e testados.

Em dia 14 do desafio oral de SA, as taxas de mortalidade dos respectivos grupos foram calculadas. Enquanto isso, o conteúdo de intestino grosso foi coletado, e o número de células viáveis de SA no conteúdo de intestino grosso foi medido pelo seguinte método. 1 g do conteúdo de intestino grosso foi diluído 10 vezes com salina tamponada com fosfato esterilizada, e o conjunto foi bem misturado para preparar uma solução estoque de amostra. Subseqüentemente, a solução estoque de amostra foi serialmente diluída 10 vezes com salina fisiológica esterilizada para preparar soluções serialmente diluídas. A solução estoque de amostra e soluções serialmente diluídas foram separadamente borradas em um meio de ágar ovo sal “Nissui” (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) em uma quantidade de 0,1 ml, e cultura foi realizada a 37°C por 48 horas, seguido por medida do número de colônias típicas de SA multiplicadas em cada meio de placa. O número de células viáveis de SA em 1 g do conteúdo de intestino grosso foi calculado multiplicando o número de colônias confirmadas de serem SA por um fator de diluição da solução diluída. Baseado nos resultados, os índices de infecção e índices de defesa foram calculados como segue.

Índice de infecção: Valor médio de logaritmos dos números de células viáveis de SA nos intestinos grossos dos respectivos indivíduos (valor médio de log CFU/g)

Índice de defesa: índice de infecção de grupo de controle/índice de infecção de cada grupo de teste

Os resultados são mostrados em Tabela 21.

Tabela 21

	Taxa de mortalidade 14 dias depois de infecção de SA (%)	Número de células viáveis de SA em conteúdo de intestino grosso	
		Índice de infecção	Índice de defesa
Exemplo 31	0	3,2	1,6
Exemplo 32	0	3,0	1,7
Exemplo 33	0	3,1	1,6
Exemplo 34	0	3,0	1,7
Exemplo Comparativo 25	0	4,6	1,1
Exemplo Comparativo 26	0	4,8	1,0
Exemplo de Controle	0	5,0	-

Nos casos de todos os grupos de teste de Exemplos, Exemplos Comparativos, e Exemplo de Controle, as taxas de mortalidade revelaram ser 0%. Os grupos de teste alimentados com os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos 31 a 34 exibiram índices de infecção de SA menores e índices de defesa maiores do que aqueles dos grupos de teste alimentados com as composições de Exemplos Comparativos. Os resultados revelam que os agentes de controle de bactéria prejudicial da presente invenção são efetivos em prevenção/tratamento de doenças infecciosas intestinais causadas por SA.

(21) Estudo de desafio de *Streptococcus* para camundongo

10 Alimentação preliminar de camundongo SPF de 7 semanas de idade (ICR, Oriental Yeast Co., Ltd., machos) foi realizada da mesma maneira que no item (19) acima para confirmar a ausência de aparências e comportamentos anormais. O agente de controle de bactéria prejudicial de Exemplo 31 foi cheio em um mecanismo de alimentação de água, e camundongos dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 10 camundongos, foram permitidos ingerir livremente água por 21 dias. O mecanismo de alimentação de água foi trocado a cada dia para trocar o agente por um agente de controle de bactéria prejudicial fresco (suspensão de esporo). Da mesma maneira que acima, os agentes de controle de bactéria prejudicial de Exemplos 32 a 34 e as composições de Exemplos Comparativos 25 e 26 foram administrados. Em adição, uma composição contendo água esterilizada ao invés de uma suspensão de esporos foi designada Exemplo de Controle e administrada da mesma maneira que acima.

20 7 dias depois do começo de administração das suspensões de esporos, $1,1 \times 10^8$ CFU de *Streptococcus suis* (SS) foi infundido em um esfregão pré-esterilizado em uma quantidade de 100 μ l de composição, e os camundongos foram oralmente desafiados pelo SS girando suavemente o esfregão na cavidade oral de cada camundongo por 30 segundos. Depois de desafio de SS, os camundongos foram observados a cada dia para calcular as proporções de indivíduos que desenvolveram sintomas neurológicos tal como

torcicolo e comportamento giratório e indivíduos mortos. Para um indivíduo morto, o sangue foi assepticamente coletado a partir do coração enquanto que o pulmão, fígado, baço, rim, e fluido cerebrospinal foram assepticamente coletados. Além disso, um esfregão pré-esterilizado foi usado para coletar tecidos de garganta. Em dia 14 de administração de SS, os respectivos tecidos foram coletados a partir de camundongos sobreviventes da mesma maneira que acima. Imediatamente depois de coleta, os tecidos foram cultivados a 37°C por 24 horas em caldo de Todd Hewitt (fabricado por Oxoid). Um meio onde multiplicação foi observada foi adicionalmente inoculado em um meio de ágar infusão coração (fabricado por fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) suplementado com 5% em volume de sangue de ovelhas, e cultura foi realizada a 37°C por 24 a 48 horas para confirmar as propriedades. Um tecido que foi confirmado conter SS foi julgado como positivo, e a proporção de indivíduos julgados como positivos para cada tecido foi calculada e definida como uma proporção positiva de SS.

Enquanto isso, o cérebro foi fixado com uma solução de 10% de formalina tamponada, e seções de parafina foram preparadas de acordo com um método convencional e sujeitas à coloração com hematoxilina-eosina, e resultados histológicos foram avaliados para calcular a taxa de incidência de meningite.

Os resultados são mostrados em Tabela 22.

20

Tabela 22

	Incidência de sintoma neurológico/ taxa de mortalidade (%)	Proporção de SS-positivo (%)							Taxa de incidência de meningite (%)
		Sangue de coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rim	Fluido cérebro-espinhal	Garganta	
Exemplo 31	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Exemplo 32	30	30	30	20	20	30	30	30	30
Exemplo 33	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Exemplo 34	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Exemplo Comparativo 25	50	50	40	40	40	40	50	50	50
Exemplo Comparativo 26	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Exemplo de Controle	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Nos casos dos grupos de teste de Exemplos 31 e 33, as taxas de mortalidade foram tão baixas quanto 20%. Enquanto isso, nos casos dos

grupos de teste de Exemplos 32 e 34, as taxas de mortalidade foram 30%. Embora as proporções de SS-positivos dos respectivos grupos tenham sido diferentes dependendo do tipo dos tecidos, nos casos dos grupos de teste de Exemplos 31 e 33, as proporções de SS-positivos foram tão baixas quanto 20% em todos os tecidos. Em adição, no caso do grupo de teste de Exemplo 32, as proporções de SS-positivos foram tão baixas quanto 20% no fígado e baço e 30% nos outros tecidos. No caso do grupo de teste de Exemplo 34, as proporções de SS-positivos dos respectivos tecidos foram relativamente altas (30%). Por outro lado, no caso do grupo de teste de Exemplos Comparativos, as proporções de SS-positivos nos respectivos tecidos foram tão altas quanto 40 a 50%, e infecção de SS foi apenas ligeiramente inibida comparada com Exemplo de Controle. Em adição, nos casos dos grupos de teste de Exemplos 31 a 34, as taxas de incidência de meningite foram 20 a 30%, e os valores foram menores do que aqueles dos grupos de teste de Exemplos Comparativos.

Os resultados revelam que administração dos agentes de controle de bactéria prejudicial da presente invenção é efetiva em prevenção/tratamento de doenças infecciosas causadas por SS e em diminuição de taxas de incidência de desordens nervosas e meningite.

(22) Produto farmacêutico contendo *Bacillus thuringiensis*

(A) Pomada

Bacillus thuringiensis BGSC 4A3, BGSC 4D1, BGSC 4J4, e BGSC 4Q7 foram sujeitos a cultura líquida a 37°C por 72 horas usando o meio de formação de esporo descrito no item (3). A solução de cultura resultante foi centrifugada para coletar as células bacterianas. As células bacterianas resultantes foram liofilizadas e pulverizadas, e D(+)-trealose diidrato (grau especial, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) foi adicionado em uma densidade de esporos de 1×10^9 CFU/g. 1 g da trealose resultante contendo esporos de uma bactéria *Bacillus thuringiensis* e

5 g de uma pomada de resina de polietileno/parafina líquida (nome comercial: Plastibase, fabricado por Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.) aquecidos a 60°C foram adicionados, e o conjunto foi bem misturado. Então, o peso total foi ajustado para 100 g adicionando adicionalmente a pomada de resina de polietileno/parafina líquida, e o conjunto foi misturado uniformemente, para com isso preparar pomadas de Exemplos 35 a 38. As densidades de esporos das pomadas de Exemplos 35 a 38 revelaram ser $1,1 \times 10^7$ CFU/g, $1,2 \times 10^7$ CFU/g, $1,0 \times 10^7$ CFU/g, e $1,1 \times 10^7$ CFU/g, respectivamente. A densidade de esporos foi medida: diluindo a pomada para uma concentração apropriada com água esterilizada contendo 0,1% em massa de Tween 80 (marca comercial registrada); aquecendo a solução a 70°C por 30 minutos para matar apenas células vegetativas; inoculando a solução em um meio de ágar normal; e medindo o número de colônias formadas. Por outro lado, pomadas foram produzidas usando *Bacillus coagulans* NBRC12583 e *Bacillus subtilis* NBRC3009 da mesma maneira que acima e designadas Exemplos Comparativos 27 e 28, respectivamente. As densidades de esporos das pomadas resultantes de Exemplos Comparativos 27 e 28 revelaram ser $1,0 \times 10^7$ CFU/g e $1,1 \times 10^7$ CFU/g, respectivamente. Enquanto isso, uma pomada produzida da mesma maneira que acima usando D(+)-trealose diidrato não suplementada com nenhuma bactéria *Bacillus* foi designada Exemplo de Controle.

Alimentação preliminar de ratos SD (Oriental Yeast Co., Ltd., machos, peso corporal inicial 120 g) dos respectivos grupos, cada grupo consistindo de 10 ratos, foi realizada permitindo-os ingerir livremente água e uma ração para animais experimentais, MF (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.) em uma temperatura de criação de 23°C por uma semana para confirmar a ausência de aparências e comportamentos anormais. Cada rato foi anestesiado com pentobarbital, e o fêmur direito foi depilado, fixado em uma base fixa, e comprimido pelo fundo de uma seringa descartável (diâmetro 16

mm) por 6 horas por dia ao longo de 6 dias (pressão: 1,0 kg/cm²). Um fino amortecedor de silicone foi colocado entre o fundo da seringa e o fêmur do rato.

5 Depois de conclusão do teste de compressão, as pomadas de Exemplos, Exemplos Comparativos, e Exemplo de Controle obtidas acima foram administradas aos sítios de lesão por pressão em uma quantidade de 100 mg por dia para avaliar a eficácia de droga de cada pomada. A eficácia de droga foi avaliada por observação visual e observação histopatológica.

10 Observação visual foi realizada medindo o eixo maior e menor usando um compasso de calibre para medir mudanças em áreas dos sítios de lesão por pressão com respeito ao número de dias passados e o número de dias para tratamento.

15 Primeiro, um produto do eixo maior e menor de um sítio de lesão por pressão em dia 2 de desenvolvimento de uma lesão por pressão foi definido como 100%, e as proporções (proporções de área) do produto do eixo maior e menor medidas depois de 3 dias do desenvolvimento da lesão por pressão foram calculados pela seguinte expressão.

20
$$\text{Proporção de área (\%)} = (\text{eixo maior} \times \text{eixo menor de sítio de lesão por pressão [no dia de observação]}) \times 100 / (\text{eixo maior} \times \text{eixo menor de sítio de lesão por pressão [em dia 2 de desenvolvimento de lesão por pressão]})$$

A proporção de área (y) foi plotada contra o número de dias passados (x) para criar uma curva (f(x)), e uma área aproximada de uma região representada por

25
$$0 \leq y \leq f(x) \text{ e}$$

$$5 \leq x \leq 20$$

foi calculada pela seguinte expressão e usada como um índice de processo de cura. Isto é, quanto maior o número de dias requeridos para reduzir o tamanho de um sítio de lesão por pressão, maior o índice de processo de cura.

$$\text{Índice de processo de cura} = \sum_{n=5}^{19} \frac{\text{Razão de Área [No dia n]} + \text{Razão de Área [No dia n + 1]}}{2}$$

Em adição, o número de dias requeridos para completar formação de epitélio em um sítio de lesão por pressão para curar a lesão é definido como o número de dias para cura.

5 Os resultados são mostrados em Tabela 23.

Tabela 23

	Número de dias para cura	Índice de processo de cura
Exemplo 35	16,7	435
Exemplo 36	16,8	427
Exemplo 37	15,9	431
Exemplo 38	16,3	429
Exemplo Comparativo 27	18,6	514
Exemplo Comparativo 28	19,5	521
Exemplo de Controle	21,7	576

10 Como é claro a partir de Tabela 23, nos casos de aplicar as pomadas de Exemplos 35 a 38, os números de dias para cura foram menores do que aqueles nos casos de aplicar as pomadas de Exemplos Comparativos 27 e 28. Em adição, os índices de processo de cura revelaram-se menores, e altas taxas de cura foram atingidas em uma data breve.

15 Em dias 5 e 10 depois do começo de aplicação de pomada, a pele de cada sítio de lesão por pressão foi removida e fixada com uma solução de 10% de formalina tamponada neutra, e seções de parafina foram criadas em conformidade com um método convencional e sujeitas à marcação com

20 Na observação histopatológica, regeneração dos tecidos epiteliais de folículos capilares residuais em dia 5 do começo da aplicação foi observada, e a descamação de cicatriz de porções periféricas foi observada. A formação de tecido de granulação foi claramente observada na camada inferior do epitélio regenerado, e a restauração de tecido foi claramente observada comparada com Exemplos Comparativos 27 e 28. Em adição, em dia 10 do começo da aplicação, prolongamento do epitélio de porções periféricas foi claramente observado, e o umedecimento de células foi

observado apenas na camada superior. Além disso, formação de fibra foi observada no epitélio regenerado, e o sítio foi ficando melhor. Por outro lado, nas porções periféricas dos sítios de lesão por pressão onde as pomadas de Exemplos Comparativos 27 e 28 foram aplicadas, revestimento com o epitélio regenerado foi observado, e partes defeituosas foram cobertas com casca grossa, resultando em inibição de prolongamento de epitélio. Os resultados revelam que as pomadas contendo *Bacillus thuringiensis* de Exemplos 35 a 38 revelaram ter capacidade de promover cura de lesões.

(B) Antiflatulento

10 *Bacillus thuringiensis* BGSC 4D1 foi sujeito à cultura líquida a 37°C por 72 horas no meio de formação de esporo descrito acima. A solução de cultura resultante foi centrifugada para coletar células. As células resultantes foram liofilizadas e pulverizadas, e D(+)-trealose diidrato (grau especial, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) foi adicionado em uma densidade de esporos de 2×10^7 CFU/g. A trealose resultante contendo esporos de uma bactéria *Bacillus thuringiensis* (50 partes em massa) foi misturada com amido de batata (50 partes em massa), e uma mistura foi formada em 350 mg de comprimidos, para com isso produzir um antiflatulento, que foi designado Exemplo 39. A densidade de esporos do antiflatulento de Exemplo 39 revelou ser $1,1 \times 10^7$ CFU/g. A densidade de esporos foi medida: diluindo o antiflatulento para uma concentração apropriada com água esterilizada; aquecendo a solução a 70°C por 30 minutos para matar apenas células vegetativas; inoculando a solução em um meio de ágar normal; e medindo o número de colônias formadas. Por outro lado, um antiflatulento foi produzido usando *Bacillus coagulans* NBRC12583 da mesma maneira que acima e designado Exemplo Comparativo 29. A densidade de esporos do antiflatulento resultante de Exemplo Comparativo 29 revelou ser $1,2 \times 10^7$ CFU/g. Enquanto isso, uma composição produzida usando D(+)-trealose diidrato não suplementada com nenhuma bactéria

Bacillus da mesma maneira que acima foi designada Exemplo de Controle.

(a) Teste de melhora de perda de fezes

Para adultos com perda de fezes, efeitos de um antiflatulento contendo *Bacillus thuringiensis* em propriedades fecais foram avaliados. 11 homens com idade por volta de 40 anos e 7 homens com idade por volta de 50 anos foram permitidos ingerir 3 comprimidos do antiflatulento de Exemplo 39 depois de café da manhã, almoço, e jantar por 2 semanas. Durante as próximas 2 semanas, eles foram permitidos ingerir a composição de Exemplo de Controle. Durante as outras 2 semanas, eles foram permitidos ingerir o antiflatulento de Exemplo Comparativo 29. Um período de 2 semanas antes do começo do período de ingestão foi definido como um período de não ingestão, e um questionário foi conduzido sobre suas propriedades fecais para o período de não ingestão e os períodos de ingestão. Isto é, o formato e firmeza de cada excremento foram registrados de acordo com os seguintes critérios.

Formato de excremento: 1. aquoso, 2. barrento, 3. tipo meio misturado, 4. tipo banana, 5. duro, 6. tipo bola

Firmeza: 1. muito mole, 2. mole, 3. normal, 4. duro, 5. muito duro

Os resultados são mostrados em Tabela 24.

Tabela 24

Propriedade de excremento	Antes de ingestão	Exemplo 39	Exemplo de Controle	Exemplo Comparativo 29
Formato	2,9	3,8	3,1	3,3
Firmeza	2,2	2,7	2,4	2,5

Ingestão do antiflatulento de Exemplo 39 melhorou a retenção de formato para o formato e firmeza de fezes. Por outro lado, no caso de ingestão do antiflatulento de Exemplo Comparativo 29, o formato e firmeza de cada excremento, e a sensação revelaram ser praticamente as mesmas daquelas no caso de Exemplo de Controle.

(b) Teste de melhora de constipação

Para adultos com constipação, efeitos de antiflatulentos contendo esporos de *Eacillus thuringiensis* em propriedades de fezes foram avaliados. 17 mulheres com idade por volta de 30 anos e 5 mulheres com idade por volta de 40 anos foram permitidas ingerir 3 comprimidos do antiflatulento de Exemplo 39 depois de café da manhã, almoço, e jantar por 2 semanas. Durante as próximas 2 semanas, elas foram permitidas ingerir a composição de Exemplo de Controle. Durante as outras 2 semanas, elas foram permitidas ingerir o antiflatulento de Exemplo Comparativo 29. Um período de 2 semanas antes do começo do período de ingestão foi definido como um período de não ingestão, e um questionário foi conduzido sobre suas propriedades fecais para o período de não ingestão e os períodos de ingestão. Os números de vezes de movimento de intestino, formatos de fezes, e sensações foram registrados de acordo com os seguintes critérios.

O número de vezes de movimento de intestino: vezes/semana
 Formato de excremento: 1. aquoso, 2. barrento, 3. tipo meio misturado, 4. tipo banana, 5. duro, 6. tipo bola
 Sensação: 1. muito ruim, 2. ruim, 3. normal, 4. boa, 5. muito boa

Os resultados são mostrados em Tabela 25.

20

Tabela 25

Propriedade fecal	Antes de ingestão	Exemplo 39	Exemplo de Controle	Exemplo Comparativo 29
Número de vezes de movimento de intestino	3,0	4,1	3,3	3,5
Formaio	5,0	4,1	4,3	4,3
Sensação	3,4	3,6	3,4	3,5

Ingestão do antiflatulento de Exemplo 39 melhorou o número de vezes de movimento de intestino, formatos de fezes, e sensações. Por outro lado, no caso de ingestão do antiflatulento de Exemplo Comparativo 29, o número de vezes de movimento de intestino, formatos de fezes, e sensações revelaram ser praticamente os mesmos daqueles de Exemplo de Controle.

Os resultados revelam que um antiflatulento contendo esporos

de *Bacillus thuringiensis* pode melhorar movimento de intestino e propriedades fecais.

(23) Alimento contendo *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis BGSC 4D1 foi sujeito à cultura líquida a 37°C por 24 horas no meio de formação de esporo descrito acima. Sojas mínimas foram imersas em água de torneira a 4°C durante a noite e esterilizadas em um tanque de pressão a 121°C por 30 minutos. Nas sojas esterilizadas resultantes foi inoculada uma solução obtida diluindo a solução de cultura de *Bacillus* descrita acima para 1.000 vezes em uma quantidade de 2 ml com respeito a 100 g das sojas esterilizadas, e cultura foi realizada a 37°C por 48 horas. Além disso, envelhecimento em armazenamento frio foi realizado a 4°C por 72 horas, e um produto de cultura de soja foi designado Exemplo 40. A densidade de esporos revelou ser $2,9 \times 10^9$ CFU/g. A densidade de esporos foi medida: adicionando 90 ml de água esterilizada ao produto de cultura de soja; homogeneizando a mistura usando a homogeneizador (fabricado por NISSEI Corporation) a 10.000 rpm por 2 minutos; diluindo o homogenado para uma concentração apropriada com água esterilizada; aquecendo a solução a 70°C por 30 minutos para matar apenas células vegetativas; inoculando a solução em um meio de ágar normal; e medindo o número de colônias formadas. Um produto de cultura de soja foi produzido usando *Bacillus subtilis* NBRC3009 da mesma maneira que acima e designado Exemplo Comparativo 30. A densidade de esporos revelou ser $1,0 \times 10^9$ CFU/g. Enquanto isso, sojas esterilizadas não suplementadas com nenhuma bactéria *Bacillus* foram designadas Exemplo de Controle.

(a) Teste de melhora de perda de fezes

Para adultos com perda de fezes, efeitos de um alimento contendo *Bacillus thuringiensis* em propriedades de fezes avaliados. 11 homens com idade por volta de 40 anos e 7 homens com idade por volta de 50 anos foram permitidos comer 100g do alimento de Exemplo 40 por dia por

duas semanas. Durante as próximas 2 semanas, eles foram permitidos comer o alimento de Exemplo de Controle. Durante as outras 2 semanas, eles foram permitidos comer o alimento de Exemplo Comparativo 30. Um período de 2 semanas antes do período de refeição foi estabelecido como período de não refeição, e um questionário foi conduzido sobre suas propriedades fecais. Isto é, o formato e firmeza de cada excremento foram registrados de acordo com os seguintes critérios.

Formato de excremento: 1. aquoso, 2. barrento, 3. tipo meio misturado, 4. tipo banana, 5. duro, 6. tipo bola

Firmeza: 1. muito mole, 2. mole, 3. normal, 4. duro, 5. muito duro

Os resultados são mostrados em Tabela 26.

Tabela 26

Propriedade fecal	Antes de comer	Exemplo 40	Exemplo de Controle	Exemplo Comparativo 30
Formato	3,1	3,7	3,0	3,6
Firmeza	2,5	3,0	2,2	2,4

Ingestão do alimento de Exemplo 40 melhorou a retenção de formato para o formato e firmeza de fezes. Por outro lado, no caso de ingestão do alimento de Exemplo Comparativo 30, o formato e firmeza de cada excremento, revelaram ser praticamente os mesmos daqueles no caso de Exemplo de Controle.

(b) Teste de melhora de constipação

Para adultos com constipação, efeitos de alimento contendo *Bacillus thuringiensis* em propriedades de fezes foram avaliados. 17 mulheres com idade por volta de 30 anos e 5 mulheres com idade por volta de 40 anos foram permitidas comer 100 g do alimento de Exemplo 40 por dia por 2 semanas. Durante as próximas 2 semanas, elas foram permitidas comer o alimento de Exemplo de Controle. Durante as outras 2 semanas, elas foram permitidas comer o alimento de Exemplo Comparativo 30. Um período de 2 semanas antes do período de refeição foi estabelecido como período de não

refeição, e um questionário foi conduzido sobre suas propriedades fecais. Os números de vezes de movimento de intestino, formatos de fezes, e sensações foram registrados de acordo com os seguintes critérios.

O número de vezes de movimento de intestino: vezes/semana

5 Formato de excremento: 1. aquoso, 2. barrento, 3. tipo meio misturado, 4. tipo banana, 5. duro, 6. tipo bola

Sensação: 1. muito ruim, 2. ruim, 3. normal, 4. boa, 5. muito boa

Os resultados são mostrados em Tabela 27.

10

Tabela 27

Propriedade fecal	Antes de comer	Exemplo 40	Exemplo de Controle	Exemplo Comparativo 30
Número de vezes de movimento de intestino	3,5	4,7	3,2	3,5
Formato	4,3	4,1	4,5	4,5
Sensação	3,5	3,9	3,5	3,6

Ingestão do alimento de Exemplo 40 melhorou o número de vezes de movimento de intestino, formatos de fezes, e sensações. Por outro lado, no caso de ingestão do alimento de Exemplo Comparativo 30, o número de vezes de movimento de intestino, formatos de fezes, e sensações revelaram ser praticamente os mesmos daqueles de Exemplo de Controle.

15

Os resultados revelam que um alimento contendo esporos de *Bacillus thuringiensis* pode melhorar movimento de intestino e propriedades fecais.

Aplicabilidade Industrial

20

Se um agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção é administrado a um animal, *Bacillus thuringiensis* pode se multiplicar no intestino para inibir multiplicação de uma bactéria prejudicial e para inativar fatores bacterianos auto-induzidos, resultando em melhora do equilíbrio de flora intestinal ou prevenção/tratamento de doenças infecciosas.

25

Em particular, *Bacillus thuringiensis* contido no agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção é considerado tendo alguns efeitos

tal como ação antagonística, interferência bacteriana, efeito de barreira, inibição de colonização para células do trato intestinal, e exclusão competitiva.

5 Um agente de controle de bactéria prejudicial da presente invenção pode ser usado em drogas para prevenir/tratar doenças infecciosas, alimentos para melhorar o equilíbrio de flora intestinal, e rações para promover crescimento de animais de fazenda.

REIVINDICAÇÕES

1. Agente de controle de bactéria prejudicial, caracterizado por compreender *Bacillus thuringiensis*.

5 2. Agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o *Bacillus thuringiensis* tem uma resistência a ácido biliar.

3. Agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o *Bacillus thuringiensis* tem uma capacidade de inativação de fator auto-induzida bacteriana.

10 4. Agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o *Bacillus thuringiensis* é uma linhagem BGSC 4A3 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*, uma linhagem BGSC 4D1 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, uma linhagem BGSC 4J4 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, uma linhagem BGSC 4Q7 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, ou mutantes destas.

5. Agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a bactéria prejudicial é um patógeno causando uma doença infecciosa.

20 6. Agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o patógeno é um patógeno pertencendo a uma bactéria gram-negativa.

25 7. Agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o patógeno pertencendo a uma bactéria gram-negativa compreende pelo menos qualquer uma das bactérias pertencendo ao gênero *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibro*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, e *Shigella*.

8. Agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o patógeno é um patógeno

pertencendo a uma bactéria gram-positiva.

9. Agente de controle de bactéria prejudicial de acordo com reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o patógeno pertencendo a uma bactéria gram-positiva compreende pelo menos qualquer uma das bactérias pertencendo ao gênero *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, e *Listeria*.

10. Produto farmacêutico, caracterizado pelo fato de compreender o agente de controle de bactéria prejudicial como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

10 11. Produto farmacêutico de acordo com reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o produto farmacêutico é para prevenir ou tratar uma doença infecciosa causada por um patógeno.

12. Produto farmacêutico de acordo com reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que o produto farmacêutico é para humano.

15 13. Produto farmacêutico de acordo com reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que o produto farmacêutico é para um animal não humano.

20 14. Alimento, caracterizado pelo fato de compreender o agente de controle de bactéria prejudicial como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

15. Ração, caracterizada pelo fato de compreender o agente de controle de bactéria prejudicial como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

25 16. Ração de acordo com reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que a ração é para prevenir ou tratar uma doença infecciosa intestinal de um animal.

17. Método para criar um animal, caracterizado pelo fato de compreender alimentar a ração como definida na reivindicação 15 ou 16 a um animal.

RESUMO

“AGENTE DE CONTROLE DE BACTÉRIA PREJUDICIAL, PRODUTO FARMACÊUTICO, ALIMENTO, RAÇÃO, E, MÉTODO PARA CRIAR UM ANIMAL”

5 Através de inibição da multiplicação de bactérias patogênicas e inativação de fatores bacterianos auto-induzidos, o equilíbrio de flora intestinal é melhorado para com isso promover regulação de funções intestinais animais e possibilitar prevenção/tratamento de doença infecciosa causada por tais bactérias patogênicas. Por conseguinte, um produto
10 farmacêutico contendo *Bacillus thuringiensis* é administrado a animais, e animais são deixados para ingerir alimento ou ração contendo *Bacillus thuringiensis*