



(51) МПК
A23K 1/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C12R 1/125 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011114988/10, 17.09.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 17.09.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 17.09.2008 US 61/192,436

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2012 Бюл. № 30

(45) Опубликовано: 20.03.2015 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: RU 2266747 C1, 27.12.2005. US
 6,060,051 A1, 09.05.2000. US 20030194424 A1,
 16.10.2003. US 20030147923 A1, 07.08.2003

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 18.04.2011

(86) Заявка РСТ:
 US 2009/057335 (17.09.2009)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2010/033714 (25.03.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, строение 3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры", пат.пов. А.В.Миц, рег. N 364

(72) Автор(ы):

**ШМИДТ, Джозеф, Эрл (US),
 ХИМЕНЕС, Десмонд, Рито (US)**

(73) Патентообладатель(и):

БАЙЕР КРОПСАЙЕНС ЭлПи (US)

(54) СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ ШТАММА *Bacillus subtilis* QST713 ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РОСТА ЖИВОТНОГО

(57) Реферат:

Группа изобретений касается способа улучшения показателей роста животного и композиции, используемой в таком способе. Охарактеризованный способ включает введение животному, не являющемуся насекомым или человеком, эффективного количества композиции, включающей *Bacillus subtilis* QST713, с кормом

или питьевой водой. Представленная группа изобретений позволяет укрепить здоровье животного посредством более эффективного использования корма за счет модуляции флоры желудочно-кишечного тракта и может быть использована в области сельского хозяйства. 2 н. и 22 з.п. ф-лы, 8 ил., 9 табл., 10 пр.

RU 2 544 952 C2

RU 2 544 952 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A23K 1/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C12R 1/125 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011114988/10, 17.09.2009**

(24) Effective date for property rights:
17.09.2009

Priority:

(30) Convention priority:
17.09.2008 US 61/192,436

(43) Application published: **27.10.2012 Bull. № 30**

(45) Date of publication: **20.03.2015 Bull. № 8**

(85) Commencement of national phase: **18.04.2011**

(86) PCT application:
US 2009/057335 (17.09.2009)

(87) PCT publication:
WO 2010/033714 (25.03.2010)

Mail address:

**129090, Moskva, ul.B.Spaskaja, 25, stroenie 3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mits, reg.N 364**

(72) Inventor(s):

**ShMIDT, Dzhozef, Ehrl (US),
KhIMENES, Desmond, Rito (US)**

(73) Proprietor(s):

BAJER KROPSAJENS EhIPi (US)

(54) **METHOD OF USING STRAIN Bacillus subtilis QST713 FOR IMPROVING ANIMAL'S GROWTH RATES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions concerns a method for improving animal's growth rates and a composition used in this method. The characterised method involves administering into an animal other than an insect or a human, an effective amount of a composition containing Bacillus subtilis QST713, with

food or drinking water.

EFFECT: presented group of inventions enables strengthening the animal's health by the more effective use of the food by modulating the gastrointestinal microflora, and can be used in agriculture.

24 cl, 8 dwg, 9 tbl, 10 ex

C 2 2 5 4 4 9 5 2 C 2 R U

R U 2 5 4 4 9 5 2 C 2

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка имеет приоритет патентной заявки США № 61/192436, поданной 17 сентября 2008 года в соответствии с 35 U.S.C Section 119(e). Указанная заявка включена здесь ссылкой в полном объеме.

5 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к пробиотикам и их способности укреплять здоровье животных или улучшать общее физическое состояние.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Род *Bacillus* включает многочисленные бактерии, образующие эндоспоры, которые среди прочего имеют огромное число применений в области сельского хозяйства и области кормления животных. Некоторые представленные в настоящее время на рынке штаммы *Bacillus* применяют в качестве пробиотиков в кормовых продуктах для животных, как альтернативу антибиотикам. Эти пробиотики укрепляют здоровье животного, включая улучшение роста животного и эффективность использования корма, за счет модуляции флоры желудочно-кишечного тракта. Применение таких пробиотиков увеличилось из-за опасений, связанных с наличием остаточного количества антибиотиков в продуктах животного происхождения, потребляемых человеком, и развитием устойчивости к антибиотикам. В последние годы были проведены исследования спорообразующих бактерий для использования их в качестве пробиотиков. Хотя различные коммерческие продукты содержат штаммы *Bacillus subtilis*, *Bacilluslicheniformis* и *Bacillus coagulans*, такие исследования показали, что не все штаммы *Bacillus* эффективны в качестве кормовых добавок.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к штамму *Bacillus subtilis*, который при введении животному укрепляет его здоровье. В частности, настоящее изобретение относится к способам укрепления здоровья животных, не относящихся к насекомым и человеку, или для улучшения общего физического состояния таких животных посредством кормления или с питьевой водой (но не при принудительном кормлении) композиций, включающих (i) *Bacillus subtilis* QST 713, (ii) его мутант (i), бесклеточный препарат (i) или (ii), или метаболит (i) или (ii). В одном варианте воплощения настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению включает *Bacillus subtilis* 713 или его мутанты или метаболиты, продуцируемые бактериями. В другом варианте воплощения настоящего изобретения композиция включает *Bacillus subtilis* QST713 по существу в его споровой форме.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения композиции вводят животным в корм в течение множества дней на протяжении всей жизни или в течение определенных периодов или стадий жизни животного. Например, в некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения композиции вводят только в стартер или только в финишер для сельскохозяйственных животных.

Способы по настоящему изобретению могут быть использованы для увеличения прироста массы животных, для повышения эффективности использования кормов, для снижения заболеваемости, для повышения устойчивости к заболеваниям, для повышения коэффициента выживаемости, для повышения иммунного ответа животного и для поддержания здоровой микрофлоры желудочно-кишечного тракта. В одном варианте воплощения настоящего изобретения способы по настоящему изобретению используют для оказания помощи в восстановлении здорового баланса кишечной микрофлоры после введения антибиотиков в терапевтических целях.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения композиция по настоящему

изобретению включает *Bacillus subtilis* QST713 или его мутанты, и ее вводят животному в количестве около 1×10^3 КОЕ/г кормового продукта на мл питьевой воды или около 1×10^4 КОЕ/г кормового продукта на мл питьевой воды, или около 1×10^5 КОЕ/г кормового продукта на мл питьевой воды, или около 1×10^6 КОЕ/г кормового продукта на мл питьевой воды, или около 1×10^7 КОЕ/г кормового продукта на мл питьевой воды, или около 1×10^8 КОЕ/г кормового продукта на мл питьевой воды, или около 1×10^9 КОЕ/г кормового продукта на мл питьевой воды, или около 1×10^{10} КОЕ/г кормового продукта на мл питьевой воды, или около 1×10^{11} КОЕ/г кормового продукта на мл питьевой воды.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения композиции по настоящему изобретению вводят или скармливают животному в количестве, эффективном для снижения роста патогенных бактерий в кишечнике животного. Такие патогенные бактерии включают *Clostridia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* и *Vibrio*. Соответственно способы по настоящему изобретению могут быть использованы для снижения количества патогенных бактерий, находящихся в фекалиях животных. Также способы по настоящему изобретению могут быть использованы для поддержания или усиления роста полезных бактерий, таких как молочнокислые бактерии, в кишечнике животного. За счет снижения патогенных бактерий и/или усиления роста или поддержания полезных бактерий композиции по настоящему изобретению поддерживают здоровую кишечную микрофлору в целом.

Также способы по настоящему изобретению могут быть использованы для всех животных, не относящихся к насекомым и человеку. Животные, которые могут получить положительное воздействие от способов по настоящему изобретению, включают без ограничения среди прочих птиц, свиней, жвачных, домашних и экзотических животных, животных, содержащихся в зоопарках, водных животных и лошадей. В одном варианте воплощения настоящего изобретения животные представляют собой сельскохозяйственных животных, которых выращивают для потребления или для получения пищевых продуктов, таких как бройлеры и куры-несушки.

Также настоящее изобретение относится к композициям, адаптированным для укрепления здоровья животных или улучшения физического состояния животных. Следовательно, композиции по настоящему изобретению могут включать *Bacillus subtilis* QST713 или его мутанты, их бесклеточные препараты или метаболиты и носители, которые делают эти композиции, подходящими для скармливания животным в качестве кормовой добавки или в качестве добавки в питьевую воду. В качестве альтернативы *Bacillus subtilis* QST713 или его мутанты, их бесклеточные препараты или метаболиты могут быть ингредиентами кормового продукта для животных, включая кормовой белок и/или кормовые углеводы. Такие комбинации могут быть в форме гранул, экструдированных в процессе стандартного гранулирования.

Композиции по настоящему изобретению также включают комбинации *Bacillus subtilis* QST713 или его мутантов, бесклеточных препаратов QST713 или его мутантов и метаболитов QST713 и его мутантов с другими пробиотиками и/или с пребиотиками.

Также настоящее изобретение включает в способ получения кормового продукта для животных, содержащего микроорганизмы для прямого скармливания, включающий перед процессом гранулирования добавление спор *Bacillus subtilis* QST713 в количестве, эффективном для укрепления здоровья животного при скармливании животному стандартных кормовых компонентов, таких как углеводы и белки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1 - результаты теста бесклеточного препарата *Bacillus subtilis* QST713 на эффективность против различных изолятов *Clostridia*.

5 Фигура 2 - результаты теста устойчивого к нагреванию бесклеточного препарата *Bacillus subtilis* QST713 на эффективность против различных изолятов *Clostridia*.

Фигура 3 - результаты теста бесклеточного препарата *Bacillus subtilis* QST713 на эффективность против различных изолятов *Listeria*.

Фигура 4 - результаты теста устойчивого к нагреванию бесклеточного препарата *Bacillus subtilis* QST713 на эффективность против различных изолятов *Listeria*.

10 Фигура 5 - результаты теста бесклеточного препарата *Bacillus subtilis* QST713 на эффективность против различных изолятов *Salmonella*.

Фигура 6 - результаты теста устойчивого к нагреванию бесклеточного препарата *Bacillus subtilis* QST713 на эффективность против различных изолятов *Salmonella*.

15 Фигура 7- агаровые пластинки, на которых *Bacillus subtilis* QST713 (вертикально) и различные изоляты *Clostridium perfringens* (горизонтально) перекрестно пересечены для тестирования эффективности QST713 против патогенов.

Фигура 8 - агаровые пластинки, на которых *Bacillus subtilis* QST713 (вертикально) и различные изоляты *Campylobacter jejuni* (горизонтально) перекрестно пересечены для тестирования эффективности QST713 против патогенов.

20 ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Все публикации, патенты и патентные заявки, включая фигуры и приложения, включены ссылками в том же объеме, как если бы каждый отдельный патент или заявка на патент были специально и отдельно включены ссылкой.

25 Описание включает информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Это не является признанием того, что какая-либо представленная информация является частью предшествующего уровня техники или относится к поданным на рассмотрение в настоящий момент изобретениям или что любая публикация по существу или потенциально относится к предшествующему уровню техники.

30 Настоящее изобретение относится к новому применению штамма *Bacillus subtilis* QST 713 и/или его метаболитов, которые эффективны для укрепления здоровья животных в качестве пробиотиков. Пробиотики используют в области здравоохранения животных для поддержания здоровой кишечной микрофлоры, включая снижение вредных бактерий, таких как *Clostridia* и *Campylobacter*, и увеличение полезных бактерий, таких как *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium*. Пробиотики хорошо подходят для поддержания 35 здорового баланса между патогенными и полезными бактериями, поскольку антибиотики нежелательны. Существует множество механизмов, за счет которых пробиотики поддерживают здоровую кишечную микрофлору: конкурентное исключение патогенных бактерий, снижение патогенных бактерий за счет продуцирования 40 антимикробных веществ, усиление роста и жизнеспособности полезной кишечной микрофлоры и стимулирование системного иммунного ответа животного.

В объем настоящего изобретения входит способ укрепления здоровья животного введением животному композиции, включающей: (i) *Bacillus subtilis* QST713, (ii) мутантов *Bacillus subtilis* QST713, (iii) бесклеточных препаратов (i), или (ii), или (iv) метаболитов 45 (i) или (ii).

Bacillus subtilis QST713, его мутанты, супернатанты и липопетидные метаболиты и способы контроля патогенов растений и насекомых полностью описаны в патентных заявках США № 6060051, 6103228, 6291426, 6417163, и 6638910. В этих патентах штамм

указан, как AQ713. *Bacillus subtilis* QST713 депонирован с NRRL 7 мая, 1997 года в соответствии с положениями Будапештского договора о признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры под инвентарным номером B21661. Любые ссылки в этом описании на QST713 относятся к *Bacillus subtilis* QST713.

5 Штамм *Bacillus subtilis* QST713 имеет определенные свойства, которые, как неожиданно было обнаружено, делают штамм хорошо подходящим для укрепления здоровья животного. Споры QST713 жизнеспособны при низких pH, и клетки QST713 растут (при подходящих питательных условиях) при таком низком pH, как 4,5. Дополнительно, как указано в Примерах 8 и 4 соответственно, ниже, QST713 способен
10 расти в условиях высокой солености по меньшей мере в течение десяти дней и может выживать при высокой температуре, необходимой для гранулирования кормовых продуктов для животных. Также QST713 способен агрегироваться, или группироваться в массу, как показано в Примере 2, отесняя и снижая, таким образом, уровень патогенных бактерий. Не желая быть ограниченными какой-либо теорией, авторы
15 настоящего изобретения считают, что *Bacillus subtilis* QST713 укрепляет здоровье животного многоаспектным способом, включая продуцирование антимикробных метаболитов и конкуренцию с патогенами за счет большего использования нутриентов и пространств присоединения по сравнению с патогенами, предотвращая, таким образом, эффективное заселение патогенными бактериями кишечника.

20 В одном аспекте настоящего изобретения композиции, вводимые животным, включают мутанты *Bacillus subtilis* QST713, обладающие всеми отличительными характеристиками QST713. Такие мутанты могут иметь последовательность ДНК, идентичную QST713 по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере
25 на около 99%. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения мутанты представляют собой спонтанные мутанты. Используемый термин спонтанный мутант относится к мутантам, происходящим от QST713, без интенсивного применения мутагенов. Такие спонтанные мутанты могут быть получены классическими способами, такими как выращивание штамма *Bacillus subtilis* в присутствии определенных
30 антибиотиков, к которым исходный штамм чувствителен, и тестируют любые устойчивые мутанты на повышенную биологическую активность или в этой заявке на повышенную способность укреплять один или более признаков, характеризующих здоровье животного, приведенных ниже. Другие способы идентификации спонтанных мутантов хорошо известны специалисту в области техники, к которой относится настоящее
35 изобретение.

Все ссылки в этой заявке на *Bacillus subtilis* QST713 или его мутанты относятся к бактерии, выделенной из природы и выращенной человеком, например, в лаборатории или в промышленных условиях.

40 Клетки *Bacillus subtilis* QST713 могут присутствовать в композициях по настоящему изобретению в виде спор (которые не активны), вегетативных клеток (которые растут), клеток в переходном состоянии (которые переходят из фазы роста в фазу споруляции) или в виде комбинации всех этих типов клеток. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения композиция главным образом включает споры.

45 Метаболиты QST713 или его мутанты включают липопептиды, такие как итурины, сурфактины, плипастатины и аграстатины и другие соединения с антибактериальными свойствами. Метаболиты липопептидов QST713 подробно описаны в патентах США № 6291426 и 6638910.

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены культивированием

Bacillus subtilis QST713 или его мутантов способами, хорошо известными из предшествующего уровня техники, включающими использование среды, и другими способами, описанными в патенте США № 6060051. Традиционные промышленные способы культивирования микроорганизмов включают глубинное культивирование, твердофазное культивирование или культивирование на поверхности жидкости. К концу ферментации, когда нутриенты истощаются, клетки *Bacillus subtilis* QST713 начинают переходить из фазы роста в фазу споруляции, таким образом, конечный продукт культивирования имеет много спор, метаболитов и остаточную среду культивирования. Споруляция является частью естественного жизненного цикла *Bacillus subtilis* и, как правило, инициируется клетками в ответ на ограничение нутриентов. Культивирование проводят с достижением высокого уровня колониеобразующих единиц *Bacillus subtilis* QST713 и промотирования споруляции. Бактериальные клетки, споры и метаболиты в культуральной среде, полученные в результате культивирования, могут быть использованы непосредственно или сконцентрированы при использовании традиционных промышленных способов, таких как центрифугирование, тангенциальная поточная фильтрация, глубинная фильтрация и выпаривание. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения концентрированный культуральный бульон промывают, например проведением процесса диафильтрации, для удаления остаточного культурального бульона и метаболитов.

Культуральный бульон или концентрат бульона может быть высушен с или без носителей, используя традиционные процессы или способы сушки, такие как распылительная сушка, лиофильная сушка, сушка на лотках, сушка в псевдооживленном слое, барабанная сушка или выпаривание. Полученные в результате сушки продукты могут быть подвергнуты дополнительной обработке, такой как измельчение или грануляция, до достижения определенного размера частиц или физического формата. Также после сушки могут быть добавлены носители, описанные ниже.

Бесклеточные препараты культурального бульона QST713 могут быть получены любыми средствами, известными из предшествующего уровня техники, такими как экстракция, центрифугирование и/или фильтрация культурального бульона. Специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение, следует понимать, что так называемые бесклеточные препараты не могут не содержать клеток, но могут быть в значительной степени свободными от клеток или по существу свободными от клеток в зависимости от используемой технологии (например, скорость центрифугирования) для удаления клеток. Полученный в результате бесклеточный препарат может быть высушен и/или включен в состав вместе с компонентами, которые помогают ввести его животным. Способы концентрирования и технологии сушки, описанные выше для культурального бульона, также применимы к бесклеточным препаратам.

Метаболиты QST713 могут быть получены согласно способам, приведенным в патенте США № 6060051. Используемый здесь термин «метаболиты» относится к полуочищенным метаболитам и очищенным или по существу очищенным метаболитам или к метаболитам, которые не были выделены из *Bacillus subtilis* QST713. Липопептиды и другие бактерицидные метаболиты QST713 составляют в пределах от 600 килодальтон до 100 дальтон. Следовательно, в некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения после получения бесклеточного препарата центрифугированием культурального бульона QST713 метаболиты могут быть очищены при использовании эксклюзионной хроматографии, при которой группы метаболитов разделяют на различные фракции, исходя из отсечения по молекулярной массе, такого как отсечение по молекулярной массе менее чем 600 кДа, менее чем 500 кДа, менее чем 400 кДа и так

далее. Способы концентрирования и технологии сушки, описанные выше для культурального бульона, также применимы к метаболитам.

Композиции по настоящему изобретению могут включать носители, которые являются инертными ингредиентами в рецептурном составе, добавленными в композиции, включающие клетки, бесклеточные препараты или метаболиты, для улучшения восстановления, эффективности или физических свойств и/или помощи в расфасовке и введении. А в некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения носители представляют собой агенты, предотвращающие слеживание, агенты против окисления, агенты-наполнители и/или протективные агенты. Примеры используемых носителей включают полисахариды (крахмалы, мальтодекстрины, метилцеллюлозы, белки, такие как сывороточный белок, пептиды, камеди), сахара (лактоза, трегалоза, сахароза), липиды (лецитин, растительные масла, минеральные масла), соли (хлорид натрия, карбонат кальция, цитрат натрия) и силикаты (глины, аморфный кремнезем, аморфная коллоидная двуокись кремния/осажденный диоксид кремния, силикаты). Подходящие носители для добавок для кормовых продуктов приведены в Официальной публикации Ассоциации американских официальных контролеров по качеству кормов (American Feed Control Officials, Inc.'s Official Publication), публикуемой ежегодно. Смотрите, например, Официальную публикацию Ассоциации американских официальных контролеров по качеству кормов, Sharon Krebs, editor, 2006 edition, ISBN 1-878341-18-9 (Official Publication of American Feed Control Officials, Sharon Krebs, editor, 2006 edition, ISBN 1-878341-18-9). В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения носители добавляют после концентрирования культурального бульона и во время и/или после сушки.

В вариантах воплощения настоящего изобретения, в которых композиции получают в виде кормовых добавок, концентрация по массе (масса/масса) (i) *Bacillus subtilis* QST713 или его мутантов, (ii) бесклеточных препаратов *Bacillus subtilis* QST713 или его мутантов, (iii) метаболитов *Bacillus subtilis* QST713 или его мутантов или (iv) комбинации клеток и метаболитов в композиции могут составлять около 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или около 95%. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения, например, когда концентрированный препарат бульона промывают и сушат без проведения тепловой обработки, такой как лиофильная сушка, концентрация *Bacillus subtilis* QST713 или его мутантов в конечной композиции может составлять в пределах от около 90% до около 100%.

Композиции по настоящему изобретению могут быть введены/скормлены животным, не относящимся к насекомым и человеку, для улучшения здоровья животного или общего физического состояния таких животных. Такие композиции могут быть введены как в терапевтических, так и в не терапевтических целях. Эффективное количество композиции является количеством, эффективным для укрепления здоровья животного по сравнению со здоровьем животного, которому не вводят композицию, но которое получает тот же самый рацион (включая кормовой продукт и другие вещества), как и животное, получающее композиции по настоящему изобретению. Признаком укрепления здоровья является одно или более из следующего: прирост массы, который включает прирост массы определенной части животного или увеличение всей массы; поддержание кишечной микрофлоры; повышение эффективности использования кормов, снижение риска падежа, повышение устойчивости к заболеваниям, повышение выживаемости, повышение иммунного ответа животного; снижение риска возникновения диареи; повышение продуктивности и/или снижение заселенности патогенными бактериями.

Следовательно, в соответствии с указанным выше, варианты воплощения настоящего изобретения относятся к применению не терапевтических способов, таких как прирост массы животного, поддержание кишечной микрофлоры или повышение эффективности использования корма введением/скармливанием животному композиции, включающей

5 *Bacillus subtilis* QST 713, мутант *Bacillus subtilis* QST 713, бесклеточный препарат, полученный из *Bacillus subtilis* QST713 или его мутанта, или метаболиты QST713 или его мутантов.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения, в которых композиции по настоящему изобретению вводят/скармливают сельскохозяйственным животным,

10 композиции вводят для улучшения показателей роста сельскохозяйственного животного. Используемый термин улучшение показателей роста относится к усиленному росту (масса или длина) и/или эффективности использования корма, и/или снижения падежа/повышения показателя выживаемости по сравнению с животными, которым не вводят композиции по настоящему изобретению. В одном аспекте настоящего изобретения

15 достигаемый прирост массы составляет в пределах от около 1% до около 20%, или в пределах от около 1% до около 15%, или в пределах от около 1% до около 9%. Также способ по настоящему изобретению может включать повышение эффективности использования корма животными по сравнению с животными, которым не вводят композиции по настоящему изобретению. Эффективность использования корма, как

20 правило, оценивают при использовании показателя потребленного корма к приросту массы. Снижение этого показателя указывает на повышение эффективности использования корма. Эффективность использования корма может быть улучшена в пределах от около 1% до 15%, в пределах от около 2% до около 10% и в пределах от около 3% до около 8%. Также способы по настоящему изобретению могут снижать

25 падеж. Улучшение показателя выживаемости, которое может быть достигнуто, составляет в пределах от около 1% до около 20%, или в пределах от около 2% до 17%, или в пределах от около 4% до около 13%, или в пределах от около 5% до около 10%. Усиленный рост, улучшение эффективности использования корма и снижение падежа могут быть определены индивидуально по сравнению со средними, известными в

30 области животноводства или по сравнению со средними показателями роста по группе сельскохозяйственных животных примерно того же возраста, как правило, выращенных вместе и/или в аналогичных условиях, которые не получают композиции по настоящему изобретению.

Поддержание кишечной микрофлоры относится к снижению (инактивированием

35 или ингибированием роста) вредных, вызывающих заболевания микроорганизмов, вызывающих беспокойство органов здравоохранения, и/или увеличивая уровень полезных бактерий, таких как *Lactobacilli* и *Bifidobacteria*, по сравнению с животными, к которым не применяли способы по настоящему изобретению. Не желая быть

40 ограниченными какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения считают, что увеличение уровня полезных бактерий может быть вызвано стимуляцией роста таких бактерий или просто селективным снижением патогенных бактерий, таким образом, давая полезным бактериям больше места для роста и прикрепления к стенкам кишечника. Вредные, вызывающие заболевания бактерии, уровни которых могут быть снижены способами по настоящему изобретению, включают *Clostridia spp.* (такие как

45 *perfringens* и *dificile*), *Listeria spp.* (такие как *monocytogenes*, *seeligeri* и *welshimeri*), *Salmonella spp.* (такие как *enterica*, *arizonae*, *typhirium*, *enteritidis* и *bonglori*), *E. coli*, *Enterococcus spp.* (такие как *faecalis* и *faecium*), *Campylobacter*, *Aeromonas spp.*, *Staphylococcus aureus* и *Vibrio spp.* В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения количество вредных

вызывающих заболевания микроорганизмов может быть снижено на около 0,5 log, около 1 log, около 2 log, около 3 log, около 4 log или около 5 log.

Указанные выше патогенные бактерии приводят к возникновению различных заболеваний у животных. У домашней птицы, например у кур, кормовой продукт, зараженный *Clostridium perfringens*, вызывает вспышку некротического энтерита (или некротические очаги на стенках кишечника). Что интересно, хотя эти бактерии, как правило, находятся в желудочно-кишечном тракте кур, они не всегда приводят к некротическим энтеритам, хотя увеличение их количества связывают с этим заболеванием. Снижение этого патогена при применении пробиотиков в результате приводит к укреплению здоровья и приросту массы, как приведено в примерах ниже. Следовательно, контроль этих бактерий за счет снижения их способности к росту снижает случаи возникновения заболеваний, вызванных такими бактериями. В Таблице 1 ниже приведены различные микроорганизмы и заболевания или состояния, с которыми они связаны.

Организм	Заболевание и/или больное животное
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Легочные заболевания у домашней птицы
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Заболевания суставов и легких у домашней птицы
<i>Pasterella multocida</i>	Куриная холера
<i>Staphylococcus aureus</i>	Обычный вторичный патоген для домашней птицы
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Респираторный патоген для домашней птицы, в частности индеек
<i>Avibacterium paraglaaiinarum</i>	Катар верхних дыхательных путей у кур
<i>Bordella avium</i>	У индеек
<i>Salmonella arizonae</i>	Катар верхних дыхательных путей у индеек
<i>Salmonella typhimurium</i>	Куриный тиф
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Обычный вторичный патоген для домашней птицы
<i>E.coli</i> O 18 или O 45 k88 positive	Диарея сосунков (поросята)
<i>Brachyspira hyodysenteria</i>	Дизентерия свиней
<i>Lawsonia intracellularis</i>	Илеит (свиней)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Атрофический ринит (свиней)
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Рожистое воспаление (свиней)

Сохранение здоровой кишечной микрофлоры, и в частности, снижение уровня одного или более из указанных выше вредных бактерий, также является причиной снижения заселенности патогенами фекалий животных. Количество патогенов может быть определено несколькими способами, известными специалисту в области техники, к которой относится изобретение, включая анализ на заселенность патогенами фекалий животных или умерщвленных животных во время исследования и анализа популяций бактерий (полезных и патогенных) в их кишечнике.

Также способы по настоящему изобретению могут быть использованы для сохранения нормального баланса желудочно-кишечного тракта после введения терапевтических количеств антибиотиков за счет ингибирования роста патогенных бактерий и/или увеличения или сохранения роста полезных бактерий. Используемый здесь термин «терапевтическое количество» относится к количеству, достаточному для улучшения или изменения болезненного состояния у животного.

Повышение продуктивности, достигнутое при применении способов по настоящему изобретению, относится к любому из следующего: получение большего количества или более высокого качества яиц, молока или мяса или увеличение числа отъемышей.

Способы по настоящему изобретению могут быть применены к любому животному, включая позвоночных, таких как млекопитающие и водные животные, и ракообразных, таких как креветки, но исключая насекомых и людей. Млекопитающие, которые могут

получать композиции по настоящему изобретению, включают сельскохозяйственных животных; животных, используемых для спорта, отдыха или работы, таких как лошади, включая скаковых лошадей; животных, которых держат в качестве домашних питомцев, включая собак, кошек, птиц и экзотических животных; и животных, содержащихся в зоопарках. Сельскохозяйственные животные относятся к животным, выращенным для 5 потребления или для получения пищевых продуктов. В одном варианте воплощения настоящего изобретения способ применяют к животным с однокамерным желудком, таким как домашняя птица и пернатая дичь. Домашняя птица может включать кур, индеек, уток, гусей, цесарок и бескилевых, таких как страус и эму. Пернатая дичь может 10 включать перепелов, азиатского кеклика, фазана, шотландскую куропатку, маленьких курочек Cornish hens и куропаток. Куры относятся к мясным курам, которые включают кур, выращенных для забоя, также называемых бройлерами, и кур-несушек, которых используют для получения яиц для потребления человеком. В другом варианте воплощения настоящего изобретения способ может быть применен к млекопитающим, 15 таким как свиньи. В другом варианте воплощения настоящего изобретения способ может быть применен к животным с многокамерным желудком, таким как крупный рогатый скот, козы и овцы, также указанных здесь как жвачные. В одном варианте воплощения настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению может быть скормлена жвачным животным на раннем периоде жизни для укрепления их 20 здоровья, и в частности, для снижения случаев диареи у этих животных. Жвачные животные на раннем периоде жизни представляют собой жвачных животных, включая телят в возрасте от рождения до около двенадцати недель. Композиции по настоящему изобретению могут быть введены жвачным животным на раннем периоде жизни вместе с заменителями молока. Заменители молока относятся к кормовым продуктам для 25 замены колоostrума на стадии выпойки молоком жвачных животных на раннем периоде жизни.

В одном аспекте композиции по настоящему изобретению представляют собой кормовые добавки, которые добавляют в корм животному или в его питьевую воду перед потреблением. В таких случаях в состав композиций может быть введен носитель, 30 такой как карбонат кальция или сывороточный белок, как указано выше. В одном аспекте настоящего изобретения такой носитель является гидрофобным.

В другом аспекте композиции, включающие *Bacillus subtilis* QST713, его мутанты, бесклеточные препараты QST713 и его мутанты и метаболиты QST713 и его мутанты могут быть получены в комбинации с ингредиентами кормового продукта для животных, 35 необходимыми для промотирования и поддержания роста животного. Такие ингредиенты кормового продукта для животных могут включать один или более из следующего: белок, углеводы, жиры, витамины, минеральные вещества, кокцидиостаты, продукты на основе кислот и/или лекарственные средства, такие как антибиотики. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения также могут присутствовать 40 носители, такие как описанные выше. Белки и углеводы необходимы для промотирования и поддержания роста и могут быть указаны как кормовые белки и кормовые углеводы для различения их от любых остаточных белков и/или углеводов, которые могут остаться от процесса культивации бактерий.

В другом аспекте композиции по настоящему изобретению, включающие *Bacillus subtilis* QST713, его мутанты, бесклеточные препараты QST713 и его мутантов и метаболиты QST713 и его мутантов могут дополнительно включать другие пробиотики, 45 такие как другие виды и штаммы *Bacillus*, которые скармливают животным для укрепления здоровья или улучшения общего физического состояния животных. Примеры

штаммов включают *Bacillus subtilis* PB6 (как описано в патенте США № 7247299 и депонированном, как ATCC № PTA-6737), доступные от Kemin под торговой маркой CLOSTAT® или *Bacillus subtilis* C-3102 (как описано в патенте США № 4919936 и депонированном, как FERM BP-1096 Научно-исследовательским институтом процессов ферментации, Агентства по науке и промышленным технологиям Японии (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, in Japan)), доступном от Calpis как CALSPORIN®, или смесь *Bacillus licheniformis* и спор *Bacillus subtilis*, доступную от Chr. Hansen под торговой маркой BIOPLUS2B®, *Bacillus coagulans*, включая штаммы, описанные в патенте США № 6849256, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus laterosporus* и *Bacillus alevi*. В композициях по настоящему изобретению также могут быть использованы другие пробиотики не *Bacillus*, такие как *Saccharomyces cerevisiae*. Если такие другие пробиотики не являются частью рецептурного состава композиций по настоящему изобретению, они могут быть введены с (или в то же самое время, или в другое время) композициями по настоящему изобретению.

В другом аспекте композиции по настоящему изобретению могут включать или могут быть введены с (или в то же самое время или в другое время) ферментами, которые помогают переваривать кормовой продукт, такими как амилаза, глюканаза, глюкоамилаза, целлюлаза, ксиланаза, глюканаза, амилаза и пектиназа; иммуномодуляторами, такими как антитела, цитокины, прошедшая распылительную сушку плазма; интерлейкины, интерфероны; и/или олигосахаридами, такими как фруктоолигосахариды, маннанолигосахариды, галактоолигосахариды, инулин, инулин, обогащенный олигофруктозой, тагатоза и полидекстроза.

В вариантах воплощения настоящего изобретения, в которых композиции включают QST713 или его мутанты, бактерии могут быть добавлены в кормовой продукт или питьевую воду и скормлены животным в количестве, эффективном для укрепления здоровья животного. В одном варианте воплощения настоящего изобретения он может быть добавлен при проценте ввода в пределах от около 1×10^4 КОЕ *Bacillus subtilis* на грамм кормового продукта или мл питьевой воды до около 1×10^{10} *Bacillus subtilis* на грамм кормового продукта или мл питьевой воды. В другом варианте воплощения настоящего изобретения может быть добавлено в пределах от около 1×10^5 КОЕ *Bacillus subtilis* на грамм кормового продукта или мл питьевой воды до около 1×10^9 *Bacillus subtilis* на грамм кормового продукта или мл питьевой воды. В другом варианте воплощения настоящего изобретения может быть добавлено в пределах от около 1×10^5 КОЕ *Bacillus subtilis* на грамм кормового продукта или мл питьевой воды до около 1×10^9 *Bacillus subtilis* на грамм кормового продукта или мл питьевой воды. В другом варианте воплощения настоящего изобретения может быть добавлено в пределах от около 1×10^6 КОЕ *Bacillus subtilis* на грамм кормового продукта или мл питьевой воды до около 1×10^8 *Bacillus subtilis* на грамм кормового продукта или мл питьевой воды. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения процент ввода составляет около 1×10^3 КОЕ *Bacillus subtilis* на грамм кормового продукта или мл питьевой воды, или около 1×10^4 , или около 1×10^5 , или около 1×10^6 , или около 1×10^7 , или около 1×10^8 , или около 1×10^9 , или около 1×10^{10} или около 1×10^{11} КОЕ *Bacillus subtilis* на грамм кормового продукта или мл питьевой воды. В вариантах воплощения настоящего изобретения, в которых композиции содержат QST713 или его мутанты, используемые в качестве кормовых добавок, такие композиции могут иметь количество КОЕ,

позволяющее разведение до указанных выше пределов при добавлении в кормовой продукт для животного или питьевую воду.

Композиции, включающие *Bacillus subtilis* QST713 или его мутанты, их бесклеточные препараты или их метаболиты, могут быть добавлены в кормовой продукт для животного перед процессом его гранулирования таким образом, что композиция, используемая в указанном выше способе, является частью гранул кормового продукта для животного. В этом аспекте, если бактериальные клетки используют в композиции, то их, как правило, добавляют в другие компоненты кормового продукта для животных в споровой форме перед процессом гранулирования. Могут быть использованы стандартные процессы гранулирования, известные специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение, включая процесс экструзии сухих или полувлажных кормовых продуктов. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения процесс гранулирования проводят при температуре по меньшей мере около 65°C. В других вариантах воплощения настоящего изобретения температура гранулирования составляет в пределах от около 65°C до около 120°C. В других вариантах воплощения настоящего изобретения температура гранулирования составляет в пределах от около 80°C до около 100°C. В других вариантах воплощения настоящего изобретения температура гранулирования составляет около 60°C, около 65°C, около 70°C, около 75°C, около 80°C, около 85°C, около 90°C или около 100°C.

Композиции по настоящему изобретению также могут быть введены орально как фармацевтический препарат в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Оптимальные уровни дозировки для различных животных легко могут быть определены специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение, оценкой, среди прочего, способности композиции (i) в различных дозах ингибировать или снижать количество патогенных бактерий в кишечнике, (ii) в различных дозировках увеличивать или поддерживать уровни полезных бактерий и/или (ii) укреплять здоровье животного.

Для водных животных, включая лосось, форель, креветок и декоративных рыб, в одном варианте воплощения настоящего изобретения композиции по настоящему изобретению могут быть добавлены в воду, где разводят рыбу (вместо или дополнительно к кормовому продукту для рыб), в количестве, эффективном для укрепления здоровья рыб. Такие эффективные количества могут составлять в пределах от около 10^4 до около 10^{10} КОЕ *Bacillus subtilis* QST713 на мл воды, в которой разводят рыбу, или в другом варианте воплощения настоящего изобретения в пределах от около 10^5 до около 10^9 КОЕ *Bacillus subtilis* QST713 на мл воды, в которой разводят рыбу, или в другом варианте воплощения настоящего изобретения в пределах от около 10^6 до около 10^8 КОЕ *Bacillus subtilis* QST713 на мл воды, в которой разводят рыбу.

Следующие примеры приведены только для целей иллюстрации и не ограничивают объем притязаний настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - In vitro исследования эффективности QST713 бесклеточных препаратов против патогенов животных

Бесклеточные препараты QST713 тестируют на антимикробную активность против *Clostridia* (*Clostridia perfringens* ATCC 13124 и двух *Clostridia perfringens*, выделенных из природной среды); *Listeria* (*Listeria monocytogenes* ATCC 19116 и 19111, *Listeria seeligeri* ATCC 35968 и *Listeria welshimeri* ATCC 35897); *Salmonella* (*Salmonella enterica* ATCC 10398, *Salmonella arizonae* ATCC 13314 и *Salmonella bongori* ATCC 43975); и *E. coli*, при использовании технологии Kirby-Bauer и технологии минимальной ингибирующей

концентрации (МИС).

Бесклеточные препараты получают, выращивая QST713 в среде, соответствующей среде, в которой выросли целевые патогены, как показано в Таблице 2 ниже, центрифугированием в течение 15 минут при 3000 оборотов в минуту при температуре 23°C и фильтрованием через 0,45 мкм фильтрационную установку Nalgene. Для тестирования стабильности к нагреванию часть бесклеточного препарата нагревают до температуры 50°C в течение одного часа перед каждым тестом Kirby-Bauer и МИС.

Таблица 2

Род	Вид/АТСС	Ростовая среда	Условия для роста
<i>Clostridia</i>	<i>Perfringens</i> ATCC 13124	Усиленная <i>Clostridial</i> среда (Oxoid Cat.№ CM 0149)	Рост в течение ночи в сосуде АнаэроПак, как указано выше, с одним саше
			MGC Anaero-Indicator (Remel Cat№ 68-3001)
<i>Clostridia</i>	<i>Perfringens</i> изолят среды	Как указано выше	Как указано выше
<i>Clostridia</i>	<i>Perfringens</i> изолят среды	Как указано выше	Как указано выше
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i> ATCC 19116	Бульон из мозгов и сердца	В течение ночи при температуре 37°C
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i> ATCC 1911	Как указано выше	Как указано выше
<i>Listeria</i>	<i>seeligeri</i> ATCC 35968	Как указано выше	Как указано выше
<i>Listeria</i>	<i>welshimeri</i> ATCC 35897	Как указано выше	Как указано выше
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> ATCC 10398	Триптиказа -соевый бульон	Как указано выше
<i>Salmonella</i>	<i>arizonae</i> ATCC 13314	Как указано выше	Как указано выше
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i> ATCC 43975	Как указано выше	Как указано выше

В экспериментах Kirby-Bauer диски из 2-мм стерильной фильтровальной бумаги погружают в супернатант QST713 и сушат воздухом в стерильных условиях. Затем эти диски помещают на полотно для фильтрации целевого патогена, инкубируют в течение ночи и измеряют зоны ингибирования. Наблюдаются зоны ингибирования для целевых *Clostridia* и *Listeria*.

В технологии МИС лунки пластин микротитратора инкубируют и 75 мкл каждого целевого патогена разводят до 1×10^5 . Указанный выше бесклеточный препарат добавляют в каждую лунку при конечных разведениях 1:2, 1:10 и 1:50. Пластины инкубируют в течение ночи при температуре 37°C и OD600 и считывают при использовании ридера микротитратора Wallach. Бесклеточный препарат (как прошедший тепловую обработку, так и не прошедший тепловую обработку) в значительной степени эффективен против целевых *Clostridia* и *Listeria* и ингибирует рост *Salmonella* и *E. coli*, хотя не наблюдаются зоны ингибирования по меньшей мере для двух патогенов на пластинах Kirby-Bauer. Данные для *Clostridia*, *Listeria* и *Salmonella* приведены на Фигурах 1-6.

Пример 2: In vitro исследования эффективности QST713 против различных бактерий

Порошкообразный препарат *Bacillus subtilis* QST713 тестируют на эффективность против следующих различных бактерий, выделенных из природной среды: *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Samonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* и *Listeria monocytogenes*. Этот порошкообразный препарат получают культивированием *Bacillus subtilis* QST713, концентрированием культурального бульона и сушкой, как описано выше в детальном описании изобретения. Концентрируют до достижения 14,6%, сушат бульон, и 85,4% препарата составляют инертные компоненты (выбирают из возможных приведенных выше) и содержат минимально около $7,3 \times 10^9$ КОЕ *Bacillus subtilis*/грамм и максимально около 1×10^{10} КОЕ *Bacillus subtilis*/грамм. Этот препарат указан здесь, как Композиция 1. Исходные растворы Композиции 1 получают, добавляя 0,2 грамма

порошкообразной композиции в 1,8 мл стерильной дистиллированной воды таким образом, что раствор содержит около 1×10^9 КОЕ *Bacillus subtilis* на мл. Тестируемые организмы наносят полосами на триптиказа-соевый агар с 5% овечьей крови вплоть до четырех организмов, нанесенных полосами в одной агаровой пластине, каждый в одну линию, разделяющую агаровую пластинку. Организмы оставляют для высыхания в течение ночи. Затем на инокулированные пластины полосами наносят суспензию препарата QST713, как указано выше, которые наносят перпендикулярно нанесению тестируемых организмов. Изоляты *Clostridium perfringens* и *Campylobacter jejuni* инкубируют в газовой атмосфере Campy ($10\% \text{CO}_2$, $5\% \text{O}_2$, $8\% \text{N}_2$) при температуре $41 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение ночи. Другие изоляты, являющиеся аэробными, инкубируют при температуре $36 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение ночи без газа. QST713 вызывает ингибирование некоторых изолятов *Clostridium perfringens*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* и *Listeria monocytogenes*, хотя не наблюдается ингибирование *E. coli*. Дополнительно в некоторых случаях *Bacillus subtilis* QST713 демонстрирует агрессивную конкуренцию при быстром росте патогенных бактерий. Результаты суммированы в Таблице 3 ниже. Зоны ингибирования, приведенные в Таблице 3, измеряют от края роста *Bacillus* до начала роста тестируемых организмов. Дополнительно приведены фотографии пластин *Clostridium perfringens* и *Campylobacter jejuni* на Фигурах 7 и 8 соответственно.

Таблица 3

Название культуры	Изолят ID	Атмосфера и температура	Зона ингибирования (мм)	Комментарии
<i>Clostridium perfringens</i>	CL-2	газ Campy 41°C	0	Слабое ингибирование роста, хотя отсутствует зона соби- рание в массу <i>Bacillus</i>
	CL-3		3	
	CL-14		0	Собирание в массу <i>Bacillus</i>
	CL-15		0	Собирание в массу <i>Bacillus</i>
<i>Escherichia coli</i> O 157	EC-80	Аэробная 36°C	0	
	EC-81		0	
	EC-82		0	
<i>Salmonella enteritidis</i>	SE 27	Аэробная 36°C	0	
	SE 28		2	
	SE 29		1	
	SE 03		1	
	SE 09		1	
	SE 22		0	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cj-1	газ Campy 41°C	1	Собирание в массу <i>Bacillus</i>
	Cj-22		0	Слабое ингибирование роста, хотя отсутствует зона соби- рание в массу <i>Bacillus</i>
	NCj1		0	Собирание в массу <i>Bacillus</i>
	NCj2		1	
<i>Listeria monocytogenes</i>	LM1	Аэробная 36°C	2	

Пример 3 - In vivo исследования QST713 на бройлерах

Композицию 1 добавляют в стартер и финишер для бройлерных кур и отслеживают прирост массы и эффективность использования кормов. 252 бройлерных цыпленка Jumbo Cornish Cross случайным образом разделяют на четыре группы и одной из групп скармливают рационы, приведенные ниже.

> Только базовый рацион - контроль.

> Базовый рацион + 0,05% CALSPORJN® (0,5 г/кг; 10^6 КОЕ/г) (обозначенный как CS в приведенной ниже Таблице 4).

> Базовый рацион + 0,05% Композиции 1 (0,5 г/кг; 10^6 КОЕ/г) (обозначенный как Comp.1- 10^6 в приведенной ниже Таблице 4).

5 > Базовый рацион + 0,0005% Композиции 1 (0,5 г/кг; 10^3 КОЕ/г) (обозначенной как Comp. 1- 10^3 в приведенной ниже Таблице 4).

Базовый рацион состоит из следующего стартерного рациона для дней 1-22 и следующего финишного рациона для дней 22-42:

10 Таблица 4
Ингредиент композиции стартера (дни с 1 по 21) и финишера (дни с 22 по 42) базового рациона для бройлерных кур

Ингредиент, %	Стартер	Финишер
Кукуруза	45,6	49,2
Соевая мука (48% CP)	23,5	16,8
Сухая зерновая барда	5,0	5,0
Кукурузная глютенная мука	2,0	4,0
15 Рыбная мука	1,0	2,5
Мука из люцерны	--	0,5
Витамины, минеральные вещества, другое	22,9	22,0

10 Приведенные ниже в Таблице 5 результаты показывают, что Композиция 1 улучшает прирост массы птицы при уровне 10^6 КОЕ/г. Эффективность использования кормового продукта улучшена для периода дней 21-42 и для всего периода роста (1-42 дней). На 20 схеме ниже ADG относится к среднему дневному приросту, ADFI относится к среднему дневному потреблению кормового продукта.

25 Таблица 5
Воздействие пищевого препарата на рост бройлерных кур

Позиция	Препарат			
	Контроль	CS	Comp.1- 10^6	Comp.1- 10^3
Прирост массы, г				
1 день	40,5±0,43	40,0±0,40	40,8±0,43	40,7±0,43
21 день	861,8±22,3	815,6±20,3	880,0±22,3	842,3±22,3
30 42 день	2494,4±66,7	2469,0±60,9	2617,0±66,7	2460,3±66,7
ADG, г				
1-21 дни	39,8±0,89	37,7±0,81	39,8±0,89	38,9±0,89
21-42 дни	77,9±3,18	77,5±2,90	82,5±3,18	78,3±3,18
1-42 дни	58,4±1,46	57,8±1,33	61,3±1,46	57,9±1,46
ADFI, г				
35 1-21 дни	57,3±1,15	55,9±1,05	59,4±1,15	57,6±1,15
21-42 дни	156,6±3,56	158,3±3,25	155,3±3,56	158,7±3,56
1-42 дни	105,2±2,30	104,9±2,10	106,6±2,30	106,7±2,30
Прирост : Кормовой продукт, г/г				
1-21 дни	0,69±0,015	0,67±0,014	0,66±0,015	0,67±0,015
21-42 дни	0,50±0,024	0,50±0,022	0,52±0,024	0,49±0,024
40 1-42 дни	0,50±0,022	0,51±0,020	0,52±0,022	0,48±0,022
Смертность, n	1,2±0,51	1,2±0,46	1,4±0,51	1,4±0,51

Пример 4 - Стабильность QST713 в процессе гранулирования кормового продукта

45 Для определения стабильности *Bacillus subtilis* QST713 в процессе гранулирования кормового продукта для животных получают гранулы кормового продукта, содержащие Композицию 1, и тестируют образцы при различных температурах. Контрольный кормовой продукт содержит ингредиенты, приведенные в Таблице 6, при этом экспериментальный кормовой продукт дополнен 8% Композиции 1.

Ингредиент	%
Кукуруза	68,94
Соевая мука	20,40
Рыбная мука	5,50
Монокальций фосфат	0,51
Известняк	0,58
Соль	0,33
DL-метионин	0,31
L-лизин 98%	0,18
Премикс Витамины/Минеральные вещества для домашней птицы	0,25
Соевое масло	3,00
Итого	100,000

Ингредиенты смешивают в миксере Foberg при комнатной температуре и затем нагревают до различных целевых температур, при которых их выдерживают в течение около 30 секунд перед гранулированием при около 907 кг/час (2000 фунтов/в час) через матрицу для гранул 5/32"×1¼". Из десяти различных мест миксера берут десять образцов. Образцы гранул берут при целевой температуре 65°C, 75°C, 80°C и 85°C из одной и той же партии в 340 кг партия (750 фунтов партия).

Образцы из миксера разводят водой и оставляют на пять минут для полного увлажнения. Образцы гранул замачивают в течение 30 минут в фосфатном буфере для восстановления клеток QST713. Разведенные образцы помещают на пластины для определения количества колониеобразующих единиц. Количество колониеобразующих единиц в миксере на стадии гранулирования незначительно снижено, как видно из Таблицы 7 ниже.

Материал	КОЕ/г
8% <i>Bacillus</i> Миксер 1	1,98E+09
8% <i>Bacillus</i> Миксер 2	1,62E+09
8% <i>Bacillus</i> Миксер 3	1,62E+09
8% <i>Bacillus</i> Миксер 4	1,42E+09
8% <i>Bacillus</i> Миксер 5	1,73E+09
8% <i>Bacillus</i> Миксер 6	1,64E+09
8% <i>Bacillus</i> Миксер 7	1,63E+09
8% <i>Bacillus</i> Миксер 8	1,44E+09
8% <i>Bacillus</i> Миксер 9	1,72E+09
8% <i>Bacillus</i> Миксер 10	1,64E+09
8% <i>Bacillus</i> 85°C	1,52E+09
8% <i>Bacillus</i> 80°C	1,71E+09
8% <i>Bacillus</i> 75°C	1,73E+09
8% <i>Bacillus</i> 70°C	1,09E+09

Пример 5 - In vivo исследования QST713 у свиней

Проводят исследование при использовании QST713 в гранулированном кормовом продукте при участии 750 свиней на участке доращивания поросят. Композицию 1 добавляют в кормовой продукт перед его гранулированием стандартным способом. Исследование КОЕ QST713 перед и после процесса стандартного гранулирования согласуется с результатами, приведенными в Примере 4 выше, и выявлено, что КОЕ QST713 после гранулирования снижается незначительно.

Ориентировочная начальная масса поросенка составляла 4,5 кг (10 фунтов), целью являлся набор поросятами массы около 18 кг (40 фунтов). Контрольное лечение состоит из стандартного рациона без каких-либо антибиотиков или *Bacillus*, которую

скармливают около 250 пороссятам. Другие 250 пороссят получают стандартный рацион плюс 1×10^6 КОЕ *Bacillus subtilis* QST713 на г кормового продукта. Третья группа из 250 пороссят получает 1×10^7 КОЕ *Bacillus subtilis* QST713 на грамм кормового продукта. Количество выбракованных пороссят в третьей группе значительно ниже по сравнению с контрольной группой. Практика выбраковки включает снятие нездоровых или не соответствующих размерам мелких пороссят с рациона для получения ими терапевтических продуктов или умерщвления.

Пример 6 - In vivo исследования QST713 на домашней птице

Исследования проводят при использовании Композиции 1 в качестве кормовой добавки при участии бройлерных кур, 50 кур на 1 отделение на соломенной подстилке и 6 отделений для эксперимента. Композицию 1 добавляют в стандартный кормовый продукт для домашней птицы (не содержащий другие пробиотики или антибиотики) с содержанием 91 грамм Композиции 1 на тонну кормового продукта (около $6,64 \times 10^6$ КОЕ/тонна). Одну из контрольных групп и группу птиц, получающих кормовой продукт, дополненный Композицией 1, подвергают воздействию *Clostridium perfringens* на 19, 20 и 21 дни исследования. В течение всего исследования записывают массу, данные приведены в Таблице 8 ниже. Определяют эффективность использования кормового продукта и указывают ее, как коэффициент усвоения корма, данные приведены в Таблице 9 ниже. Коэффициент усвоения кормового продукта регулируют с учетом массы павшей и снятой с рациона птицы. На 22 день исследования выбирают по пять птиц из каждого отсека и умерщвляют их, взвешивают и проводят исследования на наличие очагов некротического интритита (NE). Оценку NE проводят по шкале от 0 до 3, где 0 норма и 3 наиболее тяжелые поражения. В Таблицах 8 и 9 среднее в столбцах значительно отличается в индексах ($P < 0,05$). SEM стандартная ошибка LSMEANS.

Эксперимент	Средний прирост массы (кг) 0 день	Средний прирост массы (кг)		
		Дни 0-21	Дни 0-42	Дни 21-42
Контроль (NC)	0,044	0,515 ^A	1,892 ^A	1,377 ^A
Зараженный контроль (CP)	0,044	0,469 ^B	1,704 ^B	1,235 ^B
Композиция 1 (CP)	0,044	0,496 ^{A B}	1,838 ^A	1,324 ^{A B}
SEM	0,000	0,011	0,041	0,037
Pr>F	0,3712	0,0415	0,0049	0,0083

Эксперимент	Коэффициент усвоения кормового продукта (кормовой продукт к приросту массы)				Оценка очагов некротического интритита
	Дни 0-21	Дни 0-42	Дни 21-42		
Контроль (NC)	1,723 ^B	1,943 ^B	2,055 ^B		0,17 ^C
Зараженный контроль (CP)	1,893 ^A	2,051 ^A	2,183 ^A		1,30 ^A
Композиция 1 (CP)	1,765 ^B	1,964 ^B	2,128 ^A		0,77 ^B
SEM ⁴	0,026	0,021	0,040		0,17
Pr>F	0,0003	0,0010	0,0490		0,0009

Пример 7 - Применение Композиции 2 в различных исследованиях

Для тестирования улучшения показателей роста при применении второго препарата с *Bacillus subtilis* QST713 проводят исследования. Порошкообразный препарат получают культивированием, концентрированием культурального бульона, его сушкой и промывкой при использовании процесса диафильтрации для удаления остаточной культуральной среды и метаболитов, все как описано выше, таким образом, что композиция включает по существу клетки - главным образом споры - и некоторые вегетативные клетки. Эта композиция содержит 14,6% концентрированной, высушенной, промытой культуры и 85,4% инертных ингредиентов препарата (выбирают из возможных приведенных выше в детальном описании изобретения) и около $1,0 \times 10^{10}$ КОЕ *Bacillus subtilis*/грамм, и указана здесь как Композиция 2. Композиция 2 заменяется Композицией 1 в исследованиях, описанных в Примерах 3-6, и ожидается, что результаты будут аналогичными таковым, достигнутым при использовании Композиции 1.

Пример 8 - Жизнеспособность спор QST713 в морской воде

Композицию 1 тестируют для определения жизнеспособности в морской воде и NaCl. Получают искусственную морскую воду в трех концентрациях; 10 частей на триллион, 30 частей на триллион, 50 частей на триллион; 4 пробирки по 25 мл на концентрацию. Питательный бульон в трех концентрациях NaCl: 1%, 3% и 5%; 4 пробирки по 25 мл на концентрацию. Как морскую воду, так и питательный бульон стерилизуют автоклавированием перед инокуляцией. Суспензию Композиции 1 получают, растворяя 0,5 г в 10 мл DI воды. Аликвоты (0,5 мл) суспензии инокулируют в каждую из трех концентраций морской воды и бульона. При проведении оценки было установлено, что пробирки содержат $>10^7$ КОЕ/мл (КОЕ = колониеобразующая единица). Получают емкости с разведениями 1% питательного бульона и 1% NaCl (99 мл на емкость) и стерилизуют автоклавированием. Питательный агар получают согласно инструкциям производителя; 15x100 мм пластины получают для определения количества бактерий посевом, одна пластинка на тест плюс инокулированные контроли.

Пробирки инкубируют при температуре 28°C в шейкер-инкубаторе, используя 125 оборотов в минуту в течение 14 дней. Образцы субкультур берут на 0, 2, 10 дни. На 0 день все пробирки тестируют; на 2 и 10 день тестируют только 2 самые высокие концентрации морской воды и NaCl. Определение количества бактерий посевом на агаре проводят, помещая на пластины 10 мкл из оригинальной пробирки на 0 день (= до 10^{-2} разведения) и 100 мкл 10^{-2} и 10^{-4} разведения получают в 1% питательном бульоне/1% NaCl на 2 и 10 дни. Следовательно, определения количества бактерий посевом получают фактически при уровне 10^{-3} и 10^{-5} . Пластины инкубируют при температуре 28°C. Колонии исследуют через 24 и 48 часов.

Показатели мутности получают при использовании Spectronic 20D+ инструмент, 12x75 пробирок из полистерена для сбора фракций в качестве кювет, и длине волн 660 при измерении поглощающей способности каждого образца. Тестируемые образцы получают на 0 день получением разведения 1:10 из каждой пробирки (0,5 мл в 4,5 мл 1% солевого раствора и на 2 и 10 дни тестированием 5 мл 24 часовых субкультур 10^{-2} и 10^{-4} разведения). Дополнительно показатели мутности получают на 8-й день инкубации разведений 2-го дня.

Как показатели культур на пластинах, так и показатели мутности указывают на то, что споры существуют в течение по меньшей мере 10 дней при незначительном или без отличия в количестве.

Пластины с культурой исследуют через 24 и 48 часов. Через 24 часа пластины с 10^{-3}

были все сплошь покрыты растущими бактериями. На пластинах с 10^{-5} рост наблюдался в меньшей степени, но все еще составлял 1000 колоний на пластину. Через 48 часов на всех пластинах наблюдается сплошное сильное покрытие растущими бактериями,

5 одинаково более 10^8 КОЕ на мл как в исходной пробирке. Это количество сохраняется на 0, 2 и 10 дни. Нет разницы при наблюдении роста культур в зависимости от пределов концентрации морской воды или NaCl. Культура Композиции 1 растет хорошо во всех тестируемых пределах. Не наблюдается роста ни в какое время в инокулированной морской воде или питательном бульоне с NaCl.

10 Тесты на мутность (поглощающая способность) дали аналогичные результаты, но более трудные для интерпретации. Пробирки с исходным раствором не могут быть проанализированы непосредственно, поскольку как таковые они слишком мутные, в частности при высоких концентрациях морской воды. Разведение 1:10 используют для получения показателей на 0 дней. На 2 день и 10 день для инокуляции пластин культурами используют разведения и могут быть взяты из емкостей с разведениями. 15 Поскольку оцененные количества на 2 и 10 дни составили более чем 10^8 на мл, это считается недостаточным количеством при негативном воздействии на рост концентрации соли.

Композицию 1 тестируют в трех концентрациях искусственной морской воды (10 20 частей на триллион, 30 частей на триллион и 50 частей на триллион) и трех концентрациях NaCl в питательном бульоне (1%, 3% и 5%) на устойчивость. Пробиотики выросли во всех концентрациях и были жизнеспособны по меньшей мере в течение 10 дней в высоком количестве $>10^8$ /мл. Концентрация соли в морской воде или в бульоне не оказывает негативного воздействия на способность спор прорасти и расти.

25 **Пример 9 - In vivo исследования QST713 на форели**

Радужную форель весом около 14 грамм разделяют на две группы по 20 рыб в каждой. Контрольной группе скармливают стандартный кормовой продукт для рыб, при этом экспериментальная группа получает кормовой продукт и 1×10^6 КОЕ *Bacillus subtilis* QST713 на грамм кормового продукта. Ожидается, что экспериментальная 30 группа покажет прирост массы по сравнению с контрольной группой.

Пример 10 - In vivo исследования на креветках

Для определения ингибирующей активности QST713 против известных патогенов *Penaedae* и *Palaemonidae* креветок и глубоководных креветок Композиции 1 и 2 тестируют 35 против трех бактериальных патогенов, выделенных из выращиваемых креветок: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* и *V. vulnificus* и патогенных грибков *Fusarium solani* из креветок. Исходные растворы Композиции 1 и Композиции 2 получают, добавляя 0,2 грамма полученного порошка до 1,8 мл стерильной дистиллированной воды, таким образом, что каждый раствор содержит около 1×10^9 КОЕ *Bacillus subtilis* на мл.

40 Кониdiosпоры из культивируемых в течение 5 дней культур 5 *Fusarium solani*, выросших на агаре Сабуро с декстрозой, собирают в стерильный 2% NaCl. *Vibrio* выращен на бульонной среде Luria при температуре 37°C. Субштаммы морских бактерий культивируют на обогащенной агаровой среде Мюллер Хинтон (Mueller Hinton) или среде морского бульона (marine broth) 2216 при температуре 30°C и затем культивируют 45 в триптическом соевом бульоне (TSB), дополненном 1-3% NaCl при температуре 30°C. Штаммы *V. parahaemolyticus* селективно выращивают на тиосульфат-цитрат-желчном агаре при температуре 42°C и затем культивируют на TSB, дополненном 3% NaCl при температуре 30°C.

Тестируемые организмы *Vibrio* и *Fusarium* наносят полосами на единственную вспомогательную агаровую пластину. Организмы сушат в течение ночи. Затем на две серии инкубированных пластин наносят полосами суспензию Композиции 1 или Композиции 2, как описано выше, которые наносят перпендикулярно на тестируемые организмы. Пластины с нанесенными полосами инкубируют при температуре 36°C±2 в течение ночи. Ожидается, что QST713 вызовет ингибирование некоторых изолятов патогенов *Vibrio* и *Fusarium*. Дополнительно в некоторых случаях ожидается, что *Bacillus subtilis* QST713 продемонстрирует агрессивную конкуренцию при быстром росте патогенных бактерий.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь имеют то же значение, обычно понимаемое специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные таковым, описанным здесь, могут быть использованы при осуществлении настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны здесь. Все публикации, патенты и патентные публикации, приведенные здесь, введены ссылками в полном объеме.

Приведенные здесь публикации приведены только для описания предшествующего уровня техники. Ничто из них не делает настоящее изобретение частью предшествующего уровня техники.

В то время как настоящее изобретение описано со ссылкой на конкретные варианты его воплощения, следует понимать, что могут быть сделаны дополнительные модификации, и они входят в объем притязаний настоящего изобретения, как и варианты, применения или адаптации, изложенные в приложенной формуле изобретения.

Формула изобретения

1. Способ улучшения показателей роста животного, не относящегося к насекомым и человеку, включающий введение животному, не относящемуся к насекомым и человеку, эффективного количества композиции, включающей *Bacillus subtilis* QST713.

2. Способ по п.1, где композиция включает *Bacillus subtilis* QST713.

3. Способ по п.2, где композиция дополнительно включает метаболиты, продуцированные *Bacillus subtilis* QST713.

4. Способ по п.1, где количество эффективно для повышения эффективности использования кормового продукта животным, не относящимся к насекомым и человеку.

5. Способ по п.1, где количество эффективно для увеличения показателей выживаемости животного, не относящегося к насекомым и человеку.

6. Способ по п.1, где количество эффективно для повышения прироста массы животного, не относящегося к насекомым и человеку.

7. Способ по п.1, где композицию вводят в количестве, эффективном для поддержания здоровой кишечной микрофлоры.

8. Способ по п.1, где композицию вводят в количестве, эффективном для снижения роста патогенных бактерий у животного, не относящегося к насекомым и человеку.

9. Способ по п.8, где патогенные бактерии выбирают из группы, состоящей из *Clostridia spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria spp.* и *E. coli*.

10. Способ по п.1, где животное, не относящееся к насекомым и человеку, является домашней птицей.

11. Способ по п.10, где домашняя птица является бройлерной курицей.

12. Способ по п.10, где домашняя птица является курицей-несушкой.

13. Способ по п.1, где животное является свиньей.

14. Способ по п. 1, где животное является жвачным животным.

15. Способ по п.14, где животное является жвачным животным в возрасте от рождения до двенадцати недель.

16. Способ по п.1, где композиция дополнительно включает носитель.

5 17. Способ по п.1, где композицию вводят с кормом для животных.

18. Способ по п.17, где ингредиенты корма для животных включают кормовой белок.

19. Способ по п.18, где ингредиенты корма для животных дополнительно включают кормовые углеводы.

20. Способ по п.1, где композиция дополнительно включает питьевую воду.

10 21. Способ по п.1, где композиция дополнительно включает заменитель молока для жвачного животного в возрасте от рождения до двенадцати недель.

22. Способ по п.17, где корм для животного содержит от около 1×10^3 КОЕ *Bacillus subtilis* QST713 на грамм корма для животных до около 1×10^{10} КОЕ *Bacillus subtilis* QST713 на грамм корма для животных.

15 23. Композиция для улучшения показателей роста животного, не относящегося к насекомым и человеку, включающая (i) *Bacillus subtilis* QST713 в количестве, эффективном для улучшения показателей роста животного, и (ii), по меньшей мере, один ингредиент корма для животных.

20 24. Композиция по п.23, где эффективное количество *Bacillus subtilis* QST713 составляет в пределах от около 1×10^3 КОЕ/г корма для животных до около 1×10^{10} КОЕ/г кормового продукта для животных.

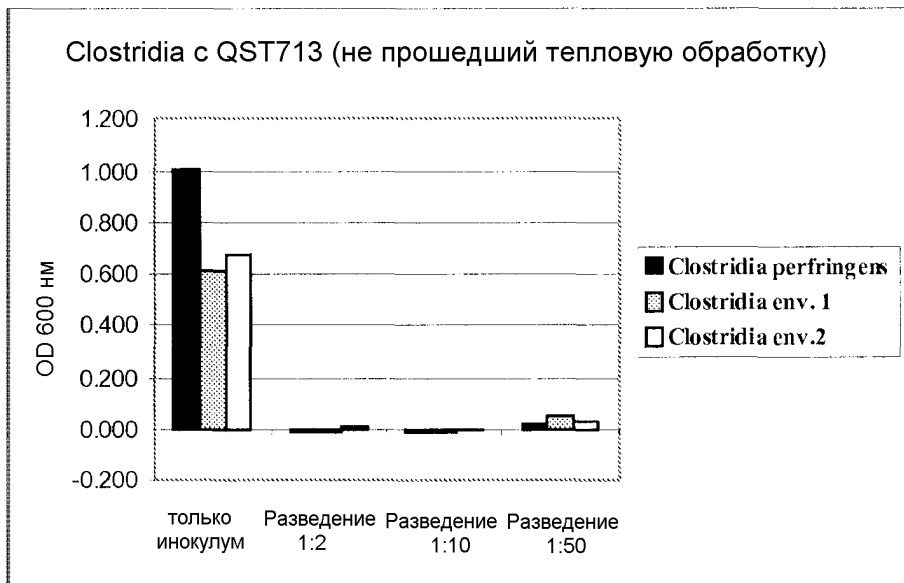
25

30

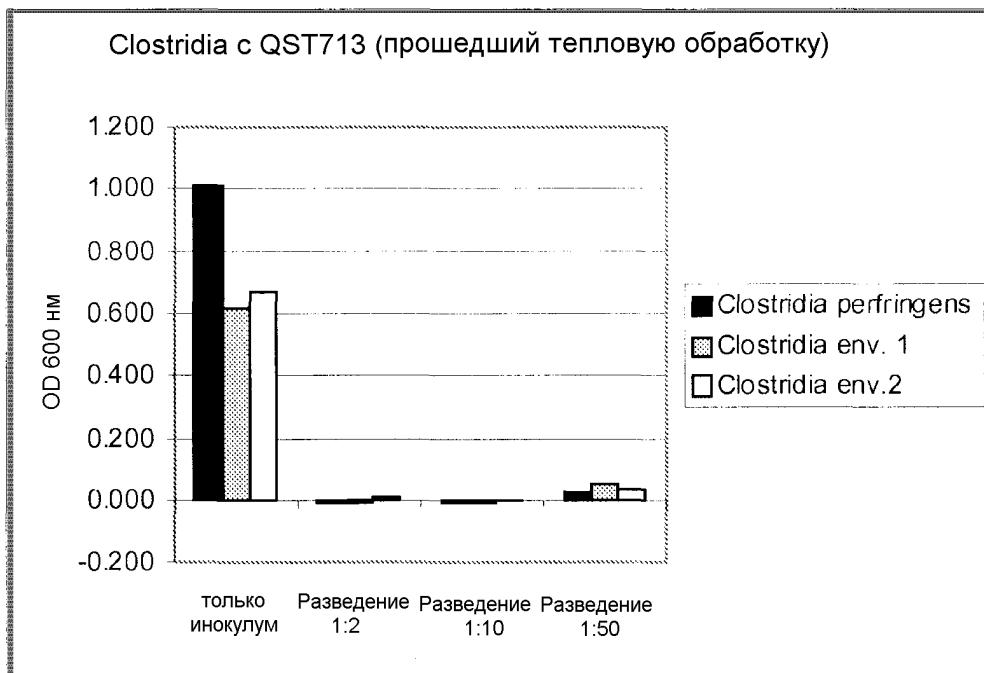
35

40

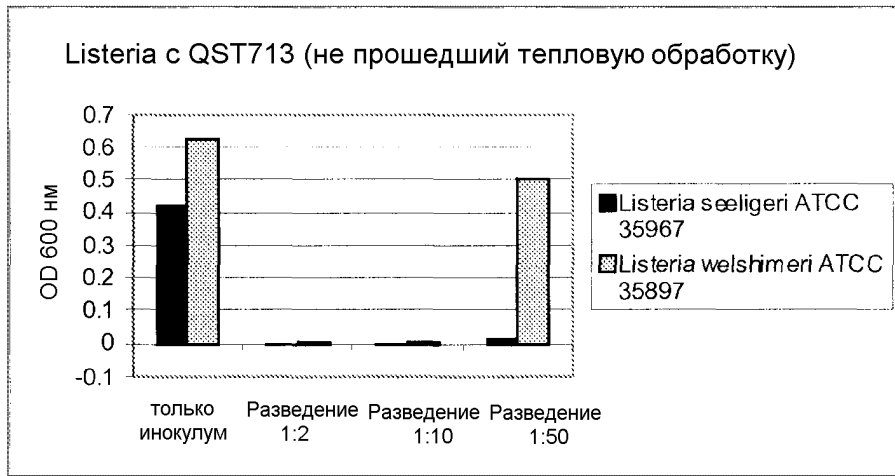
45



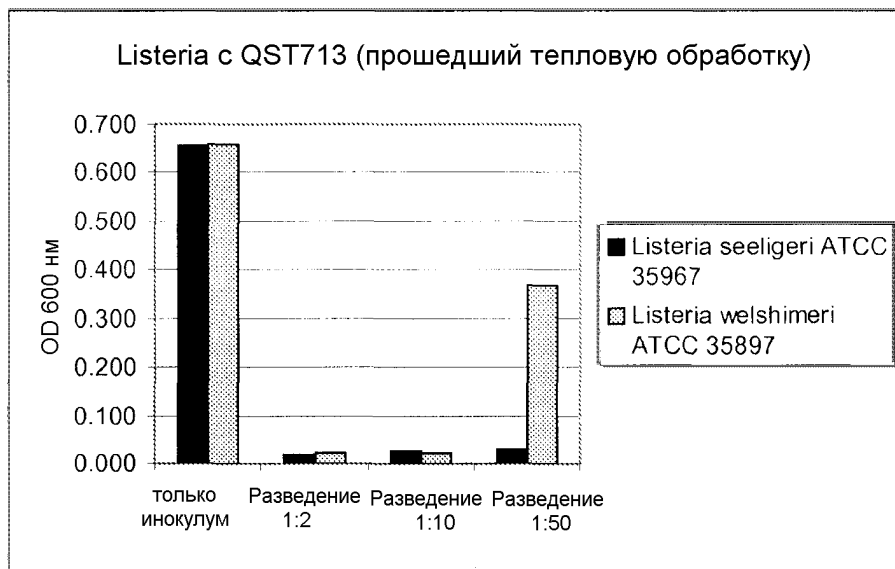
Фиг.1



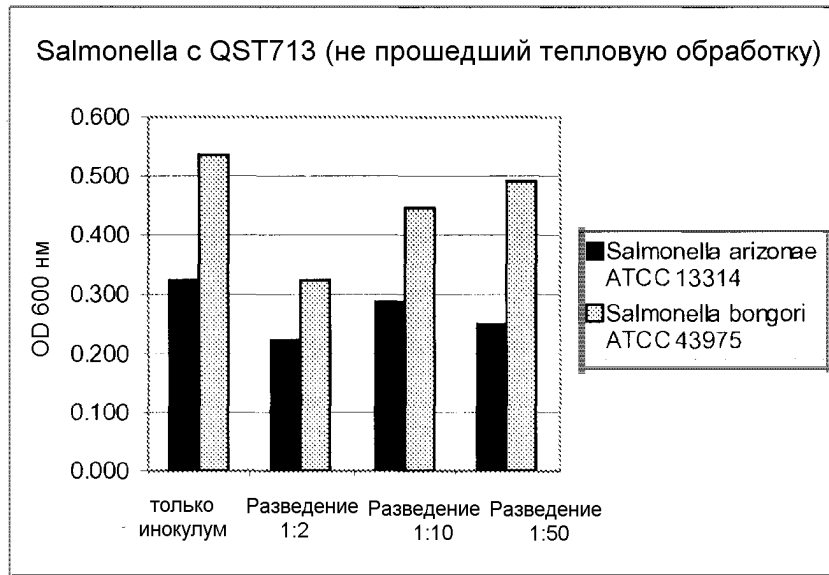
Фиг.2



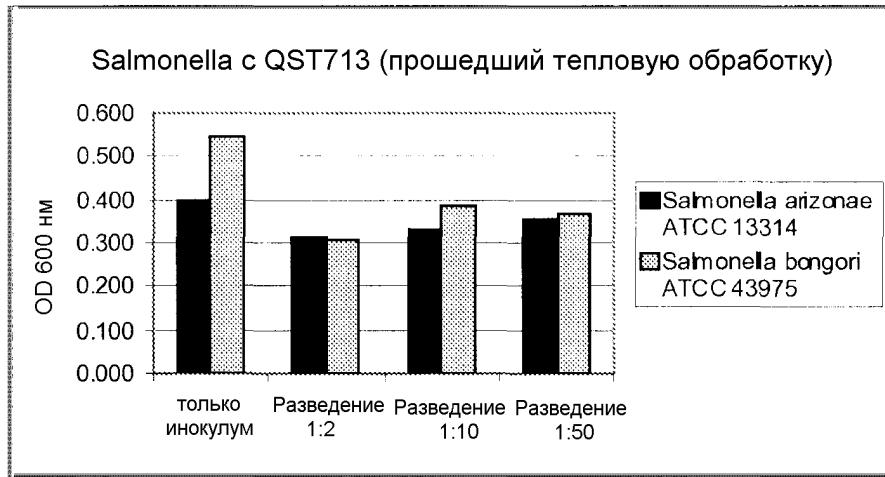
Фиг.3



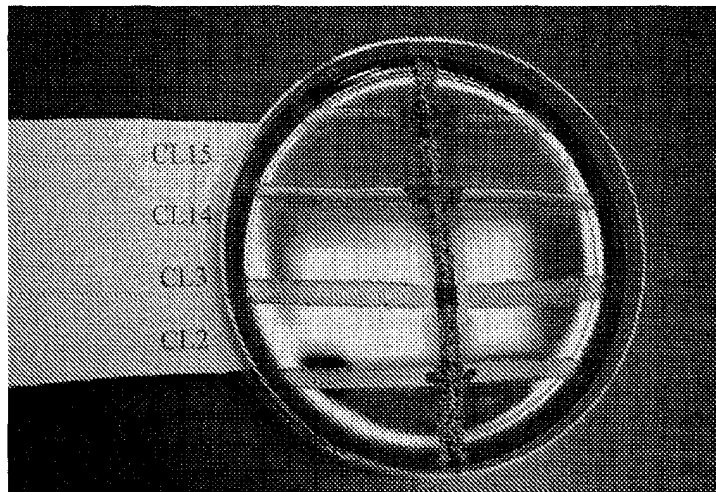
Фиг.4



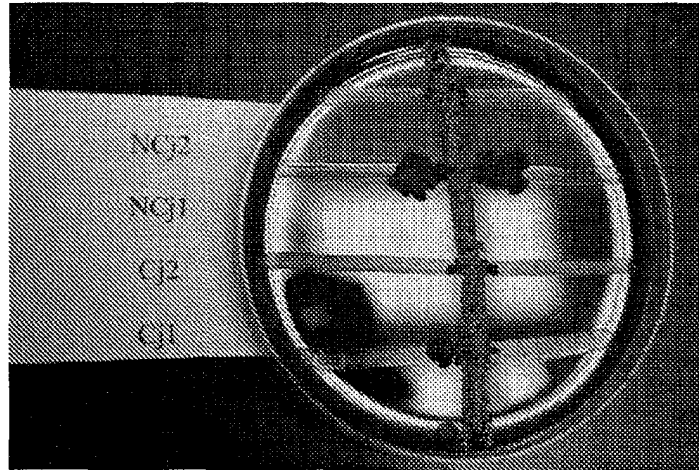
ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7



ФИГ.8