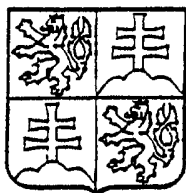


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 00141-92

(13) A3

(22) 17.01.92

(32) 18.01.91

(31) 91/9100576

(33) FR

5(51) A 23 K 1/18.
1/17

(40) 12.08.92

(71) Guyomarc`H Nutrition Animale, Saint-Nolff, FR

(72) Nguyen Tan Hung ing., Saint Ave, FR
Brongniart Isabelle Agnès ing., Trefflean, FR

(54) Způsob zvětšování mikrobiální populace v báchoru
přežvýkavých zvířat a zlepšování zootechnické
užitkovosti těchto zvířat

(57) Způsob spočívá v tom, že se do báchoru
těchto zvířat vpravují oživitelné spory Bacillus
cereus, kmen C.I.P. 5832.

PŘÍL. 1	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	25. 11. 92	01033

Způsob zvětšování mikrobiální populace v báchoru přežvýka-
vých zvířat a zlepšování zootechnické užitkovosti těchto
zvířat

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu zvětšování mikrobiální populace v báchoru přežvýkavých zvířat, což má za následek, že se tím zlepšuje zootechnická užitkovost těchto zvířat. Vynález se rovněž týká krmivového aditiva pro uskutečňování tohoto způsobu a doplňkového krmiva pro přežvýkavá zvířata, jež obsahuje toto aditivum.

Dosavadní stav techniky

Báchor, který je jedním ze čtyřech žaludků přežvýkavců, obsahuje velmi značné množství mikroorganismů, jež tvoří ekosystém žijící v symbioze se zvířecím hostitelem.

Mezi těmito organismy dominují tyto druhy:

- bakterie, řádově 10^{10} až 10^{11} zárodků na gram obsahu báchoru,
- prvoci, řádově 10^5 až 10^6 zárodků na gram obsahu báchoru.

Kromě těchto převládajících druhů nalézají se v báchoru mikroskopické houby, mykoplazmy a bakteriofágy.

Tyto mikroorganismy patří k velmi různým rodům a druhům: pouze u bakterií je možné popsat 22 rodů a 63 druhů (T.M. Yokohama et K.A. Johnson - In the ruminal animal - Digestive Physiology and Nutrition - D.C. Church, vydavatel, A Reston Book, New Jersey 07632, USA, str. 125-144).

Většina mikroorganismů obsažených v báchoru jsou přísné aneroby, jejichž výzkum je nesnadný.

Vzhledem k nesnázím spojeným současně s velkým počtem mikrobiálních druhů přítomných v báchoru a vzhledem k jejich anerobní povaze, provádějí se výzkumy kvantitativních změn mikrobiální populace v báchoru ve většině případů sloučeními značkujícími mikrofloru.

Nejčastěji a nejběžněji používanou značkovanou slouče-

ninou je DAPA (2,6-diaminopimelová kyselina), což je aminokyselina, které je specifická pro mikroorganismy a které se nenachází ani ve zvířecích tkáních, ani v uvedených rostlinných mikroorganismech. Při daném krmném režimu zůstávají poměry DAPA v obsahu báchoru stálé a použití těchto značkových sloučenin je užitečné obzvláště při měření kvantitativních změn mikrobiální populace v báchoru.

Výzkumy mikrobiální populace v báchoru se mohou uskutečňovat přímo na zvířatech in vivo (punkcí báchorové šťávy, fistulací a kanylací báchoru, atd.).

Mikroorganismy báchoru jsou schopné degradovat a fermentovat kompletní krmiva zkrmovaná přežvýkavci, které tím ztrácejí důležitou část v nich obsažených živin. Mikrobiální tělíška mikroorganismů báchoru představují rovněž důležitý krmivový přínos pro přežvýkavce. Zvětšení mikrobiální populace v báchoru je tudíž výhodné pro zootechnickou užitečnost přežvýkavých zvířat.

Antibiotika a především ionoforová antibiotika jsou schopná výhodně upravovat mikrobiální fermentace v báchoru.

V japonském vynálezu č. 1977-8381 se uvádí, že *Bacillus cereus*, kmenu T7112, je schopen korigovat příznaky anomálií kvašení v báchoru přežvýkavých savců. Takové anomálie, které vyvolávají nadýmání a hnilobné procesy v žaludku, jsou charakterizované zvýšeným množstvím amoniakálního dusíku nebo propionové kyseliny ve šťávě báchorového obsahu. Tyto příznaky a výsledky jejich léčení jsou uvedeny v následujících tabulkách 1 a 2. V případě hovézího dobytka se nastalé nadýmání (tabulka 1) a množství amoniakálního dusíku, jež je u nemocných zvířat značně zvětšené, upraví u léčených zvířat na normální množství. V případě nadouvání nastávajícím u jehňat se množství kyseliny propionové, které je u nemocných zvířat zvětšené, upravuje u léčených zvířat na normální množství. Japonský vynález č. 1977-8381 neuvádí však, zda *Bacillus cereus*, kmen T7112, má jakýkoliv účinek na tvar nebo složení mikrobiální populace, jež je původně v báchoru.

Tabulka 1 - hovězí dobytek

Hovězí dobytek		Amoniakální dusík g/ml	Celkový dusík mg/ml	Těkavá kyselina ml NaOH 0,1N	Mléčná kyselina g/ml
Zdravý	1	62	0,74	4,35	51
	2	84	0,76	3,25	0
	3	67	0,84	7,44	46
	4	120	0,71	3,13	56
Zasažený nadýmáním	5	232	0,78	4,50	0
	6	204	0,76	3,50	10
	7	273	1,36	6,32	50
	8	344	0,80	6,20	16
	9	194	0,53	1,55	8
Nadýmání po léčbě	8	17	0,62	10,62	27
	9	52	0,62	5,55	74

Tabulka 2 - jehňata

Jehňata		Kyselina octová %	Kyselina propionová %	Kyselina máselná %	Jiné těkavé mastné kyseliny %
Zdravá	1	57	16	19	8
	2	59	17	21	3
	Průměr	58	17	20	7
Zasažená nadouváním	3	56	22	19	3
	4	49	25	23	3
	5	56	21	17	6
	Průměr	54	23	20	4
	Léčená	3'	58	18	20
4'		55	16	18	11
5'		56	19	21	4
Průměr		56	18	20	6

V evropské patentové přihlášce č. 88108549.2 z 26.05.88 (priorita: 11.06.87 SE 8702435) se uvádí, že vpravováním do žaludku bakterií, jež produkují kyselinu mléčnou (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a *Leuconostoc*), nebo bakterií produkujících amylázu a proteázu (*Bacillus subtilis* a *Bacillus toyoi*) se může upravovat složení mléka u dojnic. Tato úprava se vyznačuje tím, že se při ní zvětšuje v mléce množství proteinů (popisuje se jisté skromné zvýšení obsahu tukových látek, rovněž v uvedeném spise). Avšak výsledky uvedené v tomto spise (tabulka 3) jasně dokazují, že se zvyšuje toliko obsah proteinů v mléce, dojivost (kg mléka vyrobeného za den) se nemění a dojivost korigovaná na obsah (standartizovaný) tukových látek značně klesne. To znamená, že se ošetřením zmenšuje obsah tukových látek.

Tabulka 3

	Farma 1 Ošetření		Farma 2 Ošetření		Farma 3 Ošetření	
	1	2	1	2	1	2
Produkce mléka kg/den	24,71	24,07	19,57	18,91	28,21	28,39
Produkce mléka korigovaná na tukové látky kg/den	27,90	22,93	22,74	20,53	29,43	26,65
Protein, %	3,47	3,71	3,30	3,63	3,37	3,5

Ošetření 1: kontrolní, bez přídavku bakteriálního preparátu

Ošetření 2: s přídavkem bakteriálního preparátu

V evropské patentové přihlášce č. 88108549.2 se neuvádí, nastává-li ^{vlivem} účinek do žaludku vpravovaných bakterií (zvětšení obsahu proteinu v mléce) v důsledku kteréhokoliv vlivu těchto bakterií ^{účinek} (na původní mikrobiální populaci obsaženou v báchoru).

Podstata vynálezu

Bylo nyní zjištěno a je předmětem tohoto vynálezu, že vpravováním do báchoru přežvýkavců velmi malých množství znovuoživitelných spor *Bacillus cereus*, kmen C.I.P 5832 (C.I.P. = Collection de l'Institut Pasteur) se může zvyšovat obsah DAPA v báchoru a zvyšovat zootechnická užitkovost přežvýkavých zvířat (produkce mléka nebo masa).

Malá množství spor *Bacillus cereus*, kmen C.I.P. 5832, přidávaná zvířatům se vypočítávají tak, aby spory byly přítomné ve šťávě báchoru v množství 10 000 až 100 000 spor na mililitr báchorové šťávy. Tato množství jsou mnohem menší než množství, jež jsou dosud udávány pro mikrobiální populaci báchoru.

V následujících příkladech je vynález blíže objasňován, aniž by byl nějak omezován.

Příklady provedení vynálezu

Pokus na kravách s umělou píštělí (fistulovaných)

Použijí se 4 krávy s píštělí, plemeno křížené Frisonne x Holstein, nesoucí kanylu, jež umožňuje přístup do báchoru.

Zvířata se krmí denní dávkou 9 kg sušiny směsi, která se skládá z 30 % silážované kukuřice a 70 % koncentrovaného krmiva.

Dávka se podává jednotlivě každému zvířeti ráno v 10 hodin. Distribuovaná dávka se spotřebovává během dne.

Nutriční charakteristiky silážované kukuřice a koncentrovaného krmiva jsou uvedeny v následující tabulce 4.

Tabulka 4

	Silážovaná kukuřice	Koncentrované krmivo
Sušina, g/kg	330	870
Hrubá celulóza, g/kg	231	109
Amidon + cukry, g/kg	149	214
Surový protein, g/kg	82	180
U.F.L./kg	0,9	0,9

Během 4 dní před pokusem se každý den pomocí kanyly odebere u každé krávy vzorek báchorové šťávy. Táto předexperimentální perioda slouží jako kontrola.

Během pokusu se do koncentrovaného krmiva přidá 0,1 % suchého prášku, který obsahuje 10^9 oživitelných spor *Bacillus cereus*, kmen C.I.P. 5832, na 1 gram. Pokus trvá 9 dnů. Během posledních dvou dní pokusu se u každé krávy odebere jednotlivě báchorová šťáva.

Šťáva z báchoru se odebírá vždy kolem 8 hodiny ranní, před podáním krmné dávky.

Šťáva odebraná z báchoru se zfiltruje přes gázu, aby se z ní odstranily částice krmiva.

Každý vzorek zfiltrované šťávy z báchoru se podrobí těmto analýzám:

- Výpočtení ^{množství} *Bacillus cereus*, kmen C.I.P. 5832, podle metody J. Michard a L. Levesque, 1989,
- stanovení pH elektronickým pHmetrem (značky Schott)
- ^{celkové} celkových těkavých mastných kyselin, kyseliny octové, kyseliny propionové, kyseliny máselné, plynovou chromatografií (chromatograf značky Girdel),
- stanovení amoniaku Kjeldahlovou metodou po vysrážení proteinů trichloroctovou kyselinou,
- stanovení DAPA metodou podle autora J.W. Czerkawski, 1974.

Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 5.

Tabulak 5 - výzkum na fistulovaných kravách

	Kontrolní perioda	Výzkumné perioda	Statistická průkaznost (analýza změn)
B. cereus, C.I.P. 5832 (C.F.U./ml)	-	45 000 [±] 1 540	
pH	6,84 [±] 0,13	6,90 [±] 0,10	N.S. (x)
Celkové těkavé mastné kyseliny (mmol/l)	77,18 [±] 11,36	79,80 [±] 12,10	N.S.
Kyselina octová (mmol/l)	53,50 [±] 6,67	54,15 [±] 7,47	N.S.
Kyselina propio- nová (mmol/l)	10,47 [±] 2,95	10,12 [±] 2,19	N.S.
Kyselina máselná (mmol/l)	10,87 [±] 1,93	11,31 [±] 2,84	N.S.
Amoniak (mg/l)	57 [±] 27	83 [±] 15	S.
DAPA (mg/l)	855 [±] 85	1 290 [±] 90	S.

(x) N.S. = neprůkazná, $p \geq 0,05$

S. = průkazná, $p \leq 0,05$

Během pokusné (~~výzkumné~~) periody nemění spory Bacillus cereus, kmen C.I.P. 5832, hodnotu pH, celkový obsah těkavých mastných kyselin a kyseliny octové, propionové a máselné v báchoru. Naproti tomu ošetřením se zvětší množství amoniaku a DAPA.

Tyto výsledky jsou tudíž odlišné od výsledků uvedených v japonské patentové přihlášce 1977-2381.

Zvýšení obsahu DAPA o 50 % (1290 vs. 855 mg/l) nemůže být důsledkem podání velmi malého množství spor Bacillus cereus, kmen C.I.P. 5832. Ve skutečnosti je počet spor naměřených neobyčejně malý vzhledem k počtům uváděným dříve pro původní mikrobiální populaci báchoru a činí 45 000 pro ml báchorové šťávy. Toto zvýšení obsahu DAPA znamená, že se zvětšilo množství původní mikrobiální populace v báchoru.

Příklad 2

Pokus na dojnicích

20 dojnic kříženého plemene Frisonne x Holstein se rozdělí do dvou stejných skupin.

Krmení se skládá ze základní denní dávky doplněné koncentrovaným krmivem.

Základní denní dávka se skládá z těchto složek: ray-grass, silážovaná kukuřice, obilí, sláma a močovina. Podává se každé krávě denně v množství 17 kg sušiny, 15,31 UFL (Unités Fourragères Lait - pícninové mléčné jednotky), 1 435 g "PDIN" a 1 428 g "PDIE" (jednotky proteinů stravitelných ve střevě podle francouzského systému krmení přežvýkavců). Tato základní denní dávka dodávaná v podobě směsné hmoty kryje základní produkci 25 kg mléka denně.

Koncentrované krmivo poskytuje v kg sušiny: 1 UFL, 142 g PDIN, 138 g PDIE, 80 g hrubé celulozy a 320 g emidonu + cukry. Koncentrované krmivo se rozděljuje jednotlivě každé krávě automatickým rozdělovačem v poměru 1 kg krmiva v průměru na 2,5 kg mléka nad základní produkci (25 kg).

Skupina deseti krav dostává shora uvedenou denní dávku. Tato skupina je kontrolní skupinou.

Druhá skupina 10 krav dostává navíc kromě uvedené dávky 10 g na krávu denně suchého prášku obsahujícího 10^9 oživitelných spor Bacillus cereus, kmen C.I.P. 5832, v gramu prášku. Toto doplnění umožňuje získat v průměru 60 000 až 80 000 oživitelných spor v 1 ml báchorové šťávy.

Krávy se ^{dojí} ~~ošetřují~~ dvakrát denně. Množství mléka vyrobená každou krávou se měří automaticky při každém dojení. Kontroluje se rovněž obsah másla a obsah proteinů v mléce.

Pokus se provádí po tři týdny. Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 6.

Tebulka 6

	Kontrolní skupina	Skupina Bacillus	Statistická průkaznost (analýza změn)
Dojivost, kg/den	34,61	37,62	S. (x)
Obsah tuků, %	3,86	3,83	N.S.
Obsah proteinů, %	2,87	2,85	N.S.

(x) N.S. = neprůkazná, $p \geq 0,05$

S. = průkazná, $p \leq 0,05$

Uvedené výsledky dokazují, že spory Bacillus cereus, kmen C.I.P. 5832, zvyšují produkci mléka, aniž by měnily jeho složení. Účinky Bacillus cereus, kmen C.I.P. 5832, jsou tudíž odlišné od výsledků podle přihlášky evropského patentu č. 88108549.2, které se získávají použitím mikroorganismů Lactobacillus, Pedicoccus, Streptococcus, Leuconostoc, Bacillus subtilis a Bacillus toyoi.

Příklad 3

Pokus na mladých býčích určených k výrobě masa

28 býků plemene Salers se rozdělí do dvou stejných skupin.

Jednotlivé denní krmení se skládá z těchto dvou složek:

- silážovaná kukuřice, jejíž spotřeba se váží, a
- 5 kg koncentrovaného krmiva obsahujícího v 1 kg sušiny 870 g, surového proteinu 167 g, hrubé celulozy 109 g, amidonu 120 g, vápníku 6,1 g a fosforu 5,9 g.

Skupině 14 býků, jež jsou kontrolní skupinou, se podává samotná tato dávka.

Druhá skupina 14 býků se krmí stejnou dávkou, avšak do koncentrovaného krmiva se přidají spory Bacillus cereus, kmen C.I.P. 5832, v poměru 400 000 oživitelných spor na 1 g krmiva. Toto doplnění se vypočítá tak, aby se v 1 ml báchové šťávy získalo přibližně 30 000 oživitelných spor.

Zvířata se označí kroužkem s číslem v uchu. Každý kus

dobytka se jednotlivě zváží před pokusem a po něm.

Po 63 dnech pokusu se získají následující výsledky, uvedené v tabulce 7.

Tabulka 7 - pokus na mladých býcích

	Kontrolní skupina	Skupina Bacillus	Statistická průkaznost (analýza změn)
Živá hmotnost, kg			
počáteční	312,9	312,2	N.S. (x)
konečná	397,3	402,7	S.
Přírůstek celkové hmotnosti, kg	84,4	90,5(+7,2 %)	S.
Průměrný denní přírůstek hmotnosti, g	1 339	1 436(+7,2%)	S.
Spotřeba sušiny kg/den			
silážované kukuřice	4,32	3,59	N.S.
koncentrované	4,35	4,35	N.S.
celkově	8,67	7,94	N.S.
Index spotřeby	6,42	5,93(-7,6 %)	S.

(x) N.S. neprůkazná, $p \geq 0,05$

S. průkazná, $p \leq 0,05$

Tyto výsledky tudíž dokazují, že oživitelné spory *Bacillus cereus*, kmen C.I.P. 5832, jsou schopné zlepšovat zootechnickou užitkovost mladých býků krmených na maso, tj. přírůstek hmotnosti a index spotřeby (index spotřeby = kg sušiny spotřebovaných na kg přírůstku hmotnosti).

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob zvětšování mikrobiální populace v báchoru přežvýkavých zvířat, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se do báchoru těchto zvířat vpraví bakterie typu *Bacillus cereus*, kmen C.I.P. 5832.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se používá bakterií, které jsou zčásti nebo zcela ve formě oživitelných spor.

3. Způsob zvyšování zootechnické užitkovosti přežvýkavých zvířat chovaných na maso, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se zvětší obsah mikrobiální populace v jejich báchoru způsobem popsaným v kterémkoliv z nároků 1 nebo 2.

4. Krmivové aditivum určené k provádění způsobu popsaného podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3.

5. Doplnovací krmivo pro přežvýkavá zvířata, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje krmivové aditivum podle nároku 4.

6. Použití bakterií typu *Bacillus cereus*, kmen C.I.P. 5832 ke zvětšování mikrobiální populace v báchoru přežvýkavých zvířat.

Zastupuje:

Příl.	ÚŘAD PRO VYHÁLEZY A OBJEVY	25. 11. 92	010332
			č. j.