



# Effets de probiotiques de type *Bacillus* combinés à un aliment 2<sup>ème</sup> âge pour porcelets sevrés précocement

Sandrine DUFOURNY (1), Mario AGUEDO (2), Othmane BENCHAIB (3), Giulia DE RAZZA (1), Véronique DELCENSERIE (4), Benjamin DUBOIS (1), Thami EL MEJDOUB (5), Sébastien GOFFLOT (1), Irma GONZA QUITO (4), Elizabeth GOYA-JORGE (4), Serge HILIGSMANN (6), Julien POPULIN (3), Martine SCHROYEN (7), Philippe THONART (2,5), José WAVREILLE (1)

(1) Centre wallon de Recherches agronomiques, 5030 Gembloux, Belgique

(2) Artechno SA, 5032 Les Isnes, Belgique

(3) Lutosa SA, 7900 Leuze-en-Hainaut, Belgique

(4) Université de Liège, FARAHA, Faculté de Médecine Vétérinaire, 4000 Liège, Belgique

(5) Fermented Product Partner SA, 5032 Les Isnes, Belgique

(6) CELABOR Plateforme de Valorisation des Biomasses, 4650 Chaîneux, Belgique

(7) Université de Liège, TERRA, Gembloux Agro Bio-Tech, 5030 Gembloux, Belgique

[s.dufourny@cra.wallonie.be](mailto:s.dufourny@cra.wallonie.be)

## Effect of *Bacillus* spp. probiotics on the ability to sustain early-weaned piglets receiving a 2<sup>nd</sup> age diet immediately

Weaning is a critical step for piglets. The feeding strategy needs to be adapted to sustain performances and intestinal health. *Bacillus* spp. are well known probiotics. In this study, *B. subtilis* (BS), *B. licheniformis* (BL) and *B. coagulans* (BC) were tested *in vitro* before performing an *in vivo* experiment with the strains that showed the most promising microbiota and fermentation process. *In vitro*, BL and BC showed the most contrasting effects by acting on the propionate and butyrate pathways despite reducing the relative quantities of *C. coccoides* group. BC tended to be the most effective at reducing coliforms in the fermentation juice of the bioreactors. *In vivo*, an experiment was conducted with 84 piglets for 42 days. They were weaned at 21 days and divided into three groups: a control group that received a 2<sup>nd</sup> age commercial diet and two groups that received the same diet supplemented with either BL or BC (> 2.10<sup>9</sup> CFU/kg diet). BC induced an increase in piglet weight on d7 post-weaning ( $P = 0.03$ ) and a higher valerate concentration in piglet faeces ( $P = 0.03$ ). The diarrhoea frequencies tended to be reduced for the supplemented piglets ( $P = 0.07$ ). These results showed that BC is a promising probiotic strain for piglets weaned under difficult conditions. The advantage conferred by the strain should now be economically assessed under conditions in which feed is manufactured on-farm.

## INTRODUCTION

Le sevrage du porcelet constitue une étape importante de sa vie pour laquelle l'éleveur adapte l'alimentation afin d'assurer une santé et des performances. Cependant, cette adaptation a un coût puisque les aliments spécifiquement adaptés au sevrage requièrent d'utiliser des ingrédients plus digestes et d'assurer la santé intestinale au travers de pré-, pro- ou symbiotiques. Des économies pourraient être réalisées mais cela se ferait au détriment des performances. L'étude vise à évaluer, lors du sevrage, les effets de probiotiques du type *Bacillus* incorporés dans un aliment dédié au 2<sup>ème</sup> âge, moins coûteux mais également moins adapté à la transition du sevrage.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Modèle *in vitro*

Un modèle *in vitro* simplifié du modèle baby-SPIME (Dufourny *et al.*, 2019) a été utilisé durant 48 h. Douze bioréacteurs de 300 mL, maintenus en anaérobiose par flush quotidien à l'azote, mimaient le côlon distal de porcelets non sevrés (39,5°C, pH 6,6

– 6,9, agitation continue à 300 rpm), milieu de culture de type post-sevrage. L'inoculum unique (mélange de matières fécales de 12 porcelets allaités de 25 j d'âge homogénéisé dans un tampon phosphate) a été réparti dans les bioréacteurs (15 mL) avec 0,6 g d'additif. Quatre additifs ont été préparés, répartis chacun dans trois bioréacteurs. Le contrôle (CO) était le produit nommé 3LP à base d'amidon de pomme de terre de chez Lutosa (Leuze-en-Hainaut, Belgique). Les trois autres additifs étaient ce 3LP diluant 5\*10<sup>9</sup> UFC/g des souches sporulées de *B. subtilis* (BS) ou *B. licheniformis* (BL) ou *B. coagulans* (BC). Des échantillons ont été prélevés à 0 (J0), 24 h (J1) et 48 h (J2) pour analyser les acides gras à chaînes courtes par HPLC (détecteur RI, calcul du ratio molaire en % de chaque acide par rapport à la somme des acides acétique, propionique et butyrique), dénombrer les bactéries sur milieux gélosés et faire une quantification relative de groupes bactériens par qPCR.

### 1.2. Animaux, logement et aliments

Quatre-vingt-quatre porcelets croisés Piétrain x Landrace ont été sevrés à 21 j d'âge. Ils ont été répartis (en fonction des portées, du poids et du sexe) entre trois groupes alimentaires répartis chacun aléatoirement dans sept loges sur caillebotis

pour 42 jours de post-sevrage. Le groupe CO a reçu un aliment porcelet 2<sup>ème</sup> âge. Les autres groupes ont reçu le même aliment mais supplémenté avec BL ou B dilués dans le 3LP (aliment + > 2.10<sup>9</sup> CFU/kg aliment). Les animaux ont été pesés hebdomadairement et les gains moyens quotidiens (GMQ) calculés. Les ingestions ont été consignées et les indices de consommation ont été calculés sur la base de la matière sèche de l'aliment. Des échantillons de matières fécales (MF) ont été prélevés à 7 j post-sevrage (deux porcelets par loge).

### 1.3. Statistiques

Les données, normales, ont été traitées par ANOVA avec un facteur fixe (Minitab® 21.4.1, Minitab LLC., USA). Les moyennes ont été comparées par la méthode de Dunnett sur base de CO. L'unité statistique est le bioréacteur ou la case. La fréquence de diarrhées a fait l'objet du test Khi-2 (contrôle vs. supplémenté).

## 2. RESULTATS - DISCUSSION

### 2.1. Résultats *in vitro*

A J1 (Tableau 1), les traitements BL et BC se sont démarqués de CO par l'emprunt de la voie propionique et non acétique. A J2, BC a continué de se démarquer par l'emprunt de la voie butyrique, ce qui tendait à se confirmer sur la concentration du métabolite en bioréacteurs (donnée non communiquée,  $P = 0,09$ ). Cependant, une diminution de l'abondance de l'un des deux groupes bactériens de *Clostridium* connus pour favoriser la production de butyrate (Guo *et al.*, 2020), *C. coccoides*, a été observée avec l'ajout des souches BL et BC.

A J2, une réduction du nombre de coliformes a été observée dans chaque bioréacteur (Tableau 1). Une tendance a par ailleurs été observée sur ce critère. La souche pour laquelle la réduction du nombre de coliformes, par rapport à l'inoculum de départ, a été la plus marquée était BC.

**Tableau 1** – Synthèse des principaux résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* avec l'utilisation des souches probiotiques de l'étude<sup>1</sup>

	CO	BS	BL	BC	SEM <sup>2</sup>	P <sup>2</sup>
<b>Stades et critères <i>in vitro</i></b>	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)		
J1 <sup>1</sup> Ratio molaire (RM) acide acétique (%)	44,9 <sup>a</sup>	45,1 <sup>a</sup>	40,5	41,3	0,65	< 0,001
RM acide propionique (%)	51,2 <sup>a</sup>	51,0 <sup>a</sup>	55,1	54,2	0,58	< 0,001
RM acide butyrique (%)	3,9	3,9	4,4	4,5	0,11	0,06
J2 <sup>1</sup> RM acide acétique (%)	42,3	43,4	40,8	41,3	0,35	< 0,01
RM acide propionique (%)	54,0	53,0	55,0	54,5	0,30	0,05
RM acide butyrique (%)	3,8 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>	4,1 <sup>a</sup>	4,3	0,09	0,01
Réduction coliformes (10 <sup>4</sup> CFU/mL)	5,85	1,69	11,1	16,2	2,18	0,07
Quantification relative de <i>C. coccoides</i>	0,029 <sup>a</sup>	0,031 <sup>a</sup>	0,011	0,015	0,0028	0,001
Quantification relative de <i>C. leptum</i>	0,062	0,068	0,037	0,043	0,0060	0,19
<b>Critères <i>in vivo</i></b>	(n = 7)		(n = 7)	(n = 7)		
Poids vif initial (kg)	6,3		6,4	6,4	0,02	0,32
Poids vif après 1 semaine (kg)	6,3 <sup>a</sup>		6,6 <sup>a</sup>	6,7	0,07	0,03
GMQ pendant la 1 <sup>ère</sup> semaine (kg/j)	-0,007		0,035	0,046	0,0096	0,05
GMQ final (kg/j)	0,236		0,246	0,252	0,0056	0,54
Indice de consommation	1,86		1,86	1,84	0,014	0,91
Matière sèche des MF (%) <sup>3</sup>	20,5		21,7	22,3	1,10	0,79
Acide valérique (mmol/kg MF sèches) <sup>3</sup>	10,99 <sup>a</sup>		12,66 <sup>a</sup>	16,63	0,937	0,03

<sup>1</sup> J1 et J2 : analyses à 24 et 48 h de digestion *in vitro*, MF : matières fécales. <sup>2</sup> Les moyennes B. subtilis (BS), B. licheniformis (BL), B. coagulans (BC) non étiquetées « a » sont significativement différentes de la moyenne du témoin (CO) ; SEM : erreur standard de mesure. <sup>3</sup> Matières fécales collectées 7 jours après le sevrage.

### 2.2. Résultats *in vivo*

Bien que la supplémentation en probiotique n'ait pas influencé les performances des animaux en fin d'essai (Tableau 1), BC s'est différencié de CO sur le poids et le GMQ de la première semaine de post-sevrage, montrant un soutien de croissance des animaux sur ce moment considéré le plus critique du post-sevrage. Dans les MF, BC a également augmenté la concentration en valérate. Or, ce dernier pourrait être considéré comme un bioindicateur non invasif de stimulation du système immunitaire (Kar *et al.*, 2022). Bien que le taux de MS des MF n'ait pas été significativement différent entre les traitements, la fréquence de diarrhées à risque pathogénique (MS < 20%, Niewold, 2015) chez les porcelets supplémentés tendait à être réduite de moitié par rapport aux porcelets

contrôles (respectivement 29% vs. 57%,  $P = 0,07$ ). La distribution d'un aliment 2<sup>ème</sup> âge, moins cher, dès le sevrage n'est pas dans les pratiques d'élevage. Mais le concept pourrait être transposé chez les éleveurs qui fabriquent des aliments à la ferme moins optimisés au sevrage que les aliments commerciaux. Dans ce cas, cette souche probiotique pourrait conférer un bénéfice.

### CONCLUSION

L'étude a démontré l'intérêt de *B. coagulans* en tant que probiotique. Il a favorisé la croissance des animaux en début de post-sevrage et tendait à réduire la fréquence des diarrhées. La concentration plus élevée en valérate des fèces témoignerait d'une potentielle action sur le système immunitaire.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dufourny S., Everaert N., Lebrun S., Douny C., Scippo M.L., Li B., Taminiua B., Marzorati M., Wavreille J., Froidmont E., Rondia P., Delcensier V., 2019. Baby-SPIIME: a dynamic *in vitro* piglet model mimicking gut microbiota during the weaning process. *J. Microbiol. Methods*, 167, 105735.
- Guo P., Zhang K., Ma X., He P., 2020. *Clostridium* species as probiotics: potentials and challenges. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 11, 24.
- Kar S.K., Te Pas M.F.W., Kruijt L., Vervoort J.J.M., Jansman A.J.M., Schokker D., 2022. Sanitary conditions on the farm alters fecal metabolite profile in growing pigs. *Metabolites*, 12, 238.
- Niewold T., 2015. Intestinal health. Key to maximise growth performance in livestock. Wageningen Academic Publishers (Ed), Wageningen, The Netherlands, 276 p.