

## **MODE D'ACTION, AMELIORATION DE LA SANTE INTESTINALE ET EFFICACITE DE BACILLUS SUBTILIS C-3102 EN NUTRITION AVICOLE**

**D. Kampf<sup>1</sup>, F. Paboeuf<sup>2</sup>, C. Moire<sup>2</sup>, L. Segers<sup>3</sup>**

*1Orffa Additives B.V., Wesel, Allemagne*

*2Orffa France S.A.S, Paris, France*

*3Orffa Additives B.V., Bornem, Belgique*

### **RÉSUMÉ**

Les probiotiques ont été introduits en nutrition animale depuis quelques années afin de soutenir la microflore intestinale et de maintenir la santé des animaux. Les probiotiques *Bacillus subtilis* sous forme sporulée sont particulièrement adaptés. En effet, ils peuvent être utilisés sans problème en combinaison avec des acides organiques, des coccidiostatiques et des antibiotiques thérapeutiques. Par ailleurs, lors de la fabrication des aliments, ces probiotiques peuvent facilement survivre à des traitements thermiques comme par exemple lors de la granulation.

De nombreuses études mettent en avant les effets positifs des probiotiques sporulés et en particulier de la souche *Bacillus subtilis* C-3102. La flore est alors optimisée, permettant une réduction des pathogènes au niveau de l'intestin mais également de la carcasse. Ces études portant sur environ 14.000 poulets et 2.000 dindes ont également démontré que ces spores viables de *Bacillus subtilis* C-3102 ont un effet positif sur les paramètres de production et plus spécialement sur le gain moyen quotidien et l'indice de consommation. Les résultats de ces études combinés à de nombreux essais techniques, mettent en avant les avantages d'une forme de probiotique stable dans l'aliment pour obtenir des productions performantes de dindes et de poulets de chair. En conclusion, le *Bacillus subtilis* C-3102 peut être employé avec succès dans le cadre de productions de poulets et de dindes. Le recours à ce probiotique peut aider à maintenir un bon état de santé grâce à la diminution de la population de bactéries pathogènes. En conséquence, il permet de réduire l'impact négatif des maladies chez les volailles et de diminuer les risques de possibles intoxications alimentaires chez l'humain après consommation de la viande.

### **ABSTRACT**

The use of probiotics to support the gut microflora and to maintain the health of the animals has been established in feeding practice in recent years. Especially spore forming probiotics of the genus *Bacillus subtilis* have been referred to because they can be used without issue in combination with organic acids, coccidiostats and therapeutic antibiotics, beside that these products can easily survive heat treatments during feed production e.g. while pelleting.

Concerning the use of spore forming probiotics, and in particular the strain *Bacillus subtilis* C-3102, numerous studies exist describing the positive effects to achieve an optimized gut flora with regard to a reduction of pathogens in the gut and also in the carcass. In numerous efficacy studies with in total nearly 14,000 broilers and 2,000 turkeys it has also been proven, those viable spores of *Bacillus subtilis* C-3102 in turkey as well as in broiler feed have a positive effect on production parameters especially daily weight gain and feed conversion. The results of these studies show together with widespread practical trials the contribution of a stable in feed probiotic for efficient turkey and broiler production. In conclusion, *Bacillus subtilis* C-3102 can be used successfully in broiler and turkey production. Its use can help to maintain good gut health and pathogenic bacteria can be reduced, thereby reducing the incidence of disease in the poultry themselves and potential food poisoning episodes in humans after the consumption of poultry meat.



## INTRODUCTION

Afin d'éviter les maladies liées à une forte pression pathogène en élevage intensif de dindes et poulets de chair, les Antibiotiques Facteurs de Croissance ont été largement utilisés dans de nombreuses situations passées. Depuis la prohibition européenne de ces produits, un intérêt grandissant est apparu pour leurs alternatives afin de soutenir la microflore intestinale et maintenir un bon état de santé chez l'animal. Ainsi, l'utilisation des probiotiques est par exemple apparue. Les probiotiques sont des cultures vivantes de souches de bactéries non-pathogènes et de levures, capables d'influer de manière positive sur la microflore intestinale de l'animal hôte (Fuller 1989). La plupart des probiotiques connus sont incapables de survivre lorsque des techniques modernes de production d'aliments sont employées comme le traitement thermique jusqu'à 90°C durant la granulation. Une solution à ce problème est d'utiliser des probiotiques sous forme sporulée, et plus spécifiquement des probiotiques de type *Bacillus subtilis*. De même, la compatibilité avec d'autres additifs nutritionnels, tels que des acides organiques, des coccidiostatiques et des antibiotiques thérapeutiques, doit être considérée en situation pratique.

## MODE D'ACTION

Les probiotiques se caractérisent par la formation de colonies. Ils sont dotés d'une structure complexe aérobie et possèdent de grandes capacités d'action. Par ses différents modes d'action, *Bacillus subtilis* s'avère être efficace en alimentation avicole avec l'objectif d'améliorer les paramètres de production. *Bacillus subtilis* consomme l'oxygène au sein du tube digestif et produit différentes molécules enzymatiques, telles que la subtilisine et la catalase. Par conséquent, cette situation plus anaérobie entraîne une optimisation des conditions environnementales pour des bactéries bénéfiques, par exemple les *Lactobacilli* (Hosoi et al. 2000). Ces bactéries colonisent la paroi intestinale et bloquent les sites d'attachement pour des bactéries pathogènes établissant un mécanisme appelé « inhibition compétitive ». De plus, les *Lactobacilli* produisent de l'acide lactique ayant un effet négatif sur la croissance de certaines bactéries pathogènes comme *E. Coli*, *Campylobacter* et *Clostridia* (Hosoi et al. 2000). De nombreux résultats d'essais concernant la réduction de ces pathogènes avec *B. subtilis* ont été déjà publiés (Marutra et al. 1996, Fritts et al. 2000, La Ragione and Woodward 2003). A titre d'illustration, le tableau 1 nous montre les résultats de l'essai de Maruta et al. (1995). En présence de *Bacillus subtilis* C-3102, ces auteurs observent d'une part une réduction du nombre d'animaux infectés, et d'autre part une diminution

de la concentration de bactéries pathogènes dans les fèces des animaux infectés.

Dans un autre essai en poulets de chair (Maruta et al. 1996), une diminution des infections à *Campylobacter* a été observée lorsque *Bacillus subtilis* est ajouté à l'aliment à partir de 34 jours d'âge jusqu'à 56 jours. Le pourcentage d'animaux infectés passe ainsi de 100% pour le groupe témoin à 40% pour le groupe traitement. Ce résultat descend jusqu'à 16% lorsque *Bacillus subtilis* est ajouté à partir de 17 jours d'âge jusqu'à 56 jours. Toujours dans cette étude, une diminution significative de la concentration en *Campylobacter* dans les fèces des animaux infectés a été observée. D'autres études mettent en avant une plus faible contamination des carcasses de poulets par *Salmonella* et *Clostridia* (La Ragione and Woodward 2003) ou encore par *Salmonella* et *Campylobacter* (Fritts et al. 2000) lorsque *Bacillus subtilis* est incorporé à l'aliment.

Comme mentionné auparavant, un probiotique efficace doit être compatible avec d'autres composants de l'aliment tels que les acides organiques, les coccidiostatiques et antibiotiques thérapeutiques. De plus, il doit être également très stable en cas de traitement thermique lors de la production d'aliment. Des probiotiques sporulés comme *Bacillus subtilis* existent sous une forme stable et inactive. Ils ne passent sous forme végétative que dans des conditions idéales (Hongh et al. 2005). Cet avantage par rapport aux probiotiques non-sporulés est observé dans de nombreux essais qui étudient l'influence du traitement thermique et du procédé de granulation (température jusqu'à 90°C), mais également dans des conditions plus défavorables jusqu'à 105°C (Nollet 2005, Kampf and van der Aa 2010). La compatibilité de *Bacillus subtilis* C-3102 avec des coccidiostatiques, des antibiotiques thérapeutiques et des acides organiques a également été démontrée (Enthoven and van der Lee 2004).

## RESULTATS D'ESSAIS EN DINDES ET POULETS DE CHAIR

Dans le cadre de l'enregistrement Européen d'un probiotique à base de *Bacillus subtilis* C-3102, 8 études ont été réalisées par différents Instituts de Recherche sur un total de 13.732 poulets de chair. Dans un second temps, les résultats de ces études ont fait l'objet de deux méta-analyses (Gracia and Medel 2004, Gracia et al. 2007). De plus, 3 études regroupant un total de 1960 dindes ont été réalisées afin d'obtenir l'enregistrement en dinde (EFSA 2010, Blair et al. 2004). Les aliments utilisés en station expérimentale ont été présentés sous une forme granulé ou non. Concernant la teneur en UFC/kg et les performances zootechniques, aucune différence n'a été observée entre ces deux présentations.

Les résultats zootechniques de ces études sont présentés dans le tableau 2. L'utilisation de *Bacillus subtilis* C-3102 à 10x10<sup>8</sup> UFC/kg d'aliment a ainsi amélioré significativement la croissance (+2.7%) et l'indice de consommation (-2.7%). En supplémentant un aliment poulet de chair à 5x10<sup>8</sup> UFC/kg d'aliment, le Gain Moyen Quotidien (+1.6%) et l'indice de consommation (-2.6%) ont également été améliorés. Dans chacune des méta-analyses, un accroissement de la valeur-EPEF (European Production Efficiency Factor) a été mis en évidence (Gracia and Medel 2004, Gracia et al. 2007).

Une supplémentation à 3x10<sup>8</sup> UFC/kg d'aliment entraîne un Gain Moyen Quotidien significativement plus élevé (+4.6% en moyenne) en dinde en comparaison avec le lot témoin. Concernant l'indice de consommation, un seul essai met en avant un effet significatif (-1.5%, tableau 2, EFSA 2010 ; Blair et al. 2004). En parallèle, dans le troisième essai, une réduction de la concentration en ammoniac dans les fèces (seulement 7.8 ppm contre 25.2 ppm dans le groupe témoin) peut être observée avec la supplémentation en *Bacillus subtilis* C-3102 (-69.0%, Blair et al. 2004).

## ESSAIS TERRAIN

Les probiotiques doivent également être testés de manière continue en conditions d'élevage. Le tableau 3 montre une vue d'ensemble des résultats obtenus à partir d'essais terrain avec *Bacillus subtilis* C-3102, collectés de 2008 à 2012. Ces résultats sont en accord avec ceux mis en évidence par les essais scientifiques.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blair, E.C., Allen, H.M., Brooks, S.E., Firman, J.D., Robbins, D.H., Nishimura, K., Ishimaru, H. (2004): Effects of Calsporin® on Turkey Performance, Carcass Yield and Nitrogen Reduction. *International Journal of Poultry Science*, 3 (1), 75-79.
- Enthoven, P., van der Lee, A. (2004): Compatibility of Calsporin® (preparation of viable spores of *Bacillus subtilis* C-3102) with EU approved coccidiostats, antimicrobials and organic acids in broiler feeds. CCL Research, Veghel, The Netherlands, trial code CCL 840.09.V.00.
- EFSA (2010): Scientific Opinion on the safety and efficacy of Calsporin® (*Bacillus subtilis*) for turkeys for fattening, ducks, geese, pigeons and other game birds for meat production, ducks, geese, pigeons, game birds, ornamental and sporting birds for rearing to point of lay, turkeys reared for breeding and chickens reared for laying. *EFSA Journal*, (8) 10, 1867 (13pp.)
- Fritts, C., Kersey, J., Motl, M., Kroger, E., Yan, F., Jiang, J., Campos, M., Waldroup, L., Waldroup P. (2000): *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbial status of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 9, 149-155.
- Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-368.
- Gracia, M. and Medel, P. (2004): Statistical meta-analysis of data from four EU efficacy studies conducted with Calsporin® in broilers. IMASDE, Madrid, Spain. Unique Study Code: Meta.1.04
- Gracia, M., Esteve-Garcia, E., Cachaldora, P., Marubashi, T., McCartney, E. and Medel, P. (2007): Efficacy of a bacillary probiotic in broilers. *J. Poultry Sci.*, 86, suppl. 1, 316-317.

## CONCLUSIONS

L'utilisation des probiotiques afin de soutenir la microflore intestinale et maintenir la santé animale a été mis en avant par des essais nutritionnels ces dernières années. Les probiotiques sporulés du genre *Bacillus subtilis* ont été plus particulièrement suivis étant donné leur possibilité d'utilisation en combinaison avec des acides organiques, des coccidiostatiques et des antibiotiques thérapeutiques. En parallèle, ces probiotiques peuvent aisément résister à des traitements thermiques intervenant durant les procédés de fabrication des aliments, tels que la granulation.

Concernant l'utilisation des probiotiques sporulés et plus particulièrement du genre *Bacillus subtilis* C-3102, de nombreuses études décrivent leurs effets positifs afin d'obtenir une flore intestinale optimisée. Elles mettent ainsi en avant une réduction des pathogènes au niveau intestinal mais également au niveau de la carcasse. Plusieurs études ayant inclus près de 14.000 poulets de chair et 2.000 dindes, ont également prouvé que ces spores viables de *Bacillus subtilis* C-3102 présentent des effets positifs sur les paramètres de production (en particulier GMQ et IC), autant chez la dinde que chez le poulet. Les résultats de ces études, combinés à des essais terrain largement répandus, mettent en avant la contribution positive d'un probiotique stable sur l'efficacité des productions de dindes et de poulets de chair.

En conclusion, *Bacillus subtilis* C-3102 peut être utilisé avec succès en production de dindes et de poulets. Son utilisation peut aider à maintenir une bonne santé intestinale et l'impact des bactéries pathogènes peut être réduit. En production de volailles, il est ainsi possible de diminuer d'une part les incidences de pathologies, d'autre part le risque potentiel d'apparition de contaminations alimentaires en nutrition humaine.

- Hongh, H., Duc, L., Cutting, S. (2005): The use of bacterial sporeformers as probiotics. FEMS Microbiology Reviews, 29, 813-835.
- Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K., Kaminogawa, S. (2000): Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase or subtilisin. Canadian Journal of Microbiology, 46, 892-897.
- Kampf, D., van der Aa, A. (2010): Mode of action of *Bacillus subtilis* and efficiency in piglet feeding. In: M. Gierus et al. (Hrsg.) Proc. 11. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 23.-25. November 2010, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Universität Halle-Wittenberg, ISBN: 978-3-86829-250-3, 28-30.
- La Ragione, R., Woodward, M. (2003): Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. Veterinary Microbiology, 94, 245-256.
- Maruta, K., Miyazaki, H., Masuda, S., Takahashi, M., Marubashi, T., Tadano, Y., Takashi, H. (1996): Exclusion of intestinal pathogens by continuous feeding with *Bacillus subtilis* C-3102 and its influence on the intestinal microflora in broilers. Animal Feed Science and Technology, 67 (3), 273-280.
- Nollet, L. (2005): Stability of Calsporin® during pelleting of broiler feeds at 70, 80 or 90°C. CLO-INVE, Dendermonde, Belgium. Study code: PelInveCal0204/Broiler feeds.

**Tableau 1:** Influence de *Bacillus subtilis* C-3102 sur la concentration en *Clostridium perfringens* et *Salmonella* (Maruta et al. 1996)

N = 9000 poulets par traitement	Témoin	<i>Bacillus subtilis</i> C-3102 (3x10 <sup>8</sup> UFC/kg aliment)
<i>Clostridium perfringens</i> , log <sub>10</sub> /g fèces	3.39±0.79	2.62±0.47*
<i>Cl. perfringens</i> , % animaux positifs	93%	47%*
<i>Salmonella spp.</i> , log <sub>10</sub> /g fèces	2.97±0.36	3.06±0.62
<i>Salmonella spp.</i> , % animaux positifs	57%	17%*

\* P<0.01

**Tableau 2:** Résultats zootechniques de l'utilisation de *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin®) en poulets de chair et dindes (Gracia and Medel 2004, Gracia et al. 2007, EFSA 2010, Blair et al. 2004)

Essai no.	Nombre d'animaux (réplicas par groupe x animaux/case)	<i>Bacillus subtilis</i> C-3102 (UFC/kg d'aliment)	Poids Vif final (kg)	Gain Moyen Quotidien (g/jour)	Indice Conso. (kg aliment/ kg gain)
Poulet 1 (4 essais)	5524 (63 x 22-100)	0 5x10 <sup>8</sup>	2,599 2,640*	61,2 62,2*	1,90 1,85**
Poulet 2 (4 essais)	8208 (139 x 26-50)	0 10x10 <sup>8</sup>	2,372 2,436***	55,5 57,0***	1,82 1,77***
Dinde 1 <sup>#</sup>	600 (12 x 25)	0 3x10 <sup>8</sup>	6,498 6,732**	77,7 80,5**	2,06 2,05
Dinde 2 <sup>#</sup>	960 (32 x 15)	0 3x10 <sup>8</sup>	9,522 9,854**	112,6 116,6**	2,05 2,02**
Dinde 3 <sup>#</sup>	400 (8 x 25)	0 3x10 <sup>8</sup>	13,41 14,32**	105,9 113,2**	2,42 2,42

Différences significatives entre les groupes témoin et traitement : \* P<0,10; \*\* P<0,05; \*\*\* P<0,001

<sup>#</sup> Essai 1 sur femelles uniquement, Essai 2+3 sur mâles uniquement

**Tableau 3:** Effets de *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin®) sur l'Indice de Consommation (corrigé à 1500g de Poids Vif) et le Gain Moyen Quotidien (g/jour) dans des conditions pratiques en U.E. (2008-2010)

Essai / Lot	Nombre d'animaux	Pays	Indice de Conso. c1500			Gain Moyen Quotidien		
			Témoin	<i>B. subtilis</i>	Diff.	Témoin	<i>B. subtilis</i>	Diff.
<b>1</b>	90.200	NL	1,461	1,439	-1,5%	54,3	55,8	2,8%
<b>2</b>	102.000	NL	1,410	1,368	-3,0%	56,8	57,6	1,4%
<b>3</b>	50.000	NL	1,561	1,478	-5,3%	50,0	54,8	9,6%
<b>4</b> 1	66.000	NL	1,413	1,379	-2,4%	56,0	57,0	1,8%
<b>4</b> 2	66.000	NL	1,413	1,426	0,9%	56,0	54,5	-2,7%
<b>5*</b>	1.500.000	FR	1,660	1,641	-1,1%	49,2	50,4	2,4%
<b>6*</b>	39.270	FR	1,666	1,634	-1,9%	51,0	52,3	2,5%
<b>7</b>	33.000	GB	1,295	1,233	-4,8%	66,1	68,1	3,0%
<b>8</b>	128	PL	1,238	1,222	-1,3%	60,2	62,1	3,2%
<b>9</b> 1	175	DE	1,235	1,149	-7,0%	66,1	68,6	3,8%
<b>9</b> 2	150	DE	1,193	1,180	-1,1%	64,0	63,9	-0,2%
<b>10<sup>#</sup></b>	480.000	DE	1,263	1,289	2,1%	56,9	56,7	-0,3%
<b>Moyenne</b>	<b>2.426.923</b>		<b>1,401</b>	<b>1,370</b>	<b>-2,2%</b>	<b>57,2</b>	<b>58,5</b>	<b>2,3%</b>

\* = Dans ces essais, *B. subtilis* C-3102 est testé par rapport à un témoin positif (huiles essentielles)

<sup>#</sup> = Dans cet essai, *B. subtilis* C-3102 réduit significativement les entérites nécrotiques avec significativement moins de traitements dans le groupe *B. subtilis* C-3102