

EVALUACION A LARGO PLAZO DE LA ADMINISTRACION DE DOS CEPAS PROBIÓTICAS DE *BACILLUS SP.* EN EL RENDIMIENTO REPRODUCTIVO DE CERDAS COMERCIALES Y SU MICROBIOTA INTESTINAL

Saladrigas-García¹, M., Solà-Oriol¹, D., López-Vergé¹, S., Nielsen², B., Pérez¹, J.F. y Martín-Orúe¹, S.M.

¹Servicio de Nutrición y Bienestar Animal, Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España. ²Chr. Hansen A/S, Boege Allé 10-12, 2970 Hoersholm, Dinamarca. Email: mireia.saladrigas@uab.cat

INTRODUCCIÓN

En los sistemas actuales de producción intensiva, la cerda reproductora debe alcanzar elevados índices reproductivos lo que supone en ocasiones un reto difícil de lograr. Los probióticos se han propuesto como una herramienta útil para mejorar su rendimiento, incrementando el consumo en lactación, reduciendo la movilización de reservas, promoviendo una mayor calidad en la producción de leche y un mayor peso de camada al destete (Alexopoulos *et al.*, 2004; Böhmer *et al.*, 2006; Stamati *et al.*, 2006; Hayakawa *et al.*, 2016). Algunas cepas de *Bacillus* spp. han demostrado además ser capaces de promover la salud digestiva (Sun *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2012), evidenciando actividad inhibitoria contra bacterias patógenas (Guo *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2014). El objetivo del presente estudio fue evaluar, en cerdas reproductoras, el efecto de administrar, durante tres ciclos consecutivos, una de dos cepas probióticas: *Bacillus subtilis* 25841 o *Bacillus amyloliquefaciens* 25840. Particularmente se analizó su impacto sobre su rendimiento reproductivo y sobre la microbiota intestinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 90 cerdas reproductoras comerciales (Landrace x Yorkshire) similares en términos de paridad ($2,83 \pm 0,14$) y peso corporal ($211,8 \pm 1,10$ kg). Al inicio del estudio (primer ciclo), las cerdas fueron distribuidas al azar en tres tratamientos dietéticos ($n = 30$): (i) grupo control con dieta estándar (CON); (ii) dieta control suplementada con 5×10^8 cfu/kg *B. subtilis* 25841 (PR1); y (iii) dieta control suplementada con 5×10^8 cfu/kg *B. amyloliquefaciens* 25840 (PR2). Los tratamientos se administraron durante la totalidad del período experimental. Las cerdas fueron alojadas en jaulas individuales hasta gestación confirmada (30 días de gestación), seguidamente fueron alojadas en grupo hasta los 107 días de gestación y finalmente fueron trasladadas a las salas de maternidad, donde permanecieron con sus lechones hasta el destete. El periodo experimental contempló tres ciclos reproductivos completos. El número de cerdas en el ciclo 2 y 3 fue menor debido al reemplazo y movimiento normal de animales (58 y 45 cerdas, respectivamente). Se recogieron los datos productivos, tanto referentes al peso, consumo y grasa dorsal de las cerdas como a su rendimiento en el parto y al destete. Durante el tercer ciclo se recogieron muestras fecales para el estudio de la microbiota intestinal los días 8 y 21 de lactación ($n = 13$, $n = 11$ y $n = 14$ para CON, PR1 y PR2, respectivamente). El análisis de microbiota se llevó a cabo mediante secuenciación masiva del gen 16S RNA (Illumina MiSeq). El análisis estadístico de los datos productivos se realizó mediante un ANOVA de dos vías con el programa R v3.5.1. El análisis bioinformático de la microbiota se llevó a cabo mediante los programas QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) para el procesado de los datos primarios, y R v3.5.2. para el análisis bioestadístico, utilizando entre otros, los paquetes *phyloseq*, *vegan* y *metagenomeSeq* (McMurdie & Holmes, 2013). La significación se estableció en $\alpha < 0,05$ y la tendencia en $\alpha < 0,10$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo de los tres ciclos no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto al consumo medio diario, la pérdida de peso corporal ni la movilización de grasa dorsal de las cerdas durante la lactación ($P > 0,1$). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en el rendimiento reproductivo de las cerdas (Tabla 1). Ambos grupos suplementados mostraron un mayor número de lechones nacidos totales y nacidos vivos por

cerda (P=0,01). Las cerdas que recibieron la dieta PR2 presentaron también un mayor número de nacidos vivos (P=0,01) y lechones destetados (P=0,002). Asimismo, se observó un efecto del ciclo en el número de lechones destetados por cerda, independientemente del tratamiento, lo que refleja un incremento asociado a la paridad de las cerdas. No se observó interacción en ninguna de las variables de estudio.

Tabla 1. Rendimiento reproductivo de las cerdas a lo largo de tres ciclos completos para cada grupo experimental (CON: dieta estándar; PR1: CON + 5×10^8 cfu/kg *B. subtilis* 25841; y PR2: CON + 5×10^8 cfu/kg *B. amyloliquefaciens* 25840). Los resultados se presentan como la media \pm la desviación estándar.

	CON	PR1	PR2	P-valor
Lechones totales	18,3 ^a \pm 4,02	19,5 ^{ab} \pm 4,38	20,7 ^b \pm 4,36	0,009
Nacidos vivos	15,7 ^a \pm 3,05	15,7 ^a \pm 3,72	17,4 ^b \pm 3,60	0,009
Nacidos muertos	1,8 \pm 1,69	2,5 \pm 2,02	2,1 \pm 2,11	0,129
Momificados	0,9 \pm 1,37	1,3 \pm 1,43	1,2 \pm 1,37	0,215
Destetados	13,9 ^a \pm 1,13	13,6 ^a \pm 1,13	14,4 ^b \pm 0,98	0,001

^{a,b} valores en cada fila significativamente diferentes (P<0,05).

Con respecto a la microbiota fecal, no se registraron cambios significativos en la biodiversidad alfa, ni beta, pero si se observó una tendencia a cambios en la estructura del ecosistema (prueba ANOSIM, P = 0,08). En relación a los cambios en grupos microbianos concretos, se observó una reducción significativa en el filo Bacteroidetes (22,4, 18,7 y 18,6%, para CON, PR1 y PR2, respectivamente; P = 0,03) y una tendencia para una mayor ratio Firmicutes:Bacteroidetes en las cerdas suplementadas (3,7, 5,3 y 4,6; para CON, PR1 y PR2, respectivamente; P = 0,10). Cambios similares han sido también observados por otros autores (Cui *et al.*, 2013) y han sido relacionados con un mayor crecimiento y metabolismo lipídico. También se observaron cambios significativos en algunas familias concretas (Tabla 2), con disminuciones en Prevotellaceae (9,4, 7,3 y 7,3%; para CON, PR1 y PR2, respectivamente; P = 0,03) y Ruminococcaceae (16,1, 13,1 y 13,7%, para CON, PR1 y PR2, respectivamente; P = 0,04). Varios géneros también fueron modificados por las cepas probióticas, como *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Megasphaera*, *Oscillospira*, *Dorea*, *Blautia* o *Roseburia*.

Tabla 2. Top 10 de las familias con mayor representación en la microbiota fecal de las cerdas para cada grupo experimental (CON: dieta estándar; PR1: CON + 5×10^8 cfu/kg *B. subtilis* 25841; y PR2: CON + 5×10^8 cfu/kg *B. amyloliquefaciens* 25840). Los resultados se presentan como la media \pm la desviación estándar.

	CON	PR1	PR2	P-value
<i>Clostridiaceae</i>	15,8 \pm 8,15	19,9 \pm 9,46	22,8 \pm 8,59	0,594
<i>Ruminococcaceae</i>	16,1 ^a \pm 4,84	13,1 ^b \pm 3,85	13,7 ^b \pm 3,06	0,039
<i>Turicibacteraceae</i>	9,7 \pm 12,9	11,8 \pm 8,91	10,7 \pm 4,86	0,943
<i>Prevotellaceae</i>	9,5 ^a \pm 5,88	7,3 ^b \pm 5,45	7,3 ^b \pm 4,87	0,032
Desconocido	8,1 \pm 3,28	7,6 \pm 2,90	8,3 \pm 3,50	0,147
<i>Lachnospiraceae</i>	5,6 ^a \pm 2,19	4,5 ^b \pm 1,66	5,0 ^{ab} \pm 1,07	0,039
<i>Lactobacillaceae</i>	4,1 \pm 4,25	6,1 \pm 7,37	4,9 \pm 6,46	0,639
<i>Bacteroidaceae</i>	4,7 \pm 5,05	4,4 \pm 4,96	3,9 \pm 3,94	0,147
<i>Peptostreptococcaceae</i>	3,4 \pm 2,27	4,1 \pm 2,05	4,4 \pm 2,22	0,626
<i>Spirochaetaceae</i>	3,4 \pm 2,38	2,8 \pm 2,38	3,1 \pm 2,20	0,259

^{a,b} valores en cada fila significativamente diferentes (P<0,05).

En conclusión, la adición de *B. amyloliquefaciens* 25840, de forma ininterrumpida durante tres ciclos consecutivos, mejoró el rendimiento reproductivo de las cerdas en términos de prolificidad. Asimismo, la cepa de *B. amyloliquefaciens* 25840 también exhibió un aumento en el número de lechones destetados por camada. La administración de probióticos a lo largo de tres ciclos completos demostró tener un claro impacto en el ecosistema microbiano intestinal además de incrementar el ratio Firmicutes:Bacteroidetes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Alexopoulos, C. *et al.* 2004. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 88(11-12): 381-392. • Böhmer, B.M. *et al.* 2006. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 90(7-8): 309-315. • Caporaso, J.G. *et al.* 2010. *Nat Methods* 7(5): 335-336. • Cui, C. *et al.* 2013. *Genet Mol Res.* 12(2): 1766-1776. • Guo, X. *et al.* 2006. *Antonie Leeuwenhoek.* 90(2): 139-146. • Hayakawa, T. *et al.* 2016. *Anim Sci J* 87(12): 1501-1510. • Larsen, N. *et al.* 2014. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(3): 1105-1118. • McMurdie, P.J. & Holmes, S. 2013. *PLoS One* 8(4): e61217. • Novak, K.N. *et al.* 2012. *Res Vet Sci.* 92(3): 427-434. • Reglamento (CE) No 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo. • Stamati, S. *et al.* 2006. *Int J Probiotics Prebiotics.* 1(1): 33-40. • Sun, P. *et al.* 2010. *J Dairy Sci* 93(12): 5851-5855.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (proyecto AGL2016-75463-R).

EVALUATION OF LONG-TERM ADMINISTRATION OF TWO BACILLUS STRAINS IN COMMERCIAL SOWS ON PERFORMANCE AND FAECAL MICROBIOTA

ABSTRACT: The effect of long-term administration of two different *Bacillus* strains was tested on 90 breeding sows that were randomly allotted into three treatments: a control group (CON); and CON supplemented with 5×10^8 cfu/kg *B. subtilis* 25841 (PR1); or 5×10^8 cfu/kg *B. amyloliquefaciens* 25840 (PR2). Reproductive parameters were registered along the three reproductive cycles. Faecal samples were taken on days 8 and 21 of the third lactation for microbiota analysis by Illumina MiSeq 16S RNA. Supplemented groups showed higher number of born piglets per litter ($P=0.01$) and PR2 sows a higher number of born alive ($P=0.01$) and weaned piglets ($P=0.001$). Regarding fecal microbiota changes were found in community structure (ANOSIM test, $P=0.08$) with changes at phylum level (Firmicutes:Bacteroidetes: 3.7, 5.3 and 4.6, $P=0.10$) and at family level (*Prevotellaceae*: 9.4, 7.3, 7.3% ($P=0.03$) and *Ruminococcaceae*: 16.1, 13.1, 13.7% ($P=0.04$)). Several genera were also modified by the probiotic strains including *Prevotella*, *Ruminococcus* and *Megasphaera*, among others. In conclusion, the addition of *B. subtilis* 25841 and *B. amyloliquefaciens* 25840 were sown to enhance the sow reproductive performance in terms of prolificacy with a clear impact on the gut microbial ecosystem.

Keywords: Probiotic, *Bacillus*, sows, performance.