

ÉTUDE DE QUELQUES FACTEURS DE LA STABILITÉ DES ANTIBIOTIQUES DANS LES ALIMENTS POUR PORCELETS

E. SALMON-LEGAGNEUR, A. AUMAITRE, C. JOUANDET

avec la collaboration technique de P. VAISSADE, Huguette DEWULF, A. KMOISANT,
Hélène MOUTEL, Michelle NÔCART et J. HAUTDUCÉUR.

*Station de Recherches sur l'Élevage des Porcs,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique*

SOMMAIRE

Le taux de disparition de l'activité antibiotique (dosage microbiologique) est très variable mais il peut dépasser 80 p. 100 avant 6 mois dans certains aliments. Cette dégradation dépend en particulier de la nature de l'antibiotique, mais aussi de la composition de l'aliment (présence de graisse) et de sa présentation (granulation) ; la teneur en protides et la dose d'antibiotique semblent avoir une moindre influence.

INTRODUCTION

Il arrive parfois que des supplémentations par un même antibiotique d'aliments destinés aux animaux ne produisent pas le même effet dans le temps. L'intérêt de cette stimulation pour favoriser la croissance s'en trouve donc diminué. Diverses explications ont été données à ce phénomène. En particulier, la variabilité peut provenir des différences de sensibilité individuelle des animaux, des phénomènes d'accoutumance ou des variations des conditions de milieu. Une autre explication très simple de ce manque de fidélité pourrait être la perte d'activité de l'antibiotique dans l'aliment. Cette dégradation est un phénomène connu qui a été signalé pour la plupart des antibiotiques utilisés en alimentation animale (ESPOSITO et *al.*, 1952 ; HOLLENBECK, 1954 ; WEINSTEIN, 1958 ; GOLDBERG, 1959 ; KATZ et FASSBENDER, 1967 ; BARBIERS et NEFF, 1966 ; WORNICK, 1967 ; HUSAAS, 1967). Nous l'avons rencontrée au cours d'une expérience sur porcelets, où elle fut la cause probable d'une réduction importante de la stimulation de croissance escomptée (JOUANDET et *al.*, 1964). Tou-

tefois, les facteurs qui provoquent cette dégradation au cours du stockage des aliments sont encore mal connus (WORNICK, 1967).

Il nous a donc paru utile d'examiner dans le cas des aliments pour sevrage des porcelets, où l'antibiosupplémentation est souvent la règle, l'influence de quelques facteurs qui varient souvent dans les fabrications : taux de protides, présence de graisse, présentation, dose d'antibiotique.

Cette expérience a consisté à étudier l'évolution, de l'activité antibiotique, mesurée par dosage microbiologique, au cours de la conservation, de divers aliments représentant 48 combinaisons différentes (2 taux de protides \times 2 taux de lipides \times 2 présentations \times 2 doses d'antibiotique \times 3 antibiotiques). La durée de stockage était fixée à 6 mois par similitude avec la garantie exigée dans les aliments industriels pour certaines vitamines.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

a) Antibiotiques

Les 3 antibiotiques utilisés ont été choisis parmi ceux d'un emploi courant en alimentation animale. La forme chimique et la présentation étaient celles des préparations commerciales usuelles à l'usage de l'alimentation (*feed grade*), à savoir :

- chlortétracycline base (1) : adjuvant A 80/80, Rhône-Poulenc (81,5 g d'activité chlorhydrate/kg).

- oxytétracycline complexée sur ammonium quaternaire : terramycine T 80, Pfizer-Clin (82, 71 g d'activité chlorhydrate/kg).

- Embonate de spiramycine : Spiravit 20, Rhône-Poulenc (22 g 75 d'activité embonate/kg).

Chacune de ces préparations était introduite sur un support de tourteau de soja cuit, compte tenu de son activité réelle, de façon à réaliser des concentrations de 10 et 100 p.p.m. dans les aliments.

b) Aliments

Quatre formules d'aliments pour porcelets correspondant aux combinaisons factorielles de 2 taux de protéines (16 et 25 p. 100) et de 2 taux de lipides (0 et 10 p. 100 d'huile stabilisée au BHT.) ont été utilisées. Les formules désignées par les lettres A, B, C, D sont reproduites dans le tableau 1. A l'exception du taux de graisse volontairement élevé dans les aliments A et C, la composition de ces aliments est voisine de celle que l'on trouve dans les aliments pour sevrage des porcelets de 3 à 5 semaines (*starter* porcelet). L'huile d'arachide, bien que peu utilisée habituellement, a été choisie de préférence à d'autres graisses pour la meilleure homogénéité qu'elle conférerait aux mélanges. Chacun de ces aliments était préparé sous deux présentations différentes, farine (mouture moyenne) ou granulés (2,5 mm de diamètre) par passage de la farine à travers une presse Templewood.

De façon à réduire les erreurs ou variations liées à l'hétérogénéité des aliments, la préparation de la quantité nécessaire de chaque aliment A, B, C ou D pour tous les antibiotiques était effectuée en une seule fois (mélangeuse de 1 500 l). L'introduction des antibiotiques était alors effectuée aux doses voulues (mélangeuse de 200 l). La moitié de chaque préparation était ensuite granulée et l'autre laissée en farine. Les aliments étaient conservés dans des sacs en papier. Le stockage avait lieu dans un hangar fermé, à proximité des bâtiments d'élevage des animaux et à température ambiante. Les températures et le degré hygrométrique du local étaient enregistrés pendant toute la durée de l'expérience (tabl. 2).

c) Analyses

Toutes les analyses ont été effectuées par voie microbiologique. L'activité antibiotique des échantillons d'aliment était déterminée par rapport à une gamme de concentration connue et à des aliments témoins sans antibiotique de même composition conservés dans les mêmes conditions.

(1) Actuellement, cette préparation a été remplacée dans le commerce par un mélange de sels de calcium et de magnésium.

Ces analyses étaient pratiquées après les intervalles de temps suivants (stades), désignés par les chiffres I à V : 5 jours (délai nécessaire à la mise en route du premier dosage), 1 mois, 2 mois, 3 mois et 6 mois. Toutefois, par suite de difficultés matérielles, le dosage de la spiramycine n'a pas été effectué au stade III.

TABLEAU I
Formule et composition des aliments

Aliment	A	B	C	D
Céréales	53	52	53	52
T. soja cuit	18	18	8	8
Farine de poisson Norvège....	12	12	6	6
Huile arachide (1)	10	—	10	—
Manioc.....	2	13	18	29
Mélange minéral	3	3	3	3
Prémélange antibiotique	2	2	2	2
	100	100	100	100
Matière azotée brute p. 100..	25	25	16	16
Lipides totaux p. 100.....	12	2	12	2

(1) Stabilisée par 0,01 p. 100 de B. H. T.

TABLEAU 2
Conditions atmosphériques pendant la durée de l'expérience

Période	Température (°C)			État hygrométrique
	Moyenne	Minimum	Maximum	Moyenne (E %)
27-3 au 3-4	6	2	10	72
15-4 au 21-4	10	5	18	78
1-5 au 8-5	18	7	29	82
15-5 au 22-5	13	7	28	77
29-5 au 6-6	15	9	27	70
14-6 au 21-6	20	13	36	68
28-6 au 3-7	17	11	25	71
18-7 au 25-7	16	11	23	73
30-7 au 6-8	16	11	20	70
15-8 au 22-8	17	11	24	62
28-8 au 4-9	16	10	22	63
11-9 au 19-8	17	12	22	75

A chaque stade, deux échantillons moyens de 500 g de chaque aliment étaient prélevés et soumis simultanément pour analyse à deux laboratoires différents. Cette procédure d'analyse contradictoire était apparue nécessaire pour tenir compte de la variabilité des dosages et du nombre élevé de répétitions indispensable à la précision de chaque résultat.

Les techniques d'analyses étaient celles utilisées couramment par les différents laboratoires et décrites par GROVE et RANDALL (1955), *Analytical Committee* (1963) et Laboratoires Rhône-Poulenc

(1966) : le principe est celui du disque de diffusion en culture sur plaque de gélose. Les germes utilisés étaient : *B. Cereus mycoïde* ATCC 1178 (Pasteur) pour l'auroémicine et la terramycine et *Sarcina lutea* ATCC 1341 (Pasteur) pour la spiramycine. Bien que les techniques utilisées par les laboratoires pratiquant le même dosage aient été, en principe, les mêmes, de légères différences opératoires sont apparues (technique d'extraction, mode de culture, nombre de répétitions). Elles ne semblaient pas de nature à modifier la validité des résultats et il n'en a pas été tenu compte dans les comparaisons. Par contre, une modification plus importante (augmentation du nombre d'extractions), proposée en cours d'expérience par l'un des laboratoires pour améliorer la récupération de certains antibiotiques dans les aliments enrichis en lipides, n'a pu être prise en considération pour ne pas détruire l'homogénéité des résultats, ce qui aurait rendu impossible toute interprétation pratique.

d) *Calculs*

Pour faciliter les calculs et permettre les comparaisons statistiques, tous les résultats ont été exprimés en p. 100 de la dose initiale, supposée exactement connue. Le temps zéro de l'expérience était celui de l'introduction des antibiotiques dans la mélangeuse et bien que cette opération ait été exécutée avec beaucoup de précautions, il n'a pas été possible de vérifier si les concentrations initiales étaient bien celles qui étaient prévues.

Tous les résultats concernant un même échantillon ont été regroupés. Une analyse de variance préliminaire a montré en effet qu'il n'y avait pas de différence significative entre les séries de résultats homologues des différents laboratoires. Les effets de la durée de conservation (5 stades), de la nature de l'antibiotique (3 produits), de la composition de l'aliment (4 formules), ainsi que de la combinaison de la dose et du mode de présentation (4 cas) ont été analysés simultanément par la méthode des moindres carrés sur ordinateur IBM 1620 (programme 65025 de la S. C. G. A.). L'analyse a été poursuivie en considérant les facteurs 3 à 3, puis 2 à 2, afin de déterminer l'origine et l'importance des interactions de différents ordres. Les meilleures estimations des moyennes de dosages correspondant aux différents niveaux des 4 traitements ont été calculées dans l'hypothèse de non interaction des facteurs. Puis, après avoir été ordonnées, elles ont été comparées par la méthode de DUNCAN (1955).

RÉSULTATS

1. *Effets principaux*

Les tableaux 3, 4 et 5 rapportent pour chacun des antibiotiques les valeurs moyennes des activités des différents échantillons correspondant aux 4 aliments. 3 361 résultats individuels ont été utilisés dans ces calculs (soit une moyenne de 14 répétitions par valeur exprimée).

L'analyse statistique des résultats individuels a montré que l'influence de tous les facteurs étudiés (stade de conservation, composition de l'aliment, antibiotique, dose et présentation) sur l'activité antibiotique des échantillons était hautement significative. Il est difficile d'apprécier l'importance de ces influences car, à l'exception de la dernière, les variances qui s'y rapportent ne diffèrent pas significativement entre elles. Sous réserve de l'hypothèse de non-interaction, on peut cependant, sans grand risque d'erreur, les classer dans l'ordre des valeurs de F correspondant à chaque facteur (tabl. 6). Dans ces conditions, la nature de l'antibiotique et la durée de conservation seraient les deux composantes principales de la stabilité ; la composition de l'aliment et sa présentation viendraient ensuite. La concentration en antibiotiques aurait un moindre effet.

Avec les mêmes réserves, l'examen des moyennes par traitement (estimation par analyse simultanée des quatre facteurs) donne des renseignements complémentaires (tabl. 6).

TABIEAU 3. — *Activité antibiotique dans les aliments contenant de la chlortétracycline*
(p. 100 de la dose initiale)

Échantillon (1)	Stade				
	I (5 jours)	II (1 mois)	III (2 mois)	IV (3 mois)	V (6 mois)
A 10 F.....	89	66	60	38	13
A 10 G.....	90	63	63	45	19
A 100 F.....	88	65	57	38	14
A 100 G.....	85	61	54	37	13
B 10 F.....	89	85	88	80	65
B 10 G.....	89	69	67	55	36
B 100 F.....	96	87	83	77	65
B 100 G.....	86	69	63	54	40
C 10 F.....	97	57	58	41	14
C 10 G.....	94	68	60	40	15
C 100 F.....	96	67	60	41	14
C 100 G.....	95	66	59	43	15
D 10 F.....	97	89	84	78	64
D 10 G.....	93	77	75	65	32
D 100 F.....	95	89	86	81	67
D 100 G.....	98	78	71	63	33

(1) A-B-C : aliments ; 10-100 : doses en ppm; F-G : farine, granulé.

TABIEAU 4. — *Activité antibiotique dans les aliments contenant de la spiramycine*
(p. 100 de la dose initiale)

Échantillon (1)	Stade				
	I (5 jours)	II (1 mois)	III (2 mois) (2)	IV (3 mois)	V (6 mois)
A 10 F.....	99	102		91	48
A 10 G.....	90	81		82	27
A 100 F.....	100	96		87	51
A 100 G.....	93	84		80	29
B 10 F.....	102	91		97	98
B 10 G.....	94	80		78	66
B 100 F.....	105	103		103	99
B 100 G.....	94	83		85	68
C 10 F.....	100	99		94	61
C 10 G.....	91	83		78	36
C 100 F.....	99	107		98	64
C 100 G.....	88	91		78	36
D 10 F.....	102	96		103	105
D 10 G.....	94	85		78	69
D 100 F.....	101	94		97	99
D 100 G.....	95	85		83	70

(1) A-B-C-D : aliments ; 10-100 : doses ; F-G : farine, granulé.

(2) Dosages non effectués.

A l'exception des aliments B et D, toutes les différences entre traitements sont significatives. On peut alors faire les commentaires suivants :

— *Antibiotique* : la chlortétracycline a une stabilité moyenne inférieure d'environ 30 p. 100 à celle des deux autres antibiotiques. Ces deux derniers diffèrent peu.

— *Stade de conservation* : les antibiotiques se dégradent rapidement dans les aliments au cours du stockage. Ce phénomène apparaît dès le premier mois, mais il s'accroît au cours des 3 derniers.

TABLEAU 5

Activité antibiotique dans les aliments contenant de l'oxytétracycline
(p. 100 de la dose initiale)

Échantillon (1)	Stade				
	I (5 jours)	II (1 mois)	III (2 mois)	IV (3 mois)	V (6 mois)
A 10 F.....	95	91	87	85	62
A 10 G.....	99	96	85	91	71
A 100 F.....	93	85	82	77	62
A 100 G.....	97	83	73	69	58
B 10 F.....	104	101	98	99	89
B 10 G.....	100	96	91	88	79
B 100 F.....	101	99	92	89	80
B 100 G.....	93	86	86	82	70
C 10 F.....	96	92	87	78	62
C 10 G.....	103	96	91	86	70
C 100 F.....	95	98	84	79	59
C 100 G.....	95	88	80	74	61
D 10 F.....	99	97	103	99	87
D 10 G.....	97	90	91	87	77
D 100 F.....	98	91	91	98	90
D 100 G.....	93	93	91	81	76

(1) A-B-C-D : aliments ; 10-100 : doses ; F-G : farine, granulé.

— *Composition de l'aliment* : l'addition d'un taux élevé de graisse aux aliments (A et C) diminue l'activité antibiotique d'environ 20 p. 100 par rapport aux aliments sans graisse (B et D). Par contre, l'augmentation du taux de protéine (aliments A et B) ne modifie pas cette activité par rapport aux aliments à taux de protéine plus faible (C et D).

— *Mode de présentation de l'aliment* : l'influence de la granulation est nette (aliments 10 G et 100 G), elle entraîne une perte moyenne de 12 p. 100 du pouvoir antibiotique, par rapport aux aliments présentés en farine (10 F, 100 F).

— *Dose d'antibiotique* : la conservation de l'antibiotique semble légèrement moins bonne (2 p. 100) aux concentrations fortes (100 G, 100 F) qu'aux faibles concentrations (10 F, 10 G).

TABLEAU 6

Influence des différents traitements sur la stabilité des antibiotiques

Facteur étudié	Antibiotique	Stade	Composition de l'aliment	Dose Mode de présentation
Valeur moyenne du traitement	Cl = 63,38 Ox = 87,40 Sp = 86,03	I = 96,73 II = 85,28 III = 81,07 IV = 75,11 V = 56,50	A = 70,08 B = 86,06 C = 72,88 D = 86,75	10 F = 84,18 100 F = 83,09 10 G = 75,86 100 G = 72,63
Valeur de F pour le facteur considéré (degrés de liberté n_1/n_2)	1 195** (2/3 137)	995** (4/3 117)	362** (3/3 117)	142** (3/3 117)
Valeur de la plus petite différence significative (P < 0,01)	0,92	1,18	1,05	1,05

Abréviations :

Cl : chlortétracycline ; Ox : oxytétracycline ; Sp : spiramycine,

I : 5 jours ; II : 1 mois ; III : 2 mois ; IV : 3 mois ; V : 6 mois.

A : 10 p. 100 lipides + 25 p. 100 protides ; B : 25 p. 100 protides ; C : 10 p. 100 lipides + 14 p. 100 protides ; D : 15 p. 100 protides.

10 F : 10 p.p.m./farine ; 100 F : 100 p.p.m./farine

10 G : 10 p.p.m. /granulés ; 100 G : 100 p.p.m./granulés.

TABLEAU 7

Valeurs de F (et degrés de liberté) pour les interactions entre les différents facteurs agissant sur la stabilité des antibiotiques

Interaction	1 ^{er} ordre		2 ^e ordre		3 ^e ordre	
	F	degrés de liberté	F	degrés de liberté	F	degrés de liberté
Stade / antibiotique	73,7	7				
Stade / aliment	29,3	12				
Antibiotique / forme	11,4	6				
Antibiotique / aliment	4,9	12				
Stade / forme	3,4	12				
Stade / antibiotique / aliment			48,8	46		
Stade / antibiotique / forme.....			19,5	46		
Stade / aliment / forme.....			8,1	69		
Aliment / antibiotique / forme.....			5,5	39		
Stade / antibiotique / aliment / forme ...					24,8	211

(1) Degrés de liberté de la variance résiduelle 3 305 à 3 341.

2. Interactions

Le tableau 7 rapporte les valeurs du test F concernant les interactions possibles entre les divers facteurs considérés 2 à 2, 3 à 3, ou tous simultanément. Toutes ces interactions sont significatives avec de légères différences qui permettent (pour un même nombre de degrés de liberté) d'en apprécier l'importance relative. Il en résulte que la stabilité d'un antibiotique dans un aliment dépend simultanément, mais à des degrés variables, de tous les facteurs considérés. Il n'est donc pas possible d'en tirer de conclusions générales et il faut, au contraire, considérer chaque cas particulier. Nous nous sommes limités à examiner les interactions les plus intéressantes.

a) *Stade | antibiotique | aliment.*

La figure 1 montre que la stabilité des antibiotiques au cours de la conservation varie avec la nature de l'antibiotique (interaction du 1^{er} ordre) : l'oxytétracycline présente une perte d'activité régulière, sensiblement proportionnelle au temps de stockage ; la chlortétracycline se dégrade proportionnellement beaucoup plus vite (30 p. 100) au cours du premier mois de conservation ; la spiramycine se conserve relativement bien pendant les 3 premiers mois, mais paraît plus fragile ensuite.

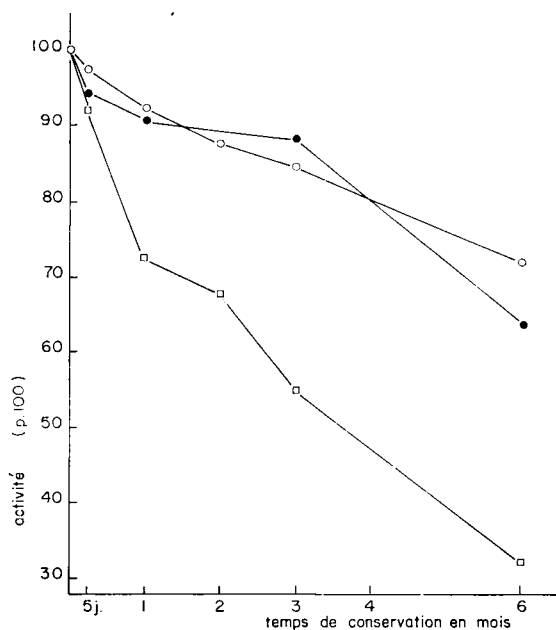


FIG. 1. — Évolution de l'activité moyenne des différents antibiotiques dans les aliments

- Chlortétracycline
- Oxytétracycline
- Spiramycine

Mais ce schéma peut être nuancé en fonction des aliments utilisés (interaction du 2^e ordre). Les figures 2 a, 2 b et 2 b montrent que suivant qu'il s'agit d'aliment enrichi ou non en graisse, la perte d'activité des différents antibiotiques n'est pas la même : pour la chlortétracycline, l'influence de la graisse est importante et apparaît

dès le premier mois (fig. 2 a) ; pour l'oxytétracycline, l'effet des lipides n'apparaît qu'au bout de deux mois. Pour la spiramycine, la perte de stabilité des antibiotiques dans les aliments gras n'est importante qu'après 3 mois.

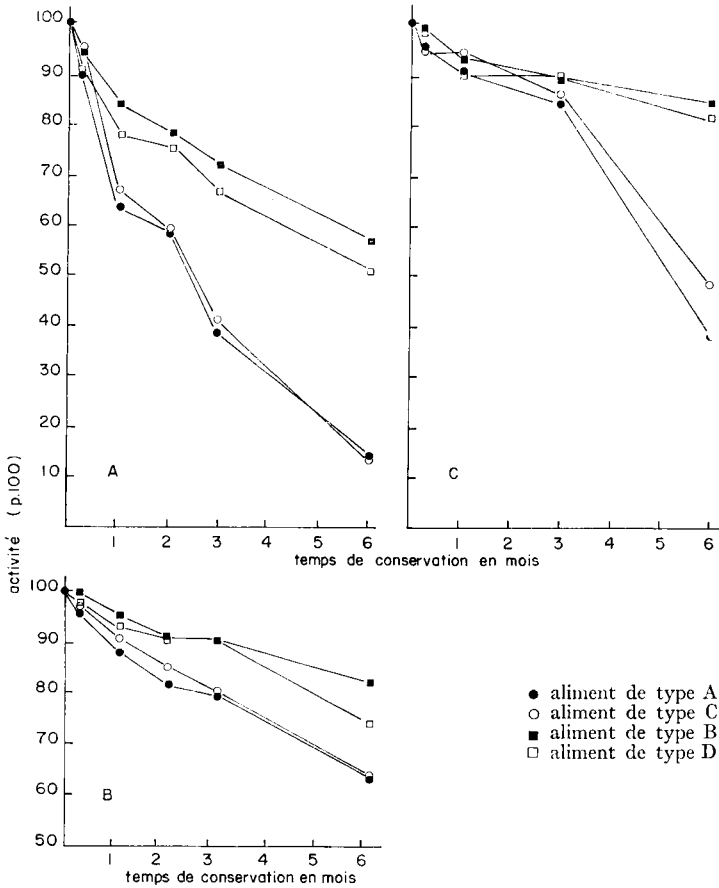


FIG. 2. — Évolution de l'activité des antibiotiques dans différents aliments
 a — Chlortétracycline b — Oxytétracycline c — Spiramycine

b) *Stade | antibiotique | forme.*

La granulation entraîne une perte d'activité de l'antibiotique, par rapport à la présentation en farine. Ce phénomène s'intensifie avec le temps (interaction du 1^{er} ordre), mais il se manifeste différemment suivant les antibiotiques (interaction du 2^e ordre). La figure 3 rapporte l'évolution de l'activité antibiotique des aliments en fonction du mode de présentation et de l'antibiotique utilisé. L'effet maximum apparaît dans les aliments supplémentés à la spiramycine : la perte d'activité due à la granulation est importante dès le pressage et atteint 40 p. 100 au bout de 6 mois. Avec la chlortétracycline, la perte est relativement moins importante et augmente progressivement jusqu'à 15 p. 100 en fin de stockage. L'oxytétracycline supporte encore mieux la granulation des aliments : la perte d'activité n'apparaît qu'après 2 mois et ne dépasse pas 7 p. 100 en moyenne.

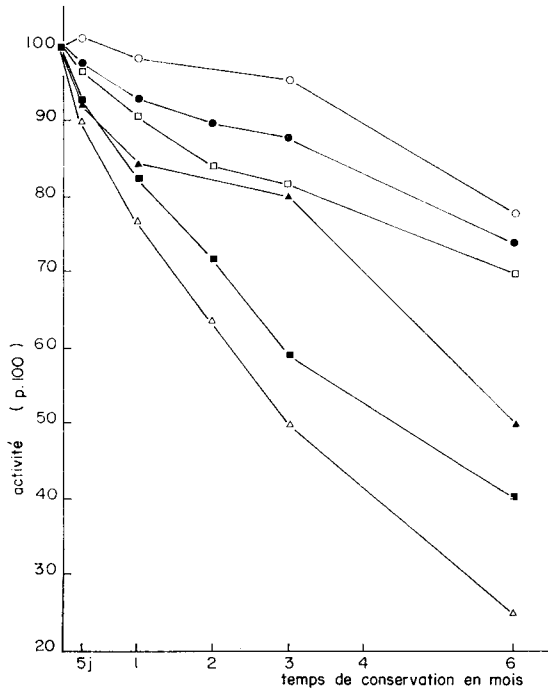


FIG. 3. — Évolution de l'activité des différents antibiotiques suivant le mode de présentation des aliments

○ spiramycine, farine ● oxytétracycline, farine ■ chlortétracycline, farine
 ▲ spiramycine, granulé □ oxytétracycline, granulé △ chlortétracycline, granulé

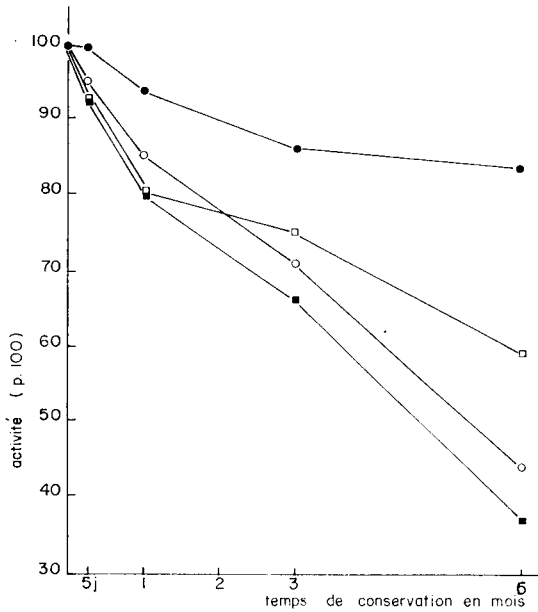


FIG. 4. — Évolution de l'activité antibiotique suivant le mode de présentation et la composition des aliments

● aliments sans graisse (B, D), farine ○ aliments avec graisse (A, C), farine
 □ aliments sans graisse (B, D), granulé ■ aliments avec graisse (A, C), granulé

c) Interaction aliment / forme / stade / antibiotique.

La granulation, comme la présence de graisse dans l'aliment, diminue la stabilité des antibiotiques au cours de la conservation. On pourrait penser que les effets de ces deux facteurs se cumulent dans les combinaisons où elles se rencontrent (interaction du 2^e ordre). Il semble qu'il n'en soit rien.

La figure 4 montre que l'effet de la granulation est plus important dans les aliments sans graisse (B, D), dans lesquels la perte d'activité atteint 30 p. 100 à 6 mois, que dans les aliments gras (A, C) où cette perte d'activité reste sensiblement constante et ne dépasse pas 10 p. 100.

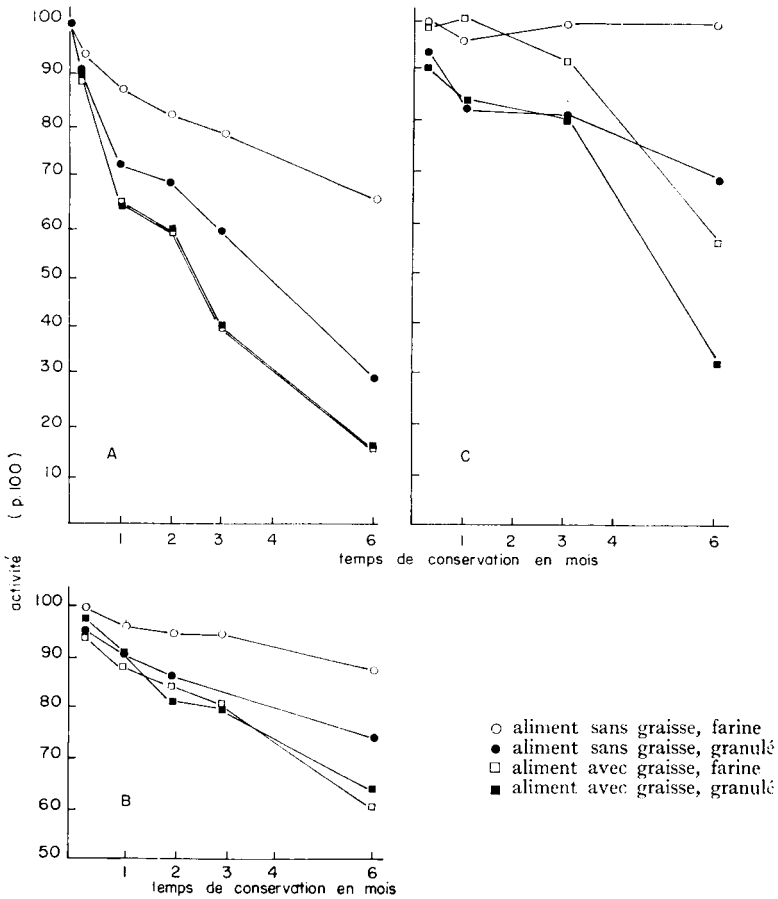


FIG. 5. — Évolution de l'activité des différents antibiotiques suivant le mode de présentation et la composition des aliments

a — Chlortétracycline b — Oxytétracycline c — Spiramycine

Mais ce phénomène est aussi variable selon l'antibiotique (interaction du 3^e ordre) : dans les aliments supplémentés à l'oxytétracycline et à la chlortétracycline, l'effet de la granulation est rigoureusement nul lorsque ceux-ci sont enrichis en graisse,

alors qu'il est très important dans les aliments sans graisse (fig. 5 a et 5 b). Par contre, avec la spiramycine, la présence de graisse n'empêche pas la dégradation de l'antibiotique due à la granulation (fig. 5 c).

d) *Dose | antibiotique | aliment.*

Seule l'oxytétracycline semble se dégrader nettement plus vite (8 p. 100) à dose élevée qu'à dose faible dans les aliments. Le phénomène est surtout apparent avec les aliments A et B, c'est-à-dire avec ceux qui contiennent le plus de protides (tabl. 8). La chlortétracycline réagit dans le même sens mais d'une façon moins marquée et la spiramycine dans le sens contraire.

TABLEAU 8
*Influence de la dose d'antibiotique sur la stabilité
des différents antibiotiques dans les aliments*

Antibiotique	Oxytétracycline		Chlortétracycline		Spiramycine	
	10	100	10	100	10	100
Dose antibiotique (p.p.m.)						
A	86	78	55	51	76	78
B	95	87	72	71	88	92
Aliments						
C	86	82	55	55	80	81
D	93	90	75	75	91	94
Moyenne	90	84	64	63	84	86

DISCUSSION

Il est permis de faire des réserves sur la valeur des dosages microbiologiques pour mettre en évidence les altérations supportées par les antibiotiques dans les aliments et l'incidence de ce phénomène sur la réponse des animaux. Toutefois, le fait qu'on ait trouvé une bonne concordance entre ces dosages et l'analyse chimique, qui, dans des conditions analogues, fait apparaître une dégradation importante des antibiotiques par épimérisation, lève en grande partie ce doute (KATZ, 1963; KATZ et FASSBENDER, 1967). Nos résultats confirment, en outre, un certain nombre de faits qui apparaissaient déjà avec divers antibiotiques, aussi bien en produits purs, qu'en solution ou dans des préparations pharmaceutiques ou alimentaires : influence du substrat de la présentation, du temps de conservation (WORNICK, 1967).

Malgré les interférences rencontrées, nous pouvons donc essayer de dégager le rôle des principaux facteurs examinés :

a) *Nature de l'antibiotique*

Les valeurs moyennes dont nous disposons se rapportent à 3 antibiotiques différents, dont la forme chimique, elle-même, est différente. Elles n'ont qu'une signification limitée, car elles ne correspondent à aucune condition précise (stade moyen).

Elles suffisent cependant à montrer que des différences de stabilité importantes peuvent apparaître entre les antibiotiques lorsqu'ils sont incorporés aux aliments. Ces différences sont de l'ordre de celles que rapporte WORNICK (1959) avec divers antibiotiques, dont l'érythromycine. Dans des conditions similaires, KOROLEVA et PEHOVA (1963) avaient conclu que les tétracyclines se conservaient beaucoup mieux que diverses préparations de pénicilline. Dans le cas présent, la stabilité de la chlortétracycline est beaucoup moins bonne que celle de la spiramycine, elle-même légèrement inférieure à celle de l'oxytétracycline, résultat qui confirme les observations de WELCH (1950), DIDING (1954) et KAWABATA *et al.* (1960).

Il ne peut être question de rattacher trop étroitement les différences de stabilité que nous avons observées aux formes chimiques utilisées. On sait cependant que celles-ci ont une grande importance (MULLER *et al.*, 1958 ; WORNICK et KUHN, 1962). Le fait que certaines expériences aient montré que l'oxytétracycline et la chlortétracycline conservaient, sous une même forme chlorhydrate, une activité comparable (KOROLEVA et PEHOVA, 1965) conduirait à penser que la différence de forme sous laquelle ces mêmes antibiotiques ont été comparés dans notre expérience n'est peut-être pas étrangère aux résultats obtenus.

b) Temps de conservation

La dégradation du pouvoir antibiotique au cours de la conservation est classique, mais elle peut être plus ou moins rapide suivant les conditions (WORNICK, 1967 ; KAWABATA *et al.*, 1960). La dégradation de la chlortétracycline est très brutale,

TABLEAU 9

Durée limite de conservation (mois) des aliments de différents types pour une activité antibiotique minimum de 75 et 50 p. 100 de la dose initiale

Antibiotique	Chlortétracycline		Spiramycine		Oxytétracycline	
	75	50	75	50	75	50
Activité minimum p. 100						
A { Farine	— de 1	2	3	3	3	6
{ Granulé	- de 1	2	3	3	2	6
B { Farine	3	6	6	6	6	6
{ Granulé	— de 1	3	6	6	6	6
C { Farine	— de 1	2	3	6	3	6
{ Granulé	— de 1	2	3	3	3	6
D { Farine	3	6	6	6	6	6
{ Granulé	1	3	6	6	6	6

quels que soient les aliments utilisés. Celles de la spiramycine et de l'oxytétracycline sont, en comparaison, nettement moins rapides, surtout dans les aliments ne contenant pas de graisse et présentés en farine. Pour ces deux antibiotiques, la perte d'activité après 6 mois de conservation atteint cependant en moyenne 30 à 40 p. 100 de la dose initiale, ce qui est du même ordre que la valeur trouvée pour la bacitracine

dans les aliments pour volailles (HUSAAS, 1967). Mais le phénomène varie aussi beaucoup suivant les échantillons. Il en résulte que si les fabricants d'aliments devaient donner une garantie de conservation pour les antibiotiques qu'ils utilisent, celle-ci devrait varier non seulement avec l'antibiotique et le taux de conservation considéré comme minimum acceptable (75 ou 50 p. 100), mais aussi avec le type d'aliment (tabl. 9).

c) *Conditions atmosphériques*

Il ne semble pas que, dans le cadre de cette expérience (aliments conservés en sacs sous abri), les conditions atmosphériques soient intervenues d'une façon appréciable sur la stabilité des antibiotiques. On sait cependant que de faibles variations de température peuvent accélérer les phénomènes d'épimérisation des antibiotiques (KATZ et FASSBENDER, 1967). Paradoxalement, on constate que la baisse d'activité relativement importante supportée par tous les aliments pendant le premier mois est apparue au moment où la température extérieure était la plus basse. Inversement, la température et l'humidité plus élevées au cours des mois suivants ne paraissent pas avoir accéléré la dégradation des antibiotiques, sauf peut-être dans les aliments qui contenaient de la graisse (fig. 2 a, 2 c).

d) *Composition des aliments*

Les constituants chimiques des aliments capables de modifier l'activité des antibiotiques sont nombreux. Les plus connus sont les sels minéraux, qui ont suscité un grand nombre de travaux (ALBERT, 1953 ; PRICE et *al.*, 1957 ; BINKLEY, 1955 ; HARMS et *al.*, 1964 ; WEINBERG, 1957), et les vitamines (GEIGER, 1946 ; WORNICK, 1967).

L'influence des substances azotées est plus discutée. Pour certains auteurs, les protides accélèrent la dégradation (WEINSTEIN, 1958 ; PRICE et coll., 1957), pour d'autres, ils la diminuent (KAWABATA et *al.*, 1960). Notre expérience ne nous permet pas de trancher, car si pour l'oxytétracycline l'élévation du taux de protides de l'aliment a légèrement accru les pertes en antibiotique, cet effet est apparu tardivement et n'est pas très important. Il est en outre négligeable pour les deux autres antibiotiques, résultat conforme à celui trouvé par KATZ et FASSBENDER (1967) avec la chlortétracycline.

L'influence de la graisse du régime a été peu étudiée jusqu'à présent (WHITTET, 1959). Certains auteurs ont cependant montré que la présence d'acides gras insaturés ou de peroxydes pouvait accélérer la dégradation des antibiotiques (WASKMAN, 1950 ; FOX, 1965), phénomène que confirme notre expérience. Cette influence est plus importante pour la chlortétracycline que pour la spiramycine ou l'oxytétracycline, ce qui peut être lié à la plus grande sensibilité de la première à l'épimérisation (KATZ et FASSBENDER, 1967). Un autre point aussi devra être éclairci, celui des difficultés d'extraction : après plusieurs mois de conservation, des difficultés de dosage des antibiotiques sont apparues pour certains antibiotiques dans les aliments enrichis en graisse, phénomène que WORNICK (1959) signale également. Une technique d'extraction plus poussée permettrait, dans certains cas, de récupérer une fraction supplémentaire de l'activité initiale. Le problème est posé de savoir si cette activité qui échappe à l'analyse classique conserve une signification biologique. Dans le cas présent, ceci ne change rien aux conclusions précédentes.

e) Mode de présentation

L'effet de la granulation sur l'efficacité alimentaire des constituants des aliments (amidon, protéines, vitamines) a été souvent étudié. Dans la plupart des cas, cette action peut s'expliquer par l'effet thermique auquel est soumis l'aliment au moment du pressage. Les antibiotiques n'échappent pas à ce dernier phénomène. La perte d'activité antibiotique que nous avons observée dans les aliments granulés est comparable à celle que signalent d'autres auteurs (WORNICK, 1959-1962 ; STOCKSTAD, 1952), elle varie de 7 à 40 p. 100 suivant les antibiotiques. Certains antibiotiques, comme l'oxytétracycline, y sont peu sensibles (peut-être en raison d'une meilleure stabilité à la chaleur), alors que d'autres, comme la spiramycine, sont beaucoup plus dégradés. Cet effet thermique semble confirmé par le fait que la présence de graisses dans les aliments limite beaucoup l'altération due au pressage. Par contre, la dégradation est maximum et s'aggrave avec le temps dans les aliments ne contenant pas de graisse (fig. 5 *b*). Il est, en effet, connu que la présence de corps gras facilite les opérations de pressage en diminuant l'échauffement et la dureté des granulés. Ceci ne compense qu'en partie cependant l'effet dépressif joué par certaines graisses sur la stabilité des antibiotiques et il reste à savoir si ce rôle protecteur lors du pressage ne pourrait être obtenu avec un moindre taux de graisse, ou éventuellement avec d'autres constituants (glycérol, vapeur d'eau).

f) Dose d'antibiotique

La tendance que l'on observe pour l'oxytétracycline à se dégrader davantage à concentration élevée (100 p.p.m.) qu'à dose faible (10 p.p.m.) peut paraître peu importante. La cause ne nous en est d'ailleurs pas connue. Il faut toutefois remarquer que cette perte devient plus sensible sur le plan économique lorsqu'elle est exprimée en valeur absolue (p.p.m.). Dans les échantillons contenant 10 p.p.m. au départ, la perte reste faible (1 p.p.m. en moyenne), mais elle atteint 16 p.p.m. dans les échantillons qui en contenaient 100. Cette perte peut alors dépasser le seuil de réponse des animaux et conduire à utiliser des doses inutilement élevées d'antibiotiques. L'antibiosupplémentation à dose élevée entraîne un gaspillage plus important et coûte donc proportionnellement plus cher que celle à dose faible. Sous cet aspect, ceci peut justifier l'emploi simultané de plusieurs antibiotiques différents à dose restreinte plutôt qu'un seul antibiotique à dose massive.

CONCLUSION

Les principaux résultats de cette expérience peuvent se résumer comme suit :

1. Les aliments antibiosupplémentés peuvent perdre une fraction importante de leur activité, variable jusqu'à 87 p. 100 suivant les conditions expérimentales au cours d'une conservation de 6 mois.

2. La chlortétracycline est, en moyenne, moins stable dans les aliments que l'oxytétracycline ou la spiramycine (qualité « alimentation animale »).

3. La dégradation des antibiotiques est importante (surtout pour la chlortétracycline) dès le premier mois de conservation. La demi-vie (efficacité 50 p. 100) est atteinte avant 2 mois pour la chlortétracycline, entre 3 et 6 mois pour la spiramycine et après 6 mois pour l'oxytétracycline.

4. Les variations météorologiques saisonnières, agissent peu sur la conservation des antibiotiques dans les aliments stockés sous abri.

5. L'addition de graisse (huile d'arachide) aux aliments diminue la stabilité des antibiotiques, principalement celle de la chlortétracycline (après un mois) et de la spiramycine (après 3 mois).

6. Les variations du taux de protéines des aliments ne semblent pas modifier d'une façon importante la stabilité des antibiotiques.

7. La granulation des aliments provoque une perte moyenne d'activité antibiotique de 12 p. 100 par rapport à la forme farine. Cet effet est maximum dans les aliments supplémentés à la spiramycine (30 p. 100). Il apparaît surtout dans les aliments ne contenant pas de graisse.

8. En valeur relative, la perte d'activité des antibiotiques varie peu, sauf pour l'oxytétracycline, avec la dose d'antibiotique utilisée. En valeur absolue, cette perte peut dépasser, quel que soit l'antibiotique, le seuil d'efficacité dans les aliments contenant des doses élevées d'antibiotiques.

9. Ces conclusions, valables pour des aliments destinés aux porcelets, ont été obtenues à l'aide de tests microbiologiques (*in vitro*). Il reste à les confirmer par des tests sur animaux d'élevage.

Reçu pour publication en mars 1968.

REMERCIEMENTS

Cette étude a pu être menée à bien grâce à la collaboration des Établissements Rhône-Poulenc (C. ROUSSEL) et de la Société industrielle de Biochimie (B. GODEFROY). Une partie importante des dosages nécessaires a été effectuée dans leurs laboratoires respectifs de Vitry (M. DUBOST) et d'Amboise (J.-P. RAYNAUD), ainsi qu'au Laboratoire d'analyse et d'essai des aliments de l'I. N. R. A. (J. DELORT-LAVAL et P. VALDEBOUZE). L'exploitation statistique a été effectuée grâce à l'atelier mécanographique de la Station centrale de Génétique animale et nous avons bénéficié, pour l'interprétation des résultats, des conseils de notre collègue C. LEGAULT. Nous leur adressons à tous nos plus vifs remerciements.

SUMMARY

STUDIES ON THE STABILITY OF ANTIBIOTICS IN PIGLET FEEDS

The stability of antibiotics through a six months storage was studied in 48 feed combinations. The factorial design covered : 3 antibiotics \times 2 doses (10-100 p.p.m. \times 2 protein level (16-25 p. 100) \times 2 lipids level (0-10 p. 100) \times 2 forms (meal, pellet).

Results, expressed as percent recovery estimated from microbiological activity varied from 13 to 105 p. 100 and are summarized in table 6. Conclusions may be as follows :

1. Chlortetracyclin is less stable (63 p. 100 in average) than oxytetracyclin (87 p. 100) and spiramycin (86 p. 100).

2. The maximum rate of decomposition is achieved during the first month of storage (fig. 1).

3. Losses are higher in fat (ground nutoil) supplemented feeds, mainly for chlortetracyclin (fig. 2a)
4. Protein level in feed has no consistent effect on antibiotic stability.
5. Pelleting process increases losses, mostly for spiramycin (30 p. 100) in non fat supplemented feeds (fig. 5c). On the other hand, fat seems to exert a protective effect against degradation due to pelleting (fig. 5a).
6. Influence of level of antibiotic supplementation is rather small, except for oxytetracyclin.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBERT A., 1953. Avidity of terramycin and aureomycin for metallic cations. *Nature*, **172**, 201.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1953. The determination of penicilline, chlortetracycline and oxytetracycline in diet supplements and compound feedstuffs. *Analyst.*, **88**, 835-850.
- BARBIERS A. R., NEFF J., 1966. Development of an assay for neomycin in feeds. *J. Ass. off. Agric. Chem.*, **49**, 1256.
- BINKLEY S. B., 1955. Biochemistry of antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.*, **24**, 597-627.
- DIDING N. A., 1954. Stability of tetracyclines. *Svensk. Farm. Tidskr.*, **58**, 745-751.
- ESPOSITO R. G., 1952. Stability of various penicillin salts used for growth promotion in animal feeds. *Fedn. Proceed.*, **11**, 208.
- FOX P. F., 1965. Destruction of the properties of some antibiotics by hydrogen peroxide. *J. Dairy Sci.*, **48**, 1116-1118.
- GEIGER W. B., 1946. Inactivation of streptomycin and its practical application. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **61**, 187-192.
- GOLDBERG H. S., 1959. *Antibiotics, their chemistry and non medical uses*. Van Nostrand, New York.
- GROVE D. C., RANDALL W. A., 1955. Assay methods of antibiotics. *Medical Encyclopedia inc.*, New York.
- HARMS R. H., WILSON H. R., HALDROUP P. W., 1964. The effects of certain estrogenic hormones, terphthalic acid and calcium level upon oxytetracyclin utilization. *Poult. Sci.*, **43**, 970-973.
- HOLLENBECK C. M., 1954. Stability of procain penicillin in feeds. *Poult. Sci.*, **33**, 425-427.
- HUSAAS O., 1967. An antibiotic. *Proceed. Holmenkollen Sympos.*, Oslo, 75-84.
- JOUANDET C., AUMAITRE A., SALMON-LEGAGNEUR E., 1964. Influence des antibiotiques sur la croissance des porcelets sevrés à 5 semaines. *Ann. Zootech.*, **13**, h.-s. I, 113-127.
- KATZ S. E., 1963. Comparison of chemical and microbiological methods for the détermination of procaine penicillin in premixes and mixed feeds. *J. Ass. off. Agric. Chem.*, **46**, 429-433.
- KATZ S. E., FASSBENDER C. A., 1967. Studies in the stability of chlortetracyclin in mixed feeds. Epimerization of chlortetracyclin. *J. Ass. off. Agric. Chem.*, **50**, 821-827.
- KAWABATA T., SAKAGUCHI G., NAKAMURA Y., AKANO T., 1960. Factors affecting the decomposition of oxytetracycline and chlortetracycline. *J. Antibiot. Tokyo*, **13**, 180-183.
- KOROLEVA V. P., PEHOVA I. I., 1964. Stabilité des préparations de tétracycline et de pénicilline dans les aliments mélangés (en russe). *Trud. Inst. eksp. Vet. Mosk.*, **230**, 329-334.
- LABORATOIRE RHONE-POULENC, 1966. *Méthode de dosage de la spiramycine*. (Note technique).
- MULLER Z., RUZICKA B., ROEDL J., MATTUSOVA D., 1958. Amélioration de la stabilité de la pénicilline dans les aliments. *Zivoc. Vyroba*, **31**, 723-752.
- PRICE K., ZOLLI Z., ATKINSON J., CUTHER H. G., 1957. Antibiotics inhibition. II. Studies on the inhibitory action of selected divalent cations for oxytetracycline. *Antibiotics Chemother.*, **7**, 689-698.
- PRICE K., ZOLLI Z., ATKINSON J., LUTHER H., 1957. Antibiotics inhibitions. I. The effect of certain milk constituents. *Antibiotics Chemother.*, **7**, 672-688.
- STOCKSTAD E. L., 1952. Stability of antibiotics in poultry feeds during pelleting and storage. *Poult. Sci.*, **31**, 937-939.
- WAKSMAN S. A., 1950. Antimicrobial properties of neomycin. *J. Lab. Clin. Med.*, **36**, 93-99.
- WEINBERG E. D., 1957. The mutual effects of antimicrobial compounds and metallic cations. *Bac. Rev.*, **21**, 46-68.
- WELCH H., 1950. Comparative studies on terramycin and aureomycin : antibacterial spectrum, serum concentrations and urinary excretion. *J. Amer. Pharm. Ass. Sci.*, **39**, 185-192.
- WEINSTEIN L., 1958. Streptomycin and dehydrostreptomycin. *Medical Encyclopedia*, New York.
- WHITTE T. D., 1959. Decomposition of medicaments due to excipients and containers and its prevention. *Pharm. Acta Helvet.*, **34**, 489-520.
- WORNICK R. G., 1959. Feed pelleting and its effects on microingredients. *10th Ann. Feed. Production School, Missouri*.
- WORNICK R. C., RUHN G. O., 1962. Stability of several oleandomycin derivatives in livestock and poultry feeds products. *J. Agr. Food. Chem.*, **10**, 286-290.
- WORNICK R. C., 1967. Antibiotic stability, a review. *Proceed. 15th Research conf. Pfizer*, 54-90.