RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté
Égalité
Fraternité

INRAE
la science pour la vie, l'humain, la terre

ACADÉMIE d'AGRICULTURE de FRANCE

DISTRIBUTION DES BACTERIES PATHOGENES DE L'HOMME OU COMMENSALES DANS L'ENVIRONNEMENT (SOL, EAU) ET LES AGRO-ECOSYSTEMES, EMERGENCE DE RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES

Alain Hartmann

Directeur de Recherche INRAE Dijon

alain.hartmann@inrae.fr

Discussion avec Ed Topp Ph.D.
London Research and Development Centre
Agriculture and Agri-Food Canada
Ed.topp@canada.ca

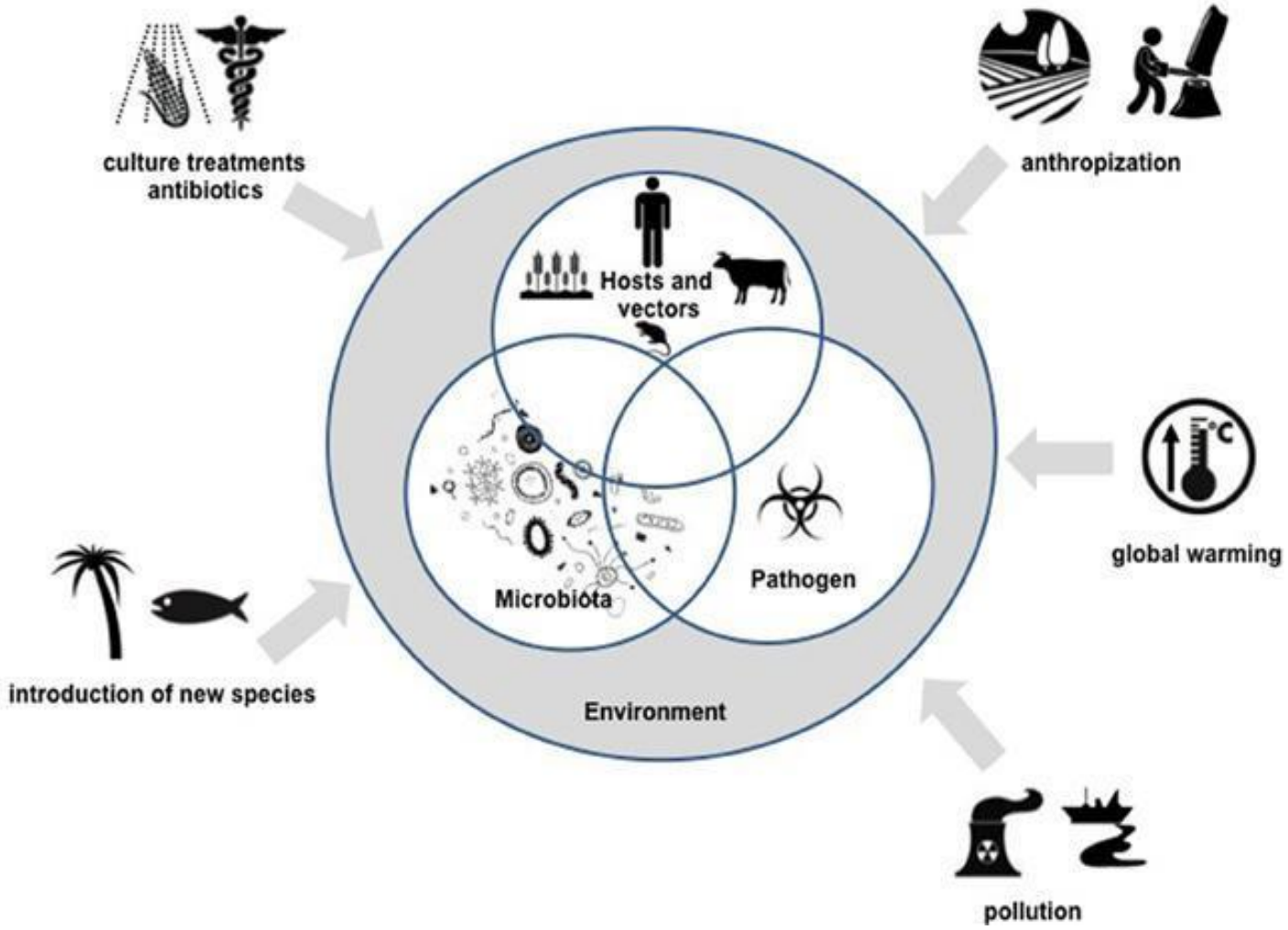
Plan de l'exposé

- **Introduction**: concept « One Health », microorganismes du sol, pathogènes ESKAPE et résistome des sols
- **Sources de contamination** des sols par les pathogènes ESKAPE résistantes ou par des gènes de résistance
- **Persistance dans les sols,** interactions avec les résidus de substances pharmaceutiques
- **Impact de la contamination** des sols sur l'exposition humaine et la sécurité sanitaire des aliments

Plan de l'exposé

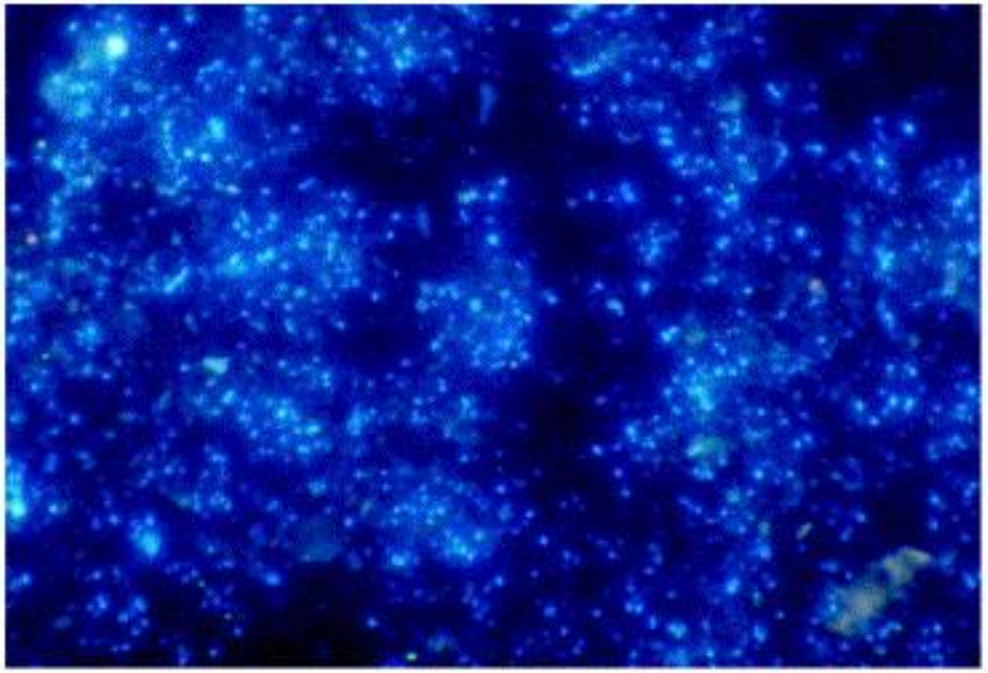
- **Introduction**: concept « One Health », microorganismes du sol, pathogènes ESKAPE et résistome des sols
- **Sources de contamination** des sols par les pathogènes ESKAPE résistantes ou par des gènes de résistance
- **Persistance dans les sols,** interactions avec les résidus de substances pharmaceutiques
- **Impact de la contamination** des sols sur l'exposition humaine et la sécurité sanitaire des aliments

Une Seule Santé : vision écosystémique des pathogènes mais aussi des bactéries antibio-résistantes



Abondance et diversité des microorganismes du sol

- Epifluorescence micrography of soil microorganisms stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The total bacterial count was 4.2 × 10^{10} cells gram^{-1} soil (dry weight) by fluorescent microscopy, and 4.2 × 10^{6} colony-forming units gram^{-1} soil (dry weight) by plating.



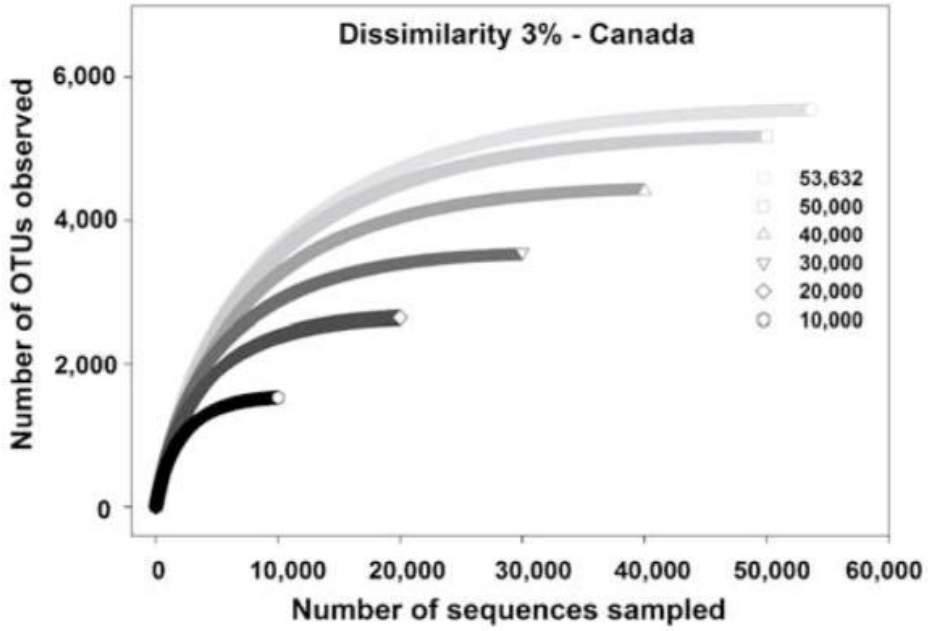
Current Opinion in Microbiology

Densité microbienne très élevée.
4.2 × 10^{10} cellules g^{-1} sol
Forte limitation des approches culturales

Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, *5*(3), 240–245.

Abondance et diversité des microorganismes du sol

Séquençage haut débit ADNr 16S eADN du sol
2000 à 50 000 OTU (espèces distinctes /g de sol)



Etudes plus récentes
Jusqu'à 1 million d'espèces /g de sol

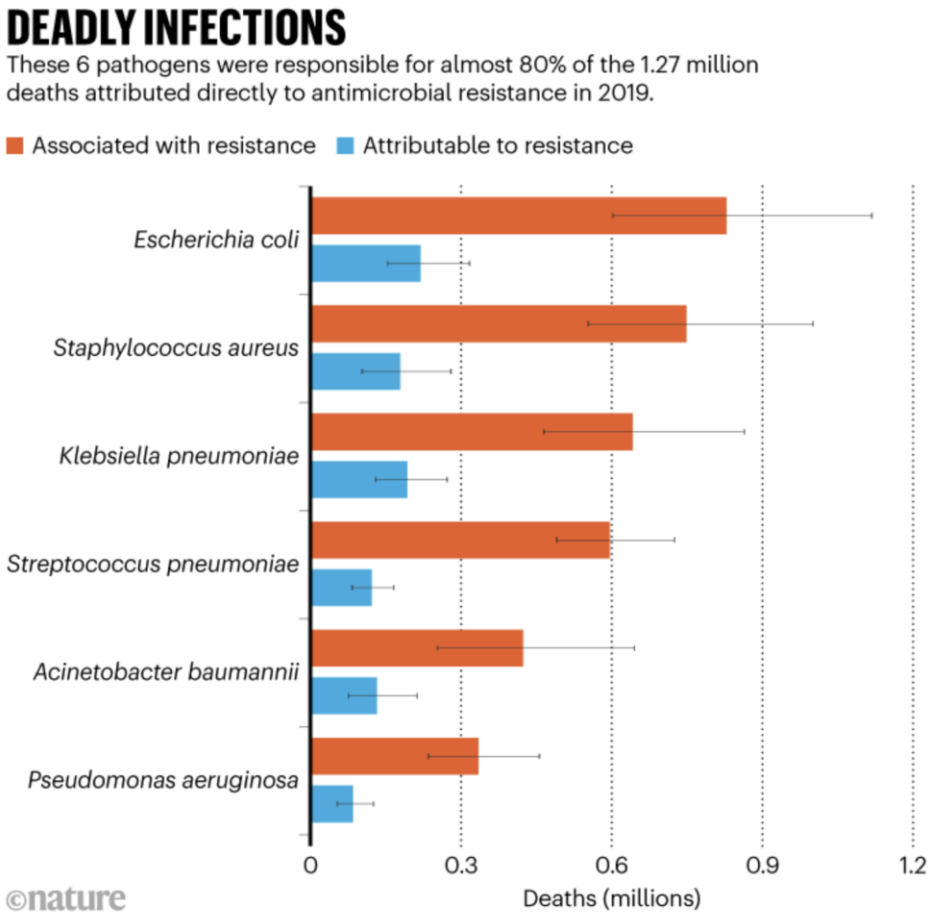
Roesch LF, Fulthorpe RR, Riva A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J*. 2007;1(4):283-90.

Pathogènes ESKAPE

- *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa et Enterobacter spp.*

  plus E. coli BLSE, EHEC ou VTEC/STEC

- Menace d'échappement à l'effet biocide des antibiotiques



•NEWS
•31 January 2022

The staggering death toll of drug-resistant bacteria

Global survey shows that in 2019, antimicrobial resistance killed more people than HIV/AIDS or malaria.

Résistome du sol (de l'environnement)

- Production d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques : interactions microbe-microbe antibiose dans les sols

- Les communautés de microorganismes du sol hébergent un pool important de gènes de résistance, certaines bactéries sont naturellement résistantes, d'autres sensibles

- Soil + resistome = 500 publications

Approches de metagénomique, de métagénomique fonctionnelle

De nombreuses études basées sur des méta analyses

environmental microbiology

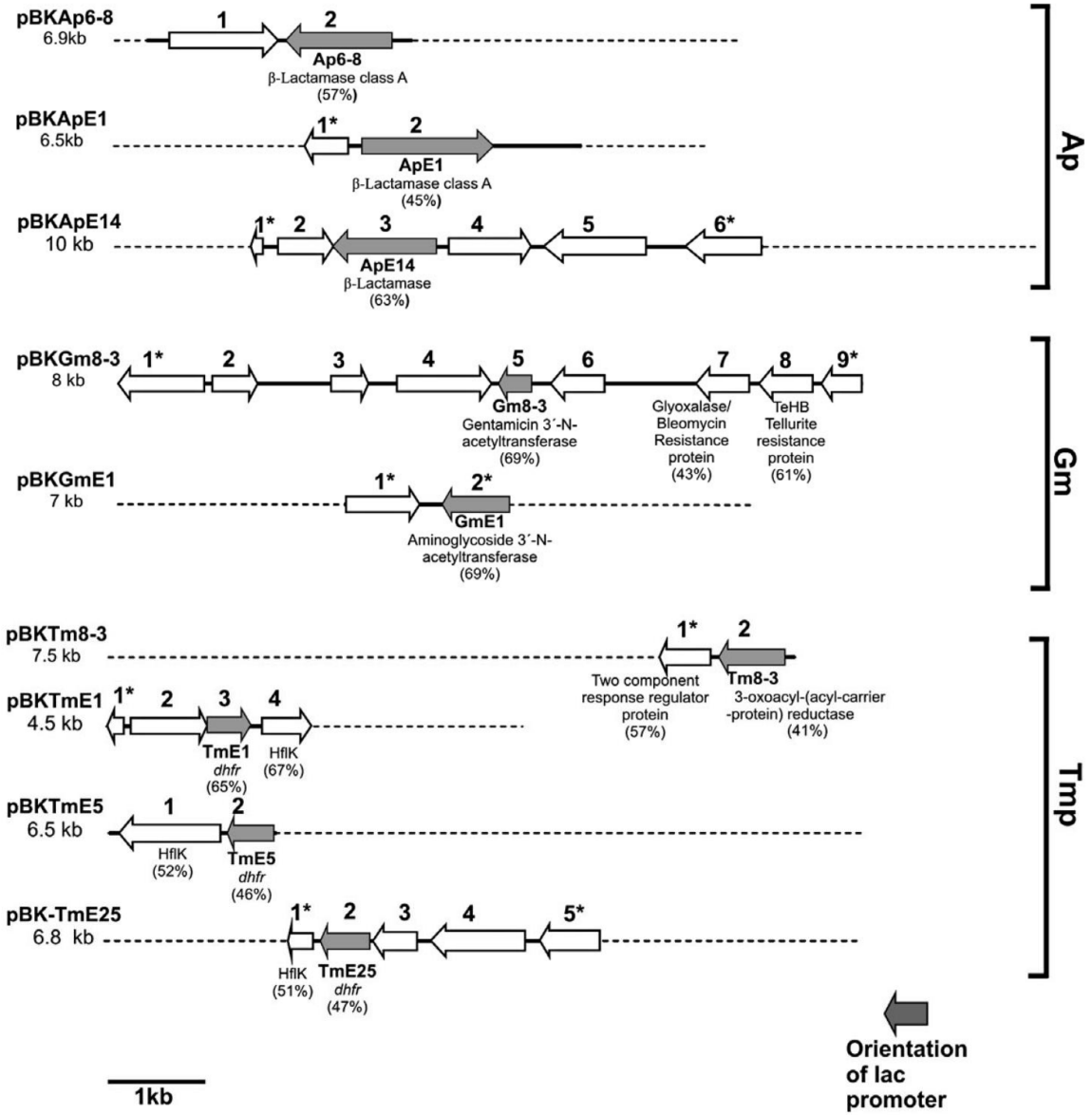
sfam society for applied microbiology

Full Access

Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples

Gloria Torres-Cortés, Vicenta Millán, Hugo C. Ramírez-Saad, Rafael Nisa-Martínez, Nicolás Toro, Francisco Martínez-Abarca

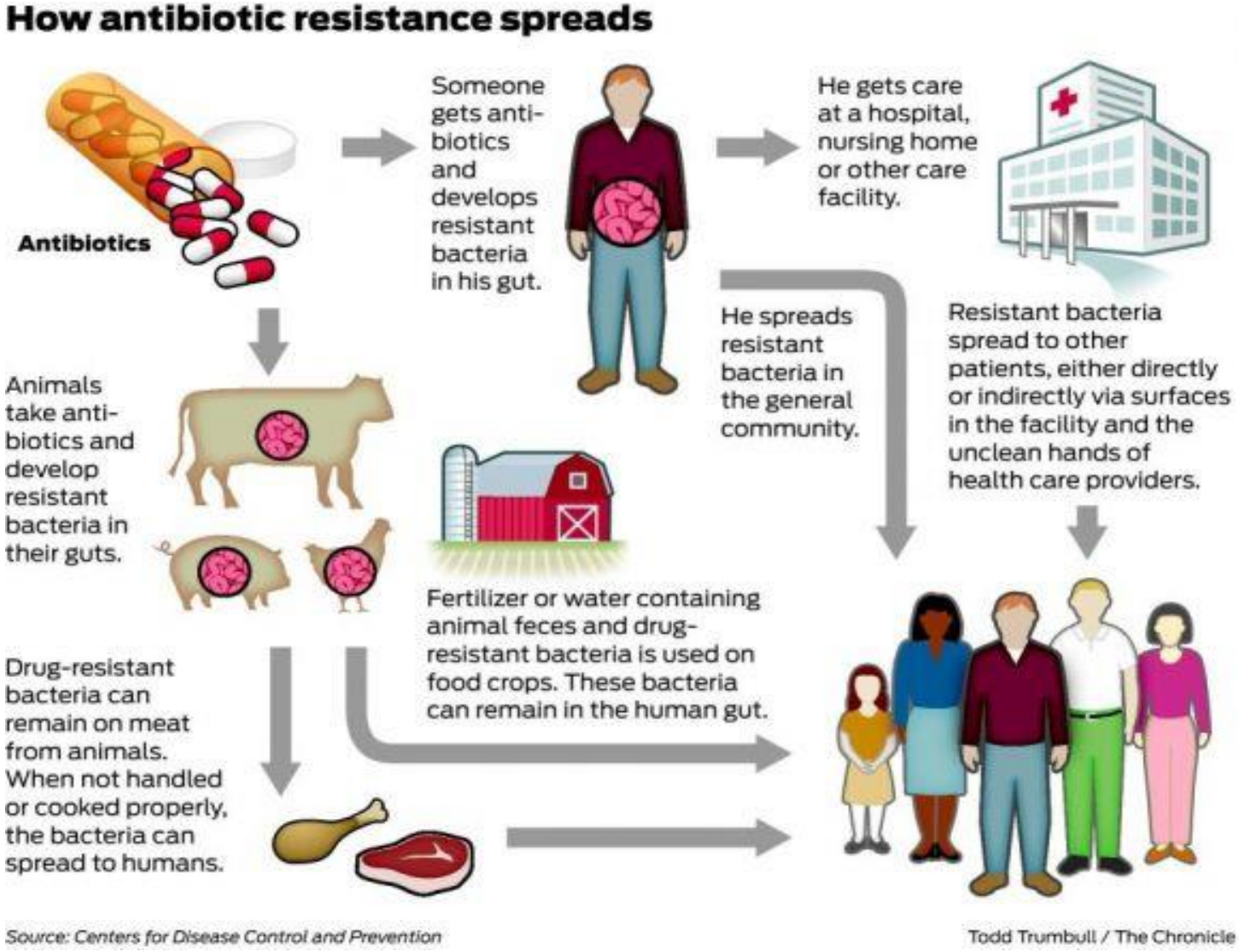
First published: 31 January 2011 | https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02422.x | Citations: 71


pBKAp6-8
6.9kb
1
2
Ap6-8
β-Lactamase class A
(57%)
pBKApE1
6.5kb
1*
2
ApE1
β-Lactamase class A
(45%)
pBKApE14
10 kb
1*
2
3
4
5
6*
ApE14
β-Lactamase
(63%)
Ap
pBKGm8-3
8 kb
1*
2
3
4
5
6
7
8
9*
Gm8-3
Gentamicin 3´-N-acetyltransferase
(69%)
Glyoxalase/ Bleomycin Resistance protein
(43%)
TeHB Tellurite resistance protein
(61%)
pBKGmE1
7 kb
1*
2*
GmE1
Aminoglycoside 3´-N-acetyltransferase
(69%)
Gm
pBKTm8-3
7.5 kb
1*
2
Two component response regulator protein
(57%)
Tm8-3
3-oxoacyl-(acyl-carrier -protein) reductase
(41%)
pBKTmE1
4.5 kb
1*
2
3
4
TmE1
dhfr
(65%)
HflK
(67%)
pBKTmE5
6.5 kb
1
2
HflK
(52%)
TmE5
dhfr
(46%)
pBK-TmE25
6.8 kb
1*
2
3
4
5*
HflK
(51%)
TmE25
dhfr
(47%)
Tmp
1kb
Orientation of lac promoter

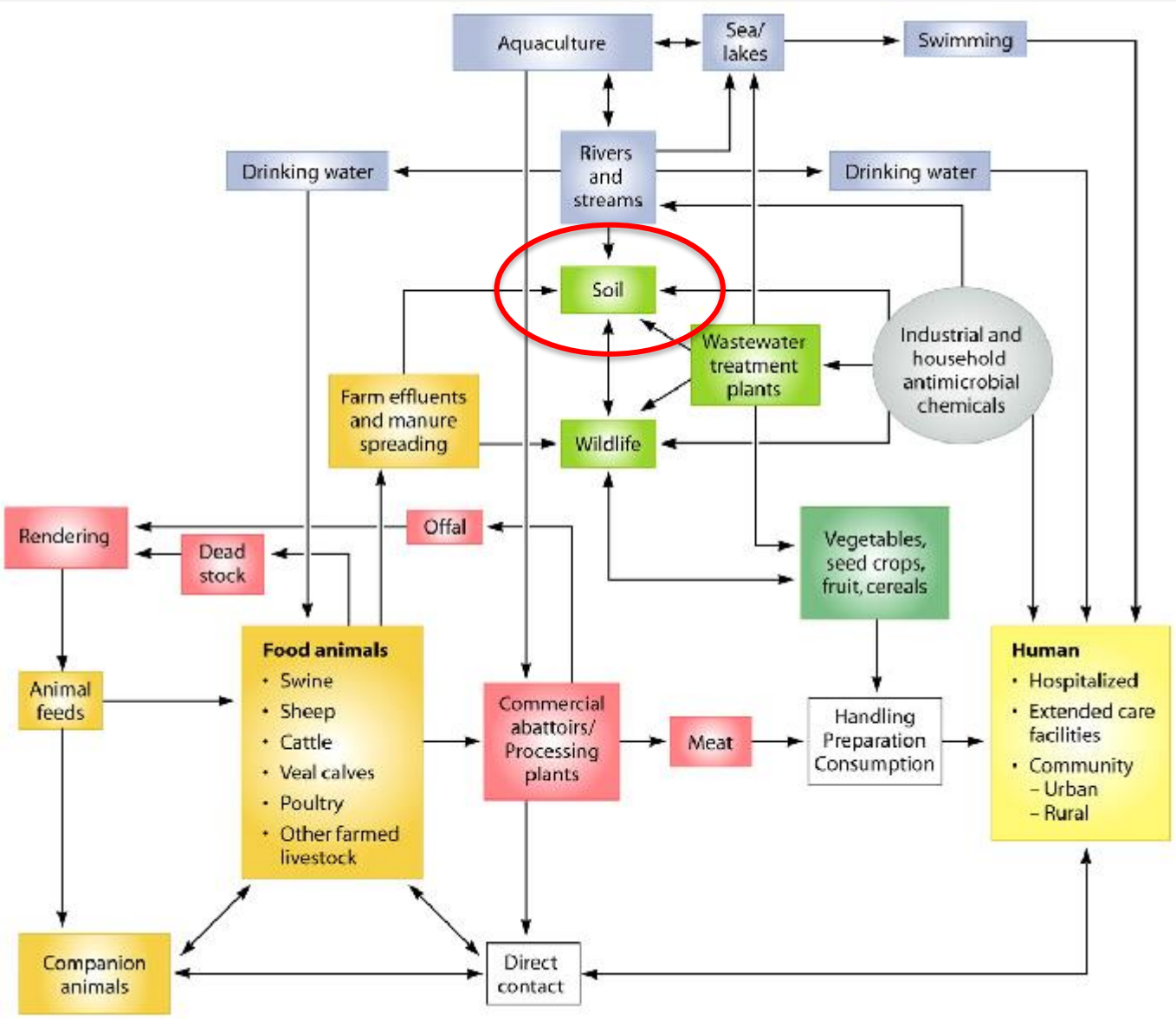
Plan de l'exposé

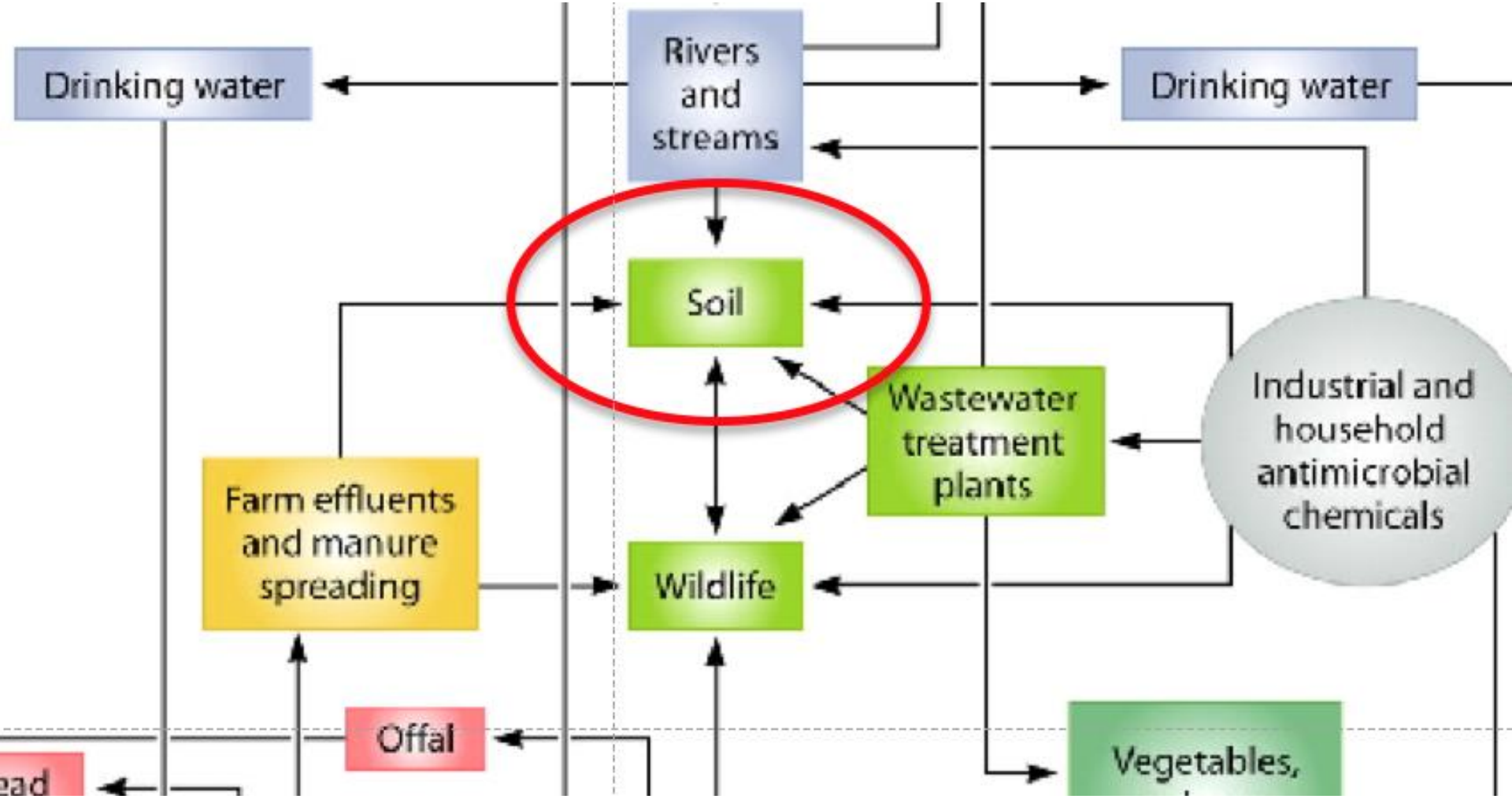
- **Introduction**: concept « One Health », microorganismes du sol, pathogènes ESKAPE et résistome des sols
- **Sources de contamination** des sols par les pathogènes ESKAPE résistantes ou par des gènes de résistance
- **Persistance dans les sols,** interactions avec les résidus de substances pharmaceutiques
- **Impact de la contamination** des sols sur l'exposition humaine et la sécurité sanitaire des aliments

Quelles sont les sources de contamination de l'Homme par les bactéries résistantes ? One Health Framework



Dissemination routes for AMR and pathogenic bacteria in ecosystems




Drinking water
Rivers and streams
Drinking water
Soil
Wastewater treatment plants
Industrial and household antimicrobial chemicals
Farm effluents and manure spreading
Wildlife
Offal
Vegetables,

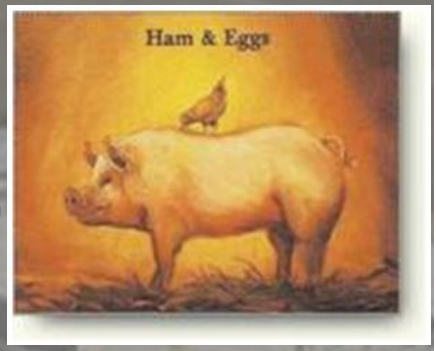
Le recyclage des produits organiques résiduaires est une clé pour l'apport de nutriments dans les systèmes de culture

Utilisation judicieuse des boues de STEU [& fumiers]:

- Recycle et conserve les éléments nutritifs
- Améliore la structure des sols et les rendements
- Peut contribuer au stockage de C dans les sols

C, N, P, K

C, N, P, K



REUSE

Reutilisation des eaux traitées en STEU

pratique courante dans de nombreux pays, amenée à se développer en France ?

Recyclage des effluents traités de STEU:

Arrêté du 2 aout 2010 en France

- Adaptation au changement climatique et à la limitation des ressources en eau pour l'agriculture

Irrigation

Mais, ces PRO à base de matières fécales ou ces effluents contiennent:

- Des microorganisms dont des Bactéries résistantes aux antibiotiques.
- Des pathogenes groupe ESKAPE

- Des résidus médicamenteux dont des antibiotiques.
- Quel risque pour la transmission de pathogènes resistant aux antibiotiques vers l'Homme ?

| Research Article | 01 April 2020

ESKAPE Bacteria and Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Wastewater and Process Water from German Poultry Slaughterhouses

Authors: Mykhailo Savin, Gabriele Bierbaum, Jens Andre Hammerl, Céline Heinemann, Marijo Parcina, Esther Sib, Alexander Voigt, Judith Kreyenschmidt | AUTHORS INFO & AFFILIATIONS

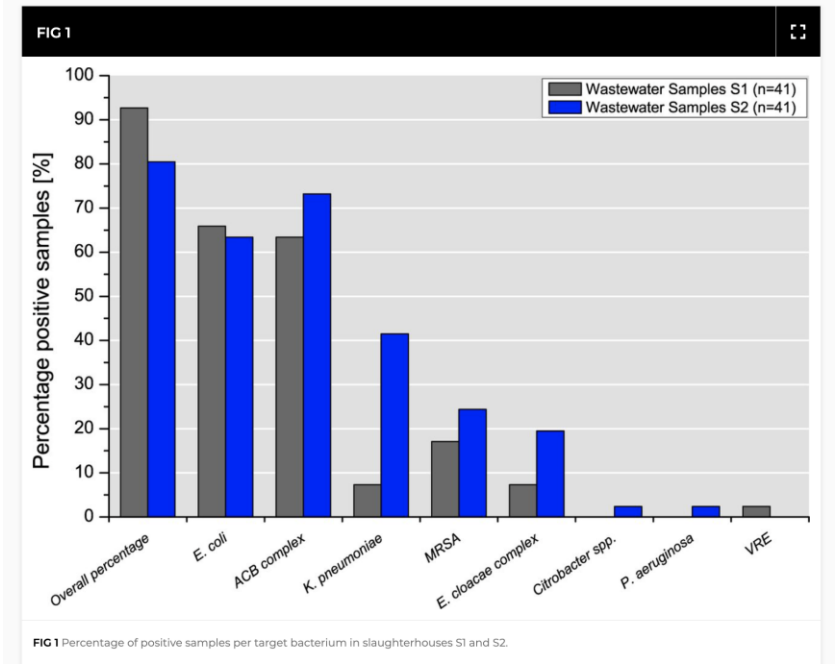


FIG 1 Percentage of positive samples per target bacterium in slaughterhouses S1 and S2.

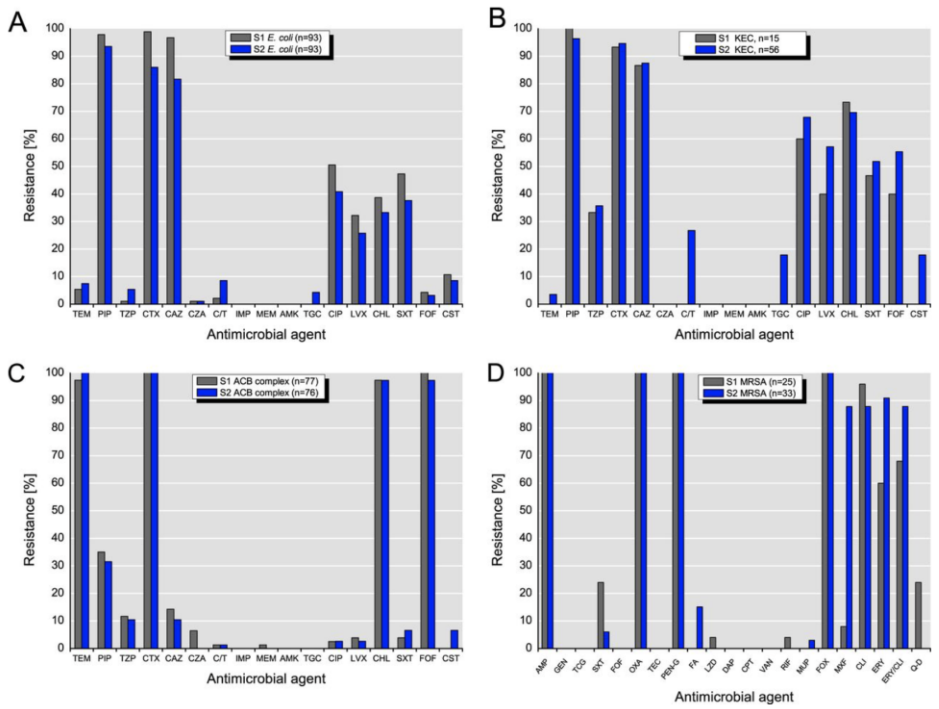


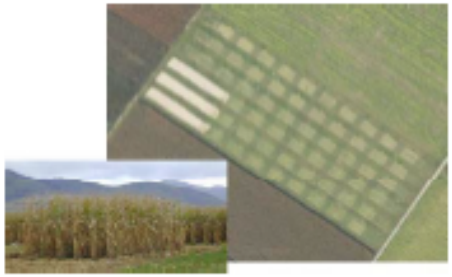
FIG 3 Resistance to antimicrobial agents detected among isolates of *E. coli* (A), *K. pneumoniae*, the *E. cloacae* complex, and *Citrobacter* spp. (B),

Plan de l'exposé

- **Introduction**: concept « One Health », microorganismes du sol, pathogènes ESKAPE et résistome des sols
- **Sources de contamination** des sols par les pathogènes ESKAPE résistantes ou par des gènes de résistance
- **Persistance dans les sols,** interactions avec les résidus de substances pharmaceutiques
- **Impact de la contamination** des sols sur l'exposition humaine et la sécurité sanitaire des aliments

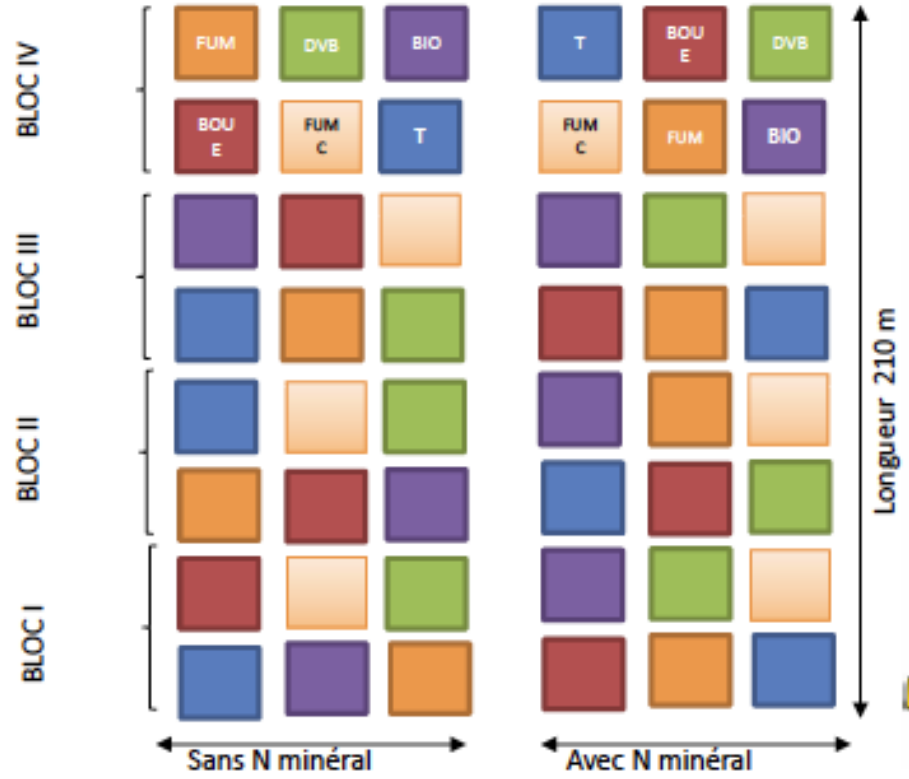
SOERE PRO : Essais agronomiques de longue durée. Programme ECOSOM

Theme 2 : organic matter management

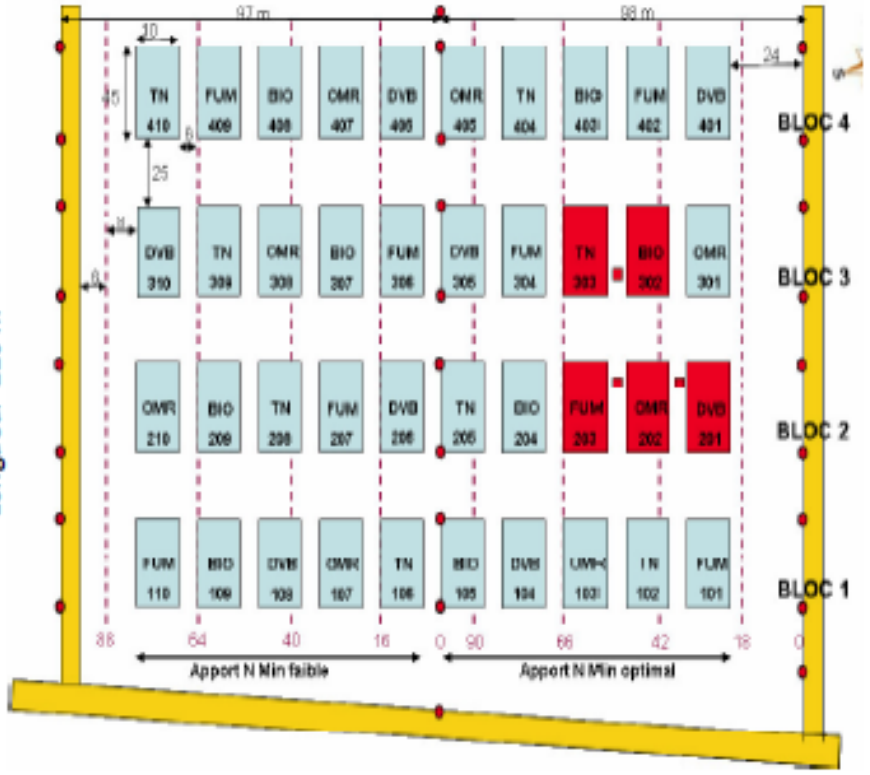


French sites: Qualiagro (Feucherolles) & Colmar

Colmar



Feucherolles (Qualiagro)



Résultats

Indicateurs de contamination fécale et pathogènes : FIB et particulièrement *E. coli* sont retrouvés dans tous les amendments et dans la pluspart des sols. *Listeria monocytogenes* n'est pas retrouvée dans les sols.

Bactéries résistantes : Des *E. coli* productrices d'ESBL et les gènes $bla_{CTX\text{-}M}$ sont détectés dans les **boues non compostées** (jusqu'à 10^7 gene copy par g de boue), **dans les lisiers de porc et dans les fumier bovins non compostés**. Des *E. coli* productrices d'ESBL sont détectées dans les sols amendés avec les boues non compostées jusqu'à un mois après épandage (Colmar).

Concernant les gènes $bla_{CTX\text{-}M}$, ils sont détectés dans plusieurs échantillons de sol indépendamment de la date de prélèvement et du traitement.

Conclusion : Hygiénisation des PRO (au moins par compostage) doit être réalisée pour éviter la dissémination des FIB et des souches et gènes de résistance aux antibiotiques. Les gènes de résistance peuvent persister …

Devenir dans des sols agricoles amendés avec des lisiers ou fumiers d'*E. coli* BLSE résistant aux C3G

frontiers in MICROBIOLOGY

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE
published: 09 March 2012
doi: 10.3389/fmicb.2012.00083

Occurrence of CTX-M producing *Escherichia coli* in soils, cattle, and farm environment in France (Burgundy region)

Alain Hartmann[1,2]*, Aude Locatelli[1], Lucie Amoureux[3], Géraldine Depret[1,2], Claudy Jolivet[4], Eric Gueneau[5] and Catherine Neuwirth[3]

[1] *INRA, UMR Microbiologie des Sols et de l'Environnement (MSE), The Institut National de la Recherche Agronomique, Dijon, France*
[2] *Université de Bourgogne, Dijon, France*
[3] *Laboratory of Bacteriology, University Hospital of Dijon, Dijon, France*
[4] *Unité InfoSol, The Institut National de la Recherche Agronomique, Orléans, France*
[5] *Laboratoire Départemental de la Côte d'Or, Dijon, France*

Résultats

- 271 échantillons fécaux de bovins (sains pour la majorité) analysés, 13 contiennent des ESBL-producing *E. coli*

- 5 isolats portent le gèneTEM-71-ESBL
- 8 isolats portent le gène CTX-M-1 ESBL.

- Collecte d'échantillons environnementaux dans deux fermes

Conclusions

- Les *E. coli* productrices de BLSE peuvent survivre dans les sols pour des périodes de temps non négligeables
- Rôle des filtres environnementaux dans leur survie ?
- Rôle d'indicateurs au même titre que des indicateurs moléculaires comme les intégrons de classe 1 ?

RESEARCH ARTICLE | ENVIRONMENTAL SCIENCES |

Pharmaceutical pollution of the world's rivers

John L. Wilkinson, Alistair B. A. Boxall, Dana W. Kolpin, +123, and Charles Teta Authors Info & Affiliations

February 14, 2022 | 119 (8) e2113947119 | https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119

global-scale study of API pollution in 258 of the world's rivers, representing the environmental influence of 471.4 million people across 137 geographic regions.

Fig. 3.

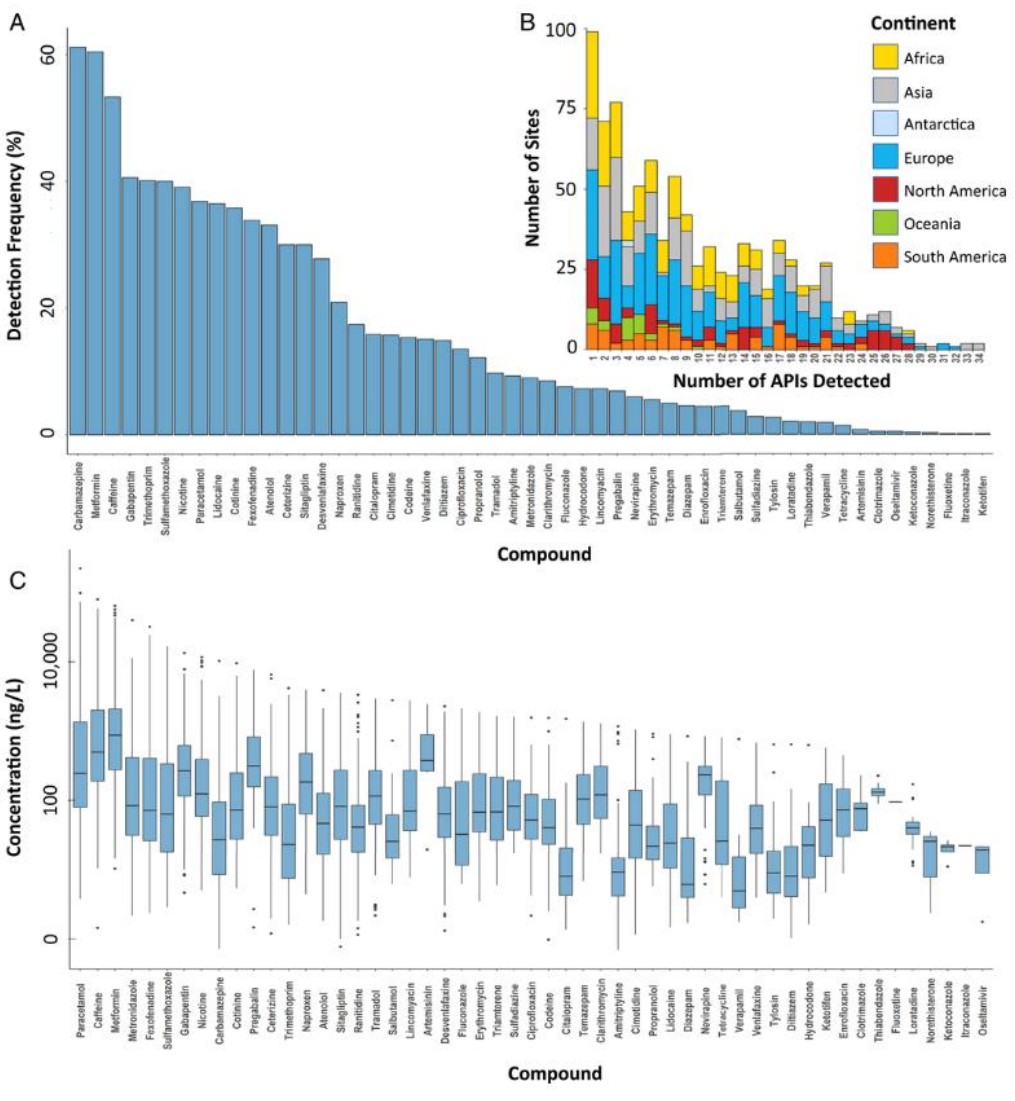
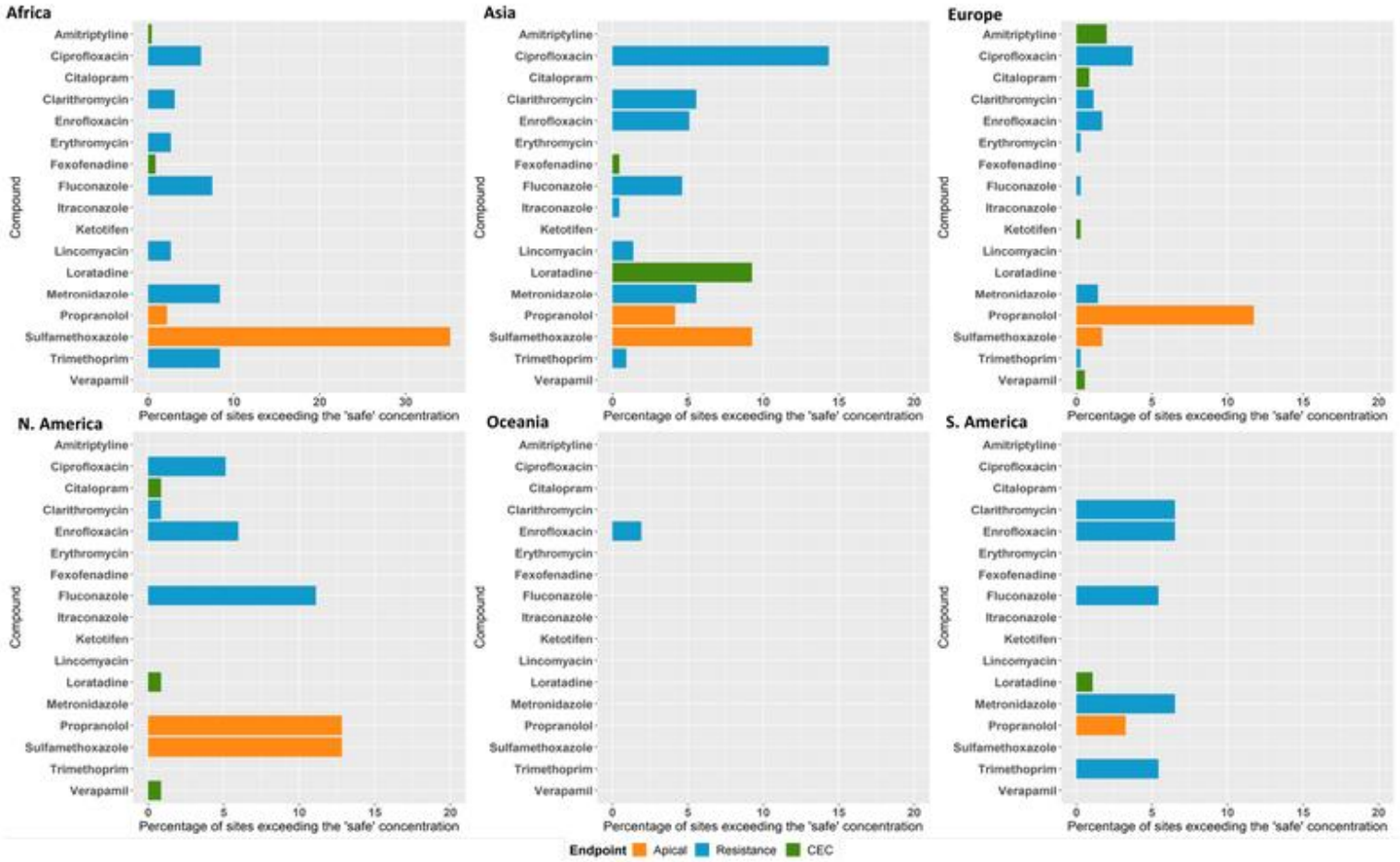


Fig. 5.



Percent of sites in the global monitoring study where concentrations exceeded: lowest PNECs (Dataset S12) derived from apical ecotoxicological endpoints for algae, fish, and daphnia (orange bars); CECs estimated based on human plasma therapeutic concentrations and uptake predictions for fish (green bars); and "safe" target concentrations for AMR selection (blue bars).

Plan de l'exposé

- **Introduction**: concept « One Health », microorganismes du sol, pathogènes ESKAPE et résistome des sols
- **Sources de contamination** des sols par les pathogènes ESKAPE résistantes ou par des gènes de résistance
- **Persistance dans les sols,** interactions avec les résidus de substances pharmaceutiques
- **Impact de la contamination** des sols sur l'exposition humaine et la sécurité sanitaire des aliments

Evaluation du risque : deux problèmes

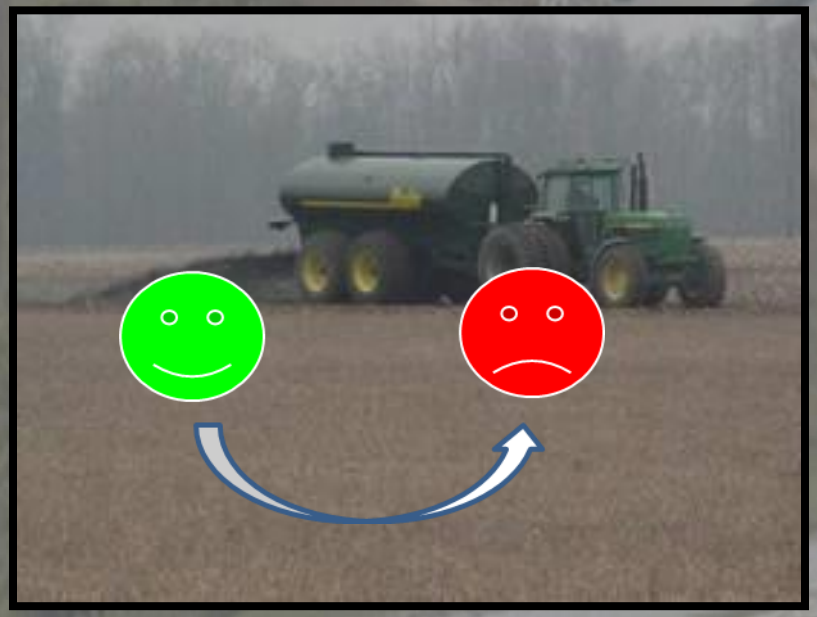
1. Les végétaux produits sur des sols amendés par des PRO sont contaminés par des résidus d'antibiotiques ou des bactéries résistantes

– Ceci représenterait une voie de transmission à l'Homme et l'animal

2. Impact sur les communautés de microorganismes : émergence de gènes de résistance, inhibition de certains microorganismes et altération de leur fonction .

– Ceci peut augmenter le reservoir de genes de résistance dans les sols ou affecter leur fertilité

1. Est-ce que les bactéries résistantes des PRO peuvent contaminer les végétaux?



Différents types de PRO.

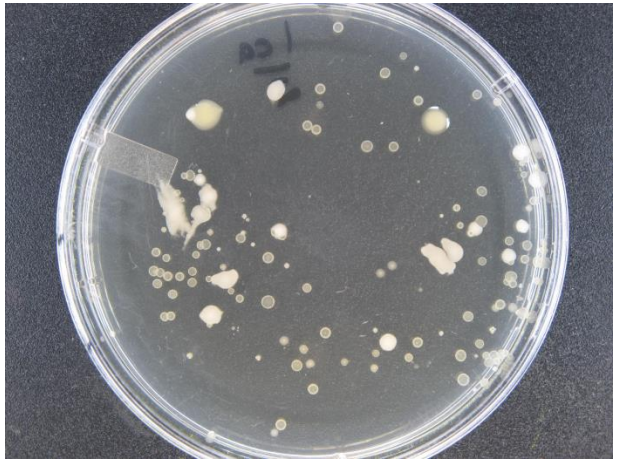
Différents types de prétraitement:
Compostage, digestion
(an)aerobic, deshydratation.

Culture [in]dependent analysis of populations

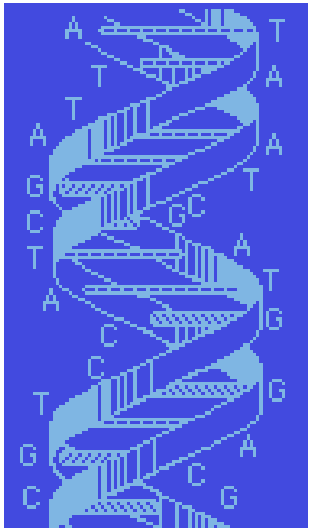
végétaux, sol,

boues/fumiers

+/- Antibiotics



Extraction eDNA



Enumerate, isolate and characterize
Abundance of AMR, MAR,
conjugative potential

Détection PCR, quantification par qPCR, inventaires métagénomiques, metagenomique fonctionnelle

Résultats

Les genes codant la résistance aux antibiotiques peuvent persister dans les sols plusieurs saisons après amendement des sols avec des PRO

Les végétaux récoltés l'année de l'application des PRO portent plus de germes ou gènes de résistance aux antibiotiques que les végétaux cultivés sans amendement avec un PRO

Impact of Manure Fertilization on the Abundance of Antibiotic-Resistant Bacteria and Frequency of Detection of Antibiotic Resistance Genes in Soil and on Vegetables at Harvest

Romain Marti,[a] Andrew Scott,[a] Yuan-Ching Tien,[a] Roger Murray,[a] Lyne Sabourin,[a] Yun Zhang,[a] Edward Topp[a,b]
Agriculture and Agri-Food Canada, London, Ontario, Canada[a]; Department of Biology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada[b]

September 2013 Volume 79 Number 18 Applied and Environmental Microbiology p. 5701–5709

Safely Coupling Livestock and Crop Production Systems: How Rapidly Do Antibiotic Resistance Genes Dissipate in Soil following a Commercial Application of Swine or Dairy Manure?

Romain Marti,[a] Yuan-Ching Tien,[a] Roger Murray,[a] Andrew Scott,[a] Lyne Sabourin,[a] Edward Topp[a,b]
Agriculture and Agri-Food Canada, London, Ontario, Canada[a]; Department of Biology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada[b]

Applied and Environmental Microbiology p. 3258–3265 May 2014 Volume 80 Number 10

Le compostage réduit les nuisances liées à la résistance aux antibiotiques dans le fumier bovin et réduit les risques de transfert vers les cultures

Science of the Total Environment 581–582 (2017) 32–39

Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest

Yuan-Ching Tien [a], Bing Li [b], Tong Zhang [c], Andrew Scott [a], Roger Murray [a], Lyne Sabourin [a], Romain Marti [a], Edward Topp [a,d,*]

[a] Agriculture and Agri-Food Canada, London, ON N5V 4T3, Canada
[b] Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, China
[c] Environmental Biotechnology Laboratory, University of Hong Kong, Hong Kong
[d] University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

Il y a dans les sols des gènes cryptiques de résistance aux antibiotiques qui pourraient apparaitre chez des pathogènes humains (transfert horizontaux de genes). ‘Canary in the coal mine’?

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Applied and Environmental Microbiology®

PUBLIC AND ENVIRONMENTAL HEALTH MICROBIOLOGY

Novel Antibiotic Resistance Determinants from Agricultural Soil Exposed to Antibiotics Widely Used in Human Medicine and Animal Farming

Calvin Ho-Fung Lau,[a] Kalene van Engelen,[a] Stephen Gordon,[a] Justin Renaud,[a] Edward Topp[a,b]

London Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, London, Ontario, Canada[a]; Department of Biology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada[b]

August 2017 Volume 83 Issue 16 e00989-17

CTX-M ESBL

Kluyvera

↓

Enterobactéries pathogènes

A retenir (1)

- L'application de PRO sur les sols peut s'accompagner d'une survie des bactéries du groupe ESKAPE résistantes dans les sols
- Les cultures produites sur des sols amendés par des PRO peuvent être porteuses de bactéries résistantes aux antibiotiques / sols non amendés.
- Management possible par compostage, mais d'autres solutions restent à imaginer.

A retenir (2)

- Les résidus d'antibiotiques impactent le microbiome des sols en modifiant sa structure.
- La contamination des resources en eau par des API (Active Pharmaceutical Ingredients) à des teneurs supérieures aux PNEC (Probable no effect concentration) est préoccupante.
- Développement dans l'environnement de nouvelles résistances chez les ESKAPE

Fronts de science à développer

- Poursuivre l'étude de la dissémination environnementale de l'antibiorésistance
- ESKAPE persistance dans les sols risque de transfert vers l'homme
- Indicateurs de dissémination : BLSE *E. coli*, intégrons de classe 1.
- Faire le lien entre exposition et risque pour la santé (pour définir des actions et la politique de santé, principe de précaution ?).

Merci de votre attention