

Antibiorésistance des bactéries fécales et autochtones présentes dans les eaux de rivières et les boues de station d'épuration

Julien Passerat¹, Adriana Anzil¹, Sophie Haenn², Laurent Moulin² et Pierre Servais^{1*}

¹Ecologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles

²Eau de Paris DRDQE, 144 avenue Paul Vaillant Couturier 75014 Paris

* personne à contacter : pservais@ulb.ac.be

1 Introduction

Les travaux menés sur l'antibiorésistance dans le cadre du PIREN-Seine les années précédentes ont mis en évidence des taux de résistance aux antibiotiques parfois élevés chez les bactéries fécales rencontrées dans les rivières du bassin. En moyenne plus de 40 % des *Escherichia coli* et plus de 80 % des entérocoques intestinaux résistent à l'un au moins des antibiotiques testés (Passerat et Servais, 2008 ; Servais et Passerat, 2009), et de forts taux d'antibiorésistance sont également observés chez les coliformes (Haenn et al., 2009). Si une prévalence élevée de l'antibiorésistance est observée chez ces trois indicateurs de contamination fécale, il est possible que ce soit également le cas des bactéries fécales pathogènes. La présence de pathogènes fécaux dans les eaux de surface constituant un risque sanitaire, leurs éventuelles résistances pourraient représenter un facteur aggravant, dans l'hypothèse où celles-ci réduiraient les options thérapeutiques lors d'une infection. Enfin, l'émission de bactéries fécales antibiorésistantes dans l'environnement aquatique, par le rejet d'eau usée, ou dans le sol, par l'épandage de boues d'épuration, pourrait constituer une source de dissémination des gènes de résistance, si des échanges génétiques avec les bactéries autochtones de ces milieux ont lieu.

Au cours de l'année 2009, le laboratoire d'Eau de Paris a poursuivi ses efforts de caractérisation de l'antibiorésistance des coliformes trouvés dans les rivières et dans les effluents hospitaliers. Le laboratoire ESA a entrepris d'évaluer la teneur en bactéries fécales des boues de différentes stations d'épuration du SIAAP, pour évaluer l'efficacité de l'élimination de ces bactéries par les divers traitements utilisés, ainsi que pour évaluer l'antibiorésistance des bactéries qui restent dans les boues et qui peuvent alors être exportées hors de la station. Enfin, pour évaluer le risque de dissémination de gènes de résistance dans le milieu aquatique, des travaux débutés en 2008 ont été poursuivis. Ceux-ci consistent à explorer l'antibiorésistance des bactéries autochtones du milieu aquatique et de la mettre en relation avec celle des *Escherichia coli*, pris comme représentants des bactéries fécales, avec lesquelles elles coexistent.

2 Concentration en antibiotiques et influence sur les coliformes

2.1 Contexte et projets en cours

Les recherches menées par le laboratoire d'Eau de Paris sur la thématique de l'antibiorésistance ont été initiées en 2007 et poursuivies en 2008 et 2009. Dans ce programme, nous proposons de déterminer la résistance des coliformes isolés selon la méthode normative (NF EN ISO 9308-1) à des antibiotiques appartenant à 4 classes d'antibiotiques différentes. Cette détermination a été réalisée par la méthode des CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices), c'est-à-dire par repiquage sur un milieu gélosé contenant des concentrations croissantes d'antibiotiques. Ces études ont été réalisées sur des prélèvements issus de différentes origines : eau de la Seine, eau de l'Orge, eau provenant d'effluents d'un hôpital de l'AH-HP.

2.2 Résultats

Afin de compléter les études de 2007 et 2008, des prélèvements supplémentaires en Seine, en Orge ainsi qu'au niveau des effluents d'un hôpital de l'AH-HP ont été réalisés. Durant l'année 2009, la résistance à 4 antibiotiques de 345 souches de coliformes de différentes provenances ont été analysées :

- 90 échantillons sur des effluents d'hôpitaux
- 139 échantillons provenant de l'Orge
- 36 échantillons provenant de la Seine

Les données obtenues ont été compilées avec les 400 clones des années précédentes. La figure 1 représente le pourcentage de clones résistants pour chaque concentration d'antibiotique, exprimée en multiples de la dose définissant la limite de résistance (Comité Français d'antibiogramme).

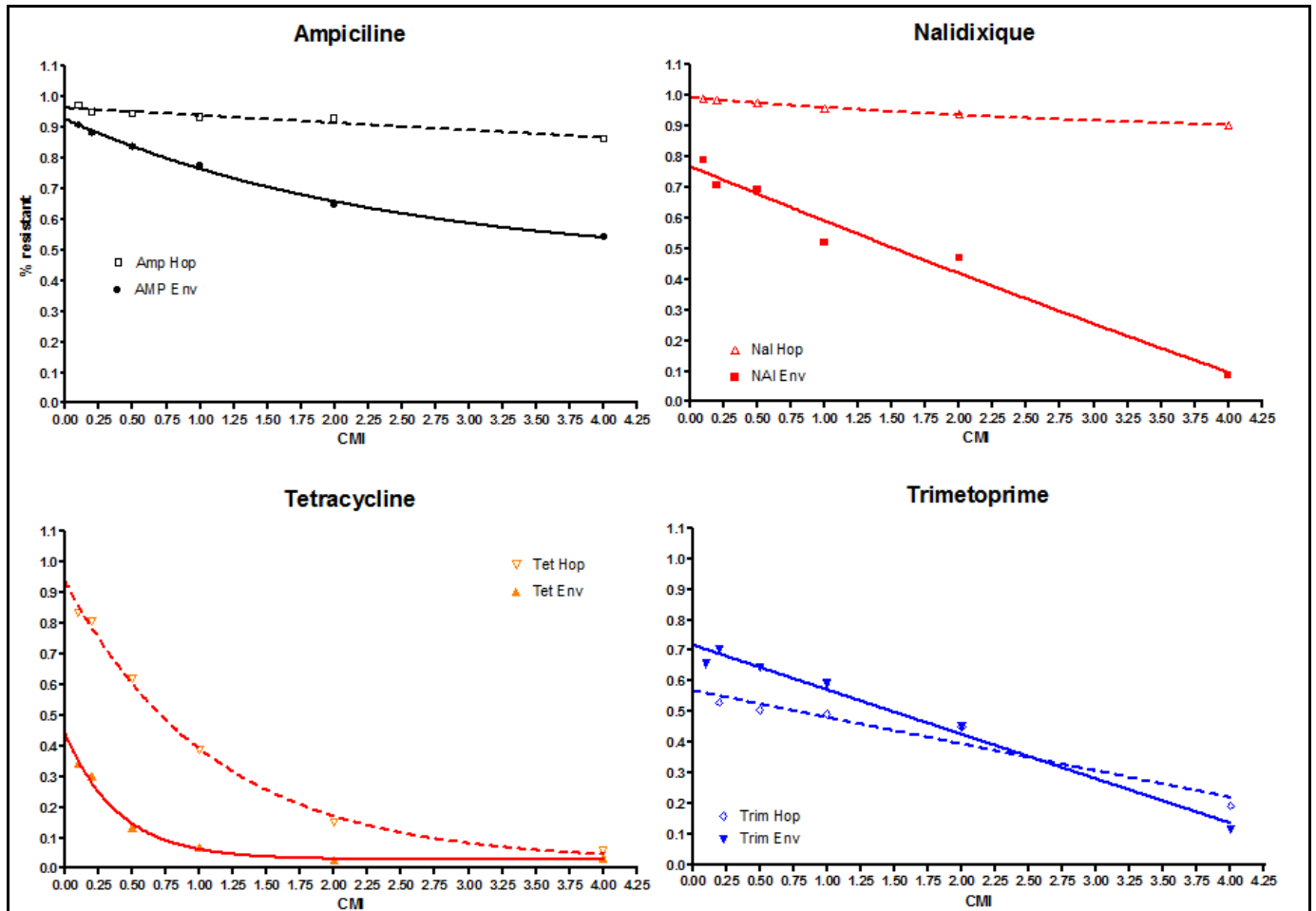


Figure 1 : Comparaison des pourcentages moyens de coliformes résistants à l'ampicilline, l'acide nalidixique, la tétracycline et le triméthoprim dans l'environnement (Seine et Orge (Env)) et en effluents d'hôpitaux (Hop). (Légende : points = valeurs mesurées, lignes = modélisation ($R^2 > 0.99$)).

Sur les 4 résistances aux antibiotiques étudiées, on observe une résistance plus importante dans les rejets hospitaliers que dans l'environnement sauf pour le triméthoprim où on isole autant de coliformes résistants dans l'environnement (Seine et l'Orge) que dans les effluents d'hôpitaux. En ce qui concerne le triméthoprim (Figure 1D), la différence entre le taux de résistance entre les coliformes trouvés en Seine/Orge et en effluents d'hôpitaux est beaucoup moins importante. Ceci pourrait s'expliquer par l'usage essentiellement vétérinaire du triméthoprim : en 2002, 259 tonnes de triméthoprim ont été utilisées en médecine vétérinaire contre 1,6 tonnes en médecine humaine (Données AFSSA, Rapport sur les Antibiotiques). Concernant l'étude environnementale, la poursuite de notre échantillonnage en 2009 nous a permis de conforter les résultats obtenus lors des campagnes 2007 et 2008.

L'utilisation d'une technique par CMI permet d'observer que non seulement les coliformes isolés à partir des rejets hospitaliers sont à la fois plus fréquemment résistants mais aussi que les clones résistants le sont à des concentrations d'antibiotiques beaucoup plus élevées. Cette observation est à mettre en parallèle avec la nature plus fréquemment plasmidique des résistances développées en hôpital, mécanisme qui peut entraîner des niveaux de résistance plus importants.

Nous avons également observé une différence entre l'Orge et la Seine (données non représentées ici). Les coliformes isolés à partir de l'Orge sont moins résistants que ceux isolés à partir des autres sources.

3 Abondance et antibiorésistance des bactéries fécales dans des boues d'épuration

3.1 Matériel et méthodes

Trois échantillons de boues en provenance de trois stations d'épuration (Seine centre, Seine aval et Seine Grésillons) ont été fournis par le SIAAP. Les boues ont été resuspendues dans une solution de Ringer stérile dans une proportion de 1 % (m/V). Par la suite 50 mL de ces mélanges ont été traités aux ultrasons (2 fois une minute à 60 W) avec une sonde pour décrocher un maximum de bactéries des particules des boues. Après une sédimentation de 10 min des plus grosses particules, le surnageant a été récupéré et traité comme un échantillon d'eau pour le dénombrement des *E. coli* et des entérocoques intestinaux. Les *E. coli* ont été cultivés sur gélose Chromocult Coliformes Agar 24 h à 36 °C et les entérocoques intestinaux sur gélose Chromocult Entérocoques Agar 36 h à 36 °C. Suite au dénombrement des unités formant colonies, 20 *E. coli* et 20 entérocoques intestinaux ont été isolés par échantillon. Leur résistance envers divers antibiotiques a été testée par la méthode standard de diffusion en milieu gélosé (Passerat et Servais, 2008). Douze antibiotiques ont été testés pour *E. coli* : amoxicilline (AMX, charge en antibiotique du disque : 25 µg), amoxicilline + acide clavulanique (AMC, 20/10 µg), céfalotine (CF, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg), tétracycline (TE, 30 UI), sulfaméthoxazole + triméthoprim (SXT, 23,75/1,25 µg), acide nalidixique (NA, 30 µg), ofloxacin (OFX, 5 µg), lévofloxacin (LVX, 5 µg), ciprofloxacine (CIP, 5 µg), gentamicine (GM, 15 µg) et amikacine (AN, 30 µg). Six antibiotiques ont été testés pour les entérocoques intestinaux : érythromycine (E, 15 UI), lévofloxacin (LVX, 5 µg), ampicilline (AM, 10 µg), chloramphénicol (C, 30 µg), sulfaméthoxazole + triméthoprim (SXT, 23,75/1,25 µg), tétracycline (TE, 30 UI). Pour chaque échantillon, un index de multirésistance a été calculé comme le rapport du nombre de cas de résistance observés (total des résistances observées pour chaque isolat de l'échantillon) au nombre de cas de résistance possibles (nombre total d'isolats de l'échantillon × nombre d'antibiotiques testés).

3.2 Résultats

Tableau 1 : Origine des boues, traitements subis, composition en matières sèche et organique, abondance et antibiorésistance des *E. coli* et des entérocoques intestinaux.

Origine	Traitements	% Mat. sèche	% Mat. organique	Abondance (unités formant colonie par g de matière sèche)		% d'isolats résistants à = 1 antibiotique		Index de multirésistance	
				<i>E. coli</i>	Entéro. int.	<i>E. coli</i>	Entéro. int.	<i>E. coli</i>	Entéro. int.
Seine centre	Déshydratation par centrifugation	24	73	$1,6 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$	25	30	0,058	0,067
Seine aval	Digestion + conditionnement thermique (20 bars, 150 °C) + déshydratation par filtre presse	53	35	$1,9 \times 10^2$	$6,1 \times 10^1$	55	50	0,113	0,108
Seine Grésillons	Déshydratation par centrifugation + séchage thermique	93	72	< 1	< 1	NA	NA	NA	NA

Une abondance élevée en indicateurs fécaux a été observée dans la boue de Seine centre, qui n'a subi qu'une déshydratation par centrifugation (Tableau 1). Une abondance de cinq ordres de grandeur plus faible a été mesurée dans la boue de Seine aval qui a subi une digestion et un conditionnement thermique (20 bars, 150 °C) en plus de l'étape finale de déshydratation (par filtre presse). Enfin aucun *E. coli* ou entérocoque intestinal n'a pu être cultivé à partir de la boue de Seine Grésillons, qui en plus de la déshydratation par centrifugation comme à Seine centre a subi un séchage thermique. Il semble donc à première vue que plus le niveau de déshydratation de la boue est élevé et plus les abondances en bactéries fécales sont basses.

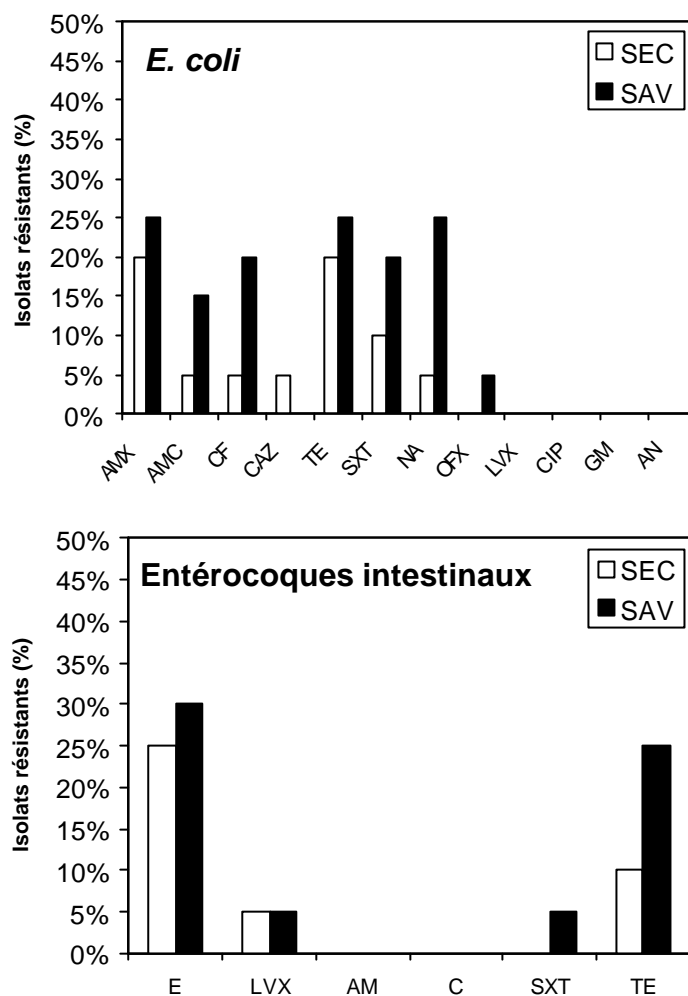


Figure 2 : Pourcentage d'isolats de *E. coli* et d'entérocoques intestinaux résistants à divers antibiotiques dans les boues de Seine centre (SEC) et Seine aval (SAV).

Dans les deux échantillons de boue pour lesquels des indicateurs fécaux ont pu être isolés, l'antibiorésistance détectée s'est révélée assez semblable à celle qui a précédemment été observée dans les eaux usées municipales (Figure 2). La prévalence de l'antibiorésistance parmi les isolats était de 25 % et 55 % pour *E. coli* et 30 % et 50 % pour les entérocoques intestinaux à Seine centre et Seine aval respectivement (Tableau 1).

Les boues d'épurations peuvent donc potentiellement contenir une forte charge en bactéries fécales si elles ne sont que déshydratées par centrifugation. Ces bactéries fécales possèdent les mêmes caractéristiques d'antibiorésistance que celles trouvées dans les eaux usées dont elles proviennent. Les traitements supplémentaires qui peuvent être apportés aux boues, et peut-être particulièrement les traitements thermiques en vue d'augmenter la déshydratation, semblent par contre réduire fortement la charge en bactéries fécales, jusqu'à des niveaux inférieurs au seuil de détection de la méthode utilisée dans cette étude (1 unité formant colonie par gramme de boue sèche).

4 Antibiorésistance des bactéries autochtones du milieu aquatique

4.1 Matériel et méthodes

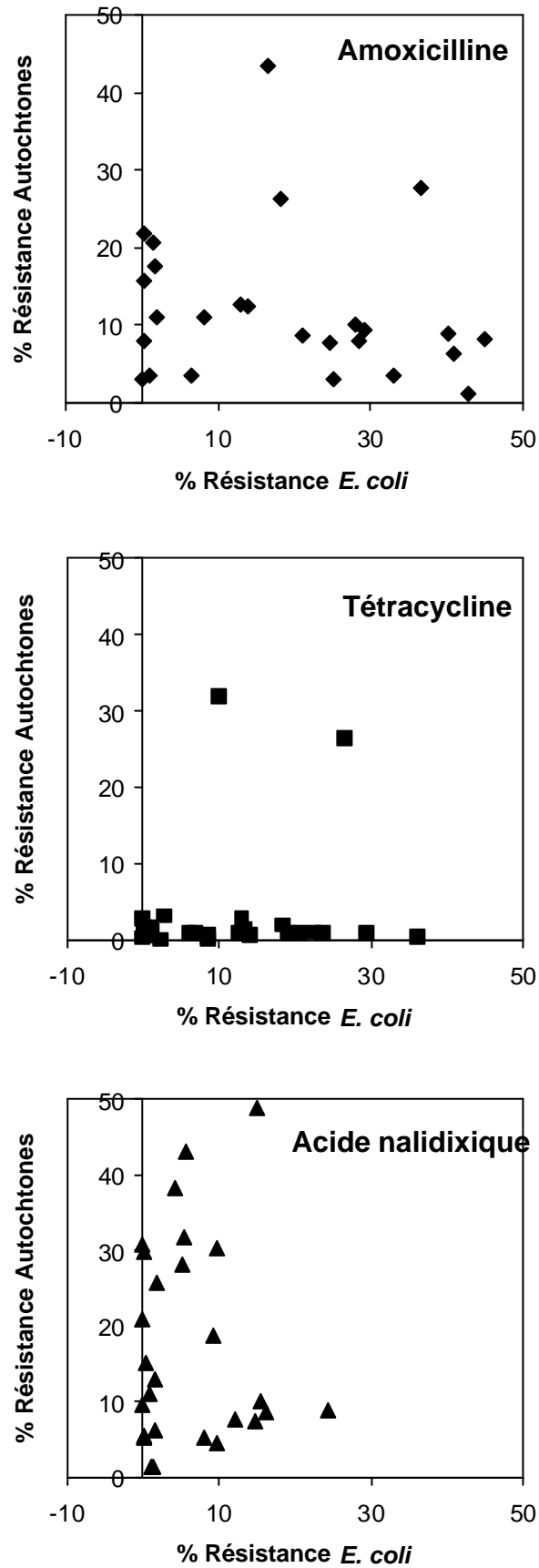
L'analyse parallèle de l'antibiorésistance des bactéries autochtones et des *E. coli* a été poursuivie en 2009. En 2008, 10 échantillons de rivières avaient été étudiés (6 provenant de la Seine, 2 de l'Orge et 2 de la Renarde) (Passerat et al., 2009). En 2009, 19 échantillons supplémentaires ont été traités. Pour étendre la gamme d'exposition des bactéries autochtones à des bactéries fécales antibiorésistantes, en plus des rivières, des échantillons ont été prélevés dans des ruisseaux en zone rurale (avec des bassins versants dont l'usage du

sol est à dominance forestière, ou de culture, ou d'élevage), ainsi que dans des eaux usées. Finalement, 10 échantillons de ruisseaux (3 forestiers, 2 de culture, 5 de pâtures), 3 échantillons d'eaux usées (2 eaux usées brutes et 1 eau usée traitée) et 6 échantillons de rivières (3 de l'Oise, 2 de la Seine et 1 de l'Orge) ont été analysés. Les bactéries autochtones ont été dénombrées sur une gélose R2A après 7 jours d'incubation à 20 °C. Le R2A est une gélose non sélective permettant de dénombrer les bactéries hétérotrophes aérobies cultivables présentes dans les échantillons d'eau. Les bactéries autochtones ont également été dénombrées sur des géloses R2A respectivement supplémentées en amoxicilline (4 mg/L), en tétracycline (4 mg/L) et en acide nalidixique (8 mg/L). Ces concentrations sont les concentrations critiques basses des trois antibiotiques selon le CA-SFM (CA-SFM, 2008). Une souche dont la croissance est inhibée à la concentration critique basse d'un antibiotique est considérée comme sensible à cet antibiotique. En parallèle, les *E. coli* ont été dénombrés sur gélose sélective Chromocult Coliform Agar (CCA), ainsi que sur des géloses CCA contenant l'un des trois antibiotiques à la même concentration que celle utilisée pour le milieu R2A. Le rapport entre le dénombrement effectué sur la gélose supplémentée en antibiotique et celui effectué sur la gélose non supplémentée donne une estimation du taux de résistance des bactéries autochtones ou de *E. coli* à l'antibiotique considéré.

4.2 Résultats

Une comparaison du taux de résistance des bactéries autochtones et de *E. coli* a été effectuée sur 27 des 29 échantillons collectés en 2008 et 2009, pour les trois antibiotiques. Les deux échantillons d'eau usée brute ont été exclus de cette comparaison, car dans ce cas il est problématique de considérer les bactéries cultivées sur la gélose non spécifique R2A comme autochtones du milieu aquatique : leur vitesse de croissance à 20 °C (grosses colonies formées en 24 h), l'aspect des colonies qu'elles forment, similaire à ce qu'on observe avec des coliformes, et leur abondance relative en comparaison de *E. coli* (supérieure à peine de 2 ordres de grandeur quand dans les autres échantillons la population de bactéries hétérotrophes aérobies cultivables sur R2A dépasse celle de *E. coli* de 3,5 à 5 logs) laisse à penser qu'il s'agit essentiellement de bactéries fécales.

Cette comparaison ne révèle aucune relation apparente entre les taux de résistance observés pour *E. coli* et ceux observés pour les bactéries autochtones (Figure 3). Le niveau de résistance observé chez les bactéries autochtones semble ainsi indépendant de celui des *E. coli* trouvés à leur côté dans les échantillons. En fait, dans certains échantillons, la population de bactéries autochtones qui résistent à un antibiotique donné, telle qu'on l'observe sur gélose R2A supplémentée, se limite à une seule espèce (un seul type de colonies sur la gélose). A quelques reprises une fluorescence verdâtre a été observée pour ces colonies ayant le même aspect, ce qui pourrait faire penser à *Pseudomonas fluorescens*. Il est connu que *Pseudomonas spp.* résiste naturellement à un nombre important d'antibiotiques (Jones et al., 1986). Il est donc probable que les bactéries cultivées sur gélose R2A supplémentée d'un antibiotique appartiennent à des espèces autochtones naturellement résistantes. Cette résistance naturelle semble très répandue chez les bactéries aquatiques autochtones, puisque les taux de résistance moyens mesurés sur les 27 échantillons sont de 20 % pour l'amoxicilline, 11 % pour la tétracycline et 6 % pour l'acide nalidixique. Dans ces conditions, si des transferts de gènes de résistance ont lieu de *E. coli* vers les bactéries autochtones, la méthode utilisée ici ne permet pas de les mettre en évidence car ces événements pourraient être moins fréquents que l'occurrence de résistances naturelles chez les autochtones.



5 Conclusion

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence les points suivants :

Les coliformes isolés à partir des rejets hospitaliers sont à la fois plus fréquemment résistants mais aussi résistants à des concentrations d'antibiotiques beaucoup plus élevées. La confirmation de ce résultat démontre que le mécanisme de résistance mis en jeu lors d'une d'antibiothérapie permet la sélection de souches beaucoup plus résistantes que celles identifiées dans l'environnement.

La teneur en bactéries fécales des boues de STEPs dépend du type de traitement subi par les boues ; le traitement de déshydratation par centrifugation suivi par un séchage thermique tel qu'appliqué à Seine Grésillons permet d'éliminer totalement la flore fécale. Les pourcentages de résistance aux antibiotiques des *E. coli* isolés des boues de STEPs sont du même ordre de grandeur que ceux des *E. coli* isolés des eaux usées.

Des pourcentages non négligeables de résistances aux antibiotiques testés ont été mesurés pour les bactéries autochtones des échantillons environnementaux. L'absence de relation entre les pourcentages de résistances des *E. coli* et des bactéries autochtones dans les échantillons environnementaux ne permet pas de démontrer un transfert de l'antibiorésistance des bactéries fécales vers les autochtones.

6 Remerciements

Les auteurs remercient le SIAAP ainsi que Joëlle Eurin et Marie-Jeanne Teil pour leur avoir fourni une partie des échantillons de boues et d'eau de cette étude. Ils remercient également Frédéric Jeanney pour sa contribution aux prélèvements de terrain et aux analyses de laboratoire.

7 Références

- Haenn, S, Accrombessi, H et Moulin, L. Antibiorésistance des coliformes par l'étude de concentration minimale inhibitrice (CMI) : Application à la Seine et aux rejets hospitaliers. Rapport PIREN-Seine 2008. Février 2009
- Jones, J.G., S. Gardener, B.M. Simon & R.W. Pickup. 1986. Antibiotic resistant bacteria in Windermere and two remote upland tarns in the English Lake District. *Journal of Applied Bacteriology* 60:443-453
- Passerat, J & Servais, P. 2008. Occurrence et origines des bactéries fécales antibiorésistantes (*E. coli* et entérocoques) dans le bassin de la Seine. Rapport PIREN-Seine 2007. Février 2008.
- Passerat, J, Anzil, A & Servais, P. 2009. Antibiorésistance des flores bactériennes autochtone et fécale dans les rivières du bassin de la Seine. Rapport PIREN-Seine 2008. Février 2009.
- Servais, P & Passerat, J. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river basin (France). *Science of the Total Environment*. 2009. 408: 365-372.