



Agriculture and
Agri-Food Canada
Agriculture et
Agroalimentaire Canada



Survie et devenir des bactéries résistantes aux antibiotiques dans le sol et les systèmes de culture

Alain Hartmann Ph.D.
Agroécologie, INRA Dijon
alain.hartmann@inra.fr



Ed Topp Ph.D.
London Research and Development Centre
Ed.topp@canada.ca

Plan de l'exposé

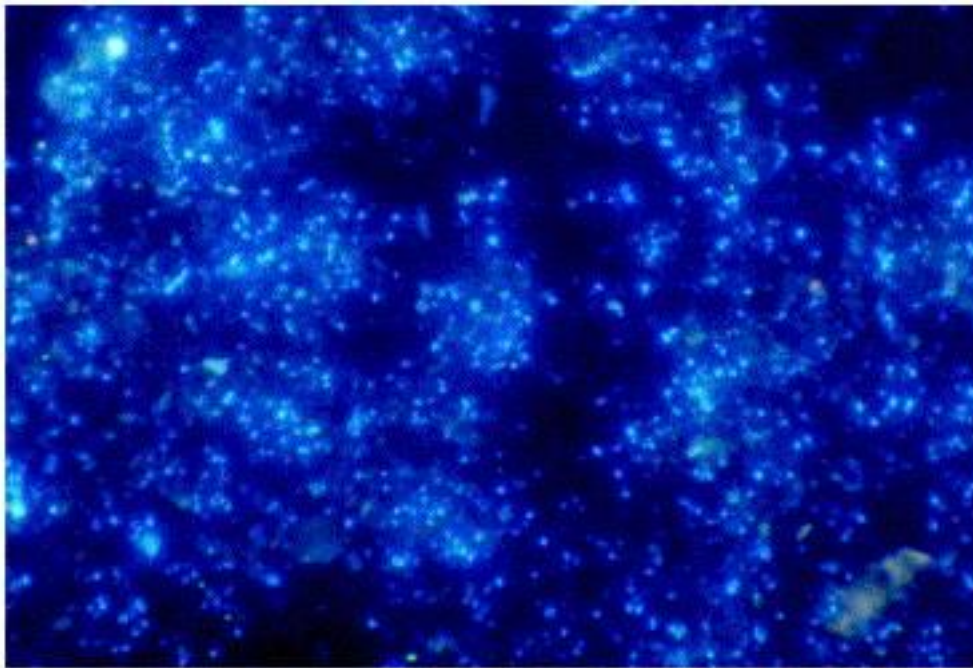
- **Introduction:** One Health concept, microorganismes du sol et résistome des sols
- **Sources de contamination** des sols par des bactéries résistantes ou des gènes de résistance
- **Survie des bactéries résistantes dans les sols** et transferts horizontaux de gènes de résistance
- **Impact de la contamination** des sols sur la sécurité sanitaire des aliments

Plan de l'exposé

- **Introduction:** One Health concept, microorganismes du sol et résistome des sols
- **Sources de contamination** des sols par des bactéries résistantes ou des gènes de résistance
- **Survie des bactéries résistantes dans les sols** et transferts horizontaux de gènes de résistance
- **Impact de la contamination** des sols sur la sécurité sanitaire des aliments

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.

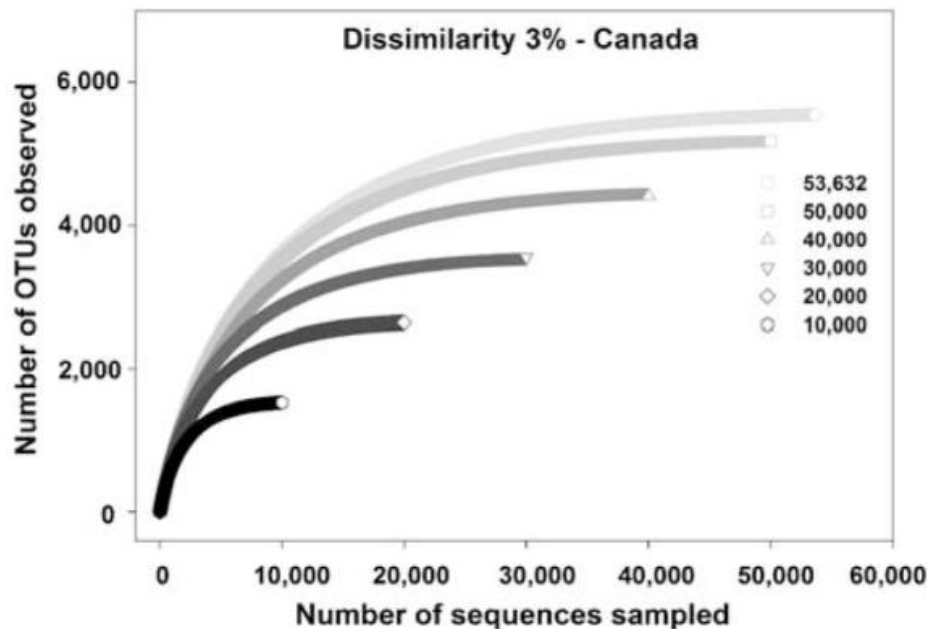


Current Opinion in Microbiology

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

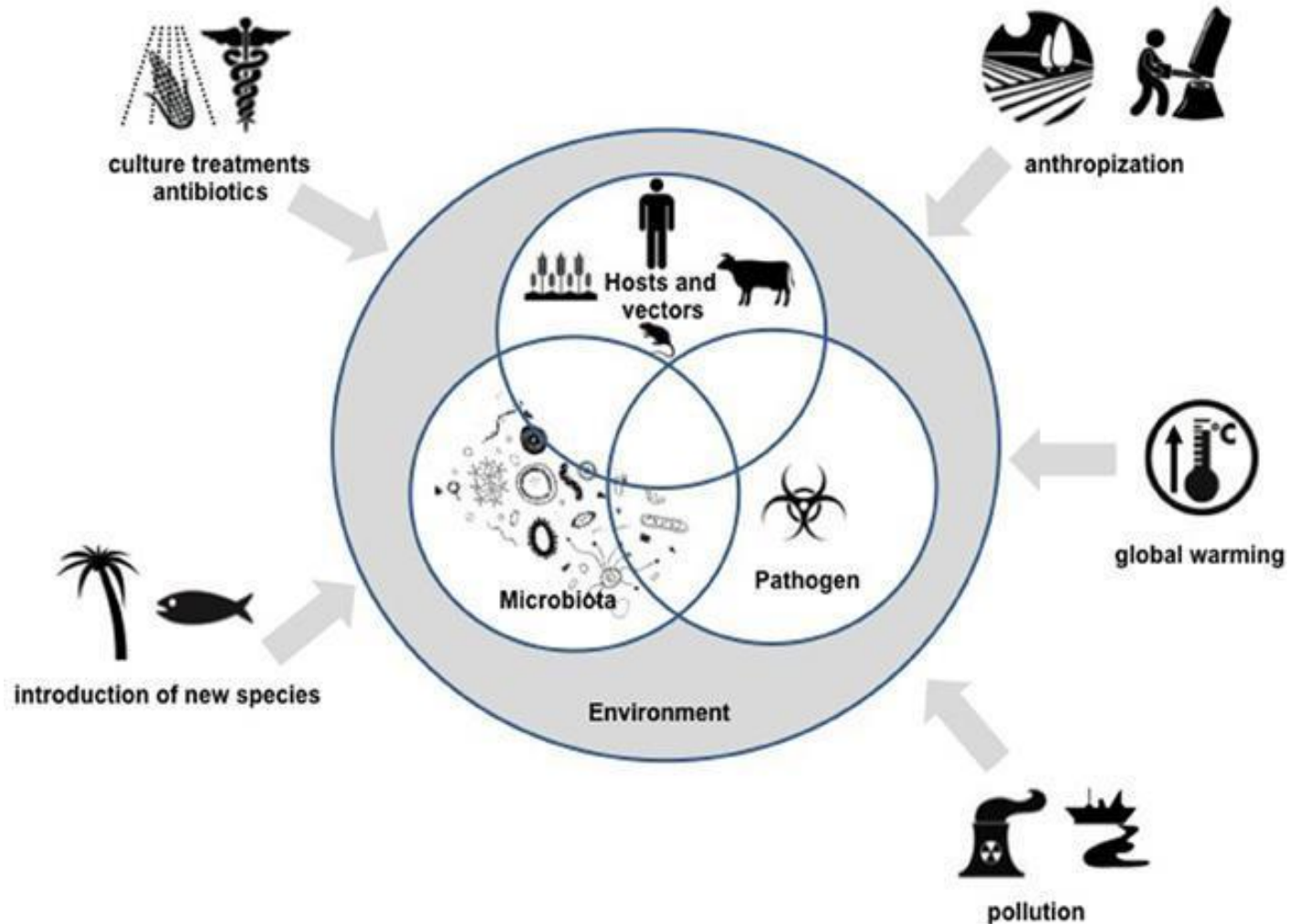
Abondance et diversité des microorganismes du sol

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

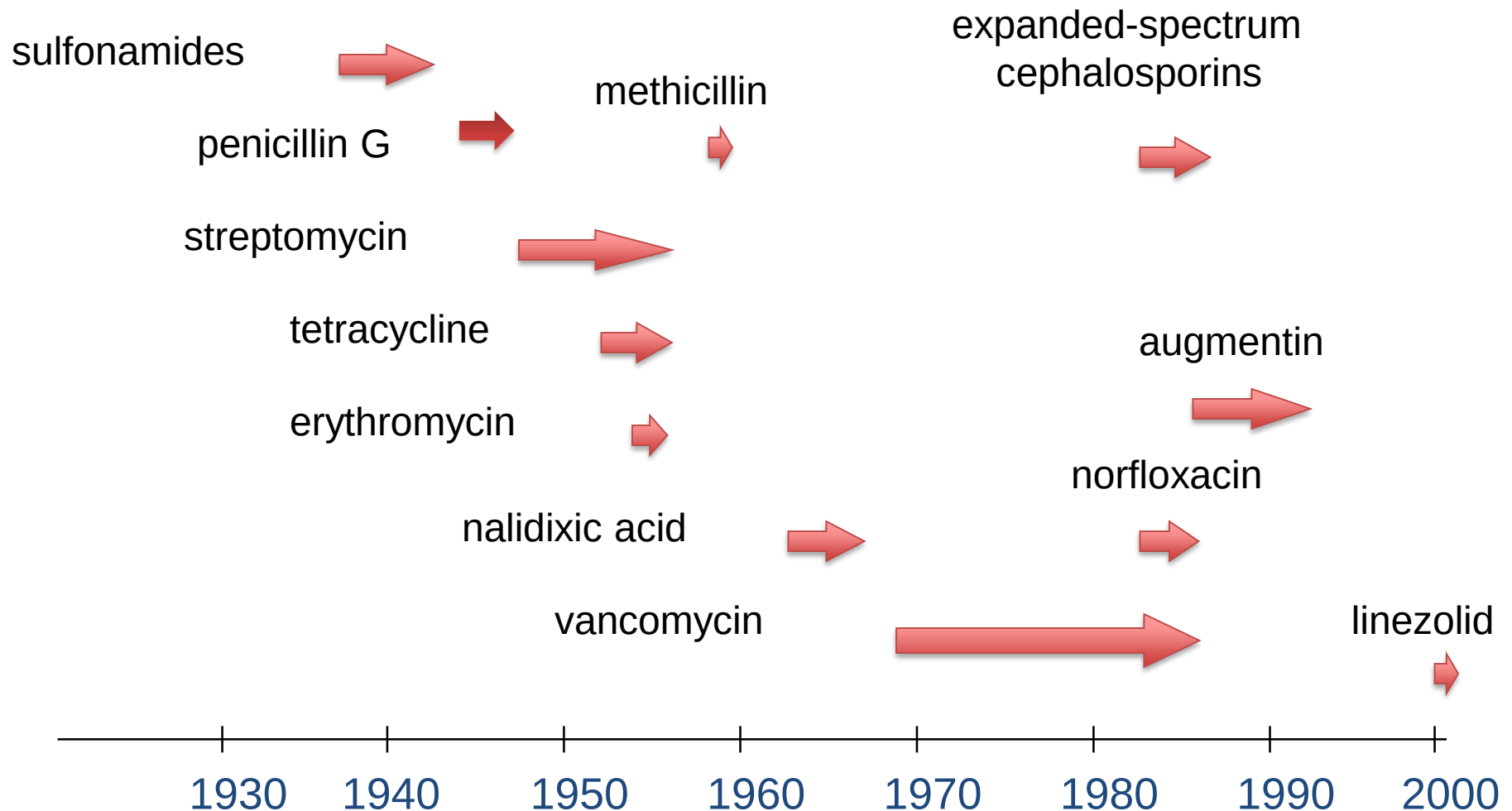
One health concept: vision écosystémique des pathogènes mais aussi des bactéries antibio-résistantes



Résistome du sol

- 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

La résistance aux antibiotiques apparaît rapidement après le début de leur utilisation



Conséquences de la résistance aux antibiotiques

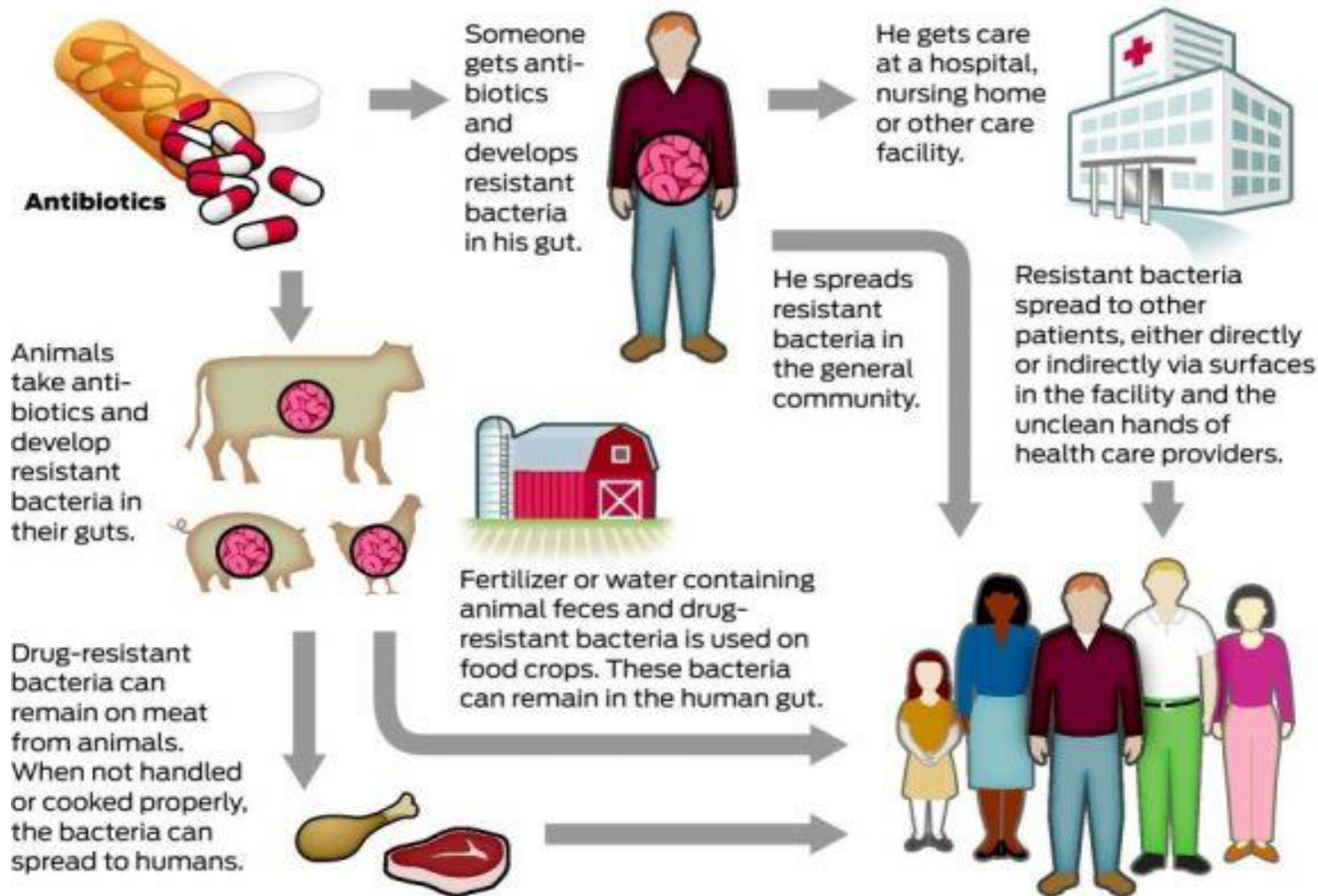
- Coût pour la santé
- Mortalité et morbidité : > 30 000 décès et > 600 000 contaminations pour l'UE en 2015
- Réduction de l'utilité des antibiotiques
- OMS : retour à l'âge pré-antibiotiques ?
 - Dégradation de la santé
 - Des actes médicaux et chirurgicaux de routine remis en cause.

Plan de l'exposé

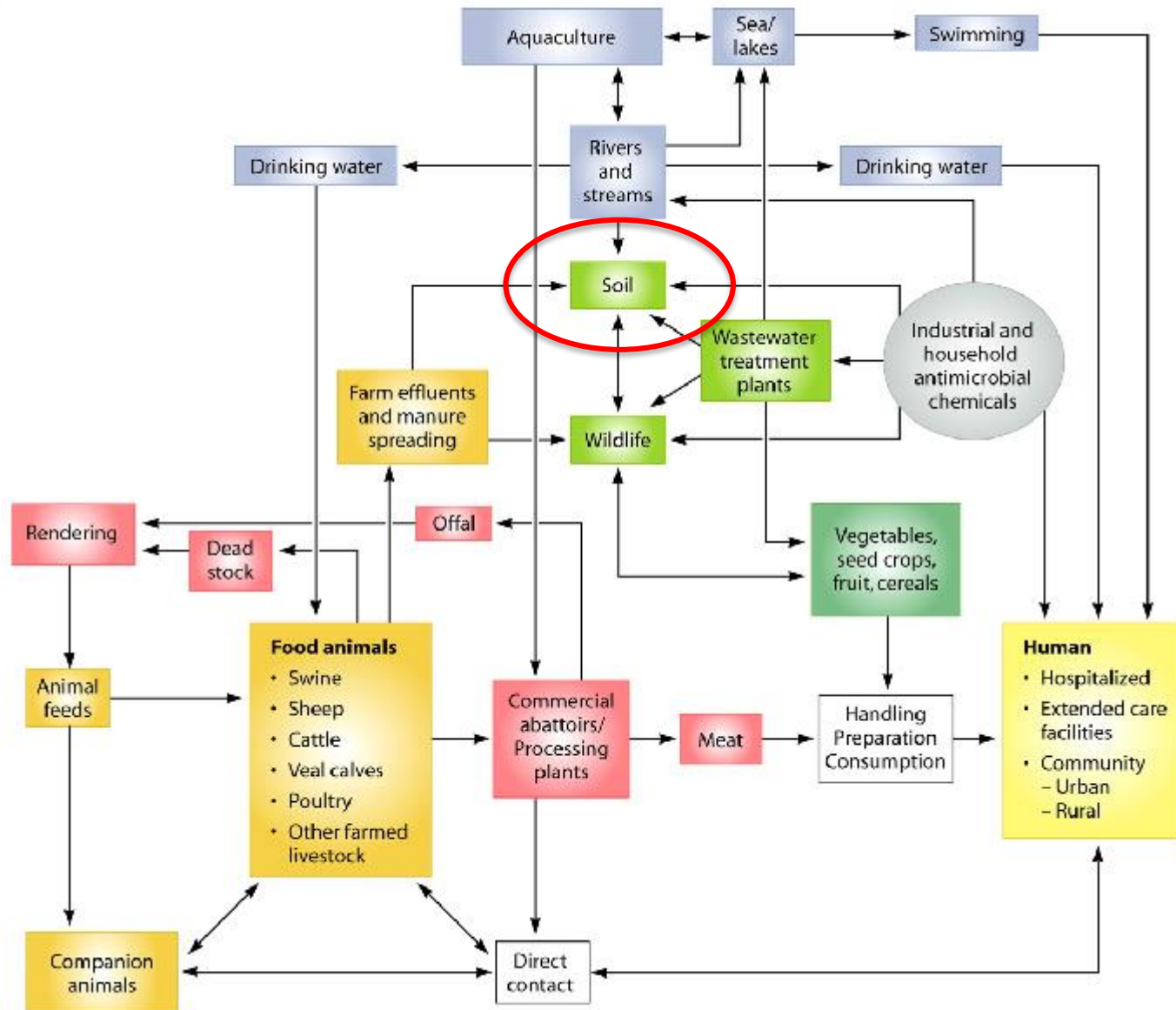
- **Introduction:** One Health concept, microorganismes du sol et résistome des sols
- **Sources de contamination** des sols par des bactéries résistantes ou des gènes de résistance
- **Survie des bactéries résistantes dans les sols** et transferts horizontaux de gènes de résistance
- **Impact de la contamination** des sols sur la sécurité sanitaire des aliments

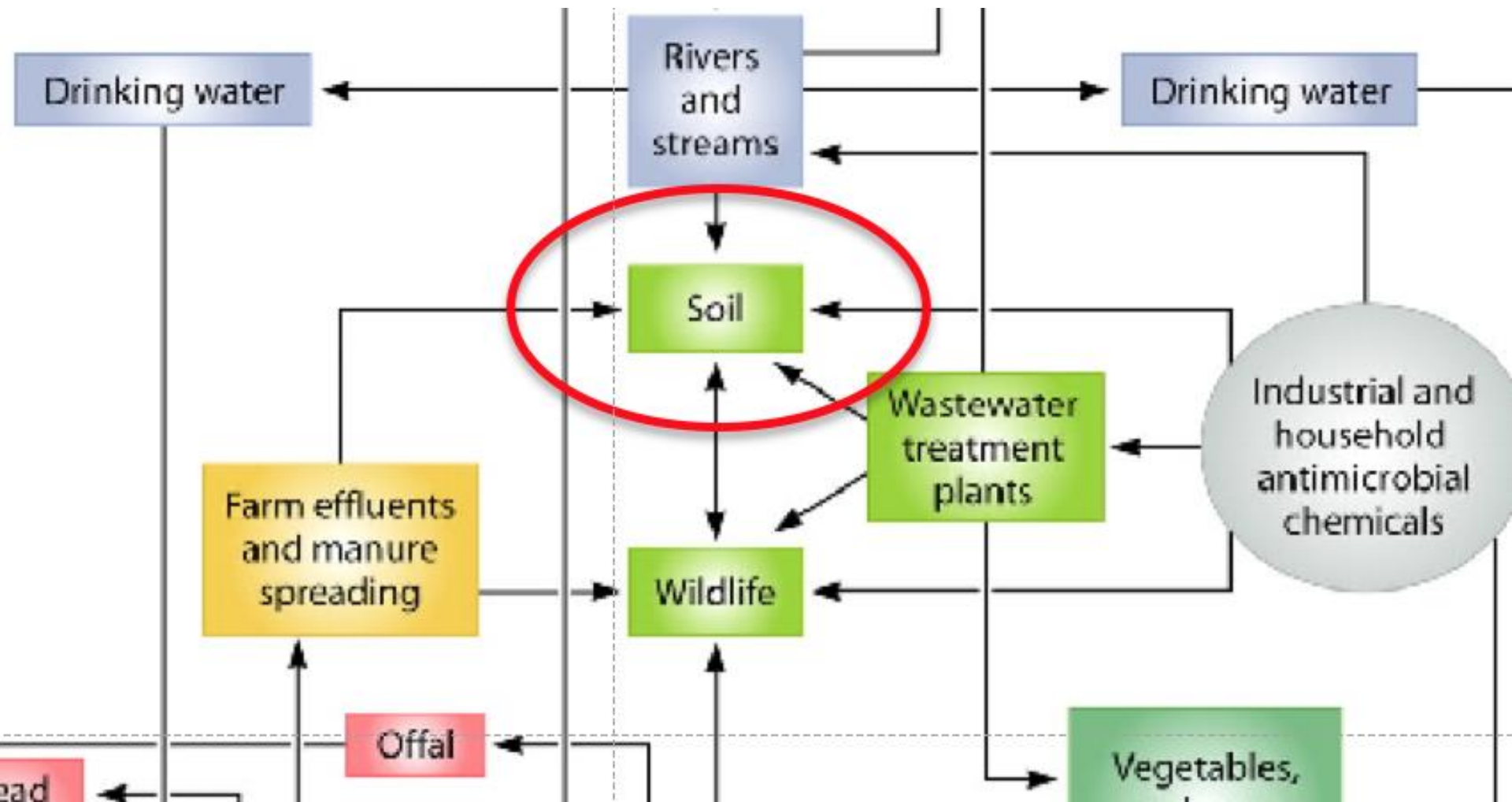
Quelles sont les sources de contamination de l'Homme par les bactéries résistantes ? One Health Framework

How antibiotic resistance spreads



Dissemination routes for AMR and pathogenic bacteria in ecosystems





Le recyclage des produits organiques résiduels 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



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 août 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:



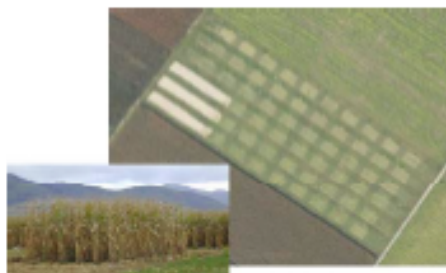
- Des microorganismes dont des **Bactéries résistantes aux antibiotiques**.
- Des résidus médicamenteux dont des **antibiotiques**.
- Quel risque pour la transmission de l'**antibiorésistance** vers l'Homme ?

Plan de l'exposé

- **Introduction:** One Health concept, microorganismes du sol et résistome des sols
- **Sources de contamination** des sols par des bactéries résistantes ou des gènes de résistance
- **Survie des bactéries résistantes dans les sols et transferts horizontaux de gènes de résistance**
- **Impact de la contamination** des sols sur la sécurité sanitaire des aliments

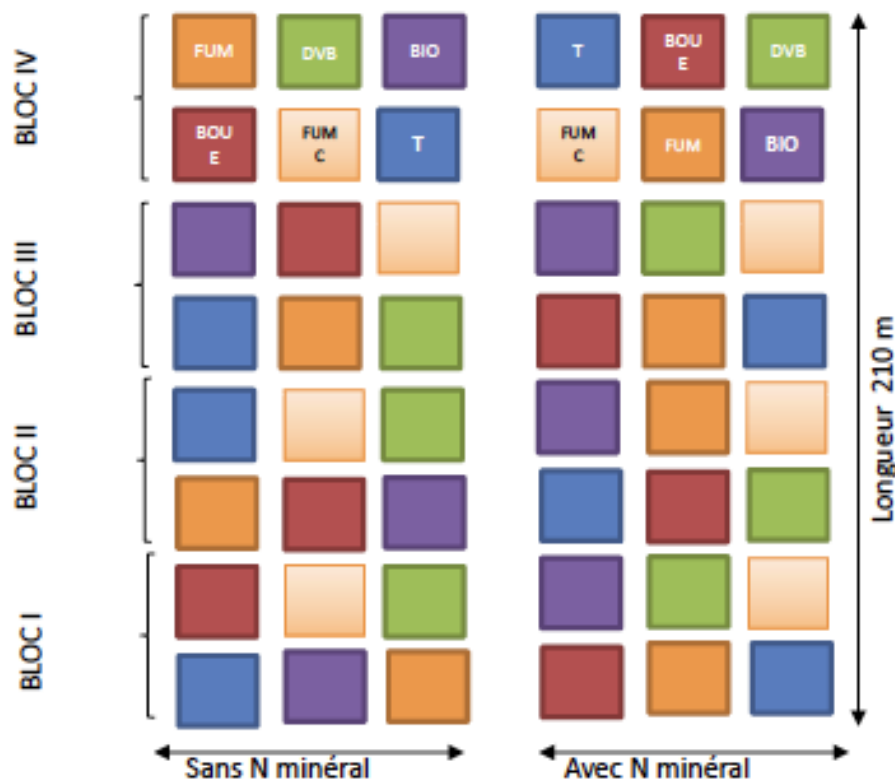
SOERE PRO : Essais agronomiques de longue durée. Programme ECOSOM

Theme 2 : organic matter management

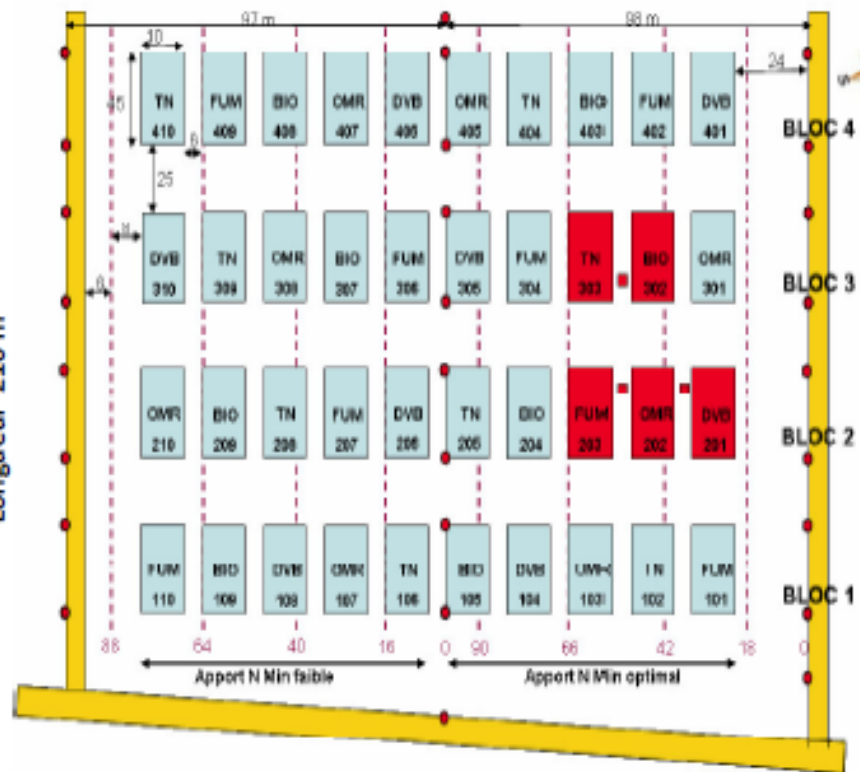


French sites: Qualiagro (Feucherolles) & Colmar

Colmar

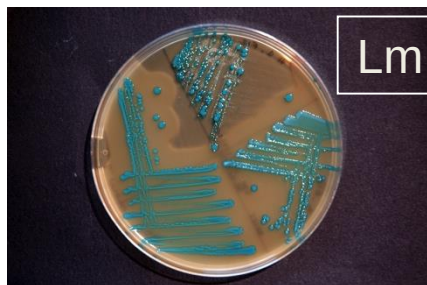


Feucherolles (Qualiagro)

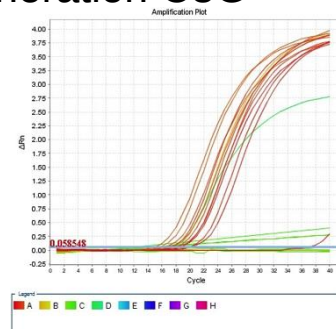


Prévalence d'indicateurs de contamination fécale et de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les PRO et les sols, avant et après amendement

Cibles: FIB indicateurs de contamination fécale (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*), pathogène : *Listeria monocytogenes*, bactéries résistantes extended spectrum beta lactamases ***E. coli* productrices de BLSE (beta lactamase à spectre étendu)** gene de résistance gene ***bla*_{CTX-M}** . Résistance aux céphalosporines de 3ème génération C3G



Méthodes culturales
et moléculaires



Localisation ? Trois sites, **11 amendements organiques différents** (d'origine agricole ou urbaine)
prélèvements de sol avant et 15 jours à un mois après amendement



Résultats

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

Bactéries résistantes : Des *E. coli* productrices d'ESBL et les gènes $bla_{\text{CTX-M}}$ 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 $bla_{\text{CTX-M}}$, 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



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

Alain Hartmann^{1,2*}, Aude Locatelli¹, Lucie Amoureux³, Géraldine Depret^{1,2}, Claudy Jolivet⁴, Eric Gueneau⁵ and Catherine Neuwirth³

¹ INRA, UMR Microbiologie des Sols et de l'Environnement (MSE), The Institut National de la Recherche Agronomique, Dijon, France

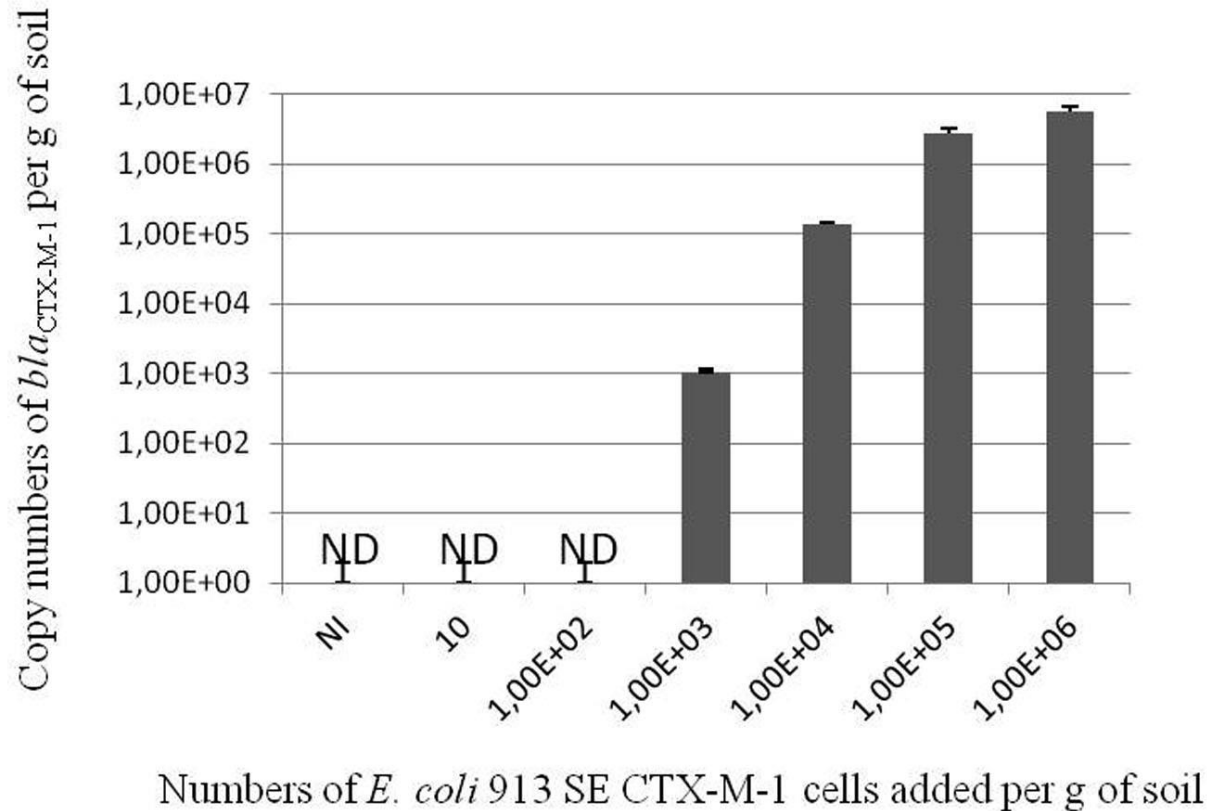
² Université de Bourgogne, Dijon, France

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

Détection moléculaire dans le sol d'un indicateur *E. coli* BLSE (détection bla_{CTX-M})



Résultats

- 271 échantillons fécaux de bovins (sains pour la majorité) analysés, 13 contiennent des ESBL-producing *E. coli*
- 5 isolats portent le gène TEM-71-ESBL
- 8 isolats portent le gène CTX-M-1 ESBL.
- Collecte d'échantillons environnementaux dans deux fermes

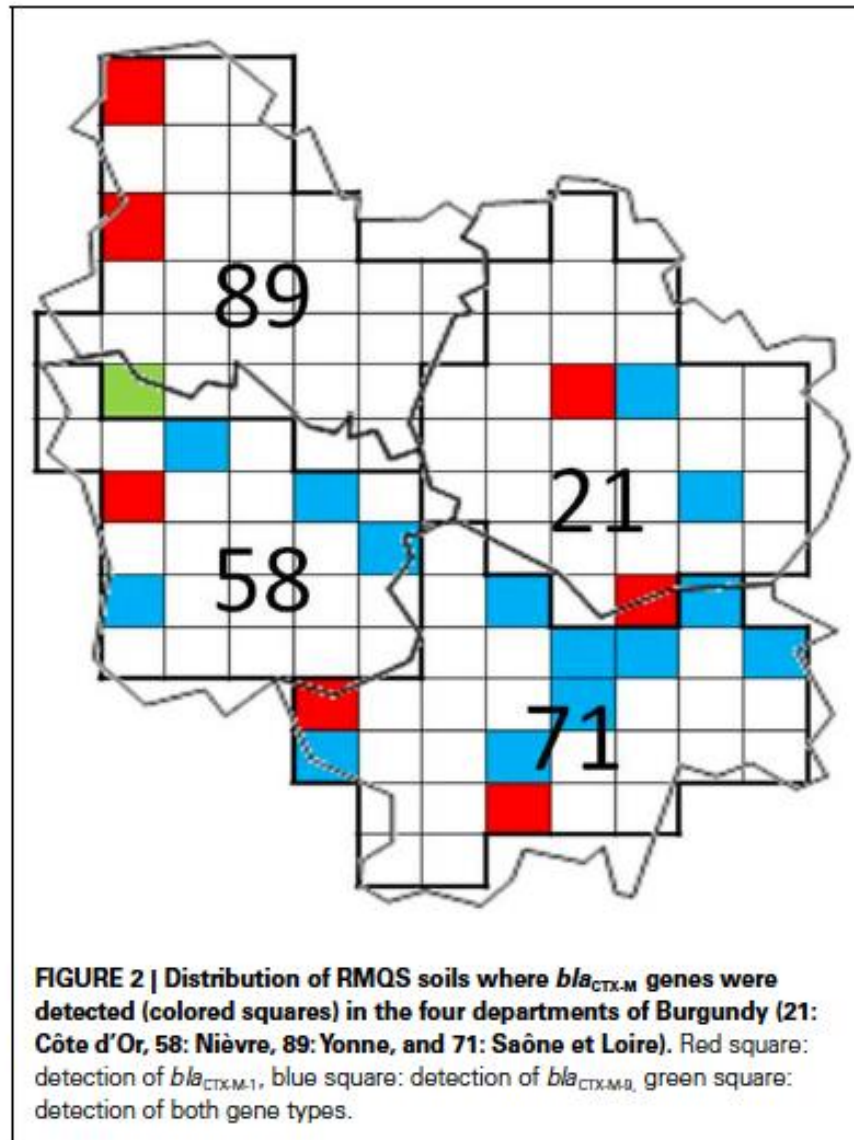
Table 2 | Characteristics of the *E. coli* strains isolated from animals, manure and soils.

Strain designation^a, farm number/department/ isolate number	Origin^b	Type of ESBL	Rep-PCR genotype (Diversilab)	Associated non-beta- antibiotic resistance^c
F1/SL/250	Animal EDC	CTX-M-1	E	CIP-G
F2/CO/234	Animal H	CTX-M-1	A	SXT
F2/CO/235	Animal H	CTX-M-1	A	SXT
F2/CO/RET12	Cultivated soil	CTX-M-1	A	SXT
F2/CO/RET15	Cultivated soil	CTX-M-1	A	SXT
F2/CO/RET20	Cultivated soil	CTX-M-1	A	SXT
F2/CO/RET21	Cultivated soil	CTX-M-1	A	SXT
F2/CO/V9 (2010)	Animal H	CTX-M-1	F	SXT
F2/CO/V71 (2010)	Animal H	CTX-M-1	G	SXT
F3/CO/241	Animal H	CTX-M-1	B	SXT
F3/CO/RET23	Pasture soil	CTX-M-1	H	CIP-Cm-SXT
F3/CO/RET24	Pasture soil	CTX-M-1	B	SXT
F3/CO/RET25	Pasture soil	CTX-M-1	B	SXT
F3/CO/RET26	Pasture soil	CTX-M-1	B	SXT
F3/CO/RET27	Composted manure	CTX-M-1	B	SXT
F3/CO/RET28	Composted manure	CTX-M-1	B	SXT
F3/CO/RET29	Pasture soil	CTX-M-1	B	Cm-SXT
F4/N/32	Animal HLEDC	TEM-71	C	CIP-G-Cm-SXT
F5/N/87	Animal H	CTX-M-1	I	CIP-G-Cm-SXT
F6/N/92	Animal EDC	TEM-71	C	CIP-G-Cm-SXT
F7/N/101	Animal HLEDC	TEM-71	C	CIP-G-Cm-SXT
F8/N/105	Animal H	TEM-71	J	CIP-G-Cm-SXT
F9/N/107	Animal H	TEM-71	C	CIP-G-Cm-SXT
F10/SL/190	Animal EDC	CTX-M-1	K	CIP-Cm-SXT

Conclusions

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

Détection bla_{CTX-M} dans les sols de Bourgogne



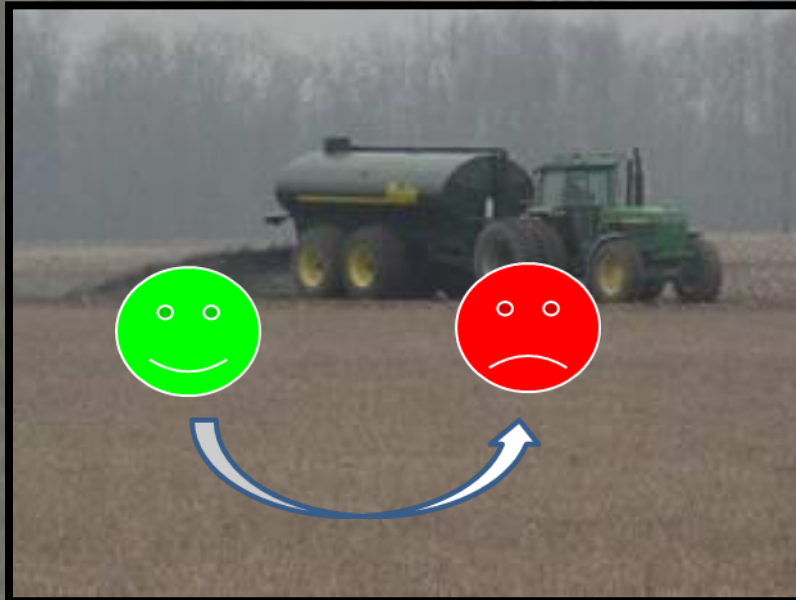
Plan de l'exposé

- **Introduction:** One Health concept, microorganismes du sol et résistome des sols
- **Sources de contamination** des sols par des bactéries résistantes ou des gènes de résistance
- **Survie des bactéries résistantes dans les sols** et transferts horizontaux de gènes de résistance
- **Impact de la contamination des sols sur 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 réservoir de gènes de résistance dans les sols ou affecter leur fertilité

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



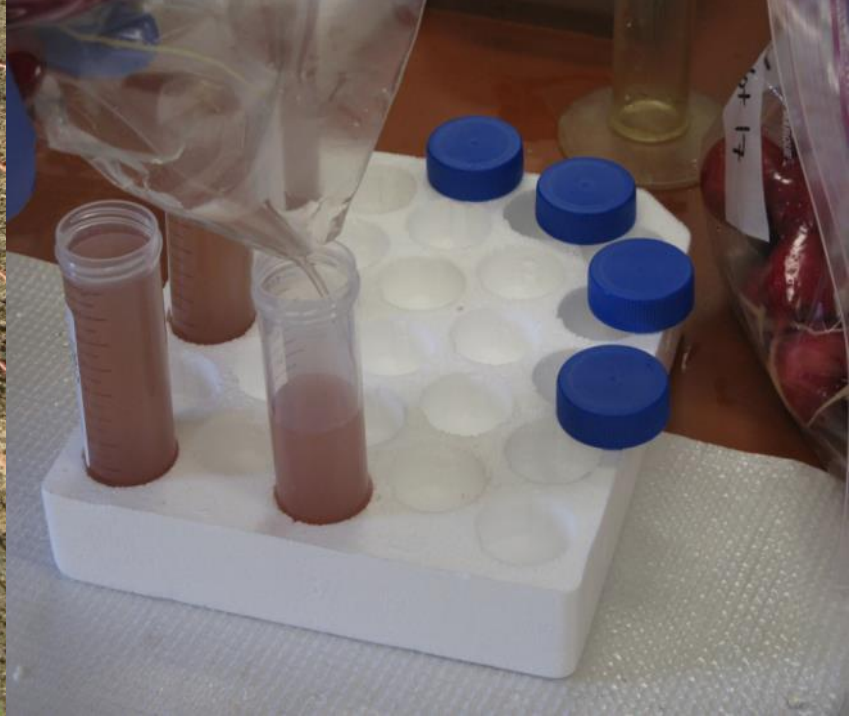
Différents types de PRO.

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

Experimentations entreprises à la ferme expérimentale de AAFC LRDC



lisier de bovin

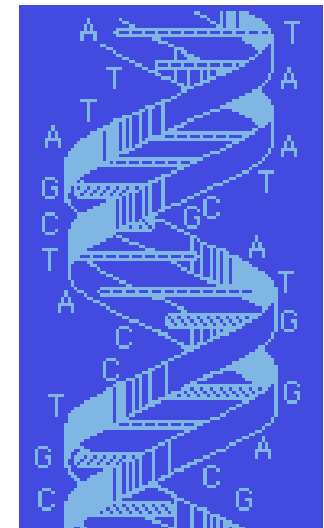


Culture [in]dependent analysis of populations

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}
^aAgriculture and Agri-Food Canada, London, Ontario, Canada^a; ^bDepartment 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}
^aAgriculture and Agri-Food Canada, London, Ontario, Canada^a; ^bDepartment of Biology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada^b

Prétraitements du lisier bovin pour diminuer la prévalence des souches résistantes aux antibiotiques



Farm 1



Farm 2



Lisier brut



Deshydratation



Digestion anaérobie



Compostage

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

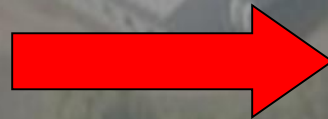
^d University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

Impact des antibiotiques sur les microorganismes du sol

Durée de la persistance des antibiotiques?

Est ce que l'exposition à long terme aux antibiotiques:

- favorise la résistance des bactéries du sol?
- impacte la biodiversité du microbiome des sols?
- impacte des microbes qui catalyse des services écosystémiques clés?





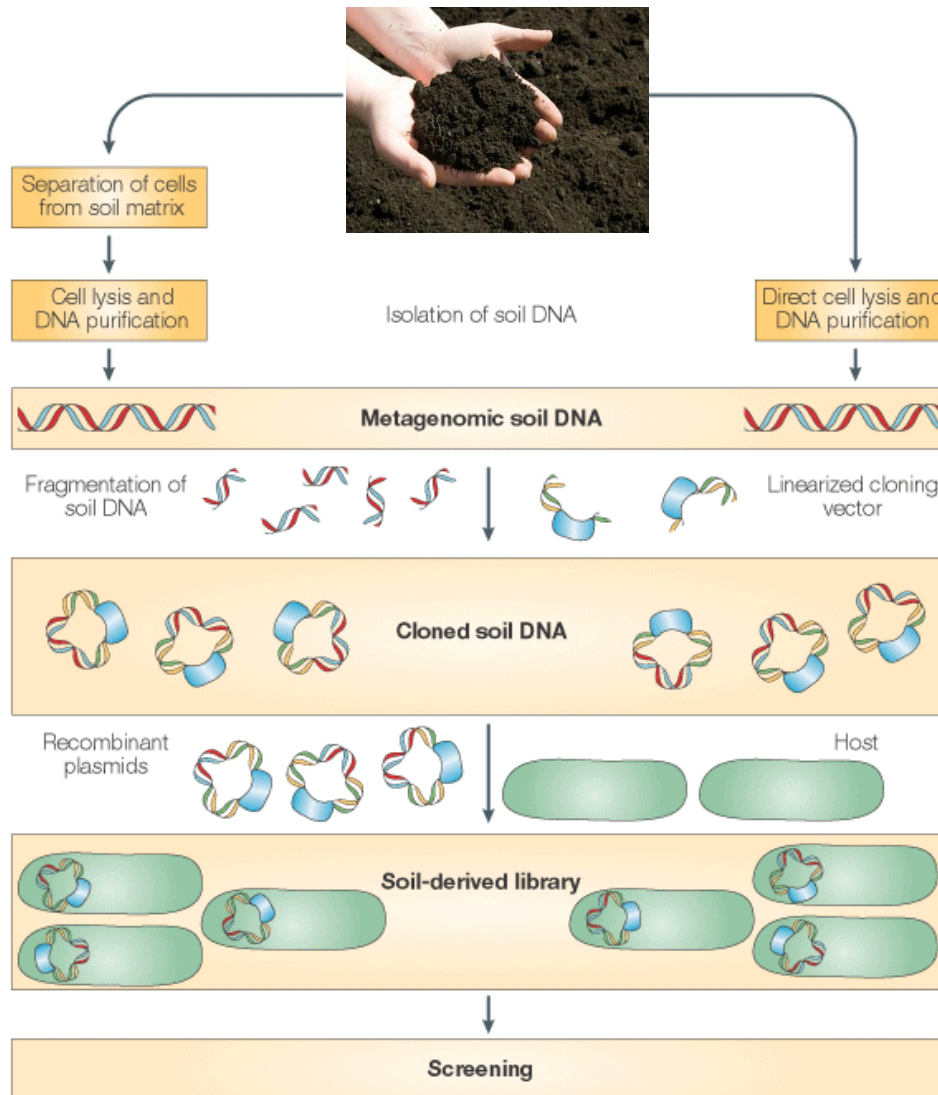
Essai agronomique de longue durée sur petites placettes AAFC London Farm Expt '99, Expt 2010

Micro-parcelles répétées
Application annuelle au printemps de différents
mélanges d'antibiotiques ou médicaments
depuis 1999, 2017 season number 19
depuis 2010, 2017 season number 8

Treatments [0.1 and 10 mg/kg soil]

- Sulfamethazine + tylosin + chlortetracycline [1999]
- Erythromycin + clarithromycin + azithromycin [2010]
- Ciprofloxacin + norfloxacin
- Ceftiofur + cefotaxime + cefalexin
- Lincomycin, spectinomycin
- Coccidiostats: roxarzone + amprolium
- Antivirals: tenofovir + tamiflu + acyclovir
- Antifungals: miconazole, clotrimazole
- Anticancer: prednisone + cytarabine + 5-fluorouracil + capecitabine
- BDDA + BDTA [2014]

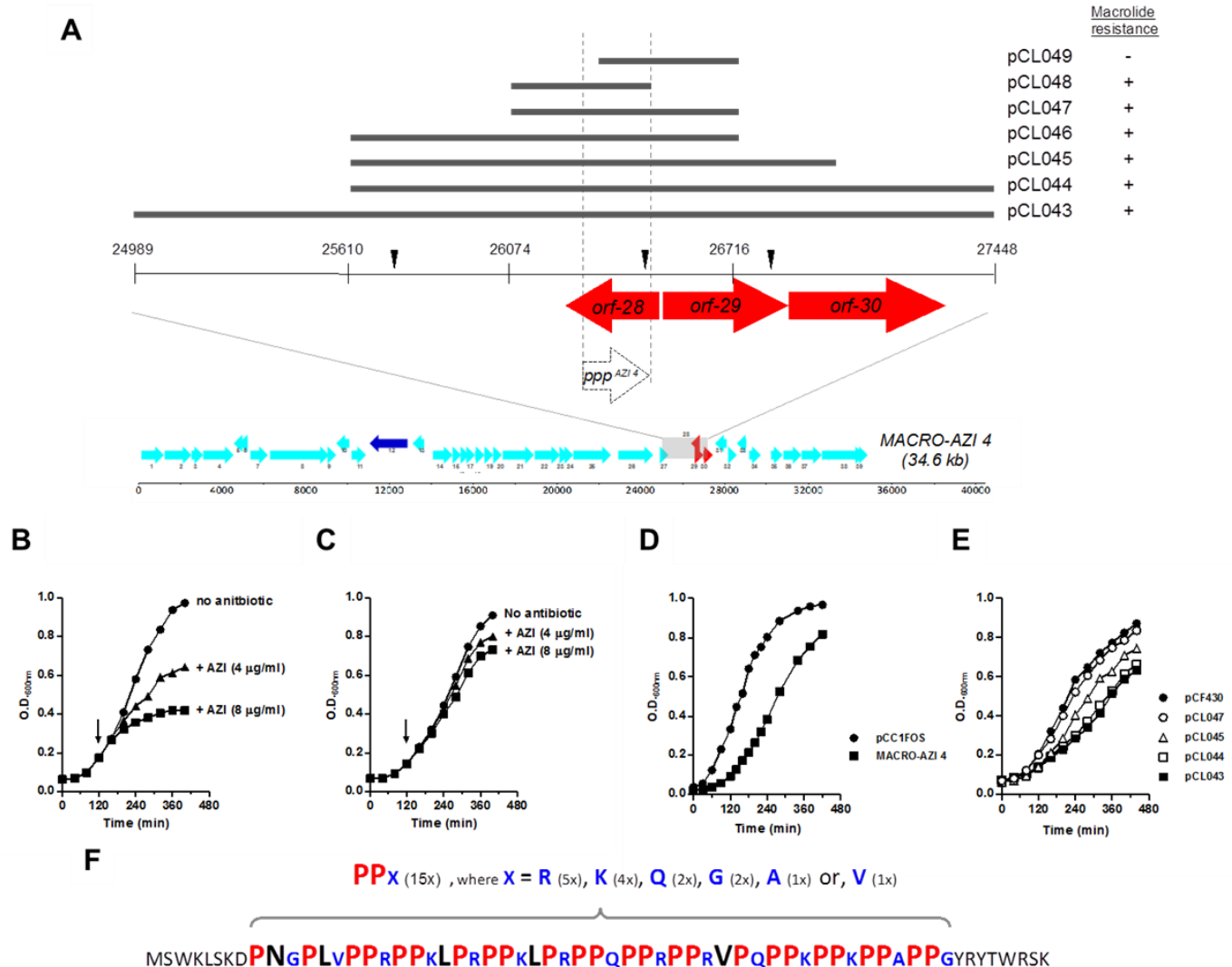
Approche de métagénomique fonctionnelle pour explorer l'ADN du sol et les gènes présents



Découverte de gènes nouveaux par leur fonction: résistance aux antibiotiques

Cloned gene target	Plots from which DNA obtained	Confers resistance to:
MEM-B2_MBL	MACRO treated	β -lactams
SMZB27_folP*	Untreated	Sulfonamides
1999-SMZ28_sul2	SCT treated	Sulfonamides
TET-A6_PBP*	MACRO treated	Cephalosporins
K1_apH	Untreated	Aminoglycosides
SCT_kan4_aac6'	SCT treated	Aminoglycosides
TET7_MFS	SCT treated	Tetracyclines
TET23_emrB	SCT treated	Tetracyclines, macrolides
TETA7_ABC	SCT treated	Tetracyclines, macrolides
TETB7_MATE	MACRO treated	Tetracyclines, macrolides
TYL10_HflX	MACRO treated	Macrolides
AZ14_ppp	MACRO treated	Macrolides

Structure of the protein elucidated



Il y a dans les sols des gènes cryptiques de résistance aux antibiotiques qui pourraient apparaître chez des pathogènes humains (transfert horizontal de gènes).
‘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

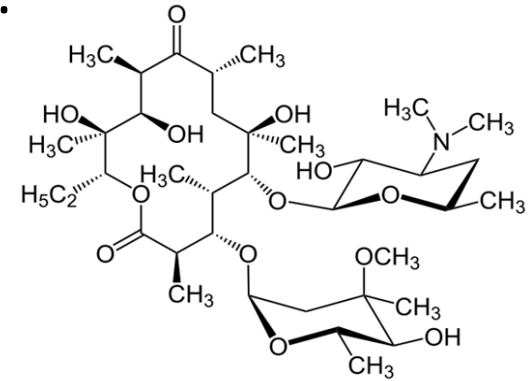
CTX-M ESBL

Kluyvera



Enterobactéries
pathogènes

nismes évoluent en réponse à la pression
antibiotique dans les sols.



Science of the Total Environment 562 (2016) 136–144



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

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



Reduced persistence of the macrolide antibiotics erythromycin, clarithromycin and azithromycin in agricultural soil following several years of exposure in the field

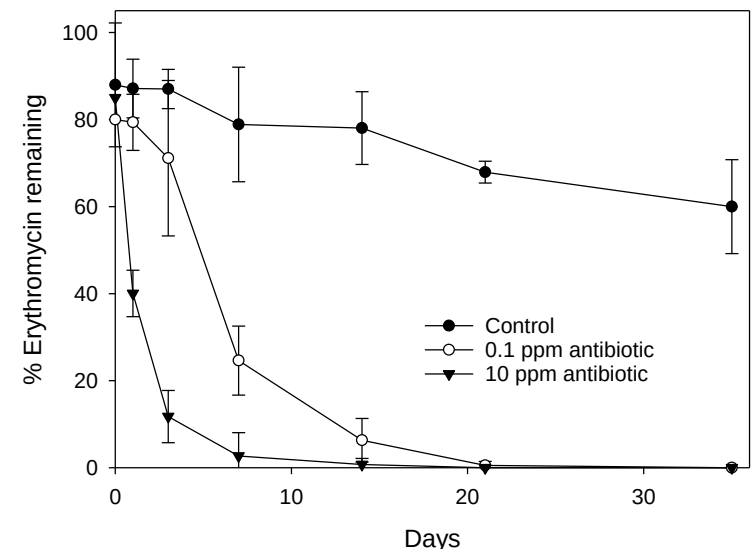
Edward Topp *, Justin Renaud, Mark Sumarah, Lyne Sabourin

Agriculture and Agri-Food Canada, London, ON N5V 4T3, Canada



Dégradation accélérée de plusieurs antibiotiques dans les sols après des applications répétées des molécules

Érythromycine, sulfaméthazine



L'exposition aux antibiotiques change la composition et la structure du microbiome des sols et augmente la prevalence des intégrons de classe 1



FEMS Microbiology Ecology, 92, 2016, fiw159

doi: [10.1093/femsec/fiw159](https://doi.org/10.1093/femsec/fiw159)

Advance Access Publication Date: 5 August 2016

Research Article

RESEARCH ARTICLE

Long-term antibiotic exposure in soil is associated with changes in microbial community structure and prevalence of class 1 integrons

David W. Cleary^{1,2,*}, Alistair H. Bishop³, Lihong Zhang⁴, Edward Topp⁵, Elizabeth M. H. Wellington⁶ and William H. Gaze⁴

¹Academic Unit of Clinical and Experimental Sciences, Faculty of Medicine, University of Southampton, Southampton SO16 6YD, UK, ²Institute for Life Sciences, Faculty of Natural and Environmental Sciences, University of Southampton SO17 1BJ, UK, ³Defence Science Technology Laboratory, Porton Down, Salisbury SP4 0JQ, UK, ⁴European Centre for Environment and Human Health, University of Exeter Medical School, Knowledge Spa, Royal Cornwall Hospital, Truro TR1 3HD, UK, ⁵Southern Crop Protection and Food Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Ontario CV4 7AL, Canada and ⁶School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, UK

A retenir (1)

- L'application de PRO sur les sols peut s'accompagner d'une survie des bactéries résistantes dans les sols
- Les cultures produites sur des sols amendés par des PRO peuvent porter des 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 impacte le microbiome des sols en modifiant sa structure.
- Certaines bactéries peuvent évoluer pour dégrader rapidement les antibiotiques.
- Beaucoup de travail reste à faire. La dissémination fulgurante des E. coli ESBL doit être mieux comprise pour éviter que le phénomène se reproduise pour d'autres résistances

Fronts de science à développer

- Poursuivre l'étude de la dissémination environnementale de l'antibiorésistance (données encore très lacunaires dans les sols). Transferts sol > eau
- Indicateurs de dissémination : ESBL *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

