

# Caractérisation et élimination des bactéries antibio-résistantes dans les effluents urbains.

17 Mars 2016

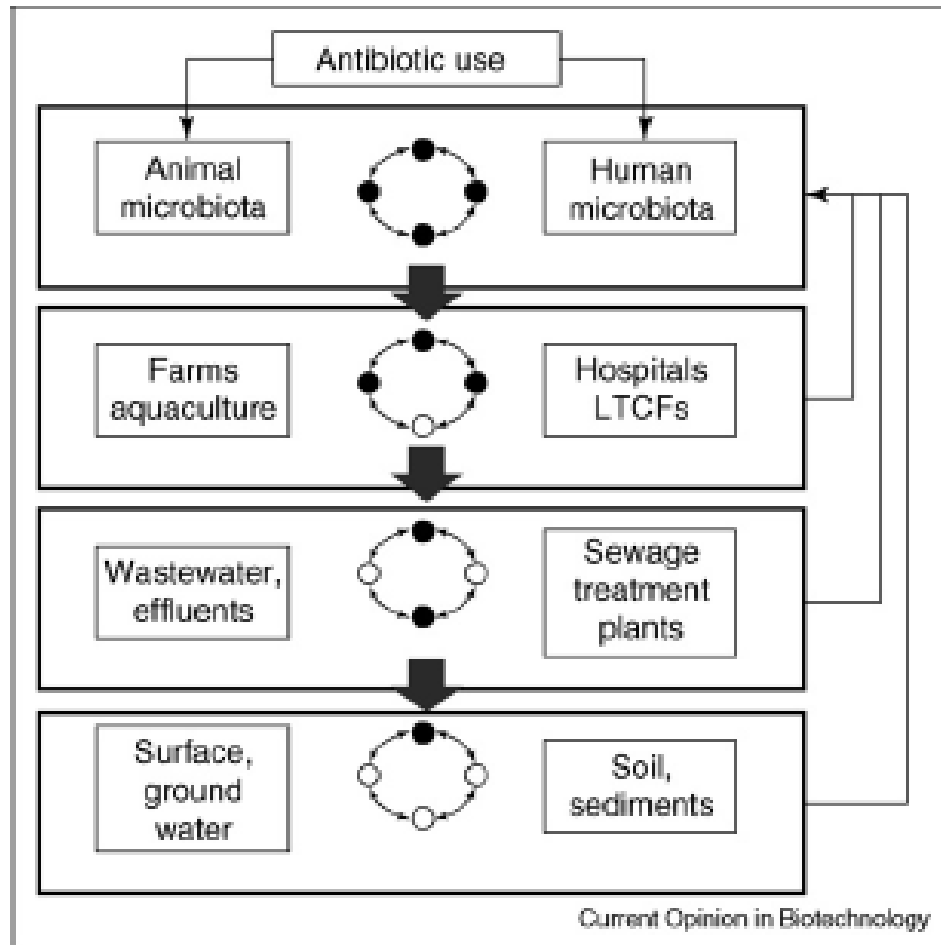
Colloque Adebiotech

Sophie COURTOIS, Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement

ready for the resource revolution



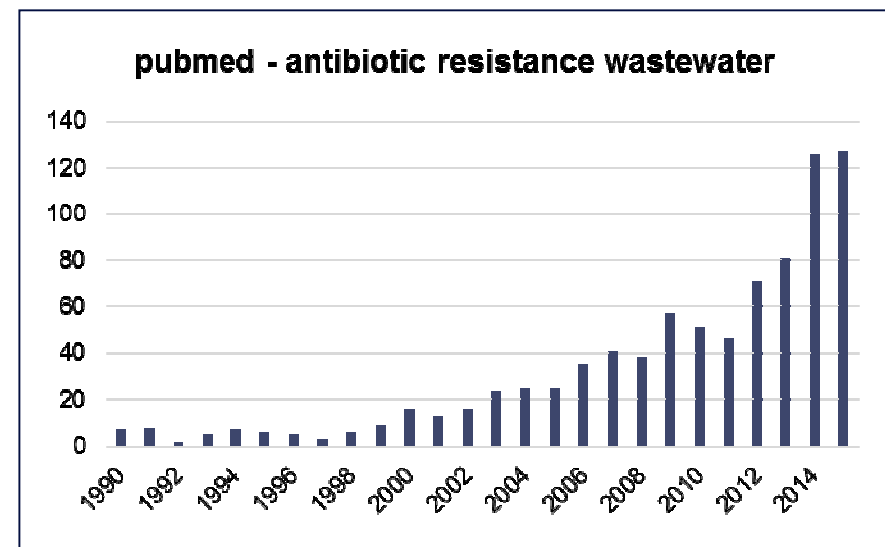
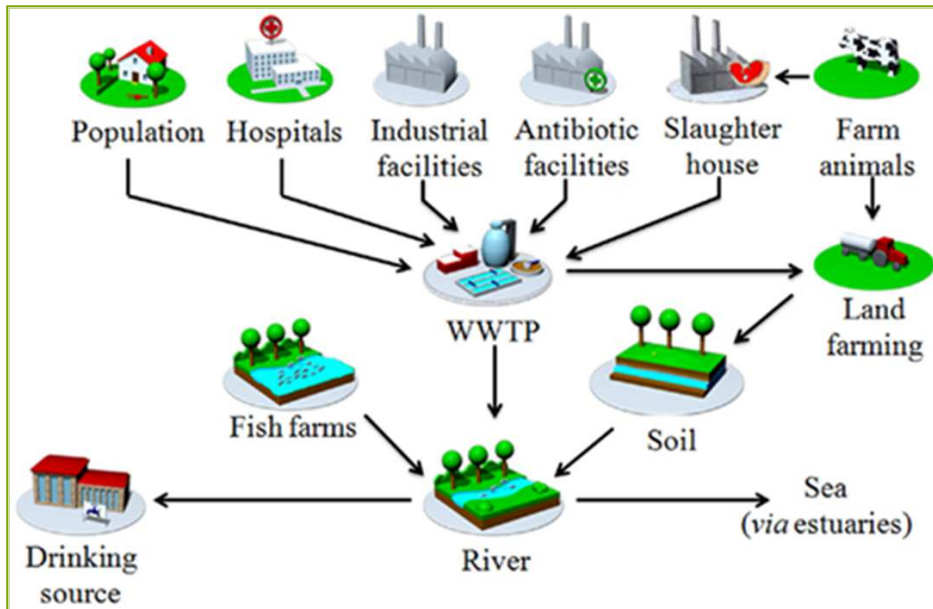
# Les compartiments de la résistance aux antibiotiques



Environnements aquatiques et terrestres: **récepteurs, réservoirs, et sources** des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG)

*Baquero et al., COB, 2008*

# La station d'épuration: une barrière clé avant dissemination dans l'environnement



# Surveillance des résistances aux antibiotiques dans les STEPs

## Etudes de cas dans la littérature

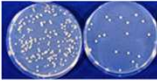
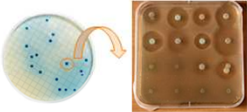
**Table 1**  
Antibiotic resistance of microbial community in WWTPs. Bouki et al. (*Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013)

ARB	Environmental source	Effect	Reference
Population of <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Aeromonas</i> spp.	Discharges of WWTP in the Arga River in Spain	Resistance against 21 out of the 22 antibiotics tested	Goni-Urriza et al. (2000)
<i>Escherichia coli</i> and coliform group bacteria tetracycline resistant	Downstream of a WWTP in Japan	The percentages of antibiotic resistance in the wastewater effluent were higher than the percentages in the river water	Iwane et al. (2001)
Vancomycin-resistant enterococci and <i>b</i> -lactam-hydrolyzing <i>Enterobacteriaceae</i>	Biofilms from hospital and municipal wastewater, river water and drinking water in Germany	Enterococci and <i>Enterobacteriaceae</i> were found in all biofilms except those in drinking water	Schwartz et al. (2003)
Resistant bacteria (e.g., <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Pseudomonades</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> ) against <i>b</i> -lactams, quinolones, tetracycline and sulfamathoxazole, trimethoprim and other sulphonamides	WWTP and sewage sludge all over the world	Antibiotic resistance on microbial community in WWTPs provides evidence suggest that WWTP are reservoirs for diverse mobile antibiotic resistance elements	Kümmerer (2004) and Schluter et al. (2007b)
Tetracycline antibiotic-resistant bacteria	Biological WWTP process	Increase in organic loading and growth rate, indicating that the fate of antibiotic-resistant bacteria in a biological wastewater treatment system is affected significantly by changes in operating conditions	Kim et al. (2006a)
<i>b</i> -lactams, quinolones, tetracycline and other sulphonamide resistant bacteria	WWTP	Resistant and multi-resistant bacteria are present in municipal sewage	Kümmerer (2009a, 2009b)
Tetracycline and sulfonamide resistant bacteria	Raw sewage of five WWTPs in Michigan	High level of resistance was found even in the final effluent from WWTPs	Munir et al. (2010)

**Effluent bacterial composition depends on biological process, hydraulic residence time, bacterial removal rates, and inflow volume.** Novo & Manaia, 2010. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:1157–1166.

Disparité des méthodes et des résultats obtenus

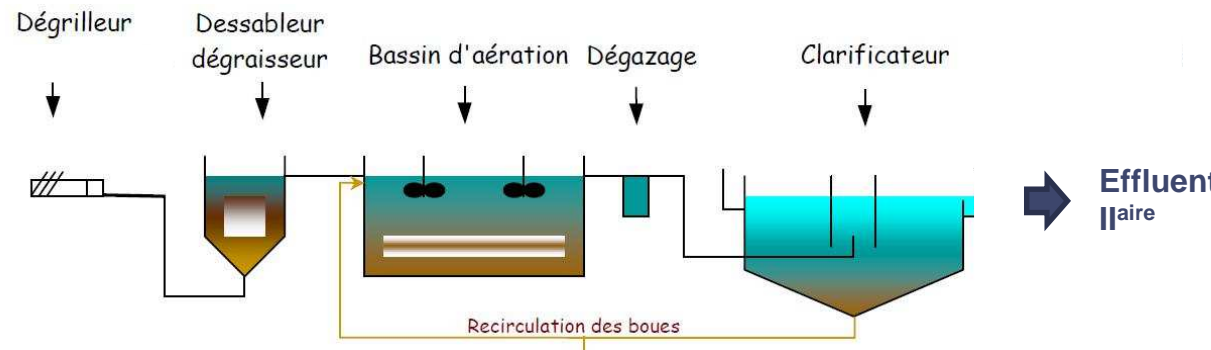
# Quelle(s) approche(s) analytique(s) privilégier ???

Approche	Methode	Principe	Avantages	Inconvénients	Commentaire
CULTURE	Quantification de l'antibiorésistance parmi : <b>la flore hétérotrophe cultivable</b>	Plate Count Agar (PCA) PCA + antibiotic 	<ul style="list-style-type: none"> <li>Comptage Direct</li> <li>Facile à réaliser</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nombre d'antibiotiques testés</li> <li>Pas d'identification des souches dénombrées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Approche limitée aux bactéries cultivables</li> <li>Le réservoir génétique des gènes de résistance n'est pas évalué</li> <li>Choix des antibiotiques à sélectionner</li> </ul>
	<b>des groupes bactériens :</b> - Coliformes / E. coli - Entérocoques - ...		<ul style="list-style-type: none"> <li>Conservation et identification des souches</li> <li>Nombre d'antibiotiques testés plus grand</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nécessite d'isoler un grand nombre de souches (&gt;100)</li> </ul>	
MOLECULAIRE	<b>Suivi des gènes de résistance aux antibiotiques par PCR quantitative</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Extraction d'ADN total</li> <li>Quantification du nombre de copies de gènes / échantillon</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Accès au réservoir génétique d'antibiorésistance selon les gènes ciblés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nécessite d'implanter plusieurs tests PCRq selon les antibiotiques Ex : TET = 10 gènes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Etude du réservoir génétique des gènes de résistance</li> <li>Choix des antibiotiques à sélectionner</li> </ul>
	<b>Métagénomique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Extraction d'ADN total</li> <li>Séquençage d'ADN à haut débit</li> <li>Identification des gènes de résistance</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Accès au réservoir génétique d'antibiorésistance et à sa diversité</li> <li>Accès aux éléments mobiles de transfert de gènes et leurs diversités</li> <li>Pas de biais sélection des gènes cibles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pipeline analytique à mettre en place, notamment outils bioinformatiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Accès au réservoir génétique total d'antibiorésistance et des éléments mobiles de transfert</li> </ul>

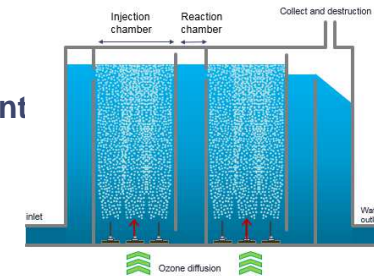
Absence de méthode standard et d'indicateur reconnu

# Traitement secondaire et tertiaire des effluents urbains

## Filière conventionnelle à boue biologique



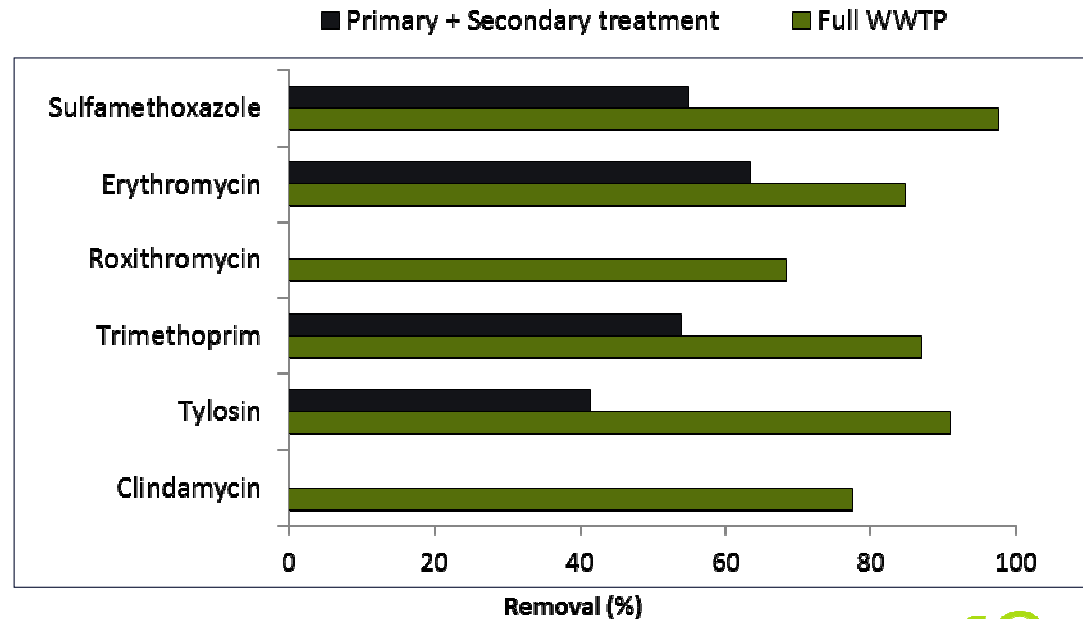
## Traitement III<sup>aire</sup> par ozonation



Exemple d'élimination des antibiotiques:

Traitement secondaire: entre 0 et 60% selon les Ab.

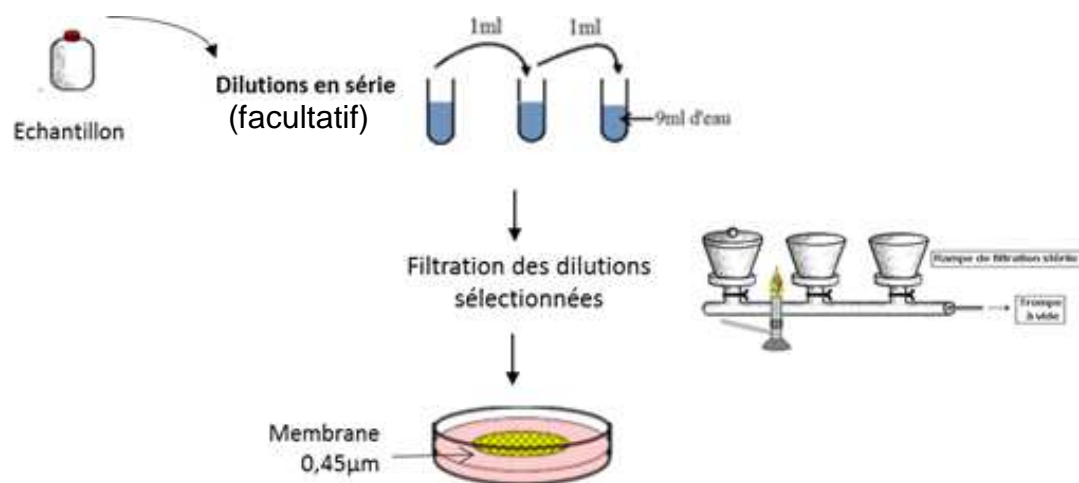
Traitement ozone: >70%



# Quantification des bactéries résistantes dans les effluents urbains

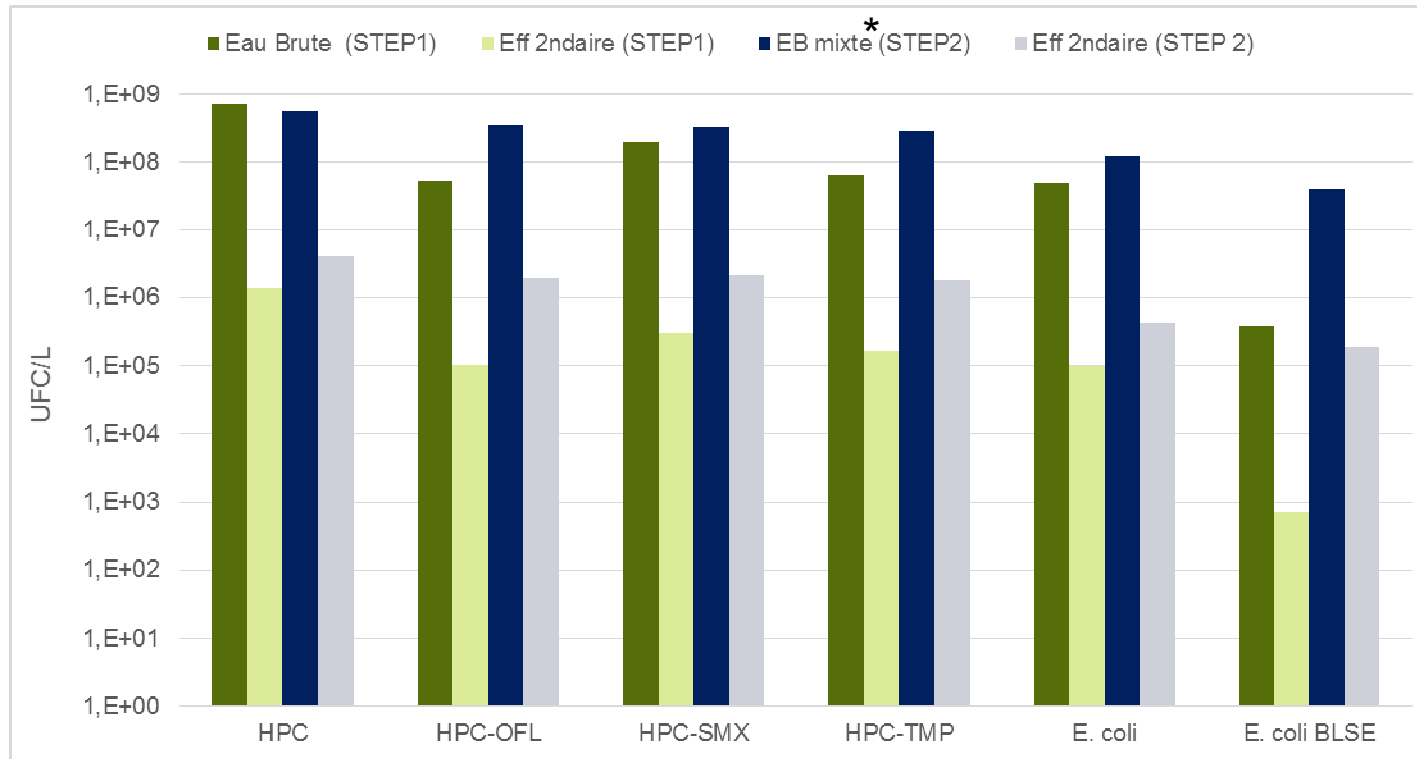
Approche par culture

*Méthodologie proposée par Novo et Manaia (2010): adaptée aux analyses de routine*



- Dénombrement de la flore hétérotrophe cultivable (HPC), résistante au Sulfaméthoxazole (SMX), Ofloxacine (OFL), Triméthoprième (TMP)
- Dénombrement *E. coli* et *E. coli* BLSE

# Quantification et abattement dans les eaux résiduaires brutes et effluents secondaires

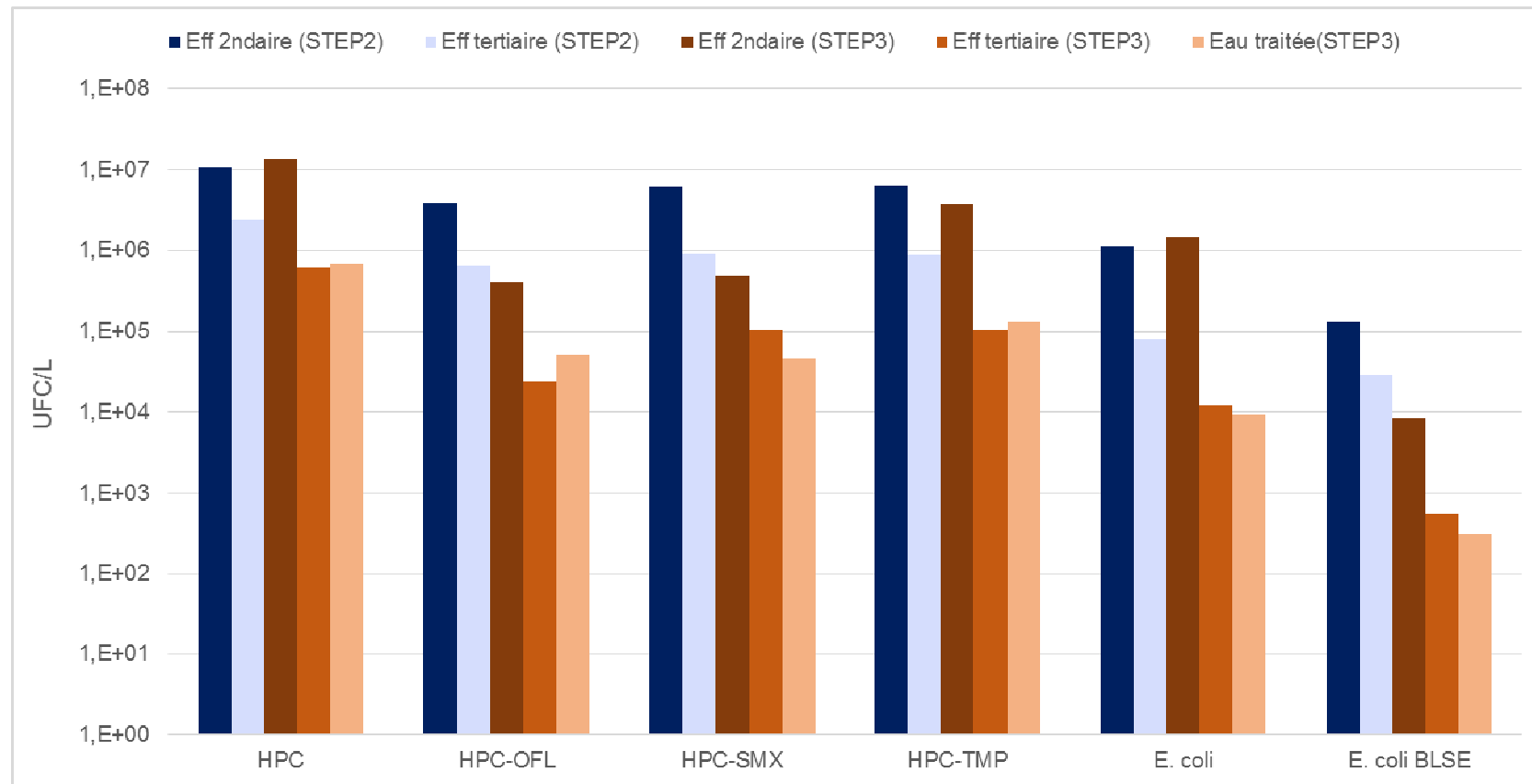


\* effluent mixte : 50/50 vol/vol urbain - hospitalier

- HPC-SMX, -OFL et -TMP, BLSE : [ 1 à 30 %] dans les effluents bruts urbains; [ 30 à 65%] dans les effluents mixtes: impact des effluents hospitaliers
- Abattement: 2.7 log (STEP1) – 2.2 log (STEP 2)

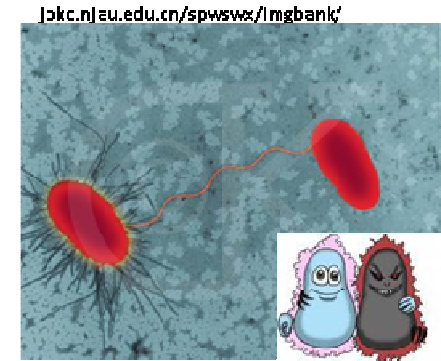
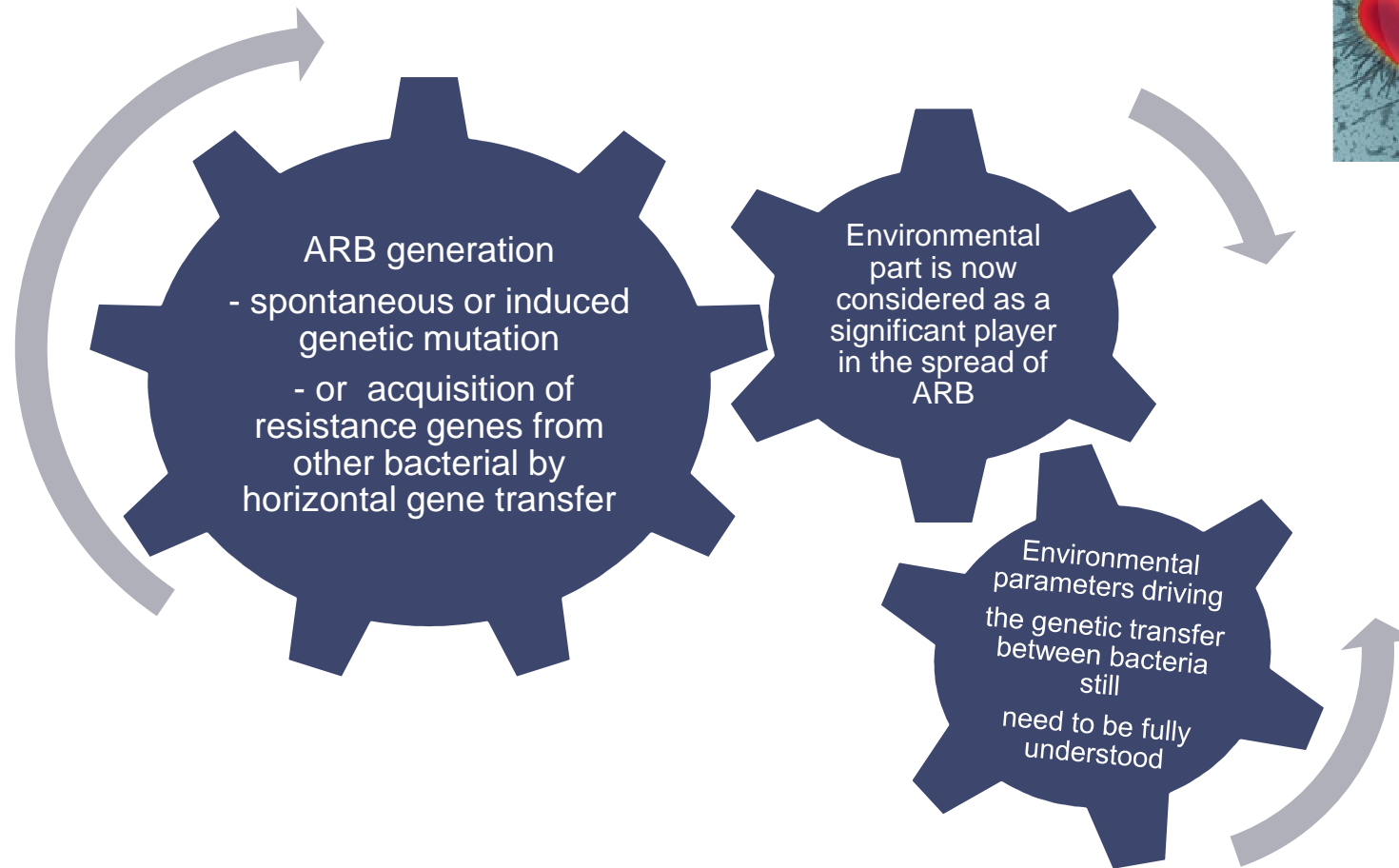


# Efficacité des traitement tertiaires

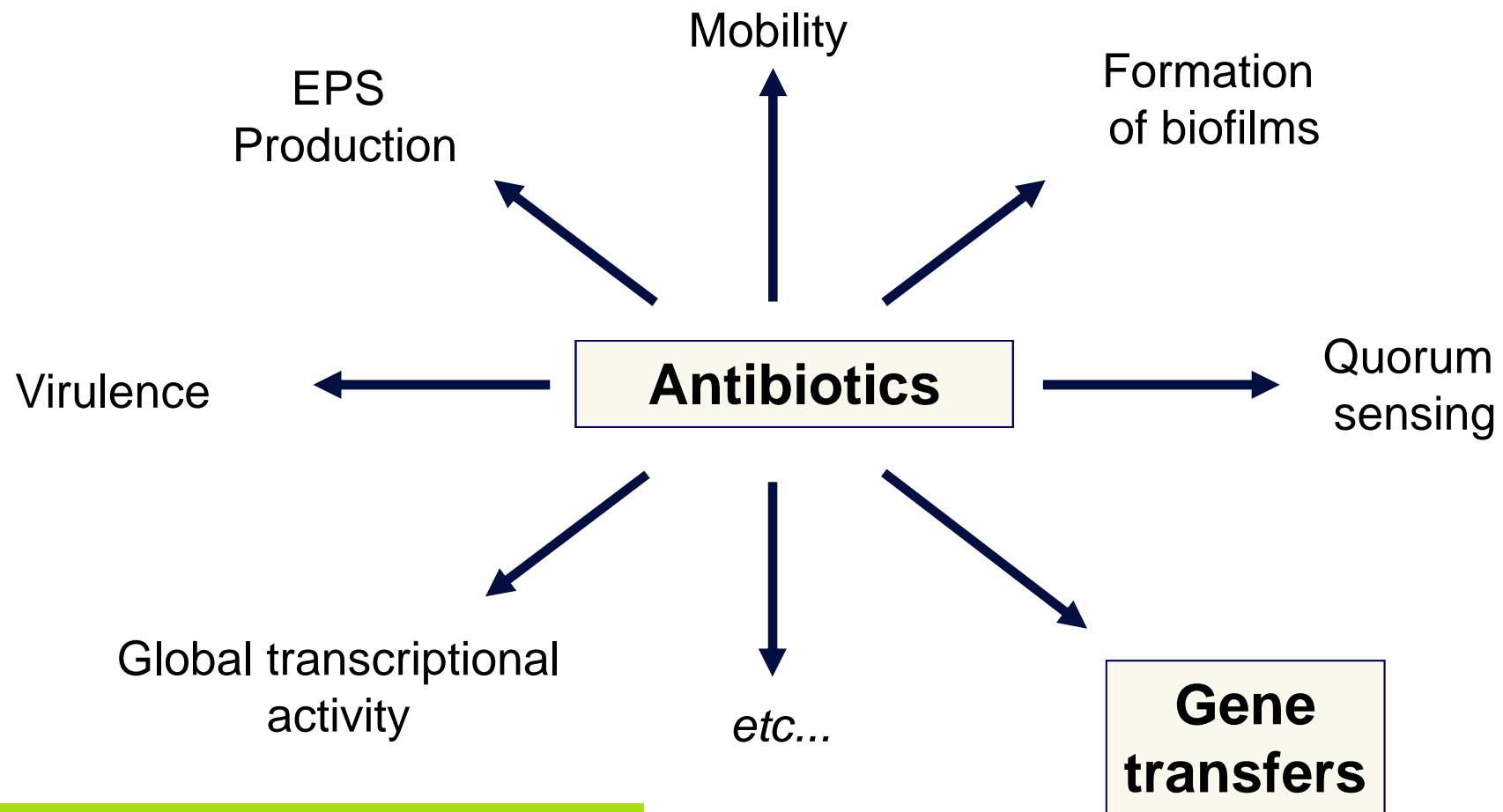


➤ Traitement tertiaire par ozonation: de 0,9 à 2,2 log d'abattement supplémentaire

# Résistance aux antibiotiques et environnement

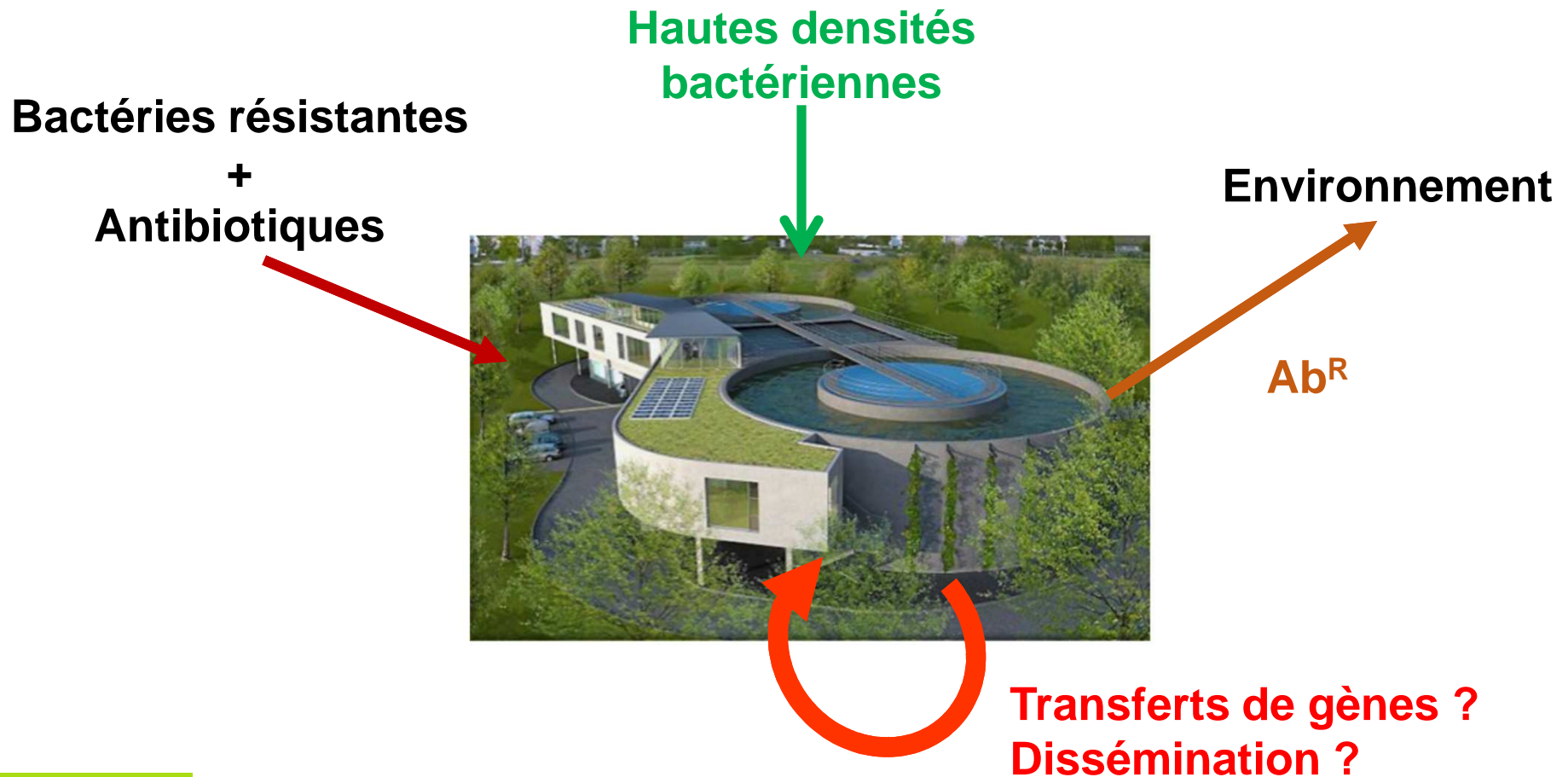


# Effets des concentrations sub-inhibitrices sur des écosystèmes microbiens

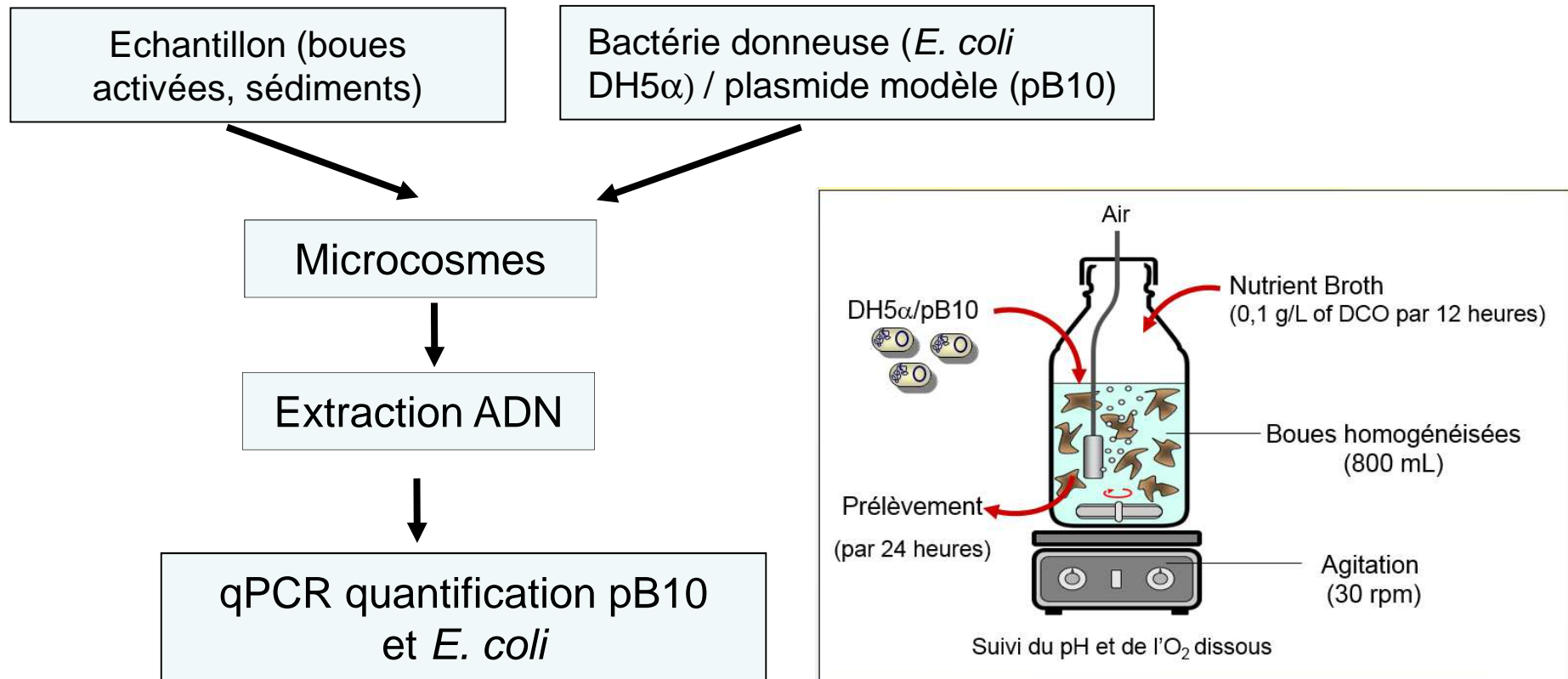


Concentrations dans l'environnement <  $\mu\text{g/L}$

# Etude du potentiel de transfert de gènes de résistance dans les boues activées

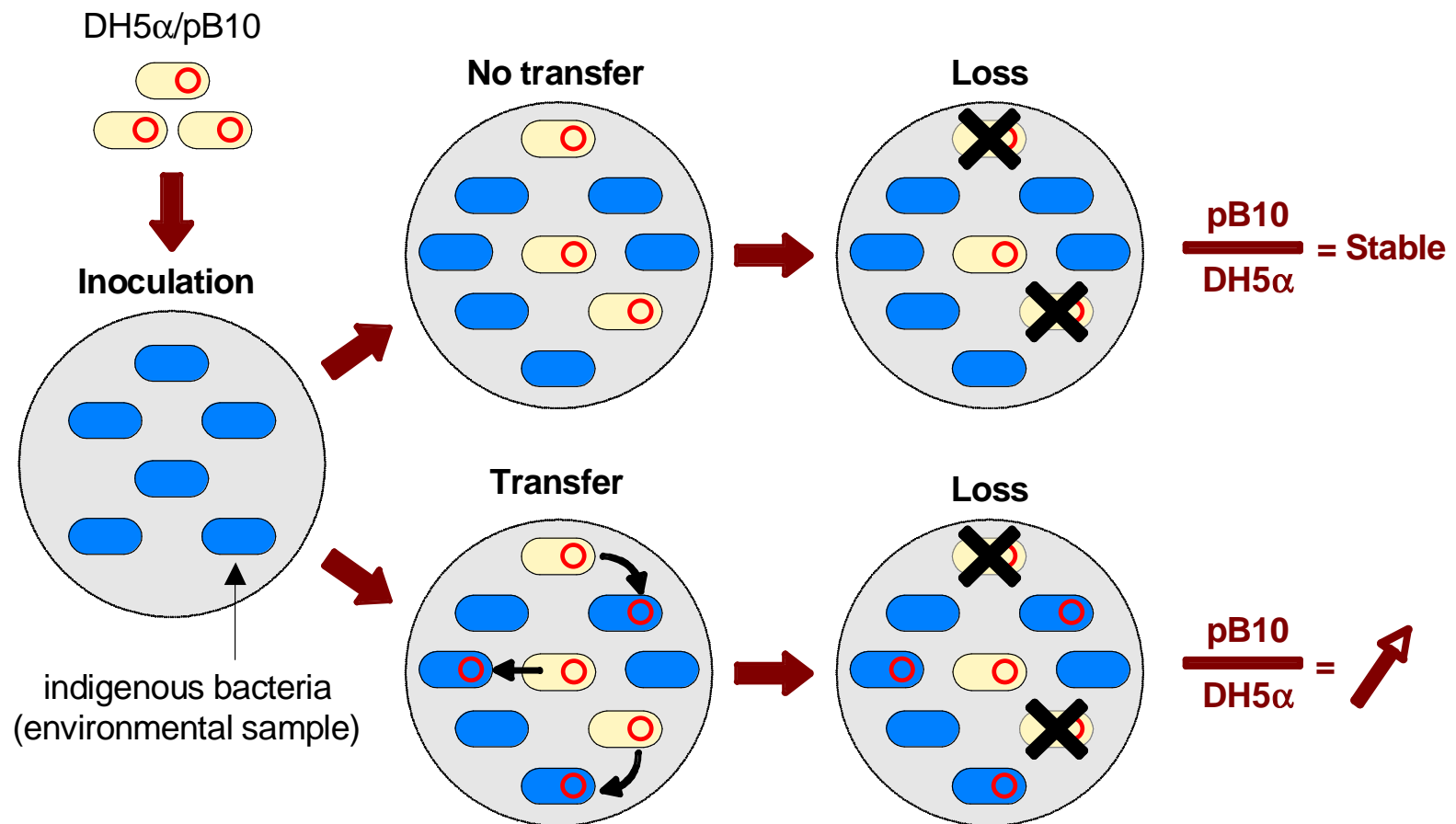


# Développement méthodologique

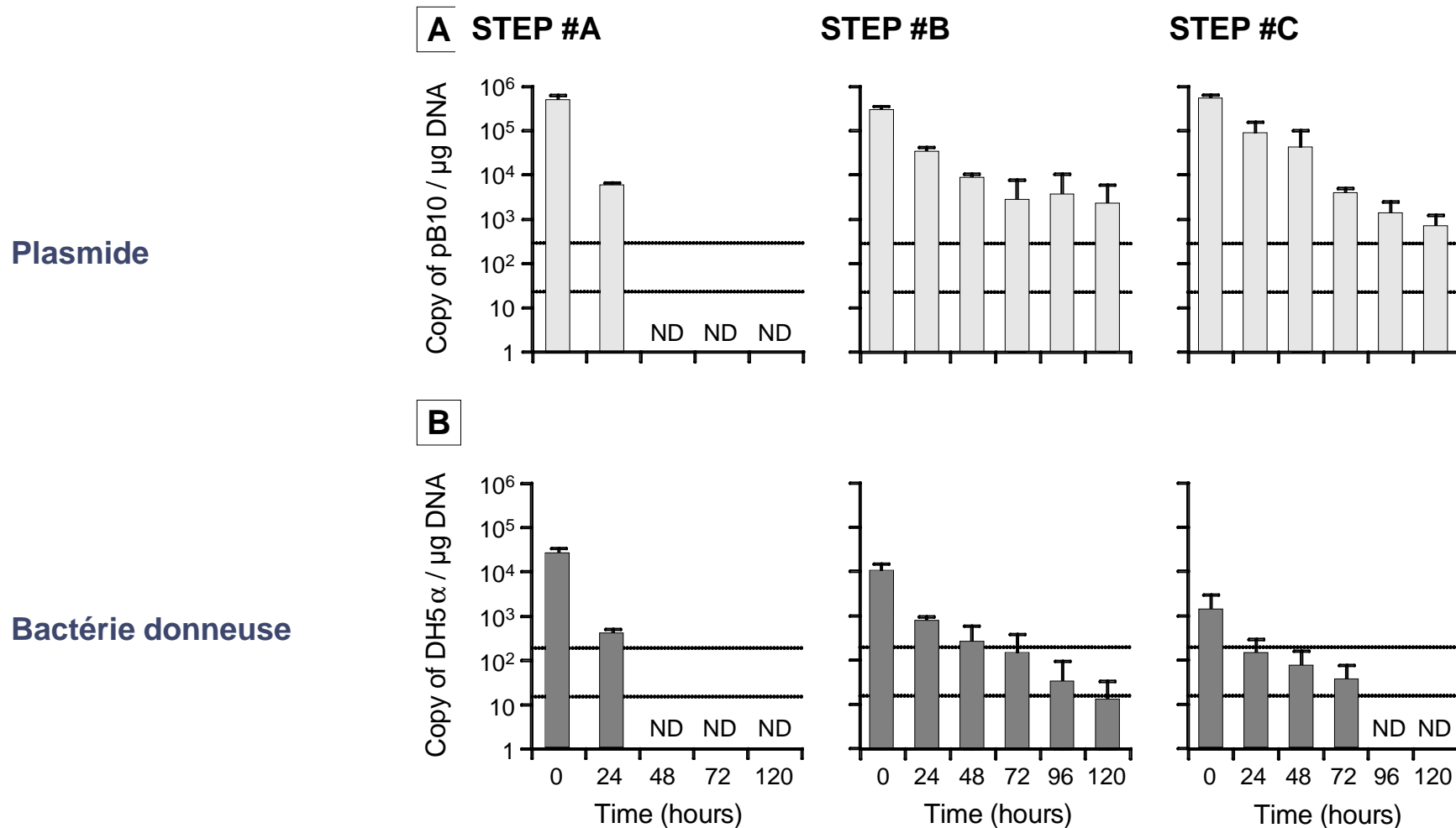


Bonot and Merlin, Appl and Env, Microbiol, 2010, 76:378

# Suivi du transfert du pB10 dans l'environnement

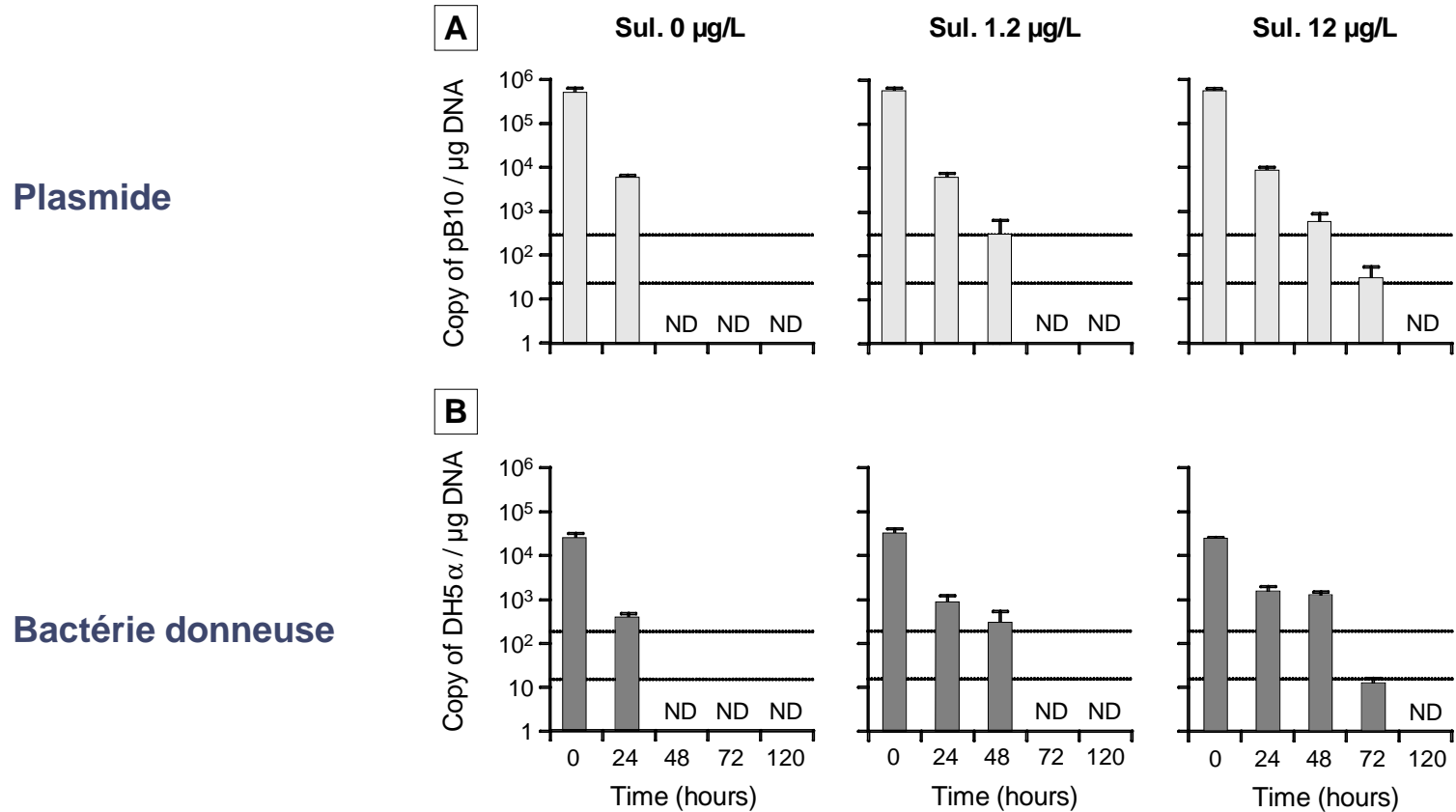


# Stabilité du pB10 dans microcosmes de boues activées



Cinétiques parallèles de disparition des bactéries donneuses et plasmides pB10 dans les microcosmes : pas de mise en évidence de transfert horizontal

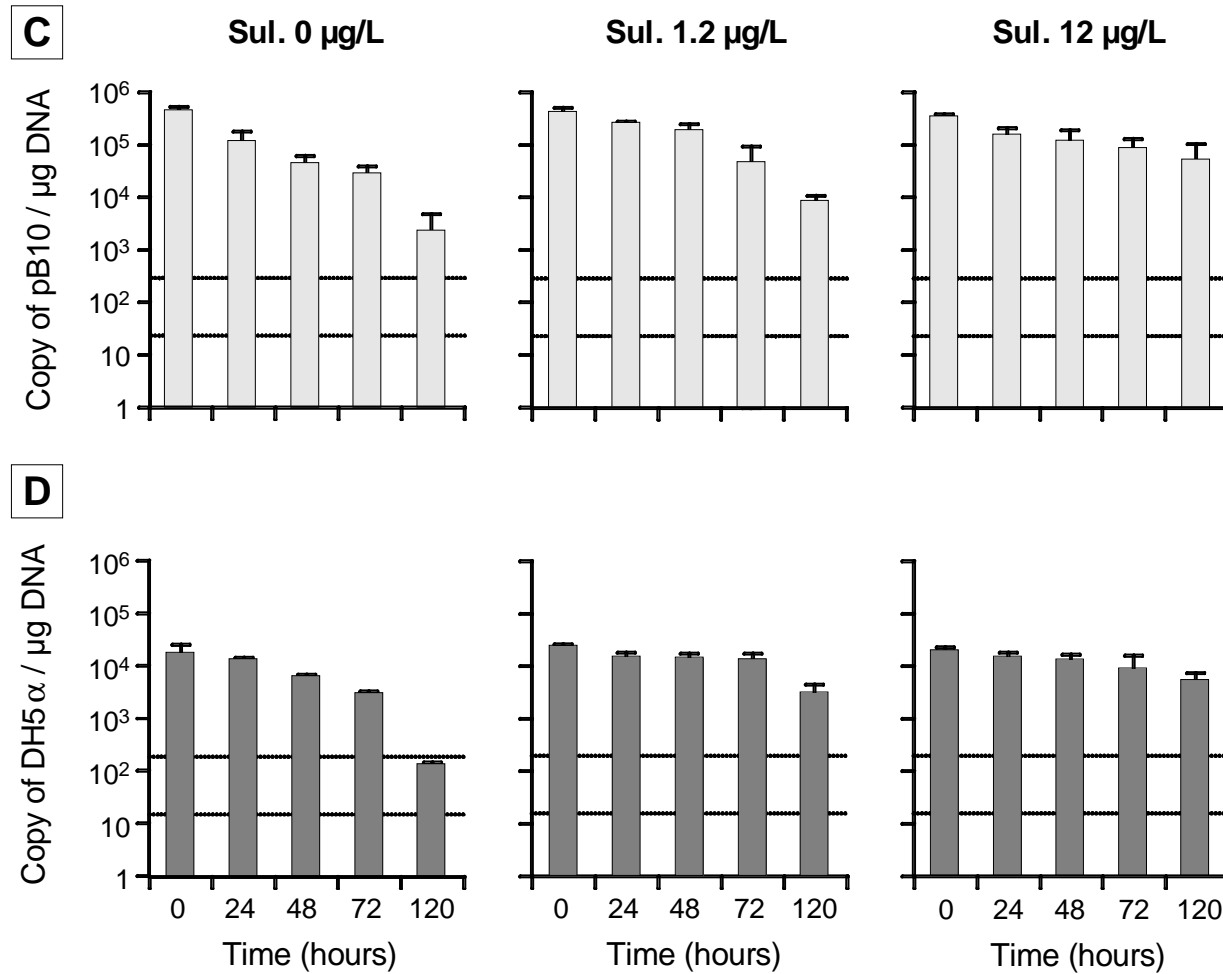
# Effet de la concentration en antibiotique sur la stabilité du pB10



En présence d'aération. Pression AB favorise le maintien de la bactérie donneuse et du pB10: pas de mise en évidence de transfert horizontal



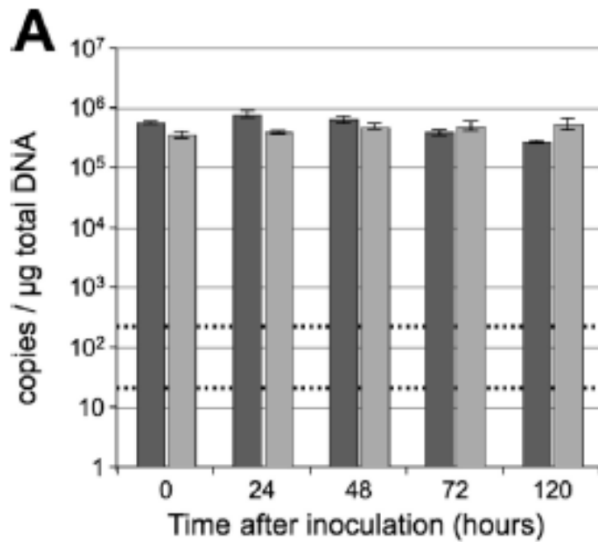
# Effet de la concentration en antibiotique sur la stabilité du pB10



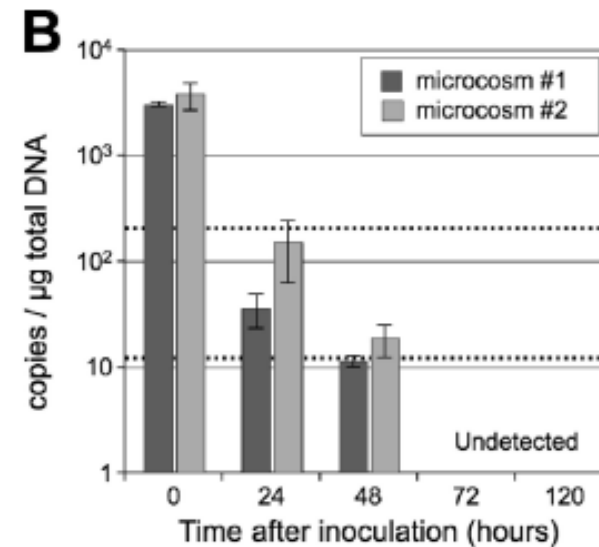
En absence d'aération / agitation : persistance bactérie donneuse et pB10 plus longue

# Etude du transfert du pB10 dans les sédiments

## Plasmide pB10



## Bactéries donneuses



## Maintien du pB10 et perte des bactéries donneuses

Mise en évidence du potentiel de transfert des gènes de résistance dans des microcosmes de sédiments

# Conclusion



**L'antibiorésistance est considérée comme une pollution émergente de l'environnement. Mais:**

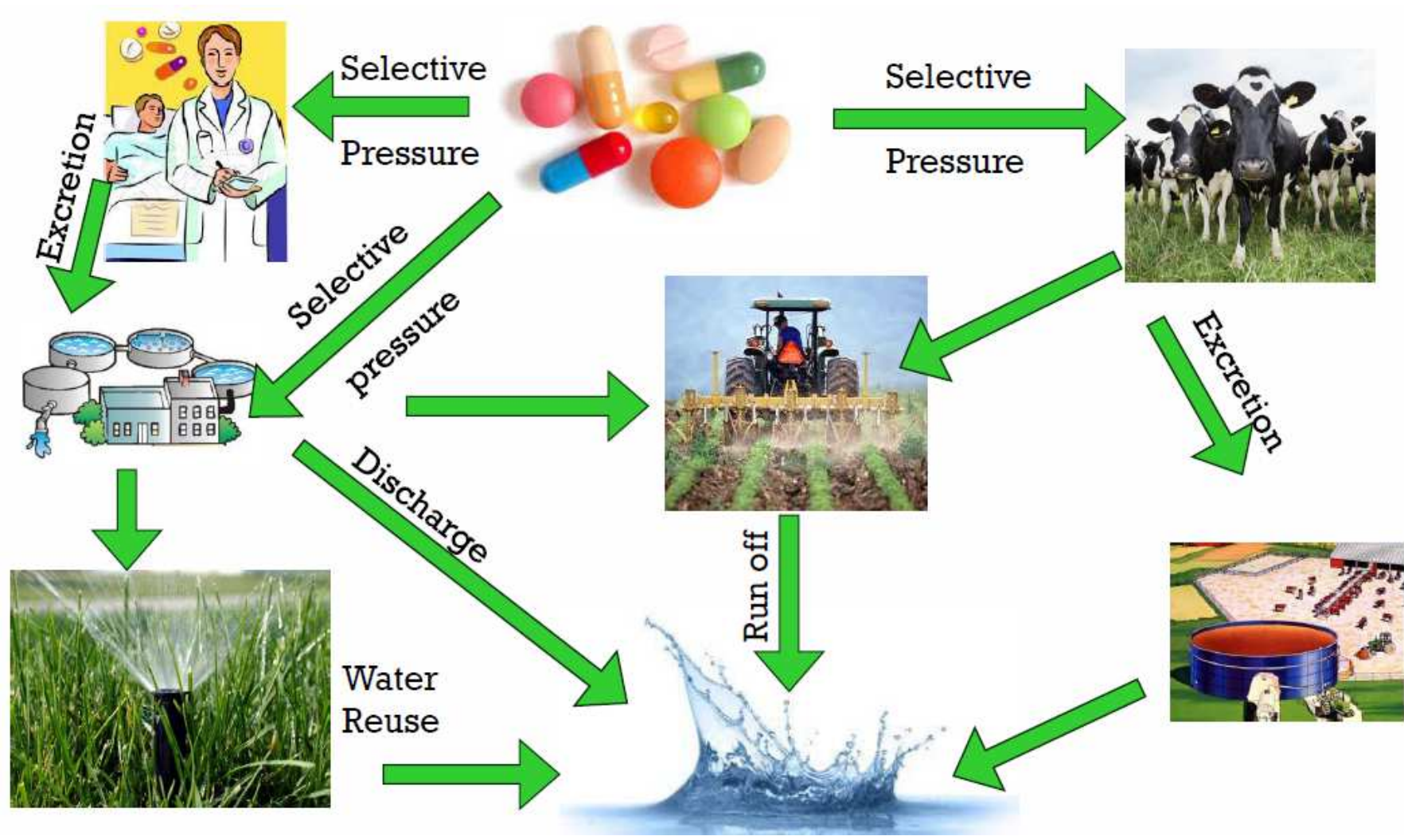
- Absence de méthode standard pour la caractérisation
- Aucune réglementation à l'heure actuelle

**Difficulté d'évaluer le risque pour la santé humaine de la dissémination de bactéries antibiorésistantes dans l'environnement**

**Systèmes d'assainissement = possible point de contrôle**

Intérêt des traitements tertiaires pour l'élimination des micropolluants et des bactéries / gènes de résistance aux antibiotiques

# Nécessité d'une vision globale



## **Remerciement aux co-auteurs :**

Sébastien Bonot

Ywann Penru et Adriana Gonzales Ospina

**Merci pour votre attention !**