



HAL
open science

Diversité des bactéries résistantes aux antibiotiques dans l'ancienne décharge de la prairie des Mauves, Nantes, France

Fabien Aujoulat, Hervé Capiiaux, Estelle Jumas-Bilak, Cécile Le Guern, Alexandra Lépinay, Thierry Lebeau, Beatrice Bechet, Patricia Licznar-Fajardo

► To cite this version:

Fabien Aujoulat, Hervé Capiiaux, Estelle Jumas-Bilak, Cécile Le Guern, Alexandra Lépinay, et al.. Diversité des bactéries résistantes aux antibiotiques dans l'ancienne décharge de la prairie des Mauves, Nantes, France. Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne, Nov 2019, Bussang, France. hal-04916999

HAL Id: hal-04916999

<https://hal.science/hal-04916999v1>

Submitted on 29 Jan 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Fabien Aujoulat¹, Hervé Capioux^{2,6}, Estelle Jumas-Bilak³, Cécile Le Guern^{4,6}, Alexandra Lépinay^{6,7}, Thierry Lebeau^{2,6}, Béatrice Béchet^{5,6}, Patricia Licznar^{3*}

¹ HSM, Univ Montpellier, IRD, CNRS, Montpellier, ² UMR CNRS LPG 6112, Nantes, ³ HSM, Univ Montpellier, IRD, CNRS, Département d'Hygiène Hospitalière, CHU de Montpellier, ⁴ BRGM, Nantes, ⁵ IFSTTAR, GERS, LEE, Bouguenais, ⁶ IRSTV - FR CNRS 2488, Nantes, ⁷ UMS 3281 de soutien à l'OSUNA, Nantes

Introduction

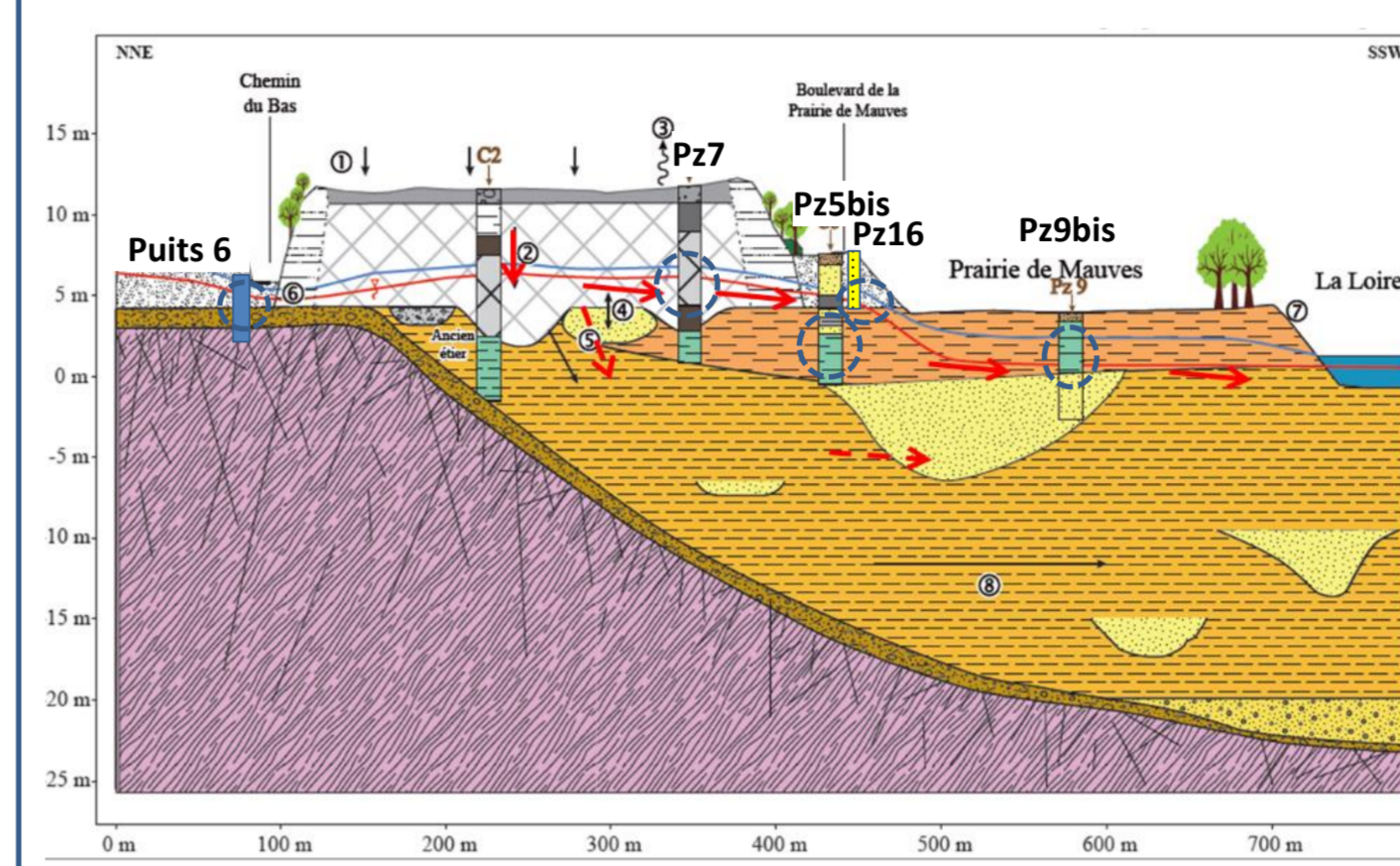
L'ancienne décharge de la Prairie de Mauves (zone Natura 2000, Nantes) a accueilli des déchets divers (gravats, déchets ménagers, hospitaliers, verts, ...) entre 1969 et 1987. La présence dans les lixiviats de la décharge de xénobiotiques a précédemment été montrée [1, 2]. La plupart de ces substances sont retrouvées dans les eaux souterraines en aval immédiat du site mais elles sont très peu détectées à quelques centaines de mètres de la limite de la décharge (aval éloigné) suggérant une forte atténuation naturelle. La présence de molécules médicamenteuses pose la question du développement et du transfert d'une antibiorésistance dans la nappe alluviale de la Loire.

L'objectif de ce travail est ainsi :

- ☐ d'étudier la diversité des bactéries résistantes aux antibiotiques au sein des lixiviats de la décharge et aux abords du site (nappe alluviale).
- ☐ de déterminer le risque d'un éventuel transfert de bactéries résistantes vers la Loire.

Echantillonnage des eaux souterraines

Les déchets reposent directement sur d'anciennes prairies humides et constituent un plateau surélevé d'environ 8 à 10 m par rapport au terrain naturel. En fin d'exploitation, ces déchets ont été couverts avec divers gravats et argiles. Au sein des déchets s'est mise en place une nappe perchée, dite nappe des remblais, en continuité hydraulique avec la nappe alluviale sous-jacente. Les eaux de pluies s'infiltrent et percolent à travers le massif de déchets, les lixiviats rejoignent la nappe phréatique alluviale sous-jacente (flèches en rouge). L'échantillonnage a été réalisé dans des piézomètres situés selon l'axe d'écoulement des eaux souterraines (fig ci-dessous).

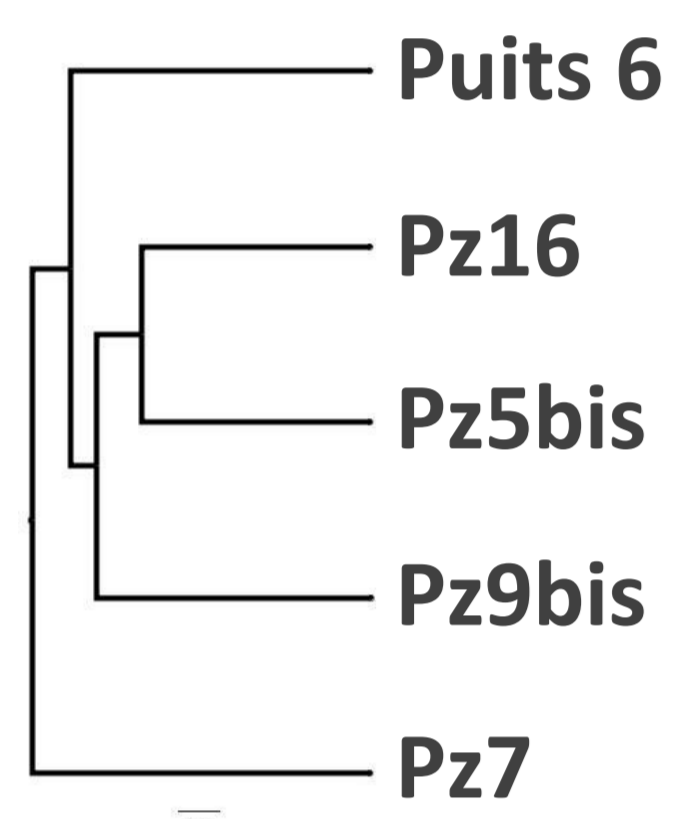


5 points

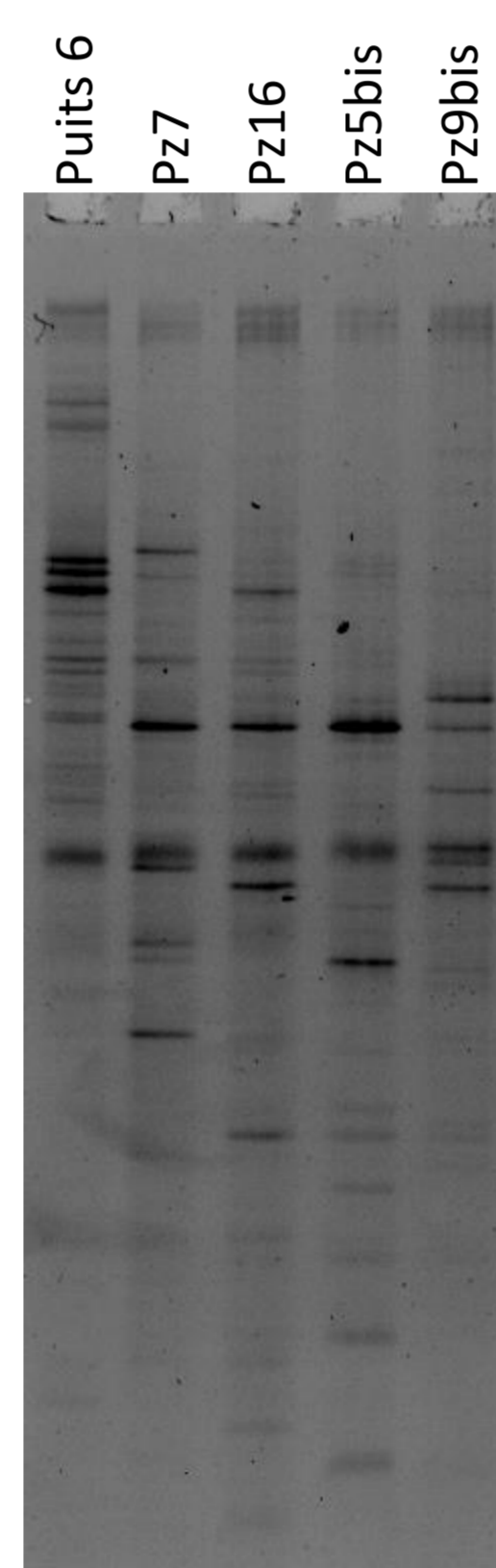
- Puits 6** : nappe alluviale en amont de la décharge
- Pz7** : lixiviats dans la nappe de remblais
- Pz16** : lixiviats infiltrés dans le talus de la décharge
- Pz5bis** : nappe alluviale impactée par les lixiviats en aval hydraulique immédiat de la décharge
- Pz9bis** : partie superficielle de la nappe alluviale impactée par les lixiviats, en aval hydraulique éloigné

Communautés totales

Diversité des espèces dominantes par PCR-TTGE

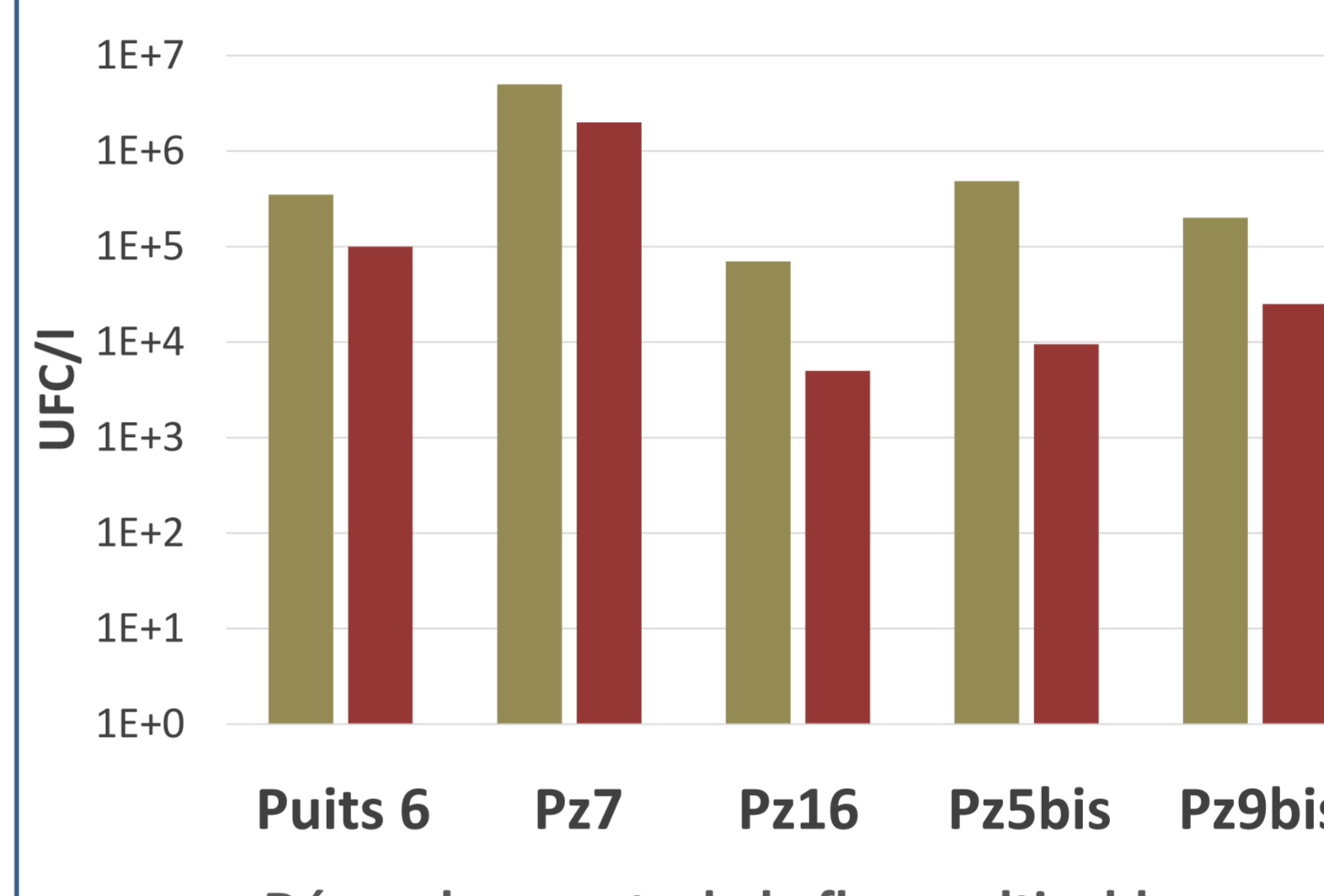


- Amont (Puits 6) :** plus forte diversité (20 bandes majeures)
- Lixiviats (Pz7) :**
 - profil TTGE pauvre (13 bandes majeures)
 - seulement 3 distances de migration communes avec le point amont (Puits 6)
- Talus de la décharge (Pz16) :** seulement 4 distances de migration communes avec les lixiviats Pz7



Communautés cultivables

Dénombrements Flore cultivable totale (TS, 25°C)
Bacilles à Gram négatif poussant à 37°C (Drigalski)

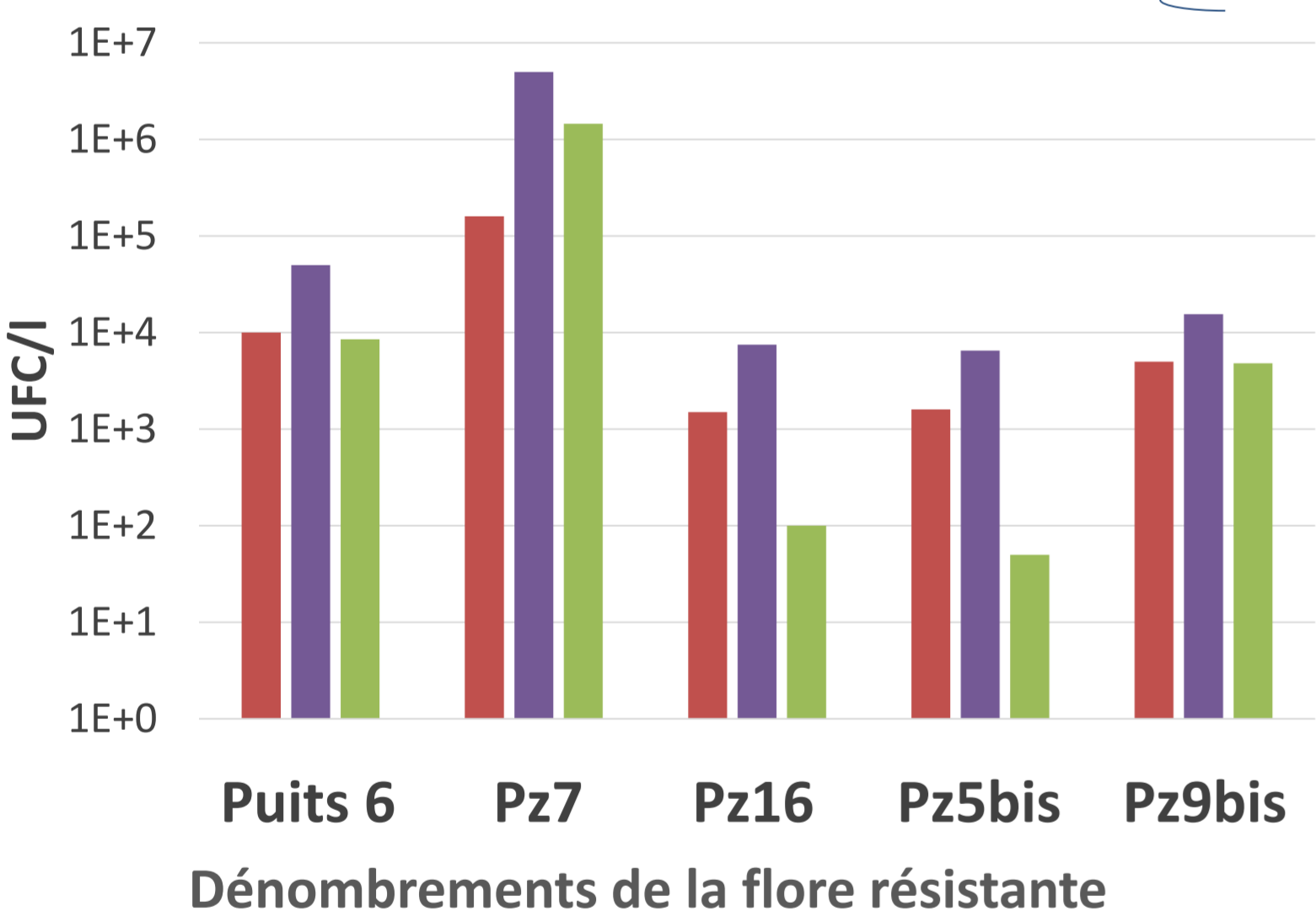


- Lixiviats Pz7 :**
 - Fortes abondances (20 à 400 fois plus forte que les autres échantillons)
 - Plus forte proportion de bacilles à Gram négatif poussant à 37°C
- Talus de la décharge (Pz16) :** Abondances beaucoup plus faibles que dans les lixiviats Pz7

Communautés résistantes aux antibiotiques

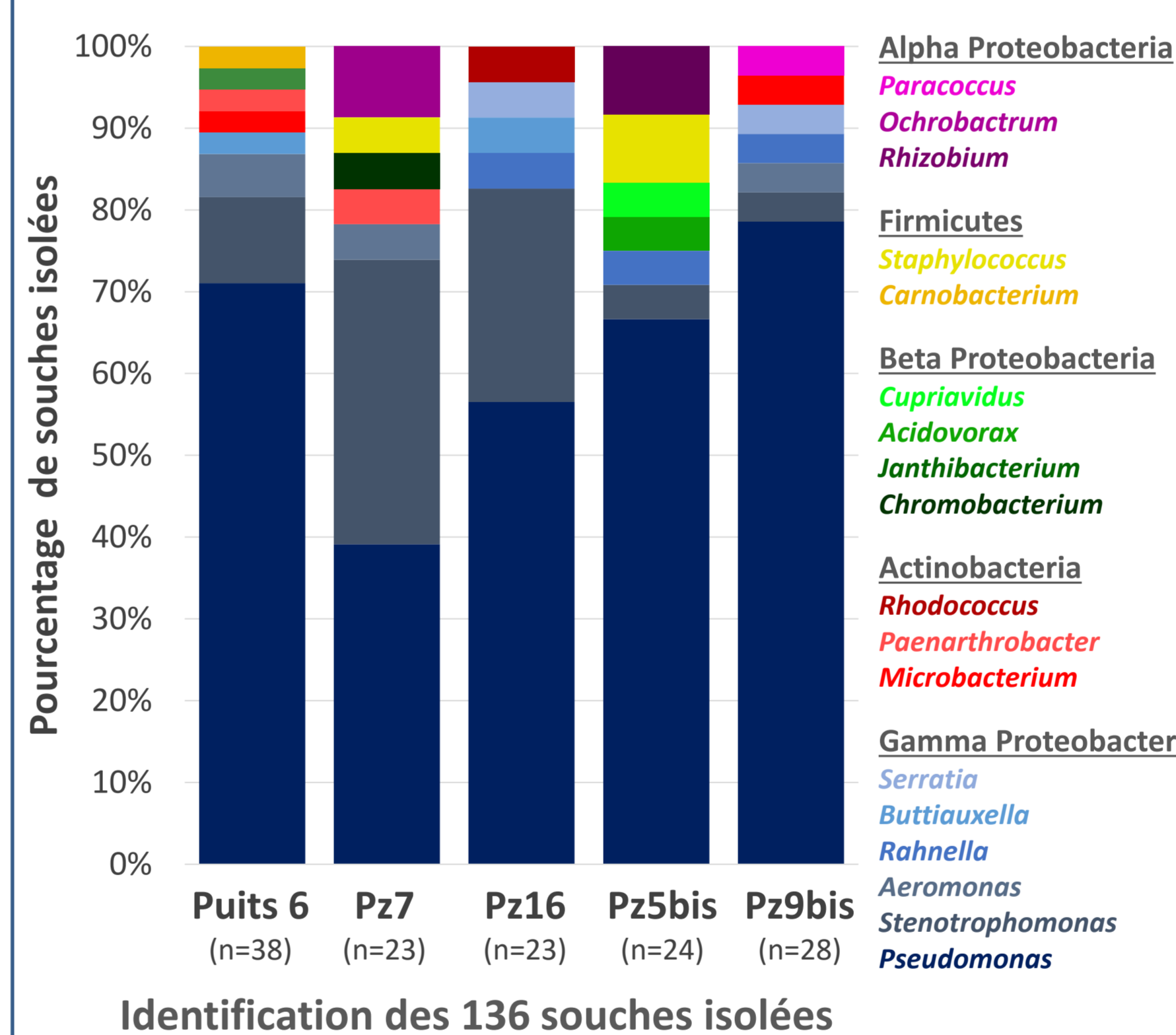
Milieux de culture utilisés en clinique pour la détection des bactéries résistantes aux antibiotiques

- Drigalski/ceftazidime :** résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération
- ESBL :** beta-lactamases à spectre étendu
- Msuper CARBA :** résistance aux carbapénèmes



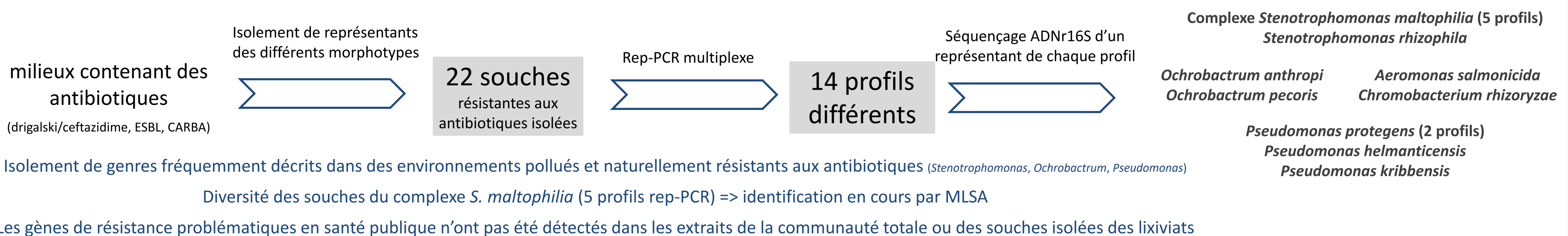
- Lixiviats (Pz7) :**
 - Fortes abondances quel que soit le milieu de culture
 - Très faible sélectivité du milieu ESBL (dénombrement équivalent à celui sur TS)
- Aval :** abondances beaucoup plus faibles, y compris sur le côté de la décharge

Identification des souches isolées (tous milieux de culture)



- Prédominance de **gamma Proteobacteria** pour tous les échantillons
- Pseudomonas** : genre le plus abondant
- Lixiviats (Pz7) :**
 - plus forte proportion de *Stenotrophomonas* / plus faible proportion de *Pseudomonas*
 - Présence de genres absents des autres échantillons (*Ochrobactrum*, *Chromobacterium*)

Caractérisation des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les lixiviats Pz7



Matériel et méthodes:

Traitement des échantillons : Un litre de chaque échantillon a été filtré sur membrane acétate de cellulose (0,22µm). Les filtrats ont été remis en suspension et utilisés pour l'extraction d'ADN et la mise en culture.
Dénombrements et milieu de culture : Les dénombrements ont été réalisés sur gélose trypticase soja (TS) et drigalski après 4 jours d'incubation à 25 et 37°C, respectivement. L'abondance de bactéries résistantes aux antibiotiques a été estimée par dénombrements après culture sur les milieux CHROMagar™ ESBL et mSuperCARBA (37°C, 24h) ainsi que sur gélose drigalski supplémentée de ceftazidime (4µg/ml) (37°C, 48h).
Isolement et identification : Des représentants de chaque morphotype observé sur les différents milieux de culture ont été isolés et identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker) et/ou séquençage de l'ADNr16S [3].
Extraction d'ADN et PCR : L'ADN génomique a été extrait par le kit MasterPure (Epicentre®). Les souches isolées des lixiviats pz7 ont été comparées par multiplexe rep-PCR [3]. La PCR pré-TTGE ainsi que la migration TTGE ont été réalisées comme décrit précédemment (région V3 de l'ADNr 16S, amorces HDA1-GC/HDA2, 63-70°C, 0,4°C/h) [4]. Un dendrogramme a été construit à partir d'une matrice présence/absence de chaque distance de migration en utilisant le coefficient de Dice avec l'outil dendroUPGMA. Les gènes codant les β-lactamase *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA}*, *bla_{VIM}*, ainsi que le gène plasmidique codant la résistance à la colistine (*mcr-1*) ont été recherchés par PCR [5].

Conclusion

L'ensemble des résultats de cette campagne suggère que les lixiviats de l'ancienne décharge de la Prairie de Mauves abritent une communauté bactérienne plus abondante et moins diverse que la nappe alluviale aux abords du site, probablement en raison de la présence de substrats sélectionnant quelques populations bactériennes spécifiques. L'étude par PCR-TTGE de même que l'identification des souches isolées de ces prélèvements, montrent que les populations bactériennes présentes au cœur de la décharge (lixiviats Pz7) diffèrent de celles en amont, aval et sur les bordures du site. Alors que le genre *Pseudomonas* représente plus de la moitié des souches isolées aux abords de la décharge, *Stenotrophomonas* est le genre le plus fréquemment isolé des lixiviats Pz7.

Les bactéries des lixiviats Pz7 montrent par ailleurs une résistance aux antibiotiques supérieure à celle des autres prélèvements, avec une abondance sur milieu mSuperCARBA au moins 100 fois plus importante pour le lixiviat. Le transfert des bactéries résistantes en aval de la décharge semble limité, avec des abondances en bactéries résistantes dans les lixiviats débordant en aval immédiat de la décharge (Pz16) au moins 100 inférieure à celle des lixiviats Pz7. Une atténuation similaire entre ces 2 points géographiquement très proches a été décrite pour différents xénobiotiques [1]. D'autres campagnes, incluant l'étude des communautés bactériennes en biofilm, sont nécessaires pour expliquer l'absence de transfert de contaminants biologiques.

[1] Le Guern et al. (2016), Journées de la Société Hydrotechnique de France (SHF) : Actes du Colloque, Orléans
 [2] Lotram et al. (2011), IWA Specialist Groundwater Conference, Belgrade, Serbie
 [3] Dupont et al. (2015), Infect Genet Evol., Jun;32:214-23
 [4] Roudière et al. (2009), J Microbiol Methods., 79: 156-165
 [5] Almakki, Ayad 2017. Thèse de doctorat : Université de Montpellier