

Projet AGROCAPI

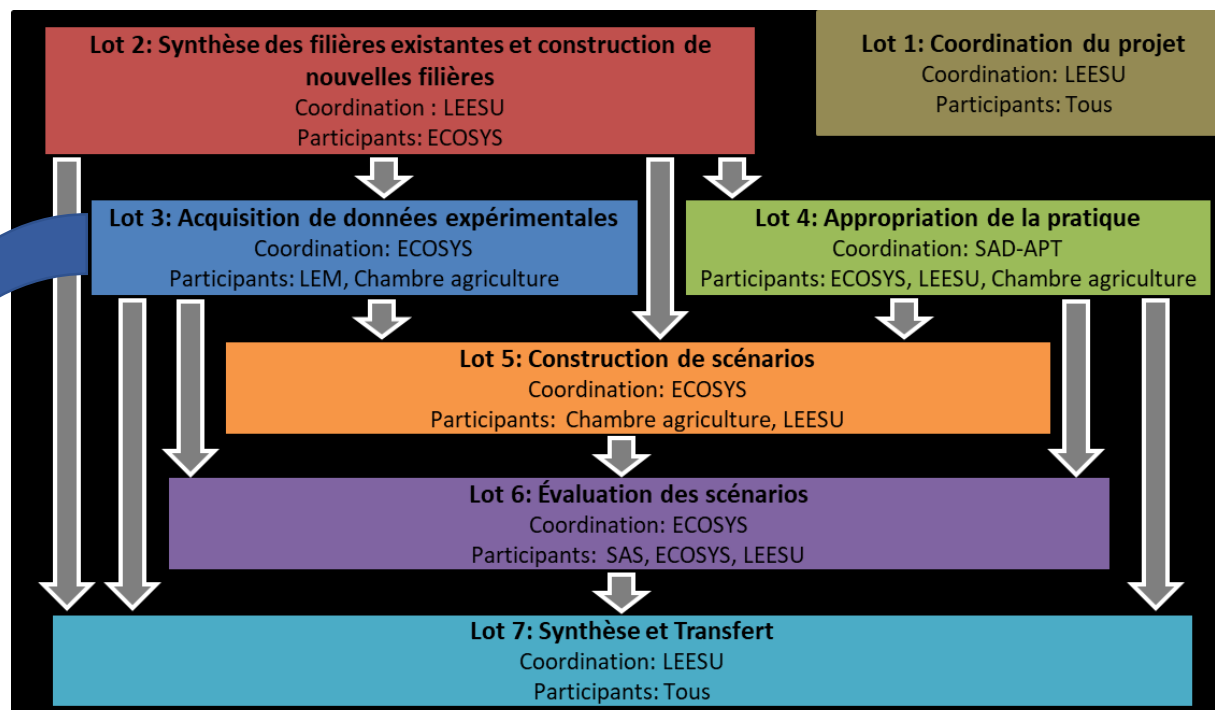
Inocuité sanitaire des produits et conséquences de leur épandage sur les sols

Sylvie NAZARET

UMR CNRS 5557 - INRAE 1418 - Université Lyon 1 -
VetAgro Sup; 69622 Villeurbanne



Amandine Chauviat
(CDD AgroCapi)
Elisabeth Brothier
(IE CNRS)



Lot 3: Inocuité sanitaire des échantillons

Étudier l'**impact sanitaire** de l'épandage de produits dérivés des urines sur la dissémination de **résistance aux antibiotiques** dans les communautés bactériennes du sol

Le projet pour le LEM

Étudier l'**impact sanitaire** de l'épandage de produits dérivés des urines sur l'émergence et la dissémination de **résistances aux antibiotiques** dans les communautés bactériennes du sol.



Rechercher des **gènes de résistance aux antibiotiques (GRA)** et des **gènes de mobilité (EGM)** dans les produits épandus et dans les sols avant et après épandage



En parallèle: estimation de l'**abondance de la microflore bactérienne totale**



Recherche de **pathogènes**

Microflore bactérienne totale, GRA et EGM

Méthodologie : approche
indépendante culture



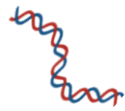
- Bactéries totales : gène universel codant ARNr 16S
- 7 GRA : différentes classes d'ATB et des gènes d'importance en clinique) +
- 2 EGM : « estimateurs »

Microflore bactérienne totale, GRA et EGM

Méthodologie : approche indépendante culture



- Extraction ADN
- qPCR - ddPCR



- Bactéries totales : gène universel codant ARNr 16S
- 7 GRA : différentes classes d'ATB et des gènes d'importance en clinique
- 2 EGM : « estimateurs »

GRA

- **tétracyclines** - *tetB*, *tetW* ➤ large distribution phylétique et environnementale
- **sulfonamides** – *sul1*, *sul2* ➤ « vieux » gènes
- **béta-lactamines** - *bla*_{CTX-M1}, *bla*_{CTX-M9} ➤ distribution phylétique et environnementale restreinte (Enterobactéries et *Pseudomonas*)
- **fluoroquinolones** - *qnrD* ➤ gènes récents

EGM

Intégrons classes I et II (*intl1* and *intl2*)

- co-localisation sur le génome
- responsable de l'acquisition de résistance par transfert horizontal de gènes

Produits analysés

Produits
étudiés
2019



**Urine
stockée
BUREAU**

(mix 1 à 6 mois)



**Urine
stockée
FESTIVAL**

(1 an)



pH 9,1

pH 9,0



**Urine
fermentée**

Acidification +
stockage (2 semaines)
+ fermentation
lactique



pH 4,1



AURIN

Traitement
nitrifiant
+ réduction



pH 4,3



GRANURIN

Traitement
alcalin
+
déshydratation



pH 9,1



**Contrôle =
Lisier bovin
(phase liquide)**

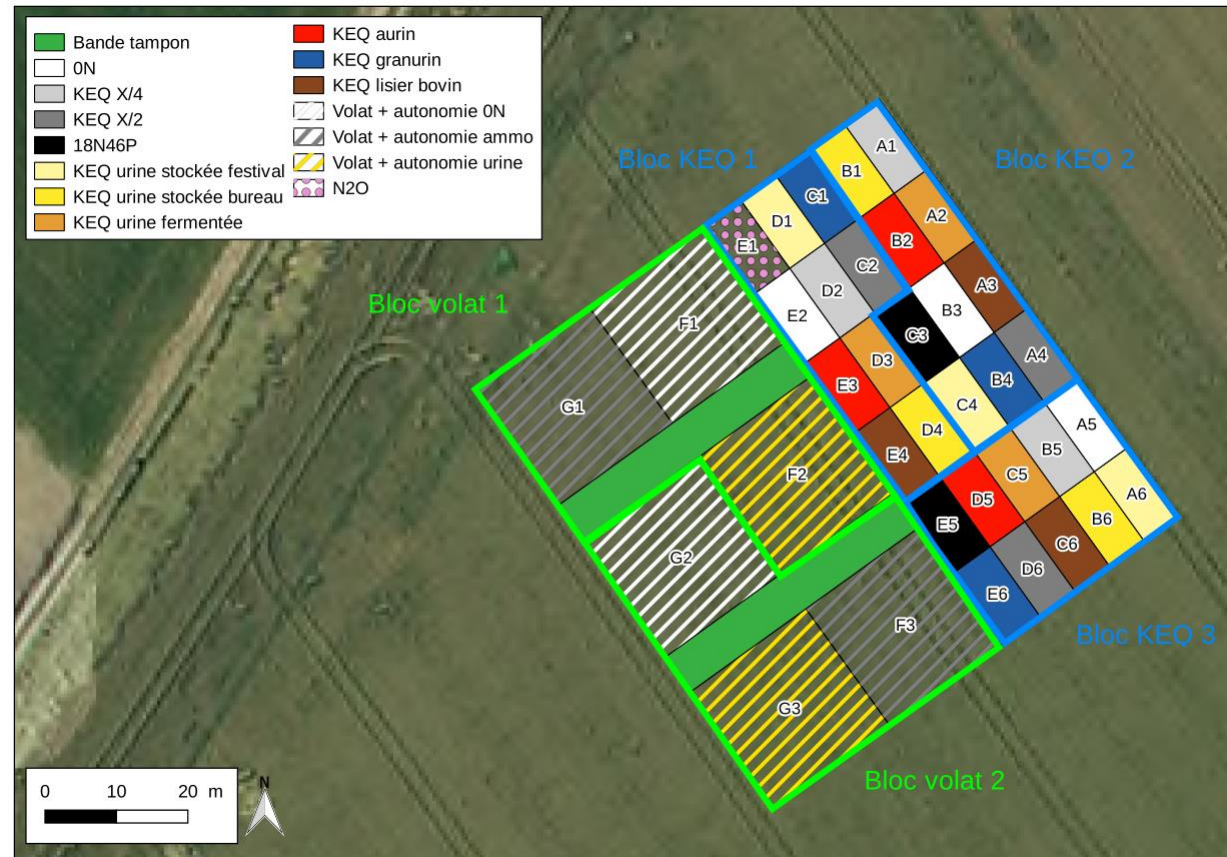
Avant stockage

Dispositif expérimental au champ

Démarche appliquée sur le dispositif à Maule (78) destiné à la culture de maïs

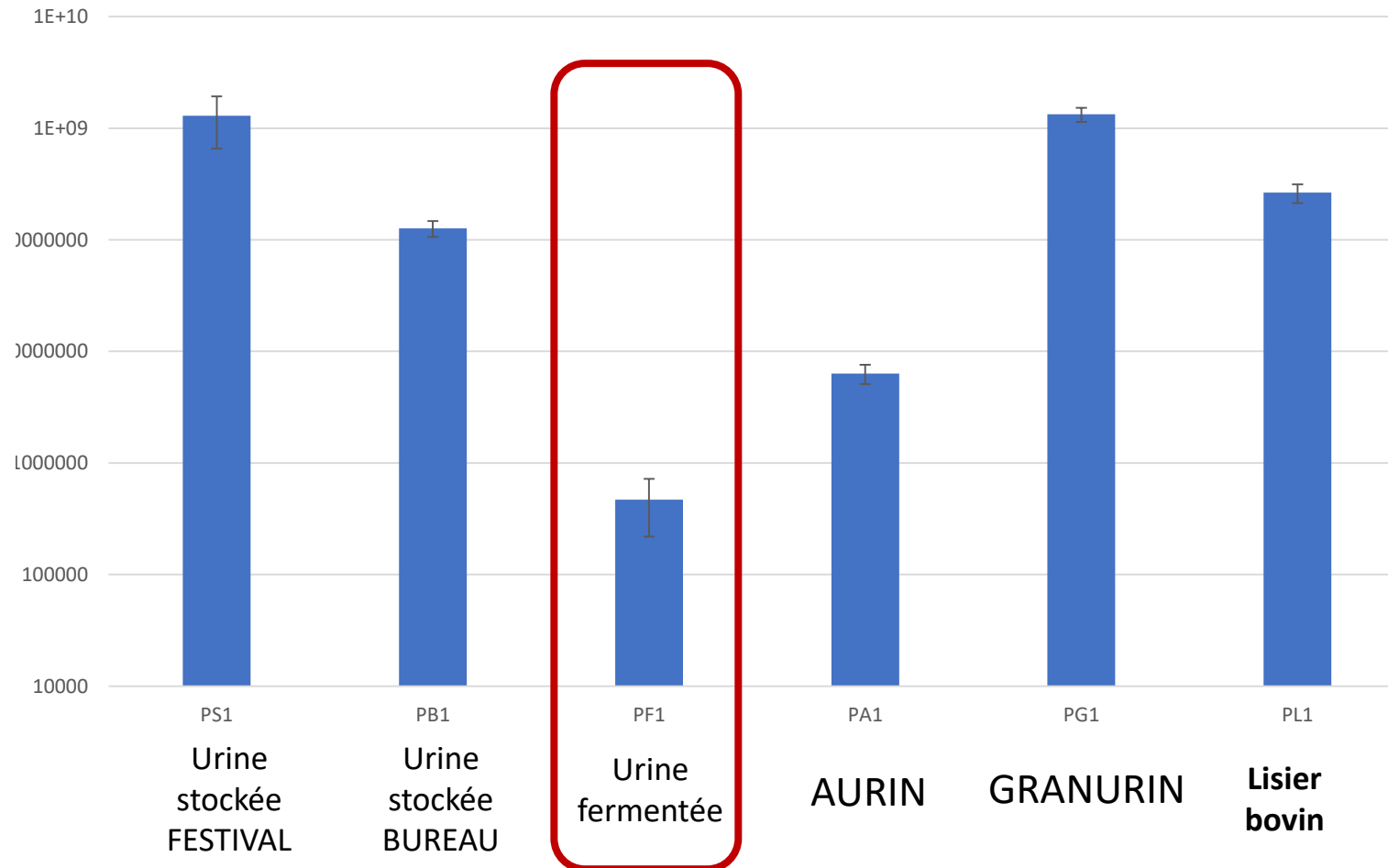
- microparcelles de 6 m sur 12 m
- 3 répétitions / traitement

Campagne 2019
Avant et 1 mois
après épandage



RESULTATS – Biomasse bactérienne dans les produits

Biomasse bactérienne - nombre de copies de gènes codant l'ARNr 16S



RESULTATS – Pathogènes dans les produits

Procédures Normes ISO (Méthodologie : approche dépendante culture) - Indicateurs de pathogènes



	Lisier	Urine stockée festival	Urine stockée bureau	Urine fermentée	Aurin	Granurin (1% N)
Coliforme totaux	587	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Escherichia coli</i>	<400 - 600	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
<i>Clostridium perfringens</i>	3033	353	<10	<10	<10	<10 - < 40
Spores <i>Clostridium perfringens</i>	217	< 10	<10	<10	<10	<10
Entérocoques fécaux	7061	163	129	<23 - 25	< 23 -25	107
Salmonelles	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Œufs nématodes	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence

Prévalence de pathogènes ➡

Présence de certains indicateurs (*Entérocoques fécaux*; *C. perfringens*)
Prévalence la plus importante dans urine stockée festival

Faible teneur

RESULTATS – Antibiorésistance dans les produits



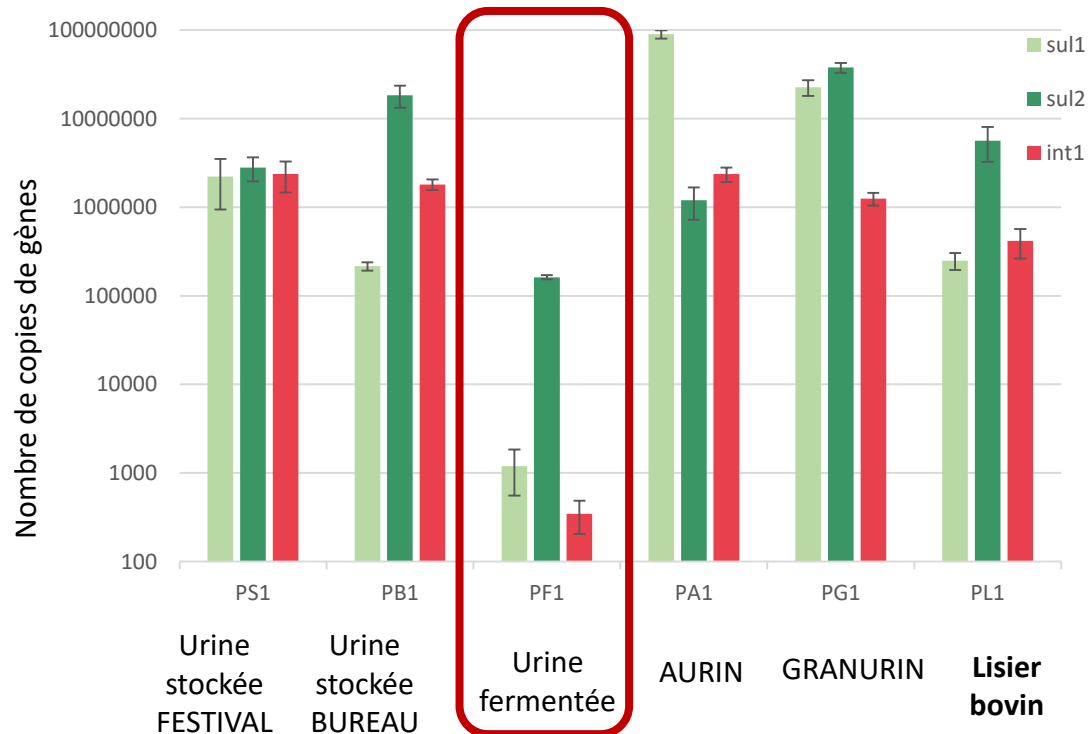
	Lisier	Urine stockée festival	Urine stockée bureau	Urine fermentée	Aurin	Granurin (1% N)
<i>sul1, sul2</i>	+	+	+	+	+	+
<i>tetB</i>	+	+	+	-	-	-
<i>tetW</i>	+	+	-	-	-	-
<i>blaCTX_{M1-M9}</i>	-	-	-	-	-	-
<i>qnrD</i>	-	+	-	-	-	-
<i>intI1</i>	+	+	+	+	+	+
<i>intI2</i>	-	+	+	-	-	-

Prévalence des gènes ➡

- Présence des gènes *sul1, sul2* et *intI1* dans tous les produits
- Prévalence la plus importante dans urine stockée Festival

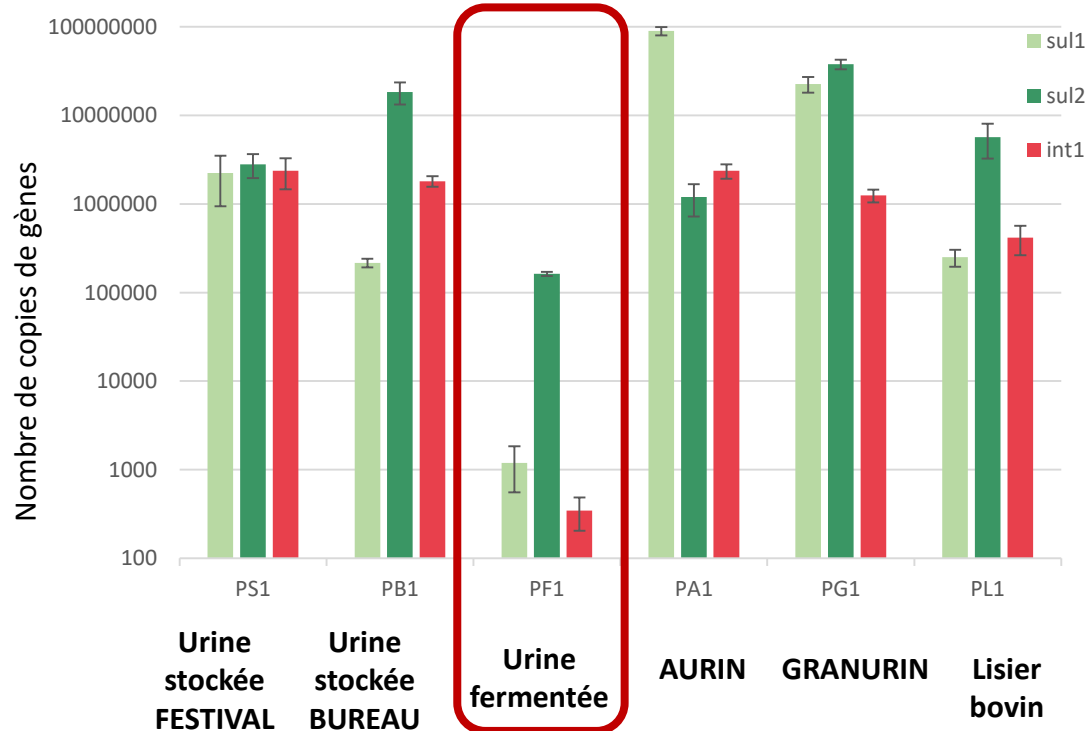
RESULTATS – Antibiorésistance dans les produits

**Plus faible abondance dans
urine fermentée**

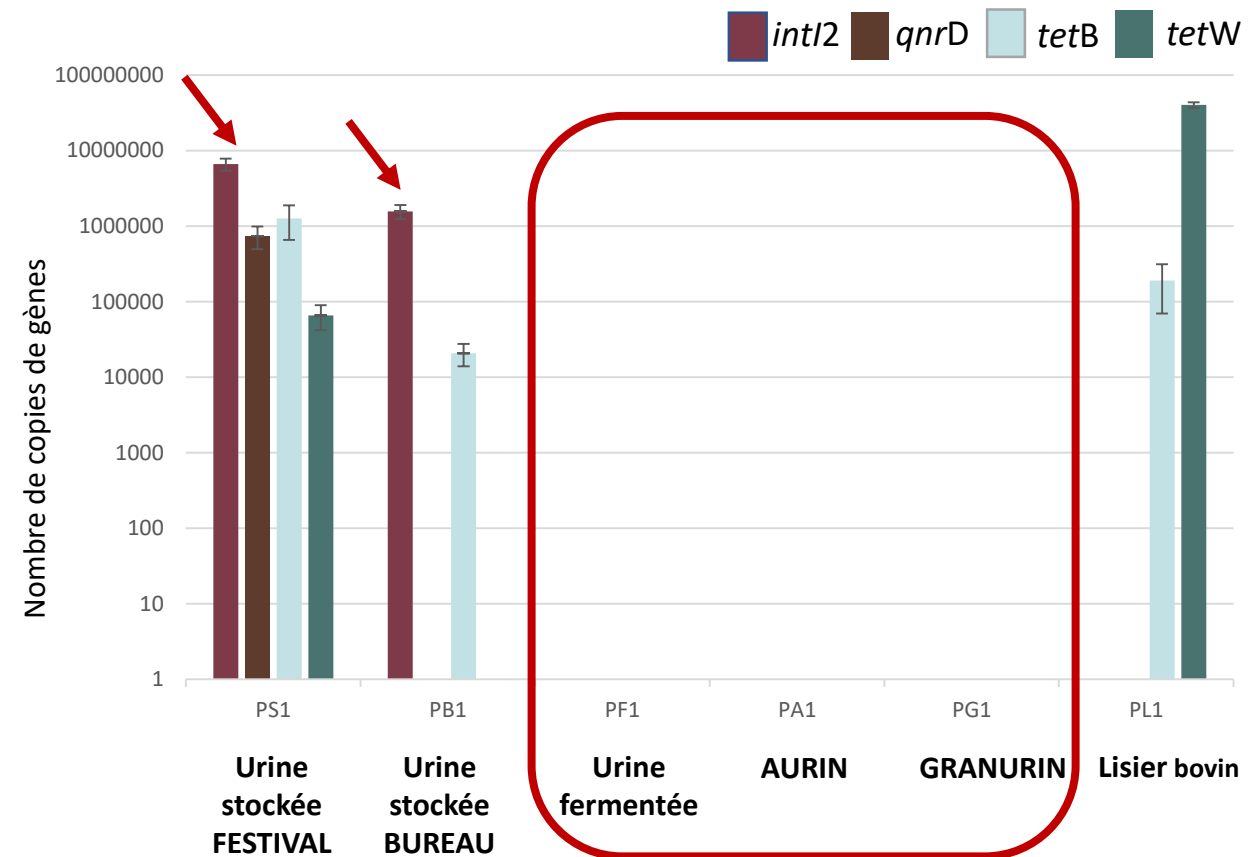


RESULTATS – Antibiorésistance dans les produits

Plus faible abondance dans
urine fermentée



Fermentation, « traitement nitrifiant
+ réduction » et « traitement alcalin + déshydratation »
éliminent les GRA et EGM les plus à risque



Synthèse : produits dérivés d'urine

Produits
étudiés
2019



- **Indicateurs pathogènes**
(Entérocoques, *C. perfringens*)
- **6 antibiotiques** / métabolites :
sulfonamides et fluoroquinolones
- **ARG fluoroquinolones** (*qnr*) et
EGM (*intI2*)



Absence de **pathogènes**, d'ATB,
d'ARG et EGM « à risque »

Boues de STEP et produits dérivés

ANR DIGESTATE

- Fortes prévalences et abondances d'ARG et EGM « à risque » dans déchets bruts, produits digérés et composts:

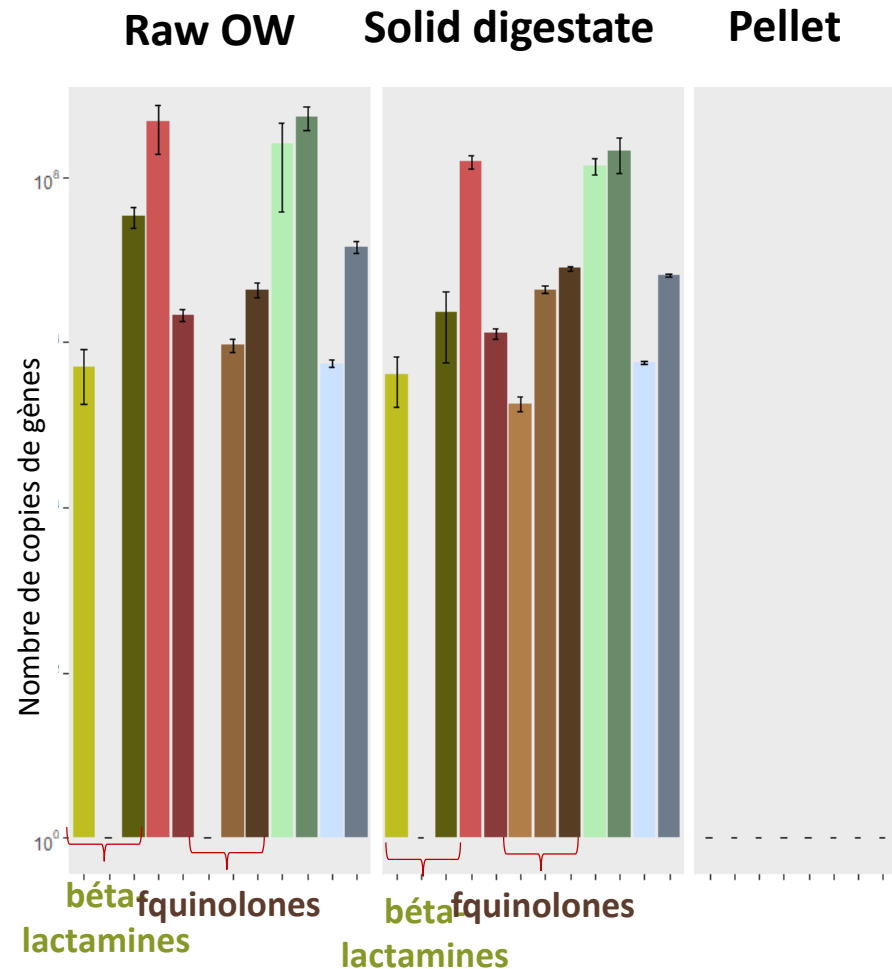
- beta-lactamines : *bla*
- fluoroquinolones : *qnr*
- intégrons: *intI2*



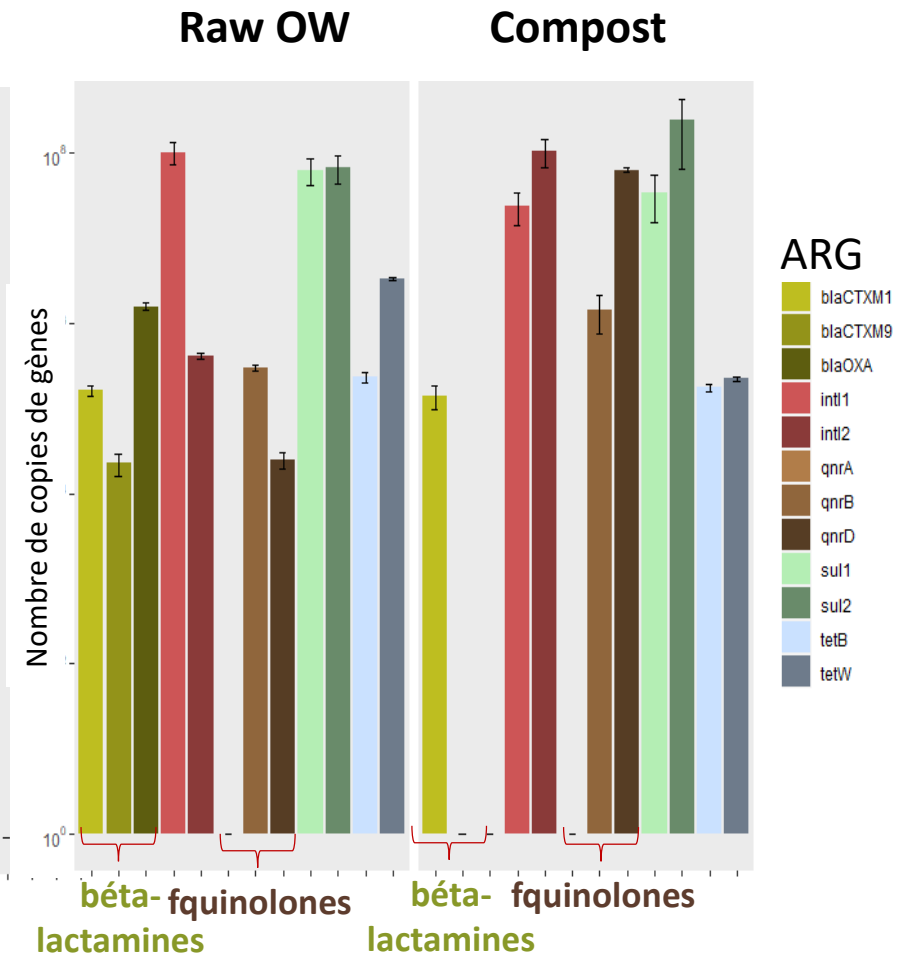
- fortes concentrations en antibiotiques déchets bruts, produits digérés (fluoroquinolones, tétracyclines)

- compostage : 

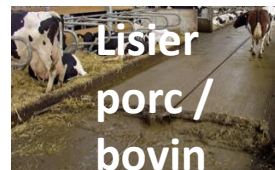
WWTP La Réunion



WWTP Colmar



Estimation apport GRA et EGM aux sols



Lisier
porc /
bovin

10^5 à 10^8
copies d'un
GRA / g ou ml
d'échantillon

10^5 à 10^{10} copies GRA /
g ou ml d'échantillon
(AGROCAPI –
littérature)

Doses épandues



AURIN : 1,460 T/ha

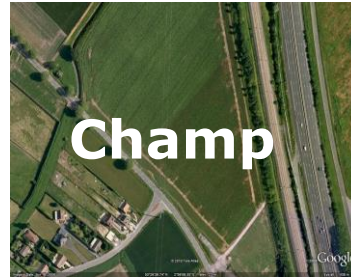
GRANURIN : 0,889 T/ha

Lisier : 20 T/ha

$1,5 \times 10^{11}$ à 10^{13} copies / T / ha

$8,9 \times 10^{10}$ à 10^{12} copies / T / ha

2×10^{14} à 10^{17} copies / T / ha

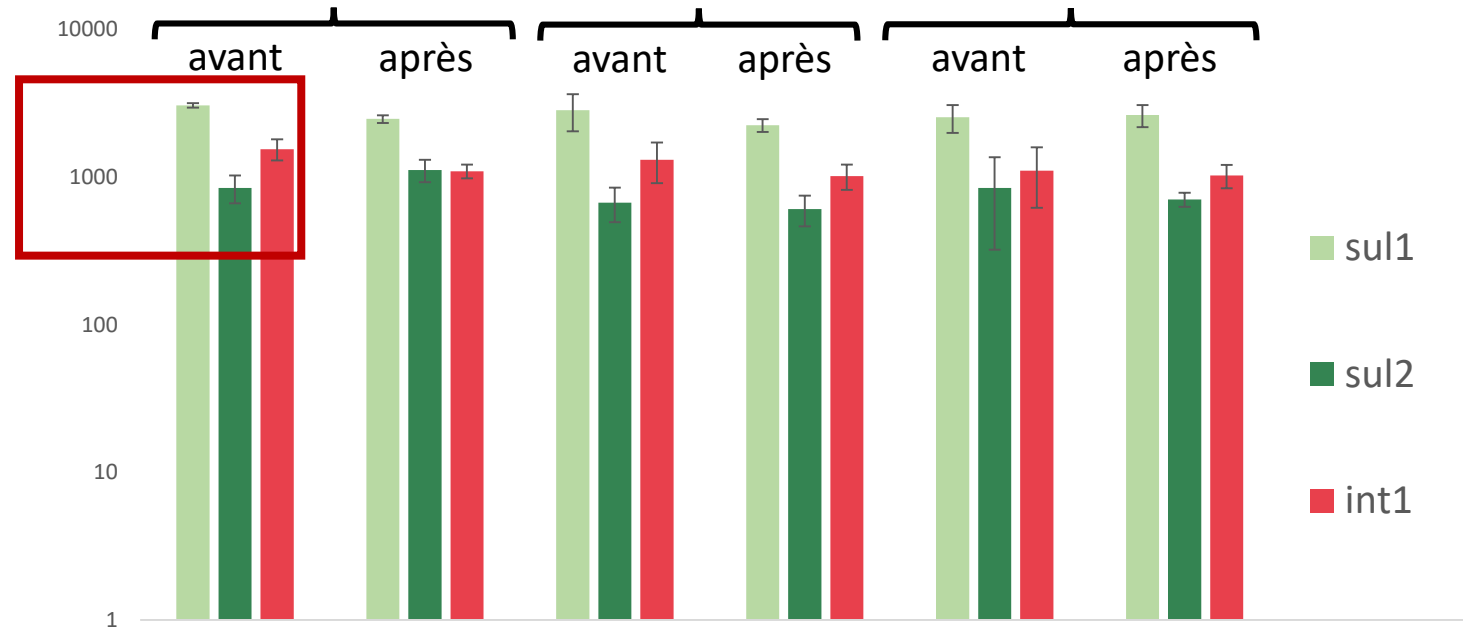


Champ

Résultats – Dissémination des GRA et EGM dans les sols

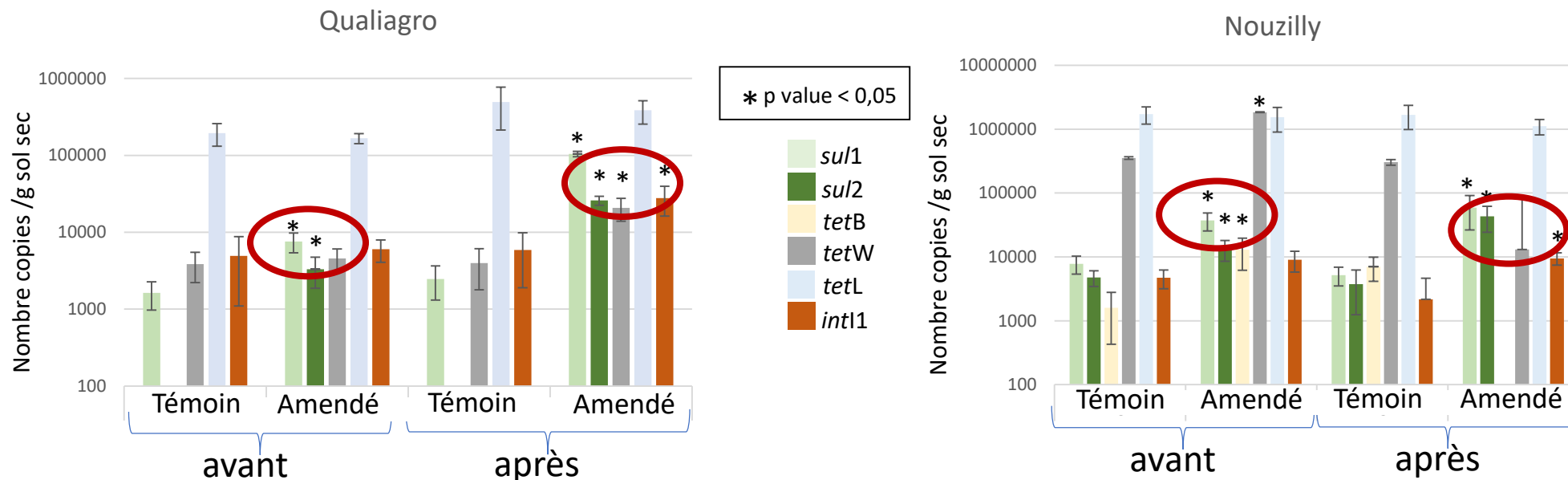


- Pas de détection de GRA ou EGM « à risque » (*qnr*, *intI2*)
- Pas d'enrichissement significatif en gènes présents initialement dans les produits (*sul*, *tet*, *intI1*)



Résultats : GRA et EGM dans les sols amendés avec fumier de bovin

(projet DABARES du plan ECOANTIBIO)



Présence des GRA (10^3 à 10^6) et EGM (5×10^3 à 10^5) dans les sols avant et 1 mois après épandage de fumier de bovins

Effet court terme et long terme :

Augmentation significative du nombre de copies de *sul1*, *sul2*, *tetB/W* et *int1* 1 mois après épandage de fumier

Apport populations exogènes et/ou augmentation populations autochtones

Le projet pour le LEM

**Merci,
Questions ?**