

**PROJET ANR "EVALUFQ-VOL" : PERSISTANCE DES ENTEROBACTERIACAE
RESISTANTES AUX FLUOROQUINOLONES DANS LE SOL APRES EPANDAGE
DE FUMIER DE VOLAILLES**

**P. Dabert¹, A.-M. Pourcher¹, C. Ziebal¹, M. Kervarrec¹, S. Le Roux¹, R. Maurice²,
P. Cotinet³, A. Jadas-Hécart⁴, P.-Y. Communal⁴, R. Moraru⁵ et I. Kempf²**

¹*Cemagref, 17 avenue de Cucillé, 35044 RENNES*

²*ANSES Laboratoire de Ploufragan/Plouzané, BP 53, 22440 PLOUFRAGAN*

³*Chambre Régionale d'Agriculture de Bretagne, ZAC Atalante Champeaux, 35042 RENNES*

⁴*Université d'Angers / LEESA, 2 boulevard Lavoisier, 49045 ANGERS*

⁵*Universitatea de Stiinte Agricole, IASI IASI, ROUMANIE*

patrick.dabert@cemagref.fr

RESUME

Deux fumiers frais, l'un issu de poulets de chair conventionnels non traités et l'autre de poulets traités à l'enrofloxacin (BaytrilND) pendant cinq jours à la dose thérapeutique, ont été épandus sur céréales à raison de 8 T /ha. Une quantification des entérobactéries et des résidus d'antibiotique a été réalisée sur les fumiers à la sortie du bâtiment d'élevage et dans le sol pendant 2 mois après épandage. La proportion de bactéries résistantes à 32 mg/L de ciprofloxacine (métabolite de l'enrofloxacin) dans les fumiers en sortie du bâtiment était inférieure à 0,003% pour les animaux non traités et d'environ 2% pour les animaux traités. Les concentrations en enrofloxacin et ciprofloxacine correspondantes étaient de 11 et 1 mg/kg pour les fumiers d'animaux traités respectivement, et inférieures à la limite de quantification pour les fumiers d'animaux non traités. L'apport de fumier a augmenté d'un facteur 10 les teneurs en entérobactéries présentes dans le sol et a conduit à des concentrations en enrofloxacin voisines de 20 µg/kg et en limite de quantification pour la ciprofloxacine. Ces teneurs en antibiotiques ont peu évolué au cours des deux mois suivant l'épandage. Aucune entérobactérie résistante à la ciprofloxacine n'a été observée dans le sol épandu avec du fumier d'animaux non traités. En revanche, les bactéries résistantes à 1 mg /L de ciprofloxacine représentaient environ 60% des entérobactéries totales 7 jours après l'épandage du fumier d'animaux traités. Cette proportion a diminué au cours du temps et aucune résistance n'a été observée un mois après l'épandage. Des *Escherichia coli* (bactérie fécale) ont cependant été détectés deux mois après l'épandage. 114 colonies recueillies tout au long de l'expérience ont été analysées par typage moléculaire (PCR ERIC). L'analyse des profils distingue 51 souches représentées par une à 19 colonies. Elle démontre la persistance d'une souche depuis le fumier traité jusqu'au sol 7 jours après l'épandage et la persistance d'une autre souche d'*E. coli* sur le sol pendant au moins 41 jours.

ABSTRACT

Anr project "evalufq-vol": persistence of fluoroquinolon resistant enterobacteriaceae on soil surface after poultry manure application.

Two fresh manure, one from broiler conventional untreated and the other from chickens treated with enrofloxacin (BaytrilND) for five days at the therapeutic dose, have been applied to cereals at 8 T / ha. Quantification of enterobacteria and antibiotic residues was conducted on manure leaving the barn and land for 2 months after application. The proportion of bacteria resistant to 32 mg / L of ciprofloxacin (metabolite of enrofloxacin) in manure at the output of the building was less than 0.003% for untreated animals and about 2% for treated animals. The concentrations of enrofloxacin and ciprofloxacin were respectively 11 and 1 mg / kg for animals treated manure, and below the limit of quantification (LOQ) for the manure of untreated animals. The manure application increased by 10-fold the level of enterobacteria in soil and led to concentrations of enrofloxacin close to 20 µg / kg and LOQ for ciprofloxacin. These levels of antibiotics did not really change over two months after application. No enterobacteria resistant to ciprofloxacin was observed in soil receiving manure from untreated animals. However, bacteria resistant to more than 1 mg / L of ciprofloxacin accounted for about 60% of total enterobacteria 7 days after application of manure from treated animals. This proportion decreased over time and no resistance was observed one month after application. *Escherichia coli* (faecal bacteria) were detected two months after application. 114 colonies collected throughout the experiment were analyzed by a molecular typing method (ERIC PCR). The analysis of the profiles distinguished 51 strains represented by one to 19 colonies. It demonstrated the persistence of a strain from the treated manure up to soil until 7 days after application and the persistence of another strain of *E. coli* on soil for at least 41 days.

INTRODUCTION

Les travaux présentés s'intègrent dans le projet ANR "Evalu FQ vol" qui a pour objectif majeur d'analyser le rapport bénéfice/risque apporté par l'utilisation des fluoroquinolones (FQ) en élevage de poulets de chair vis-à-vis de l'animal, l'homme et l'environnement. En effet, l'utilisation d'antibiotiques chez les volailles contribue à l'apparition de bactéries résistantes susceptibles d'être transmises à l'homme, essentiellement par l'alimentation. Ainsi, certains pays ont interdit l'usage des FQ en aviculture en raison du risque de sélection de souches de *Campylobacter* résistantes. Toutefois, le transfert des déjections animales dans l'environnement par des pratiques telles que l'épandage de fumier peut participer à la dissémination de ces bactéries résistantes. La question se pose alors des flux de germes disséminés dans l'environnement, des dangers de persistance de ces microorganismes dans les sols, de leur capacité à transférer leurs gènes de résistance à des bactéries de l'environnement et de la constitution de réservoirs de résistance environnementaux.

C'est dans ce contexte que deux fumiers, l'un issu d'animaux non traités et l'autre d'animaux traités aux fluoroquinolones ont été épandus sur des sols de la station expérimentale de Kerguéhennec. Des dénombrements d'entérobactéries (groupe microbien incluant la bactérie fécale *Escherichia coli*) ont été réalisés (i) sur les fumiers à la sortie du bâtiment sur le site de Ploufragan, (ii) lors de leur épandage après transfert en camion sur le site de Kerguéhennec et (iii) dans le sol après épandage. Les souches isolées ont été analysées par une technique de typage de l'ADN afin d'étudier la diversité des souches résistantes et de mieux cerner leur évolution dans le sol.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Elevage des animaux et épandage des fumiers

Deux lots de poulets à croissance rapide (Ross jaune PM3) ont été élevés sur litière à la station expérimentale de l'AFSSA Ploufragan dans deux salles de 216 m² à une densité de 20,5 poulets au m². La litière, composée de copeaux de bois non traités (Copobox de chez SISCA, copeaux volailles dépoussiérés), a été déposée à raison d'environ 5 kg/m².

Un lot (4400 poulets) d'environ 1,120 kg lors du premier jour de traitement, a été traité par l'enrofloxacin (Baytril 10% solution orale) donnée dans l'eau de boisson à 24 jours d'âge pendant 5 jours. Le poids des oiseaux a été évalué chaque jour de manière à obtenir une posologie de 10 mg/kg. Les autres oiseaux sont restés non traités. La conduite du

troupeau a été gérée de manière à limiter les contaminations entre oiseaux traités et non traités

Les oiseaux sont partis à l'abattoir à 35 jours d'âge. Les fumiers ont été recueillis 12h après la sortie des animaux et transportés par camion à la station expérimentale de la Chambre d'agriculture de Kerguéhennec où ils ont été épandus 12h plus tard sur trois parcelles de céréales, soit environ huit jours après l'arrêt du traitement des oiseaux. L'épandage a été réalisé à la main à raison de 8 T/ha.

Des prélèvements de fumier ont été réalisés en sortie de bâtiment d'élevage et au moment de l'épandage, tandis que des prélèvements de sol ont été effectués avant et après épandage. Pour chaque parcelle, environ 500g de sol ont été prélevés lors de 5 carottages et congelés (analyses chimiques) ou analysés (bactériologie) dans les 24 heures qui ont suivi le prélèvement. L'évolution des teneurs en antibiotique et le nombre de bactéries résistantes à la ciprofloxacine (métabolite de l'enrofloxacin) ont été suivis du 19 février (6 jours avant l'épandage) au 26 mai 2009 (soit 90 jours après épandage)..

1.2. Quantification des antibiotiques dans les sols

Un gramme d'échantillon broyé a été soumis à une série d'extractions comprenant une agitation par vortex (1 min), 15 min dans un bac à ultrasons et une centrifugation à 4 000 rpm pendant 5 minutes. Les extraits obtenus ont été filtrés sur nylon de 0,45 µm avant percolation sur cartouche SAX. Après séchage de la cartouche sous azote, l'enrofloxacin a été éluée par 4mL d'ammoniaque à 6% dans du méthanol. L'extrait a été évaporé sous azote à un volume inférieur à 200µL. Un passage aux ultrasons durant 15 minutes a été parfois nécessaire pour décoller le résidu sec des parois du tube headspace. Le résidu a été repris par 1 mL de phase mobile (eau acidifiée par de l'acide formique (99.8 / 0.2) (v/v)) avant analyse par HPLC couplée à une spectrométrie de masse en tandem.

1.3. Dénombrement des entérobactéries

La proportion d'entérobactéries résistantes à la ciprofloxacine a été évaluée par dénombrement des colonies sur le milieu Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar (OXOID, France) contenant de 0 à 64 mg/L de ciprofloxacine. Dix grammes de fumier ont été mélangés à 90 mL d'eau peptonée. Les échantillons de sol ont été dilués au demi dans l'eau peptonée. Après agitation, une série de dilutions a été réalisée au 1/10^{ème} et chaque dilution a été ensemencée sur le milieu spécifique par incorporation en double couche. Les dénombrements ont été réalisés après 24h d'incubation à 37°C. Dix colonies présentes sur les milieux VRBG sans ou avec les plus fortes concentrations d'antibiotique ont été conservées en milieu Tryptone Soy Yeast Extract (TSYE, Biokar)

glycérol 5% à -80°C afin (i) de pouvoir comparer les profils génomiques des souches résistantes à la ciprofloxacine dans les fientes des animaux traités et non traités et (ii) de les identifier à posteriori par galerie Api 20E. Les résultats des dénombrements sont exprimés en gramme de matière brute (MB).

1.3. Typage des entérobactéries par ERIC-PCR

L'ensemble des souches congelées a été analysé par typage moléculaire à l'aide de la technique de PCR-ERIC (*Enterobacteriaceae* repetitive intergenic consensus-PCR, Burr et al. 1998). Cette technique est basée sur l'amplification de fragments chromosomiques bactériens à l'aide d'amorces ciblant des régions répétées des *Enterobacteriaceae*. Elle permet d'obtenir des profils génétiques qui sont utilisés pour classer les souches entre elles (De Bruijn 1992).

Dans la pratique, les isolats congelés sont ensemencés en milieu TSYE et incubés 24 heures à 37°C. Une suspension dense de bactéries est réalisée dans 1 mL d'eau stérile et centrifugée à 5000 g pendant 5 minutes. Le culot bactérien est repris dans 1 mL de Tampon PBS-Tween (NaCl 8g/L ; KCl 0,2g/L ; Na₂HPO₄ 1,44g/L ; KH₂PO₄ 0,24g/L ; 0,05% Tween 80 (p/v)). Cette nouvelle solution est incubée 5 minutes à 100°C pour lyser les cellules sous l'action combinée du détergent Tween et de la température. La solution est centrifugée à 12 000 g pendant 5 minutes. Le surnageant qui constitue le lysat est gardé au froid avant d'être utilisé rapidement (sous 24-48h). La PCR ERIC a été réalisée dans un volume final de 20 µl à partir de 1 µL de lysat frais et selon les conditions réactionnelles suivantes : tampon RedTaq 1X, dNTP 0,2 mM, 600 ng d'amorce ERIC 1 (GTAAGCTCCTGGGGATTAC), 700 ng d'amorce ERIC 2 (AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG) et 2U de RedTaq polymérase (SIGMA). Les conditions d'amplification en Mini MJ (Biorad) sont : dénaturation initiale 94°C-3min, puis 30 cycles de dénaturation 94°C-1min / hybridation 50°C-1min / élongation 72°C-3min suivis d'une élongation finale 72°C-5min. Les produits de PCR obtenus ont été analysés par électrophorèse en gel TBE 1X - agarose 1,5% en présence du marqueur de taille 100 bp ladder (Promega).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Caractérisation du fumier en sortie de bâtiment

Dans les fumiers en sortie du bâtiment, sur le milieu contenant 32 mg/L de ciprofloxacine, la proportion de bactéries résistantes était inférieure à 0,003% pour les animaux non traités et d'environ 2% pour les animaux traités (Tableau 1). *Escherichia coli* représentait 97% des 40 isolats identifiés sur les milieux avec ou sans antibiotique.

Les concentrations en enrofloxacin et ciprofloxacine correspondantes étaient de 11 et 1 mg/Kg pour les fumiers d'animaux traités respectivement, et inférieures à la limite de quantification pour les fumiers d'animaux non traités.

L'étape de transport a conduit à une diminution des concentrations en germes de 2 à 30 fois (données non montrées). Cette diminution peut s'expliquer par la montée en température des deux fumiers. En effet, des sondes placées dans les fumiers ont montré que la température a dépassé 50°C pendant plus de 10 heures.

2.2. Evolution de la concentration en antibiotique et persistance des entérobactéries dans le sol après épandage

Les teneurs en germes ont été suivies pendant 3 mois dans le sol des parcelles recevant du fumier d'animaux non traités (P101, 202, 301) et traités (P102, 201, 302). Avant l'épandage, les entérobactéries sont dénombrées à des concentrations de l'ordre de 10² bactéries / g de sol. Il s'agit d'espèces environnementales appartenant aux genres *Enterobacter*, *Serratia* ou *Klebsiella*. Aucune *E. coli* n'a été détectée dans les sols analysés avant l'épandage.

Suite à l'épandage, l'apport de fumier conduit à une augmentation plus ou moins rapide d'un facteur 10 à 100 des teneurs en entérobactéries présentes dans le sol (Figure 1). Cette augmentation est trop importante pour être liée uniquement aux germes fécaux apportés. Elle est vraisemblablement due en partie à l'apport de matière organique qui stimule la croissance de bactéries du sol comme cela a été observé par Gessel et al (2003) et Rufete et al. (2006). Quel que soit le type de fumier, les teneurs en entérobactéries diminuent ensuite progressivement pour atteindre le seuil de détection de la méthode (10 germes / g) en 8 semaines.

Les colonies détectées 7 jours après l'épandage sont majoritairement des *E. coli* tandis qu'elles correspondent à nouveau à des genres environnementaux 56 jours après l'épandage. Selon Snowdon et al. (1989) le taux de survie des bactéries entériques est de l'ordre de 12 semaines, mais les données de la littérature sont très variables, la survie des bactéries dans les sols dépendant de nombreux facteurs environnementaux tels que le pH, la nature du sol, la température, l'ensoleillement, l'humidité, la prédation ou la compétition avec les micro-organismes du sol (Chee-Sanford et al., 2009).

Juste après l'épandage, les concentrations en enrofloxacin sont voisines de 20 µg/kg et en limite de quantification pour la ciprofloxacine (Figure 2). Ensuite, les teneurs mesurées sont très variables mais peuvent être jusqu'à 25 fois plus importantes que la quantité initiale mesurée au jour 7. La grande variabilité observée reflète très probablement l'hétérogénéité de l'épandage du fumier sur le sol. Il

est intéressant de constater cependant que des concentrations locales d'enrofloxacin de 250 µg / Kg de sol sont encore détectables sur le sol 44 jours après épandage et que le niveau 0 d'avant l'épandage n'est pas atteint au jour 56. Il n'existe pas à notre connaissance de données sur les teneurs en ciprofloxacine dans les sols. La ciprofloxacine est détectée en beaucoup plus faible quantité (0 à 30 µg / Kg de sol) et de manière plus aléatoire au cours des deux mois suivant l'épandage.

La proportion de bactéries résistantes à la ciprofloxacine a été évaluée lors de chaque prélèvement de sol. Aucune entérobactérie résistante à la ciprofloxacine n'a été mise en évidence dans le sol des parcelles recevant du fumier d'animaux non traités. En revanche, il a bien été observé une résistance des entérobactéries dans les sols ayant reçu du fumier d'animaux traités (Figure 3). Ces bactéries, résistantes à des concentrations en ciprofloxacine de 0,5 à 16 mg /L, représentaient environ 60% des entérobactéries totales 7 jours après l'épandage du fumier d'animaux traités. Elles ont toutes été identifiées comme *E. coli*. Cette proportion a diminué au cours du temps et aucune résistance n'a été observée un mois après l'épandage. Un retour à un niveau de résistance initial a également été rapporté par Sengelov et al. (2003) qui ont étudié la persistance de bactéries hétérotrophes résistantes à la tétracycline dans des sols agricoles ayant reçu du lisier de porcs. Ils ont observé que le nombre de bactéries résistantes à la tétracycline augmentait après l'application du lisier mais que leur proportion, 5 mois après l'application, revenait à des niveaux similaires à ceux observés dans un sol sans lisier.

2.3. Typage moléculaire des entérobactéries sélectionnées

Le typage moléculaire des 114 colonies recueillies tout au long de l'expérience a été réalisé par PCR ERIC et analyse des profils génomiques sur gel d'agarose. La comparaison des profils obtenus révèle une grande diversité génétique avec 51 classes différentes regroupant entre une et 19 colonies. De plus, la moitié des classes observées est composée de singletons (29/51). Cette grande diversité conduit à observer une succession de variants (ou de souches) différents sur la plupart des prélèvements.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Burr et al., 1998. Letters in Applied Microbiology (27), 24–30.
 Chee-Sanford J.C., 2009. J. Environ. Qual. (38), 1086–1108.
 De Bruijn, 1992. Applied and Environ. Microbiol. (58), 2180–2187.
 Gessel P.D., 2004. Applied soil ecology (25), 237–243
 Kolpin, D.W., 2002. Environ. Sci. Technol. (36), 1202–1211.
 Rufete B. (2006) et al., Livestock Science (102), 211 – 215
 Snowdon, J.A., 1989. Waste Manage. Res. (7), 121–134.
 Sengelov G.Y et al. (2003) Environ. Int. (28), 587–595.

Le suivi des profils au cours du temps démontre que :
 (i) une même souche d'*E. coli* a été observée sensible à la ciprofloxacine dans les fumiers d'animaux non traités, ou résistante à 32 mg/L de ciprofloxacine dans les fumiers d'animaux traités. Cette observation suggère que cette souche est dominante dans la flore fécale des poulets et capable de devenir résistante à l'antibiotique pendant le traitement en élevage.
 (ii) une autre souche résistante, observée le jour de l'épandage dans le fumier issu des animaux traités, a persisté sur le sol jusqu'à 7 jours après l'épandage. Et enfin (iii) une même souche d'*E. coli*, résistante à des concentrations de ciprofloxacine de 1 mg/L a persisté sur le sol pendant au moins 41 jours.

CONCLUSION

Il ressort de cette étude :

- une forte variation des concentrations en antibiotiques et en entérobactéries mesurées dans le sol après épandage qui s'explique par l'hétérogénéité du sol et du fumier constitué d'agrégats de copeaux de bois et de fiente. Les teneurs en bactéries fécales et en antibiotiques peuvent donc différer au sein d'une même parcelle en fonction de la répartition du fumier sur le sol.
- l'enrofloxacin reste quantifiable pendant 2 mois, jusqu'à des teneurs de l'ordre de 250µg/ Kg traduisant une persistance de l'antibiotique dans les sols.
- des entérobactéries résistantes à 16 mg/L de ciprofloxacine sont capables de survivre au moins 20 jours sur le sol après épandage, tandis que des bactéries résistantes à 1 mg/L de ciprofloxacine sont détectables jusqu'à quatre semaines. La résistance à la ciprofloxacine étant généralement chromosomique, il est difficile d'évaluer la possibilité de sélection de la résistance et du transfert des gènes sur cette durée.
- il n'a pas été établi de corrélation entre la diversité génomique des entérobactéries et la résistance à la ciprofloxacine ou la durée de la survie dans le sol.

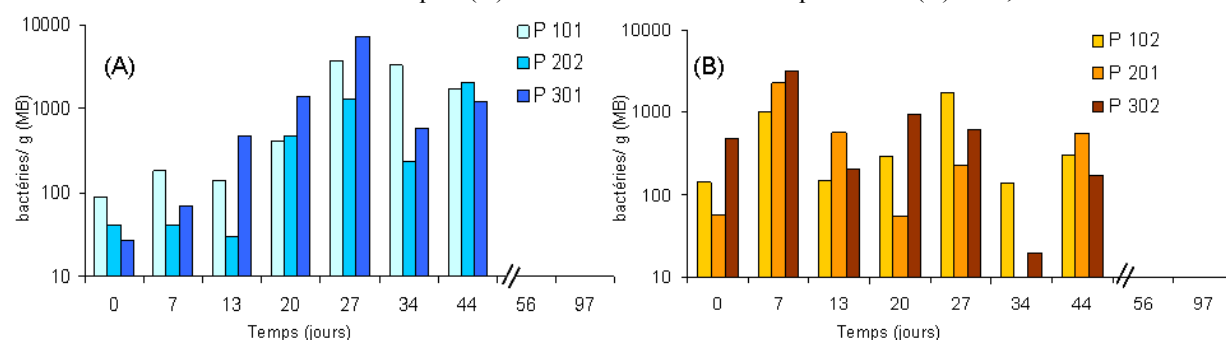
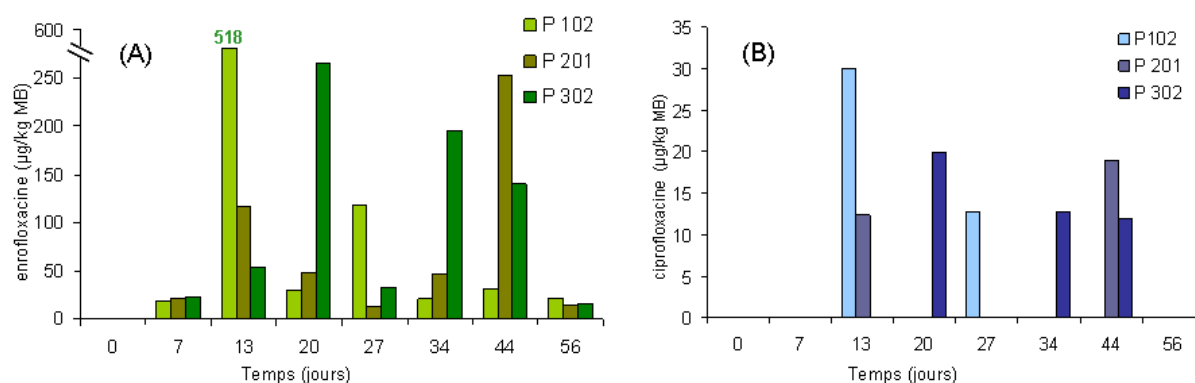
REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche dans le cadre du projet PNRA-007 : « Evaluation de l'utilisation des fluoroquinolones chez la volaille ».

Tableau 1. Concentrations en antibiotiques et en entérobactéries des fumiers recueillis en sortie de bâtiment des animaux traités ou non aux antibiotiques

| Fumier d'animaux | Concentration en enrofloxacin | Concentration en ciprofloxacine | Entérobactéries totales Germes/g | % d'entérobactéries résistantes sur milieu supplémenté en ciprofloxacine à | | | |
|------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|-----------------|-----------------|---------|
| | mg/Kg | mg/Kg | | 1 mg/L | 8 mg/L | 16 mg/L | 32 mg/L |
| non traités | < seuil | < seuil | 3,5 10 ⁶ | 0,1 | <0,003 | <0,003 | nd |
| traités | 11 | 1 | 9,9 10 ⁵ | nd | >3 ^a | >3 ^a | 1,8 |

nd : non déterminé; ^a plus de 300 colonies sur le milieu de culture à la dilution ensemencée (-2)

Figure 1 Evolution des concentrations en entérobactéries dans les 6 parcelles de sol épandues avec du fumier de volailles non traitées aux antibiotiques (A) ou traitées avec des fluoroquinolones (B). MB, matière brute.**Figure 2** Evolution des concentrations en enrofloxacin (A) et en ciprofloxacine (B) dans 3 parcelles de sol épandues avec du fumier de volailles traitées avec des fluoroquinolones. MB, matière brute.**Figure 3.** Suivi des teneurs moyennes en entérobactéries dénombrées sans antibiotique (0) et en présence de différentes concentrations en ciprofloxacine (0,5 à 16 mg/L) à partir des sols des trois parcelles ayant reçu du fumier d'animaux traités. Les barres indiquent les valeurs minimales et maximales observées. ND : non détecté;