

Déterminisme de la présence des bactéries pathogènes et antibiorésistantes d'origine humaine dans les zones humides fluviales

Determinism of the presence of pathogenic- and antibiotic-resistant bacteria of human origin in fluvial wetlands

Charles Henriot¹, @, Didier Hocquet^{1,2}, @, Xavier Bertrand^{1,2}, @, Gudrun Bornette¹, @

1 : Laboratoire Chrono-environnement (UMR CNRS 6249) - [Site web](#)
CNRS : UMR6249, Université de Franche-Comté
UFR Sciences et Techniques 16, route de Gray 25030 BESANCON - France
2 : Laboratoire d'hygiène hospitalière, CHRU Minjoz, Besançon

RÉSUMÉ

Les bactéries pathogènes et antibiorésistantes d'origine humaine suscitent de plus en plus de préoccupations. Leur établissement et développement dans les écosystèmes reste une question ouverte. Les zones humides étant potentiellement contaminées par les flux hydriques provenant des cours d'eau, et présentant potentiellement des conditions environnementales favorables au développement bactérien, on peut imaginer que certaines d'entre elles pourraient constituer une niche pour les bactéries d'origine humaine. Pour répondre à cette question, il est nécessaire de déterminer le niveau de contamination et la connectivité existant entre les différentes masses d'eau de l'hydrosystème (rivière, zones humides, nappe de versant, etc.). Pour cela, 16 zones humides, réparties le long d'un large gradient d'eutrophisation et de variabilité thermique, ont été sélectionnées au sein de 3 rivières du massif jurassien distinctes en termes de fonctionnement et de pression anthropique (l'Ain, le Doubs et la Loue). Pendant un an, les caractéristiques physico-chimiques de l'eau et des sédiments ont été mesurées. Durant la même période, trois bactéries potentiellement pathogènes pour l'Homme - *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* - ont été échantillonnées dans l'ensemble des sites (zones humides et rivières). Les résultats très prometteurs démontrent que ces bactéries d'origine humaine sont en partie au moins dispersées par les cours d'eau dans les zones humides, même si l'étude suggère d'autres sources et processus potentiels de contamination.

ABSTRACT

Human pathogenic and antibiotic resistant bacteria raise more and more concerns. Their survival and development within ecosystems is an open question. Wetlands being potentially contaminated by hydric fluxes from the rivers, and presenting environmental conditions potentially favorable to the bacterial development, we can imagine that some of them could constitute a niche for human bacteria. To answer this issue, it is necessary to determine the contamination level and the connectivity existing between the different water bodies (rivers, wetlands, underground waters, etc.). Therefore, 16 wetlands, arranged along a wide eutrophication gradient and thermal variability, were selected within 3 rivers of the Jura Massif that greatly diverge in terms of functioning and anthropogenic pressure (the Ain, Doubs and Loue rivers). During one year, the physico-chemical characteristics of the water and the sediments were measured. During the same period, 3 bacteria potentially pathogenic for humans - *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* - were sampled in all sites (wetlands and rivers). Very promising results demonstrate that these human bacteria are at least in part dispersed by the rivers up to the wetlands, even if the study suggests other potential contamination sources and processes.

MOTS CLES

Bactéries antibiorésistantes, bactéries pathogènes, connectivité, niche écologique, zones humides

1 INTRODUCTION

Outre les polluants d'origine agricole et industrielle, les cours d'eau reçoivent des agents pathogènes d'origine animale et humaine. La dispersion des bactéries potentiellement pathogènes d'origine humaine par les rivières dépend de la connectivité superficielle et interstitielle entre les masses d'eau (Amoros and Bornette 2002, Anza et al. 2014), et de la capacité de ces bactéries à survivre lors des transferts longitudinaux, latéraux et verticaux entre les différents compartiments de la plaine alluviale. Cette survie fait potentiellement intervenir la vitesse de l'eau, sa teneur en éléments nutritifs, sa température, etc. (Anza et al. 2014). Ainsi, les zones humides potentiellement riches en nutriments, fréquemment connectées à la rivière et aux nappes, possédant des eaux stables thermiquement et calmes, sont donc de potentiels réservoirs pour les bactéries pathogènes d'origine humaine.

L'objectif du projet est de mener une étude pionnière sur la relation entre le fonctionnement des plaines alluviales et le risque sanitaire associé aux bactéries généralistes humaines potentiellement pathogènes libérées dans l'environnement (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*), en portant une attention particulière à leur antibio-résistance. Ces espèces sont des marqueurs de l'activité anthropique : elles sont généralement relâchées dans l'environnement via les STEPs (rejet des eaux usées traitées dans les cours d'eau et utilisation de boues d'épuration comme fertilisant, entre autres). L'hypothèse générale est que l'état trophique et thermique des zones humides, régis par leur fonctionnement hydraulique, hydrogéologique et anthropique, influencera directement la survie et la multiplication des bactéries rejetées dans ces écosystèmes et déterminera la susceptibilité des zones humides à constituer des réservoirs d'agents pathogènes humains.

2 METHODE

L'étude s'intéresse à 16 zones humides réparties selon un large gradient d'eutrophisation (en termes d'azote, de phosphore et de carbone organique dans l'eau) et de variabilité thermique (due à différents contextes hydrogéologiques et géomorphologiques), distribuées le long de 3 cours d'eau du massif jurassien (l'Ain, le Doubs et la Loue), distincts en termes de fonctionnement (connectivité à la nappe, pente, eutrophisation) et de pression anthropique (zones urbaines, pratiques agricoles, utilisation des sols dans les bassins versants). L'occupation des sols a été renseignée pour chaque bassin versant des 16 zones humides d'étude.

Nous avons documenté les paramètres de l'eau susceptibles d'influencer directement ou indirectement l'établissement et/ou le développement bactériologique dans chaque zone humide. La température est un des paramètres clé qui contrôle le fonctionnement d'une zone humide et renseigne sur sa connectivité avec la rivière et les nappes phréatiques. Elle a été mesurée automatiquement à un rythme horaire en utilisant des sondes immergées. 9 autres paramètres ont été mesurés chaque mois durant un an (04/2015-03/2016). La minéralisation de l'eau a été renseignée grâce à 3 paramètres mesurés *in situ* : la conductivité électrique, la concentration en carbonates et le pH. Les 6 paramètres restant ont été analysés en laboratoire grâce à des prélèvements d'eau effectués dans chaque zone humide, à chaque date d'échantillonnage. Les concentrations de l'eau en N-nitrate, N-ammonium et P-phosphates - nutriments clef de l'eutrophisation - ont été mesurés. Le carbone organique dissous (COD) informe sur la quantité de matière organique dans l'eau, la chlorophylle-a sur la productivité phytoplanctonique, et la concentration en oxygène dissous informe entre autres sur l'activité phytoplanctonique et microbienne.

L'étude se concentre sur 3 bactéries humaines potentiellement pathogènes - *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Pseudomonas aeruginosa* – choisies comme marqueurs de l'activité anthropique (eaux usées, hôpitaux, etc.), et pour leur capacité à acquérir un caractère antibiorésistant (risque sanitaire). Les analyses bactériologiques ont été réalisées par le CHRU de Besançon sur les mêmes échantillons d'eau que les mesures des paramètres physico-chimiques. Des analyses bactériologiques ont également été réalisées sur des échantillons d'eau provenant des cours d'eau afin de mesurer leur possible rôle dans la dispersion des bactéries.

Des analyses statistiques temporelles et spatiales ont été menées pour mettre en évidence les périodes/zones humides où les abondance bactériennes sont significativement plus élevées (test de Kruskal-Wallis), et dans le but de relier ces pics de contamination *i)* à la connectivité des zones humides concernées aux masses d'eau (rivière, nappe), *ii)* à leurs caractéristiques physico-chimiques (corrélations et analyse de redondance (RDA)) et *iii)* à de potentielles sources de contamination au sein du bassin versant (corrélations avec l'occupation des sols (pression agricole, etc.)).

3 RESULTATS ET DISCUSSION

Contrairement aux attentes, *P. aeruginosa* est absente de la quasi-totalité des zones humides et des dates d'échantillonnage : soit les eaux relâchées dans le bassin versant, notamment par les hôpitaux, sont très peu contaminées et/ou, plus probablement, les conditions environnementales ne permettent pas la survie de la bactérie dans l'environnement.

Les hydrosystèmes du Doubs, puis de la Loue, et enfin de l'Ain sont contaminés de manière significativement décroissante par *E. coli* BLSE (antibiorésistant). Le Doubs est également la rivière dans laquelle la pression anthropique est la plus forte (villes de Besançon et Dôle, pression agricole dans le bassin versant des zones humides). La répartition de *E. coli* BLSE diffère significativement entre les zones humides (présence et abondance, Kruskal-Wallis, $p=0.0005851$). Les zones humides les plus contaminées sont également les plus connectées à la rivière. Pour ces zones humides, le cours d'eau est potentiellement le principal vecteur de contamination. Les pics de contamination sont également positivement corrélés aux débits des rivières (et aux précipitations), suggérant soit que la rivière déborde de manière plus importante/durable lorsque les débits sont élevés, soit que les fortes pluies conduisent à l'engorgement des STEPs et l'augmentation consécutive de la contamination du cours d'eau récepteur (situation soulignée pendant la période d'étude dans les rapports des STEPs). Enfin, de fortes pluviosités peuvent également conduire à une augmentation du ruissellement sur les terres agricoles, et une augmentation du flux contaminant si ces terres sont-elles mêmes contaminées (e.g. par des boues d'épuration). *E. coli* BLSE est la seule bactérie étudiée à présenter des variations saisonnières significatives (p -value= 0.0001865 , Kruskal-Wallis ; abondance plus élevée en hiver - janvier, février, mars-), ce qui semble lié aux pics de précipitations et de débits, eux aussi hivernaux.

Comme pour *E. coli* BLSE, *K. pneumoniae* est significativement plus abondante dans l'hydrosystème du Doubs, puis dans la Loue, et enfin dans l'Ain. La répartition de *K. pneumoniae* diffère également significativement entre les zones humides (présence et abondance, Kruskal-Wallis $p=0.01929$). Aucune corrélation n'est observée entre cours d'eau et zones humides, même si un certain synchronisme apparaît entre la contamination des zones humides et celle de la rivière, ce qui suggère une voie de contamination partagée. En revanche, les zones humides les plus contaminées ont des caractéristiques communes : eaux peu profondes, chaudes en été et eutrophes. De plus, les contaminations sont principalement estivales. Cela suggère que ces zones humides présentent des caractéristiques écologiques favorables à la survie de *K. pneumoniae*.

La répartition de *E. coli* B2 (pathogène) diffère également entre les zones humides (présence et abondance, Kruskal-Wallis, $p=0.06994$). Ces bactéries sont présentes de manière plus abondante dans la basse vallée de l'Ain, et notamment dans deux sites : l'un connecté en permanence à la rivière à l'aval, et l'autre fortement alimenté par la nappe de versant. La contamination pourrait, dans cette vallée alluviale, emprunter des voies différentes suivant les sites : la rivière ou les nappes (dont la contamination pourrait résulter de procédés différents).

Enfin, on note qu'aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la contamination des zones humides par les bactéries et l'occupation des sols dans leur bassin versant respectif.

4 CONCLUSION

Cette étude suggère deux scénarios potentiels de contamination des zones humides, dépendant de l'espèce et de ses caractéristiques : soit la contamination est due à la connectivité entre la zone humide et la rivière (*E. coli* BLSE), soit cette contamination proviendrait de la nappe de versant, qui pourrait elle-même être contaminée (*E. coli* B2). L'étude suggère également que certaines zones humides, peu profondes, chaudes en été, et eutrophes, pourraient constituer des habitats favorables à la survie de *K. pneumoniae*. Ces observations, si elles sont confirmées, peuvent être déterminantes dans la mise en place et l'application des politiques publiques en matière d'épuration des eaux contaminées, mais également de la libération des produits issus des STEPs dans l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- Amoros, C. & Bornette, G. 2002. Connectivity and biocomplexity in water-bodies riverine floodplains. *Freshwater Biology*, 47, 761-776.
- Anza, I., Vidal, D., Laguna, C., Diaz-Sanchez, S., Sanchez, S., Chicote, A., Florin, M., Mateo, R. 2014. Eutrophication and Bacterial Pathogens as Risk Factors for Avian Botulism Outbreaks in Wetlands Receiving Effluents from Urban Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(14), 4251-4259.