



HAL
open science

Potentiel de dispersion de l'antibiotrophie le long du continuum lisier-sol-sédiment dans les agrosystèmes contaminés par la sulfaméthazine

Loren Billet

► **To cite this version:**

Loren Billet. Potentiel de dispersion de l'antibiotrophie le long du continuum lisier-sol-sédiment dans les agrosystèmes contaminés par la sulfaméthazine. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1280 . tel-03714128

HAL Id: tel-03714128

<https://theses.hal.science/tel-03714128>

Submitted on 5 Jul 2022

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.



N°d'ordre NNT :

2021LYSE1280

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341
Evolution Ecosystème Microbiologie et Modélisation

Spécialité de doctorat :
Ecologie microbienne

Soutenue publiquement le 09/12/2021, par :
Loren Billet

**Potentiel de dispersion de
l'antibiotrophie le long du continuum
lisier-sol-sédiment dans les
agrosystèmes contaminés par la
sulfaméthazine**

Devant le jury composé de :

Agnès RICHAUME	Professeur, Université Lyon 1	Présidente
Lise BARTHELMEBS	Professeur, Université de Perpignan	Rapporteure
Gwenaël IMFELD	Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg	Rapporteur
Jean MARTINS	Directeur de Recherche, CNRS, Grenoble	Examineur
Stéphane PESCE	Directeur de Recherche, INRAE, Villeurbanne	Directeur de thèse
Marion DEVERS-LAMRANI	Ingénieur d'Etude, INRAE, Dijon	Co-directrice de thèse



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Préparée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1
Ecole Doctorale N° 341

Evolution Ecosystème Microbiologie et Modélisation

Opérée au sein de
Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
Laboratoire EMFEED, UMR Agroécologie, Dijon
Laboratoire EMA, UR Riverly, Villeurbanne

Spécialité de doctorat :
Ecologie microbienne

Soutenue publiquement le 09/12/2021, par :
Loren Billet

POTENTIEL DE DISPERSION DE L'ANTIBIOTROPHIE LE LONG DU CONTINUUM LISIER-SOL-SÉDIMENT DANS LES AGROSYSTEMES CONTAMINÉS PAR LA SULFAMÉTHAZINE

Devant le jury composé de :

Lise BARTHELMEBS	Professeur, Université de Perpignan	<i>Rapportrice</i>
Gwenaël IMFELD	Directeur de Recherche, CNRS Strasbourg	<i>Rapporteur</i>
Agnès RICHAUME	Professeur, Université Lyon I	<i>Examinatrice</i>
Jean MARTINS	Directeur de Recherche, CNRS, Grenoble	<i>Examineur</i>
Marion DEVERS-LAMRANI	Ingénieur d'Etude, INRAE, Dijon	<i>Co-Directrice de Thèse</i>
Stéphane PESCE	Directeur de Recherche, INRAE, Villeurbanne	<i>Directeur de Thèse</i>

A ceux qui savent qu'ils ne sauront jamais,

REMERCIEMENTS

Au détour d'un couloir, à la surface d'une paillasse ou dans le confort d'un bureau, comme une mélodie familière ...« *C'est pas ça qui va faire avancer ta thèse, va bosser !* ». Mais pour la bourrique que je suis chacun de ces moments conviviaux ont été essentiels et devraient peut-être comme l'ont suggéré certains faire l'objet d'un chapitre entier dans ce manuscrit de thèse. Mais par soucis pour l'environnement (et un peu par paresse), on va rester le plus classique et synthétique possible.

Je remercie tout d'abord mes deux directeurs, Stéphane Pesce et Marion Devers. Stéphane, tes conseils et connaissances ont permis de bonifier ces travaux tant au moment de leur conception que de leur valorisation. Tout en me donnant un cadre, tu m'as prêtée une oreille bienveillante et attentive qui m'a permis d'explorer ce sujet de façon constructive. Un grand merci, j'espère emporter avec moi un peu de tes qualités qui caractérisent les grands « p'tits chefs ». Marion, ces quelques lignes seront insuffisantes pour exprimer toute la gratitude amoncelée le long de ces 5 années. Pendant cette aventure, tu m'as irradiée de ton énergie (digne d'une fission nucléaire) stimulant ma curiosité et me motivant à aller toujours plus loin tout en me fournissant un cadre pour éviter que je m'égare. Ton avis m'a toujours énormément importé (ne tient s'il te plait pas rigueur à mon esprit de contradiction) merci de m'en avoir toujours fait part. Je remercie aussi l'amie qui s'est missionnée d'éveiller mes papilles à des saveurs toujours plus « spéciales », tout en se souciant de me faire éliminer des calories.

A mon équipe dijonnaise, merci de m'avoir chaleureusement accompagnée, chacun d'entre vous m'a enrichie à sa manière et mériterait au moins un paragraphe. Fabrice, merci de m'avoir introduite dans l'équipe et de t'être intéressé à chacune des étapes de mon parcours, ta bienveillance nous est enviée. Je remercie aussi chaleureusement Aymé pour son aide et son intérêt alors qu'il n'était plus contraint par un rapport encadré-encadrant (en passant merci de t'être assuré de mon avenir post-thèse même si je ne doute pas que ça soit une façon d'avoir enfin la paix). Merci aux deux mamans de l'équipe Nadine et son acolyte Marie Christine pour les bons moments passés ensemble au labo comme à la potinière, merci de m'avoir partagé vos connaissances parfois historiques sur la vie du centre. Merci Arnaud pour ton aide info sans jugement. Merci David pour ton talent à raconter les blagues, Laurent pour ta bienveillance, Stéphane pour ton pâté, Jérémie pour ton approvisionnement en bonbons, Samuel et Sara mes équivalents gourmands. Merci aussi à ceux qui ont été de passage, l'étoile filante Sylvia, les rares p'tits gars Corentin et Olivier. Un grand merci aussi aux supers nanas de l'équipe que ça soit les petites nouvelles Camilla, Mathilde, Marine et Carrie (des futures grimpeuses de talent à n'en pas

douter) ou les ténors de la potinière. A commencer par celles ayant partagé mon bureau, Sarah qui a fui pour avoir une chance de travailler, Laly qui pour mon plus grand plaisir n'a pas tardé à retrouver le bureau où je m'étais exilée et Tiffany que j'ai même rejoint à l'autre bout de la France pour « travailler ». Merci aussi Clémence ta voix et ton humour ont égaillé plus d'une de mes soirées. Et puis pour finir je voudrais dire merci à Sana, une amie au tempérament volcanique qui affole tous les sismographes. L'équipe EMFEED n'étant pas isolé du reste du monde, il me reste tant d'autres à remercier, les rivaux amicaux du deuxième Pauline¹, Pierre-Antoine, Thibault, Adiilah et Stéphanie pour ne citer qu'eux. Mais aussi l'énergisante Isilda, et Emilie qui m'a suivi dans ma lubie de remplacer le plastique par la vieille verrerie.

A mon équipe Lyonnaise, merci de m'avoir accueillie même si c'était pour moins longtemps que prévu, vos mots-fléchés et apéro-pots me laisseront un bon souvenir. Merci Bernard, mascotte de l'équipe (et peut-être même de tout le site), ton aide et ton humour ont été plus que bienvenus. Merci Bernadette pour ton extrême gentillesse et ton soutien dans les manips. Merci à Christophe même s'il reste un baromètre météorologique peu fiable. Merci Chloé pour les discussions concernant tant mes données que nos goûts en mangas. Merci à Ayanleh et Laura, mes deux agents immobiliers de choc, nos débats me manquent. Merci aux anciens membres Anaïs, Gilles et Diane.

Au membre du projet ANTIBIOTOX et de mon comité de suivi de thèse, merci de votre participation aux discussions, de votre bienveillance et pour les chimistes clermontois de votre contribution aux expériences.

Je remercie aussi mes amis rencontrés le long du parcours : Selya et Mélanie mes hôtes lyonnaises à 5 étoiles, Aline ma princesse parisienne, Ludivine et Hélène mes binômes dijonnaises, les Grimpipestes qui se sont laissés infiltrer et ne savent plus comment se débarrasser de moi. J'aimerais remercier tous particulièrement Marine, boudouille de cœur qui m'a toujours accompagnée.

Enfin, je remercie celle qu'on ne choisit pas mais que je n'aurais pas voulu différente, ma famille ! Présente tout du long vous m'avez donné la force et l'envie d'y croire. Merci maman, tu as écouté et lu scrupuleusement tout ce que j'ai fait et bien que n'en percevant pas toujours le sens tu l'as jugé aussi inestimable que mes premiers « dessins » (de l'art abstrait pour sûr), qu'est-ce que tu peux être biaisée ! Merci ma sœur, discrète mais toujours présente tu as toujours su me remotiver et me reconforter en relâchant un peu de sérieux. Merci papa, ta réapparition m'a rendue plus légère notamment grâce à nos sorties sportives. Merci l'arsouille de frère, petite brute

¹ +1 (tu sauras)

pleine d'amour. Merci au cousines, au tontons, aux tantes, enfin à toute la tripotée de cœur et de sang qui m'a apportée tant de joie.

J'exprime toute ma gratitude à Lise Barthelmebs et Gwenaël Imfeld pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à Agnès Richaume et Arnaud Foulquier en tant qu'examineurs.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE	17
I. Dispersion des antibiotiques et des antibiorésistances dans l'environnement	17
1. Etat des lieux de la contamination antibiotique dans l'environnement : sources et circulation.....	17
2. Adaptation bactérienne à l'exposition environnementale aux antibiotiques.....	19
2.1. Niveau d'exposition et développement des antibiorésistances.....	19
2.2. Niveau d'exposition et dispersion des antibiorésistances	20
2.2.1. Un constat, l'omniprésence des antibiorésistances	20
2.2.2. Dispersion dans la communauté.....	20
2.2.3. Dispersion dans l'environnement	22
2.2.3.1. Point chaud de dispersion	22
2.2.3.2. Dispersion par invasion de bactéries résistantes	23
2.2.3.3. Dispersion par le matériel génétique.....	24
II. L'antibiotrophie	24
1. Historique	24
2. Une fonction plutôt répandue	25
3. Origine et évolution de l'antibiotrophie.....	27
4. Une variante d'un mécanisme connu de résistance aux antibiotiques ?	28
5. Les conséquences possibles de l'antibiotrophie.....	30
5.1. D'un point de vue bactérien.....	30
5.1.1. Augmentation du potentiel de dispersion.....	30
5.1.2. Compétitivité accrue des bactéries résistantes	30
5.1.3. Perturbation des équilibres régis par les bactéries productrices d'antibiotiques.....	31
5.2. D'un point de vue anthropocentré.....	31
5.2.1. Un risque sanitaire.....	31
5.2.2. Un outil de bioremédiation	32
PRÉSENTATION GÉNÉRALE DU SUJET DE THÈSE	35
CHAPITRE 1	39
ARTICLE 1 - Antibiotrophy: Key function for antibiotic-resistant bacteria to colonize soils—Case of sulfamethazine-degrading <i>Microbacterium</i> sp. C448	43
I. Introduction.....	45
II. Materials and methods.....	48

1.	Collection and analyses of soils and manure.....	48
2.	Microcosm experiment setup	48
3.	SMZ fate monitoring	49
3.1.	SMZ mineralization monitoring	49
3.2.	SMZ quantification.....	49
4.	Soil DNA extraction and real-time PCR.....	50
5.	16S rDNA sequencing and bioinformatic analysis.....	51
6.	Statistical analyses	51
III.	Results and discussion.....	52
1.	The soils, regardless of manure amendment, did not have innate antibiographic potential or activity	52
2.	Microbacterium sp. C448 needs SMZ to become established in the soil community.....	53
3.	The presence of genetic potential for antibiography in soil does not guarantee its expression	54
4.	Antibiography efficiency depends on SMZ biocidal impact.....	56
5.	Antibiography efficiency depends on soil permissiveness to invasion of manure-originating OTUs and resulting trophic competition.....	60
IV.	Conclusion.....	61
ARTICLE 2 - Experimental evidence for manure-borne bacteria invasion in soil during a coalescent event: influence of the antibiotic sulfamethazine		63
I.	Introduction.....	65
II.	Material and method.....	67
1.	Collection and Analyses of Soils and Manure.....	67
2.	Microcosm Experiment Setup.....	67
3.	Soil DNA Extraction and 16S rDNA Sequencing.....	67
4.	Statistical Analyses.....	68
III.	Results	69
1.	Manure's effect on diversity in the soils communities.....	69
2.	Manure's effect on the relative abundance of OTUs.....	70
IV.	Discussion	73
V.	Conclusion	76
CHAPITRE 2		77
I.	Matériels et méthodes.....	81
1.	Les matrices telluriques et sédimentaires.....	81
1.1.	Collecte du sol et des sédiments	81
1.2.	Préparation des matrices telluriques	81
1.2.1.	Stérilisation du sol.....	81

1.2.2. Séparation pédologique.....	81
2. Dispositif expérimental en microcosmes.....	82
3. Suivi de la minéralisation de la sulfaméthazine.....	83
4. Les mesures culturales	83
4.1. Etude de la fraction cultivable des communautés totales et résistantes des sédiments.....	83
4.2. Quantification de <i>Microbacterium</i> sp. C448.....	84
5. Les mesures génomiques.....	84
5.1. PCR quantitative	84
5.2. Séquençage	84
6. Les mesures chimiques	85
7. Les mesures fonctionnelles.....	85
7.1. Minéralisation en point final	85
7.2. Enrichissement et isolement de bactéries antibiotrophes naturelles	86
II. Résultats	86
1. Evolution du potentiel de minéralisation dans les sédiments non inoculés avec <i>Microbacterium</i> sp. C448	87
2. Evolution du potentiel de minéralisation dans les sédiments inoculés avec <i>Microbacterium</i> sp. C448	90
3. Répartition spatiale de la sulfaméthazine et de l'ADMP au terme du mois d'incubation	94
4. Influence de la sulfaméthazine, de l'érosion et de l'antibiotrophie sur l'antibiorésistance	95
III. Discussion	98
1. Existence d'un potentiel naturel d'antibiotrophie dans les sédiments étudiés	98
2. Implantation de <i>Microbacterium</i> sp. C448 et de sa capacité antibiotrophe dans les sédiments suivant les modalités d'érosion.....	100
3. Impact de l'érosion sur la communauté sédimentaire.....	101
4. Impact de la sulfaméthazine sur les populations bactériennes résistantes	102
IV. CONCLUSION	103
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	105
I. Les transferts bactériens le long des continuums par évènements de coalescence, cas des agrosystèmes	105
1. Un continuum biologique observé mais mal compris	105
2. Focus sur l'antibiorésistance	107
II. L'antibiotrophie, une fonction à comprendre	112

1. Une dispersion mondiale véhiculée par bactérie	112
2. Une fonction indissociable de l'antibiorésistance.....	113
CONCLUSIONS	115
REFERENCE.....	117
ANNEXE A	135
ANNEXE B.....	145
ANNEXE C.....	161

ABRÉVIATIONS

ADMP : 2-amino-4,6-diméthylpyrimidine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNr : ADN ribosomique

ANOVA : analyse de la variance

C448 : *Microbacterium* sp. C448

DHPS : Dihydroptéroate Synthase

DW : Dry Weight

LB : Lysogeny Broth

HPLC : Chromatographie en phase liquide haute performance

OD_{600nm} : Optical density at 600 nm

OTU : Operational Taxonomic Unit

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGPR : Plant-Growth Promoting Bacteria

pH : potentiel hydrogène

PICT : pollution induced community tolerance

PS : poids sec

qPCR : quantitative PCR

rpm : rotation par minute

SMZ : sulfaméthazine

¹⁴C-SMZ : sulfaméthazine radio-marquée au carbone 14

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Résumé des principales sources d'antibiotiques dans l'environnement.

Figure 2 - Représentation schématique des différents types de transferts horizontaux.

Figure 3 - Pollution d'un système riverain par les effluents d'une station d'épuration : suivi du gène d'antibiorésistance *sul1* et de la concentration en antibiotiques.

Figure 4 - Schéma illustrant les 2 stratégies hypothétiques du catabolisme de la pénicilline.

Figure 5 - Voie de dégradation de la sulfaméthazine.

Figure 6 - Vision schématique des événements de coalescence se succédant le long du continuum lisier-sol-sédiment

Figure 7 - Dispositif expérimental faisant le lien entre le lisier et le compartiment tellurique.

Figure 1.1 - Relative abundances of *groL* (A) and *sadA* (B) gene sequences in the soil microcosms.

Figure 1.2 - Kinetics of ¹⁴C-SMZ mineralization throughout the incubation.

Figure 1.3 - Phylogenetic placement of bacterial OTUs significantly impacted by SMZ (A) or manure spreading (B) in the four different types of soils, A, B, C, and D, after 1 month of incubation.

Figure 2.1 - Comparison of the bacterial diversity in the four soils (A, B, C and D) amended or not with manure and exposed or not to SMZ.

Figure 2.2 - Phylogenetic diversity of the bacterial diversity in the four soils (A, B, C and D) amended or not with manure and exposed or not to SMZ.

Figure 2.3 - Impact of soil amendment with manure on the relative abundance of bacterial OTUs.

Figure 2.4 - Abundance of OTUs impacted differently by manure amendment depending on SMZ application.

Figure 8 - Dispositif expérimental faisant le lien entre les compartiments tellurique et sédimentaire.

Figure 3.1 - Mesure de la minéralisation de la sulfaméthazine dans les microcosmes de sédiment de l'Ain non inoculés avec *Microbacterium* sp. C448.

Figure 3.2 - Mesure de la minéralisation de la sulfaméthazine dans les microcosmes de sédiment de l'Arvan non inoculés avec *Microbacterium* sp. C448.

Figure 3.3 - Abondance du gène *sadA* en fin d'incubation dans les sédiments non inoculés de l'Ain (A.) et de l'Arvan (B.).

Figure 3.4 - Abondance du gène *groL* spécifique de *Microbacterium* sp. C448 en fin d'incubation dans les sédiments non inoculés de l'Ain (A.) et de l'Arvan (B.).

Figure 3.5 - Mesure de la minéralisation de la sulfaméthazine dans les microcosmes de sédiment de l'Ain (A) et de l'Arvan (B) inoculés avec *Microbacterium* sp. C448.

Figure 3.6 - Potentiel de la minéralisation de la sulfaméthazine dans les microcosmes de sédiment de l'Ain (A) et de l'Arvan (B) au terme du mois d'incubation.

Figure 3.7 - Quantification de *Microbacterium* sp. C448 dans les sédiments de l'Ain (A) et de l'Arvan (B) après 30 jours d'incubation, dans la modalité sans sulfaméthazine et celle inoculée avec la souche et traitée à la sulfaméthazine.

Figure 3.8 - Bilan de masse de la sulfaméthazine par condition au terme du mois d'incubation.

Figure 3.9 - Quantification de gène *sul1* dans les sédiments de l'Ain (A) et de l'Arvan (B) après 30 jours d'incubation dans les différentes modalités.

Figure 3.10 - Abondances bactériennes totales et résistante des sédiments de l'Ain (A) et de l'Arvan (B).

Figure 9 - Schéma descriptif de la méthode d'epicPCR

Figure 10 - Dispositif expérimental envisagé pour perfectionner l'étude de l'invasion des communautés sédimentaires par les bactéries telluriques antibiorésistantes en fonction de la présence d'antibiotique.

LISTE DES TABLES

Table 1 - Liste non exhaustive d'articles référençant l'isolement de bactéries utilisatrices d'antibiotiques comme substrat

Table 1.1 - Concentrations of extractable SMZ measured after 1 month of incubation.

Table 2 - Granulométrie des matrices utilisées

INTRODUCTION GÉNÉRALE

« Le progrès était dans l'horizon des existences. Il signifiait le bien-être, la santé des enfants, le savoir, tout ce qui tournait le dos aux choses noires de la campagne et à la guerre. Il était dans le plastique et le Formica, les antibiotiques ... » Les années - Annie Ernaux

I. Dispersion des antibiotiques et des antibiorésistances dans l'environnement

1. Etat des lieux de la contamination antibiotique dans l'environnement : sources et circulation

La responsabilité de la contamination des différents compartiments de l'environnement par les antibiotiques se partage entre les effluents industriels, agricoles, domestiques et hospitaliers (Figure 1).

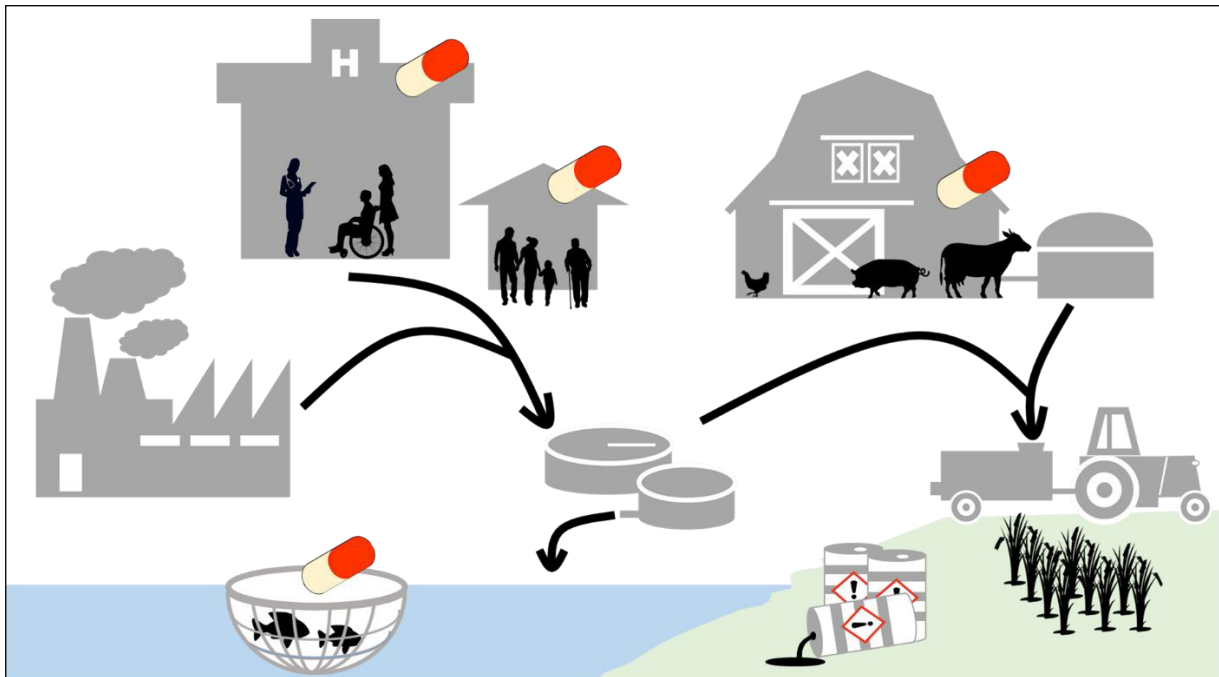


Figure 1 – Résumé des principales sources d'antibiotiques dans l'environnement.

La réglementation en vigueur dans de nombreux pays, incluant la France, oblige l'industrie pharmaceutique à traiter ses rejets avec des normes de concentrations à respecter (Tardy *et al.*, 2021). Cependant, les usines pharmaceutiques restent une source de contamination, avec de fortes disparités à l'échelle mondiale. Par exemple, de nombreuses études rapportent par exemple des concentrations alarmantes d'antibiotiques dans des effluents d'usines pharmaceutiques asiatiques qui peuvent atteindre le mg par litre (Larsson *et al.*, 2007; Fick *et al.*, 2009; Thai *et al.*, 2018). De leur côté, les effluents domestiques et hospitaliers sont majoritairement contaminés par les antibiotiques pris à des fins curatives, qui sont le plus souvent faiblement métabolisés par le corps avant d'être excrétés (Egorin *et al.*, 1986; Kümmerer, 2009). Ces trois types d'effluents, quand ils ne sont pas directement rejetés dans l'environnement par négligence ou faute d'infrastructures, transitent par des stations d'épuration. Dans les effluents industriels, la composition relativement connue des mélanges de substances pharmaceutiques et les niveaux de concentrations élevés facilitent la mise en place de traitements adaptés. A l'inverse, à ce jour, les stations d'épuration traitant les effluents urbains et/ou hospitaliers restent majoritairement incapables d'éliminer la plupart des substances pharmaceutiques présentes dans les eaux usées faute de technologies adaptées applicables pour de faibles concentrations. Il serait notamment préférable par soucis d'économie et de faisabilité que le déploiement des procédés prometteurs d'ozonation, de photocatalyse ou d'adsorption (Iakovides *et al.*, 2019; Phoon *et al.*, 2020) s'effectue en leur amont, au plus proche des rejets, où les concentrations sont les plus importantes. Au final, les antibiotiques présents dans ces effluents peuvent en partie rejoindre l'environnement, même après un passage en station d'épuration, soit par le relargage des eaux dans le système aquatique en sortie de cette station (Sabri *et al.*, 2020) ou soit par l'application sur les sols comme fertilisant des boues produites pendant le processus d'épuration (Li *et al.*, 2013), quand elles ne sont pas incinérées ou enfouies. L'entrée de ces matrices dans l'environnement entraîne une augmentation ne serait-ce que transitoire des concentrations en antibiotiques dans le compartiment récepteur initial (Martín *et al.*, 2012; Sabri *et al.*, 2020). Mais ce compartiment étant rarement isolé, la contamination peut se diffuser à l'ensemble du système dans lequel il s'inclut. On peut citer le cas extrême de la région d'Hyderabad, plaque tournante indienne de la production pharmaceutique, où une contamination sévère en antibiotiques est mesurée non seulement dans les rivières recevant les effluents des stations de traitement mais aussi dans les lacs et les eaux de consommation des puits environnants (Fick *et al.*, 2009).

La dernière grande voie d'entrée des antibiotiques dans l'environnement repose sur l'élevage piscicole et agricole (Pouliquen *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2019). De même que pour l'Homme, la faible métabolisation par les organismes des antibiotiques employés dans les élevages à des fins thérapeutiques ou comme stimulateurs de croissance (Sarmah *et al.*, 2006) fait qu'on les retrouve

en fortes concentrations dans les excréments. Du côté piscicole, certaines structures n'ont même pas la possibilité de traiter ces excréments, notamment quand il s'agit d'infrastructures en pleine mer. Pour les autres, l'utilisation de procédés d'élimination est possible mais pas toujours mis en place comme la nanofiltration couplée à l'oxydation photocatalytique (Esmaili *et al.*, 2017). Du côté de l'élevage agricole, le compostage des fumiers et lisiers qui implique des températures élevées et une forte activité bactérienne peut permettre de réduire en partie la contamination par les antibiotiques (Ramaswamy *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2019). Toutefois, les antibiotiques rejoignent quand même en quantité les sols agricoles lors de l'épandage des excréments animaux pour leurs propriétés fertilisantes. An *et al.* (2015) montrent par exemple que la tétracycline détectée à 4,69 mg.kg⁻¹ dans du lisier se retrouve à 0,24 mg.kg⁻¹ dans le sol amendé.

Même si les pics de concentrations sont localisés au plus proche des rejets, ces substances peuvent être détectées loin de leur point d'entrée dans l'environnement (Davis *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2020), leurs concentrations se diluant le long de leur parcours, influencées par leurs caractéristiques intrinsèques (e.g. hydrophobicité) ainsi que par les paramètres géographiques et physico-chimiques des milieux traversés (e.g. taille du compartiment receveur, granulométrie). Par exemple, la sulfadiazine apportée lors de l'épandage de lisier peut rejoindre aisément le compartiment aquatique avec les précipitations, à cause de sa faible capacité d'adsorption aux particules telluriques (Shen *et al.*, 2018).

2. Adaptation bactérienne à l'exposition environnementale aux antibiotiques

2.1. Niveau d'exposition et développement des antibiorésistances

Les niveaux d'exposition des bactéries aux antibiotiques sont très différents d'un compartiment environnemental à l'autre. Dans les lisiers et les eaux usées, les concentrations en antibiotiques peuvent constituer une pression de sélection propice au développement de fonctions de résistance. Les populations bactériennes présentes dans ces matrices possèdent en plus un important potentiel d'évolution, puisque la richesse nutritive de ces environnements soutient une forte activité microbienne synonyme d'une forte fréquence d'évènements de mutation. L'acquisition de capacités de résistance est favorisée par le fait que les concentrations en antibiotiques, bien que fortes, restent sub-létales (Andersson and Hughes, 2014). En effet, ces concentrations ralentissent la croissance des bactéries et augmentent leur taux de mutagenèse à cause d'une production accrue de radicaux libres (Kohanski *et al.*, 2010). En conséquence, elles augmentent la probabilité d'émergence de mutations qui conférant une résistance pourraient permettre de rétablir une croissance normale. Ching and Zaman (2020) ont montré par exemple qu'*Escherichia coli* exposée à des concentrations sub-létales de ciprofloxacine pouvait sélectionner

tout un spectre de mutations conférant des résistances aux antibiotiques, dont certaines n'avaient encore jamais été décrites.

Dans les écosystèmes telluriques et aquatiques, les concentrations en antibiotiques étant moins élevées, les études peinent à démontrer les impacts directs de l'exposition à ces substances sur leurs communautés microbiennes, notamment concernant le développement de l'antibiorésistance. A ce sujet, certains spéculent que les concentrations seraient trop faibles pour que le développement de capacités de résistance soit véritablement sélectionné (Agersø *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2016). Mais c'est sans compter sur les phénomènes de sélection indirecte (Rodríguez-Verdugo *et al.*, 2013) ou sur la dérive génétique qui peuvent permettre l'émergence de capacités de résistance en conservant plus ou moins aléatoirement des mutations ne présentant pas d'intérêt sans la pression de sélection antibiotique mais qui n'entraîne pas de surcoût métabolique. C'est, par ailleurs, l'argument avancé pour expliquer l'existence depuis l'ère pré-antibiotiques de gènes de résistance à certains antibiotiques synthétiques (Sánchez-Osuna *et al.*, 2019).

2.2. Niveau d'exposition et dispersion des antibiorésistances

2.2.1. Un constat, l'omniprésence des antibiorésistances

Une même résistance à un antibiotique peut être présente chez des bactéries phylogénétiquement et géographiquement distantes. L'acquisition de fonctions analogues peut découler de convergences évolutives. Toutefois, le degré d'homologie de certains gènes de résistance soutient la thèse d'une origine commune et implique donc leur dispersion à travers les environnements et/ou les communautés microbiennes. L'exemple des gènes *sul1* à *sul4* codant pour des isoprotéines analogues à la dihydroptéroate synthase (DHPS), une protéine du métabolisme des folates inhibée par les sulfamides, illustre ces 2 scénarios (Sköld, 2000). D'une part, bien que dérivant tous du gène *folP* codant pour la DHPS, Sánchez-Osuna *et al.* (2019) ont montré qu'ils résultent de mobilisations indépendantes du gène *folP* issu des familles de Rhodobiaceae (*sul1* et *sul2*), Leptospiraceae (*sul3*) et du phylum des chloroflexi (*sul4*). A l'inverse, les gènes *sul1* présents de façon plus ou moins conservée chez des bactéries différentes en des lieux éloignés (Wei *et al.*, 2018), possèdent une origine commune. Les antibiorésistances circulent donc vraisemblablement au sein et entre les compartiments environnementaux.

2.2.2. Dispersion dans la communauté

La dispersion de l'antibiorésistance entre les membres d'une communauté microbienne se réalise par transferts horizontaux de gènes. On peut en distinguer 3 types : la conjugaison, la transformation et la transduction (Figure 2).

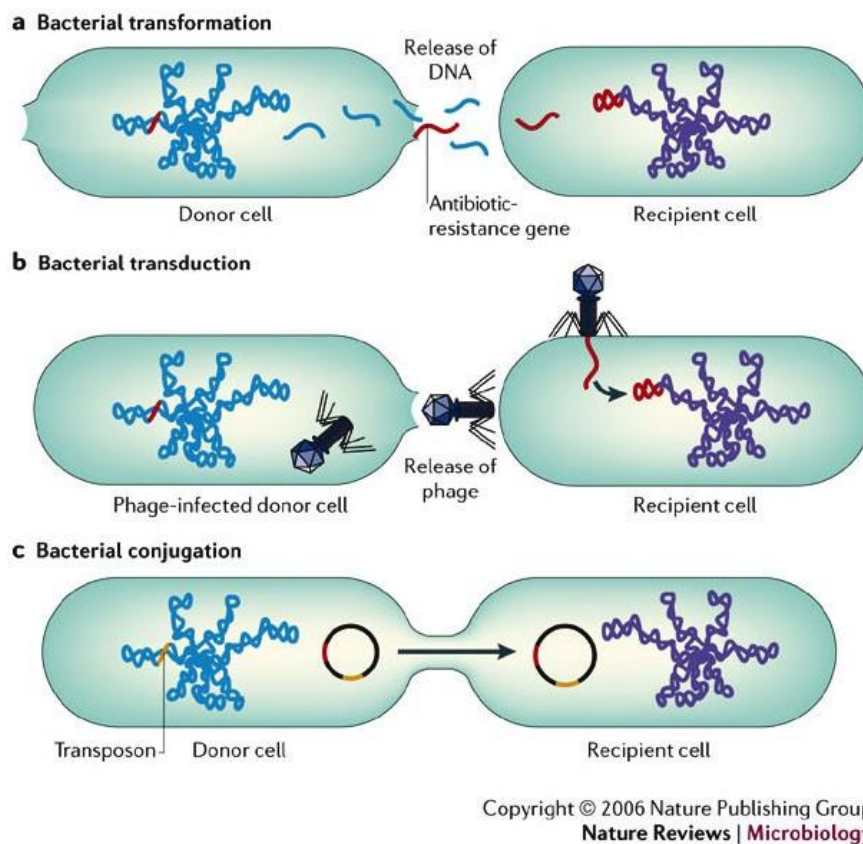


Figure 2 – Représentation schématique des différents types de transferts horizontaux, issue des travaux de Furuya and Lowy (2006)

La fréquence de leur succès est, pour tous, positivement corrélée à l'abondance bactérienne. Et puisqu'en plus la concentration en antibiotique augmente leur probabilité de survenue et leur sélection (Jutkina *et al.*, 2018), les eaux usées et les effluents agricoles (lisier et fumier) sont des environnements propices tout désignés. Jacquiod *et al.* (2017) ont montré par exemple dans une station d'épuration, la dispersion chez des bactéries phylogénétiquement éloignées du plasmide conjugatif pKJK5 conférant une résistance à de multiples antibiotiques (Bahl *et al.*, 2007). Mais d'autres paramètres rendent ces environnements encore plus propices aux transferts horizontaux. Outre la présence d'antibiotiques en concentration sub-létale (Shun-Mei *et al.*, 2018), les fréquences de conjugaison semblent être améliorées par les températures élevées impliquées dans les processus de compostage (Zeng *et al.*, 2015). Par ailleurs, la transformation qui repose sur l'acquisition de l'ADN environnemental est favorisée par les processus de lyse cellulaire, comme celui de chloration utilisée dans le traitement des eaux usées (Jin *et al.*, 2020), qui libèrent dans l'environnement des gènes de résistance. Il est intéressant de noter que ces matrices, de par

leur origine animale et humaine, peuvent être chargées en bactéries pathogènes, les filtres environnementaux n'ayant pas encore diminué leur abondance (Maréchal *et al.*, 2019). Ce sont donc potentiellement des points chauds pour l'acquisition d'antibiorésistances par les pathogènes.

Mis à part dans les effluents, les transferts horizontaux de gènes de résistance peuvent aussi intervenir dans d'autres environnements tels que le sol. Lu *et al.* (2020) montrent par exemple que la conjugaison peut permettre la dispersion de gènes de résistance à la tétracycline et au chloramphénicol au travers la communauté microbienne des sols. De prime abord, leur caractère oligotrophe et leur plus faible contamination les rendent pourtant moins propices aux transferts horizontaux. Toutefois, il s'agit de compartiments très hétérogènes où les communautés microbiennes peuvent s'organiser sous forme de biofilms. Ces assemblages microbiens sont reconnus comme des hauts lieux de transferts des antibiorésistances, puisqu'à l'image des effluents d'élevage et les eaux usées, ils présentent une forte activité bactérienne et peuvent être fortement contaminés par certains antibiotiques qu'ils accumulent (Valdés *et al.*, 2021).

2.2.3. Dispersion dans l'environnement

2.2.3.1. Point chaud de dispersion

La dispersion des antibiorésistances dans l'environnement est en partie médiée par la gestion des rejets anthropiques qui, comme vu précédemment, peuvent être hautement contaminés. L'épandage de boue d'épuration ou de lisier comme fertilisant organique peut entraîner une élévation du taux et parfois de la diversité des antibiorésistances dans les sols agricoles (Peng *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Pérez-Valera *et al.*, 2019). Le relargage des eaux en sortie de station d'épuration peut aussi augmenter l'abondance des antibiorésistances dans les eaux de surface et les sédiments des rivières réceptrices (Cacace *et al.*, 2019). Par exemple, Sabri *et al.* (2020) ont montré que les rejets d'une station d'épuration néerlandaise entraînaient une augmentation drastique dans les sédiments du nombre de copies du gène de résistance aux sulfamides *sul1* (Figure 3). La dispersion de l'antibiorésistance se poursuit au-delà de ces compartiments récepteurs initiaux, le long des continuums environnementaux. Il est notamment connu que les antibiorésistances apportées dans les sols par l'épandage de lisier peuvent être véhiculées vers le compartiment aquatique par ruissellement lors d'évènements de précipitations (Barrios *et al.*, 2020). Toutefois, il est encore mal déterminé si cette dispersion est portée par la dissémination des gènes de résistance ou par la diffusion des bactéries résistantes elles-mêmes.

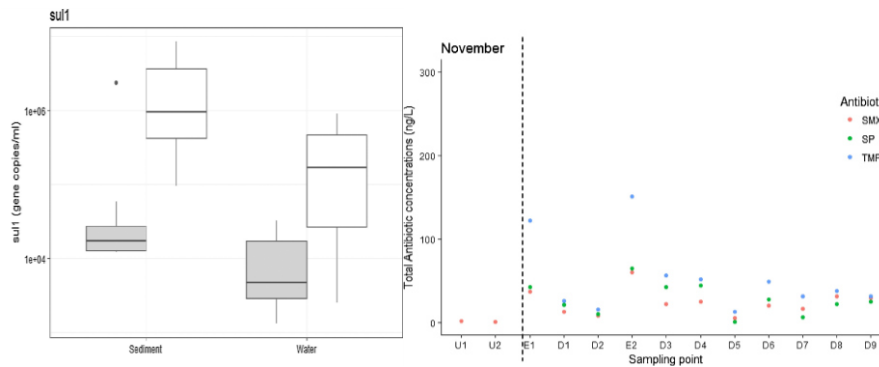


Figure 3 – Pollution d'un système riverain par les effluents d'une station d'épuration : suivi du gène d'antibiorésistance sul1 et de la concentration en antibiotiques, d'après la publication de Sabri et al. (2020). A gauche/ Quantification du gène de résistance sul1 dans les sédiments et l'eau d'une rivière en amont (gris) et en aval (blanc) des rejets d'une station d'épuration. A Droite/ Profil des concentrations des antibiotiques sulfaméthoxazole (SMX), sulfapyridine (SP) et triméthoprim (TMP) dans l'eau de la rivière. La ligne en pointillés sépare les prélèvements en amont (U) des rejets d'effluents (E) de la station d'épuration de ceux en aval (D).

2.2.3.2. Dispersion par invasion de bactéries résistantes

Les compartiments environnementaux pourraient acquérir des capacités de résistance aux antibiotiques via l'invasion de bactéries antibiorésistantes provenant d'autres compartiments. Par exemple, des études ont souligné l'importance de la part biotique des lisiers dans l'augmentation de la résistance survenant dans les sols à la suite de leur épandage (Peng *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017), instillant l'idée d'une invasion des sols par des bactéries résistantes originaires du lisier. De plus, les antibiotiques, sous réserve d'être assez concentrés dans les sols, pourraient exercer une pression de sélection positive vis-à-vis des envahisseurs antibiorésistants. C'est ce que montre l'augmentation de la capacité d'invasion d'une souche d'*Escherichia coli* résistante à la tétracycline dans un sol contaminé par des doses croissantes de l'antibiotique (Xu *et al.*, 2021). Ce phénomène peut être accentué également par la présence d'autres contaminants des sols comme les métaux qui peuvent exercer une pression de sélection favorable envers les souches antibiorésistantes (Kang *et al.*, 2018).

Toutefois, cette dispersion peut être limitée puisque le succès d'invasion d'une souche bactérienne dans un nouvel environnement dépend de nombreux autres facteurs. Ces facteurs peuvent être de nature abiotique; la salinité, le pH ou encore la disponibilité en oxygène sont par exemple connus pour influencer la survie du pathogène *Escherichia coli* O157:H7 dans les sols (Semenov *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2021). Mais ce sont surtout les paramètres biotiques de l'environnement qui peuvent freiner l'invasion bactérienne, en raison de la compétition avec les

bactéries autochtones. Il a notamment été montré que l'invasibilité¹ des environnements étaient inversement proportionnelle à leur diversité bactérienne. L'hypothèse étant que la probabilité de redondance fonctionnelle empêchant l'invasion est augmentée avec la hausse de la diversité bactérienne (van Elsas *et al.*, 2012).

2.2.3.3. Dispersion par le matériel génétique

La dispersion des antibiorésistances entre les compartiments environnementaux peut aussi être stimulée par les trois types de transferts horizontaux sans nécessiter l'établissement, à terme, d'une bactérie antibiorésistante. La transformation peut même être facilitée dans certains cas par leur échec d'invasion, qui peut favoriser la libération des gènes de résistance dans l'environnement. Cela pourrait expliquer les résultats de certaines études montrant une augmentation du taux d'antibiorésistance dans des sols épandus avec du lisier stérile mais non dépourvu de matériel génétique (Chen *et al.*, 2017). Les phages quant à eux responsables de la transduction peuvent circuler entre les compartiments et véhiculer les antibiorésistances qu'ils ont encapsidées (Colomer-Lluch *et al.*, 2014; Calero-Cáceres *et al.*, 2017). Même la conjugaison qui requiert la survie transitoire de la souche donneuse fonctionne (Chen *et al.*, 2017). Fan *et al.* (2019) montrent par exemple la transmission d'un plasmide portant des résistances à plusieurs bactéries du sol malgré un déclin de la souche donneuse qui ne parvient pas à s'installer.

II. L'antibiotrophie

1. Historique

En 2016, Woappi *et al.* introduisent le terme d'antibiotrophe. Il désigne les bactéries présentant en plus de capacités de résistance aux antibiotiques, des fonctions cataboliques leur permettant de les utiliser comme source nutritive. Bien que la dégradation des antibiotiques soit un des principaux mécanismes de résistance bactérienne (Blair *et al.*, 2015), les études démontrant leur métabolisation par des bactéries sont rares et plutôt récentes. On dénombre toutefois quelques articles, datant du milieu du 20^{ème} siècle, qui rapportent l'isolement de bactéries telluriques capables de subsister en dégradant la streptomycine (Pramer and Starkey, 1951), la benzylpénicilline (Kameda *et al.*, 1961; Johnsen, 1977; Beckman and Lessie, 1979) ou le chloramphénicol (Abd-El-Malek *et al.*, 1961). Ces travaux n'ayant pas donné suite à des études approfondies, des doutes subsistent sur l'aptitude de ces bactéries à métaboliser réellement les antibiotiques. En effet, l'observation d'une croissance bactérienne en milieu minimum où l'antibiotique est l'unique source de carbone et/ou d'azote pourrait s'expliquer par l'impureté des

¹ Se définit comme la susceptibilité intrinsèque d'un écosystème d'être envahi par une espèce exogène.

produits antibiotiques utilisés. La dissipation des antibiotiques en cours de croissance pourrait, quant à elle, être due à des phénomènes d'adsorption. Après ces démonstrations, il faut attendre la désignation des antibiotiques comme polluants émergents (Houtman, 2010; Milić *et al.*, 2013), s'accompagnant de l'intention de les éliminer, pour que le sujet éveille de nouveau l'attention.

2. Une fonction plutôt répandue

Initialement, l'étude des antibiotiques et de leur dégradation était principalement conduite dans un contexte médical, en regardant la diminution de l'efficacité des substances. Cette vision anthropocentrique se limitait donc au suivi de la disparition du produit actif sans chercher à voir plus qu'un intérêt de résistance pour la bactérie. Cependant la désignation des antibiotiques comme polluants environnementaux a induit un gain d'intérêt pour l'étude des capacités bactériennes de dégradation des antibiotiques, notamment en vue de développer des approches de bioremédiation (Fenu *et al.*, 2015; Hirth *et al.*, 2016). Dès lors, les mises en évidence de bactéries dégradant les antibiotiques se sont multipliées et elles concernent aujourd'hui une multitude de substances (Table 2). L'antibiotrophie pourrait donc être plus commune dans l'environnement que le laisserait présager la littérature, mais à l'heure actuelle l'ampleur de cette fonction reste encore à être démontrée. Parmi les études défendant l'omniprésence de la capacité bactérienne de subsistance par l'utilisation des antibiotiques, on peut citer comme cas extrême celle de Dantas *et al.* (2008) qui conclut que les 18 antibiotiques qu'ils ont employés (synthétiques, hémi-synthétiques ou naturels) peuvent supporter la croissance de certaines bactéries. Ils indiquent même avoir isolé à partir d'une dizaine de sols pas moins de 74 souches dégradant les antibiotiques et phylogénétiquement très diverses. Cependant cette étude porte à controverse puisque Walsh *et al.* (2013), qui se sont proposés de la reproduire, n'ont mis en évidence aucune activité catabolique des antibiotiques. Mais l'omniprésence de l'antibiotrophie reste défendue par d'autres travaux, tels que ceux de Zhang and Dick (2014) qui montrent la subsistance de 19 isolats bactériens originaires de 4 sols dans des milieux où la pénicilline représente l'unique source de carbone. Dans la même lignée, Crofts *et al.* (2018) supposent que l'absence d'accumulation de certains antibiotiques dans l'environnement s'explique par la présence de bactéries capables de les métaboliser. Sans vouloir rejeter totalement leurs propos, il est toutefois essentiel de souligner que d'autres processus peuvent être impliqués. Du côté biotique, l'inactivation enzymatique par les bactéries résistantes qui altère la molécule antibiotique ou encore l'adsorption et la biodégradation par les plantes (Kurade *et al.*, 2019) peuvent expliquer la dissipation des antibiotiques. A quoi s'ajoute aussi l'impact de processus abiotiques comme la photodégradation (Thiele-Bruhn and Peters, 2007). En outre, la faible persistance dans les sols de certains peut aussi s'expliquer par leur transfert vers le compartiment aquatique (Kerrigan *et al.*, 2018).

Table 1 - Liste non exhaustive d'articles référencant l'isolement de bactéries utilisatrices d'antibiotiques comme substrat. Sur l'ensembles des études consultées, ont été écartées celles indiquant la dégradation d'un antibiotique par une bactérie sans justifier d'un intérêt nutritif suffisant pour soutenir, sans sources alternatives de carbone ou d'azote, la croissance de la souche.

Information sur l'antibiotique				Information sur l'antibiotrophe		
Nom	Famille	Mode d'action	Origine	Lieu d'isolement	Affiliation phylogénétique	Référence
Chloramphénicol	Phénicolés			Sol	<i>Streptomyces</i>	Abd-El-Malek et al., 1961
				Tractus intestinal humain	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia fergusonii</i>	Xin et al., 2012
				-	<i>Haemophilus influenzae</i>	Smith et al., 2007
				Boue activée	<i>Sphingobium</i> sp. CAP-1	Ma et al., 2020
Erythromycine	Macrolides	Inhibiteur synthèse protéique	Naturelle	Boue activée de IP ¹	<i>Delftia lacustris</i> RJ-61	Ren et al., 2021
				Sol contaminé par rejet IP	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Zhang et al., 2017
Lincomycine	Lincosamide			Déchet biologique IP	<i>Clostridium</i> sp. LCM-B	Wang et al., 2018
				Boue activée	<i>Klebsiella</i> sp. SQY5	Shao et al., 2018
Tétracycline	Cycline			Boue activée de IP	<i>Arthrobacter nicothianae</i> OTC-16	Shi et al., 2020
				Sol	<i>Proteobacteria</i> , <i>Beacteroidetes</i>	Zhang and Dick, 2014
Néomycine	Aminoside				<i>Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i>	Zhang and Dick, 2014
Pénicilline	Béta-lactamine	Inhibiteur synthèse paroi		Sol	<i>Burkholderia</i> , <i>Pandoreae</i> , <i>Pseudomonas</i>	Crofts et al., 2018
Pénicilline G				Déchet biologique IP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Z1	Wang et al., 2014
				Boue activée	<i>Arthrobacteria</i>	Deng et al., 2016
Sulfadiazine				Sol amendé	<i>Microbacterium lacus</i> SDZm4	Tappe et al., 2013
				Boue activée	<i>Pseudomonas psychrophila</i> HA-4	Jiang et al., 2014
Sulfamethoxazole	Sulfamide	Inhibition du métabolisme des folates	Synthétique	Membrane de bioréacteur	<i>Achromobacter denitrificans</i> PR1	Reis et al., 2014
					<i>Microbacterium</i> sp. BR1	Bouju et al., 2012
Sulfathiazole				Sédiment contaminé	<i>Microbacterium</i> sp. CJ77	Kim et al., 2019
Sulfamethazine				Sol expérimental	<i>Microbacterium</i> sp. C448	Topp et al., 2013

¹ IP : industrie pharmaceutique

3. Origine et évolution de l'antibiotrophie

A l'instar de la résistance aux antibiotiques, qui existe depuis bien avant l'utilisation de ces substances par l'Homme, on est en droit de se demander s'il n'en est pas de même pour l'antibiotrophie. Un élément pouvant le laisser penser concerne l'existence de microorganismes produisant naturellement des antibiotiques. L'exposition environnementale des communautés bactériennes aux antibiotiques étant donc antérieure à l'avènement de ces substances dans la pharmacopée, une acquisition ancienne de la fonction d'antibiotrophie est envisageable. Cette hypothèse trouve sa force dans la diversité phylogénétique des bactéries dégradant les antibiotiques dits « naturels », même si les transferts horizontaux pourraient aussi l'expliquer. On peut citer comme exemple, la pénicilline qui présente *a minima* un panel de pas moins de 4 *Proteobactéries* réparties entre les genres *Burkholderia*, *Pseudomonas* et *Pandorea* capables de l'utiliser comme substrat (Crofts *et al.*, 2018). Dans le cas des antibiotiques dit « synthétiques », l'hypothèse d'une acquisition récente des fonctions d'antibiotrophie est plus probable. Cette hypothèse s'appuie notamment sur le cas des sulfamides pour lesquels on trouve une fonction hautement conservée chez des souches phylogénétiquement proches, laissant entendre une origine commune récente. L'enzyme SadA, première monooxygénase de l'unique voie catabolique connue, est en effet similaire à plus de 95% entre les 4 souches du genre *Microbacterium* antibiotrophes isolées à ce jour, qui, pour certaines, appartiennent à la même espèce (Kim *et al.*, 2019). Ce qui interpelle toutefois, c'est l'ubiquité de cette fonction, qui a été retrouvée dans des environnements éloignés sans lien apparent. *Microbacterium* sp. C448 a été isolée d'un sol canadien, sans historique d'épandage organique, après 10 ans d'exposition expérimentale à de fortes concentrations de sulfaméthazine (Topp *et al.*, 2013). *Microbacterium lacus* SDZm4 provient d'un sol allemand ayant été amendé avec du lisier de porcs traités avec des sulfamides (Tappe *et al.*, 2013). *Microbacterium* sp. BR1 a été isolée d'une membrane de bioréacteur suisse (Bouju *et al.*, 2012). *Microbacterium* sp. CJ77 provient, quant à elle, d'un sédiment sud-coréen situé près d'une station de compostage de lisier porcin (Kim *et al.*, 2019). Ce constat rappelle celui d'autres xénobiotiques, les pesticides, dont les gènes de dégradation sont plutôt conservés entre les souches et mondialement dispersés (Rousseaux *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2003). Il faut toutefois noter qu'on ne peut pas entièrement réfuter que des substances naturelles analogues aux antibiotiques « synthétiques » existent et puissent avoir conduit à l'acquisition de capacités d'antibiotrophie. Dans le cas des sulfamides qui ont été inventées en 1935, il a par exemple été montré que des sulfamides primaires sont produits dans une éponge (Mujumdar and Poulsen, 2015). L'association d'une souche *Microbacterium* à l'éponge *Halichondria panicea*, laisse donc entrevoir un possible scénario d'évolution différent (Wicke *et al.*, 2000).

Les cas d'antibiotrophie ont pour le moment été principalement reportés de l'environnement, les sols agricoles en tête. Même si l'antibiotrophie est rarement mise en évidence dans un contexte médical (un seul isolat hospitalier dans la Table 1) sûrement du fait que l'intérêt des recherches en santé se limite au gain de résistance, cela tient peut-être aussi du fait que l'environnement est plus propice à son développement. En effet, être capable d'utiliser une ressource nutritive exclusive dans des milieux oligotrophes comme les sols, peut représenter un avantage considérable pour les bactéries ; cela s'illustre notamment par l'existence de multiples fonctions de dégradation de xénobiotiques comme les pesticides (Kumar *et al.*, 1996). Les signalements de cas d'antibiotrophie restent en comparaison relativement peu nombreux, sûrement du fait que la fonction n'a éveillé que récemment un intérêt. Mais il est probable qu'elle soit désormais amenée à être plus fréquemment détectée, en particulier dans des environnements contaminés par des concentrations sub-léthales en antibiotiques, qui peuvent augmenter les fréquences de mutations et favoriser l'émergence de cette fonction.

Un point intéressant à souligner reste l'association quasi-systématique de l'antibiotrophie à l'antibiorésistance. En effet, mis à part quelques bactéries dégradant le chloramphénicol toutes les souches antibiotrophes isolées à ce jour présentent un gène de résistance envers l'antibiotique concerné (Smith *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2012). On peut avancer l'hypothèse d'un biais expérimental avec un procédé d'isolement bactérien reposant sur des niveaux d'exposition aux antibiotiques uniquement supportables par des bactéries résistantes. Mais on peut aussi se demander si l'action biocide des antibiotiques sur les bactéries environnementales, qui entraverait l'acquisition de capacité d'antibiotrophie quand la souche n'est pas résistante, n'est pas sous-évaluée par un biais inhérent aux dosages chimiques. En effet, ils fournissent une valeur moyenne pour une matrice indifféremment des variations spatiales alors que l'antibiotique n'est pas nécessairement réparti de façon homogène, avec des zones très concentrées où la résistance est une condition *sine qua non* pour permettre l'évolution de capacité de dégradation. La validation de cette hypothèse sous-entendrait donc que l'antibiotrophie est plus récente que l'antibiorésistance pour ces bactéries présentant les deux fonctions.

4. Une variante d'un mécanisme connu de résistance aux antibiotiques ?

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique est, avec la modification de la cible ou de la perméabilité membranaire, un des principaux mécanismes de résistance des bactéries (Blair *et al.*, 2015). D'un point de vue purement théorique, la fonction d'antibiotrophie lui est très similaire à la différence qu'elle donne aussi accès à une source d'énergie supplémentaire. On tendrait donc à la percevoir comme une optimisation de la fonction d'antibiorésistance. Dans cette logique, le cumul de ces deux fonctions serait contrintuitif, les redondances apportant des coûts

supplémentaires sans gain compensatoire. Toutefois à leur actuelle, mis à part quelques bactéries utilisant le chloramphénicol, les bactéries antibiotrophes possèdent systématiquement des gènes de résistance envers l'antibiotique concerné. On peut illustrer ce dilemme par l'exemple très connu de la résistance aux β -lactamines par les β -lactamases inactivant cette classe d'antibiotique par l'hydrolyse de leur noyau β -lactame. Crofts *et al.* (2018) ont montré que ce mécanisme de résistance pouvait être, pour certaines bactéries antibiotrophes, l'étape liminaire de la dégradation de l'antibiotique (Figure 4). L'acide benzylpénicilloïque, produit de l'hydrolyse de la pénicilline par une β -lactamase normalement non valorisé chez les bactéries uniquement résistantes, peut en effet être hydrolysé par l'amidase Put1 en acide phénylacétique, une source de carbone du métabolisme central de nombreuses bactéries. Mais ils ont aussi montré qu'une voie ne reposant pas nécessairement sur l'intervention d'une β -lactamase semble aussi possible, avec une amidase pouvant catalyser à la fois l'hydrolyse de la pénicilline et celle de l'acide benzylpénicilloïque. Toutefois les bactéries dotées de cette enzyme ont inévitablement une β -lactamase dont l'activité hydrolytique de la pénicilline est supérieure. L'antibiotrophie ne semble donc pas s'affranchir totalement de l'antibiorésistance et la frontière entre les deux fonctions est abstraite. Dans le premier cas, la fonction de résistance portée par les β -lactamases se confond avec celle d'antibiotrophie puisqu'elle est essentielle au processus de dégradation. Dans le deuxième cas, c'est l'inverse, la fonction d'antibiotrophie entraîne par elle-même une diminution de la concentration en antibiotique. Et bien qu'elle soit moins rapide que l'inactivation enzymatique par les β -lactamases, elle aboutit au même résultat. L'antibiotrophie pourrait donc être perçue comme un mécanisme de résistance. En ce sens, les travaux de Kim *et al.* (2019) portant sur les antibiotiques sulfamidés, ont montré que des bactéries obtenues par modification génétique étant dépourvues des gènes classiques de résistance (*sul*) mais ayant des gènes antibiotrophes (*sadA* et *sadC*) possédaient des capacités de résistance supérieures à celles ne possédant aucun de ces gènes. Mais à l'opposé, des études ont conduit à l'isolement de bactéries utilisant le chloramphénicol comme source nutritive mais n'étant pas considérées comme antibiorésistantes, sur la base de tests d'inhibition (Smith *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2012). Il peut toutefois être souligné qu'il manque dans ces deux dernières études une comparaison de sensibilité avec des souches dépourvues de cette fonction d'antibiotrophie pour affirmer que celle-ci ne confère aucun gain de résistance.

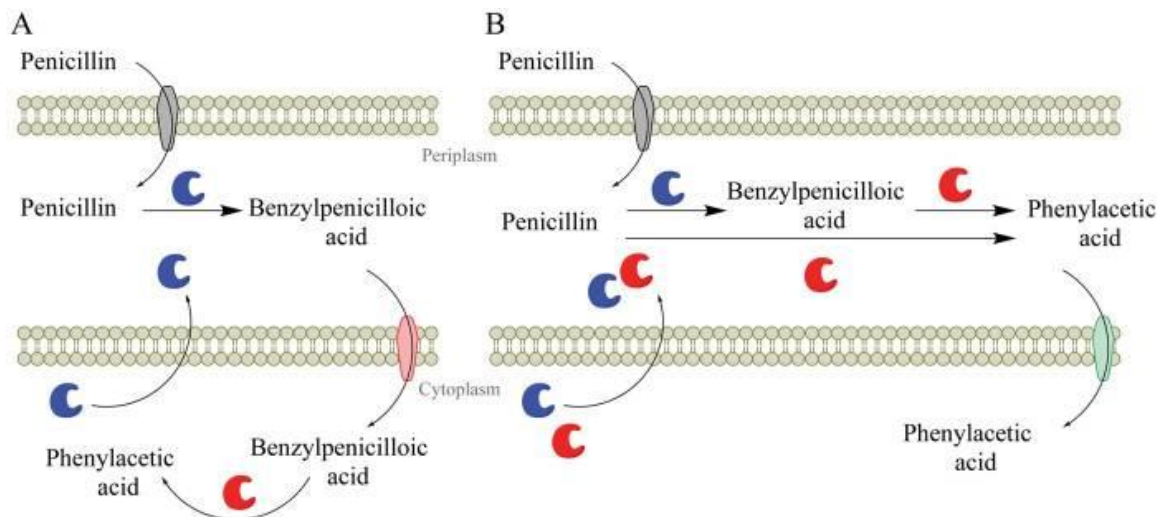


Figure 4 – Schéma illustrant les 2 stratégies hypothétiques du catabolisme de la pénicilline, issu de l'étude de Crofts et al. (2018). A) La β -lactamase est responsable de la première attaque de la pénicilline dans le périplasme bactérien, l'acide benzylpénicilloïque rejoint le cytoplasme où une amidase (e.g. Put1) hydrolyse le pont amide pour libérer l'acide phénylacétique. B) L'attaque de la pénicilline est réalisée à la fois par la β -lactamase et une amidase formant directement dans le périplasme de l'acide phénylacétique.

5. Les conséquences possibles de l'antibiotrophie

5.1. D'un point de vue bactérien

5.1.1. Augmentation du potentiel de dispersion

Etre capable de dégrader un xénobiotique peut conférer aux bactéries un avantage nutritif dans les environnements régulièrement contaminés. Quand la fonction n'est pas dispersée dans la communauté, cela peut même conférer la garantie d'avoir une niche trophique exclusive pour subsister. Dans un contexte de contamination globale de l'environnement par les antibiotiques (Kovalakova *et al.*, 2020), la dispersion des bactéries antibiotrophes n'est en théorie pas limitée par la disponibilité en ressources nutritives. Mais des réserves peuvent être émises sur les concentrations en antibiotiques actuellement retrouvées, peut-être insuffisantes pour soutenir la dispersion des antibiotrophes entre les compartiments d'autant que cette dispersion reste influencée par les autres paramètres biotiques et abiotiques des environnements (prédation, pH, biodisponibilité en oxygène). A ce jour, la question de la dispersion des bactéries antibiotrophes dans les compartiments environnementaux reste peu explorée dans la littérature.

5.1.2. Compétitivité accrue des bactéries résistantes

L'inactivation enzymatique des antibiotiques par les bactéries résistantes peut être considérée comme un bien commun puisque cette fonction bénéficie à l'ensemble de la communauté en réduisant la concentration en antibiotique du milieu. Les bactéries résistantes fournissent un

effort énergétique en produisant des enzymes d'inactivation (avec la machinerie cellulaire associée) qui favorise la subsistance des bactéries sensibles de la communauté (Domingues *et al.*, 2017; Amanatidou *et al.*, 2019). Cette différence de dépense énergétique entre populations résistantes et sensibles est supportée par les individus résistants mais la perte de la fonction leur serait néfaste si aucun autre ne supportait la charge d'éliminer les antibiotiques. Ce rôle essentiel assure probablement leur maintien dans la communauté (Wakano *et al.*, 2009; Kelsic *et al.*, 2015). En revanche, les bactéries résistantes antibiotrophes ont un avantage supplémentaire à dégrader les antibiotiques puisqu'en plus de les protéger, cela leur confère de l'énergie. L'antibiotrophie pourrait donc être un avantage sélectif permettant aux bactéries résistantes de s'imposer face à d'autres uniquement résistantes par inactivation enzymatique.

5.1.3. Perturbation des équilibres régis par les bactéries productrices d'antibiotiques

La plupart des bactéries qui synthétisent des antibiotiques le font pour éliminer des compétiteurs (Hibbing *et al.*, 2010). Une littérature plus limitée suggère également que cela pourrait leur servir pour communiquer (Aminov, 2009). La dégradation par les antibiotrophes des antibiotiques produits par ces bactéries pourrait donc les affecter. Si l'on considère l'exemple des rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes (PGPR) par synthèse d'antibiotiques inhibant les pathogènes (Park *et al.*, 2013; Kenawy *et al.*, 2019), la dégradation des antibiotiques pourrait lever l'inhibition des pathogènes, entraînant une diminution de la santé de la plante et donc de la qualité de ses exsudats qui bénéficient normalement aux PGPR.

5.2. D'un point de vue anthropocentré

5.2.1. Un risque sanitaire

Outre que l'antibiotrophie soit considérée par certains comme une fonction de résistance, la quasi-totalité des souches antibiotrophes isolées à ce jour présentent des gènes de résistance aux antibiotiques. Le gain de potentiel de dispersion de ces souches, discuté au point 5.1.1, présente donc un risque d'aggravation de la dispersion des antibiorésistances dans l'environnement. Cela peut contribuer à entretenir le réservoir d'antibiorésistance, appelé parfois résistome, potentiellement mobilisable par les bactéries pathogènes (Forsberg *et al.*, 2012). A ce jour aucune des bactéries antibiotrophes ayant été rapportées ne s'est avéré être un pathogène reconnu. Dantas *et al.* (2008) avancent que l'acquisition de capacité de dégradation par les pathogènes est peu probable puisqu'ils évoluent dans le corps, un milieu nutritif riche comparé aux compartiments environnementaux. L'apport énergétique de la dégradation de l'antibiotique n'apporterait donc pas un avantage suffisant pour que la fonction soit sélectionnée. Toutefois, la transmission de bactéries pathogènes entre hôtes peut survenir après un passage dans

l'environnement (Islam *et al.*, 2005). L'antibiotrophie pourrait favoriser leur subsistance dans les environnements contaminés en leur fournissant une niche nutritive. En augmentant ainsi leur chance de contaminer un nouvel hôte et en les rendant plus difficile à éliminer, l'antibiotrophie pourrait être sélectionnée chez ces pathogènes.

5.2.2. Un outil de bioremédiation

Les antibiotrophes pourraient participer à l'atténuation naturelle des antibiotiques dans les écosystèmes. Il est même envisagé de les utiliser dans les stations d'épuration ou bien de les appliquer directement sur les sites pollués comme les sols agricoles (Fenu *et al.*, 2015; Hirth *et al.*, 2016). Des premières recherches visant à l'emploi de *Microbacterium* sp. BR1 en station d'épuration, pour éliminer les sulfamides, soulignent que la survie de la souche est très précaire, puisqu'elle ne parvient pas à se maintenir à des températures inférieures à 20°C (Fenu *et al.*, 2015). De plus, dans ces travaux, l'antibiotique n'a été dégradé que lorsque les concentrations appliquées étaient largement plus élevées que celles habituellement détectées et ce, en un temps supérieur aux délais normaux de passage des effluents dans les stations d'épuration. Toutes ces observations ont amené les auteurs à conclure que l'utilisation des capacités antibiotrophes de *Microbacterium* sp. BR1 était pour le moment irréaliste. Cependant, Hirth *et al.* (2016) ont montré qu'une autre espèce, *Microbacterium* sp. C448, pourrait être utilisée en application directe sur les sols. En effet, leur étude démontre d'une part que la biodégradation de la sulfaméthazine peut s'effectuer à des concentrations environnementales fortes mais réalistes (1 mg.kg⁻¹) et, d'autre part, que cette capacité d'antibiotrophie peut s'installer à long terme, avec une biorémédiation toujours effective après 112 jours. Cela peut être perçu positivement, avec un aspect durable puisqu'une seule intervention permet au sol d'atténuer toute pollution ultérieure par la sulfaméthazine. D'un autre côté, cela met en évidence l'installation d'une souche résistante aux sulfamides sur le long terme. De façon intéressante, cette dernière étude met aussi l'accent sur l'importance de la communauté dans l'efficacité de l'antibiotrophie, celle-ci étant supérieure quand *Microbacterium* sp. C448 a été inoculée accompagnée de sa communauté tellurique d'origine, l'hypothèse étant que cette dernière soutiendrait la souche dégradante.

Cependant, l'utilisation des antibiotrophes en bioremédiation peut paraître imprudente ; d'une part il s'agit probablement d'une forme de résistance aux antibiotiques que l'on ne souhaite donc pas propager, d'autre part les matrices à traiter peuvent à l'image des eaux usées ou des lisiers être chargées en bactéries potentiellement pathogènes. Il y aurait donc des risques importants de transmission par transfert horizontal de l'antibiotrophie pouvant aboutir aux conséquences mentionnées ci-dessus. Une solution envisageable pour éviter tout risque de dispersion, serait l'utilisation de la technologie de bioremédiation appliquant les enzymes de dégradation et non la

souche elle-même (Sharma *et al.*, 2018). Par ailleurs, parmi les risques associés à la bioremédiation, il faut souligner que la dégradation des antibiotiques peut être partielle aboutissant à des produits dont la toxicité, souvent méconnue à ce jour, peut être accrue (Long *et al.*, 2020).

L'un des principaux objectifs de la bioremédiation des antibiotiques est la réduction de la pression de sélection qu'ils exercent favorisant les bactéries antibiorésistantes. L'hypothèse sous-jacente est que la diminution de la pression antibiotique diminuerait l'acquisition des fonctions de résistance (par mutation ou transfert horizontal) et défavoriserait les bactéries résistantes qui seraient alors encombrées d'une fonction devenue inutile. Mais la probabilité de ce scénario est réduite du fait que l'antibiorésistance n'entraîne pas nécessairement une surcharge métabolique et qu'elle peut même être sélectionnée sous certaines conditions environnementales. Par exemple, *Escherichia coli* confrontée à un stress thermique tendra à acquérir une résistance à la rifampicine sans même être exposée à cet antibiotique (Rodríguez-Verdugo *et al.*, 2013). De plus, les gènes de résistances sont souvent regroupés sur des éléments génétiques mobiles ou co-sélectionnés avec la résistance à d'autres substances comme les métaux (Seiler and Berendonk, 2012). Ainsi, même quand la pression de sélection antibiotique est levée, les gènes de résistances peuvent être indirectement sélectionnés par la présence d'autres substances. Il a par exemple été montré que la diminution des prescriptions de sulfamides mis en place au Royaume-Uni, n'a pas entraîné la diminution souhaitée des niveaux d'antibiorésistance. Une des explications avancées concerne le fait que ces gènes sont parfois situés sur des plasmides augmentant par eux-mêmes la fitness bactérienne (Enne *et al.*, 2001, 2004).

PRÉSENTATION GÉNÉRALE DU SUJET DE THÈSE

La contamination de l'environnement par les antibiotiques et les antibiorésistances prend en partie source dans les agrosystèmes. Débutant dans les excréments d'animaux d'élevage, elle se poursuit par leur épandage sur les sols agricoles comme fertilisants organiques et peut atteindre le compartiment aquatique au gré des événements climatiques, par différents processus tels que le ruissellement ou l'érosion. En prenant le cas de la sulfaméthazine, un antibiotique bactériostatique de la classe des sulfamides à usage exclusivement vétérinaire qui inhibe le métabolisme des folates par liaison à la DHPS, on peut ainsi observer une contamination par cette substance tout au long du continuum lisier-sol-sédiment (Martin-Laurent *et al.*, 2019). Les concentrations de l'ordre du $\mu\text{g.kg}^{-1}$ voir du mg.kg^{-1} dans les lisiers se diluent dans les sols et sédiments à des concentrations se rapprochant plus du ng.kg^{-1} . Cette contamination s'accompagne d'une forte présence de bactéries résistantes aux sulfamides notamment via diverses versions du gène *sul* codant pour des isoprotéines insensibles de la DHPS permettant ainsi de rétablir le métabolisme des folates (Sköld, 2000). C'est dans les années 2000 que les premières observations indirectes d'antibiotrophie pour les sulfamides ont été rapportées avec une augmentation des capacités de dégradation bactérienne après plusieurs expositions à la sulfaméthazine (Islas-Espinoza *et al.*, 2012) ou encore la dégradation d'un autre sulfamide, le sulfaméthoxazole, uniquement quand il n'y a pas de ressource azotée alternative (Drillia *et al.*, 2005). Ces observations ont été confirmées par la suite avec l'isolement dans différents agrosystèmes de plusieurs souches antibiotrophes capables d'utiliser, comme source d'azote et/ou de carbone, un panel de sulfamides, dont la sulfaméthazine (Topp *et al.*, 2013; Tappe *et al.*, 2013; Bouju *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2019). Les études moléculaires ont permis d'élucider en grande partie le métabolisme de dégradation qui repose sur 3 enzymes. La mono-oxygénase SadA, responsable de

l'attaque initiale de la molécule antibiotique, libère du 4-aminophénol transformé par la mono-oxygénase SadB en 1,2,4-trihydrobenzène qui peut être minéralisé. SadC fournit quant à elle la FMNH₂ nécessaire aux deux réactions mais qui peut être substituée par d'autres flavine-réductases (Ricken *et al.*, 2017, Figure 5). Actuellement encore peu étudiée, cette fonction de dégradation soulève de nombreuses interrogations sur les éventuelles conséquences écologiques de son émergence notamment concernant son impact sur la pollution environnementale par les antibiotiques et les antibiorésistances. Le cœur du problème repose sur l'ambivalence de l'antibiotrophie, puisqu'elle peut être perçue à la fois comme un outil potentiel de bioremédiation conduisant à l'atténuation des sulfamides dans l'environnement, mais aussi comme un nouvel atout favorisant la dispersion des bactéries antibiorésistantes. La littérature souligne en effet que pour ces substances, les bactéries antibiotrophes connues à ce jour sont toujours porteuses de gènes de résistance *sul*.

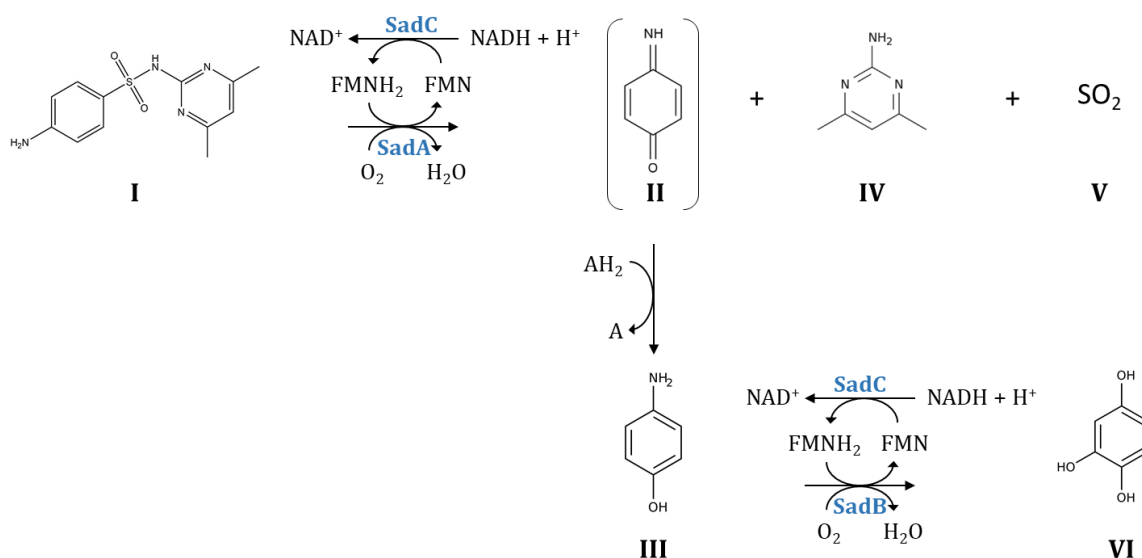


Figure 5 – Voie de dégradation de la sulfaméthazine catabolisée par les enzymes SadA, SadB et SadC selon les travaux de Ricken *et al.* (2017). I : sulfaméthazine; II : 4-benzoquinoneimine; III : 4-aminophénol; IV : 2-amino-4,6-diméthylpyrimidine; V : sulphite; VI : trihydroxybenzène.

Le projet ANTIBIOTOX (ANR-17-CE34-0003) dans lequel s'inscrit cette thèse s'est donc, entre autres, donné l'objectif de contribuer à mieux appréhender les risques et bénéfices que présente l'antibiotrophie, en prenant comme contexte d'étude le continuum lier-sol-sédiment des agrosystèmes. Le développement et la dispersion de l'antibiotrophie via une souche modèle *Microbacterium* sp. C448 dans cette succession d'environnements aux paramètres biotiques et abiotiques variés ont donc été explorés avec comme finalité la mise en exergue d'interdépendances concernant la contamination en sulfaméthazine et en antibiorésistances.

Puisque la dispersion bactérienne était au centre des interrogations, des études ont pris place aux deux interfaces du continuum où se rencontrent deux écosystèmes différents (lisier et sol dans un cas ; sol et sédiment dans l'autre) et qui, suivant la définition de coalescence, aboutit en un troisième avec ces paramètres propres (Mansour *et al.*, 2018, Figure 6).

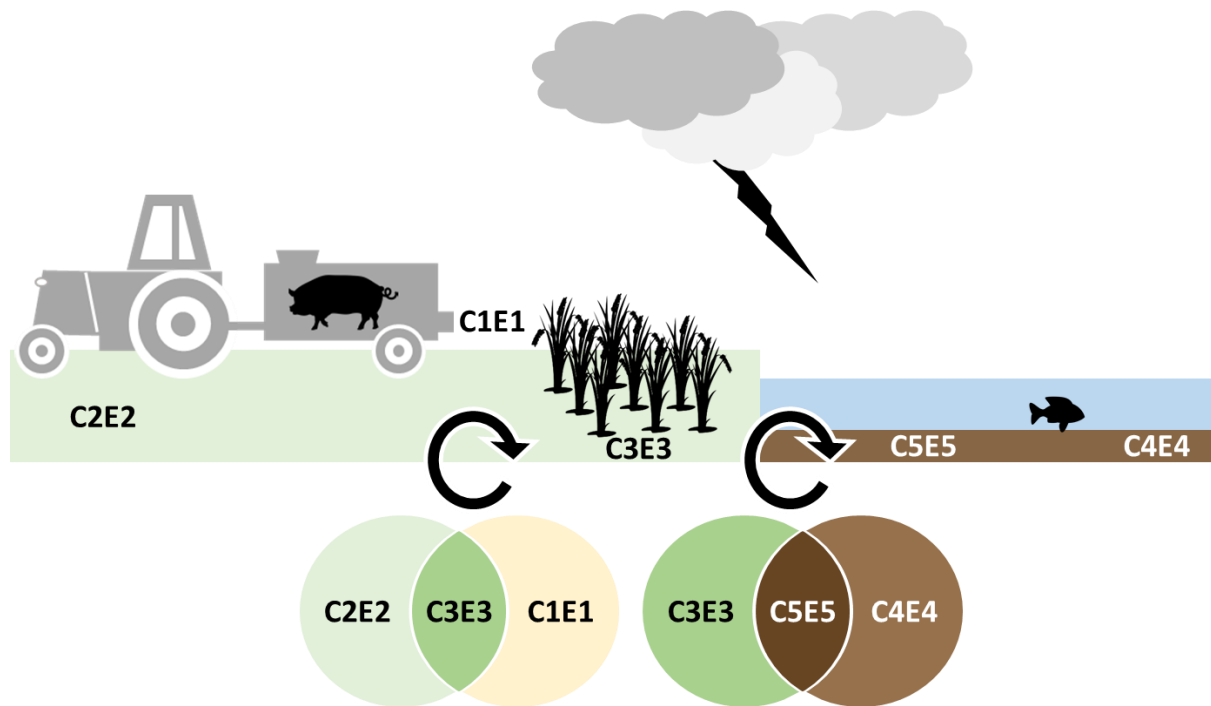


Figure 6 – Vision schématique des évènements de coalescence se succédant le long du continuum lisier-sol-sédiment. C_n représente les différentes communautés bactériennes avec leur composition propre et E_n représente les différents environnements (n compris entre 1 et 5). Le scénario ici représenté est celui d'un mélange global impliquant les composantes biotiques et abiotiques des écosystèmes.

En complément à l'étude spécifique de la fonction d'antibiotrophie, nous avons donc examiné les résultantes de ces évènements de coalescence, en prenant en considération l'influence du contexte de contamination par la sulfaméthazine. Une des hypothèses testées était que les bactéries du compartiment donneur verraient leur potentiel invasif augmenté par l'antibiotique puisque, du fait d'un gradient décroissant du niveau d'exposition aux antibiotiques le long du continuum, elles présenteraient une tolérance supérieure comparée à celles du compartiment receveur.

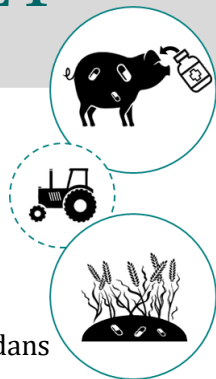
Deux études se sont succédées. Elles représentent chacune un chapitre de ce manuscrit.

- **Le premier chapitre** qui prend comme contexte l'amendement des sols agricoles avec du lisier s'intéresse d'abord à la capacité de dispersion dans les sols de la bactérie antibiorésistante *Microbacterium* sp. C448 et ses conséquences au niveau de l'activité

antibiotrophe dans ce milieu receveur. Il se poursuit ensuite par l'étude plus générale du processus de coalescence, en appréhendant l'invasion des sols par des bactéries du lisier.

- **Le second chapitre** considère un contexte d'érosion du sol vers le compartiment aquatique. S'intéressant dans un premier temps au potentiel antibiotrophe endogène de sédiments naturels de rivière, il explore ensuite la capacité d'installation d'une souche antibiotrophe exogène et l'influence de l'apport de sol sur l'activité antibiotrophe dans le compartiment sédimentaire.

CHAPITRE 1



L'étude de la dispersion de l'antibiotrophie le long du continuum lisier-sol-sédiment a débuté dans la logique chronologique par une expérience ayant comme contexte l'épandage de lisier sur les sols agricoles. L'objectif premier était de vérifier que l'implantation de *Microbacterium* sp. C448 pouvait accélérer la dégradation de la sulfaméthazine dans différents types de sol ainsi que d'appréhender l'éventuel impact de l'épandage de lisier porcin, une matrice fréquemment évoquée dans les études rapportant l'isolement de souches antibiotrophes. Le second était de mieux comprendre les conséquences de l'épandage de lisier sur la diversité des communautés bactériennes des sols, en considérant les processus de coalescence et l'influence du contexte de contamination par la sulfaméthazine.

Pour atteindre ces objectifs, il a été utilisé un dispositif expérimental complexe reposant sur une approche en microcosmes impliquant quatre sols avec des paramètres physiques différents et des communautés microbiennes distinctes. Ces sols ont été inoculés ou non avec la souche antibiotrophe *Microbacterium* sp. C448, accompagnée ou non d'un épandage de lisier porcin et/ou d'un traitement à la sulfaméthazine (Figure 7). Au bout d'un mois d'incubation des sols, le gène de dégradation *sadA* ainsi que le gène *groL* spécifique de la souche ont été quantifiés par PCR quantitative, les communautés bactériennes ont été comparées à partir de données de séquençage de l'ADNr 16S et la fraction libre de l'antibiotique a été estimée par dosage. La minéralisation de l'antibiotique a été mesurée pendant et après le mois d'incubation par radiorespirométrie dans des microcosmes distincts, supplémentés en sulfaméthazine radiomarquée au carbone 14.

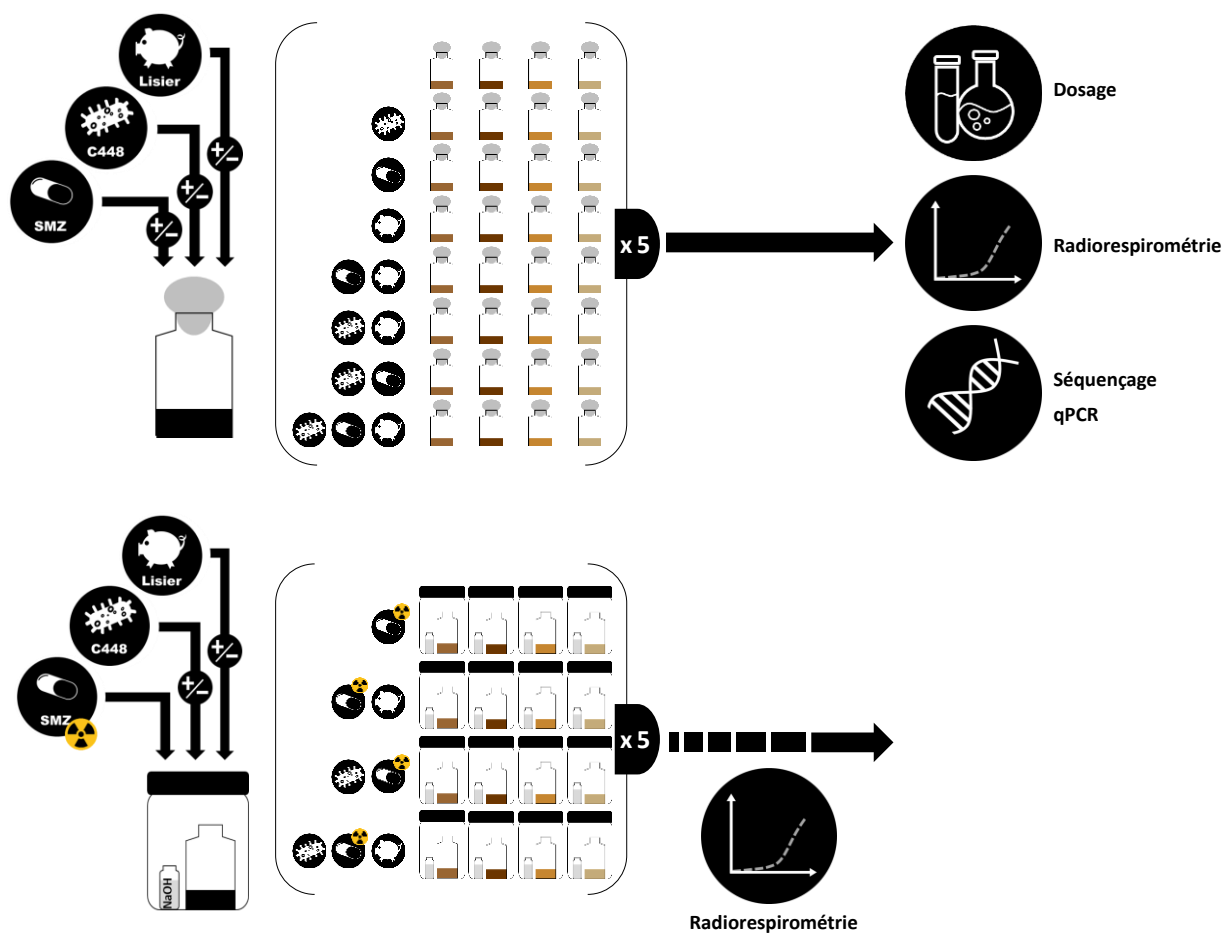


Figure 7 – **Dispositif expérimental faisant le lien entre le lisier et le compartiment tellurique.** La partie supérieure schématise les 8 conditions (3 modalités de traitement : \pm *Microbacterium* sp. C448 \pm sulfaméthazine \pm lisier) apposées sur 5 microcosmes de 4 sols à la texture contrastée. S'en suit à droite la liste des différentes mesures réalisées au terme du mois d'incubation. La partie inférieure schématise la mesure de la minéralisation de la SMZ au cours de l'incubation réalisée pour les microcosmes traités avec l'antibiotique. Pour cela, ces microcosmes ont été dupliqués, traités avec une quantité infinitésimale de ^{14}C -SMZ et placés dans une enceinte radiorespirométrique afin d'effectuer une cinétique de minéralisation.

L'ensemble des résultats obtenus a été valorisé dans 2 articles :

- Le premier publié dans « *Frontier in Microbiology* » a permis de montrer que :
 - (i) L'installation de *Microbacterium* sp. C448 dans les sols est possible mais conditionnée par la présence de sulfaméthazine.
 - (ii) L'antibiotrophie interviendrait en renfort, pour soutenir l'invasion de la souche quand la libération de niche par l'action biocide de l'antibiotique est insuffisante ou que des compétiteurs sont apportés.

- (iii) La présence de *Microbacterium* sp. C448 ne garantit pas la dégradation de la sulfaméthazine, réduisant du fait son potentiel pour un objectif de bioremédiation.
- Le second soumis au journal « *Microbial Ecology* » indique que :
 - (i) Les bactéries les plus abondantes du lisier (et notamment celles qui appartiennent à l'embranchement des Firmicutes) ont le plus de chance d'envahir les sols.
 - (ii) Un historique d'épandage prévient de futures invasions bactériennes.
 - (iii) La contamination du lisier par la sulfaméthazine peut augmenter le succès d'invasion de certaines bactéries dans les sols.

ARTICLE 1 - Antibiotrophy: Key function for antibiotic-resistant bacteria to colonize soils—Case of sulfamethazine-degrading *Microbacterium* sp. C448

Référence article : *Frontiers in Microbiology* 12:643087. doi: 10.3389/fmicb.2021.643087

Loren Billet^{1,2*}, Stéphane Pesce², Nadine Rouard¹, Aymé Spor¹, Laurianne Paris³, Martin Lereboure³, Arnaud Mounier¹, Pascale Besse-Hoggan³, Fabrice Laurent-Martin¹, Marion Devers-Lamrani¹

¹AgroSup Dijon, INRAE, Université de Bourgogne Franche-Comté, Agroécologie, F-21000 Dijon, France

² INRAE, UR RiverLy, F-69625 Villeurbanne, France

³ Université Clermont Auvergne, CNRS, Sigma Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Keywords: sulfonamide, antibiotic biodegradation, soil, microbial ecotoxicology, bacterial community invasion.

Abstract

Chronic and repeated exposure of environmental bacterial communities to anthropogenic antibiotics have recently driven some antibiotic-resistant bacteria to acquire catabolic functions, enabling them to use antibiotics as nutritive sources (antibiotrophy). Antibiotrophy might confer a selective advantage facilitating the implantation and dispersion of antibiotrophs in contaminated environments. A microcosm experiment was conducted to test this hypothesis in an agroecosystem context. The sulfonamide-degrading and resistant bacterium *Microbacterium* sp. C448 was inoculated in four different soil types with and without added sulfamethazine and/or swine manure. After 1 month of incubation, *Microbacterium* sp. (and its antibiotrophic gene *sadA*) was detected only in the sulfamethazine-treated soils, suggesting a low competitiveness of the strain without antibiotic selection pressure. In the absence of manure and despite the presence of *Microbacterium* sp. C448, only one of the four sulfamethazine-treated soils exhibited mineralization capacities, which were low (inferior to $5.5 \pm 0.3\%$). By contrast, manure addition significantly enhanced sulfamethazine mineralization in all the soil types (at least double, comprised between $5.6 \pm 0.7\%$ and $19.5 \pm 1.2\%$). These results, which confirm that the presence of functional genes does not necessarily ensure functionality, suggest that sulfamethazine does

not necessarily confer a selective advantage on the degrading strain as a nutritional source. 16S rDNA sequencing analyses strongly suggest that sulfamethazine released trophic niches by biocidal action. Accordingly, manure-originating bacteria and/or *Microbacterium* sp. C448 could gain access to low-competition or competition-free ecological niches. However, simultaneous inputs of manure and of the strain could induce competition detrimental for *Microbacterium* sp. C448, forcing it to use sulfamethazine as a nutritional source. Altogether, these results suggest that the antibiotrophic strain studied can modulate its sulfamethazine-degrading function depending on microbial competition and resource accessibility, to become established in an agricultural soil. Most importantly, this work highlights an increased dispersal potential of antibiotrophs in antibiotic-polluted environments, as antibiotics can not only release existing trophic niches but also form new ones.

I. Introduction

Antibiotics and their residues deserve specific attention as pollutants of emerging concern. Most are slightly and partially metabolized in humans or animals prior to excretion (Lamshöft *et al.*, 2007; Hawkshead, 2008), resulting in heavy contamination of wastewater and livestock manure (Kümmerer, 2001; Watkinson *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2017), where they can reach concentrations of up to micrograms per liter (Peng *et al.*, 2006; Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2020) and milligrams per kilogram (Haller *et al.*, 2002; Cid *et al.*, 2018), respectively. The disposal processes applied to these matrices lack efficiency, and so the discharge of wastewater into aquatic ecosystems or manure spread on soils, a common agricultural practice for nutrient recycling and soil fertilization, contributes to the release of antibiotics into different environmental compartments (Watkinson *et al.*, 2007; Heuer *et al.*, 2011; Ghirardini *et al.*, 2020).

By their mode of action and their targets, antibiotics have several ecotoxicological effects on environmental bacteria. First, the direct biocidal action of an antibiotic can alter microbial communities and disturb their function supporting ecosystem services (Costanzo *et al.*, 2005; Ding and He, 2010; Hammesfahr *et al.*, 2011; Pinna *et al.*, 2012; Proia *et al.*, 2013; Cycoń *et al.*, 2019). For instance, tetracycline can alter the denitrification process of soil microbial communities (Shan *et al.*, 2018) while sulfamethazine was shown to negatively impact the phosphatase activity and the respiration of soil microflora (Liu *et al.*, 2009). Second, exposure to antibiotics can induce an adaptive response of microbial communities, notably through the development and spread of antibiotic-resistant bacteria and genes. Numerous studies have shown a positive correlation between antibiotic contamination and the occurrence of antibiotic-resistance genes in ecosystems receiving the above polluted matrices (Hawkshead, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Bengtsson-Palme and Larsson, 2016; Bengtsson-Palme *et al.*, 2018). Contamination of ecosystems by antibiotics is thus a major health concern, as these environmental microbial communities constitute reservoirs of resistance that might potentially be transferred to pathogenic bacteria (Perry and Wright, 2013; Zrimec, 2020).

The adaptive capacities of environmental microorganisms toward organic pollutants are not limited to increased tolerance or resistance, but also include the development of catabolic pathways (Pesce *et al.*, 2020). In this way, the long-term exposure of microbial communities to these substances can lead to the emergence of bacteria able to use them as nutrient sources (Copley, 2000; Janssen *et al.*, 2005). Although the pesticide-degrading function has been extensively studied (Behki and Khan, 1986; Rani and Lalithakumari, 1994; Aislabie *et al.*, 1997; Gisi *et al.*, 1997), the existence of antibiotic-degrading bacteria was reported more recently (Barnhill *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2012; Topp *et al.*, 2013; Leng *et al.*, 2016; Crofts *et al.*, 2018). The

low environmental concentrations of antibiotics compared to pesticides, together with their biocidal effects on many microorganisms, have probably slowed down the development, emergence, and spread of antibiotic-degrading functions. However, the likelihood of such emerging abilities has risen with the increasing concentrations of antibiotics in the environmental compartments along with the decreasing sensitivity of microbial communities. The latest effect is due to the spread of a wide range of antibiotic resistances (Stoll *et al.*, 2012; Bengtsson-Palme *et al.*, 2018) and/or to phenotypic adaptation following chronic exposure to antibiotics (Schmitt *et al.*, 2005; Corona and Martinez, 2013).

In the last decade, a handful of antibiotic-resistant bacteria able to use some antibiotics as nutritive sources were isolated from various environmental matrices repeatedly exposed to relatively high concentrations of antibiotics as agricultural soil (Topp *et al.*, 2013), membrane bioreactor (Bouju *et al.*, 2012), and activated sewage sludge (Lin *et al.*, 2015). The degradative function, termed “antibiotrophy” (Woappi *et al.*, 2016), is specific to an antibiotic or a class of antibiotics, such as β -lactams (Lin *et al.*, 2015; Crofts *et al.*, 2018) or erythromycin (Gao *et al.*, 2015). The case of sulfonamide is currently the most documented (Bouju *et al.*, 2012; Tappe *et al.*, 2013; Topp *et al.*, 2013; Ricken *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2019).

Among antibiotics, sulfonamides are synthetic bacteriostatic compounds largely used in veterinary and human medicine (Shah *et al.*, 2013). They act as competitive inhibitors of the dihydropteroate synthase involved in the synthesis pathway of nucleic acids (Brown, 1962). The most documented resistance mechanism relies on four genes (*sul1*, *sul2*, *sul3*, and *sulA*), coding for dihydropteroate synthase isoproteins insensitive to sulfonamide (Wise and Abou-Donia, 1975; Yun *et al.*, 2012). Both sulfonamides and *sul* genes are widely detected in different environmental matrices such as livestock manure, surface water, and river sediment (Pei *et al.*, 2006; McKinney *et al.*, 2010; Stoll *et al.*, 2012). The dispersion potential of these plasmid-borne resistant genes is enhanced by their common association with integrons (Antunes *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2018), which also contain a variety of resistance genes toward many kinds of biocides (e.g., disinfectants, metals, antibiotics, etc.). Exposure to these biocides can therefore lead to a co-selection of sulfonamide resistances (Pei *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2010; McKinney *et al.*, 2010; Hoa *et al.*, 2011; Stoll *et al.*, 2012). Sulfonamide antibiopathy is a recent discovery. Reports on environmental sulfonamide-degrading bacteria are still few but increasing. Those already described originate from different geographically distant matrices, but are phylogenetically close, and their sulfonamide degradative pathway relies on the same cluster of genes (Ricken *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2019). It is composed of two flavin-dependent monooxygenases (*sadA* and *sadB*) and one flavin mononucleotide reductase (*sadC*). Although genetic and metabolic studies have been conducted

on isolated sulfonamide antibiotrophs, information is lacking on the ecological impact of this function for bacterial carriers in complex environmental bacterial communities. Manure amendment on soils, known not only to increase the fertility of soils but also to introduce biological contaminants and chemical pollutants, may also be involved in the environmental dispersion of antibiotrophy (Heuer *et al.*, 2011; Tappe *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2019).

At first glance, the development of antibiotic degradation capacities might seem environmentally beneficial by increasing the self-purifying potential of ecosystems, contributing to the natural attenuation of their contamination by antibiotics. Likewise, it could be perceived as a bioremediation tool that could improve the removal of antibiotics from contaminated matrices before their discharge into the environment (Hirth *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020). However, given that currently known antibiotrophs are also antibiotic-resistant, the question arises of whether antibiotrophy could lend them a selective advantage and so facilitate their implantation and dispersion in the environment.

We conducted a microcosm study to investigate the mechanisms driving the emergence and development of antibiotrophy in agricultural soils. Specifically, we investigated whether an allochthonous bacterium harboring both sulfonamide resistance and degradation genes could become established within natural microbial communities in soils subjected to both sulfonamide contamination and manure amendment. For this purpose, we considered four different soil types with and without added sulfamethazine (SMZ) and/or swine manure, and with and without inoculation with the sulfonamide-degrading and resistant bacterial strain, *Microbacterium* sp. C448. This model bacterium was isolated from experimental soils exposed for 10 years to an annual increasing dose of SMZ ranging from 1 to 10 mg kg⁻¹ (Topp *et al.*, 2013). It presents the advantage of being well-characterized genetically and physiologically (Martin-Laurent *et al.*, 2014). To assess the establishment of *Microbacterium* sp. C448 in soil communities, its abundance was measured, after 1 month of incubation, by qPCR assay targeting its *groL* gene sequence. The resulting effect of applied treatments on the soil community's genetic potential for sulfonamide degradation was assessed through the quantification of the *sadA* gene sequence. To determine whether the degradation potential was expressed, we measured the mineralization kinetics of ¹⁴C-SMZ during the incubation period and quantified the remaining extractable fraction of SMZ at the end of the incubation period. Finally, we assessed the effects of the eight treatments on the soil microbial community structure and diversity by Illumina 16S rDNA sequencing.

II. Materials and methods

1. Collection and analyses of soils and manure

Soils and manure were collected in the Bourgogne–Franche–Comté region of France in November 2018. Four soils, A, B, C, and D, selected for their different textures, were sampled from the upper 20 cm of different agricultural fields, air-dried, sieved (mesh size 5 mm), and stored in airtight plastic bags at 4°C until use. Soil A originated from an agricultural field frequently flooded by the nearby Saône river. Soil B came from the same plot but was less often flooded owing to its higher altitude. Soil C originated from the experimental farm of Epoisses. Soil D was sampled near a hog nursery and had received manure 6 months before the sampling. The pedological variables of the soils (pH, ion retention, grain size, and water content at pF 2.7) are given in Supplementary Table 1.S1. Manure was collected from the covered pit of a hog nursery and stored in plastic bottles at 4°C until use. SMZ quantification was performed on soil and manure samples (Supplementary Table 1.S1). SMZ concentration reached 0.94 $\mu\text{g L}^{-1}$ in manure.

2. Microcosm experiment setup

The experiment consisted in incubating soil treated or not with manure, contaminated or not with SMZ, and inoculated or not with *Microbacterium* sp. C448. Considering eight conditions and five replicates per condition, 40 microcosms for each soil were prepared as described below. Microcosms containing 50 g dry weight (DW) of soils were prepared in glass bottles closed with air-permeable lids made of gauze and cotton (Supplementary Figure 1.S1). They were incubated for 1 week at 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) to gently activate the native soil microorganisms. Soil microcosms were humidified up to 80% of their water content at pF 2.7. To inoculate microcosms with *Microbacterium* sp. C448, the strain was first grown in LB-Miller liquid medium at 28°C under 130 rpm agitation. The grown cells were collected in their exponential phase ($OD_{600\text{nm}} \sim 1$ AU) and washed twice with NaCl 0.9%. SMZ sodium salt [SMZ, CAS number: 1981-58-4, 4-amino-N-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)benzenesulfonamide, Sigma-Aldrich, France] was diluted to 100 mg mL⁻¹ in water and filtered (0.2 μm). The manure was incubated overnight at room temperature ($20 \pm 1^\circ\text{C}$). Treatments were prepared a few minutes before their application on soils to reach nominal concentrations of 10⁴ cells of *Microbacterium* sp. C448 g⁻¹ dry soil, 100 mg of SMZ kg⁻¹ dry soil, and 13 mL of manure kg⁻¹ dry soil [eight treatments, five replicates (Supplementary Figure 1.S1)]. The microcosms were incubated at room temperature in the dark for 1 month and maintained at a stable humidity by regular watering (80% of their water content at pF 2.7). At the end of the incubation, we subsampled each microcosm for DNA extraction and further molecular analyses.

3. SMZ fate monitoring

3.1. SMZ mineralization monitoring

For the soil treated with SMZ, the mineralization SMZ was monitored over the time of incubation by radiorespirometry. To do so, the SMZ-treated microcosms were duplicated, with one series being exposed to ^{12}C -SMZ and another one being exposed to a mixture of ^{12}C - and ^{14}C -SMZ (Supplementary Figure 1.S1). These last ones were treated with 0.11 μCi of ^{14}C -ring labeled SMZ (^{14}C -SMZ, CAS number: 57-68-1, radiochemical purity: >98%, specific radioactivity: X MBq mmol^{-1}) and placed in closed respirometer jars. $^{14}\text{CO}_2$ released from the ^{14}C -SMZ degradation was trapped in 5 mL of 0.2 M NaOH solution and regularly analyzed by liquid scintillation counting using ACS II scintillation fluid (Amersham).

3.2. SMZ quantification

The initial concentration of SMZ in the matrices used in this study (soil and manure) as well as the SMZ remaining in the soil microcosms at the end of the incubation were measured as described below.

To Nalgene PPCO 50-mL centrifuge tubes (checked for lack of SMZ sorption capacity) were added 6.0000 ± 0.0005 g of each previously dried and crushed SMZ-contaminated soil sample and 20 mL of MeOH/H₂O 4/1 (v/v) mixture. The tubes were stirred for 18 h using an orbital shaker (Heidolph Reax) at 50 rpm and room temperature. After centrifuging ($12,500 \times g$ for 15 min), the supernatant was filtered on a 0.45- μm syringe PVDF filter (after checking for lack of sorption) before injecting on HPLC. The four soils were spiked with standard SMZ solutions at different concentrations and underwent the same protocol. The recovery percentages ranged between $79 \pm 1\%$ and $93 \pm 2\%$ according to the soil. The antibiotic concentrations of soil liquid extracts were determined by HPLC on an Agilent 1100 apparatus (Courtaboeuf, France) equipped with a reverse-phase column (C18 Zorbax Eclipse Plus column, 75 mm \times 4.6 mm, 3.5 μm) at 22°C and a diode array detector set at $\lambda = 260$ and 298 nm. The mobile phase was composed of aqueous H₃PO₄ (0.01% v/v, pH = 2.9) (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 1 mL min^{-1} . Gradient (linear): 0–5 min: 2% B; 5–8 min: 2–30% B; 8–10 min: 30–90% B; 10–10.5 min: 90–100% B; 10.5–11.5 min: 100% B; 11.5–13 min: 100–2% B. Injection volume: 10 μL .

Each sample was analyzed twice (technical duplicate). Some samples were also treated with the LC/ESI-MS protocol (below) to check the SMZ concentrations. These were diluted 1/1000 before LC/MS analysis.

For the non-contaminated soil samples, the protocol was the same except that 50 μL of a 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ SMZ- d_4 (LCG standards) solution was added to each centrifuge tube. After centrifuging, the supernatant was concentrated in a Speed-Vac vacuum concentrator heated at 35°C. The residue was dissolved in 10 mL of distilled water. After adjusting the pH to 3.8 ± 0.2 , samples were concentrated 40-fold on Oasis HLB 500-mg cartridges (Waters™) according to the manufacturer's recommendations (elution: 10 mL methanol). The antibiotic concentrations were determined by LC/ESI-MS on a Thermo Scientific UHPLC Ultimate 3000 RSLC coupled with an Orbitrap Q-Exactive analyzer. The analyses were carried out in positive mode. The UHPLC was equipped with a Luna Omega Polar C18 column; 100 \times 2.1 mm; 1.6 μm (Phenomenex) at 30°C with acetonitrile gradient + 0.1% formic acid (Solvent A) and water + 0.1% formic acid (Solvent B): 0–2.5 min: 30–64.5% A (linear); 2.5–2.6 min: 64.5–99% A (linear); 2.6–5 min: 99% A; 5–5.1 min: 99–30% A; 5.1–8 min: 30% A. Flow rate of 0.45 mL min^{-1} . For the mass spectrometer, gaseous N_2 was used as nebulizer gas (50 A.U.). The spray voltage was 3.0 kV.

4. Soil DNA extraction and real-time PCR

DNA was extracted from 250 mg of soil from each sample using the DNeasy PowerSoil-htp 96-well DNA isolation kit (Qiagen, France) following the manufacturer's instructions and stored at -20°C .

Real-time PCR reactions were carried out in a ViiA7 (Life Technologies, USA) in a 15- μL reaction volume. For *sadA* and *rss* genes, the mixture contained 7.5 μL of Takyon MasterMix (Eurogentec, France), 1 μM of each primer (Supplementary Table 1.S2), 250 ng of T4 gene 32 (QBiogene, France), and 3 ng of DNA. The quantification of *Microbacterium* sp. C448's *groL* required a specific probe. The reaction mixture contained 7.5 μL of Takyon Low ROX Probe 2X MasterMix dTTP blue (Eurogentec, France), 400 nM of each primer, 200 nM of the probe (Supplementary Table S2), 250 ng of T4 gene 32, and 3 ng of soil DNA. Each real-time PCR assay was performed twice independently. Standard curves were obtained using serial dilutions of linearized plasmids containing the appropriate cloned target genes from bacterial strains. The qPCR efficiencies ranged between 80% and 100%. Inhibition was assessed for each sample in accordance with ISO17601 (2016). No inhibition was detected in any case. The thermal cycling was performed as follows: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 30 s, annealing (Supplementary Table 1.S2) for 30 s, and 30 s at 60°C. Relative abundances were obtained by normalizing the copy number of genes *sadA* and *groL* with bacterial 16S rRNA gene *rss* copies. The detection limit was 50 copies/ng of DNA for *sadA* and *groL* and 5000 copies/ng of DNA for *rss*. The threshold expressed by 1000 copies of *rss* was determined by dividing the detection limit of the gene by the lowest quantification value of *rss*.

5. 16S rDNA sequencing and bioinformatic analysis

The V3–V4 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified using a two-step PCR and sequenced on MiSeq (Illumina, 2×250 bp) as previously described (Spor *et al.*, 2020).

A Jupyter Notebook developed in-house was used to analyze the sequence data. Briefly, sequences were assembled using PEAR (Zhang *et al.*, 2014) with default settings. Further quality checks were conducted using the QIIME pipeline (Caporaso *et al.*, 2010) and short sequences were removed (<400 bp). Reference-based and de novo chimera detection together with clustering in OTUs were performed using VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016) and Greengenes' representative set of 16S rRNA sequences as the reference database. The identity thresholds were set at 94%. Representative sequences for each OTU were aligned using Infernal (Nawrocki and Eddy, 2013) and a 16S rRNA phylogenetic tree was constructed using FastTree (Price *et al.*, 2010). Taxonomy was assigned using RDP Classifier (Wang *et al.*, 2007) and the latest released Greengenes database (v.05/2013; McDonald *et al.*, 2012). α -Diversity metrics (PD whole tree, species richness, and equitability index) were determined from rarefied OTU tables of 25,700, 24,500, 28,300, and 23,100 sequences per sample for soils A, B, C, and D, respectively. Sequences were deposited in the SRA at NCBI under the accession number SUB8712901.

6. Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using RStudio statistical software (version 1.2.5033). For each soil, we built an ad hoc analysis of variance (ANOVA) model to determine the effects of treatments on gene abundances and on the alpha diversity indices of bacterial communities. Normality and homogeneity of the residual distribution were inspected and log₁₀-transformations were performed when necessary. Differences in response variable related to the treatment (antibiotic treatment, manure amendment, and strain inoculation) were detected using the following model:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + T_j + I_k + A:T_{ij} + A:I_{ik} + T:I_{jk} + A:T:I_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

where Y_{ijkl} is the response variable, A is the fixed effect of manure amendment ($i = 1,2$), T is the fixed effect of sulfamethazine treatment ($j = 1,2$), I is the fixed effect of inoculation by *Microbacterium* sp. C448 ($k = 1,2$), and ε_{ijkl} are the residuals.

Tukey's test was performed to detect significant pairwise differences for each treatment (significance threshold set at $p < 0.05$).

The OTU table was also filtered to keep the dominant OTUs (relative abundance > 0.1%). For each soil, the OTUs that were significantly impacted by treatments were detected with the previous linear model. We opted for a custom model analysis to take into account the relative complexity of our experimental design that cannot be handled by classical analysis packages such as edgeR or DESeq2. A false discovery rate procedure was used to decrease substantially the probability of detecting false positives. The FDR significance threshold was set at 0.05.

III. Results and discussion

1. The soils, regardless of manure amendment, did not have innate antibiogenic potential or activity

After a 1-month incubation period, the antibiogenic gene *sadA* was not detected in the four soils even when they were amended with manure (Figure 1.1B, detection limit of 0.1 *sadA* copies per 1000 *rss*). Despite the exposure to SMZ, its abundance remained below the detection limit. This strongly suggests that the microbial communities of the four soils and manure do not initially possess bacteria carrying *sadA*, although some of them were previously exposed to low concentrations of SMZ (Supplementary Table 1.S3). *sadA* has only appeared in recent literature on sulfonamide-degrading bacteria isolated from environmental compartments after high and long-term exposure to sulfonamide antibiotics, such as bioreactor membranes (Bouju *et al.*, 2012), active sludges (Reis *et al.*, 2014), or manure-amended soils (Tappe *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2019).

However, the lack of detection of the key gene coding for the first enzyme of the only currently established SMZ antibiogenic pathway cannot exclude the possibility of antibiogenic activity catalyzed by other still unknown enzymes. We also measured the antibiogenic potential activity. These analyses relied on a similar microcosm experiment differing only by the addition of ¹⁴C-labeled SMZ to monitor the mineralization of its phenyl ring. The mineralization rates obtained for soils, regardless of manure amendment and SMZ treatment modalities, did not exceed 3% of initially added ¹⁴C-SMZ (Figure 1.2). Although an alternative low-efficiency SMZ-antibiogenic pathway can explain this slight observed mineralization, it can be reasonably assumed that it results from residual mineralization. Nonspecific biotic and abiotic mechanisms can partially break complex molecules (Gold *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2015), promoting fortuitous biological degradation. Moreover, the mineralization rates did not increase during the 1 month of exposure of native soil microbial communities to a high concentration of SMZ. We note that the experimental conditions were insufficient to guarantee enhancement and development of antibiogenic abilities.

2. *Microbacterium* sp. C448 needs SMZ to become established in the soil community

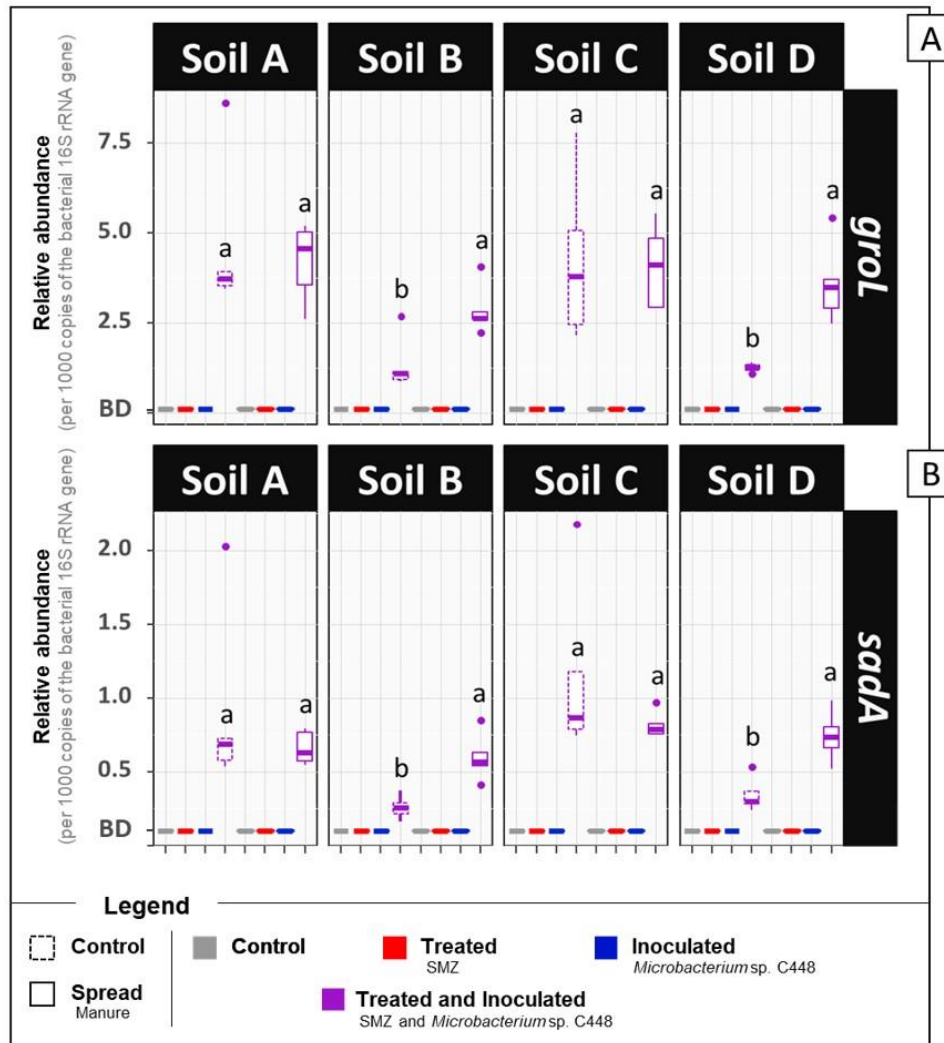


Figure 1.1 - **Relative abundances of *groL* (A) and *sada* (B) gene sequences in the soil microcosms** (four types of soil, A, B, C and D, amended or not with manure, treated or not with SMZ and inoculated or not with *Microbacterium* sp. C448). After 1 month of incubation, gene sequence abundances were measured by quantitative PCR and expressed per 1000 copies of the bacterial 16S rRNA gene *rrs* (Tukey's test, $n = 5$, $p < 0.05$). BD: below the detection limit (0.1 copy per 1000 16S rRNA gene).

After a 1-month incubation period, quantification of the *Microbacterium* sp. C448 through the estimation of the abundance of its *groL* gene sequence (Figure 1.1A) indicated that it could establish in the four tested soils but only under SMZ exposure. The relative abundance of the strain was relatively homogenous in the four treated soils (from 1.3 ± 0.1 to 4.6 ± 1.6 *groL* copies per 1000 copies of the 16S rRNA gene *rrs*), despite their different biotic and abiotic properties. Adding manure had either no impact (soils A and C) or a relatively limited one (soils B and D, $n = 5$, $p < 0.05$) on the relative abundance of the *groL* gene sequence. Extrapolating *groL* quantification

and assuming a soil DNA extraction yield of 1, at least 10^6 cells of *Microbacterium* sp. C448 per gram of dry soil were counted at the end of incubation in the SMZ-treated soils inoculated with 10^4 cells per gram of dry soil, indicating growth. Conversely, in the SMZ-untreated soils, *groL* gene sequences were below the detection limit of 0.1 *groL* per 1000 *rrs*, suggesting that *Microbacterium* sp. C448, initially absent, did not become established in these conditions. This indicates a low competitiveness for this strain, which possesses a low invasion potential under SMZ-free conditions and highlights the mandatory presence of the antibiotic for its establishment. SMZ may therefore be the main environmental driver controlling the efficiency of the establishment of *Microbacterium* sp. C448, at least in our experimental conditions. Given that this strain is also known to resist and degrade other sulfonamides such as sulfamethoxazole, sulfadiazine, or sulfadimethoxine (Martin-Laurent and Topp, unpublished data), this effect might hold for a wider range of antibiotics in this family.

Two main hypotheses could explain this selective advantage conferred by SMZ. The first is that the antibiotic may be used as a nutrient source exclusively dedicated to *Microbacterium* sp. C448, thus playing a major role in ecological selectivity (Nishiyama *et al.*, 1993; Karpouzas and Walker, 2000; Hong *et al.*, 2007). Specialized microorganisms, when they are the only ones possessing the required catabolic enzymes to mineralize selected xenobiotics, are able to establish and perform mineralization even if they are initially scant in the microbial community (van Veen *et al.*, 1997). The second hypothesis is that SMZ may release trophic niches by biocidal action (Pinna *et al.*, 2012; Reichel *et al.*, 2015), thus reducing negative interactions such as trophic interactions or competition (van Elsas *et al.*, 2012). These two non-exclusive hypotheses may explain why SMZ facilitates the establishment of the strain in the soil communities.

3. The presence of genetic potential for antibiogenesis in soil does not guarantee its expression

The relative abundance of the antibiogenic gene *sadA* (Figure 1.1B) followed trends similar to those of *groL*. *sadA* was detected only when *Microbacterium* sp. C448 was present (i.e., when *groL* was detected), with relative abundances fluctuating between 0.3 ± 0.1 and 1.1 ± 0.4 *sadA* copies per 1000 copies of *rrs* gene. More than just indicating that *Microbacterium* sp. C448 was initially the only host of *sadA* gene, it suggests that it kept its antibiogenic genetic potential after its establishment in the SMZ-treated soils, whether or not manure was added. This agrees with the idea that the antibiogenic function carried by *sadA* gene is probably useful in SMZ-polluted conditions.

Although previous studies have indicated that *sadA* is potentially mobile in other antibiotroph strains (Ricken *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2019), our results did not show any increase in the *sadA/groL* ratio (data not shown), suggesting an absence of horizontal gene transfer. This is consistent with the chromosomal localization of *sadA*, which makes its mobility via a horizontal gene transfer event unlikely (whole genome sequencing of *Microbacterium* sp. C448, Martin-Laurent *et al.*, 2014).

The main outcome of *groL* and *sadA* gene sequence quantification is that installation of *Microbacterium* sp. C448 and its antibiotrophic gene *sadA* both succeed as long as they are under SMZ selection pressure. However, and since the gene's presence does not guarantee its functional expression (Browning and Busby, 2004; Pietramellara *et al.*, 2008), qPCR assessments were complemented with functional analyses to assess potential ¹⁴C-SMZ mineralization. As stated above, mineralization rates obtained for conditions without *Microbacterium* sp. C448 were low and did not exceed 3% in any of the soils (Figure 1.2).

When *Microbacterium* sp. C448 was inoculated, a mineralization activity was observed for each soil, but it occurred only (in soils A, B, and D) or preferentially (in soil C) under manure spreading conditions (Figure 1.2). When the strain was applied simultaneously with manure, soils A, B, and D reached respectively $19.5 \pm 1.2\%$ (Figure 1.2A), $15.3 \pm 1.4\%$ (Figure 1.2B), and $5.6 \pm 0.7\%$ (Figure 1.2D) of SMZ mineralization. Soil C was the only one where *Microbacterium* sp. C448 was able to express its mineralization potential without manure spreading (Figure 1.2C). However, the mineralization rate was about half that with manure ($5.5 \pm 0.3\%$ versus $12.6 \pm 0.4\%$). Altogether, these results reveal that the presence of *Microbacterium* sp. C448 and its antibiotrophic gene *sadA* does not always result in effective antibiotrophy in SMZ-contaminated soils. In our experimental conditions, they reflect a modularity of the functional expression depending on the kind of soil and on manure addition what is commonly observed in particular for antibiotic degradation (Cycoń *et al.*, 2019). This lack of mineralization did not seem to result from the absence of SMZ bioavailability. The quantification of the SMZ extractable fraction performed at the end of the incubation period indicates that the amount of bioavailable SMZ was not or only slightly affected by manure amendment (Table 1.1). *Microbacterium* sp. C448 thus potentially had access to as much SMZ with manure amendment as without. Moreover, the variation of free SMZ amount between soils does not seem to be correlated to the variation of mineralization between soils, since the soil C with the lowest SMZ concentration was not the one with the lowest degradation rate. Altogether, these observations provide a nuanced response to the hypothesis for how SMZ can give *Microbacterium* sp. C448 a selective advantage. Without manure, the absence of mineralization (or the drastically diminished mineralization compared to manure treatment for

soil C) indicates that SMZ is not always essential as an exclusive dedicated nutrient source. We therefore investigated whether SMZ could also give this strain a selective advantage by its biocidal action to release ecological niches.

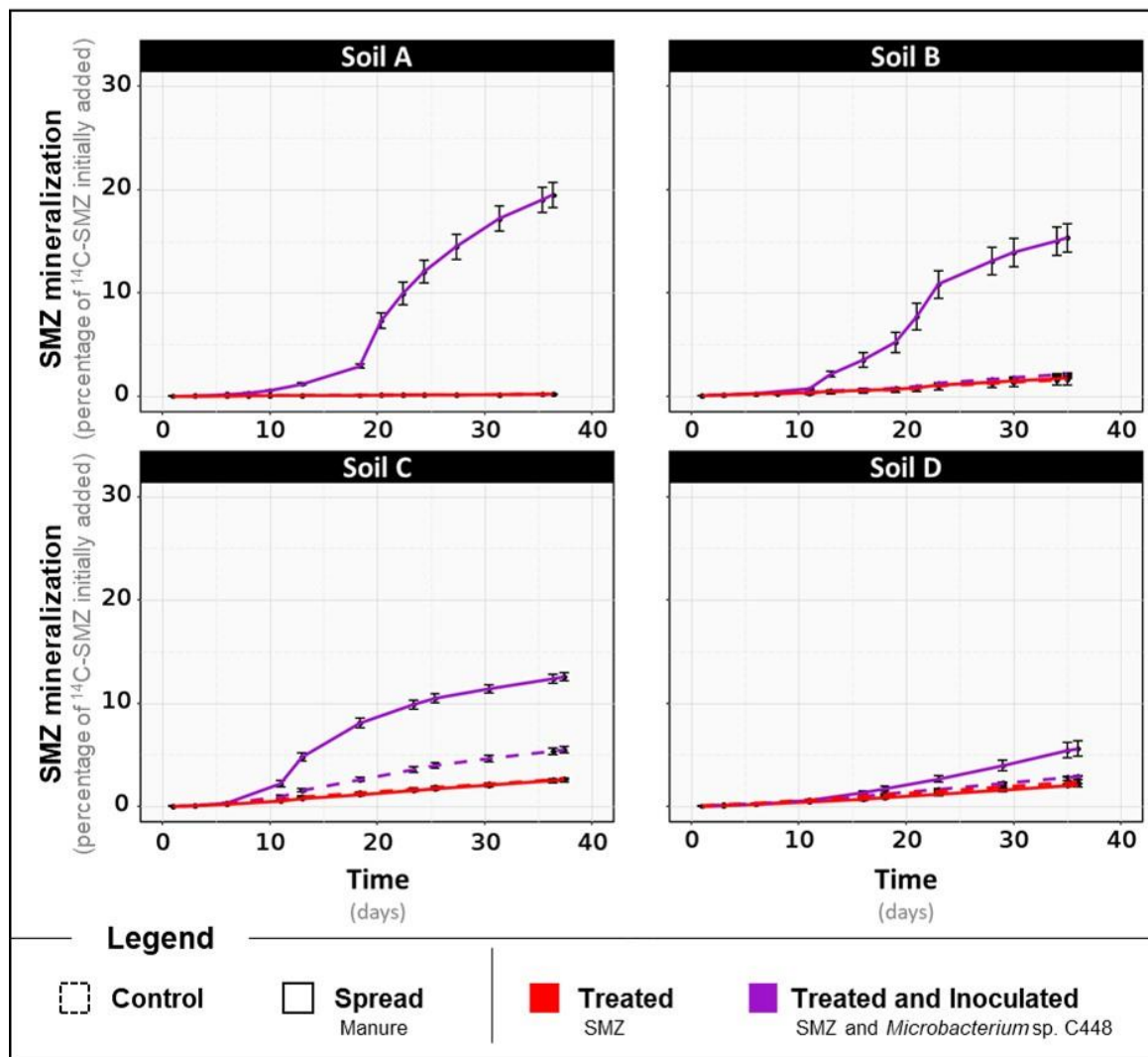


Figure 1.2 - Kinetics of ^{14}C -SMZ mineralization throughout the incubation for the four different types of soils, A, B, C, and D, treated with SMZ, amended or not with manure and inoculated or not with *Microbacterium* sp. C448. Results are expressed in percentage of initially added ^{14}C -SMZ.

4. Antibiotrophy efficiency depends on SMZ biocidal impact

The biocidal impact of SMZ on soil communities was evaluated by 16S rDNA sequencing to assess the resulting changes in the bacterial and archaeal community diversity and structure. From this sequencing, more than 23,100 partial 16S rDNA sequences were analyzed from each microcosm, accounting for 15195 OTUs. The overall diversity indices (richness, equitability, and observed species) in the four tested soils were not significantly impacted by SMZ addition, whether or not manure and/or *Microbacterium* sp. C448 were added (Supplementary Table 1.S4). This suggests

no or only transient effects of SMZ on community diversity, but it does not exclude impacts on the members of the community. Further OTU-level ANOVAs revealed that about 165 of the studied OTUs were significantly affected by SMZ in at least one of the soils (Figure 1.3A). This limited impact is coherent with the previous study of Cleary *et al.* (2016) in which few OTUs were significantly affected by the input of SMZ into soils. The response of the bacterial community to SMZ varied between soils. The soil A community was clearly the most negatively impacted with 55 OTUs whose abundance was significantly reduced by the antibiotic, while the soil C community appeared to be the most robust one, with only 8 OTUs negatively impacted (accounting for 14.1% and 2.3% of the bacterial community of untreated and non-amended soils, respectively). SMZ moderately affected soil B and D communities with respectively 15 and 20 OTUs with significantly reduced abundance (accounting for 5.3% and 2.7% of the bacterial community of untreated and non-amended soils, respectively). In parallel, the abundance of some OTUs was also increased, probably benefiting from the decrease in others.

Pre-adaptation of bacterial communities to antibiotics could have been the main factor explaining the variations in the biocidal impact (Schmitt *et al.*, 2004; Brandt *et al.*, 2009). This was not the case here since the SMZ impact on the community of soil A was much stronger than on that of soil B, whereas they were exposed before the experiment to similar concentrations of SMZ (Supplementary Table 1.S1). The second most probable factor explaining the variation of SMZ impact could be its bioavailability, since only the free fraction can be bioavailable for bacteria and exert its biocidal action. The SMZ quantification supports this hypothesis (Table 1.1).

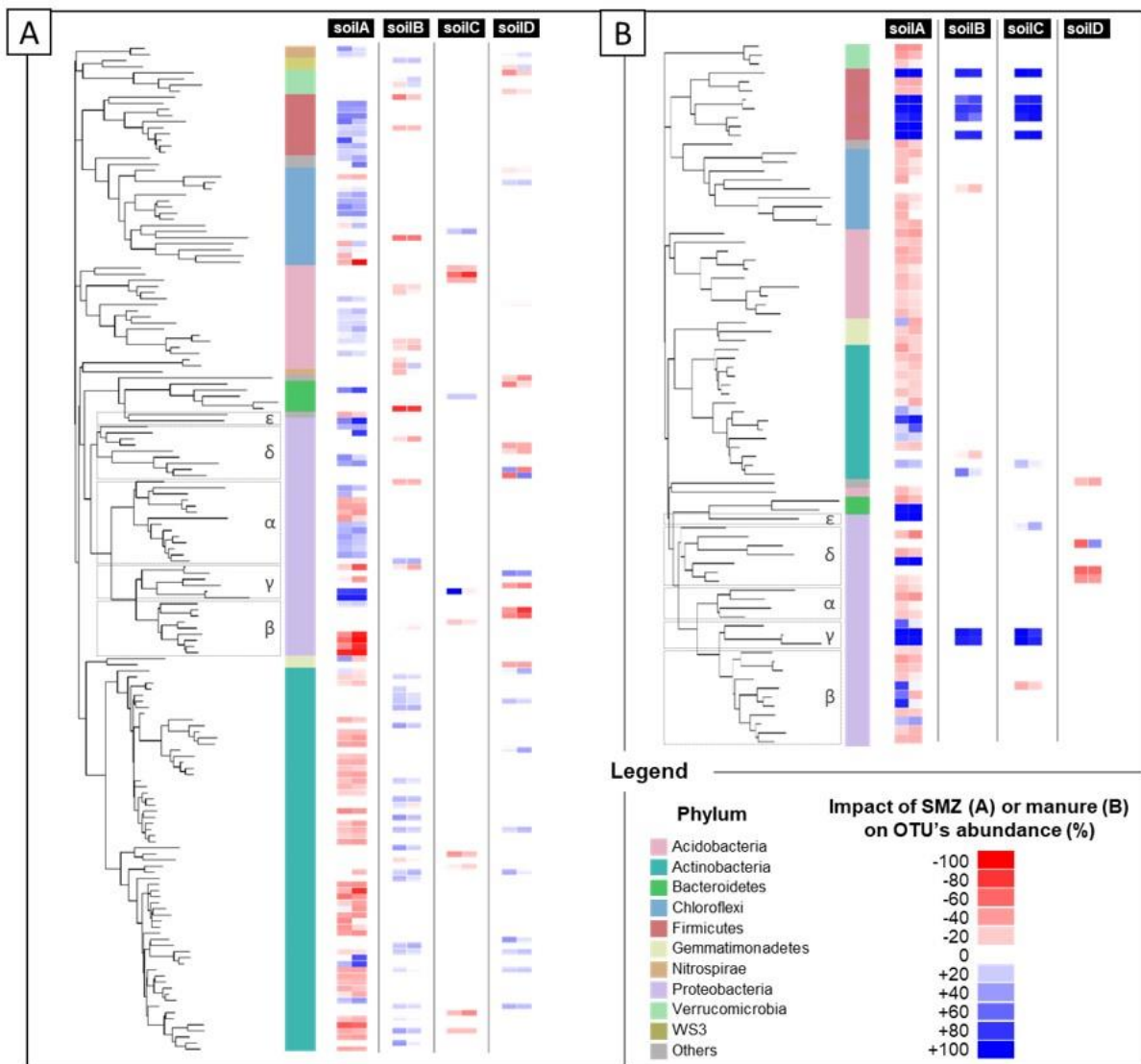


Figure 1.3 - Phylogenetic placement of bacterial OTUs significantly impacted by SMZ (A) or manure spreading (B) in the four different types of soils, A, B, C, and D, after 1 month of incubation.

Discriminant OTUs between treatments were assessed by ANOVA ($p < 0.05$). The phylum-level affiliation of each OTU is indicated by different colors in the left strip. For each OTU in each soil, the impact of SMZ (A) or manure spreading (B) is represented by a two-strip heatmap to distinguish conditions without (left strip) and with (right strip) manure spreading (A) or SMZ (B). Red represents a negative impact of the treatment on the OTU abundance; blue, a positive impact. For each condition and OTU, the impact is reported as the difference in OTU abundance means between treated and non-treated samples divided by its maximum over the two conditions. Color intensities show the strength of the impact.

In the non-inoculated soils where no specific mineralization took place, the greatest SMZ available fraction was found in the most impacted soil (soil A, $54.1\% \pm 0.4\%$ of SMZ available) and the lowest in the least impacted one (soil C, $0.9\% \pm 0.1\%$). The bioavailability of SMZ (and more generally of organic contaminants) relies on its intrinsic properties and on soil characteristics and

especially clay content, organic carbon fraction, and pH (Supplementary Table 1.S1). It is expected that their increases will reduce the bioavailability of SMZ in soil and therefore its biocidal activity (Gao and Pedersen, 2005; Lertpaitoonpan *et al.*, 2009; Pinna *et al.*, 2012). Our results are in line with this hypothesis since soil A, which hosted the most impacted community, and soil C, which hosted the least impacted one, exhibited respectively the lowest and highest values for clay content, organic carbon fraction, and pH (84‰, 5.2‰, and 5.6 and 360‰, 13‰, and 6.9, respectively).

*Table 1.1 - Concentrations of extractable SMZ measured after 1 month of incubation in the four different types of soils treated with SMZ, amended or not with manure, and inoculated or not with *Microbacterium sp. C448* (C448).*

		Concentration of extractable SMZ (mg.kg⁻¹ dry soil)
Soil A	SMZ	54.1 ± 0.4
	SMZ x C448	54.4 ± 1.7
	SMZ x MANURE	45.4 ± 1.7
	SMZ x C448 x MANURE	34.6 ± 1.8
Soil B	SMZ	21.8 ± 2.7
	SMZ x C448	21.4 ± 0.8
	SMZ x MANURE	21.0 ± 2.6
	SMZ x C448 x MANURE	19.9 ± 1.5
Soil C	SMZ	0.9 ± 0.1
	SMZ x C448	0.6 ± 0.0
	SMZ x MANURE	1.1 ± 0.1
	SMZ x C448 x MANURE	0.5 ± 0.0
Soil D	SMZ	6.4 ± 0.2
	SMZ x C448	4.1 ± 0.1
	SMZ x MANURE	6.8 ± 0.1
	SMZ x C448 x MANURE	3.7 ± 0.1

Besides confirming that the biocidal activity of SMZ depends on the soil's physical and chemical properties, microbial diversity and structure analyses suggest that ecological niches may have been freed after the reduction in abundance of some OTUs following the SMZ exposure. *Microbacterium sp. C448* could have potentially colonized and used these unoccupied niches, thus facilitating its establishment in the soil community. This outcome supports the hypothesis of released niches, which could explain the crucial positive role of SMZ for *Microbacterium sp. C448* establishment even when it does not use this antibiotic as a nutrient source. The lack (or limited level) of SMZ mineralization observed in the absence of manure spreading, although the antibiotic

was available, may indicate a niche preference of the strain for readily available organic nutrients as already shown in other studies dealing with inoculation of xenobiotics degraders in soils (Benimeli *et al.*, 2008). The degradation of antibiotics like many other synthetic organic contaminants can be arduous as the successive steps leading to their complete degradation can release intermediate transformation products that can be toxic for the degrading bacteria involved. For instance, sulfur dioxide, one dead-end product of SMZ mineralization (Ricken *et al.*, 2017), is known for its antibacterial properties (Malwal *et al.*, 2012). However, SMZ can constitute a nutritive source of prime choice for *Microbacterium* sp. C448, especially if the strain lacks niches to support its growth. The measurements of SMZ mineralization potential for the soil C fits this hypothesis. The slight mineralization of SMZ ($5.5 \pm 0.3\%$) and its reduced biocidal action on the bacterial community suggest that the release of trophic niches was insufficient to entirely support *Microbacterium* sp. C448 growth, which therefore used its antibiotic degradation in compensation.

5. Antibiotrophy efficiency depends on soil permissiveness to invasion of manure-originating OTUs and resulting trophic competition

In soils spread with manure, antibiotic mineralization was enhanced although biocidal action of SMZ and therefore niche releases occurred in a similar way (Figure 1.2). This suggests that *Microbacterium* sp. C448 encountered difficulties in accessing trophic niches released by SMZ and had to rely on antibiotic degradation to become established.

We observed that adding manure significantly increased the alpha diversity of bacteria and archaea in each SMZ treated soil, except for soil D (Supplementary Table 1.S4). Phylogenetic diversity values increased by about 5.7, 5.2, and 7.2% in soils A, B, and C, respectively, with a respective gain of about 75, 68, and 116 observed OTUs. ANOVAs conducted on each OTU individually indicated that 79 of the 15,195 OTUs were significantly increased or decreased in response to manure application in at least one of these four soils (Figure 1.3B). In detail, soil A was the most affected, with a strong increase in abundance of 21 OTU (+80% of their abundance at least) and a slight decrease in abundance of 51 OTU (-60% at most). In the presence of manure, soils B and C presented increasing abundances only for eight and nine OTUs and decreasing abundances for one and two OTUs, respectively. Interestingly, a cluster of seven OTUs presented the same pattern in soils A, B, and C. They were below or near the detection limit without manure. Their abundance significantly increased in manure-spread soils. Some of these OTUs (two γ -*Proteobacteria* and five *Firmicutes* including four *Clostridiales*) are known as fecal markers (Hagey *et al.*, 2019). Moreover, they were abundant in manure (Supplementary Table 1.S5). According to Gravuer and Scow (2021), those observations are signs that these OTUs originate manure and are

soil invaders. This supports the hypothesis that manure brought exogenous OTUs that compete with *Microbacterium* sp. C448 for establishment in soil. As stated above, *Microbacterium* sp. C448 seems to be a poor competitor in the studied soils. Simultaneous inputs of manure and the antibiotrophic strain could thus induce detrimental competition for *Microbacterium* sp. C448, in favor of using SMZ as a nutritional support of choice. This could thus explain why manure spreading led to a strong stimulation of SMZ mineralization, which reached 19.5%, 15.3%, and 12.6% in soils A, B, and C, respectively (Figure 1.2). On the contrary, the soil D community structure was only slightly affected by manure. Its diversity indices were not changed (Supplementary Figure 1.S4) and the OTU-level analyses indicated that only four OTUs were significantly decreased, with no detected increase in individual OTU abundances (Figure 1.3B). Whether or not manure was added, soil D exhibited most of the seven OTUs belonging to the above cluster that was abundant in soils A, B, and C spread with manure (Supplementary Table 1.S5). This initial presence in soil D might be due to its agronomical history, which involved regular application of manure as organic fertilizer (the latest occasion being 6 months before the experiment). Based on these results, we can hypothesize that the previous in-field manure exposure led to a pre-colonization of soil communities by manure OTUs (Gravuer and Scow, 2021), thus limiting further microbial disturbance in response to the experimental amendment of manure. It therefore suggests that most of the ecological niches made available by the biocidal effect of SMZ in this soil remained free for *Microbacterium* sp. C448, thus explaining, at least partially, the low SMZ mineralization rate ($5.6 \pm 0.7\%$) measured in soil D spread with manure (Figure 1.2).

IV. Conclusion

The sulfonamide-resistant function confers a selective advantage in competitive environments impacted by the biocidal action of SMZ. Our study strongly suggests that sulfonamide-degrading capacities could provide an additional selective advantage to sulfonamide-resistant bacteria by enhancing their dispersion potential. Besides eliminating sensitive trophic competitors, and so releasing niches, SMZ can constitute an exclusive trophic niche for sulfonamide-degraders. Our study shows that antibiotrophy is mainly beneficial when the SMZ biocidal activity on competitors is insufficient. Indeed, antibiotrophy promoted *Microbacterium* sp. C448 establishment when the impact of SMZ on soil microbial diversity and structure was low and when outsider competitors were added by manure amendment. The emergence of antibiotrophy among antibiotic-resistant bacteria might promote their dispersion and survival in the environment and thus might constitute a health concern. Antibiotrophy would be expected to provide an environmental

benefit by contributing to the self-purifying of antibiotic-contaminated ecosystems. Yet, in our experiment, SMZ degradation was neither high nor automatic in soils with antibiotrophs. Further research is needed to better assess the role of the antibiotroph function in the dispersion of antibiotic-resistant bacteria in the environment. One of the possible ways to achieve this goal will be to compare the dispersion potential of the wild-type strain to that of a mutant unable to degrade and grow on SMZ.

ARTICLE 2 - Experimental evidence for manure-borne bacteria invasion in soil during a coalescent event: influence of the antibiotic sulfamethazine

Loren Billet^{1,2}, Stéphane Pesce¹, Fabrice Martin-Laurent², Marion Devers-Lamrani²

¹ INRAE, UR RiverLy, Villeurbanne, France.

² AgroSup Dijon, INRAE, Université de Bourgogne Franche-Comté, Agroécologie, Dijon, France.

Highlights

- Most abundant OTUs in manure are most likely to invade soil bacterial communities.
- The establishment in soils of manure-born OTUs is still noticeable after one month.
- Previous manure amendment can prevent further invasion of soil communities.
- Contamination of manure by sulfamethazine might enhanced bacterial invasion of soils.

Keywords: community coalescence, manure amendment, sulfonamide, 16S rDNA sequencing, Firmicutes, soil colonization

Abstract

The fertilization of agricultural soil by organic amendment that may contain antibiotics, like manure, can transfer bacterial pathogens and antibiotic-resistant bacteria to soil communities. However, the invasion by manure-borne bacteria in amended soil remains poorly understood, being hardly observed. Here, we assessed the invasions of manure-borne bacteria during a coalescence event between manure and soil, in different soils and in the presence or absence of antibiotics. To this end, microcosms of four different soils were amended or not with manure at an agronomical dose and/or exposed or not to the antibiotic sulfamethazine (SMZ). After one month of incubation, the diversity, structure and composition of bacterial communities of the soils were assessed by 16S rDNA sequencing. The invasion of manure-borne bacteria was still perceptible one month after the soil amendment. The results obtained with the soil already amended in situ with manure six months prior to the experiment suggest that some of the bacterial invaders were established in the community over the long term. Even if differences were observed between soils, the invasion was mainly attributable to some of the most abundant OTUs of manure (mainly Firmicutes). SMZ exposure had a limited influence on soil microorganisms. It was significant in only one soil, where it enhanced the invasion potential of some manure-borne invaders.

I. Introduction

Organic amendment enables fertilization of agricultural soils and allows the recycling of a substantial amount of waste produced by livestock such as manure (Pandey *et al.*, 2018). This environmentally sound practice enhances crop yields by increasing the soil organic matter, phosphate and nitrogen contents (Liu *et al.*, 2020). Besides these nutrient inputs, manure is also a source of exogenous biological material, mainly microorganisms, for amended soils (Unc and Goss, 2004). This biological input may be beneficial in carrying functionally interesting microorganisms (Wongsaroj *et al.*, 2021) or even in suppressing plant and animal pathogens by antagonism (Pugliese *et al.*, 2010). However, it can introduce biological contaminants in soils, such as pathogenic bacteria (Franz *et al.*, 2008; Cook *et al.*, 2014) or hazardous microbial functions such as antibiotic resistances (Heuer *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016). Therefore, understanding microbial outcomes of manure amendment in soils is of interest.

In this context, it is important to determine what enables or prevents a microbial invasion from manure to soils. In particular, knowledge is needed to better understand what make manure-borne microorganisms more likely to invade a soil, taking into consideration the influence of both the biotic and abiotic components of soil and manure (as well as their interactions). This question relates to the concept of microbial coalescence, which focuses on the outcome of mixing different environments, each presenting different biotic and abiotic characteristics (Rillig *et al.*, 2015; Castledine *et al.*, 2020). Amendment of agricultural soils with manure is an environmentally relevant example of coalescence event where the mix of two distinct environments results in a new one, namely an amended soil, with its own characteristics.

Previous studies showed that amended soils durably differ from manure-free soils when considering the abiotic part of coalescence (Chang *et al.*, 1991; Lungu and Dynoodt, 2008). However, although the novel soil environment differs from the unamended one, the microbial community resulting from coalescence is generally relatively similar to that of the original one (Suleiman *et al.*, 2016; Semenov *et al.*, 2021). The rather imbalanced ratio between soil and manure matrices may partially explain this. Moreover, it is also hypothesized that autochthonous soil microorganisms constitute a natural barrier preventing the establishment of allochthonous microorganisms originating from manure by outcompeting them (Elsas *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017). For instance, it has been shown that manure-borne bacteria that are adapted to, among other things, high nutrient content and anoxic conditions, tend not to be competitive with soil autochthonous bacteria (Semenov *et al.*, 2011).

Several environmental factors might influence the invasion success of manure-borne bacteria in soil. Firstly, based on the concept of coalescence, the invasion capacity is probably soil-dependent

since it may vary according to the biotic (e.g. community structure and diversity) and abiotic (e.g. organic matter content) characteristics of the amended soil, which determine the potential presence of available ecological niches (Mallon *et al.*, 2018). It can also be modulated by the repeated amendments, with two possible contradictory scenarios. On the one hand, transient and even unsuccessful invasion events can favor subsequent invasion (Mallon *et al.*, 2018). On the other hand, the resistance of telluric communities to invasion can be enhanced after a first invasion (Gravuer and Scow, 2021). Another factor that can modulate invasion events in autochthonous microbiota refers to the possible presence of antibiotics in manure, which is frequently reported in the literature (Haller *et al.*, 2002; Huygens *et al.*, 2021). These contaminants may disturb interaction patterns of microbial communities according to the antibiotic sensitivity profile of their respective members (Adamowicz *et al.*, 2018; Jackson *et al.*, 2019), thus favoring the emergence of communities that would differ from those obtained under antibiotic-free environments. Since antibiotics are used on livestock (Teillant *et al.*, 2015), bacteria from animal tracts, which compose the manure community, may be more antibiotic-tolerant than non-antibiotic-exposed soil bacteria (Munir and Xagorarakis, 2011). Indeed manure contains more antibiotic-resistant bacteria than soils (Chen *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2021). Consequently, contamination of soil with antibiotics originating from manure amendment is likely to promote the invading potential of antibiotic-resistant manure-borne bacteria in soils. In that sense, antibiotics could increase the invading potential of isolated antibiotic-resistant strains in soil (Billet *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021) and manure amendment can result in an increase of the diversity of antibiotic-resistant bacteria in soil (Chen *et al.*, 2017).

In this context, the purpose of our microcosm study was to assess the invasions of manure-borne bacterial OTUs during a coalescence event between manure and soil under a plausible agronomical scenario, in four different soils and in the presence or in the absence of antibiotic pressure. We firstly hypothesized that the capacity of manure-borne bacteria to invade the amended soil would be variable according to the intrinsic abiotic and biotic properties of soils. In particular, among the four soils selected, one was amended (*in situ*) 6 months earlier by the same manure to test whether previous amendment had an impact on invasion outcomes. In addition, we also hypothesized that some manure-origin OTUs would be distinguished from the emerging rare soil OTUs in response to the repetition of their invasive pattern in several of the tested soils. Finally, to verify whether antibiotics can interfere with the coalescence process by promoting the invasion of soils by manure-borne OTUs, a modality made of the antibiotic sulfamethazine (SMZ), which is commonly used in veterinary care, was considered (Kobland *et al.*, 1984; Fenwick and Olander, 1987). After one month of incubation, the diversity, structure and composition of bacterial communities of the manure-amended soils exposed or not with SMZ were compared to

those of their respective non-amended control soil and of the native manure by sequencing of 16S rDNA.

II. Material and method

1. Collection and Analyses of Soils and Manure

The four soils, named A,B,C and D selected for their different textures as described by Billet *et al.*, (2021), were sampled from the upper 20 cm of different agricultural fields the Bourgogne-Franche-Comté region of France in November 2018. They originated respectively from an agricultural field frequently flooded by the nearby Saône River, the same plot but at a higher altitude, the experimental farm of Epoisses, and a field near a hog nursery that had received manure 6 months before the sampling. Each soil was air-dried, sieved (mesh size 5 mm), and stored in airtight plastic bags at 4°C until use. The manure was collected from the pig nursery whose manure had been previously used to fertilize soil D.

2. Microcosm Experiment Setup

The experiment consisted of four different soils amended or not with manure and treated or not with SMZ. Considering four conditions and five replicates per condition, 20 microcosms for each soil were prepared as described below. Fifty grammes dry weight (DW) of soils were placed in glass bottles closed with air-permeable lids made of gauze and cotton. In order to gently activate the native soil microorganisms, soil microcosms humidified up to 80% of their water content at pH 2.7, were incubated for 1 week at 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). SMZ sodium salt [SMZ, CAS number: 1981-58-4, 4-amino-*N*-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)benzenesulfonamide, Sigma-Aldrich, France] was diluted to 100 mg mL⁻¹ in water and filtered (0.2 μm). Before applying treatments, the manure was incubated overnight at room temperature (20 \pm 1°C). Treatments were prepared a few minutes before their application on soils to reach nominal concentrations of 100 mg of SMZ kg⁻¹ dry soil and 13 mL of manure kg⁻¹ dry soil. Then, the microcosms were incubated for one month in the dark at 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Their humidity has been kept stable by regular watering.

3. Soil DNA Extraction and 16S rDNA Sequencing

DNA was extracted from subsamples of 250 mg of soil for each microcosm using the DNeasy PowerSoil-htp 96-well DNA isolation kit (Qiagen, France) following the manufacturer's instructions and stored at -20°C. As previously described by Billet *et al.* (2021), the V3-V4 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified using a two-step PCR and

sequenced on MiSeq (Illumina, 2 × 250 bp) and a Jupyter Notebook developed in-house was used to analyze the sequence data. α -Diversity metrics (PD whole tree) and UniFrac distance matrices (Lozupone *et al.*, 2011) were determined from rarefied OTU tables of 25,700, 24,500, 28,300, and 23,100 sequences per sample for soils A, B, C, and D, respectively. Sequences were deposited in the SRA at NCBI under the accession number SUB8712901.

4. Statistical Analyses

Statistical analyses were carried out using RStudio statistical software (version 1.2.5033). For each soil, we used analysis of variance (ANOVA) model to determine the effects of treatments on the alpha diversity indices of bacterial communities. Normality and homogeneity of the residual distribution were inspected and log10-transformations were performed when necessary.

Permutational multivariate analysis of variance (PerMANOVA) was used to test significant differences in communities' structure using adonis function implemented in the vegan package (permutations = 999).

For each soil, the OTU table was filtered (relative abundance >0.05%) and to detect the OTUs significantly impacted by treatments (antibiotic treatment and manure amendment) a generalized linear mixed model was developed. Considering that, the OTU abundance Y follows a Poisson law of parameter Λ as $Y \sim \mathcal{P}(\Lambda)$, we used the following model :

$$\log(\Lambda_{ijk}) = o_{ij} + \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + I_k + Z_{ijk}, \text{ iid } \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2)$$

o_{ik} is the offset calculated as the log of the sample read sum. μ is the intercept. α_i is the fixed effect of manure amendment ($i = 1, 2$). β_j is the effect of SMZ treatment ($j = 1, 2$). $(\alpha\beta)_{ij}$ is the interaction effect between the manure amendment and SMZ treatment. I_k the random effect of the individuals. Z_{ijk} the residual error.

The analysis was performed using the glmer function of the lme4 package (version 1.1-27). Chi-squared test was performed to detect significant pairwise differences for each treatment (significance threshold set at $p < 0.05$). Subsequently, we performed a post-hoc Tukey test with the emmeans function of the emmeans package (version 1.6.1) to detect significant differences caused by manure amendment depending of treatment with SMZ (significance threshold was set at $p < 0.05$). A Bonferroni correction was used to decrease substantially the probability of detecting false positives (significance threshold was set at 0.05).

For the specific case where OTUs had a null abundance in soil non-amended with manure, we added a specific filter: for each OTUs, systematic detection in every replicate of condition with

manure was considered significant. Furthermore, only OTUs with a size effect implying the doubling of their abundance between treatments were retained.

III. Results

1. Manure's effect on diversity in the soils communities

Principal component analysis (PCoA) performed on unweighted unifrac matrices showed that after one month, the composition of the bacterial community in soils A, B and C amended with manure was distinct from those not amended (Fig. 2.1, PERMANOVA, $P < 0.001$). Only the community structure of soil D, which received *in situ* manure from the same pig nursery 6 months before the experiment, was not impacted by manure amending. Therefore, after the one-month incubation period, the structure of bacterial communities in three of the four soils differed depending on manure amendment modality.

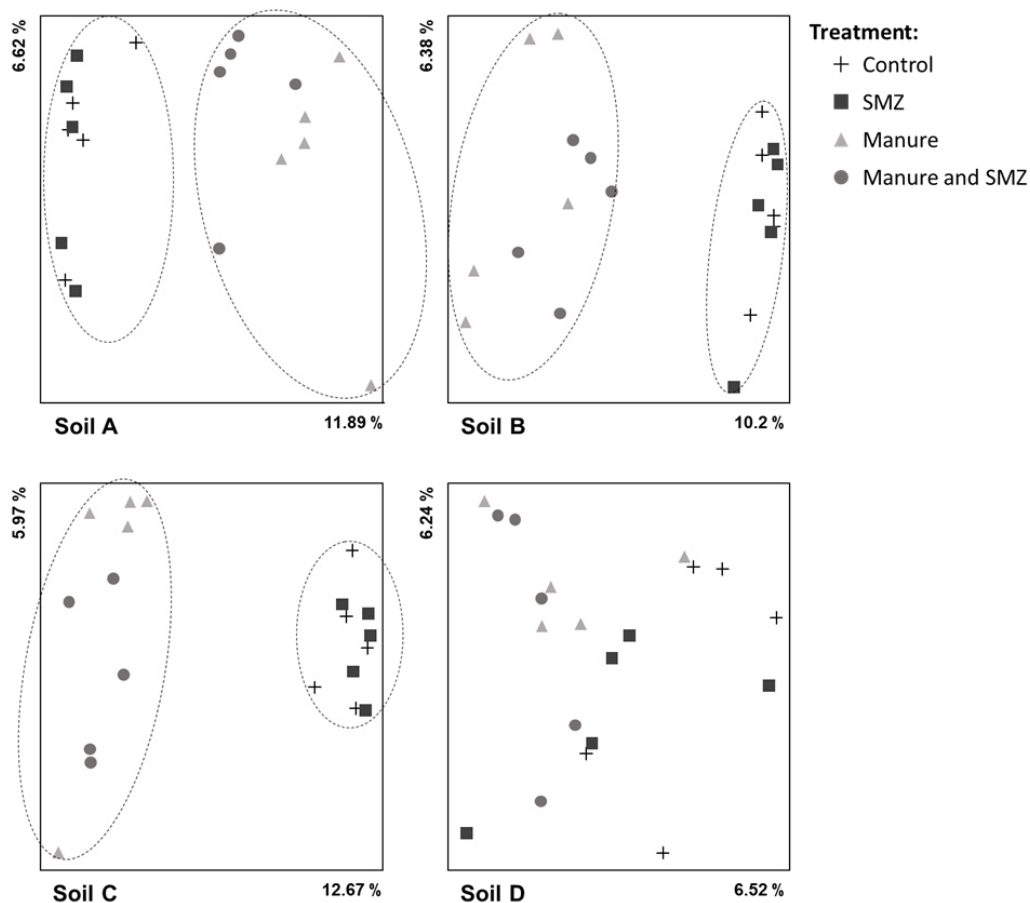


Figure 2.1 - Comparison of the bacterial diversity in the four soils (A, B, C and D) amended or not with manure and exposed or not to SMZ. Principal coordinates analysis (PCoA) of the unweighted Unifrac distance matrices of 16S rDNA amplicon sequences showing changes in bacterial community structure. The first two axes and the percent of variation explained by each are indicated. Significant effects of manure amendment are represented by ellipse ($p < 0.001$).

Regarding alpha diversity, manure amendment significantly increased the PD whole tree index in all the soils, including soil D (Fig. 2.2, ANOVA, $p < 0.001$ for soils A and C, $p < 0.01$ for soils B and D). This indicates that phylogenetic diversity of bacterial community was higher in soils amended with manure than in those not amended.

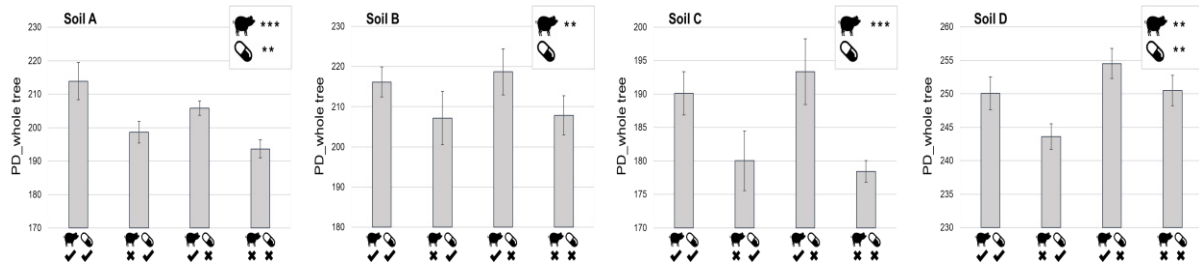


Figure 2.2 - Phylogenetic diversity of the bacterial diversity in the four soils (A, B, C and D) amended or not with manure and exposed or not to SMZ. The PD whole tree index of the four soils either amended or not with manure (pig symbol) and exposed or not with SMZ (pills symbol) are represented. Bar indicated the standard deviation of the mean ($n = 5$). For each soil, a statistical impact of the manure amendment or of the exposure to SMZ on the calculated index is indicated (ANOVA, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

2. Manure's effect on the relative abundance of OTUs

The effect of manure on the structure of communities observed by PCoA analysis relied on few OTUs (Fig. 2.3). Indeed, among the 1646 OTUs with relative abundance $> 0.05\%$ in at least one soil, only 25 OTUs were significantly impacted by amendment with manure (Fig. 2.3A, ANOVA, $P < 0.05$): 10 OTUs related to Proteobacteria, 11 to Firmicutes, 2 to Actinobacteria, 1 to Synergistetes and 1 to Bacteroidetes (Fig. 2.3B). For each soil, significant effects of amendment with manure were observed on 20 OTUs (among 642) in soil A, 9 OTUs (among 639) in soils B and 14 OTUs (among 671) in soil C. In soil D, only 1 of the 826 OTU was significantly affected by manure.

Soil amendment with manure positively influenced the relative abundance of all these OTUs (Fig. 2.3B). Some of them were only detected in conditions with manure (11 in soil A, 5 in soil B and 10 in soil C, see red stars in Fig. 2.3B), while others increased by a factor of 2.6 to 262 in amended soils (see size of green circles in Fig. 2.3B). Altogether, the manure-induced increase in the relative abundance of each impacted OTUs resulted in a noticeable increase in the sum of these relative abundances at the community level going up from 0.5% to 5.4%, 0.1% to 1.3% and 0.1% to 1.6% in soil A, B and C, respectively (Fig. 2.3C). In contrast, the effect of manure on only 1 OTU in soil D had almost no effect at community level (Fig. 2.3C), as observed previously with the PCoA analysis (Fig. 2.1).

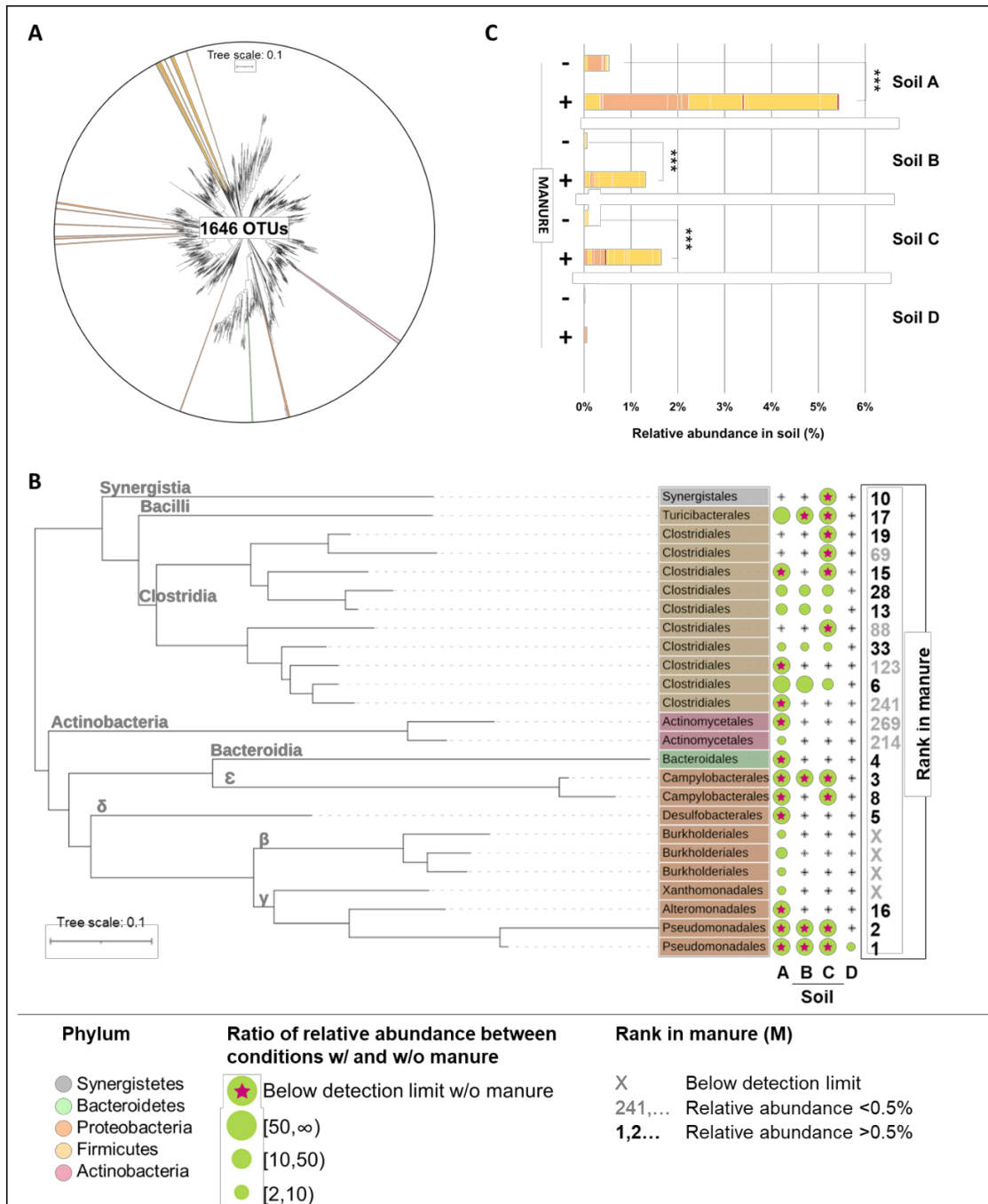


Figure 2.3 - Impact of soil amendment with manure on the relative abundance of bacterial OTUs. A- Phylogenetic tree representing all the studied OTUs (relative abundance > 0.05% in at least one soil). Among them the ones associated with a coloured line were the ones that were significantly impacted by manure amendment. B- For each of the four soils impact of amendment with manure on the relative abundance of significantly impacted OTUs. Colours of leaves indicate the phylum of the OTU. The strength of the impact is indicated by the size of green circle which correspond to the ratio of the relative abundance of the OTU between condition with and without manure. The symbol "+" indicates that the manure does not have a significant impact on the corresponding OTU in this soil. For each OTUs, its relative abundance in the manure is indicated as a rank. C- Abundance relative of OTUs impacted by manure amendment in soils amended (+) or not (-) with manure. Colours are phylum indication. Each segment correspond to an OTU.

Among the 25 different OTUs impacted by amendment with manure in at least one soils, 21 were abundantly detected in manure, with 15 of them even being among the 35 most abundant OTUs in manure where their relative abundance was greater than 0.5% (manure diversity = 654 OTUs). Interestingly, the comparison of the four manure-amended soils showed that 10 of these 15 OTUs had a redundant pattern in at least two of them. Among them, 1 Pseudomonadales was significantly impacted by manure in all four soils without exception. It was the most abundant in manure explaining by itself 11.4% of its composition while it was only detected in soil D and not in soil A, B and C under manure-free conditions. Seven other OTUs (4 Clostridiales, 1 Turibacterales, 1 Campylobacterales, 1 Pseudomonadales) were significantly impacted in all four soils except in soil D. It is noteworthy that these OTUs were always more abundant in soil D under manure-free conditions than in others (Supplementary table 2.1). In addition, 1 Clostridiales and 1 Campylobacter were not detected under manure-free conditions in both soils A and C.

3. Influence of sulfamethazine on manure's effect

Sulfamethazine treatment had a significant impact on bacterial community structure only for the soil A when considering the weighted unifrac matrix (Supplementary Figure 2.1, PerMANOVA, $P < 0.001$). This indicates that in the soil A SMZ did not significantly affect the presence and absence of OTUs but only the relative abundance of some of them. Eleven OTUs responded to manure spreading depending on SMZ (Fig. 2.4, $p < 0.05$). They all were related to the 25 OTUs whose abundance were increased by manure. Two response patterns were observed. For 4 OTUs not detected in manure, SMZ exposure inhibited the stimulating effect of manure as compared to soil not exposed to SMZ. For the other 7 OTUs, SMZ exposure enhanced the increasing effect of manure on their abundance in a non-negligible way. Indeed, the sum of their relative abundance increased from 2.4% to 4.5% with SMZ addition (data not shown). For this latter pattern, it corresponded to OTUs always detected in manure, one being even only detected in soil amended with manure.

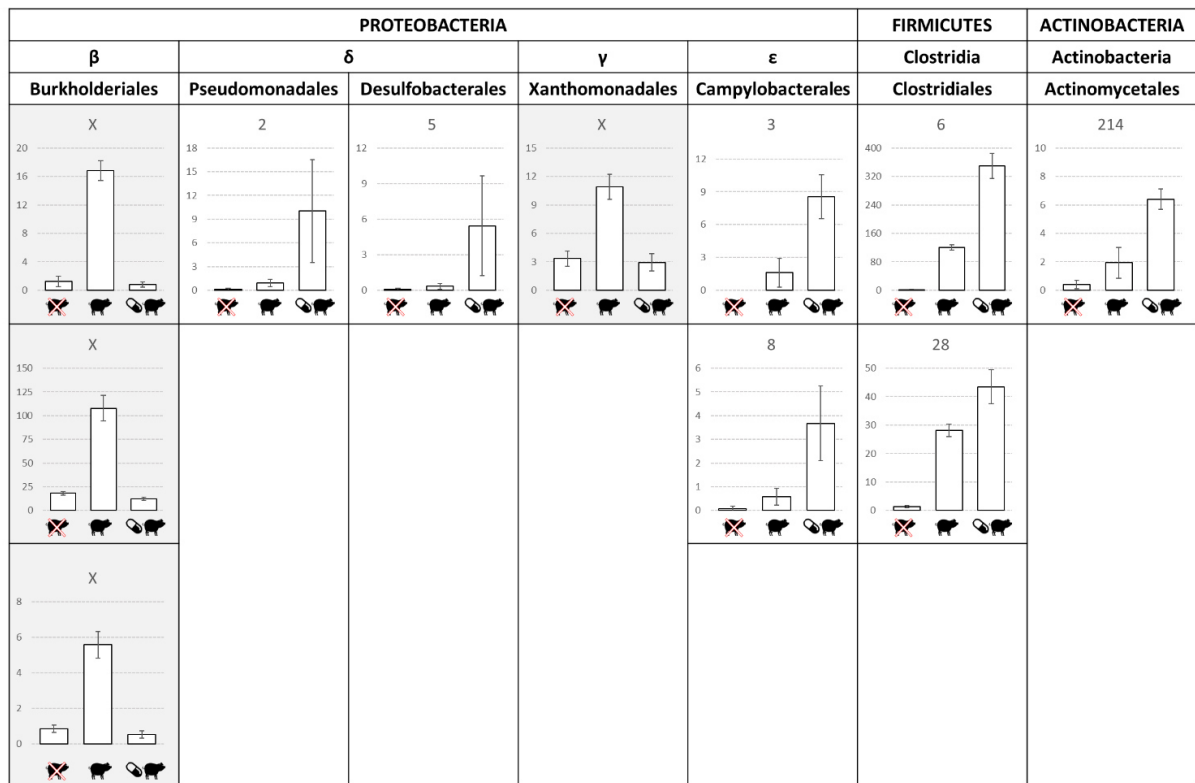


Figure 2.4 - Abundance of OTUs impacted differently by manure amendment depending on SMZ application. The abundance of the OTU in absence of manure whether or not exposed to SMZ, in presence of manure and in presence of manure and sulfamethazine are indicated above respectively the “Strikethrough pig”, “pig” and “pill and pig” symbols. Bars indicated the standard deviation of the means (n = 5). Each OTUs are entitled by its rank in the manure.

IV. Discussion

The influence of manure amendment on the soil bacterial communities was still noticeable after one month, although the magnitude of changes varied between soils. Indeed, the bacterial community of soil A showed, compared to others, a stronger shift following the manure amendment, while that of soil D was the least affected. The most abundant OTUs in the soils remained stable but the rare ones were affected (i.e. the rarest one among those with relative abundance > 0.05%) and possibly undetected ones (i.e. those with relative abundance < 0.05% and/or those that were not present in the soil). Changes in the composition of microbial communities due to rare OTUs during coalescence processes is in line with the observation of the emergence of the rare-biosphere microorganisms following environmental disturbances (Rocca *et al.*, 2019). Indeed, the least abundant OTUs under stable conditions are often those favored by a disruption of the environmental conditions (Fuentes *et al.*, 2016; Rocca *et al.*, 2019). They may benefit from the equilibrium disruption of the environment where they are normally

outcompeted by the better-adapted to multiply and colonize newly available ecological niches (Lennon and Jones, 2011).

The communities of soils amended with manure exhibited OTUs with a wider distribution along the phylogenetic tree. This increase in diversity within the soil bacterial community could either correspond to the emergence of endogenous rare OTUs with functional abilities better adapted to this new environment than the original one or to the invasion of soil community. While previous studies provided evidence suggesting soil invasion by manure-borne bacteria, they failed to distinguish surely allochthonous invaders from autochthonous OTUs that emerge because of environmental disturbance caused by the adjunction of exogenous matter (Gravuer and Scow, 2021; Semenov *et al.*, 2021). In the same line, we showed that some OTUs favored in response to manure amendment were not detected in the manure-free soils although they were almost all detected in the manure. However, even if these OTUs were not detected in control soils but detected in the manure, it is not possible to conclude definitively that there was an effective invasion of the soil with OTUs of manure origin since the lack of detection in the soil could be due to sequencing biases. Indeed, an absence of detection by 16S rDNA sequencing does not necessarily mean its effective absence in the community because of detection thresholds that ignore the endogenous rarest OTUs and make it impossible to perceive the entire bacterial community (Lynch and Neufeld, 2015).

However, our results provided additional evidence in favor of the hypothesis of the invasion of manure-borne OTUs thanks to the use of different soils, including one already amended *in situ* 6 months earlier (i.e. soil D). First, in response to manure amendment some of these OTUs presented the same increase pattern in different soils. The extreme case involved the most abundant OTU in the manure, a Pseudomonadales, which was favored in each of the four soils and was not detected in control soils A, B and C not amended with manure. This response pattern suggests a common manure origin since all the soils presented different biotic and abiotic properties, limiting the chance that they hosted the same rarest OTUs. Secondly, all these OTUs were detected in the non-experimentally amended soil D, suggesting that they were successful in colonizing this soil following previous *in situ* manure amendment events (the last amendment having taken place six months before the experiment).

Considering this set of arguments, we assumed that all or almost all the OTUs detected in both manure and soil D and which increased in several soils were from manure origin. All of them were among the most abundant OTUs in manure. Their high abundance in manure bacterial community composition may explain the success of their invasion, since a high inoculation rate is more likely to be successful (Recorbet *et al.*, 1992; Gravuer and Scow, 2021). One could argue that the

detection of the most abundant bacteria of the manure in soil may be a bias due to DNA from dead cells that did not establish in the soil (Kunadiya *et al.*, 2021; Pathan *et al.*, 2021). However, this argument can be rejected since not all the most abundant OTUs from manure were detected in the amended soils.

Interestingly, when examining the abundance of the OTUs that are suspected to be invaders established in soil D during previous *in situ* amendment of manure (see above), two kinds of establishment patterns can be differentiated, depending on their taxonomic affiliation: the first one relates to the Firmicutes that are quite abundant in soil D, while the other relates to the Proteobacteria that are rare OTUs (supplementary table 2.1). The ability of OTUs related to Firmicutes to have become well represented in the soil following previous manure amendment may be because of their physiological attributes. Firmicutes, contrary to Proteobacteria, have sporulation capacity that may confer upon them an ability to persist for a long period in a less hospitable environment until favorable conditions return (Filippidou *et al.*, 2016). Indeed, the long-term survival of Firmicutes in soil after manure amendment has been already reported, with detection even after the winter season (Semenov *et al.*, 2021).

It is noticeable that the community of soil D was much less impacted by manure amendment than the other soils, with only one OTU being significantly increased. This is in contrast to the hypothesis formulated by Mallon *et al.* (2018), who suggested that previous invasions generate legacy effects in soil communities facilitating future invasion attempts. However, it is consistent with the study of Gravuer and Scow, (2021), who observed that soils' communities after a first disturbance by manure amendment were less impacted by the following ones. They hypothesized that the endogenous soil bacteria may adapt to the occasional input of nutrients carried by manure, outcompeting manure-borne bacteria during subsequent amendments. Here, we rather hypothesized that it is the manure-borne OTUs already established in the soil that prevent the new ones from establishing since they are functionally similar and already adapted to soil.

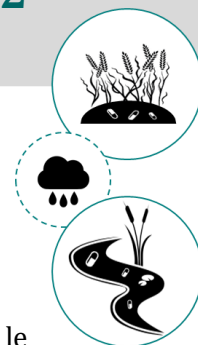
Finally, the impact of the antibiotic SMZ on the structure of autochthonous soil bacterial communities was relatively low as it was significant in only one of the four soils (soil A). Previous results obtained from the same microcosms may explain this fact (Billet *et al.*, 2020). After one month of incubation, the bioavailable fraction of SMZ in the SMZ-treated soils represented a low level of exposure for the community. Concordantly, the soil A in which the free-fraction of SMZ was the highest (Billet *et al.*, 2021) is the one for which its bacterial community was differently impacted by manure amendment according the presence or not of SMZ. A first group of seven OTUs, most of them suspected of being manure-borne OTUs, had their abundance even more increased by manure amendment in the presence of SMZ. The observed effect of SMZ could be

explained by the selection of antibiotic-resistant bacteria. Indeed, persistence of resistant bacteria and contamination by antibiotics could be positively linked (Xu *et al.*, 2021). For instance, we showed in a previous study that the invasion of SMZ-resistant bacteria in soil can be favored in the presence of the antibiotic (Billet *et al.*, 2021). The second group consisted of OTUs that were favored by the manure amendment in the absence of SMZ but that lost this advantage in the presence of the antibiotic. All were autochthonous soil bacteria. The lack of negative effects of SMZ on these OTUs in manure-free conditions (Supplementary table 2.1) suggests that they were not especially sensitive to SMZ.

V. Conclusion

Our study showed that manure-borne OTUs can colonize different soils during a coalescence event between manure and soil. This was still perceptible one month after the soil amendment. The results obtained with the soil amended *in situ* six months prior to the experiment suggest that some of the manure-borne OTUs can establish in the bacterial community over the long term. Even if different patterns were observed between the four soils, changes in the composition of bacterial community was mainly attributable to some of the most abundant OTUs of manure (mainly Firmicutes). SMZ treatment had a limited influence on bacterial composition as it was only significant for one of the four soils, where it enhanced the invasion potential of some manure-borne invaders (possibly antibiotic-resistant bacteria). Finally, considering the current problem of the spread of antibiotic resistance in agroecosystems (and more generally in the environment), our findings suggest the need for screening antibiotic resistances among the dominant OTUs of manure before amendment, as they are more likely to establish in soils.

CHAPITRE 2



Suivant l'une des voies potentielles de dispersion des antibiotiques et des antibiorésistances le long du continuum agrosystémique, notre seconde étude a pris comme contexte, l'érosion des sols vers le compartiment aquatique sédimentaire. L'objectif initial était de vérifier que l'implantation de *Microbacterium* sp. C448 dans le compartiment sédimentaire accélérerait la dégradation de la sulfaméthazine, tout en évaluant l'influence sur ce processus du phénomène d'érosion, qui lie sol et sédiment en véhiculant la matrice tellurique et ses bactéries.

L'étude précédente a indiqué que l'invasion des sols par *Microbacterium* sp. C448 n'était possible qu'en présence de sulfaméthazine, sans que cette dernière ne soit systématiquement minéralisée. Il avait alors été proposé que la souche en tant qu'antibiorésistante, profitait en priorité des niches libérées par l'antibiotique, l'antibiotrophie n'intervenant qu'en renfort si son action biocide s'était montrée insuffisante ou si des compétiteurs étaient apportés, en l'occurrence par l'épandage de lisier. Nous avons donc formulé dans cette seconde étude, l'hypothèse que si *Microbacterium* sp. C448 parvenait à envahir l'environnement sédimentaire contaminé à la sulfaméthazine, sa minéralisation de l'antibiotique dépendrait de la compétition qu'elle rencontrerait pour l'accès aux ressources. Pour le vérifier nous avons évalué la capacité d'implantation de la souche et l'activité de minéralisation de la sulfaméthazine dans des sédiments pollués par cette substance sous différents contextes d'érosion, i.e. i) sans ajout de sol, ii) avec un ajout de sol non stérile et iii) avec un ajout de sol stérile (afin de mieux prendre en considération l'influence relative de l'apport par le sol de ressources nutritives vs l'apport d'éventuels compétiteurs microbiens). Cette étude a eu comme second objectif d'évaluer si l'antibiotique pouvait augmenter

l'antibiorésistance dans le compartiment sédimentaire en distinguant les bactéries endogènes de celles apportées par l'érosion du sol.

Pour vérifier les différentes hypothèses, il a été mis en place un dispositif expérimental consistant à incuber pendant un mois des microcosmes constitués de deux types de sédiments naturels (issus de rivières différentes), immergés sous de l'eau contaminée ou non par la sulfaméthazine seule ou avec *Microbacterium* sp. C448 (Figure 8), sous les 3 contextes d'érosion cités précédemment, à savoir avec et sans apport de sol agricole stérile ou non stérile.

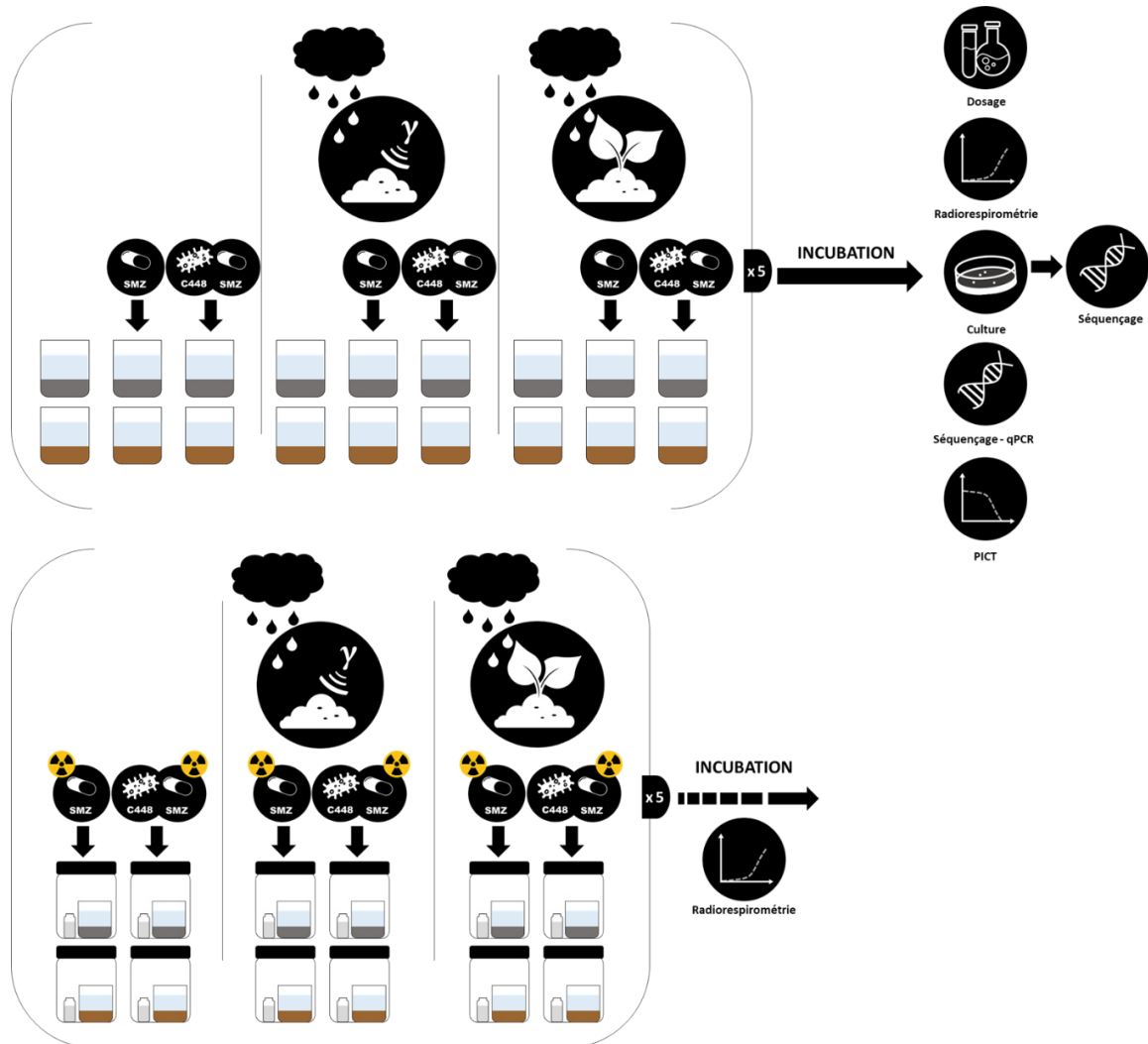


Figure 8 – Dispositif expérimental faisant le lien entre les compartiments tellurique et sédimentaire.

La partie supérieure schématise les 9 conditions : 3 modalités d'érosion : absence d'érosion, érosion de sol stérile (représenté par les rayons gammas), érosion de sol non stérile (représenté schématiquement par une plante – non présente dans notre expérience) x 3 modalités de traitement : sans inoculation de *Microbacterium* sp. C448 ni traitement sulfaméthazine, avec sulfaméthazine, avec sulfaméthazine et inoculation de *Microbacterium* sp. C448 apposées sur 5 microcosmes (les répétitions ne sont pas représentées) de 2 sédiments (représentés respectivement en gris et marron) à la texture contrastée. S'en suit à droite la liste des différentes mesures réalisées au terme du mois d'incubation. La partie inférieure

schématise la mesure de la minéralisation de la sulfaméthazine au cours de l'incubation réalisée pour les microcosmes traités avec l'antibiotique. Pour cela, ces microcosmes ont été dupliqués, traités avec une quantité infinitésimale de ¹⁴C-SMZ et placés dans une enceinte radiorespirométrique afin d'effectuer une cinétique de minéralisation (en utilisant à nouveau 5 répétitions par traitement).

Les données, exploitées partiellement à ce jour et présentées dans ce chapitre ont déjà permis de montrer que :

- (i)* Les 2 types de sédiments utilisés présentent des capacités antibiotrophes endogènes reposant sur des bactéries dotées du gène *sadA* et phylogénétiquement proche de *Microbacterium* sp. C448.
- (ii)* L'installation de *Microbacterium* sp. C448 dans les sédiments contaminés en sulfaméthazine est toujours associée à la minéralisation de l'antibiotique, dont le niveau peut varier suivant la modalité d'érosion.
- (iii)* L'érosion de sol non stérile augmente non seulement l'abondance bactérienne totale des communautés sédimentaires mais également la proportion de bactéries résistantes.

I. Matériels et méthodes

1. Les matrices telluriques et sédimentaires

1.1. Collecte du sol et des sédiments

Le sol a été prélevé sur l'horizon 0-20 cm d'une parcelle agricole du domaine expérimental d'Epoisses (47°13'52.3"N 5°06'17.6"E). Il correspond au sol C utilisé lors de la première expérience, pour lequel une minéralisation de la sulfaméthazine était observée après inoculation de *Microbacterium* sp. C448 même en l'absence de lisier, suggérant que cette souche y rencontrait une importante compétition (chapitre 1; Billet *et al.*, 2021). Deux sédiments choisis pour leur texture contrastée (Table 2) ont été prélevés à proximité des rivages dans l'Ain (45°54'38"N 5°14'14"E) et dans l'Arvan (45°11'36.9"N 6°13'21.0"E). Après tamisage à 2 mm, ils ont été stockés dans des sacs ou des seaux hermétiques à 4°C jusqu'au début de l'expérience.

1.2. Préparation des matrices telluriques

1.2.1. Stérilisation du sol

La contribution biotique de l'érosion des sols étant au cœur de questions abordées dans cette étude, la matrice tellurique se devait d'exister en deux états : stérile et non stérile. Afin de limiter les divergences physiques et chimiques causées par les processus de stérilisation et qui pourraient gêner l'interprétation des résultats, le sol non stérile a été obtenu en inoculant une partie du sol stérilisé par rayonnement gamma avec sa communauté initiale. L'inoculum a été préparé en mixant au Waring blender, 3 fois 30 secondes, du sol d'Epoisses non stérile dilué au tiers avec de l'eau physiologique. Le sol a été inoculé au centième avec un volume de jus de sol dilué au vingtième puis incubé 45 jours, soit un temps suffisant d'après Romdhane *et al.* (2021) pour que la communauté inoculée soit stablement installée dans sol.

1.2.2. Séparation pédologique

L'érosion concerne principalement la fraction argileuse des sols, qui contient les particules fines qui sont plus facilement mises en suspension lors des précipitations (Stéphane Follain, communication personnelle). Une séparation pédologique a donc été réalisée sur les sols stériles et non stériles pour récupérer cette fraction. Dans le détail, 1 litre d'eau physiologique stérile et 700 grammes de sol stérile ou non stérile ont été mis en contact pendant deux heures dans une bouteille avant d'être énergétiquement agités pendant une minute pour dissocier les particules telluriques. Le mélange a immédiatement été transféré dans une éprouvette où, après 1 minutes de sédimentation, 700 mL d'eau argileuse ont été prélevés en surface avec une pipette. Les solutions argileuses ayant été préparées la veille de l'expérience, elles ont été stockées la nuit à

4°C pour éviter la prolifération bactérienne. Cinq sous échantillons de ces suspensions argileuses ont été conservées à -20°C pour caractériser les communautés microbiennes initiales. La réussite des séparations pédologiques a été aussi confirmée avec une analyse granulométrique laser (Table 2). La stérilité des matrices argileuses qui devaient l'être a été vérifiée par dénombrement sur milieu nutritif dilué au 10^{ème} (BD, bouillon nutritif Difco [™]) après 7 jours d'incubation à 25°C. Le développement microbien d'un unique morphotype a été constaté avec une abondance de 4,3 x 10⁶ CFU par mL de matrice stérile alors que dans la matrice non stérile il a été observé le développement d'une grande diversité de morphotype avec une abondance de 1,3 x 10⁹ CFU par mL de matrice.

Table 2 – Granulométrie des matrices utilisées. Les valeurs en pourcentage expriment la portion de particules d'une taille inférieure à celle indiquée (A = Argile, LF et LG = limon fin et grossier, SF et SG = sable fin et grossier)

	Arvan	Ain	Argile stérile	Argile non stérile
2 µm (A)	1,9 ± 1,5	2,6 ± 0,7	9,3 ± 2	10,6 ± 2
20 µm (LF)	26,6 ± 20,1	12,7 ± 2,7	65,4 ± 12,2	72,9 ± 9,7
50 µm (LG)	42 ± 31,3	16,2 ± 3,4	91,8 ± 7,6	96,1 ± 3,5
200 µm (SF)	53,5 ± 36,3	38,5 ± 3,5	100 ± 0	100 ± 0
2000 µm (SG)	99,1 ± 2	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0

2. Dispositif expérimental en microcosmes

L'expérience consistait en l'incubation pendant 1 mois de 2 sédiments ayant été supplémentés ou non en sulfaméthazine, en présence ou non de *Microbacterium* sp. C448 sous 3 modalités d'érosion : pas d'érosion, érosion stérile, érosion non stérile. Considérant 5 répétitions pour 9 conditions, 45 microcosmes de chaque sédiment ont été préparés comme suit (Figure. 8). Une semaine avant l'ajout des traitements, des microcosmes contenant 70 grammes équivalent poids sec (PS) de sédiments immergés sous 420 mL d'eau (1/3 d'eau osmosée, 2/3 d'eau de Volvic) ont été préparés. Une gaze perméable aux échanges gazeux a été appliquée sur chaque béccher pour limiter l'évaporation et les risques de contamination. L'application des traitements a débuté par les 3 modalités d'érosion avec l'ajout ou non de 7 grammes PS d'argile stérile ou non stérile (10% du poids des sédiments). La sulfaméthazine a ensuite été ajoutée à une concentration de 100 mg.kg⁻¹ de sédiment PS pour deux tiers d'entre eux, et la moitié de ces derniers ont été inoculés avec *Microbacterium* sp. C448 à une densité de 10⁸ cellules par gramme de sédiment PS. Les cellules, lavées 2 fois à l'eau physiologique avant leur inoculation, ont été collectées pendant la

phase exponentielle de croissance d'une culture liquide réalisée en milieu LB-Miller (pour 1 litre : 10 grammes de peptone, 5 grammes d'extrait de levure, 10 grammes de chlorure de sodium) à 28°C sous agitation (130 rpm). Après l'ajout des traitements, les microcosmes ont été incubés un mois dans l'obscurité à température ambiante avec un contrôle régulier de leur niveau d'eau. Au terme de l'incubation, l'eau superficielle des sédiments a été retirée pour des analyses chimiques. Après homogénéisation mécanique des sédiments, une partie des sédiments a été utilisée pour déterminer leur humidité relative et le restant a été aliquoté en vue de réaliser des mesures chimiques, génomiques, culturales et fonctionnelles.

3. Suivi de la minéralisation de la sulfaméthazine

La minéralisation de la sulfaméthazine a été mesurée au cours du mois d'incubation par radiorespirométrie. Pour ce faire, les 60 microcosmes ayant reçu l'antibiotique ont été dupliqués (Figure 8), avec simplement une différence de volume (15 grammes de sédiment par microcosme au lieu de 70 grammes en adaptant le volume d'eau pour respecter le ratio eau/sédiment), afin de limiter les quantités de radioactivité utilisées. Les microcosmes de cette série ont reçu, en plus de leurs traitements, une infime quantité de sulfaméthazine uniformément radiomarkée au ^{14}C sur son cycle benzène ($^{14}\text{C-SMZ}$, $4,72 \times 10^{-2} \mu\text{Ci}$). Ils ont ensuite chacun été disposés dans un pot hermétique avec une fiole de 5 mL de soude à 0,2M. Cette dernière piégeant le $^{14}\text{CO}_2$ libéré par la dégradation de la $^{14}\text{C-SMZ}$ a été renouvelée régulièrement et analysée au compteur à scintillation pour obtenir une cinétique de minéralisation de l'antibiotique tout au long du mois d'incubation.

4. Les mesures culturales

Une partie des analyses microbiennes a reposé sur des approches de cultures bactériennes.

4.1. Etude de la fraction cultivable des communautés totales et résistantes des sédiments

Pour étudier de la fraction cultivable des communautés totales et résistantes, les sédiments ont été mixés avec 10 fois leur volume en eau physiologique au Waring blender 3 fois 30 secondes. Ces broyats de sédiments ont ensuite été successivement dilués au $1/10^{\text{ème}}$ puis étalés sur des géloses de milieu nutritif dilué au $10^{\text{ème}}$, supplémenté avec l'antifongique cycloheximide (100 mg.L^{-1}) seul ou accompagné par la sulfaméthazine (75 mg.L^{-1}). Après 7 jours d'incubation à 25°C, les premières ont permis de quantifier la communauté cultivable totale des sédiments, alors que les secondes ont permis de quantifier la communauté cultivable résistante. Par la suite, les communautés totale et résistante de chaque sédiment, obtenues à la première dilution pour laquelle le nombre de colonies totales était inférieur à 3000 par boîte, ont été récupérées dans 5 mL d'eau physiologique en raclant au râteau la surface des géloses. Les culots bactériens obtenus

après centrifugation ont été conservés à -20°C avant que leur ADN ne soit extrait selon les recommandations du fournisseur avec le kit DNeasy® UltraClean® 96 Microbial kit de Qiagen. La région hypervariable V3-V4 de l'ADNr 16S bactérien a été amplifiée en utilisant une PCR en 2 temps et séquencée par MiSeq comme précédemment décrit (Spor *et al.*, 2020).

4.2. Quantification de *Microbacterium* sp. C448

Pour déterminer la viabilité de *Microbacterium* sp. C448 au terme du mois d'incubation, les broyats de sédiment obtenus comme décrit au point précédent ont été étalés sur des géloses de LB-Miller contenant non seulement de la cycloheximide (100 mg.L⁻¹), et de la sulfaméthazine (75 mg.L⁻¹), mais également de l'acide nalidixique (25 mg.L⁻¹), un antibiotique auquel *Microbacterium* sp. C448 est résistante. La souche *Microbacterium* sp. C448 formant des micro-colonies sphériques jaunes a ainsi pu être quantifiée après 12 jours de croissance à 25°C.

5. Les mesures génomiques

L'ADN des sédiments a été extrait selon les recommandations du fournisseur avec le kit FastDNA® Spin Kit for soil (MP Biomedicals) et conservé à -20°C.

5.1. PCR quantitative

Les réactions de qPCR ont été réalisées avec un appareil ViiA7 (Life technologies, USA) dans un volume de 15 µL. Pour les gènes *rrs*, *sadA* et *sul1* le mélange réactionnel contenait 7,5 µL de MasterMix Takyon (Eurogentec, France), 1 µM de chaque amorce (tableau), 250 ng de protéine T4 gene 32 (QBiogene, France), et 3 ng d'ADN. La quantification du gène *groL* de *Microbacterium* sp. C448 a nécessité l'utilisation d'une sonde spécifique (Table 1.S2). Le volume pour chaque réaction comptait 7.5 µL de MasterMix dTTP blue Takyon Low ROX Probe 2X (Eurogentec, France), 400 nM de chaque amorce, 200 nM de la sonde, 250 ng de protéine T4 gene 32, et 3 ng d'ADN. Le cycle de température était le suivant : 95°C pendant 10 minutes, 40 cycles composés de 30 secondes à 95°C pour la dénaturation, 30 seconde pour l'appariement (Table 1.S2) et 30 secondes à 60°C pour l'élongation. Les abondances relatives des gènes *sadA*, *sul1* et *groL* ont été obtenues en normalisant le nombre de copies des gènes avec celui du gène *rrs* de l'ADNr 16S.

5.2. Séquençage

La région hypervariable V3-V4 de l'ADNr 16S bactérien a été amplifiée en utilisant une PCR en 2 temps et séquencée par MiSeq (Illumina, 2×250 bp) comme précédemment décrit (Spor *et al.*, 2020).

6. Les mesures chimiques

Les concentrations de sulfaméthazine et d'ADMP mesurées dans la fraction aquatique au terme du mois d'incubation ont été déterminées par analyse directe de l'échantillon en HPLC sur un appareil Agilent 1100, (Courtaboeuf, France) muni d'une colonne C18 Zorbax Eclipse Plus (75 mm × 4,6 mm, 3,5 µm) et d'un détecteur à barrette de diodes ($\lambda = 260$ and 298 nm) avec pour phase mobile un mélange H₂O + H₃PO₄, à 0,01% (v/v), pH = 2,9 (Solvant A) / Acétonitrile (Solvant B) ; Gradient : 0-5 min : 2% B ; 5-8 min : 2-30% B ; 8-10 min : 30-90% B ; 10-11 min : 90% B ; 11-13 min : 90-2% B ; Température du four : 22°C ; Débit = 1 mL.min⁻¹ ; Volume d'injection : 100 µL.

Les concentrations de sulfaméthazine et d'ADMP mesurées dans la fraction sédimentaire au terme du mois d'incubation ont été déterminées comme suit. Dans des tubes Nalgene PPCO (aux capacités d'adsorption de la sulfaméthazine nulle) contenant 6,0000 ± 0,001 grammes de matrice préalablement séchée et broyée sont ajoutés 20 mL d'un mélange de Méthanol et d'eau selon un ratio de volume de 4 pour 1. Après une remise en suspension de la matrice, ils sont mis sur un agitateur orbitalaire à 50 rpm pendant 18 heures. Le surnageant récupéré après centrifugation (12500 x g pendant 15 minutes) a été concentré par évaporation sous vide à 35°C avec un concentrateur Speed-Vac et le résidu solide est repris dans 500 µL d'eau distillée. Le surnageant est ensuite analysé par HPLC avec la même méthode que celle décrite précédemment. Seul le volume d'injection a été adapté (5 ou 50 µL).

Le pourcentage de recouvrement après extraction a été déterminé selon le même protocole après avoir « spiké » des échantillons de chacun des sédiments naturels non contaminés avec un mélange de sulfaméthazine et d'ADMP (5, 10 et 25 µM en concentration finale) laissé en contact pendant 3 heures d'exposition). Pour l'ADMP, les taux de recouvrement étaient supérieurs à 90% dans les deux sédiments (avec et sans érosion d'argile). Pour la sulfaméthazine le taux moyen dans l'Ain était de 89% contre 45% dans l'Arvan (Table 3.S1). Les concentrations obtenues après analyses HPLC ont été corrigées avec ces valeurs de recouvrement.

7. Les mesures fonctionnelles

7.1. Minéralisation en point final

Après la période d'incubation de 1 mois dans les microcosmes, 20 grammes de sédiments humides ont été récupérés pour chaque microcosme et transférés dans des pots dans lesquels ont été ajoutés 85 mL d'eau (1/3 eau osmosée, 2/3 eau de Volvic) et 1 mL d'une solution de sulfaméthazine concentrée à 1,5 mg.mL⁻¹ supplémentée avec 3,55 x 10⁻² µCi de ¹⁴C-SMZ. La cinétique de minéralisation a ensuite été étudiée comme décrit précédemment.

7.2. Enrichissement et isolement de bactéries antibiotrophes naturelles

Pour procéder à l'isolement de bactéries antibiotrophes naturellement présentes dans les sédiments issus de chacune des deux rivières, différentes fractions de sédiments non inoculés avec *Microbacterium* sp. C448 ayant manifestés une minéralisation de la sulfaméthazine pendant l'incubation ont été mélangés entre elles (en conservant la séparation selon la rivière d'origine). Cinq grammes de ce mélange ont ensuite été inoculés dans 50 mL de milieu minimum MS-SMZ (composition) où la sulfaméthazine présente à 500 mg.L⁻¹ représentait l'unique source de carbone et d'azote. L'expérience a été dupliquée pour faire un suivi de la minéralisation de l'antibiotique par radiorespirométrie grâce à l'ajout de ¹⁴C-SMZ. Après avoir atteint 25% de minéralisation, 5 mL de la suspension bactérienne non radioactive étaient réensemencés dans 50 mL de milieu neuf (avec ou non ¹⁴C-SMZ). Après 3 cycles de culture, des étalements ont été réalisés sur milieu minimum supplémenté en sulfaméthazine à 500 mg.L⁻¹. Pour chaque sédiment, une dizaine de colonies ayant différents morphotypes s'étant développées ont été repiquées et isolées. Leur capacité à minéraliser la sulfaméthazine a été évaluée par dosage HPLC de la disparition de l'antibiotique pendant leur croissance en culture pure en milieu liquide MS-SMZ. Les souches présentant une aptitude à dégrader l'antibiotique ont été conservées et une PCR ciblant le gène *sadA* a été réalisée (Amorce : Table 1.S2). Une PCR ciblant l'ADNr 16S de ces bactéries a également été réalisée et 5 µL du produit ont été digérés avec 10 U de l'enzyme *RsaI* une nuit à 37°C. Leur ADN a été extrait avec le kit Qiagen Genomic DNA et leur génome a été envoyé pour un séquençage complet. Une caractérisation de leur capacité à dégrader plusieurs sulfamides a également été réalisée.

8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été conduites avec le logiciel RStudio (version 1.2.5033). Pour chaque sédiment, un effet des traitements a été estimé par analyse de la variance (ANOVA). Quand il s'est avéré, un test de Tukey a été réalisé pour comparer les modalités entre elles.

II. Résultats

Au cours de l'expérience, différentes mesures ont été réalisées pour caractériser la minéralisation de la sulfaméthazine. Premièrement, une approche radiorespirométrique conduite sur les microcosmes ayant reçus l'antibiotique radiomarqué a permis de suivre sa cinétique de minéralisation pendant le premier mois d'incubation. Deuxièmement, le potentiel d'antibiotrophie après cette période a aussi été mesuré par radiorespirométrie après prélèvement des sédiments dans l'ensemble des microcosmes non radioactifs (y compris ceux qui n'avaient pas

reçu de traitement antibiotique). Troisièmement, afin d'évaluer l'abondance des populations bactériennes pouvant dégrader la sulfaméthazine, le gène *sadA* codant pour la première mono-oxygénase de l'unique voie de dégradation connue des sulfamides a été quantifié par qPCR à l'issue du mois d'incubation. Enfin, la souche *Microbacterium sp. C448* a été quantifiée en fin d'incubation par dénombrement sur milieu sélectif et par qPCR ciblant une séquence du gène *groL* qui lui est théoriquement spécifique.

1. Evolution du potentiel de minéralisation dans les sédiments non inoculés avec *Microbacterium sp. C448*

En absence d'inoculation avec la souche *Microbacterium sp. C448*, les cinétiques de minéralisation de la sulfaméthazine obtenues respectivement durant la période d'un mois d'incubation et après celle-ci sont variables en fonction de l'origine du sédiment.

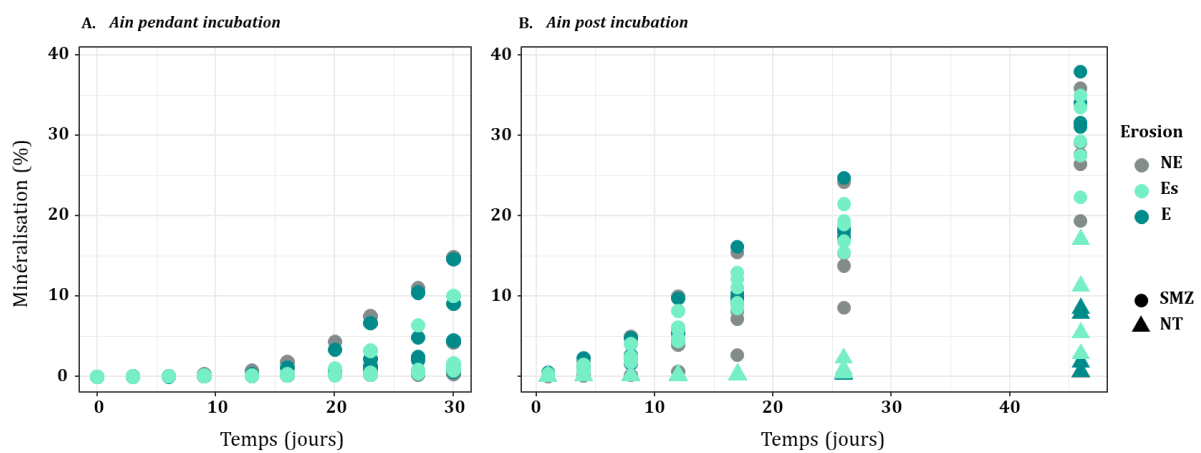


Figure 3.1 - Mesure de la minéralisation de la sulfaméthazine dans les microcosmes de sédiment de l'Ain non inoculés avec *Microbacterium sp. C448*. A - Minéralisation de la sulfaméthazine au cours de l'incubation dans les microcosmes ayant reçu de la sulfaméthazine. B : Potentiel de minéralisation de la sulfaméthazine par l'ensemble des microcosmes en fin d'incubation. Pour chaque microcosme sont indiquées les modalités d'érosion (NE : sans érosion, Es : érosion stérile, E : érosion) et de traitement à la sulfaméthazine (NT : non traité à la sulfaméthazine, SMZ : traité à la sulfaméthazine).

Pour les sédiments de l'Ain, certains microcosmes ont montré des signes de minéralisation de la sulfaméthazine après 13 jours d'incubation (Figure 3.1.A), aboutissant au terme du mois d'incubation à des taux de minéralisation supérieurs à 4% et pouvant atteindre 15% pour 7 des 15 microcosmes traités à la sulfaméthazine et ce, indépendamment de la modalité d'érosion. Les sédiments de l'Ain possèdent donc une microflore intrinsèque apte à minéraliser la sulfaméthazine. Ces résultats ont été confirmés par la mesure du potentiel de minéralisation des sédiments à l'issue de leur incubation (Figure 3.1.B). Les sédiments n'ayant pas reçu de sulfaméthazine au cours de l'incubation ont présenté sensiblement le même profil de

minéralisation que ceux précédemment décrit : (i) pour certains microcosmes le potentiel de minéralisation était quasiment nul (<0.5%), (ii) tandis que pour d'autre, une accélération de minéralisation après une phase de latence de l'ordre de 15 jours a abouti à des taux pouvant atteindre 2 % après 26 jours et même 17 % après 46 jours. Les sédiments ayant quant à eux été exposés à la sulfaméthazine pendant l'incubation ont présenté des potentiels de minéralisation accrus. Ne présentant quasiment plus de temps de latence, les microcosmes ont tous présenté des taux de minéralisation élevés, variant entre 9 et 25% après 26 jours et entre 19 et 38% après 46 jours.

Pour les sédiments de l'Arvan, les taux de minéralisation de la sulfaméthazine étaient quasiment nuls au terme du mois d'incubation (<1%), excepté pour un des microcosmes ayant reçu du sol stérile dans lequel la minéralisation a atteint 2% (Figure 3.2.A). A la fin de la période d'incubation, les potentiels de minéralisation des sédiments de l'Arvan n'ayant pas été exposés à la sulfaméthazine pendant l'incubation sont restés inférieurs à 1,5%. Des résultats similaires ont été observés avec les sédiments exposés pendant 1 mois à la sulfaméthazine en absence d'érosion ou en présence de sol non stérile alors que quatre des cinq sédiments de la modalité « érosion stérile » et traités à l'antibiotique ont présenté un potentiel de minéralisation légèrement plus élevé, variant de 2,5 à 3,5% après 26 jours (4 à 6% après 46 jours, Figure 3.2.B).

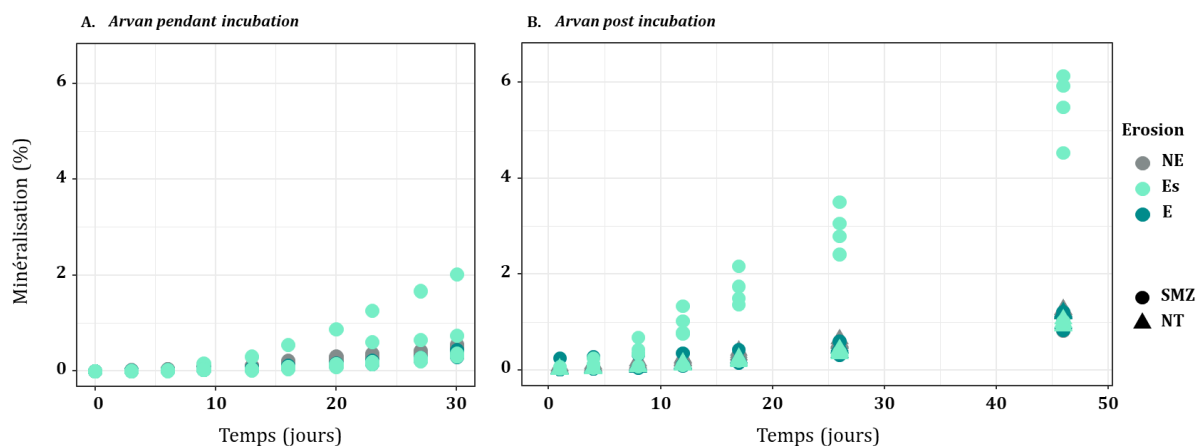


Figure 3.2 - Mesure de la minéralisation de la sulfaméthazine dans les microcosmes de sédiment de l'Arvan non inoculés avec *Microbacterium sp. C448*. A - Minéralisation de la sulfaméthazine au cours de l'incubation dans les microcosmes ayant reçu de la sulfaméthazine. B : Potentiel de minéralisation de la sulfaméthazine par l'ensemble des microcosmes en fin d'incubation. Pour chaque microcosme sont indiquées les modalités d'érosion (NE : sans érosion, Es : érosion stérile, E : érosion) et de traitement à la sulfaméthazine (NT : non traité, SMZ : traité).

L'estimation de la taille de la population endogène apte à dégrader la sulfaméthazine dans les sédiments a ensuite été réalisée par quantification du gène *sadA* au terme du mois d'incubation. Les données indiquent que pour les sédiments de l'Ain comme de l'Arvan, le potentiel de

minéralisation endogène était relié, au moins en partie, au niveau d'abondance de *sadA* (Figure 3.3). D'une part, pour tous les sédiments non exposés à la sulfaméthazine pendant l'incubation et qui présentaient des potentiels de minéralisation faibles (<2% après 46 jours), la quantité de *sadA* s'est toujours avérée inférieure au seuil de détection (10 copies par ng d'ADN). D'autre part, dans les sédiments exposés à la sulfaméthazine pendant l'incubation, *sadA* a été détecté dans la totalité ou la majorité des sédiments (Ain : 15/15, Arvan : 9/15) et sa quantité a suivi la même tendance que celle des cinétiques de potentiels de minéralisation. Plus précisément, pour les sédiments de l'Ain présentant un potentiel de minéralisation évoluant entre 9 et 25% après 26 jours (Figure 3.1B), la quantité de *sadA* variait entre 660 et 2300 copies par ng d'ADN (Figure 3.3A). Concernant l'Arvan, dans la modalité d'érosion de sol stérile où un potentiel de minéralisation supérieur à 4% avait été mesuré pour 4 des 5 microcosmes (Figure 3.2B), *sadA* a été détecté entre 100 et 3200 copies par ng d'ADN (Figure 3.3A). Dans les autres conditions où le potentiel de minéralisation était au maximum de 2%, si *sadA* était détecté il n'excédait pas 40 copies par ng d'ADN.

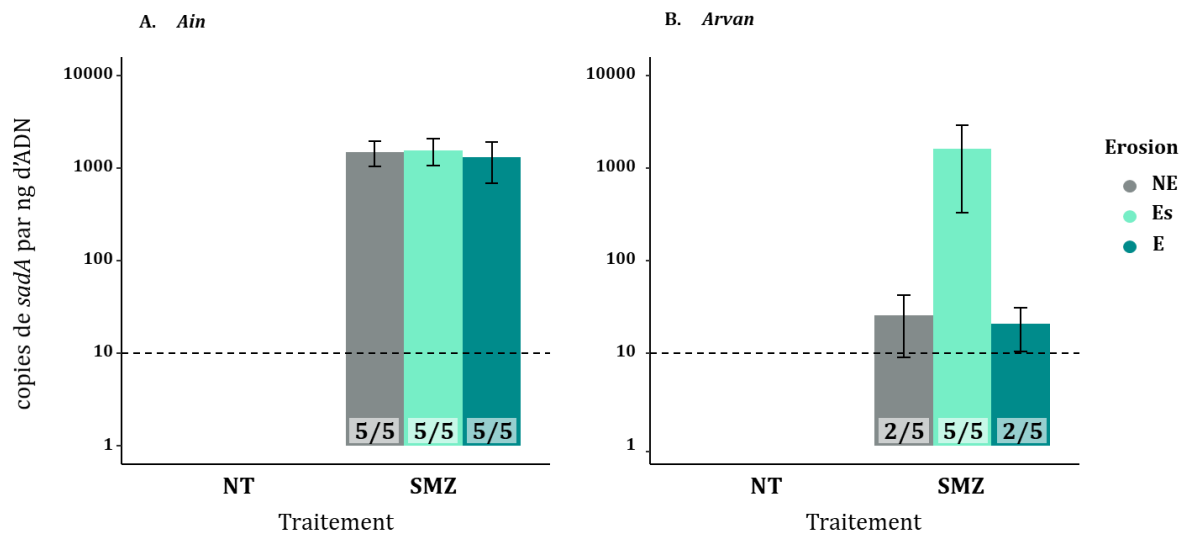


Figure 3.3 - Abondance du gène *sadA* en fin d'incubation dans les sédiments non inoculés de l'Ain (A.) et de l'Arvan (B.). Sont indiqués (i) les modalités d'érosion (NE : sans érosion, Es : érosion stérile, E : érosion) et de traitement à la sulfaméthazine (NT : non traité, SMZ : traité), (ii) le nombre de fois où les gènes ont été détectés pour chaque modalité (n=5) et le seuil de détection du gène *sadA* par des pointillés.

De manière surprenante, la séquence spécifique du gène *groL* de *Microbacterium* sp. C448, jamais détectée dans les sédiments de l'Ain non exposés à la sulfaméthazine, a parfois été détectée dans les sédiments non exposés de l'Arvan (Figure 3.4). Dans les sédiments traités à la sulfaméthazine, la quantification de *groL* a suivi la même tendance que celle de *sadA*, à savoir une détection accrue et à des densités d'autant plus fortes que les modalités présentaient un potentiel de minéralisation élevés et ce, dans les deux types de sédiments. Une possible contamination de ces microcosmes avec *Microbacterium* sp. C448 a été vérifiée par étalement sur milieu sélectif basé sur la double

résistance de la souche à la sulfaméthazine et à l'acide nalidixique. L'absence de développement de colonies avec le morphotype de *Microbacterium* sp. C448 sur ce milieu a permis d'écarter la possibilité qu'elle soit responsable de la minéralisation observée dans ces sédiments. De ce fait, il a été entrepris d'isoler la ou les bactéries antibiotrophes par des cycles d'enrichissement dans un milieu où la sulfaméthazine représentait l'unique source de carbone. Deux souches capables de se développer sur ce milieu ont été isolées (une par sédiment) formant sur le milieu minimum supplémenté à la sulfaméthazine des micro-colonies rondes et jaunes. En plus de posséder le gène *sadA*, ces souches présentent un profil de digestion par l'enzyme *RsaI* de leur ADNr 16S similaire à celui de *Microbacterium* sp. C448, suggérant donc qu'il s'agit d'une espèce proche et expliquant par le fait la détection de *groL*. Des expériences complémentaires sont en cours pour mieux caractériser ces souches d'un point de vue génomique et fonctionnel.

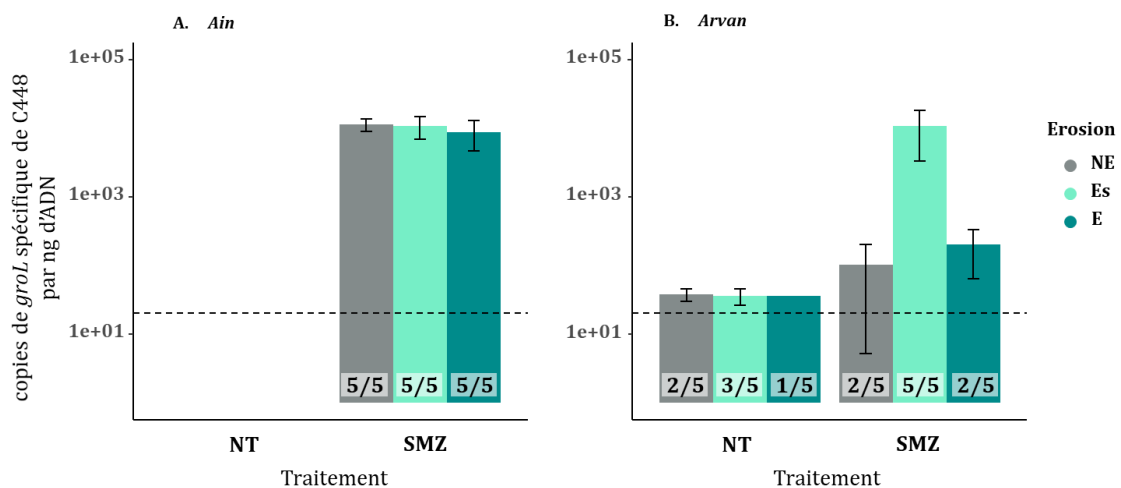


Figure 3.4 - Abondance du gène *groL* spécifique de *Microbacterium* sp. C448 en fin d'incubation dans les sédiments non inoculés de l'Ain (A.) et de l'Arvan (B.). Sont indiqués (i) les modalités d'érosion (NE : sans érosion, Es : érosion stérile, E : érosion) et de traitement à la sulfaméthazine (NT : non traité, SMZ : traité), (ii) le nombre de fois où les gènes ont été détectés pour chaque modalité (n=5) et le seuil de détection du gène *groL* par des pointillés.

2. Evolution du potentiel de minéralisation dans les sédiments inoculés avec *Microbacterium* sp. C448

Pour les sédiments inoculés avec *Microbacterium* sp. C448, on observe une minéralisation immédiate et élevée de la sulfaméthazine lors de l'incubation, avec une bonne répétabilité entre les répétitions, et ce quel que soit le type de sédiments (Figure 3.5). Dans les sédiments de l'Arvan, la minéralisation de l'antibiotique est significativement augmentée par l'érosion de sol, et ce encore plus fortement lorsqu'il est stérile (Figure 3.5.B, ANOVA, $p < 0.001$). En effet les taux de minéralisation atteignent en fin d'incubation $15,8 \pm 1,4$ % dans la modalité sans érosion contre $20,4 \pm 1,0$ % et $26,3 \pm 0,9$ % dans les modalités d'érosion de sol respectivement non stérile et

stérile. Dans les sédiments de l'Ain, l'érosion de sol a aussi impacté significativement la minéralisation mais négativement (Figure 3.5.A, ANOVA $p < 0.01$), sans différence significative entre sol stérile et non stérile. Les taux de minéralisation ont ainsi été significativement réduits passant de $35,2 \pm 0,5$ % pour la modalité sans érosion à $32,7 \pm 1,4$ % et $32,4 \pm 1,1$ % pour les modalités d'érosion stérile et non stérile, respectivement. Il semblerait que cette différence soit due à un démarrage plus tardif de la minéralisation dans les modalités avec érosion, puisqu'après 9 jours d'incubation, leur taux de sulfaméthazine minéralisée ($5,3 \pm 2,1$ % et $4,7 \pm 2,6$ % en condition d'érosion stérile et non stérile, respectivement) était 2 fois moindre que dans la modalité sans érosion ($11,5 \pm 1,9$ %).

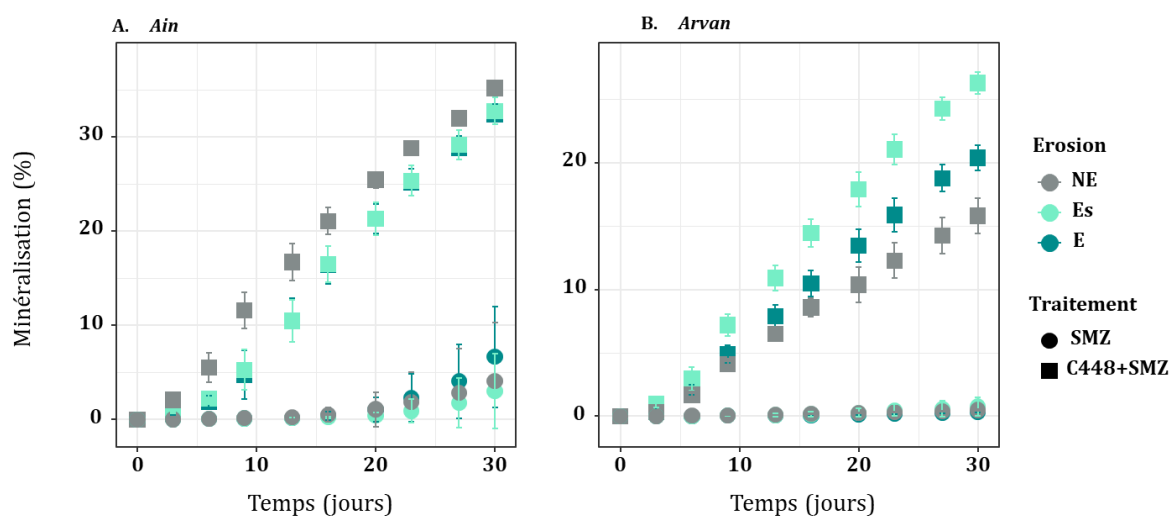


Figure 3.5 - Mesure de la minéralisation de la sulfaméthazine dans les microcosmes de sédiment de l'Ain (A) et de l'Arvan (B) inoculés avec *Microbacterium sp. C448* pendant le mois d'incubation. Pour chaque microcosme sont indiquées les modalités d'érosion (NE : sans érosion, Es : érosion stérile, E : érosion) et de traitement à la sulfaméthazine avec ou sans *Microbacterium sp. C448* (respectivement, SMZ et SMZ + C448).

Au terme du mois d'incubation, soit 30 jours après l'inoculation de *Microbacterium sp. C448*, l'ensemble des sédiments ont conservé le potentiel pour minéraliser la sulfaméthazine (Figure 3.6). Toutefois, les potentiels de minéralisation observés sont diminués, avec des taux inférieurs à ceux obtenus au terme de l'incubation initiale (Figure 3.5) malgré une échelle de temps plus longue. Dans les sédiments de l'Arvan, quelle que soit la modalité d'érosion, même si la minéralisation démarre immédiatement elle ne dépasse pas 8% après 46 jours (Figure 3.6.B). Dans les sédiments de l'Ain, la modalité sans érosion présente des taux significativement inférieurs à ceux avec érosion du fait d'un démarrage plus tardif ($21,2 \pm 2,4$ % contre $28,3 \pm 1,4$ % à 46 jours, $p < 0.001$). Cette différence est contraire à celle observée pendant l'incubation, qui mettait en évidence un effet négatif de l'érosion (Figure 3.5.A). Il est finalement intéressant de noter que le potentiel de minéralisation en fin d'incubation n'est pas meilleur dans les sédiments

de l'Ain inoculés avec *Microbacterium* sp. C448 que ceux uniquement exposés à la sulfaméthazine. Cette observation s'explique sûrement par la plus forte abondance au terme du mois d'incubation du gène *sadA* dans les conditions sans *Microbacterium* sp. C448, traduisant une plus forte abondance de microorganismes antibiophiles (Figure 3.3 et Figure 3.7).

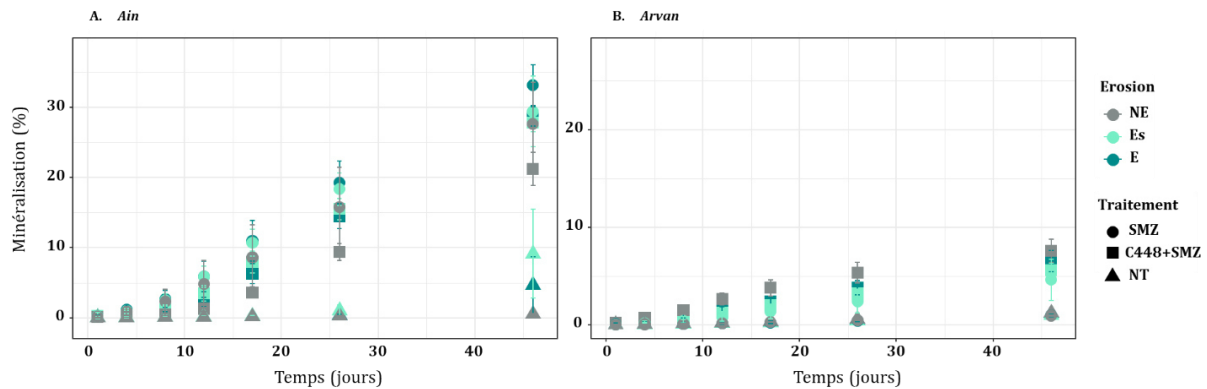


Figure 3.6 - Potentiel de la minéralisation de la sulfaméthazine dans les microcosmes de sédiment de l'Ain (A) et de l'Arvan (B) au terme du mois d'incubation. Pour chaque microcosme sont indiquées les modalités d'érosion (NE : sans érosion, Es : érosion stérile, E : érosion) et de traitement à la sulfaméthazine avec ou sans *Microbacterium* sp. C448 (NT : respectivement, sans traitement, SMZ et SMZ + C448).

Malgré la présence de bactéries antibiophiles endogènes, la minéralisation de l'antibiotique est toujours associée à la détection de *Microbacterium* sp. C448 que son abondance soit mesurée par quantification des gènes *groL* et *sadA* ou par des dénombrements sur boîte (Figure 3.7). Cette dernière technique, qui présente l'avantage de cribler spécifiquement la souche et de renseigner sur sa viabilité, confirme sa survie dans tous les sédiments un mois après son inoculation. Initialement apportée à 10^8 cellules par gramme, la souche était encore présente à des densités évoluant entre $1 \cdot 10^7$ et $5 \cdot 10^7$ CFU par gramme dans les sédiments de l'Arvan (Figure 3.7.B) et entre $0,4 \cdot 10^7$ et $1,1 \cdot 10^7$ CFU par gramme dans ceux de l'Ain (Figure 3.7.A). Dans les sédiments de l'Arvan avec les modalités avec érosion, l'abondance réduite d'un facteur 4 de *Microbacterium* sp. C448 (Anova, $P < 0.001$) s'accompagne d'un plus faible potentiel de minéralisation au terme de l'incubation (Figure 3.6B). Dans les sédiments de l'Ain sous la modalité d'érosion stérile, l'augmentation d'un facteur 2,7 de l'abondance de la souche comparée à la condition sans érosion amène à un potentiel de minéralisation supérieur au terme du mois d'incubation (Figure 3.6A; Anova, $P < 0.01$).

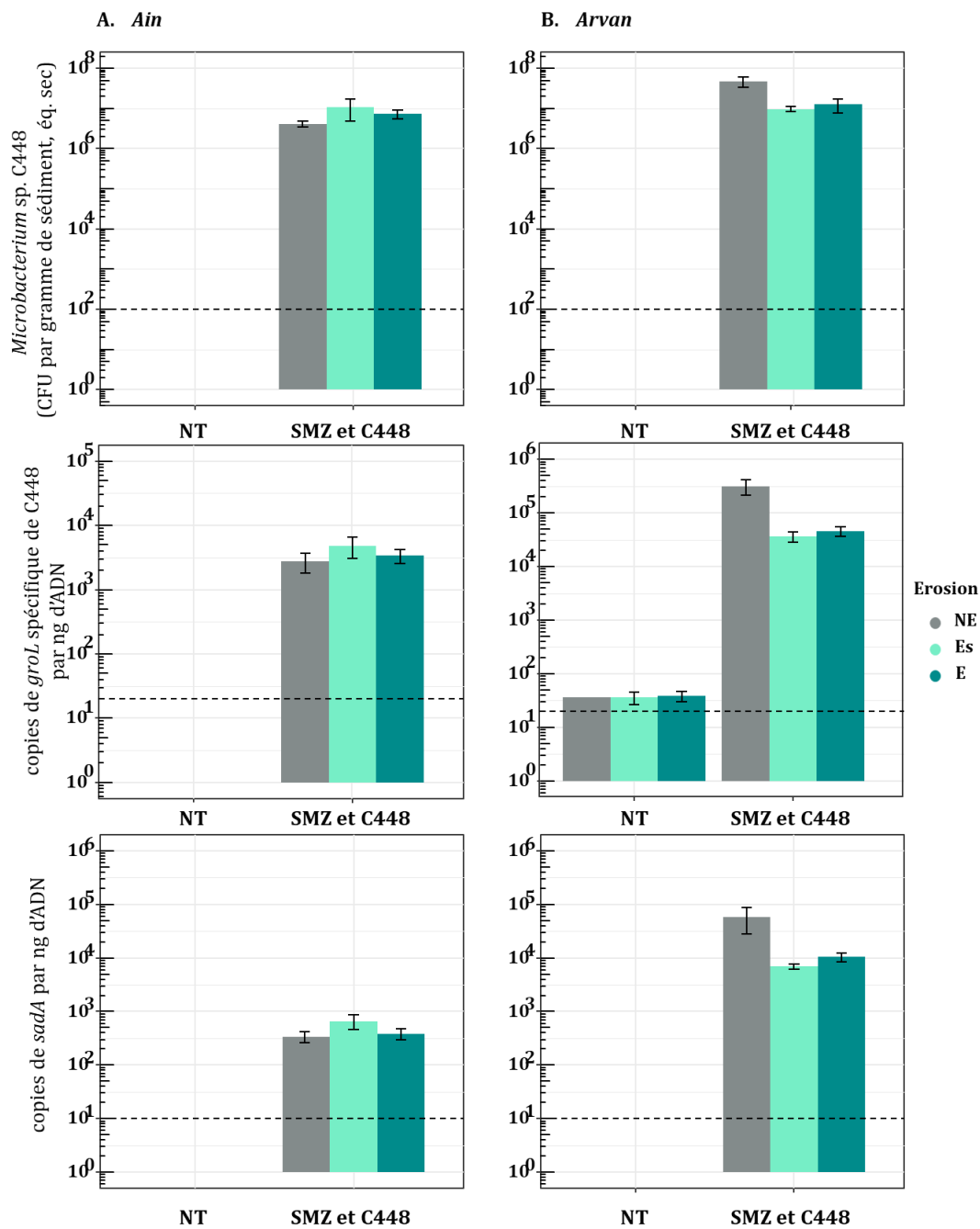


Figure 3.7 - Quantification de *Microbacterium sp. C448* dans les sédiments de l'Ain (A) et de l'Arvan (B) après 30 jours d'incubation, dans la modalité sans sulfaméthazine et celle inoculée avec la souche et traitée à la sulfaméthazine. De haut en bas sont présentés la quantification de la souche par dénombrement sur milieu sélectif, la quantification par qPCR de la séquence *groL* théoriquement spécifique de *Microbacterium sp. C448* et enfin la quantification par qPCR du gène *sadA*. Les seuils de détection sont indiqués par des pointillés.

3. Répartition spatiale de la sulfaméthazine et de l'ADMP au terme du mois d'incubation

Au-delà de compléter les données de minéralisation de la sulfaméthazine, des dosages de l'antibiotique et de l'ADMP (son produit terminal de dégradation) ont été réalisés un mois après l'incubation pour évaluer le niveau d'exposition des communautés. Les variations spatiales au sein des microcosmes ont été considérées au niveau matricielle en faisant la distinction entre le compartiment sédimentaire qui comprend l'eau interstitielle et le compartiment aquatique superficiel. Considérant que la dégradation d'une mole de sulfaméthazine forme une mole d'ADMP, les taux de recouvrement des 23,3 μ moles ajoutées par microcosmes au début de l'incubation étaient supérieurs à 90% pour l'Ain alors que pour l'Arvan, ils étaient au maximum de 55% (Figure 3.8). Ce taux plus faible, s'explique sûrement par la moins bonne extractibilité de la sulfaméthazine dans les sédiments de l'Arvan puisque lors des tests de recouvrement nous avons été uniquement capables de récupérer au mieux 59% de l'antibiotique après seulement 3 heures de contact avec la matrice alors que pour les mêmes conditions l'ADMP pouvait être récupérée à plus de 90% (Table 3.S1).

Pour les microcosmes de l'Ain, on constate qu'au terme du mois d'incubation la majeure partie des 23,3 μ moles de sulfaméthazine sont retrouvées sous forme d'ADMP indiquant une forte dégradation de l'antibiotique. Localisée à plus de 92% dans l'eau, l'ADMP représente 65 à 84% des μ moles ajoutées dans les modalités non inoculées avec *Microbacterium* sp. C448, et même 90 à 94% dans les modalités inoculées. Concernant la sulfaméthazine, sa fraction sédimentaire est toujours inférieure à 0,2 μ mole et celle aquatique varie entre 0,1 et 6,1 μ moles suivant la modalité d'érosion et surtout celle d'inoculation de *Microbacterium* sp. C448. Ainsi sans la souche, la quantité de sulfaméthazine de l'ordre de la μ mole est négativement impactée par l'érosion d'autant lorsqu'elle est stérile (NE : 6,1 μ moles > E : 3,2 μ moles > Es : 1,7 μ mole) alors qu'en sa présence les concentrations qui sont nettement plus faibles sont augmentées par l'érosion (E et Es : 0,4 μ mole vs. NE : 0,1 μ mole), pattern que l'on ne retrouve pas dans les données de minéralisation (sans la souche : NE \approx E \approx Es, avec la souche : NE > Es \approx E).

Pour les microcosmes de l'Arvan, les quantités de sulfaméthazine dans les microcosmes sont plus importantes avec de fortes différences suivant la modalité d'inoculation de *Microbacterium* sp. C448 mais sans grand impact de l'érosion. Les fractions sédimentaires et aquatiques suivent le même schéma puisqu'elles comportent respectivement en moyenne 4,2 et 3,5 μ moles de sulfaméthazine sans la souche contre 1 et 0,2 μ mole avec la souche. Donc l'inoculation de *Microbacterium* sp. C448 a fait chuter la quantité moyenne de sulfaméthazine totale, qui passe de 7,7 à 1,2 μ mole. L'ADMP est détecté dans toutes les conditions, avec une quantité minimum de 2

μmoles pour les modalités non-inoculées (dosée en majorité dans l'eau), et 8,3 μmoles pour les modalités inoculées (quasi-équitablement réparties entre l'eau et le sédiment).

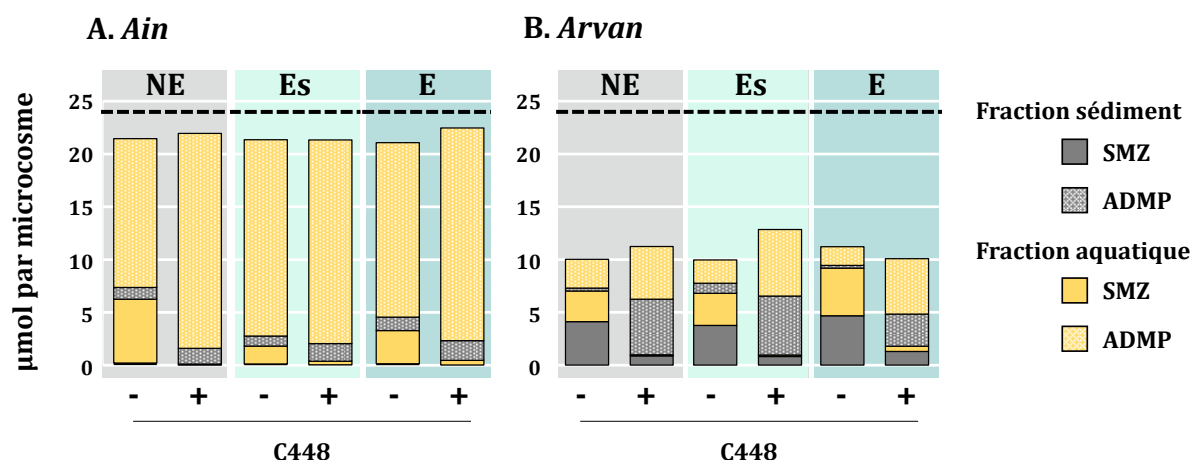


Figure 3.8 – **Bilan de masse de la sulfaméthazine par condition au terme du mois d'incubation** (moyenne de 5 répétitions, Figure 3.S1). La quantité de sulfaméthazine ajoutée par microcosme (23,3 μmoles) est indiquée en pointillé. Les quantités de sulfaméthazine et de l'ADMP sont indiquées suivant le compartiment où elles ont été trouvées. La modalité d'inoculation par la souche *Microbacterium sp. C448* (C448) est indiquée en abscisse (« - » = non inoculé, « + » = inoculé). La modalité d'érosion est indiquée par le code couleur en arrière plan et les mentions NE, Es et E pour respectivement « sans érosion », « avec érosion de sol stérile » et « érosion de sol non stérile ».

4. Influence de la sulfaméthazine, de l'érosion et de l'antibiotrophie sur l'antibiorésistance

Préliminairement aux études métagénomiques à venir, l'impact de la sulfaméthazine et de l'érosion sur les communautés des deux sédiments a été évalué par quantification du gène *sul1* et par dénombrement des bactéries cultivables totales et plus spécifiquement de celles non sensibles à une forte concentration de l'antibiotique (approx. résistantes). Dans un premier temps, il peut être souligné qu'une part non négligeable des communautés bactériennes naturellement présentes dans les sédiments considérés est résistante à la sulfaméthazine. En effet, dans les sédiments de l'Ain et de l'Arvan, on observe à la fois la détection de *sul1* à des moyennes respectives de $7,4 \times 10^3$ et $5,4 \times 10^3$ copies par ng d'ADN (Figure 3.9) ainsi qu'un pourcentage moyen de bactéries résistantes dans la population cultivable globale de respectivement 19,1 et 27,7% (Figure 3.10). Cette microflore résistante peut être impactée par les modalités d'érosion sans même l'ajout de la sulfaméthazine. En effet, alors que l'érosion de sol stérile n'impacte pas significativement les pourcentages mesurés dans l'Ain, on constate pour l'Arvan une augmentation de l'abondance des bactéries cultivables qui passe de $5,6 \times 10^4$ à $1,8 \times 10^6$ CFU par gramme de sédiment et la multiplication par un facteur de plus de 5 du nombre de copies de *sul1* par ng d'ADN (Figure 3.9). Cependant, l'augmentation de l'abondance des bactéries résistantes

étant plus faible que celle des bactéries totales, cela engendre une diminution du pourcentage moyen de bactéries cultivables résistantes, qui passe de 27,7% à 8,7% (Figure 3.10). Quand le sol apporté n'est pas stérile l'impact est encore plus marqué avec une nette augmentation de l'abondance des bactéries cultivables pour les deux sédiments, augmentation encore plus marquée concernant l'abondance de la fraction résistante à la sulfaméthazine. En effet même si l'abondance bactérienne totale des sédiments de l'Ain et de l'Arvan passe respectivement de $1,2 \times 10^6$ à $9,5 \times 10^6$ et de $5,6 \times 10^4$ à $1,4 \times 10^7$ CFU par gramme, c'est l'augmentation de l'abondance des bactéries résistantes qui est la plus marquée faisant passer leurs abondances relatives de 19,1% à 32,7% dans l'Ain et de 27,7% à 38,9% dans l'Arvan. Etonnement et de manière un peu contradictoire, l'abondance du gène *sul1* n'est quant à elle pas plus impactée que lorsque le sol érodé est stérile.

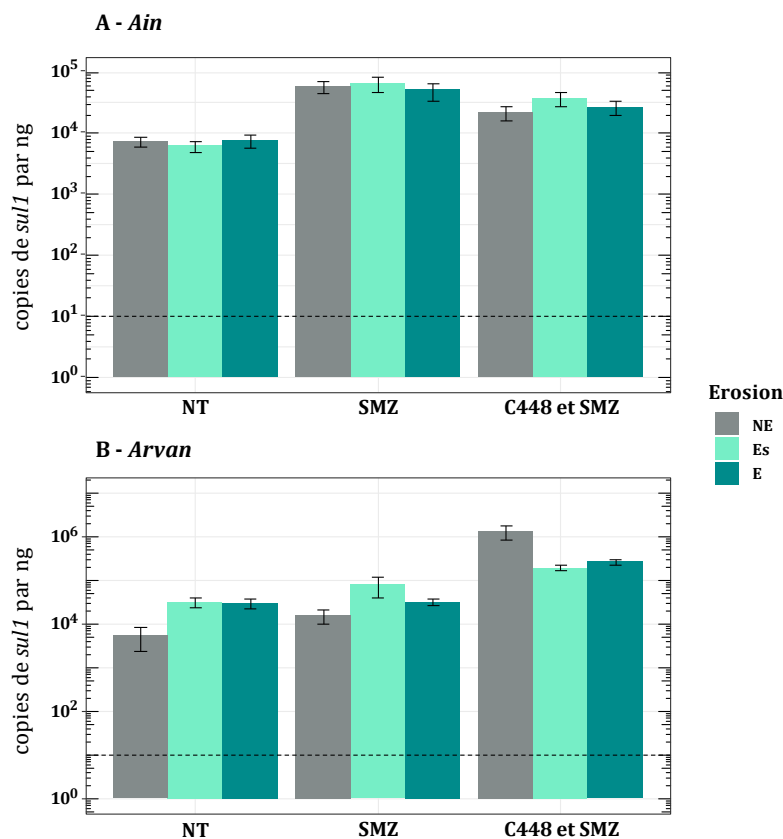


Figure 3.9 – Quantification de gène *sul1* dans les sédiments de l'Ain (A) et de l'Arvan (B) après 30 jours d'incubation dans les différentes modalités. Les seuils de détection sont indiqués par des pointillés.

Lorsque la modalité avec la sulfaméthazine est prise en compte, qu'elle soit accompagnée ou non par *Microbacterium* sp. C448, les données de quantification de *sul1* semblent se complexifier avec d'importantes variations, selon les modalités d'érosion et d'inoculation, propres à chacun des sédiments (Figure 3.9). Toutefois on peut observer que l'abondance de ce gène suit le même schéma que celui des gènes *sadA* et *groL* précédemment décrit, avec un sursaut d'abondance

proportionnel à leur niveau de détection (Figure 3.3, 3.4 et 3.7). Pour les données de dénombrements, les abondances bactériennes totale et résistante sont similaires à celle observées sans l'antibiotique et l'impact de l'érosion non stérile est toujours aussi marqué. Les deux changements notables concernent l'abondance relative des bactéries cultivables résistantes dans les sédiments de l'Arvan (Fig. 3.10.B). En effet, d'une part, en présence de sulfaméthazine uniquement, le pourcentage de ces bactéries n'est plus impacté négativement par et, d'autre part, il est fortement augmenté (facteur >2) lorsque l'antibiotique est combiné à *Microbacterium* sp. C448 en absence d'érosion.

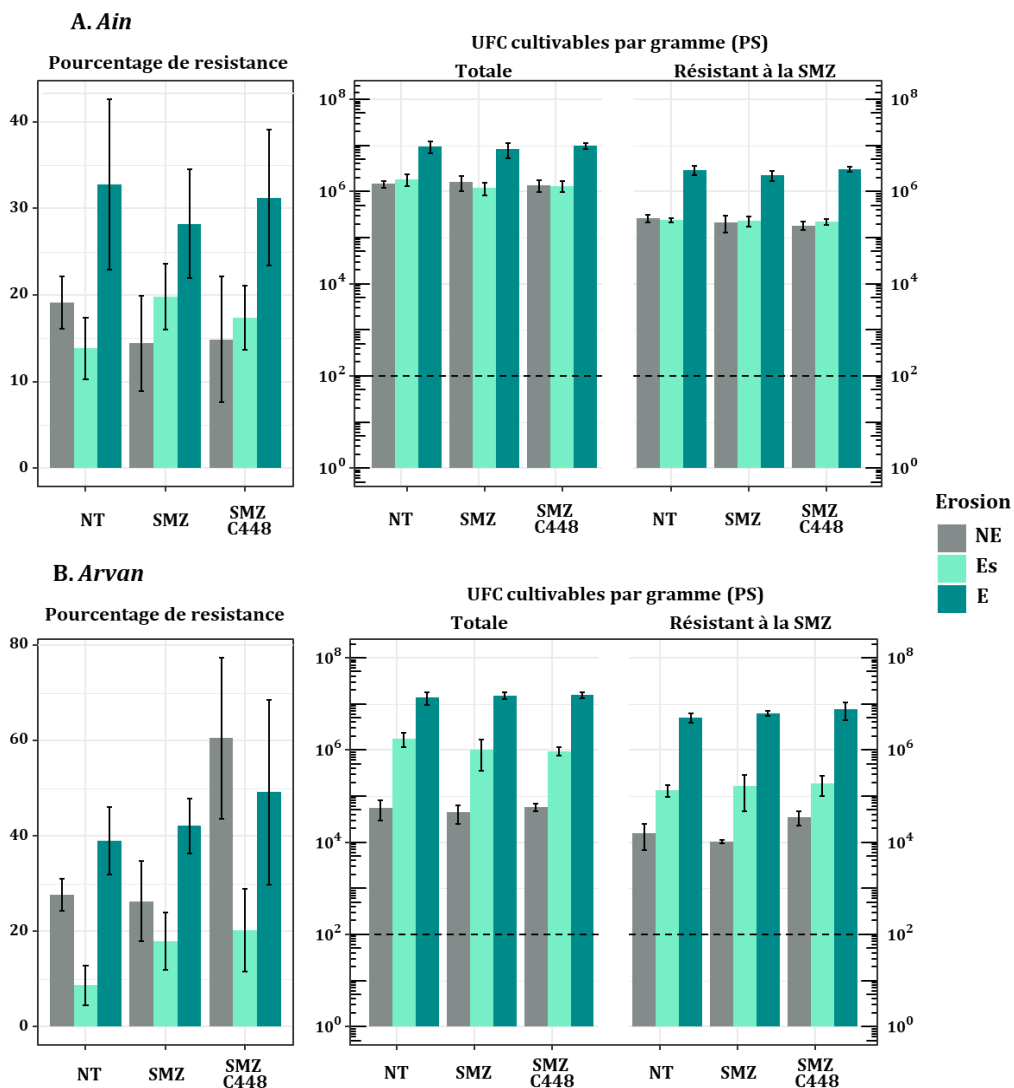


Figure 3.10 - Abondances bactériennes totales et résistante des sédiments de l'Ain (A) et de l'Arvan (B). Le graphique de gauche représente le pourcentage de bactéries résistantes cultivables parmi l'ensemble de la communauté bactérienne cultivable selon le rapport entre les données de comptage représenté sur le chapitre de gauche pour les deux conditions. La modalité d'érosion est stipulée par les mention NE, Es et E pour respectivement « sans érosion », « avec érosion de sol stérile » et « avec érosion de sol non stérile ». Les traitements sont indiqués en abscisse par les mention NT, SMZ et SMZ C448 pour « sans traitement »,

III. Discussion

1. Existence d'un potentiel naturel d'antibiotrophie dans les sédiments étudiés

Dans notre dispositif expérimental, la sulfaméthazine a été apportée à une concentration théorique (100 mg par kg de sédiment PS) très supérieure à celles détectées dans l'environnement (ex. maximum de 248 µg de sulfaméthazine par kg de sédiments de rivières situées dans des zones d'agriculture intensive ; DeVries and Zhang, 2016). Au terme du mois d'incubation, les dosages ont montré que pour les sédiments de l'Ain et de l'Arvan, la quantité de sulfaméthazine retrouvée dans le compartiment sédimentaire était bien en deçà de celle ajoutée avec respectivement une concentration maximale de 1,0 et 17,9 mg.kg⁻¹. Cette diminution s'explique d'une part par la distribution spatiale de l'antibiotique, qui se retrouve en grande proportion dans l'eau de surface notamment pour les sédiments de l'Ain. D'autre part, elle est associée à la formation d'ADMP, un produit connu de la biodégradation de l'antibiotique, détecté à des concentrations plus élevées que sa molécule mère dans le sédiment et l'eau de surface. Ces observations ont été corroborées par les données de minéralisation qui indiquent une dégradation ultime d'une partie de la sulfaméthazine sous forme de CO₂ dans ces sédiments, l'autre partie formant l'ADMP. De plus, alors que les gènes *sadA* et *groL* n'étaient pas (ou très peu) détectés dans les modalités n'ayant pas reçu la sulfaméthazine, leur abondance a fortement augmenté avec la dégradation de l'antibiotique, et ce, même en absence d'inoculation de la souche *Microbacterium* sp. C448. Ces observations, qui suggèrent que cette dégradation relève d'un ou plusieurs membres antibiotrophes des communautés sédimentaires naturelles, ont été renforcées par l'isolement de deux bactéries (une par type de sédiment) capables d'utiliser l'antibiotique comme unique source de carbone et d'azote. Ces 2 bactéries sont dotées, à l'image des autres antibiotrophes, d'un gène de résistance à la sulfaméthazine *sul1* et du gène *sadA*. Si la présence systématique du premier peut résulter du biais d'isolement qui implique des concentrations en sulfaméthazine uniquement supportables par des bactéries résistantes (dans l'hypothèse où *sadA* confère moins de résistance que *sul1*), celle du second indique que la fonction d'antibiotrophie n'a pas été acquise spontanément en réponse à l'exposition à la sulfaméthazine durant l'expérience mais qu'elle était initialement présente dans les deux sédiments (en dessous des seuils de détection par qPCR).

En considérant la proximité phylogénétique probable des bactéries antibiotrophes déjà décrites et celles isolées pendant cette étude (sur la base des profils de digestion obtenus), leur existence dans des environnements divers si éloignés géographiquement semble confirmer leur fort potentiel de dispersion. Toutefois, dans le cas des sédiments que nous avons étudiés, l'origine de cette dispersion n'est pas forcément connue. Si les sédiments de l'Ain ont été prélevés dans une zone fortement anthropisée, ceux de l'Arvan proviennent de la zone amont d'une rivière alpine

alimentée principalement par la fonte d'un glacier sans influence d'infrastructures humaines d'envergure (outre quelques petits hameaux de montagne). Toutefois des traces de sulfaméthazine (et d'ADMP) ont été décelées dans les sédiments prélevés à une concentration pouvant atteindre pour l'Ain et pour l'Arvan respectivement 1,5 et 0,3 µg par kg (ADMP = 0,6 et 4,6 µg par kg). Même si elles sont nettement plus faibles que celles des milieux d'où ont été isolées les antibiotrophes de la littérature (membrane bioactive : 100 µg par litre (Bouju *et al.*, 2012), sédiment : 10 µg par kg (Kim *et al.*, 2019), sol : plus de 1 mg par kg (Topp *et al.*, 2013)), elles traduisent une contamination chimique d'origine anthropique, la sulfaméthazine étant un antibiotique synthétique. Pour l'Ain, l'antibiotique et la capacité d'antibiotrophie ont pu être apportés par les effluents des zones agricoles et habitées situées en amont du lieu de prélèvement, à l'image des bactéries et gènes de résistances qui augmentent dans les rivières en aval des stations d'épuration (Sabri *et al.* 2020). Pour l'Arvan, l'explication la plus probable relève de la présence de bétail dans les alpages qui par leur déjection peuvent apporter directement antibiotiques et antibiorésistances dans l'environnement, et donc potentiellement l'antibiotrophie. Cependant, la présence de sulfaméthazine et de bactéries antibiotrophes et/ou antibiorésistantes dans l'Arvan questionne sur le rôle de la dispersion atmosphérique dans la propagation de ce type de contamination chimique et biologique (Sarmiento-Vizcaíno *et al.*, 2018).

Comme mentionné précédemment, les bactéries antibiotrophes sont naturellement très peu abondantes dans les sédiments (absence de détection par qPCR du gène *sadA*). En partant de l'hypothèse que leur présence est attribuable à une dispersion environnementale, cette sous-représentation pourrait tenir de leur caractère exogène qui les rendraient moins compétitives face aux bactéries endogènes du milieu sédimentaire pour l'occupation des niches. Une fois implantées, il semblerait toutefois que ces bactéries puissent se maintenir assez durablement dans les sédiments, notamment pour l'Ain où après un mois d'incubation sans apport de pression antibiotique un potentiel de minéralisation est toujours présent. Cette sous-représentation rejoint le constat effectué précédemment concernant les bactéries dégradant l'herbicide diuron dans des sédiments d'une rivière contaminée par cette substance (Pesce *et al.*, 2013). Malgré leur caractère très minoritaire, elles peuvent toutefois exprimer une capacité de dégradation non négligeable, comme illustré dans notre cas dans les sédiments de l'Ain, où la minéralisation en absence de la souche *Microbacterium* sp. C448 et de sol érodé a parfois atteint 15%. Cette capacité est vraisemblablement entretenue *in situ* par une contamination chronique du milieu par la sulfaméthazine, même à des faibles concentrations.

Cependant, il est intéressant de souligner que même si le potentiel antibiotrophe est toujours présent il ne se manifeste pas nécessairement. Dans l'Arvan, excepté dans la modalité d'érosion de sol stérile, l'antibiotique n'est pas minéralisé et on ne constate pas d'augmentation de la

population antibiotrophe au travers de la quantification du gène *sadA*. Il se pourrait que cette population n'ait pas accès à l'antibiotique (selon la biodisponibilité de ce contaminant organique), toutefois ce point est mis en doute par les données de chimie qui montrent dans toutes les modalités de l'Arvan une dégradation de la sulfaméthazine se traduisant par une production d'ADMP. On peut donc supposer que la dégradation de l'antibiotique dans ces conditions est partielle, sans minéralisation du produit intermédiaire et donc dégagement d'énergie pour soutenir la croissance des souches antibiotrophes.

2. Implantation de *Microbacterium* sp. C448 et de sa capacité antibiotrophe dans les sédiments suivant les modalités d'érosion.

La souche tellurique *Microbacterium* sp. C448 est capable de s'établir dans le compartiment sédimentaire. L'abondance mesurée après un mois, très proche des taux d'inoculation initiaux, traduit une bonne survie de cette souche dans les deux types de sédiments étudiés. Elle est donc capable de changer d'environnement bien que nombre d'études soulignent l'importance des différences physico-chimiques entre les matrices comme frein à la dispersion bactérienne (van Veen *et al.*, 1997). On peut même souligner que l'apport de matrice tellurique dans les sédiments de l'Arvan semble lui nuire puisqu'il engendre un impact négatif sur son abondance. Même si la souche est capable de s'adapter au changement de son environnement, sa survie est vraisemblablement facilitée par la forte concentration en sulfaméthazine qui lui fournit une niche trophique spécifique, d'autant que les bactéries antibiotrophes déjà présentes dans les sédiments sont beaucoup moins abondantes.

Contrairement à ce que nous avons observé dans notre première étude concernant le milieu terrestre, on constate que la souche minéralise systématiquement l'antibiotique, quel que soit le type de sédiment et le contexte d'érosion. Cependant, ces deux facteurs influencent l'efficacité de ce processus. Dans toutes les conditions expérimentales, les taux de minéralisation mesurés sont toujours plus importants dans les sédiments de l'Ain que dans ceux de l'Arvan, peut être du fait d'une meilleure disponibilité de l'antibiotique. Par ailleurs, dans ces deux types de sédiment la cinétique de minéralisation varie suivant la modalité d'érosion. Il est intéressant de souligner que ces cinétiques ne sont pas le miroir exact des données de dosage chimique. Cela s'explique par le fait que ces deux méthodes présentent toutes les deux des biais qui peuvent faire obstacle à une interprétation fiable des résultats. L'approche par radiorespirométrie peut conduire à une sous-estimation de la dégradation du produit radiomarqué puisqu'elle se base sur la mesure du ^{14}C relargué sous forme de CO_2 par le métabolisme sans considérer son incorporation à la biomasse. Concernant l'approche par dosage chimique, la mesure de la disparition de la sulfaméthazine et de l'apparition de l'ADMP ne garantit pas l'utilisation du 4-benzoquinoneimine comme substrat.

De plus, dans cette étude, les dosages effectués respectivement dans le sédiment et l'eau de surface ne renseignent pas des échanges entre ces deux compartiments (tant pour la sulfaméthazine que pour l'ADMP) et ne permettent donc pas d'établir formellement si la sulfaméthazine est exclusivement dégradée dans le sédiment ou non.

Malgré ces biais, l'activité de minéralisation de *Microbacterium* sp. C448 dans les deux types de sédiments, avec et sans apport de sol, est indéniable. De plus, l'influence de l'érosion est variable selon les cas et l'apport de communautés telluriques ne semblent pas stimuler significativement cette activité. Ce constat suggère donc que l'hypothèse selon laquelle la souche *Microbacterium* sp. C448 aurait son activité de minéralisation positivement reliée au niveau de compétition qu'elle rencontrerait dans les sédiments (donc théoriquement augmenté par l'apport de sol non stérile et diminué par celui d'un sol stérile) n'est pas vérifiée. Cependant, cette hypothèse sera explorée plus en détail à partir de l'analyse des données de séquençage à venir, qui permettra d'apporter des éléments supplémentaires concernant la structure et la diversité des communautés.

3. Impact de l'érosion sur la communauté sédimentaire

Afin d'évaluer l'impact de l'érosion et de distinguer l'influence de la part abiotique et biotique lors de l'évènement de coalescence qui en résulte, nous avons comparé trois modalités de traitements (sans érosion, apport d'un sol stérile et apport d'un sol non stérile).

L'érosion de sol stérile a uniquement impacté les sédiments de l'Arvan en augmentant l'abondance des bactéries cultivables globales. La présence d'au moins un morphotype bactérien cultivable dans le sol stérilisé et l'absence de données de séquençage à ce stade ne permettent pas d'écarter formellement l'hypothèse que cela soit dû, au moins pour partie, à un apport de bactéries telluriques par cette matrice théoriquement stérile. Cependant, il semble plus probable que cette augmentation soit principalement induite par un gain de croissance des bactéries en réponse à l'apport de sources nutritives allochtones dans ce sédiment initialement relativement oligotrophe. L'Ain, quant à lui plus riche en matière organique et en nutriments, présente initialement une capacité biotique largement supérieure à celle de l'Arvan. Dans ce contexte l'apport nutritif par l'érosion (Neal and Anders, 2015; Endale *et al.*, 2019) a donc pu passer inaperçu au milieu de cette environnement riche, limitant ainsi son impact sur l'abondance bactérienne.

L'érosion de sol non stérile a entraîné une forte augmentation de l'abondance des bactéries cultivables dans les deux types de sédiments après un mois d'incubation. Cette augmentation étant beaucoup plus forte que dans le contexte d'érosion stérile, elle traduit très probablement une invasion significative de ces sédiments par des bactéries telluriques, encore actives un mois après l'évènement de coalescence. Il est très intéressant de noter que cette invasion est

attribuable en majeure partie à des bactéries telluriques résistantes à la sulfaméthazine, leur pourcentage augmentant parmi les bactéries cultivables totales tout comme l'abondance du gène *sul1*, et ce même sans pression de la sulfaméthazine. Ces résultats rejoignent ceux d'une précédente étude montrant l'augmentation de l'abondance de gènes de résistance suite à un événement de coalescence d'épandage de lisier sur du sol alors qu'il n'y avait pas de contaminations connues en antibiotiques (Hu *et al.*, 2016). Deux hypothèses non exclusives (et non exhaustives) peuvent expliquer ce constat. Tout d'abord, l'augmentation de l'abondance relative des bactéries résistantes dans le milieu récepteur peut refléter la charge croissante des matrices en antibiorésistances en remontant le continuum lisier-sol-sédiment. Par ailleurs, il est possible que les propriétés du milieu récepteur (ici le sédiment) favorisent l'implantation des bactéries telluriques résistantes aux détriments de celles qui ne le sont pas. C'est le cas notamment de la présence de sulfaméthazine, même en faible concentration, ou d'autres contaminants, tels que les métaux, qui peuvent faciliter la co-sélection de la résistance aux antibiotiques.

4. Impact de la sulfaméthazine sur les populations bactériennes résistantes

Nous avons envisagé une augmentation de l'antibiorésistance dans les communautés sédimentaires en réponse à leur exposition à la sulfaméthazine. Nous avons également émis l'hypothèse d'une augmentation encore plus marquée avec l'apport de sol non stérile, en partant du principe que les bactéries telluriques résistantes présenteraient une meilleure capacité d'invasion dans un contexte de pression antibiotique. Avec l'existence d'un potentiel antibiotrophe naturel dans les sédiments utilisés et compte tenu de la distribution entre ce compartiment et l'eau de surface, les concentrations de l'antibiotique mesurées ont été plus faibles qu'attendu. Cependant, le niveau de contamination reste plus élevé que ceux mesurés dans des sédiments naturels pollués.

Les résultats concernant l'influence de la sulfaméthazine sur les populations bactériennes résistantes peuvent être considérés comme contradictoires selon la méthode utilisée pour étudier ces populations. En effet, nous n'avons pas observé d'impact positif de la sulfaméthazine sur l'abondance relative des bactéries résistantes cultivables, toutes modalités considérées (à l'exception de l'atténuation de l'impact négatif causé par l'érosion de sol stérile sur la proportion de bactéries antibiorésistantes dans les sédiments de l'Arvan en absence de sulfaméthazine). A l'inverse, lorsque l'on considère les données de qPCR, on observe avec la sulfaméthazine un essor indiscutable de l'abondance du gène *sul1*. Cette différence serait attribuable à l'essor des bactéries antibiotrophes qui sont dotées de ce gène mais qui nécessitent peut-être à l'image de *Microbacterium* sp. C448 un temps de croissance plus long que celui utilisé pour étudier la population de bactéries résistantes cultivables. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable

qu'en absence d'émergence d'antibiotrophe (modalités sans érosion et avec érosion de sol non stérile des sédiments de l'Arvan), l'abondance de *sul1* n'a pas été affecté par l'antibiotique.

IV. CONCLUSION

De manière assez inattendue, ces travaux ont permis la mise en évidence d'un potentiel antibiotrophe naturel dans les sédiments utilisés pouvant atténuer leur contamination par la sulfaméthazine. Il a été montré que ce potentiel naturel est fortement stimulé par l'inoculation de la souche tellurique *Microbacterium* sp. C448 qui survie plus d'un mois dans les sédiments et dégrade systématiquement l'antibiotique en absence comme en présence d'érosion. A terme, ces observations pourront être confrontées aux données de séquençage renseignant sur la structure et la composition des communautés bactériennes sédimentaires. Abordant la thématique écologique de coalescence, ces dernières devraient confirmer l'invasion suspectée des communautés sédimentaires par des bactéries telluriques, qui semblent être pour la majorité antibiorésistantes.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

I. Les transferts bactériens le long des continuums par évènements de coalescence, cas des agrosystèmes.

1. Un continuum biologique observé mais mal compris

L'explication de la distribution spatiale des bactéries se réfère souvent à la formule de Baas Becking, « everything is everywhere but the environment select¹ », implicite que même si les bactéries ont une grande capacité de dispersion, seules celles adaptées au milieu peuvent prospérer (Fuhrman, 2009). Les barrières physiques entre les compartiments environnementaux, et les spécificités physico-chimiques de ces compartiments, sont donc potentiellement génératrices de diversité (Canfora *et al.*, 2014; Bergkemper *et al.*, 2016; Sánchez-Marañón *et al.*, 2017). Cependant leur perméabilité aux transferts biologiques (et en particulier microbiens), parfois fréquents, peut maintenir une certaine continuité dans la composition bactérienne de systèmes physiquement connectés. Il a par exemple été montré que la connexion entre le compartiment tellurique et le compartiment aquatique à travers les processus d'érosion pouvait entretenir une ressemblance entre les communautés bactériennes de ces deux compartiments dans un même bassin versant, ressemblance qui s'estompe avec l'éloignement géographique (Crump *et al.*, 2012; Griffin *et al.*, 2017; Hermans *et al.*, 2020). Tout indique donc que les évènements de rencontre entre les écosystèmes (e.g. épandage de lisier sur les sols agricoles, érosion des sols vers le compartiment aquatique) sont des temps forts de transferts (micro)biologiques mais les études parvenant à l'illustrer manquent. Elles paraissent pourtant

¹ Citation pouvant être traduite par « tout est partout, mais l'environnement sélectionne ». Baas Becking, L. G. M. *Geobiologie of Inleiding tot de Milieukunde (Van Stockum & Zoon, 1934).*

essentielles à la compréhension de la dispersion de bactéries affectant la santé environnementale et humaine, à l'image des bactéries pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques. On peut notamment se demander ce qui influence le succès de l'invasion biologique. Est-ce par exemple l'abondance de la bactérie apportée (i.e. effet masse) ou son degré de ressemblance avec la microflore déjà présente (Gravuer and Scow, 2021) ? Ou encore, dans quelle mesure cette dernière peut, par un effet de priorité, entraver l'invasion (Pérez-Valera *et al.*, 2019) ?

La majorité des études s'intéressant à la résultante biotique des mélanges entre environnements repose sur la caractérisation et la comparaison des communautés bactériennes des différentes matrices, seules et additionnées, à travers le séquençage de leur ADNr 16S. Or, ce type d'approche présente deux principaux inconvénients. Tout d'abord, les limites de détection du séquençage ignorant les bactéries composant la biosphère rare ne permettent pas d'identifier la totalité des microorganismes des communautés. Or, la simple perturbation des paramètres environnementaux d'une matrice succédant à l'addition d'une seconde peut amener à la multiplication des bactéries rares et donc à leur détection, sans pouvoir identifier leur origine (Rocca *et al.*, 2019). Ainsi, les bactéries endogènes initialement non détectées peuvent être confondues avec celles envahissant la matrice. D'autre part, la caractérisation de la communauté se fait sur l'ensemble du matériel génétique extrait de la matrice sans distinction entre celui des bactéries mortes et vivantes. La détection d'une bactérie peut donc être simplement due au séquençage d'ADN environnemental, reliquat d'invasions bactériennes avortées. Pour contrer cette dernière limite, le séquençage de l'ADN complémentaire (ADNc) synthétisé à partir de l'ARNm peut constituer une alternative. Cependant, tel le revers d'une même médaille, l'instabilité de l'ARNm qui permet de se limiter à la part active de la communauté le rend difficile à étudier.

Au cours de notre étude faisant le lien entre le lisier et le compartiment tellurique, nous avons pris en considération ces limites. Bien qu'aucune certitude ne soit permise, l'hypothèse d'une émergence de bactéries telluriques rares après l'épandage a pu être écartée par un faisceau d'arguments. En tête, se trouve la détection systématique dans le lisier de l'OTU concernée. S'en suit la mise en évidence répétée de sa capacité d'invasion dans plusieurs sols et sa détection dans le sol amendé avec un lisier similaire 6 mois avant l'expérience. Dans l'hypothèse d'un faux-positif dû à l'ADN environnemental de bactéries du lisier n'étant pas parvenu à s'établir, toutes les OTUs les plus abondantes du lisier devraient être détectées. Or ce n'est pas ce qui a été observé, tendant à rendre caduc cet argument. Ainsi, avec cette première étude, nous sommes parvenus à justifier que des transferts de bactéries peuvent s'effectuer lors de la première étape de coalescence du continuum entre le lisier et le sol et que certaines d'entre elles survivent plusieurs semaines après l'évènement de coalescence. Dans le but de renforcer la puissance de détection d'invasions dans

notre seconde expérience faisant le lien entre le compartiment tellurique et aquatique, nous nous sommes proposés d'ajouter une modalité d'érosion de sol stérile comme l'avait fait Chen *et al.* en 2017 dans leur étude des conséquences de l'amendement de lisier. Les premiers résultats de notre étude soulignent que l'apport de sol stérile ne génère pas ou peu d'augmentation de l'abondance bactérienne cultivable en comparaison à l'érosion de sol non stérile. Cette différence indique probablement qu'il y a eu invasion par des bactéries du sol, en plus d'un possible sursaut de la communauté sédimentaire en réponse à l'apport de nutriments (suggéré par l'augmentation de l'abondance après ajout de sol stérile dans le sédiment le moins riche en nutriments et en matière organique). Les résultats à venir à partir du séquençage des communautés totales devraient nous permettre de déterminer si cette observation est bien la manifestation de l'invasion des communautés sédimentaires par des bactéries telluriques. En effet, grâce à la modalité d'érosion de sol stérile, il nous sera permis de mieux distinguer les bactéries de la biosphère rare sédimentaire se multipliant en réponse aux perturbations environnementales des bactéries originaires des sols envahissant les sédiments. Cependant il faut garder en tête que les communautés naturelles sont régies par des interactions complexes. Il reste donc imaginable, entre autres, que leurs perturbations par une tentative d'invasion même infructueuse peuvent faire émerger des bactéries rares du sédiment, des précautions d'interprétations devront donc aussi être prises (Mallon *et al.*, 2018). Les limites de détections inhérentes aux méthodes de séquençage, qui ne nous permettent pas de voir les communautés dans leur ensemble, restent donc le cœur du problème. Pour s'en soustraire, une des alternatives possibles serait de traiter ces problématiques avec des communautés artificielles dans lesquelles l'ensemble des membres seraient connus. Cette option est discutée plus en détail dans le point suivant.

2. Focus sur l'antibiorésistance

L'entrée simultanée d'antibiotiques et d'antibiorésistances dans l'environnement par rejet d'effluents contaminés chimiquement et biologiquement (e.g. déchets organiques agricoles, boues activées et eaux usées) est généralement désignée comme promotrice de la dispersion des antibiorésistances (celles-ci étant alors véhiculées avec un facteur chimique favorisant leur sélection via la pression qu'il exerce). C'est l'hypothèse que soutient nombre d'études, comme celle montrant une invasion facilitée d'une souche modèle *Escherichia coli* multirésistante dans des sols proportionnellement à la contamination en antibiotique (Xu *et al.*, 2021), ou encore celle indiquant une augmentation de la proportion et de la diversité de gènes et de bactéries antibiorésistantes dans les sols après amendement de lisier contaminé (Pérez-Valera *et al.*, 2019). Mais dans la controverse, Hu *et al.* 2015 et Chen *et al.* 2017 soulignent une augmentation de l'abondance relative de gènes de résistance dans les communautés telluriques même lorsqu'ils sont épandus avec des lisiers dépourvus respectivement de pression de sélection antibiotique et

de bactéries (*i.e.* lisiers stériles). Cependant, ces études reposent majoritairement sur la quantification de gènes de résistance et non sur le dénombrement des bactéries résistantes viables. Il est donc possible que leurs conclusions soient biaisées par la persistance de l'ADN environnemental, reliquat de bactéries antibiorésistantes n'étant pas parvenues à s'implanter (ou détruites lors de la stérilisation). Dans ce sens, Pérez-Valra *et al.* (2019) montrent que l'augmentation de l'antibiorésistance dans les communautés telluriques 80 jours après l'épandage n'est plus perçue avec les étalements bactériens sur milieu sélectif alors qu'elle reste visible avec la quantification des gènes de résistance (même si l'auteur l'attribue à de possibles transferts horizontaux).

Nos différentes études avaient pour vocation l'étude du potentiel d'invasion de bactéries résistantes le long du continuum agronomique suivant les conditions de pollution par la sulfaméthazine. Il aurait pu être envisagé de quantifier les gènes de résistances à partir de l'ADNc pour s'acquitter de la limite apposée par l'étude de l'ADN environnemental. Cependant, puisque cette technique a des rendements discutables et n'informe pas sur l'appartenance phylogénétique des bactéries résistantes, il lui a été préférée dans un premier temps la technique de marquage immunocytochimique au BrdU (bromodésoxyuridine). Faisant appel à un analogue de la thymidine avec un atome de Brome à la place du groupe méthyle en 5, elle permet de séparer le matériel génétique des bactéries actives l'ayant incorporé avec leur synthèse d'ADN de celui des bactéries inertes ou mortes. Cette technique, à l'avantage de l'ADN-SIP, n'est pas dépendante de la capacité des bactéries à métaboliser un substrat et peut donc théoriquement englober plus de bactéries. Lors de la mise au point de la technique, nous avons exposé les communautés telluriques du sol D (voir chapitre 1) ayant ou non été épandu et inoculé avec la souche résistante *Microbacterium* sp. C448, à des concentrations fortes en sulfaméthazine dans l'optique d'avoir une multiplication uniquement des bactéries non sensibles. Une fois l'ADN extrait, nous avons effectué une séparation immunologique pour récupérer uniquement la fraction de l'ADN marqué au BrdU. Malgré différents essais nous ne sommes pas parvenus à montrer un enrichissement en gènes de résistance après séparation immunologique. Nous avons formulé l'hypothèse que cette technique novatrice comportait un frein inhérent au protocole développé. Il est possible en effet que des fragments d'ADN non marqué puissent s'adhérer de manière aspécifique lors de l'immunocapture et soient donc artificiellement concentrés après la phase de dé-chélation par ajout de BrdU libre puisque présentant une moins forte affinité pour les sites de liaison que les fragment d'ADN marqué. Cette technique a donc été délaissée en faveur d'une approche de culture assez classique mais rarement utilisée de par sa lourdeur méthodologique. Mise en place au cours de notre deuxième expérience ciblant le continuum sol-milieu aquatique, elle a permis d'estimer la part de bactéries résistantes viables dans les communautés sédimentaires suivant les différentes

modalités d'érosion et de traitement antibiotique. De façon intéressante, l'érosion de sol non stérile a augmenté la fraction résistante de la communauté des deux sédiments et ce indépendamment de l'ajout de sulfaméthazine. En comparaison le sol stérile n'a pas eu d'impact ou sinon celui inverse, selon le type de sédiment. Il semblerait donc, à l'image des travaux de Hu *et al.* (2015) se situant à l'interface entre le lisier et le sol, que l'apport d'une matrice tellurique plus chargée en antibiorésistances (puisque plus en amont dans la voie de dispersion) puisse entraîner une augmentation de celles-ci dans les sédiments récepteurs, et ce même en absence de pression par l'antibiotique. Il faut cependant souligner que d'autres polluants possiblement présents dans les sédiments ont pu co-sélectionner les bactéries résistantes parmi les populations apportées.

Encore en analyse à ce jour, les données de séquençage des bactéries cultivables totales et résistantes nous permettront de déterminer si cette augmentation d'abondance se traduit par une augmentation de diversité. Ces données recoupées à celles du séquençage global des communautés sédimentaires permettront potentiellement de montrer l'augmentation de capacités d'invasion de bactéries telluriques identifiées comme résistantes lorsqu'elles sont apportées dans un sédiment contaminé en sulfaméthazine. Ce type d'investigation n'a pas pu être mené lors de notre première étude traitant de l'épandage, puisque nous avons montré un potentiel d'invasion des sols accru par la sulfaméthazine pour certaines OTUs du lisier sans pouvoir confirmer leur caractère résistant. Il faut toutefois là aussi souligner que les conclusions à venir de cette deuxième étude resteront dépendantes d'un seuil de détection particulièrement haut. En effet, basé sur des cultures avec une abondance maximale de 3000 CFU total par boîte (et donc une abondance plus faible concernant les bactéries résistantes), le séquençage ne nous permettra d'identifier que les bactéries résistantes les plus abondantes et surtout uniquement celles qui sont cultivables sur le milieu utilisé. Couplée à un séquençage, l'EpicPCR (Emulsion, Paired isolation and Concatenation PCR, Figure 9), qui s'affranchit de ce dernier point, aurait pu permettre de mieux appréhender la diversité des bactéries résistantes. Encore en développement, cette technique permet en effet d'identifier les bactéries dotés d'un gène d'intérêt sans nécessiter d'étape de culture grâce à l'amplification du fragment V3-V4 de l'ADNr 16S des bactéries sous condition qu'elles soient porteuses de ce gène (dans le cas présent, *sul1*). Outre permettre de mesurer une éventuelle augmentation de la diversité de résistance en réponse à la pression exercée par la sulfaméthazine, ces données aurait pu mettre en lumière la dispersion de bactéries telluriques résistantes dans les sédiments suite à l'épisode de coalescence testé (même si les limites du séquençage ignorant la rare biosphère pourraient limiter la certitude d'observation).

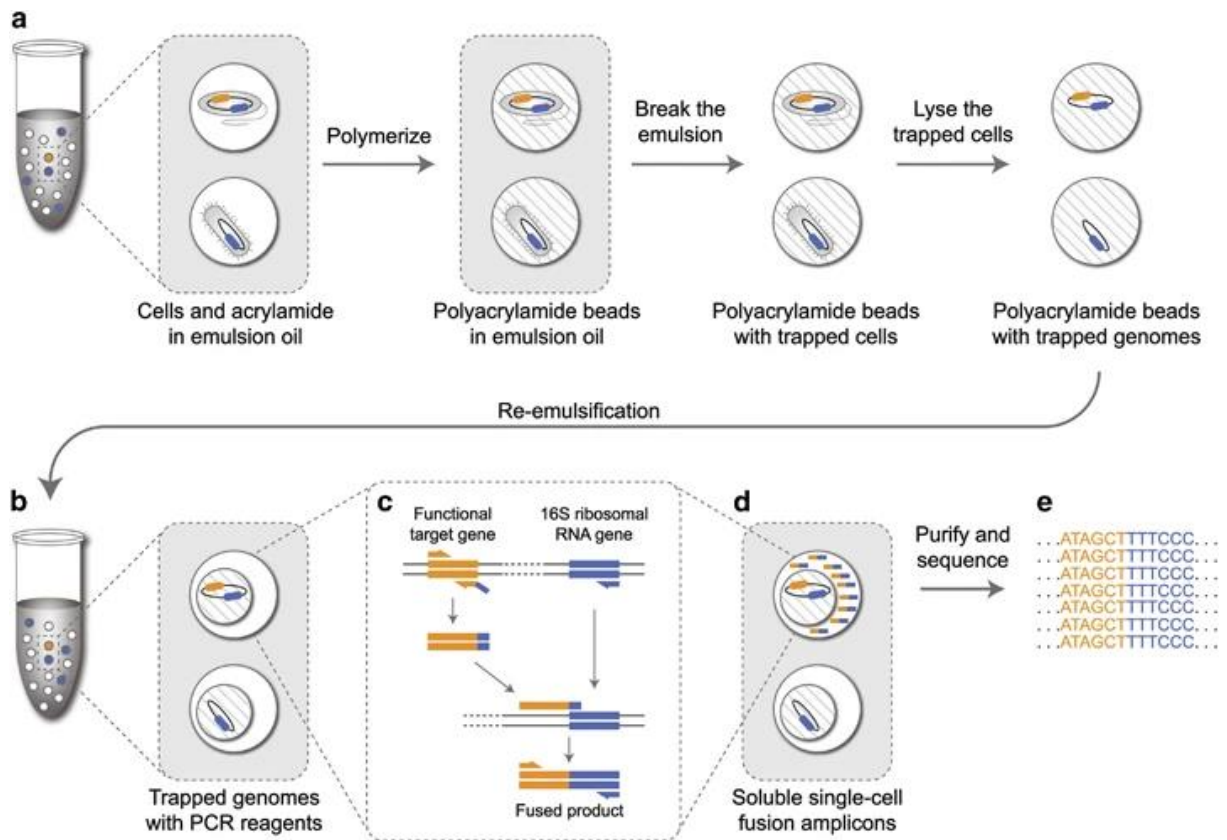


Figure 9 – Schéma descriptif de la méthode d'epicPCR, issu des travaux de Spencer *et al.* (2016)

Par ailleurs, si nous étions amenés à perfectionner le dispositif expérimental permettant d'évaluer les variations de diversité des bactéries antibiorésistantes sédimentaires en réponse à l'érosion de sol sous des contextes variables de contamination à la sulfaméthazine, il se présenterait comme indiqué dans la figure 10. D'une part, afin de contrer les limites du séquençage, et tout particulièrement celui concernant la biosphère rare, les matrices telluriques et sédimentaires seraient, après stérilisation, inoculées par des communautés bactériennes artificielles aux compositions strictement différentes et connues (sauf pour la modalité de sol stérile, Stenuit and Agathos, 2015; Carlstroem *et al.*, 2019; Fodelianakis *et al.*, 2019). Après équilibrage des matrices, des phénomènes d'érosion de sol stérile et non stérile seraient mimés sur les sédiments disposés en microcosmes selon un contexte variable de contamination à la sulfaméthazine (à l'image de l'expérience du chapitre 2). L'action de cet antibiotique sur les communautés exposées s'étant montrée relativement limitée durant nos études, et ce malgré des niveaux de contamination élevés, il pourrait notamment être possible de le substituer par un autre antibiotique potentiellement plus impactant sur les bactéries environnementales. Après incubation, les bactéries viables présentes dans les sédiments seraient récupérées par gradient de densité type Nycodenz®. En plus d'un séquençage classique pour identifier d'éventuelles bactéries telluriques

étant parvenues à envahir la communauté bactérienne sédimentaire, la puissance du dispositif serait renforcée par son couplage avec l'EpicPCR.

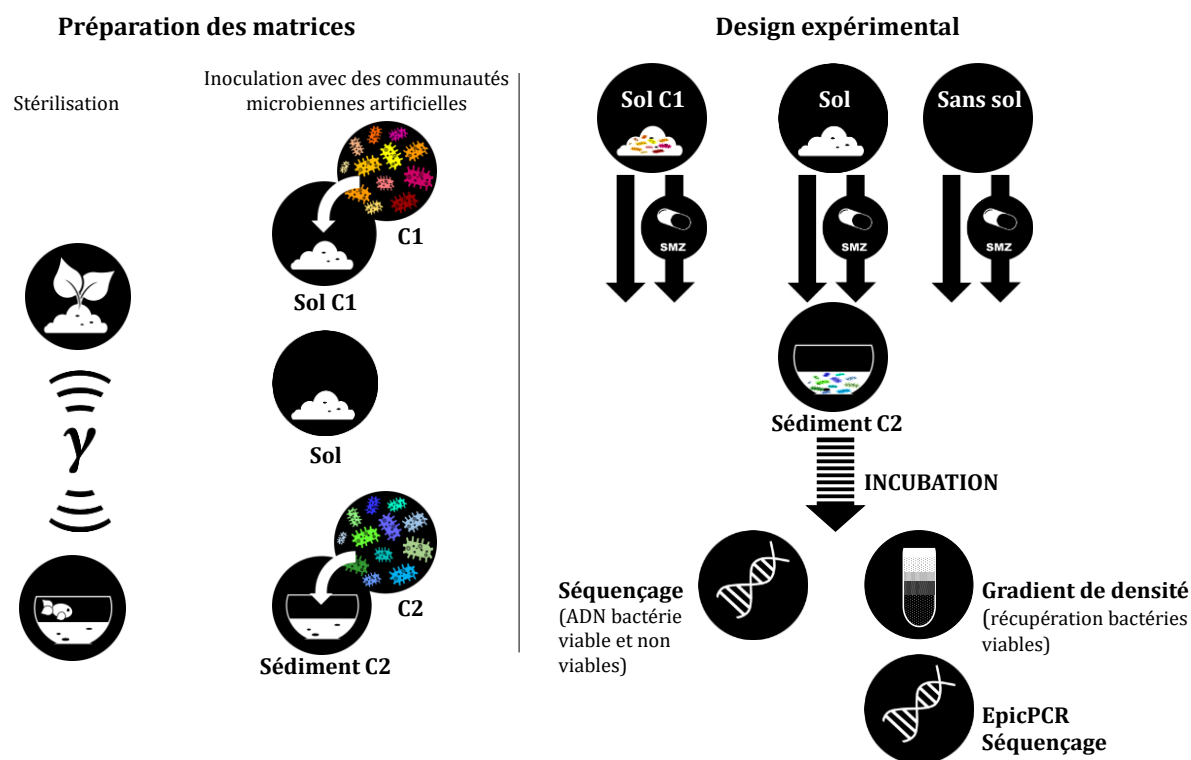


Figure 10 – Dispositif expérimental envisagé pour perfectionner l'étude de l'invasion des communautés sédimentaires par les bactéries telluriques antibiotiques en fonction de la présence d'antibiotique.

Cette méthode novatrice permettant d'identifier au terme de l'incubation les bactéries dotées du gène de résistance *sul1* permettrait de vérifier (i) si les bactéries résistantes présentent de base un potentiel de dispersion plus important que celles ne l'étant pas et, (ii) si la sulfaméthazine exerce une pression de sélection favorisant la dispersion des bactéries résistantes et les transferts horizontaux de *sul1* (détection par EpicPCR après incubation de bactéries initialement non résistantes). Elle pourrait même permettre dans une certaine mesure de déterminer qui des gènes et/ou des bactéries permettent la dispersion de l'antibiorésistance entre les compartiments, question qui fait débat (Rizzo *et al.*, 2013). En effet, des études avancent que les bactéries résistantes apportées dans une matrice se maintiennent transitoirement, alors que leur matériel génétique (incluant les gènes de résistance) pouvant être acquis par les bactéries endogènes persiste. Cette question de temporalité et de persistance associée pourrait d'ailleurs être prise en compte dans la stratégie expérimentale à travers des temps d'incubation plus long. Cela permettrait d'appréhender la résilience des communautés suite aux perturbations. Mais avant de complexifier ce dispositif, il faut souligner qu'il comporte d'importants points faibles. Tout d'abord, il n'évalue la résistance d'une bactérie qu'au travers de sa possession du gène *sul1*, or de

nombreux mécanismes, connus ou non, existent (ou co-existent) et peuvent interférer avec les observations. Deuxièmement, l'utilisation de communautés artificielles préalablement définies permet de s'affranchir des inconnus de la rarosphère mais elle impose de ne prendre en considération qu'une diversité très limitée en comparaison aux environnements naturels étudiés. Or cette diminution de diversité n'est pas anodine et peut largement impacter les processus d'invasion. En effet une occupation moindre des niches par les bactéries endogènes s'accompagne généralement d'une augmentation du succès d'invasion des bactéries exogènes puisqu'il y a moins de probabilité de redondance fonctionnelle (van Elsas *et al.*, 2012).

II. L'antibiotrophie, une fonction à comprendre

1. Une dispersion mondiale véhiculée par bactérie

La fonction d'antibiotrophie des sulfamides a été récemment rapportée dans divers environnements éloignés géographiquement. Puisqu'elle repose invariablement sur le gène *sadA* et que les bactéries isolées à ce jour appartiennent majoritairement au genre *Microbacterium*, il y a de fortes présomptions pour que l'antibiotrophie se soit dispersée par voie bactérienne. Celles-ci soutiennent l'hypothèse qu'une souche *Microbacterium* aurait récemment acquis le gène *sadA* et se serait dispersée dans l'environnement expliquant ainsi l'isolement de bactéries antibiotrophes similaires aux quatre coins du monde dans des environnements contaminés en antibiotiques. Mais comme souligné dans le point précédent, la dispersion des bactéries n'est pas nécessairement une évidence pour expliquer celle d'une fonction, l'hypothèse de transfert de gènes étant généralement préférée. Nous avons donc évalué le potentiel de dispersion de la souche antibiotrophe modèle *Microbacterium* sp. C448 à travers le continuum agricole, d'autres souches antibiotrophes ayant été isolées d'un sol épandu (Tappe *et al.*, 2013) avec du lisier et d'un sédiment proche d'une exploitation agricole (Kim *et al.*, 2019). Sous couvert de concentrations d'inoculum et d'antibiotiques environnementalement aberrantes, nous avons montré que la souche pouvait survivre dans tous les types d'environnements du continuum. En accord avec les études de Hirth *et al.* (2016) et de Fenu *et al.* (2015) qui ont démontré l'inoculation possible de bactéries antibiotrophes du genre *Microbacterium* dans des eaux usées et dans un sol différent des nôtres, nos travaux soutiennent l'hypothèse de dispersabilité bactérienne de l'antibiotrophie. Celle-ci est également fortement appuyée par le fait que nous sommes parvenus à isoler deux souches antibiotrophes phylogénétiquement proches issues de sédiments géographiquement éloignés dont l'un prélevé d'une zone assez préservée de l'activité humaine (*i.e.* zone amont de la rivière Arvan), dans laquelle il semblait peu probable d'observer de l'antibiotrophie.

2. Une fonction indissociable de l'antibiorésistance

Dans le cas des sulfamides, les gènes d'antibiotrophie permettant l'utilisation d'antibiotiques comme substrats sont pour toutes les bactéries isolées à ce jour associés à ceux de l'antibiorésistance. Cette observation ne traduit pas nécessairement une réalité biologique obligatoire, puisqu'elle peut résulter d'un biais de la méthode d'isolement (qui fait appel à l'utilisation de milieux sélectifs comportant de fortes concentrations en antibiotique). Ainsi, la souche modèle *Microbacterium* sp. C448 que nous avons utilisé possède ces deux fonctions. Or, si on considère que l'évolution évite les redondances, chacune de ces fonctions doit lui conférer ses propres avantages. Dans notre première étude, nous avons montré que ces fonctions permettaient à la souche de mieux survivre dans les sols sous condition qu'ils soient contaminés par la sulfaméthazine. Mais nos observations nous ont surtout amené à penser que l'antibiotrophie pouvait intervenir en renfort de l'antibiorésistance quand la pression de sélection de l'antibiotique se montrait insuffisante pour libérer des niches écologiques permettant à la souche de s'implanter. Ainsi, lorsque la communauté tellurique n'a pas été beaucoup impactée par la sulfaméthazine, la souche s'est appuyée sur sa capacité à métaboliser l'antibiotique pour réussir son implantation. Dans notre seconde étude, les souches antibiotrophes endogènes des sédiments n'ont vu leur abondance augmenter que lorsqu'elles ont eu la possibilité de minéraliser la sulfaméthazine. L'antibiotrophie pourrait donc être perçue comme une évolution des bactéries résistantes pour s'imposer dans un monde microbien de moins en moins sensible envers les antibiotiques. Pour le confirmer, il est envisagé de comparer les capacités d'invasion des communautés telluriques de souches *Microbacterium* sp. C448 génétiquement modifiées (*sul1+* *sadA-*, *sul1-* *sadA-*, *sul1-* *sadA+*) avec une souche naturelle (*sul1+* *sadA+*)

CONCLUSIONS

Cette thèse regroupe les résultats de deux études qui au travers de dispositifs en microcosmes se sont intéressées à la dispersion bactérienne le long du continuum lisier-sol-sédiment des agrosystèmes contaminés par la sulfaméthazine. Elles ont permis de mettre en évidence l'invasion successive du sol et du sédiment par des bactéries apportées respectivement par l'épandage de lisier et l'érosion du sol. Dans le premier cas, l'invasion du sol par certaines bactéries du lisier a été favorisée par l'antibiotique, dans le second cas, le taux de bactéries cultivables résistantes s'est vu augmenté par l'érosion de sol. Conjointement, ces résultats laissent présager de la dispersion de l'antibiorésistance par voie bactérienne et ce même sans pression de l'antibiotique et questionne donc sur les réels facteurs conditionnant l'importance du résistome environnementale. Cependant, le cœur de ces travaux reste toutefois l'étude du cas particulier de la dispersion de l'antibiotrophie qui portée par la souche *Microbacterium* sp. C448, a conquis les différents compartiments du continuum. La sulfaméthazine étant indispensable à l'implantation de la souche (même si celle-ci ne la minéralise pas systématiquement), il a été formulé l'hypothèse forte que cet antibiotique réduirait par son action biocide la compétition à laquelle est exposée la souche, et quand cela est insuffisant, il lui servirait de support nutritif. Ces travaux ont donc ouvert la voie vers l'étude de l'intérêt écologique de cette fonction puisqu'ils indiquent une potentielle augmentation des capacités d'invasion en présence de l'antibiotique comparé à l'antibiorésistance seule. Ce pourrait-il que l'antibiotrophie permette aux bactéries d'augmenter leur chance d'implantation et de survie dans des environnements contaminés hébergeant une flore bactérienne de plus en plus résistante ? De surcroît, nos travaux ont conduit à l'isolement d'antibiotrophes dans des environnements d'apparence préservés de l'activité humaine,

le tout participant donc à l'idée que cette fonction n'est émergente que dans dans la sphère scientifique, mais qu'elle est relativement bien implantée et dispersée dans les différents écosystèmes.

REFERENCE

- Abd-El-Malek, Y., Monib, M., and Hazem, A. (1961). Chloramphenicol, a simultaneous carbon and nitrogen source for a *Streptomyces* sp. from Egyptian soil. *Nature* 189, 775–776. doi:10.1038/189775a0.
- Adamowicz, E. M., Flynn, J., Hunter, R. C., and Harcombe, W. R. (2018). Cross-feeding modulates antibiotic tolerance in bacterial communities. *ISME J* 12, 2723–2735. doi:10.1038/s41396-018-0212-z.
- Agersø, Y., Wulff, G., Vaclavik, E., Halling-Sørensen, B., and Jensen, L. B. (2006). Effect of tetracycline residues in pig manure slurry on tetracycline-resistant bacteria and resistance gene tet(M) in soil microcosms. *Environ Int* 32, 876–882. doi:10.1016/j.envint.2006.05.008.
- Aislabie, J., Richards, N., and Boul, H. (1997). Microbial degradation of DDT and its residues—A review. *New Zealand Journal of Agricultural Research - N Z J AGR RES* 40, 269–282. doi:10.1080/00288233.1997.9513247.
- Amanatidou, E., Matthews, A. C., Kuhlicke, U., Neu, T. R., McEvoy, J. P., and Raymond, B. (2019). Biofilms facilitate cheating and social exploitation of β -lactam resistance in *Escherichia coli*. *npj Biofilms Microbiomes* 5, 1–10. doi:10.1038/s41522-019-0109-2.
- Aminov, R. I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology* 11, 2970–2988. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x.
- An, J., Chen, H., Wei, S., and Gu, J. (2015). Antibiotic contamination in animal manure, soil, and sewage sludge in Shenyang, northeast China. *Environ Earth Sci* 74, 5077–5086. doi:10.1007/s12665-015-4528-y.
- Andersson, D. I., and Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12, 465–478. doi:10.1038/nrmicro3270.
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., and Peixe, L. (2005). Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 836–839. doi:10.1128/AAC.49.2.836-839.2005.
- Bahl, M. I., Hansen, L. H., Goesmann, A., and Sørensen, S. J. (2007). The multiple antibiotic resistance IncP-1 plasmid pKJK5 isolated from a soil environment is phylogenetically divergent from members of the previously established alpha, beta and delta sub-groups. *Plasmid* 58, 31–43. doi:10.1016/j.plasmid.2006.11.007.

- Barnhill, A. E., Weeks, K. E., Xiong, N., Day, T. A., and Carlson, S. A. (2010). Identification of multiresistant salmonella isolates capable of subsisting on antibiotics. *Appl Environ Microbiol* 76, 2678–2680. doi:10.1128/AEM.02516-09.
- Barrios, R. E., Khuntia, H. K., Bartelt-Hunt, S. L., Gilley, J. E., Schmidt, A. M., Snow, D. D., et al. (2020). Fate and transport of antibiotics and antibiotic resistance genes in runoff and soil as affected by the timing of swine manure slurry application. *Science of The Total Environment* 712, 136505. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136505.
- Beckman, W., and Lessie, T. G. (1979). Response of *Pseudomonas cepacia* to beta-Lactam antibiotics: utilization of penicillin G as the carbon source. *J Bacteriol* 140, 1126–1128.
- Behki, R. M., and Khan, S. U. (1986). Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 34, 746–749. doi:10.1021/jf00070a039.
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., and Larsson, D. G. J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 42. doi:10.1093/femsre/fux053.
- Bengtsson-Palme, J., and Larsson, D. G. J. (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environ Int* 86, 140–149. doi:10.1016/j.envint.2015.10.015.
- Benimeli, C. S., Fuentes, M. S., Abate, C. M., and Amoroso, M. J. (2008). Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61, 233–239. doi:10.1016/j.ibiod.2007.09.001.
- Bergkemper, F., Welzl, G., Lang, F., Krüger, J., Schloter, M., and Schulz, S. (2016). The importance of C, N and P as driver for bacterial community structure in German beech dominated forest soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 179, 472–480. doi:10.1002/jpln.201600077.
- Billet, L., Pesce, S., Rouard, N., Spor, A., Martin, L. F., and Lamrani, M. D. (2020). Antibiotics favor the establishment of antibiophobic bacteria in agricultural soil microbial communities, but are not always sufficient to enhance antibiotic-degradation: manure spreading can help. in Available at: <https://hal.inrae.fr/hal-03105782> [Accessed March 22, 2021].
- Billet, L., Pesce, S., Rouard, N., Spor, A., Paris, L., Lereboure, M., et al. (2021). Antibiotrophy: Key Function for Antibiotic-Resistant Bacteria to Colonize Soils-Case of Sulfamethazine-Degrading *Microbacterium* sp. C448. *Front Microbiol* 12, 643087. doi:10.3389/fmicb.2021.643087.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., and Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13, 42–51. doi:10.1038/nrmicro3380.
- Bouju, H., Ricken, B., Beffa, T., Corvini, P. F.-X., and Kolvenbach, B. A. (2012). Isolation of bacterial strains capable of sulfamethoxazole mineralization from an acclimated membrane bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 277–279. doi:10.1128/AEM.05888-11.
- Brandt, K. K., Sjøholm, O. R., Krogh, K. A., Halling-Sørensen, B., and Nybroe, O. (2009). Increased pollution-induced bacterial community tolerance to sulfadiazine in soil hotspots amended with artificial root exudates. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2963–2968. doi:10.1021/es803546y.
- Brown, G. M. (1962). The biosynthesis of folic acid. II. Inhibition by sulfonamides. *J. Biol. Chem.* 237, 536–540.
- Browning, D. F., and Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 57–65. doi:10.1038/nrmicro787.

- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C. M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., et al. (2019). Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Res.* 162, 320–330. doi:10.1016/j.watres.2019.06.039.
- Cai, B., Han, Y., Liu, B., Ren, Y., and Jiang, S. (2003). Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. *Letters in Applied Microbiology* 36, 272–276. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01307.x.
- Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J., and Muniesa, M. (2017). The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution* 223, 384–394. doi:10.1016/j.envpol.2017.01.035.
- Canfora, L., Bacci, G., Pinzari, F., Papa, G. L., Dazzi, C., and Benedetti, A. (2014). Salinity and Bacterial Diversity: To What Extent Does the Concentration of Salt Affect the Bacterial Community in a Saline Soil? *PLOS ONE* 9, e106662. doi:10.1371/journal.pone.0106662.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7, 335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303.
- Carlstroem, C., Field, C. M., Bortfeld-Miller, M., Mueller, B., Sunagawa, S., and Vorholt, J. A. (2019). Synthetic microbiota reveal priority effects and keystone strains in the Arabidopsis phyllosphere. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 1445–1454. doi:10.1038/s41559-019-0994-z.
- Castledine, M., Sierocinski, P., Padfield, D., and Buckling, A. (2020). Community coalescence: an evolutionary perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 375, 20190252. doi:10.1098/rstb.2019.0252.
- Chang, C., Sommerfeldt, T. G., and Entz, T. (1991). Soil Chemistry after Eleven Annual Applications of Cattle Feedlot Manure. *Journal of Environmental Quality* 20, 475–480. doi:10.2134/jeq1991.00472425002000020022x.
- Chen, J., Jiang, X., Tong, T., Miao, S., Huang, J., and Xie, S. (2019). Sulfadiazine degradation in soils: Dynamics, functional gene, antibiotic resistance genes and microbial community. *Science of The Total Environment* 691, 1072–1081. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.230.
- Chen, Q., An, X., Li, H., Zhu, Y.-G., Su, J., and Cui, L. (2017a). Do manure-borne or indigenous soil microorganisms influence the spread of antibiotic resistance genes in manured soil? doi:10.1016/J.SOILBIO.2017.07.022.
- Ching, C., and Zaman, M. H. (2020). Development and selection of low-level multi-drug resistance over an extended range of sub-inhibitory ciprofloxacin concentrations in Escherichia coli. *Sci Rep* 10, 8754. doi:10.1038/s41598-020-65602-z.
- Cid, C., Álvarez-Esmorís, C., Paradelo Núñez, R., Nóvoa-Muñoz, J. C., Arias-Estévez, M., Álvarez-Rodríguez, E., et al. (2018). Occurrence of tetracyclines and sulfonamides in manures, agricultural soils and crops from different areas in Galicia (NW Spain). *Journal of Cleaner Production* 197. doi:10.1016/j.jclepro.2018.06.217.
- Cleary, D. W., Bishop, A. H., Zhang, L., Topp, E., Wellington, E. M. H., and Gaze, W. H. (2016). Long-term antibiotic exposure in soil is associated with changes in microbial community structure and prevalence of class 1 integrons. *FEMS Microbiol Ecol* 92. doi:10.1093/femsec/fiw159.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., and Muniesa, M. (2014). Quinolone resistance genes (qnrA and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 69, 1265–1274. doi:10.1093/jac/dkt528.

- Cook, K. L., Netthisinghe, A. M. P., and Gilfillen, R. A. (2014). Detection of pathogens, indicators, and antibiotic resistance genes after land application of poultry litter. *J Environ Qual* 43, 1546–1558. doi:10.2134/jeq2013.10.0432.
- Copley, S. D. (2000). Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach. *Trends Biochem. Sci.* 25, 261–265. doi:10.1016/s0968-0004(00)01562-0.
- Corona, F., and Martinez, J. L. (2013). Phenotypic resistance to antibiotics. *Antibiotics (Basel)* 2, 237–255. doi:10.3390/antibiotics2020237.
- Costanzo, S. D., Murby, J., and Bates, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 218–223. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.10.038.
- Crofts, T. S., Wang, B., Spivak, A., Gianoulis, T. A., Forsberg, K. J., Gibson, M. K., et al. (2018). Shared strategies for β -lactam catabolism in the soil microbiome. *Nat. Chem. Biol.* 14, 556–564. doi:10.1038/s41589-018-0052-1.
- Crump, B. C., Amaral-Zettler, L. A., and Kling, G. W. (2012). Microbial diversity in arctic freshwaters is structured by inoculation of microbes from soils. *ISME J* 6, 1629–1639. doi:10.1038/ismej.2012.9.
- Cycoń, M., Mroziak, A., and Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Front Microbiol* 10, 338. doi:10.3389/fmicb.2019.00338.
- Dantas, G., Sommer, M., Oluwasegun, R., and Church, G. (2008). Bacteria Subsisting on Antibiotics. *Science (New York, N.Y.)* 320, 100–3. doi:10.1126/science.1155157.
- Davis, J. G., Truman, C. C., Kim, S. C., Ascough, J. C., and Carlson, K. (2006). Antibiotic Transport via Runoff and Soil Loss. *Journal of Environmental Quality* 35, 2250–2260. doi:10.2134/jeq2005.0348.
- D’Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., et al. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457–461. doi:10.1038/nature10388.
- Deng, Y., Mao, Y., Li, B., Yang, C., and Zhang, T. (2016). Aerobic Degradation of Sulfadiazine by *Arthrobacter* spp.: Kinetics, Pathways, and Genomic Characterization. *Environ. Sci. Technol.* 50, 9566–9575. doi:10.1021/acs.est.6b02231.
- DeVries, S. L., and Zhang, P. (2016). Antibiotics and the Terrestrial Nitrogen Cycle: A Review. *Curr Pollution Rep* 2, 51–67. doi:10.1007/s40726-016-0027-3.
- Ding, C., and He, J. (2010). Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 925–941. doi:10.1007/s00253-010-2649-5.
- Domingues, I. L., Gama, J. A., Carvalho, L. M., and Dionisio, F. (2017). Social behaviour involving drug resistance: the role of initial density, initial frequency and population structure in shaping the effect of antibiotic resistance as a public good. *Heredity* 119, 295–301. doi:10.1038/hdy.2017.33.
- Drillia, P., Dokianakis, S. N., Fountoulakis, M. S., Kornaros, M., Stamatelatou, K., and Lyberatos, G. (2005). On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole. *Journal of Hazardous Materials* 122, 259–265. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.03.009.
- Egorin, M. J., Echo, D. A. V., Whitacre, M. Y., Forrest, A., Sigman, L. M., Engisch, K. L., et al. (1986). Human Pharmacokinetics, Excretion, and Metabolism of the Anthracycline Antibiotic Menogaril (7-OMEN, NSC 269148) and Their Correlation with Clinical Toxicities. *Cancer Res* 46, 1513–1520.

- Elsas, J. D. van, Chiurazzi, M., Mallon, C. A., Elhottová, D., Krištůfek, V., and Salles, J. F. (2012). Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *PNAS* 109, 1159–1164. doi:10.1073/pnas.1109326109.
- Endale, D. M., Schomberg, H. H., Truman, C. C., Franklin, D. H., Tazisong, I. A., Jenkins, M. B., et al. (2019). Runoff and nutrient losses from conventional and conservation tillage systems during fixed and variable rate rainfall simulation. *J. Soil Water Conserv.* 74, 594–612. doi:10.2489/jswc.74.6.594.
- Enne, V., Bennett, P., Livermore, D., and Hall, L. (2004). Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 53, 958–63. doi:10.1093/jac/dkh217.
- Enne, V. I., Livermore, D. M., Stephens, P., and Hall, L. M. (2001). Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *The Lancet* 357, 1325–1328. doi:10.1016/S0140-6736(00)04519-0.
- Esmaili, Z., Cheshmberah, F., Nazar, A. R. S., and Farhadian, M. (2017). Treatment of florfenicol of synthetic trout fish farm wastewater through nanofiltration and photocatalyst oxidation. *Environ. Technol.* 38, 2040–2047. doi:10.1080/09593330.2016.1245359.
- Fan, X.-T., Li, H., Chen, Q.-L., Zhang, Y.-S., Ye, J., Zhu, Y.-G., et al. (2019). Fate of Antibiotic Resistant *Pseudomonas putida* and Broad Host Range Plasmid in Natural Soil Microcosms. *Frontiers in Microbiology* 10, 194. doi:10.3389/fmicb.2019.00194.
- Feng, L., Casas, M. E., Ottosen, L. D. M., Møller, H. B., and Bester, K. (2017). Removal of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure. *Sci. Total Environ.* 603–604, 219–225. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.280.
- Fenu, A., Donckels, B. M. R., Beffa, T., Bemfohr, C., and Weemaes, M. (2015). Evaluating the application of *Microbacterium* sp strain BR1 for the removal of sulfamethoxazole in full-scale membrane bioreactors. *Water Sci. Technol.* 72, 1754–1761. doi:10.2166/wst.2015.397.
- Fenwick, B. W., and Olander, H. J. (1987). Experimental infection of weanling pigs with *Salmonella typhisuis*: effect of feeding low concentrations of chlortetracycline, penicillin, and sulfamethazine. *Am J Vet Res* 48, 1568–1573.
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M., and Larsson, D. G. J. (2009). Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ Toxicol Chem* 28, 2522–2527. doi:10.1897/09-073.1.
- Filippidou, S., Wunderlin, T., Junier, T., Jeanneret, N., Dorador, C., Molina, V., et al. (2016). A Combination of Extreme Environmental Conditions Favor the Prevalence of Endospore-Forming Firmicutes. *Front. Microbiol.* 0. doi:10.3389/fmicb.2016.01707.
- Fodelianakis, S., Lorz, A., Valenzuela-Cuevas, A., Barozzi, A., Booth, J. M., and Daffonchio, D. (2019). Dispersal homogenizes communities via immigration even at low rates in a simplified synthetic bacterial metacommunity. *Nat Commun* 10, 1314. doi:10.1038/s41467-019-09306-7.
- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O. A., and Dantas, G. (2012). The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *Science* 337, 1107–1111. doi:10.1126/science.1220761.
- Franz, E., Semenov, A. V., Termorshuizen, A. J., Vos, O. J. D., Bokhorst, J. G., and Bruggen, A. H. C. V. (2008). Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157:H7 in 36 Dutch soils. *Environmental Microbiology* 10, 313–327. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01453.x.

- Fuentes, S., Barra, B., Caporaso, J. G., and Seeger, M. (2016). From Rare to Dominant: a Fine-Tuned Soil Bacterial Bloom during Petroleum Hydrocarbon Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 888–896. doi:10.1128/AEM.02625-15.
- Fuhrman, J. A. (2009). Microbial community structure and its functional implications. *Nature* 459, 193–199. doi:10.1038/nature08058.
- Furuya, E. Y., and Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* 4, 36–45. doi:10.1038/nrmicro1325.
- Gao, J., and Pedersen, J. A. (2005). Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9509–9516. doi:10.1021/es050644c.
- Gao, P., Wei, X., Gu, C., Wu, X., Xue, G., Shi, W., et al. (2015). Isolation and characterization of an erythromycin-degrading strain and application for bioaugmentation in a biological aerated filter. *Water, Air, & Soil Pollution* 226. doi:10.1007/s11270-015-2449-8.
- Ghirardini, A., Grillini, V., and Verlicchi, P. (2020). A review of the occurrence of selected micropollutants and microorganisms in different raw and treated manure – Environmental risk due to antibiotics after application to soil. *Science of The Total Environment* 707, 136118. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136118.
- Gisi, D., Stucki, G., and Hanselmann, K. W. (1997). Biodegradation of the pesticide 4,6-dinitro-ortho-cresol by microorganisms in batch cultures and in fixed-bed column reactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 48, 441–448. doi:10.1007/s002530051077.
- Gold, R. S., Wales, M. E., Grimsley, J. K., and Wild, J. R. (2000). “Ancillary Function of Housekeeping Enzymes: Fortuitous Degradation of Environmental Contaminants,” in *Enzymes in Action: Green Solutions for Chemical Problems Proceedings of the NATO Advanced Study Institute on Enzymes in Heteroatom Chemistry (Green Solutions for Chemical Problems) Berg en Dal, The Netherlands 19–30 June 1999* NATO Science Partnership Sub-Series: 1., eds. B. Zwanenburg, M. Mikołajczyk, and P. Kiełbasiński (Dordrecht: Springer Netherlands), 263–286. doi:10.1007/978-94-010-0924-9_13.
- Gravuer, K., and Scow, K. M. (2021). Invader-resident relatedness and soil management history shape patterns of invasion of compost microbial populations into agricultural soils. *Appl. Soil Ecol.* 158, 103795. doi:10.1016/j.apsoil.2020.103795.
- Griffin, J. S., Lu, N., Sangwan, N., Li, A., Dsouza, M., Stumpf, A. J., et al. (2017). Microbial diversity in an intensively managed landscape is structured by landscape connectivity. *FEMS Microbiology Ecology* 93. doi:10.1093/femsec/fix120.
- Hagey, J., Bhatnagar, S., Heguy, J. M., Karle, B. M., Price, P. L., Meyer, D., et al. (2019). Fecal microbial communities in a large representative cohort of California dairy cows. *Front. Microbiol.* 10, 1093. doi:10.3389/fmicb.2019.01093.
- Haller, M. Y., Müller, S. R., McArdell, C. S., Alder, A. C., and Suter, M. J. F. (2002). Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 952, 111–120. doi:10.1016/s0021-9673(02)00083-3.
- Hammesfahr, U., Bierl, R., and Thiele-Bruhn, S. (2011). Combined effects of the antibiotic sulfadiazine and liquid manure on the soil microbial-community structure and functions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174, 614–623. doi:10.1002/jpln.201000322.
- Han, Z., Ma, J., Yang, C.-H., and Ibekwe, A. M. (2021). Soil salinity, pH, and indigenous bacterial community interactively influence the survival of *E. coli* O157:H7 revealed by multivariate statistics. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 5575–5586. doi:10.1007/s11356-020-10942-6.

- Hawkshead, J. (2008). Hospital wastewater containing pharmaceutically active compounds and drug-resistant organisms: A source of environmental toxicity and increased antibiotic resistance. *Journal of residuals science and technology* 5, 51.
- Hermans, S. M., Buckley, H. L., Case, B. S., and Lear, G. (2020). Connecting through space and time: catchment-scale distributions of bacteria in soil, stream water and sediment. *Environmental Microbiology* 22, 1000–1010. doi:10.1111/1462-2920.14792.
- Heuer, H., Schmitt, H., and Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 236–243. doi:10.1016/j.mib.2011.04.009.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., and Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 8, 15–25. doi:10.1038/nrmicro2259.
- Hirth, N., Topp, E., Dörfler, U., Stupperich, E., Munch, J. C., and Schroll, R. (2016). An effective bioremediation approach for enhanced microbial degradation of the veterinary antibiotic sulfamethazine in an agricultural soil. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 3, 29. doi:10.1186/s40538-016-0080-6.
- Hoa, P. T. P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D. H., et al. (2011). Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Sci. Total Environ.* 409, 2894–2901. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.04.030.
- Hong, Q., Zhang, Z., Hong, Y., and Li, S. (2007). A microcosm study on bioremediation of fenitrothion-contaminated soil using Burkholderia sp. FDS-1. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59, 55–61. doi:10.1016/j.ibiod.2006.07.013.
- Houtman, C. J. (2010). Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *Journal of Integrative Environmental Sciences* 7, 271–295. doi:10.1080/1943815X.2010.511648.
- Hu, H.-W., Han, X.-M., Shi, X.-Z., Wang, J.-T., Han, L.-L., Chen, D., et al. (2016). Temporal changes of antibiotic-resistance genes and bacterial communities in two contrasting soils treated with cattle manure. *FEMS Microbiol Ecol* 92, fiv169. doi:10.1093/femsec/fiv169.
- Huygens, J., Daeseleire, E., Mahillon, J., Van Elst, D., Decrop, J., Meirlaen, J., et al. (2021). Presence of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistant Bacteria in Cattle Manure Intended for Fertilization of Agricultural Fields: A One Health Perspective. *Antibiotics-Basel* 10, 410. doi:10.3390/antibiotics10040410.
- Iakovides, I. C., Michael-Kordatou, I., Moreira, N. F. F., Ribeiro, A. R., Fernandes, T., Pereira, M. F. R., et al. (2019). Continuous ozonation of urban wastewater: Removal of antibiotics, antibiotic-resistant *Escherichia coli* and antibiotic resistance genes and phytotoxicity. *Water Research* 159, 333–347. doi:10.1016/j.watres.2019.05.025.
- Islam, M., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., and Jiang, X. (2005). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food Microbiology* 22, 63–70. doi:10.1016/j.fm.2004.04.007.
- Islas-Espinoza, M., Reid, B. J., Wexler, M., and Bond, P. L. (2012). Soil bacterial consortia and previous exposure enhance the biodegradation of sulfonamides from pig manure. *Microb Ecol* 64, 140–151. doi:10.1007/s00248-012-0010-5.
- Jackson, L. M. D., Kroukamp, O., Yeung, W. C., Ronan, E., Liss, S. N., and Wolfaardt, G. M. (2019). Species Interaction and Selective Carbon Addition During Antibiotic Exposure Enhances Bacterial Survival. *Front. Microbiol.* 0. doi:10.3389/fmicb.2019.02730.

- Jacquioud, S., Brejnrod, A., Morberg, S. M., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., and Riber, L. (2017). Deciphering conjugative plasmid permissiveness in wastewater microbiomes. *Molecular Ecology* 26, 3556–3571. doi:10.1111/mec.14138.
- Janssen, D. B., Dinkla, I. J. T., Poelarends, G. J., and Terpstra, P. (2005). Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environ. Microbiol.* 7, 1868–1882. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00966.x.
- Jiang, B., Li, A., Cui, D., Cai, R., Ma, F., and Wang, Y. (2014). Biodegradation and metabolic pathway of sulfamethoxazole by *Pseudomonas psychrophila* HA-4, a newly isolated cold-adapted sulfamethoxazole-degrading bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4671–4681. doi:10.1007/s00253-013-5488-3.
- Jin, M., Liu, L., Wang, D., Yang, D., Liu, W., Yin, J., et al. (2020). Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation. *ISME J* 14, 1847–1856. doi:10.1038/s41396-020-0656-9.
- Johnsen, J. (1977). Utilization of benzylpenicillin as carbon, nitrogen and energy source by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Arch. Microbiol.* 115, 271–275. doi:10.1007/BF00446452.
- Jutkina, J., Marathe, N. P., Flach, C.-F., and Larsson, D. G. J. (2018). Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Science of The Total Environment* 616–617, 172–178. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.312.
- Kameda, Y., Kimura, Y., Toyoura, E., and Omori, T. (1961). A Method for isolating Bacteria capable of producing 6-Aminopenicillanic Acid from Benzylpenicillin. *Nature*. doi:10.1038/1911122A0.
- Kang, W., Zhang, Y.-J., Shi, X., He, J.-Z., and Hu, H.-W. (2018). Short-term copper exposure as a selection pressure for antibiotic resistance and metal resistance in an agricultural soil. *Environ Sci Pollut Res* 25, 29314–29324. doi:10.1007/s11356-018-2978-y.
- Karpouzias, D. G., and Walker, A. (2000). Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epl to degrade ethoprophos in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1753–1762. doi:10.1016/S0038-0717(00)00093-6.
- Kelsic, E. D., Zhao, J., Vetsigian, K., and Kishony, R. (2015). Counteraction of antibiotic production and degradation stabilizes microbial communities. *Nature* 521, 516–519. doi:10.1038/nature14485.
- Kenawy, A., Dailin, D. J., Abo-Zaid, G. A., Malek, R. A., Ambehabati, K. K., Zakaria, K. H. N., et al. (2019). “Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and Their Roles in Biocontrol of Plant Diseases,” in *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management: Volume 2: Rhizobacteria in Biotic Stress Management* Microorganisms for Sustainability., ed. R. Z. Sayyed (Singapore: Springer), 1–35. doi:10.1007/978-981-13-6986-5_1.
- Kerrigan, J. F., Sandberg, K. D., Engstrom, D. R., LaPara, T. M., and Arnold, W. A. (2018). Sedimentary record of antibiotic accumulation in Minnesota Lakes. *Science of The Total Environment* 621, 970–979. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.130.
- Kim, D.-W., Thawng, C. N., Lee, K., Wellington, E. M. H., and Cha, C.-J. (2019). A novel sulfonamide resistance mechanism by two-component flavin-dependent monooxygenase system in sulfonamide-degrading actinobacteria. *Environ Int* 127, 206–215. doi:10.1016/j.envint.2019.03.046.
- Kobland, J. D., Gale, G. O., Maddock, H. M., Garces, T. R., and Simkins, K. L. (1984). Comparative efficacy of sulfamethazine and sulfathiazole in feed for control of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine. *Am J Vet Res* 45, 720–723.

- Kohanski, M. A., DePristo, M. A., and Collins, J. J. (2010). Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. *Molecular Cell* 37, 311–320. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.003.
- Kovalakova, P., Cizmas, L., McDonald, T. J., Marsalek, B., Feng, M., and Sharma, V. K. (2020). Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere* 251, 126351. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126351.
- Kumar, M., Jaiswal, S., Sodhi, K. K., Shree, P., Singh, D. K., Agrawal, P. K., et al. (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International* 124, 448–461. doi:10.1016/j.envint.2018.12.065.
- Kumar, S., Mukerji, K. G., and Lai, R. (1996). Molecular Aspects of Pesticide Degradation by Microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology* 22, 1–26. doi:10.3109/10408419609106454.
- Kümmerer, K. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources--a review. *Chemosphere* 45, 957–969. doi:10.1016/s0045-6535(01)00144-8.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75, 417–434. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.086.
- Kunadiya, M. B., Burgess, T. I., Dunstan, W. A., White, D., and Hardy, G. E. S. (2021). Persistence and degradation of *Phytophthora cinnamomi* DNA and RNA in different soil types. *Environmental DNA* 3, 92–104. doi:10.1002/edn3.127.
- Kurade, M. B., Xiong, J.-Q., Govindwar, S. P., Roh, H.-S., Saratale, G. D., Jeon, B.-H., et al. (2019). Uptake and biodegradation of emerging contaminant sulfamethoxazole from aqueous phase using *Ipomoea aquatica*. *Chemosphere* 225, 696–704. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.03.086.
- Lamshöft, M., Sukul, P., Zühlke, S., and Spitteller, M. (2007). Metabolism of ¹⁴C-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs. *Anal Bioanal Chem* 388, 1733–1745. doi:10.1007/s00216-007-1368-y.
- Larsson, D. G. J., de Pedro, C., and Paxeus, N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J Hazard Mater* 148, 751–755. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.07.008.
- Leng, Y., Bao, J., Chang, G., Zheng, H., Li, X., Du, J., et al. (2016). Biotransformation of tetracycline by a novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* DT1. *J. Hazard. Mater.* 318, 125–133. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.06.053.
- Lennon, J. T., and Jones, S. E. (2011). Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat Rev Microbiol* 9, 119–130. doi:10.1038/nrmicro2504.
- Lertpaitoonpan, W., Ong, S. K., and Moorman, T. B. (2009). Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. *Chemosphere* 76, 558–564. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.02.066.
- Li, F., Chen, L., Chen, W., Bao, Y., Zheng, Y., Huang, B., et al. (2020). Antibiotics in coastal water and sediments of the East China Sea: Distribution, ecological risk assessment and indicators screening. *Marine Pollution Bulletin* 151, 110810. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.110810.
- Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J., and Cai, Y. (2013). Occurrence, distribution and potential affecting factors of antibiotics in sewage sludge of wastewater treatment plants in China. *Science of The Total Environment* 445–446, 306–313. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.050.
- Lin, B., Lyu, J., Lyu, X., Yu, H., Hu, Z., Lam, J. C. W., et al. (2015). Characterization of cefalexin degradation capabilities of two *Pseudomonas* strains isolated from activated sludge. *J. Hazard. Mater.* 282, 158–164. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.06.080.

- Links, M. G., Dumonceaux, T. J., McCarthy, L., Hemmingsen, S. M., Topp, E., Comte, A., et al. (2018). CaptureSeq: Capture-based enrichment of cpn60 gene fragments empowers pan-Domain profiling of microbial communities without universal PCR. *bioRxiv*, 492116. doi:10.1101/492116.
- Liu, F., Ying, G.-G., Tao, R., Zhao, J.-L., Yang, J.-F., and Zhao, L.-F. (2009). Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution* 157, 1636–1642. doi:10.1016/j.envpol.2008.12.021.
- Liu, S., Wang, J., Pu, S., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., and Razavi, B. S. (2020). Impact of manure on soil biochemical properties: A global synthesis. *Science of The Total Environment* 745, 141003. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141003.
- Long, S., Yang, Y., Pavlostathis, S. G., Xiang, F., Sun, P., Li, N., et al. (2020). Toxicity of tetracycline and its transformation products to a phosphorus removing *Shewanella* strain. *Chemosphere* 246, 125681. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125681.
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., and Knight, R. (2011). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J* 5, 169–172. doi:10.1038/ismej.2010.133.
- Lu, W., Wang, M., Wu, J., Jiang, Q., Jin, J., Jin, Q., et al. (2020). Spread of chloramphenicol and tetracycline resistance genes by plasmid mobilization in agricultural soil. *Environmental Pollution* 260, 113998. doi:10.1016/j.envpol.2020.113998.
- Lungu, O. I., and Dynoodt, R. F. (2008). Acidification From Long-Term Use Of Urea And Its Effect On Selected Soil Properties. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 8, 63–76. doi:10.4314/ajfand.v8i1.19180.
- Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., et al. (2010). Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7220–7225. doi:10.1021/es100233w.
- Lynch, M. D. J., and Neufeld, J. D. (2015). Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat Rev Microbiol* 13, 217–229. doi:10.1038/nrmicro3400.
- Ma, X., Liang, B., Qi, M., Yun, H., Shi, K., Li, Z., et al. (2020). Novel Pathway for Chloramphenicol Catabolism in the Activated Sludge Bacterial Isolate *Sphingobium* sp. CAP-1. *Environ Sci Technol* 54, 7591–7600. doi:10.1021/acs.est.9b07324.
- Mallon, C. A., Le Roux, X., van Doorn, G. S., Dini-Andreote, F., Poly, F., and Salles, J. F. (2018). The impact of failure: unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community away from the invader's niche. *ISME J* 12, 728–741. doi:10.1038/s41396-017-0003-y.
- Malwal, S. R., Sriram, D., Yogeewari, P., and Chakrapani, H. (2012). Synthesis and antimycobacterial activity of prodrugs of sulfur dioxide (SO₂). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 3603–3606. doi:10.1016/j.bmcl.2012.04.048.
- Mansour, I., Heppell, C. M., Ryo, M., and Rillig, M. C. (2018). Application of the microbial community coalescence concept to riverine networks. *Biological Reviews* 93, 1832–1845. doi:10.1111/brv.12422.
- Maréchal, C. L., Druilhe, C., Repérant, E., Boscher, E., Rouxel, S., Roux, S. L., et al. (2019). Evaluation of the occurrence of sporulating and nonsporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants. *MicrobiologyOpen* 8, e872. doi:10.1002/mbo3.872.
- Martín, J., Camacho-Muñoz, M. D., Santos, J. L., Aparicio, I., and Alonso, E. (2012). Distribution and temporal evolution of pharmaceutically active compounds alongside sewage sludge treatment. Risk assessment of sludge application onto soils. *Journal of Environmental Management* 102, 18–25. doi:10.1016/j.jenvman.2012.02.020.

- Martin-Laurent, F., Marti, R., Waglechner, N., Wright, G. D., and Topp, E. (2014). Draft genome sequence of the sulfonamide antibiotic-degrading *Microbacterium* sp. strain C448. *Genome Announc* 2. doi:10.1128/genomeA.01113-13.
- Martin-Laurent, F., Topp, E., Billet, L., Batisson, I., Malandain, C., Besse-Hoggan, P., et al. (2019). Environmental risk assessment of antibiotics in agroecosystems: ecotoxicological effects on aquatic microbial communities and dissemination of antimicrobial resistances and antibiotic biodegradation potential along the soil-water continuum. *Environ Sci Pollut Res* 26, 18930–18937. doi:10.1007/s11356-019-05122-0.
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., et al. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J* 6, 610–618. doi:10.1038/ismej.2011.139.
- McKinney, C. W., Loftin, K. A., Meyer, M. T., Davis, J. G., and Pruden, A. (2010). tet and sul antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6102–6109. doi:10.1021/es9038165.
- Milić, N., Milanović, M., Letić, N. G., Sekulić, M. T., Radonić, J., Mihajlović, I., et al. (2013). Occurrence of antibiotics as emerging contaminant substances in aquatic environment. *Int J Environ Health Res* 23, 296–310. doi:10.1080/09603123.2012.733934.
- Mitchell, S. M., Ullman, J. L., Teel, A. L., and Watts, R. J. (2015). Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin. *Chemosphere* 134, 504–511. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.08.050.
- Mujumdar, P., and Poulsen, S.-A. (2015). Natural Product Primary Sulfonamides and Primary Sulfamates. *J. Nat. Prod.* 78, 1470–1477. doi:10.1021/np501015m.
- Munir, M., and Xagorarakis, I. (2011). Levels of Antibiotic Resistance Genes in Manure, Biosolids, and Fertilized Soil. *Journal of Environmental Quality* 40, 248–255. doi:10.2134/jeq2010.0209.
- Nawrocki, E. P., and Eddy, S. R. (2013). Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics* 29, 2933–2935. doi:10.1093/bioinformatics/btt509.
- Neal, C. W. M., and Anders, A. M. (2015). Suspended sediment supply dominated by bank erosion in a low-gradient agricultural watershed, Wildcat Slough, Fisher, Illinois, United States. *J. Soil Water Conserv.* 70, 145–155. doi:10.2489/jswc.70.3.145.
- Nishiyama, M., Senoo, K., and Matsumoto, S. (1993). gamma-1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexane-assimilating bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* strain SS86, in soil. *Soil biology & biochemistry*. Available at: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302935726> [Accessed July 10, 2020].
- Pandey, P., Chiu, C., Miao, M., Wang, Y., Settles, M., Rio, N. S. del, et al. (2018). 16S rRNA analysis of diversity of manure microbial community in dairy farm environment. *PLOS ONE* 13, e0190126. doi:10.1371/journal.pone.0190126.
- Park, J.-W., Balaraju, K., Kim, J.-W., Lee, S.-W., and Park, K. (2013). Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. *Biological Control* 65, 246–257. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.02.002.
- Pathan, S. I., Arfaioi, P., Taskin, E., Ceccherini, M. T., Puglisi, E., and Pietramellara, G. (2021). The extracellular DNA can baffle the assessment of soil bacterial community, but the effect varies with microscale spatial distribution. *FEMS Microbiology Letters* 368. doi:10.1093/femsle/fnab074.

- Pei, R., Kim, S.-C., Carlson, K. H., and Pruden, A. (2006). Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res.* 40, 2427–2435. doi:10.1016/j.watres.2006.04.017.
- Peng, S., Zhou, B., Wang, Y., Lin, X., Wang, H., and Qiu, C. (2016). Bacteria play a more important role than nutrients in the accumulation of tetracycline resistance in manure-treated soil. Available at: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5233089> [Accessed August 6, 2021].
- Peng, X., Wang, Z., Kuang, W., Tan, J., and Li, K. (2006). A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters of two sewage treatment plants in Guangzhou, China. *Sci. Total Environ.* 371, 314–322. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.07.001.
- Pérez-Valera, E., Kyselková, M., Ahmed, E., Sladeczek, F. X., Goberna, M., and Elhottová, D. (2019). Native soil microorganisms hinder the soil enrichment with antibiotic resistance genes following manure applications. *Scientific Reports* 9. doi:10.1038/s41598-019-42734-5.
- Perry, J., and Wright, G. (2013). The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environment and clinic. *Front. Microbiol.* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00138.
- Pesce, S., Beguet, J., Rouard, N., Devers-Lamrani, M., and Martin-Laurent, F. (2013). Response of a diuron-degrading community to diuron exposure assessed by real-time quantitative PCR monitoring of phenylurea hydrolase A and B encoding genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97. doi:10.1007/s00253-012-4318-3.
- Pesce, S., Ghiglione, J.-F., Topp, E., and Martin-Laurent, F. (2020). Editorial: Microbial Ecotoxicology. *Front. Microbiol.* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01342.
- Phoon, B. L., Ong, C. C., Mohamed Saheed, M. S., Show, P.-L., Chang, J.-S., Ling, T. C., et al. (2020). Conventional and emerging technologies for removal of antibiotics from wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 400, 122961. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122961.
- Pietramellara, G., Ascher-Jenull, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., and Nannipieri, P. (2008). Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Biol Fertil Soils* 45, 219–235. doi:10.1007/s00374-008-0345-8.
- Pinna, M. V., Castaldi, P., Deiana, P., Pusino, A., and Garau, G. (2012). Sorption behavior of sulfamethazine on unamended and manure-amended soils and short-term impact on soil microbial community. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84, 234–242. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.07.006.
- Pouliquen, H., Delepee, R., Thorin, C., Haury, J., Larhantec-Verdier, M., Morvan, M.-L., et al. (2009). Comparison of water, sediment, and plants for the monitoring of antibiotics: A case study on a river dedicated to fish farming. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 496–502. doi:10.1897/08-238.1.
- Pramer, D., and Starkey, R. L. (1951). Decomposition of Streptomycin. *Science* 113, 127. doi:10.1126/science.113.2927.127.
- Price, M. N., Dehal, P. S., and Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLOS ONE* 5, e9490. doi:10.1371/journal.pone.0009490.
- Proia, L., Lupini, G., Osorio, V., Pérez, S., Barceló, D., Schwartz, T., et al. (2013). Response of biofilm bacterial communities to antibiotic pollutants in a Mediterranean river. *Chemosphere* 92, 1126–1135. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.063.
- Pugliese, M., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. (2010). Efficacy of microorganisms selected from compost to control soil-borne pathogens. *Commun Agric Appl Biol Sci* 75, 665–669.

- Ramaswamy, J., Prasher, S. O., Patel, R. M., Hussain, S. A., and Barrington, S. F. (2010). The effect of composting on the degradation of a veterinary pharmaceutical. *Bioresource Technology* 101, 2294–2299. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.089.
- Rani, N. L., and Lalithakumari, D. (1994). Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*. *Can. J. Microbiol.* 40, 1000–1006. doi:10.1139/m94-160.
- Recorbet, G., Steinberg, C., and Faurie, G. (1992). Survival in soil of genetically engineered *Escherichia coli* as related to inoculum density, predation and competition. *FEMS Microbiology Letters* 101, 251–260. doi:10.1111/j.1574-6968.1992.tb05782.x.
- Reichel, R., Michelini, L., Ghisi, R., and Sören, T.-B. (2015). Soil bacterial community response to sulfadiazine in the soil–root zone. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 178. doi:10.1002/jpln.201400352.
- Reis, A. C., Kolvenbach, B. A., Chami, M., Gales, L., Egas, C., Corvini, P. F.-X., et al. (2019). Comparative genomics reveals a novel genetic organization of the sad cluster in the sulfonamide-degrader ‘*Candidatus Leucobacter sulfamidivorax*’ strain GP. *BMC Genomics* 20, 885. doi:10.1186/s12864-019-6206-z.
- Reis, P., Reis, A., Ricken, B., Kolvenbach, B., Manaia, C., Corvini, P., et al. (2014). Biodegradation of sulfamethoxazole and other sulfonamides by *Achromobacter denitrificans* PR1. *Journal of Hazardous Materials* 280. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.08.039.
- Ren, J., Wang, Z., Deng, L., Niu, D., Fan, B., Huhe, T., et al. (2021). Biodegradation of erythromycin by *Delftia lacustris* RJJ-61 and characterization of its erythromycin esterase. *Journal of Basic Microbiology* 61, 55–62. doi:10.1002/jobm.202000613.
- Ricken, B., Kolvenbach, B. A., Bergesch, C., Benndorf, D., Kroll, K., Strnad, H., et al. (2017). FMNH2-dependent monooxygenases initiate catabolism of sulfonamides in *Microbacterium* sp. strain BR1 subsisting on sulfonamide antibiotics. *Sci Rep* 7, 15783. doi:10.1038/s41598-017-16132-8.
- Rillig, M. C., Antonovics, J., Caruso, T., Lehmann, A., Powell, J. R., Veresoglou, S. D., et al. (2015). Interchange of entire communities: microbial community coalescence. *Trends Ecol Evol* 30, 470–476. doi:10.1016/j.tree.2015.06.004.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., et al. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 447, 345–360. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.
- Rocca, J. D., Simonin, M., Wright, J. P., Washburne, A., and Bernhardt, E. (2019). Rare Microbial Taxa Emerge When Communities Collide: Freshwater and Marine Microbiome Responses to Experimental Seawater Intrusion. *bioRxiv*, 550756. doi:10.1101/550756.
- Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Varela Della Giustina, S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., et al. (2020). Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environ Int* 140, 105733. doi:10.1016/j.envint.2020.105733.
- Rodríguez-Verdugo, A., Gaut, B. S., and Tenaillon, O. (2013). Evolution of *Escherichia coli* rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress. *BMC Evolutionary Biology* 13, 50. doi:10.1186/1471-2148-13-50.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. doi:10.7717/peerj.2584.
- Romdhane, S., Spor, A., Aubert, J., Bru, D., Breuil, M.-C., Hallin, S., et al. (2021). Unraveling negative biotic interactions determining soil microbial community assembly and functioning. *ISME J*, 1–11. doi:10.1038/s41396-021-01076-9.

- Rousseaux, S., Hartmann, A., and Soulas, G. (2001). Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 211–222. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00842.x.
- Sabri, N. A., Schmitt, H., Van der Zaan, B., Gerritsen, H. W., Zuidema, T., Rijnaarts, H. H. M., et al. (2020). Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8, 102245. doi:10.1016/j.jece.2018.03.004.
- Sánchez-Marañón, M., Miralles, I., Aguirre-Garrido, J. F., Anguita-Maeso, M., Millán, V., Ortega, R., et al. (2017). Changes in the soil bacterial community along a pedogenic gradient. *Sci Rep* 7, 14593. doi:10.1038/s41598-017-15133-x.
- Sánchez-Osuna, M., Cortés, P., Barbé, J., and Erill, I. (2019). Origin of the Mobile Di-Hydro-Pterate Synthase Gene Determining Sulfonamide Resistance in Clinical Isolates. *Front. Microbiol.* 0. doi:10.3389/fmicb.2018.03332.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., and Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–759. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
- Sarmiento-Vizcaíno, A., Espadas, J., Martín, J., Braña, A. F., Reyes, F., García, L. A., et al. (2018). Atmospheric Precipitations, Hailstone and Rainwater, as a Novel Source of Streptomyces Producing Bioactive Natural Products. *Front Microbiol* 9, 773. doi:10.3389/fmicb.2018.00773.
- Schmitt, H., Haapakangas, H., and van Beelen, P. (2005). Effects of antibiotics on soil microorganisms: time and nutrients influence pollution-induced community tolerance. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1882–1892. doi:10.1016/j.soilbio.2005.02.022.
- Schmitt, H., van Beelen, P., Tolls, J., and van Leeuwen, C. L. (2004). Pollution-induced community tolerance of soil microbial communities caused by the antibiotic sulfachloropyridazine. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1148–1153. doi:10.1021/es034685p.
- Seiler, C., and Berendonk, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* 0. doi:10.3389/fmicb.2012.00399.
- Semenov, A. V., van Overbeek, L., Termorshuizen, A. J., and van Bruggen, A. H. C. (2011). Influence of aerobic and anaerobic conditions on survival of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica serovar Typhimurium in Luria–Bertani broth, farm-yard manure and slurry. *Journal of Environmental Management* 92, 780–787. doi:10.1016/j.jenvman.2010.10.031.
- Semenov, M. V., Krasnov, G. S., Semenov, V. M., Ksenofontova, N., Zinyakova, N. B., and van Bruggen, A. H. C. (2021). Does fresh farmyard manure introduce surviving microbes into soil or activate soil-borne microbiota? *Journal of Environmental Management* 294, 113018. doi:10.1016/j.jenvman.2021.113018.
- Shah, S. S. A., Rivera, G., and Ashfaq, M. (2013). Recent advances in medicinal chemistry of sulfonamides. Rational design as anti-tumoral, anti-bacterial and anti-inflammatory agents. *Mini Rev Med Chem* 13, 70–86.
- Shan, J., Yang, P., Rahman, M. M., Shang, X., and Yan, X. (2018). Tetracycline and sulfamethazine alter dissimilatory nitrate reduction processes and increase N₂O release in rice fields. *Environmental Pollution* 242, 788–796. doi:10.1016/j.envpol.2018.07.061.
- Shao, S., Hu, Y., Cheng, C., Cheng, J., and Chen, Y. (2018). Simultaneous degradation of tetracycline and denitrification by a novel bacterium, Klebsiella sp SQY5. *Chemosphere* 209, 35–43. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.093.

- Sharma, B., Dangi, A. K., and Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *Journal of Environmental Management* 210, 10–22. doi:10.1016/j.jenvman.2017.12.075.
- Shen, G., Zhang, Y., Hu, S., Zhang, H., Yuan, Z., and Zhang, W. (2018). Adsorption and degradation of sulfadiazine and sulfamethoxazole in an agricultural soil system under an anaerobic condition: Kinetics and environmental risks. *Chemosphere* 194, 266–274. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.11.175.
- Shi, Y., Lin, H., Ma, J., Zhu, R., Sun, W., Lin, X., et al. (2020). Degradation of tetracycline antibiotics by *Arthrobacter nicotianae* OTC-16. *Journal of Hazardous Materials* 403. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123996.
- Shun-Mei, E., Zeng, J.-M., Yuan, H., Lu, Y., Cai, R.-X., and Chen, C. (2018). Sub-inhibitory concentrations of fluoroquinolones increase conjugation frequency. *Microbial Pathogenesis* 114, 57–62. doi:10.1016/j.micpath.2017.11.036.
- Silva, V., Correia, S., Pereira, J. E., Igrejas, G., and Poeta, P. (2020). “Surveillance and Environmental Risk Assessment of Antibiotics and AMR/ARGs Related with MRSA: One Health Perspective,” in *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes: Environmental Occurrence and Treatment Technologies* Emerging Contaminants and Associated Treatment Technologies., ed. M. Z. Hashmi (Cham: Springer International Publishing), 271–295. doi:10.1007/978-3-030-40422-2_13.
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat* 3, 155–160. doi:10.1054/drup.2000.0146.
- Smith, A. L., Erwin, A. L., Kline, T., Unrath, W. C. T., Nelson, K., Weber, A., et al. (2007). Chloramphenicol is a substrate for a novel nitroreductase pathway in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2820–2829. doi:10.1128/AAC.00087-07.
- Spencer, S. J., Tamminen, M. V., Preheim, S. P., Guo, M. T., Briggs, A. W., Brito, I. L., et al. (2016). Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. *ISME J* 10, 427–436. doi:10.1038/ismej.2015.124.
- Spor, A., Camargo, A. R. O., Bru, D., Gaba, S., Garmyn, D., Gal, L., et al. (2020). Habitat disturbances modulate the barrier effect of resident soil microbiota on *Listeria monocytogenes* invasion success. *Front. Microbiol.* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.00927.
- Stenuit, B., and Agathos, S. N. (2015). Deciphering microbial community robustness through synthetic ecology and molecular systems synecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 305–317. doi:10.1016/j.copbio.2015.03.012.
- Stoll, C., Sidhu, J. P. S., Tiehm, A., and Toze, S. (2012). Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9716–9726. doi:10.1021/es302020s.
- Suleiman, A. K. A., Gonzatto, R., Aita, C., Lupatini, M., Jacques, R. J. S., Kuramae, E. E., et al. (2016). Temporal variability of soil microbial communities after application of dicyandiamide-treated swine slurry and mineral fertilizers. *Soil Biology and Biochemistry* 97, 71–82. doi:10.1016/j.soilbio.2016.03.002.
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., and Nishijima, M. (2014). Development of a Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0105592.
- Tappe, W., Herbst, M., Hofmann, D., Koepfchen, S., Kummer, S., Thiele, B., et al. (2013). Degradation of sulfadiazine by *Microbacterium lacus* strain SDZm4, isolated from lysimeters previously manured with slurry from sulfadiazine-medicated pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2572–2577. doi:10.1128/AEM.03636-12.

- Tardy, V., Bonnineau, C., Bouchez, A., Miège, C., Masson, M., Jeannin, P., et al. (2021). A pilot experiment to assess the efficiency of pharmaceutical plant wastewater treatment and the decreasing effluent toxicity to periphytic biofilms. *Journal of Hazardous Materials* 411, 125121. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.125121.
- Teillant, A., Brower, C. H., and Laxminarayan, R. (2015). Economics of Antibiotic Growth Promoters in Livestock. *Annual Review of Resource Economics* 7, 349–374. doi:10.1146/annurev-resource-100814-125015.
- Thai, P. K., Ky, L. X., Binh, V. N., Nhung, P. H., Nhan, P. T., Hieu, N. Q., et al. (2018). Occurrence of antibiotic residues and antibiotic-resistant bacteria in effluents of pharmaceutical manufacturers and other sources around Hanoi, Vietnam. *Science of The Total Environment* 645, 393–400. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.126.
- Thiele-Bruhn, S., and Peters, D. (2007). Photodegradation of pharmaceutical antibiotics on slurry and soil surfaces. *Landbauforsch. Volk* 57, 13–23.
- Topp, E., Chapman, R., Devers-Lamrani, M., Hartmann, A., Marti, R., Martin-Laurent, F., et al. (2013). Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure, and isolation of a sulfamethazine-degrading sp. *J. Environ. Qual.* 42, 173–178. doi:10.2134/jeq2012.0162.
- Unc, A., and Goss, M. J. (2004). Transport of bacteria from manure and protection of water resources. *Applied Soil Ecology* 25, 1–18. doi:10.1016/j.apsoil.2003.08.007.
- Valdés, M. E., Santos, L. H. M. L. M., Rodríguez Castro, M. C., Giorgi, A., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., et al. (2021). Distribution of antibiotics in water, sediments and biofilm in an urban river (Córdoba, Argentina, LA). *Environmental Pollution* 269, 116133. doi:10.1016/j.envpol.2020.116133.
- van Veen, J. A., van Overbeek, L. S., and van Elsas, J. D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 121–135.
- Wakano, J. Y., Nowak, M. A., and Hauert, C. (2009). Spatial dynamics of ecological public goods. *PNAS* 106, 7910–7914. doi:10.1073/pnas.0812644106.
- Walsh, F., Amyes, S. G. B., and Duffy, B. (2013). Challenging the concept of bacteria subsisting on antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents* 41, 558–563. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.01.021.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA Sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267. doi:10.1128/AEM.00062-07.
- Wang, P., Liu, H., Fu, H., Cheng, X., Wang, B., Cheng, Q., et al. (2014). Characterization and mechanism analysis of penicillin G biodegradation with *Klebsiella pneumoniae* Z1 isolated from Waste penicillin bacterial residue. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 27. doi:10.1016/j.jiec.2014.12.018.
- Wang, M., Cai, C., Zhang, B., and Liu, H. (2018). Characterization and mechanism analysis of lincomycin biodegradation with *Clostridium* sp. strain LCM-B isolated from lincomycin mycelial residue (LMR). *Chemosphere* 193, 611–617. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.11.055.
- Watanabe, K., Kodama, Y., and Harayama, S. (2001). Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J. Microbiol. Methods* 44, 253–262. doi:10.1016/s0167-7012(01)00220-2.
- Watkinson, A., Murby, E. J., and Costanzo, S. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water research* 41, 4164–76. doi:10.1016/j.watres.2007.04.005.

- Wei, R., He, T., Zhang, S., Zhu, L., Shang, B., Li, Z., et al. (2019). Occurrence of seventeen veterinary antibiotics and resistant bacterias in manure-fertilized vegetable farm soil in four provinces of China. *Chemosphere* 215, 234–240. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.152.
- Wei, Z., Feng, K., Li, S., Zhang, Y., Chen, H., Yin, H., et al. (2018). Exploring abundance, diversity and variation of a widespread antibiotic resistance gene in wastewater treatment plants. *Environment International* 117, 186–195. doi:10.1016/j.envint.2018.05.009.
- Wicke, C., Hüners, M., Wray, V., Nimtz, M., Bilitewski, U., and Lang, S. (2000). Production and structure elucidation of glycoglycerolipids from a marine sponge-associated microbacterium species. *J Nat Prod* 63, 621–626. doi:10.1021/np990313b.
- Wise, E. M., and Abou-Donia, M. M. (1975). Sulfonamide resistance mechanism in *Escherichia coli*: R plasmids can determine sulfonamide-resistant dihydropteroate synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2621–2625. doi:10.1073/pnas.72.7.2621.
- Woappi, Y., Gabani, P., Singh, A., and Singh, O. V. (2016). Antibiotrophs: The complexity of antibiotic-subsisting and antibiotic-resistant microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 17–30. doi:10.3109/1040841X.2013.875982.
- Wongsaroj, L., Chanabun, R., Tunsakul, N., Prombutara, P., Panha, S., and Somboonna, N. (2021). First reported quantitative microbiota in different livestock manures used as organic fertilizers in the Northeast of Thailand. *Sci Rep* 11, 102. doi:10.1038/s41598-020-80543-3.
- Xin, Z., Fengwei, T., Gang, W., Xiaoming, L., Qiuxiang, Z., Hao, Z., et al. (2012). Isolation, identification and characterization of human intestinal bacteria with the ability to utilize chloramphenicol as the sole source of carbon and energy. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 703–712. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01440.x.
- Xu, H., Chen, Z., Wu, X., Zhao, L., Wang, N., Mao, D., et al. (2021). Antibiotic contamination amplifies the impact of foreign antibiotic-resistant bacteria on soil bacterial community. *Science of The Total Environment* 758, 143693. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143693.
- Yun, M.-K., Wu, Y., Li, Z., Zhao, Y., Waddell, M. B., Ferreira, A. M., et al. (2012). Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase. *Science* 335, 1110–1114. doi:10.1126/science.1214641.
- Zeng, X., Ardeshtna, D., and Lin, J. (2015). Heat Shock-Enhanced Conjugation Efficiency in Standard *Campylobacter jejuni* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 4546–4552. doi:10.1128/AEM.00346-15.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* 30, 614–620. doi:10.1093/bioinformatics/btt593.
- Zhang, M., He, L.-Y., Liu, Y.-S., Zhao, J.-L., Liu, W.-R., Zhang, J.-N., et al. (2019). Fate of veterinary antibiotics during animal manure composting. *Science of The Total Environment* 650, 1363–1370. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.147.
- Zhang, Q., and Dick, W. A. (2014). Growth of soil bacteria, on penicillin and neomycin, not previously exposed to these antibiotics. *Sci Total Environ* 493, 445–453. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.114.
- Zhang, Y., Marrs, C. F., Simon, C., and Xi, C. (2009). Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Sci. Total Environ.* 407, 3702–3706. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.02.013.
- Zhang, W., Qiu, L., Gong, A., and Yuan, X. (2017). Isolation and characterization of a high-efficiency erythromycin A-degrading *Ochrobactrum* sp. strain. *Marine Pollution Bulletin* 114, 896–902. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.10.076.

Zrimec, J. (2020). Multiple plasmid origin-of-transfer regions might aid the spread of antimicrobial resistance to human pathogens. *MicrobiologyOpen* 9, e1129. doi:<https://doi.org/10.1002/mbo3.1129>.

ANNEXE A

Figures et tables supplémentaires

Table 1.S1 - GPS coordinates and physical-chemical properties of the four different soils used in the study.

		Soil A	Soil B	Soil C	Soil D
GPS COORDINATES					
Latitude	-	47.239562	47.239506	47.231351	46.960258
Longitude	-	5.415079	5.416419	5.104477	5.483326
PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES					
Clay	‰	84	215	360	146
Fine silt	‰	37	111	338	332
Coarse silt	‰	32	52	238	166
Fine sand	‰	117	147	37	64
Coarse sand	‰	731	474	28	292
pH	-	5.6	6.1	6.9	6.1
Total carbonates	‰	0	0	0	0
Total organic carbon	‰	5.2	9.9	13	10.4
Organic matter	‰	9	17.1	22.4	18
Total nitrogen	‰	0.54	1.15	1.37	1.26
C/N ratio	-	9.6	8.6	9.5	8.2
Metson CEC	Me/kg	41	112	165	79
Water content at pF 2.7	%	6.8	14	21.4	18.3
Water content at saturation	%	28.5	37.1	39.1	40.8
SMZ concentration	µg/kg	0.63	0.43	< 0.08	< 0.08

Figure 1.S1 - Experimental design of soil microcosm experiment with ^{12}C -SMZ or ^{14}C -SMZ, consisting of amendment or not with manure, treatment.

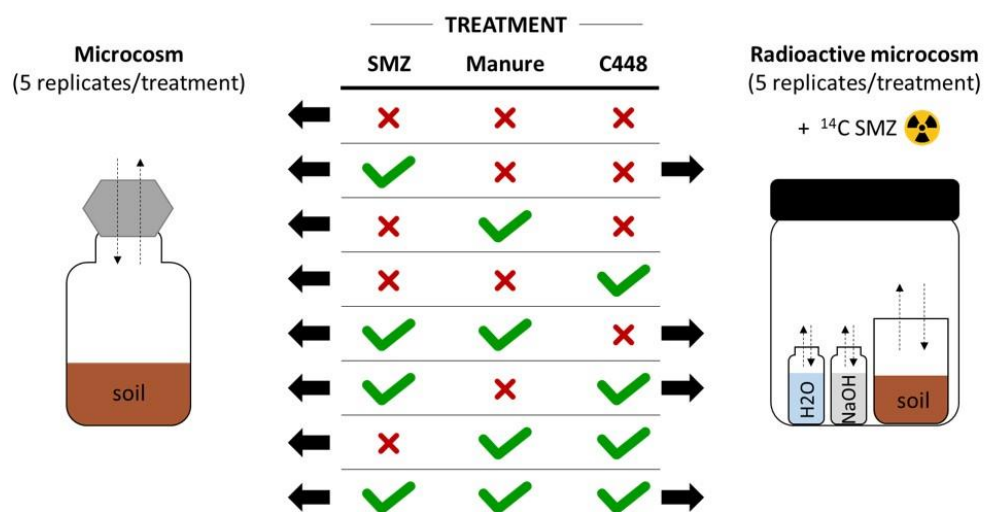


Table 1.S2 - Primers and probe used in this study.

Target	Primer name	Primer sequence	References
<i>sadA</i>	sadA_F	CCG-GTA-CGG-ATG-ATG-ACT-CT	This study
	sadA_R	GGG-ACC-ATA-GGC-GTG-AGA-TA	
<i>groL</i>	D0321	ACC-ATT-GGT-GAC-CTG-ATC	Links <i>et al.</i> , 2018
	D0322	CCT-TGT-CGA-AAC-GCA-TAC	
	C448_Probe	AAC-ACG-TTC-GGC-ACC-GAG-CT	
<i>rrs</i> (qPCR)	341_F	CCT-ACG-GGA-GGC-AGC-AG	Watanabe <i>et al.</i> , 2001
	534_R	ATT-ACC-GCG-GCT-GCT-GGC-A	
<i>rrs</i> (sequencing)	Pro341	CCT-ACG-GGN-BGC-ASC-AG	Takahashi <i>et al.</i> , 2014
	Pro805R	GAC-TAC-NVG-GGT-ATC-TAA-TCC	
	adapter	Read1: TCG-TCG-GCA-GCG-TCA-GAT-GTG-TAT-AAG-AGA-CAG Read2: GTC-TCG-TGG-GCT-CGG-AGA-TGT-GTA-TAA-GAG-ACA-G	

Table 1.S3 - Mass balances of ¹⁴C-radioactivity in the four different soils treated with SMZ, amended or not with manure, and inoculated or not with Microbacterium sp. C448 (C448) obtained at the end of the month of incubation. Between 75% and 100% of the initially added radioactivity was retrieved.

Results are expressed in percent of ¹⁴C-SMZ initially retrieved.

		Non-extractable SMZ (%)	Extractable SMZ (%)	Mineralized SMZ (%)
Soil A	SMZ	59.4 ± 1.2	40.4 ± 1.2	0.2 ± 0.01
	SMZ x C448	56.8 ± 1.4	43.0 ± 1.4	0.2 ± 0.03
	SMZ x MANURE	56.7 ± 1.5	43.1 ± 1.5	0.2 ± 0.02
	SMZ x C448 x MANURE	56.8 ± 1.5	22.7 ± 0.9	20.5 ± 1.4
Soil B	SMZ	81.9 ± 3.2	15.9 ± 3.7	2.2 ± 0.5
	SMZ x C448	81.0 ± 0.5	16.2 ± 0.5	2.8 ± 0.1
	SMZ x MANURE	83.0 ± 0.4	14.9 ± 0.4	2.1 ± 0.2
	SMZ x C448 x MANURE	73.7 ± 1.8	9,6 ± 1.2	16.7 ± 0.7
Soil C	SMZ	92.8 ± 0.4	3.7 ± 0.2	3.4 ± 0.3
	SMZ x C448	89.2 ± 0.3	3.4 ± 0.3	7.3 ± 0.4
	SMZ x MANURE	92.7 ± 0.4	4.4 ± 0.3	2.9 ± 0.2
	SMZ x C448 x MANURE	81.4 ± 0.8	3.4 ± 0.4	15.2 ± 0,4
Soil D	SMZ	87.9 ± 0.4	9.6 ± 0,4	2.5 ± 0.1
	SMZ x C448	87.5 ± 0.3	9.6 ± 0.3	2.9 ± 0.1
	SMZ x MANURE	88.0 ± 0.3	10.1 ± 0.3	1.8 ± 0.1
	SMZ x C448 x MANURE	86.6 ± 0.4	9.0 ± 0.4	4.5 ± 0.5

Table 1.S4 - Alpha diversity indices of the four different soils amended or not with manure, treated or not with SMZ and inoculated or not with *Microbacterium sp. C448* (C448).

	Treatment		PD whole tree	Equitability	Observed species	Seqs/Sample
Soil A	Manure	C448	SMZ	211 ± 4	0.824 ± 0.002	3338 ± 42
			Ø SMZ	192 ± 6	0.812 ± 0.01	3100 ± 115
	Ø C448	SMZ	205 ± 6	0.806 ± 0.015	3224 ± 59	
		Ø SMZ	198 ± 2	0.819 ± 0.002	3156 ± 32	
	Ø Manure	C448	SMZ	195 ± 5	0.83 ± 0.002	3224 ± 56
			Ø SMZ	189 ± 4	0.822 ± 0.001	3042 ± 21
	Ø C448	SMZ	192 ± 3	0.826 ± 0.001	3158 ± 31	
		Ø SMZ	189 ± 3	0.824 ± 0.003	3093 ± 36	
Soil B	Manure	C448	SMZ	197 ± 4	0.788 ± 0.005	3117 ± 39
			Ø SMZ	197 ± 8	0.799 ± 0.01	3145 ± 92
	Ø C448	SMZ	198 ± 5	0.798 ± 0.006	3162 ± 54	
		Ø SMZ	200 ± 5	0.798 ± 0.008	3209 ± 74	
	Ø Manure	C448	SMZ	184 ± 3	0.792 ± 0.004	3033 ± 39
			Ø SMZ	189 ± 6	0.798 ± 0.01	3095 ± 85
	Ø C448	SMZ	189 ± 6	0.8 ± 0.007	3090 ± 62	
		Ø SMZ	191 ± 5	0.789 ± 0.01	3144 ± 86	
Soil C	Manure	C448	SMZ	196 ± 1	0.819 ± 0.003	3132 ± 19
			Ø SMZ	190 ± 3	0.82 ± 0.004	3056 ± 48
	Ø C448	SMZ	191 ± 3	0.812 ± 0.012	2992 ± 81	
		Ø SMZ	193 ± 5	0.814 ± 0.006	3083 ± 66	
	Ø Manure	C448	SMZ	182 ± 5	0.809 ± 0.007	2938 ± 46
			Ø SMZ	177 ± 4	0.814 ± 0.006	2933 ± 75
	Ø C448	SMZ	179 ± 4	0.815 ± 0.004	2960 ± 55	
		Ø SMZ	178 ± 3	0.815 ± 0.003	2967 ± 24	
Soil D	Manure	C448	SMZ	241 ± 3	0.858 ± 0.003	3933 ± 30
			Ø SMZ	237 ± 5	0.852 ± 0.003	3830 ± 62
	Ø C448	SMZ	238 ± 2	0.853 ± 0.005	3857 ± 35	
		Ø SMZ	242 ± 3	0.854 ± 0.003	3887 ± 35	
	Ø Manure	C448	SMZ	235 ± 3	0.858 ± 0.003	3866 ± 39
			Ø SMZ	238 ± 4	0.856 ± 0.003	3885 ± 81
	Ø C448	SMZ	233 ± 2	0.852 ± 0.006	3812 ± 32	
		Ø SMZ	239 ± 3	0.858 ± 0.003	3870 ± 33	

Table 1.S5 - Initial abundance and phylogeny (phylum, class, order) of the seven OTUs highly likely to come from manure in the four soils and in the manure.

	Abundance					Phylogeny		
	Soil A	Soil B	Soil C	Soil D	Manure	Phylum	Class	Order
OTU1	0.4 ± 0.5	1.4 ± 1.7	14 ± 23	120 ± 75	299 ± 55	Firmicutes	Bacilli	Turicibacterales
OTU2	0.2 ± 0.3	5.2 ± 4.3	102 ± 163	514 ± 196	702 ± 146	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales
OTU3	4 ± 1.2	7.6 ± 4.7	38 ± 58	218 ± 78	328 ± 62	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales
OTU4	2.2 ± 0.6	1.8 ± 1	20 ± 31	90 ± 39	165 ± 36	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales
OTU5	6 ± 2.8	7.2 ± 1.8	29 ± 47	122 ± 41	128 ± 25	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales
OTU6	0.2 ± 0.3	6.4 ± 9.4	0.2 ± 0.3	670 ± 1071	2531 ± 253	Proteobacteria	γ-Proteobacteria	Pseudomonadales
OTU7	0.4 ± 0.5	3 ± 4.4	0.2 ± 0.3	440 ± 704	1577 ± 120	Proteobacteria	γ-Proteobacteria	Pseudomonadales

Figure 2.S1 - Comparison of the bacterial diversity in the four soils (A, B, C and D) amended or not with manure and exposed or not to SMZ. Principal coordinates analysis (PCoA) of the weighted Unifrac distance matrices of 16S rDNA amplicon sequences showing changes in bacterial community structure. The first two axes and the percent of variation explained by each are indicated. Significant effects of amendment of manure and exposure to SMZ are represented by ellipse ($P < 0.001$).

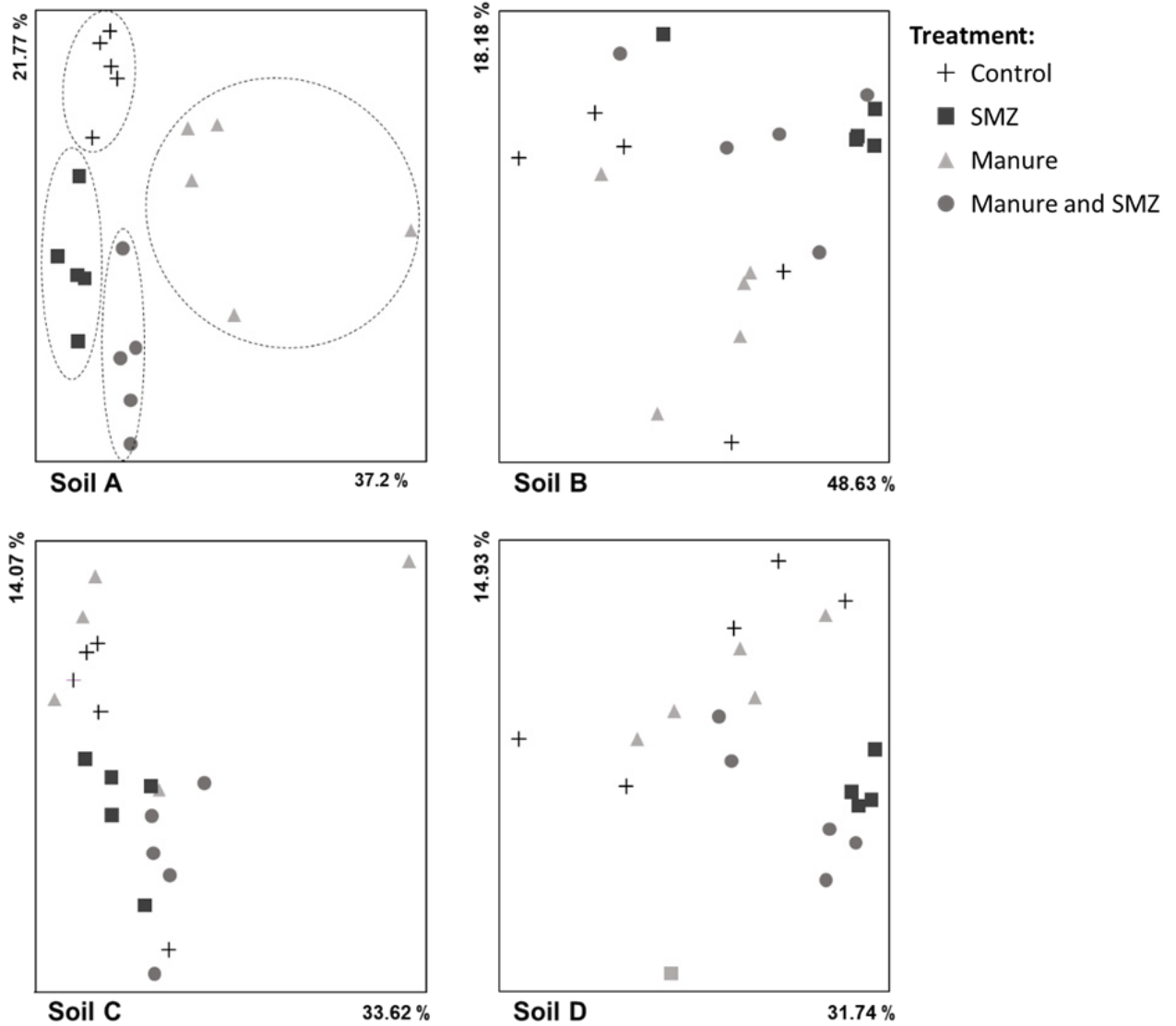


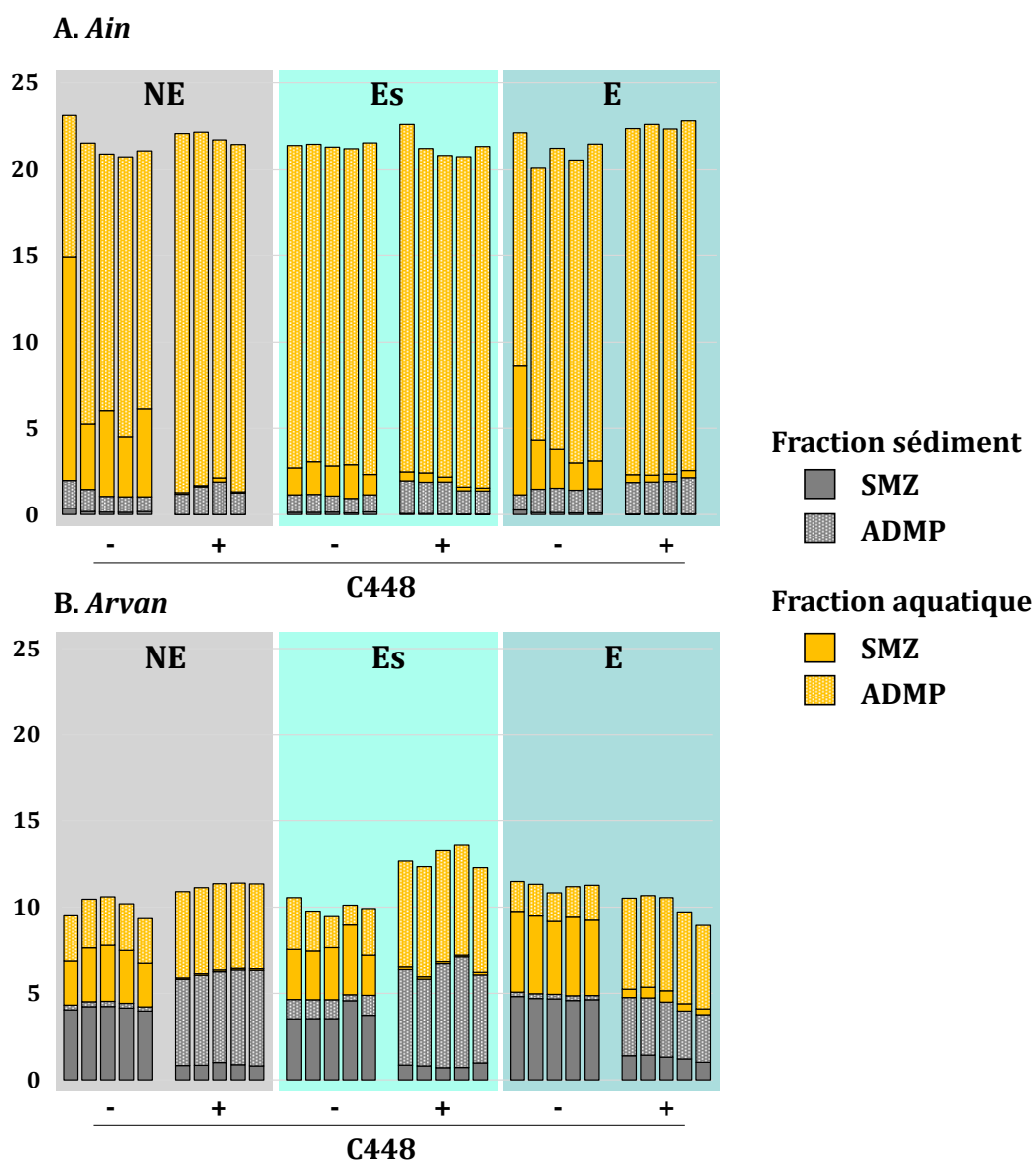
Table 2.S1 - Phylogeny and relative abundance of the 10 OTUs that were significantly increased in several soils amended with manure (expressed per 10 000 OTUs counted).

Rank in manure	Soil impacted	Relative abundance (per 10 000 OTU)				Phylogeny		
		Soil A	Soil B	Soil C	Soil D	phylum	class	order
8	A/C	BDL	BDL	BDL	0.1 ± 0.1	Proteobacteria	ε	Campylobacterales
15	A/C	0.1 ± 0.1	BDL	BDL	0.3 ± 0.2	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales
3	A/B/C	BDL	0.1 ± 0.1	BDL	0.3 ± 0.4		ε	Campylobacterales
2	A/B/C	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	BDL	0.5 ± 0.4	Proteobacteria	γ	Pseudomonadales
1	A/B/C/D	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	BDL	0.9 ± 0.6			
17	A/B/C	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.3	29.6 ± 4.2		Bacilli	Turicibacterales
28	A/B/C	1.3 ± 0.5	0.3 ± 0.2	0.8 ± 0.9	39.4 ± 7.9			
33	A/B/C	5.0 ± 1.3	1.1 ± 0.6	1.1 ± 1.4	60.0 ± 6.7	Firmicutes		
13	A/B/C	2.2 ± 1.0	2.7 ± 0.8	2.6 ± 2.6	87.9 ± 13.3		Clostridia	Clostridiales
6	A/B/C	1.3 ± 0.6	0.3 ± 0.2	3.7 ± 5.4	211.5 ± 23.2			

Table 3.S1 – Test de recouvrement de la sulfaméthazine (SMZ) et de l'ADMP dans les matrices après 3 heures de contact selon des concentrations croissantes. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de substance ajoutée.

	5 μM		10 μM		25 μM	
	SMZ	ADMP	SMZ	ADMP	SMZ	ADMP
Arvan	35,2	92,9	41,3	92,5	59,8	91,1
Ain	88,7	103,4	89,7	90,9	88,7	96,9
Arvan + Argile	49,5	94,5	46,1	97,9	79,7	90,3

Figure 3.S1 - **Bilan de masse de la sulfaméthazine par condition au terme du mois d'incubation pour les 5 répétitions.** La quantité de sulfaméthazine et de l'ADMP sont indiquées suivant le compartiment où elles ont été trouvées. La modalité d'inoculation par la souche *Microbacterium* sp. C448 (C448) est indiquée en abscisse (« - » = non inoculé, « + » = inoculé). La modalité d'érosion est indiquée par le code couleur en arrière plan et les mentions NE, Es et E pour respectivement « sans érosion », « avec érosion de sol stérile » et « érosion de sol non stérile ».



ANNEXE B

Article publié en 2019 dans le journal « *Environmental Science and Pollution Research* » (DOI : 26:18930–18937) pour présenter le contexte du projet ANR ANTIBIOTOX dans lequel s’inscrit ces travaux de thèse.

Environmental risk assessment of antibiotics in agroecosystems: ecotoxicological effects on aquatic microbial communities and dissemination of antimicrobial resistances and antibiotic biodegradation potential along the soil-water continuum

Fabrice Martin-Laurent¹, Edward Topp², Loren Billet¹, Isabelle Batisson³, Cédric Malandain⁴, Pascale Besse-Hoggan⁵, Soizic Morin⁶, Joan Artigas³, Chloé Bonnineau⁷, Laura Kergoat⁷, Marion Devers-Lamrani¹, Stéphane Pesce⁷

¹*AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, Agroécologie, F-21000 Dijon, France*

²*Agriculture and Agri-Food Canada, University of Western Ontario, London, ON N5V 4T3, Canada*

³*CNRS, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, Université Clermont Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

⁴*ENOVEO, F-69000 Lyon, France*

⁵*CNRS, Sigma Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Clermont Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

⁶*Irstea, UR EABX, F-33610 Cestas, France*

⁷*Irstea, UR RiverLy, F-69100 Lyon-Villeurbanne, France*

Keywords: Antibiotics, Resistance gene, Bacteria, Biodegradation

ABSTRACT

Antibiotics have a wide application range in human and veterinary medicines. Being designed for pharmacological stability, most antibiotics are recalcitrant to biodegradation after ingestion and

can be persistent in the environment. Antibiotic residues have been detected as contaminants in various environmental compartments where they cause human and environmental threats, notably with respect to the potential emergence and proliferation of antibiotic-resistant bacteria. An important component of managing environmental risk caused by antibiotics is to understand exposure of soil and water resources to their residues. One challenge is to gain knowledge on the fate of antibiotics in the ecosystem along the soil-water continuum, and on the collateral impact of antibiotics on environmental microorganisms responsible for crucially important ecosystem functions. In this context, the ANTIBIOTOX project aims at studying the environmental fate and impact of two antibiotics of the sulfonamide class of antibiotics, sulfamethazine (SMZ), and sulfamethoxazole (SMX).

Environmental risks of antibiotics in agroecosystems

Antibiotics (antimicrobials used to kill bacteria) are widely used in human medicine and in many terrestrial and aquatic food animal production systems. Numerous antibiotics are recalcitrant to degradation following ingestion and are excreted intact. Therefore, some antibiotics are widely detected in terrestrial and aquatic matrices (Bottoni and Caroli 2015). In agroecosystems, antibiotic residues can be transported from livestock production areas or from agricultural soils amended with antibiotic-contaminated manure by surface runoff or infiltration, contaminating adjacent surface- and groundwater resources (Boxall 2004). Once released in the environment, antibiotics may exert a selection pressure favoring the emergence of bacteria harboring antimicrobial resistances (AMR) even at low environmentally relevant concentrations (Gullberg *et al.* 2011). Indeed, the development of antibiotic-resistant bacteria near confined animal feed operations (Chee-Sanford *et al.* 2001; Koike *et al.* 2007; Sapkota *et al.* 2007), in soils treated with animal manures or in waste water treatment plants (Gao *et al.* 2012), suggests that exposure to antibiotics can lead to the increase in abundance of resistance genes in the environment (Heuer *et al.* 2011; Storteboom *et al.* 2010).

The World Health Organization has identified the increasing occurrence of AMR in human pathogens as one of the most pressing contemporary global public health challenges. Due to the risks for subsequent transfers of resistance factors to human pathogens, an increasing reservoir of AMR bacteria in the environment is of human health concern (Ashbolt *et al.* 2013; Bengtsson-Palme *et al.* 2018). Promoting the “One Health” concept, the United Nations and the European Commission highlighted the need to develop approaches to better assess the risk for resistance selection in natural microbial communities (Bengtsson-Palme and Larsson 2016). In June 2017, the European Commission adopted the new EU One Health Action Plan against AMR and the French Ministry of Agriculture launched the new EcoAntibio national plan (2017–2021) with the

objective of mitigating the risk of AMR development. Managing the environmental risk of AMR is predicated on understanding the exposure of soil and water resources to antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes (Blanco *et al.* 2009; Knapp *et al.* 2010; Pruden *et al.* 2013). There is thus a need to identify environmental conditions that govern the fate of antibiotics in agroecosystems including transfers along the soil-water continuum, as well as dissipation (e.g., through biodegradation) and persistence (e.g., through retention due to sorptive processes) in the different environmental compartments (Larsson *et al.* 2018). Up to now, the major concern about antibiotics was associated with the development and dissemination of resistance mechanisms by bacteria (Heuer *et al.* 2011) and the implications of this process for both human and animal health, their sustained release to different environmental compartments and their bioactive properties also raise serious issues about their impact on non-target organisms (González-Pleiter *et al.* 2013). Briefly, and as recently underlined by Barra Caracciolo *et al.* (2015) and Brandt *et al.* (2015), much more knowledge concerning environmental emissions of antibiotics, their persistence, degradation pathways, and impacts on ecosystem health is required. Environmental risk assessments should consider terrestrial and aquatic microbial communities that undertake the main ecosystem functions and services including the biodegradation of contaminants (Ghiglione *et al.* 2016).

The case of sulfonamides

Among the antibiotics, the sulfonamides (SMs), one the oldest family on the market, are often detected in aquatic and terrestrial matrices (Baran *et al.* 2006; Manzetti and Ghisi 2014; Deng *et al.* 2018) because of the large volume used, high excretion rates, and relative persistence in soil (Brandt *et al.* 2009). In a pioneering study, Kolpin *et al.* (2002) reported the detection of SMs in 80% of the 139 streams and rivers sampled in 1999 and 2000 across 30 states in the USA. Since then, SMs are frequently detected in the environment (Hruska and Franek 2012) including rural streams and rivers surrounding livestock production (Kolpin *et al.* 2002; Veach and Bernot 2011; Bernot *et al.* 2013; Iglesias *et al.* 2014). It is noteworthy that sulfamethoxazole (SMX; used primarily in human medicine) and sulfamethazine (SMZ; used primarily in food animal production) are among the most often SM residues detected in various contamination sources (waste water, digestate and manure) and in the different compartments of the environment (soil, sediment, surface-, and groundwater) (Table 1). The repeated fertilization of cropland with animal manure containing veterinary antibiotics (VAs) is one of the main contamination routes of surface water resources (Kemper 2008). While their concentrations in surface water worldwide vary between a few and several dozen ng·L⁻¹ (Kolpin *et al.* 2002; Veach and Bernot 2011; Bernot *et al.* 2013; Iglesias *et al.* 2014; Matongo *et al.* 2015; Grenni *et al.* 2018), peak concentrations can sometimes reach several µg·L⁻¹ in different rivers (Yargau *et al.* 2007; Peng *et al.* 2008; Lacina *et*

al. 2012; Matongo *et al.* 2015). In France, a survey performed in the Seine River revealed that SMX was detected in all samples, with a maximum concentration of 544 ng·L⁻¹ (Tamtam *et al.* 2008). In the USA, a study showed that 20% of groundwater samples were contaminated with SMX at concentrations of up to 1.0 µg·L⁻¹ which are in the range of pesticide concentrations observed in agricultural streams (Barnes *et al.* 2008). A recent review of the maximum concentrations of the most frequently detected SMs in contamination sources and in different environmental compartments including soils, surface-, and groundwaters can be found in Deng *et al.* (2018).

Table 1 - Occurrence of sulfamethoxazole and sulfamethazine in different environmental matrices (soil, sediment, surface-, and groundwater) and in various sources of contamination (waste water, digestate, and manure)

Antibiotic	Matrice	Place ^a (# of studies)	Concentrations ^{b,c}	Reference	
Sulfamethoxazole	Soil	Ch (4), Sp (1), US (1)	19.3 ^b	De Vries and Zhang 2016	
	Sediment	Ch (5), US (2), K (1), Sp (1)	0.5 ^b	De Vries and Zhang 2016	
	Surface water	It		1.8–2.4 ^c	Grenni <i>et al.</i> 2018
		It		68 ^c	Grenni <i>et al.</i> 2018
		Ca		578 ^c	Yargau <i>et al.</i> 2007
		US		150 ^c	Kolpin <i>et al.</i> 2002
	Groundwater	Nl (3)	50–75 ^c	Chitescu <i>et al.</i> 2012	
	Waste water	US (7)	98–2200 ^c	Batt <i>et al.</i> 2008	
	Digestate	Ge	880 ^b	Ratsak <i>et al.</i> 2013	
Manure	Ge	nd	Ratsak <i>et al.</i> 2013		
Sulfamethazine	Soil	Ch (4), US (1), K (1)	3.2 ^b	De Vries and Zhang 2016	
	Sediment	Ch (6), US (2), K (1)	2.9 ^b	De Vries and Zhang 2016	
	Surface water	US		6 ^c	Bernot <i>et al.</i> 2013
		US		20 ^c	Kolpin <i>et al.</i> 2002
	Groundwater	Nl (2)	21 ^c	de Weert and Smedes 2015	
	Waste water	Ch	382 ^c	Chunhui <i>et al.</i> 2016	
	Digestate	Ge	160 ^b	Ratsak <i>et al.</i> 2013	
	Manure	Ge	700 ^b	Ratsak <i>et al.</i> 2013	

^a China (Ch), Germany (Ge), Korea (K), Netherlands (Nl), Spain (Sp), Italy (It), Canada (Ca), United States (US)

^b In µg·kg⁻¹

^c In ng·L⁻¹

SMs are broad-spectrum bacteriostatic agents that inhibit the biosynthesis of folic acid through competitive inhibition of dihydropteroate synthase, blocking the condensation of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine pyrophosphate to para-aminobenzoic acid (Petri 2001). Although known as recalcitrant compounds, SMs can be metabolized; the most frequently detected metabolites being the 3-amino-5-methylisoxazole and 2-amino-4,6-dimethylpyrimidine for SMX and SMZ, respectively (Ricken *et al.* 2013) (Fig. 1). Strains belonging to the genus

manure, respectively. Biodegradation of SMs was subsequently reported in members of the phyla Proteobacteria (*Pseudomonas* (Jiang *et al.* 2014), *Ochrobactrum* (Mulla *et al.* 2018) and *Acinetobacter* (Wang *et al.* 2018)) and Actinobacteria (*Microbacterium* (Ricken *et al.* 2013; Tappe *et al.* 2013; Topp *et al.* 2013); *Arthrobacter* (Deng *et al.* 2016), *Gordonia* (Mulla *et al.* 2018), and *Leucobacter* (Reis *et al.* 2018)). SM degradation of *Microbacterium* sp. BR1 is initiated by an ipso-substitution (Ricken *et al.* 2013) followed by a ring cleavage in the downstream pathway (Ricken *et al.* 2015). The *sadABC* gene cluster encodes two monooxygenases (*SadA* and *SadB*) and one flavine mononucleotide (FMN) reductase (*SadC*). *SadA* and *SadC* initiate the transformation of SMs yielding to the release of 4-aminophenol. This intermediate is then transformed by *SadB* and *SadC* to 1,2,4-trihydroxybenzene which is entirely mineralized (Ricken *et al.* 2017). This gene cluster is nearly identical (between 97 and 99% similarity) in the draft genomes of *Microbacterium* sp. C448 (Martin-Laurent *et al.* 2014), *Microbacterium* sp. SDZm4 (Tappe *et al.* 2013) and *Arthrobacter* sp. D2 (Deng *et al.* 2016), suggesting that it might be dispersed through horizontal exchange in the Actinobacteria phylum (Ricken *et al.* 2017). Overall, the widespread distribution of sulfonamide-biodegrading bacteria presumably decreases the environmental persistence of these antibiotics, and thus the selection pressure for resistance development. Bioaugmentation of soil with *Microbacterium* sp. strain C448 decreased the persistence of SMZ, indicating that bioremediation is an option for dealing with pollution hotspots (Hirth *et al.* 2016).

In addition to their crucial role in the dissipation of pollutants including SMs, natural microbial communities in soil and water are responsible for a range of ecosystem functions and services. However, ecotoxicological effects of antibiotics and notably of SMs on microbial communities are still understudied, and there is a crucial need to investigate their impact on biogeochemical processes to further assess their possible adverse effects on ecosystem functioning (Roose-Amsaleg and Laverman 2016). This is notably the case for surface waters such as small rivers draining agricultural areas including livestock production farms or crop fields amended with manure. In these lotic ecosystems, most of the microbial activities are assumed by benthic communities which develop on hard and soft immersed substrates and which are composed of both phototrophic (mainly algae and cyanobacteria) and heterotrophic (mainly bacteria, fungi and protozoa) microorganisms. Pharmaceutical accumulation in these microbial assemblages has been occasionally reported (Writer *et al.* 2013; Wunder *et al.* 2011; Huerta *et al.* 2016). For instance, SMX tends to progressively accumulate in river biofilms (Corcoll *et al.* 2015). Exposure of aquatic microbial communities to antibiotics spiked at chronic concentration in microcosm was also found to induce resistance strategies at community level including microbial degradation of antibiotics (Vila-Costa *et al.* 2017).

Environmental exposure to antibiotics potentiates the environmental reservoir of antibiotic resistance increasing the threat to both human and animal health (Wright 2010; Ashbolt *et al.* 2013; Finley *et al.* 2013; Berendonk *et al.* 2015). One can distinguish two kinds of resistance to sulfonamides. On one hand, 3- or 6-bp duplications within *sulA*, the chromosomal gene encoding for dihydropteroate synthase, were shown to confer sulfonamide resistance to *Streptococcus pneumoniae* (Lopez *et al.* 1987; Maskell *et al.* 1997). On the other hand, sulfonamide resistance involves the acquisition of an additional dihydropteroate synthase (i.e., *sul1*, *sul2*, and *sul3*) on a mobile genetic element that is not inhibited by this class of antibiotics and that bypasses the inhibition of the enzyme encoded by the chromosomal genes. The *sul* resistance genes, located within integrons (Type 1 integrase) and carried on conjugative plasmids, are widely distributed in SM-resistant bacteria (Heuer *et al.* 2011). These genes have been detected in various aquatic ecosystems (e.g., Pei *et al.* 2006; Pruden *et al.* 2007; Luo *et al.* 2010; McKinney *et al.* 2010; Stoll *et al.* 2012). In addition, zinc was found to increase the abundance of *sul* resistance genes in intestine of weaned pigs fed with high dietary zinc supplementation as an alternative to antibiotics (Vahjen *et al.* 2015). This suggests that heavy metals can co-select antibiotic resistances by exerting a selection pressure favorable to the maintenance of mobile mosaic gene structures harboring both heavy metal and antibiotic resistances in the environment (Vahjen *et al.* 2015). Nevertheless, there are relatively few studies documenting their dispersal and survival from different sources of contaminations in agroecosystems microbiota, particularly with respect to the terrestrial to aquatic continuum.

Ecotoxicological risks and effects of SMs in agroecosystems are also largely understudied. Recently, a few papers proposed different types of usage pattern-based exposure to prioritize antibiotics to be considered in environmental risk assessment (ERA) (Di Nica *et al.* 2015; Menz *et al.* 2015). These approaches are based on the calculation of the risk quotient (RQ) as the ratio of predicted environmental concentration (PEC) over the predicted no effect concentration (PNEC). RQ values permit to predict the environmental risk for each antibiotic in the phase II of environmental risk assessment. However, besides a priori ERA of SMs including toxicological test on very sensitive species such as *Anabaena*, very few studies report their ecotoxicological impact on microbial communities. The first studies dealing with the effects of SMs on aquatic microbial communities focused on bacteria from activated sludge (Xia *et al.* 2012; Collado *et al.* 2013). SMX was found to shift bacterial community structure but did not modify microbial functions such as organic carbon and nitrogen removal. However, SMs induced large shifts in the transcriptome of microbial communities in the gene categories related to N, P, and C cycling (Yergeau *et al.* 2012). A negative exponential relationship between denitrifying gene abundance and SMZ concentrations was observed in estuarine and coastal sediments (Hou *et al.* 2015). This decrease

in the presence of SMZ led to a reduction of denitrification rates. A mechanistic model to interpret the toxic effects of SMs on nitrification in activated sludge system was proposed (Huang *et al.* 2016). Effects of SM exposure on fungi and algae co-existing with bacteria in aquatic biofilms are still unknown. In soil, microbial communities exposed to SMs experienced an overall reduction in the bacteria/fungi biomass ratio suggesting that fungi consumed nutrients released by bacteria killed by the antibiotic (Gutierrez *et al.* 2010; Pinna *et al.* 2012). This response might also occur to microbial communities in antibiotic-contaminated river ecosystems but may be modulated by the difference in proportion of bacteria, algae, and fungi among different benthic substrata (cobble, sediment, leaves) (Artigas *et al.* 2009; Mora-Gómez *et al.* 2016). Simple additive effects occur with binary mixtures of SMs (SMZ and SMX) on the growth inhibition of the freshwater green algae *P. subcapitata* (Yang *et al.* 2008). Diatoms and cyanobacteria were found to be more sensitive to pharmaceutical mixtures including SMs than to single antibiotics (Van der Grinten *et al.* 2010; Perron and Juneau 2011). Few studies have assessed how changes in microbial composition and activity of river biofilms in response to antibiotic exposure could lead to perturbation of ecosystem functions like nutrient cycling.

The ANTIBIOTOX project

Within this context, ANTIBIOTOX (“Fate of antibiotics and associated resistance genes in agroecosystems: ecotoxicological risk for functional microbial communities of receiving river systems”) is an innovative project funded by the French ANR (Agence Nationale de Recherche; contract no ANR-17-CE34-0003, 2018-2022) which aims to develop a multidisciplinary approach combining chemistry, biochemistry, environmental microbiology, bacterial genetics, molecular biology, and ecotoxicology to (i) study transcriptomic and proteomic regulation during the time-course of SMs biodegradation in *Microbacterium* sp. C448, (ii) characterize the biodegradation pathways and estimate the ecotoxicological impact of microbial biodegradation of SMs in aquatic and terrestrial compartments of agroecosystems, (iii) monitor the dissemination of SM-resistant and SM-degrading bacteria and genes from agricultural soil to adjacent water resources, (iv) estimate the impact of SM residues (and transformation products) on the abundance of resistant and degrading microbes and microbial functions in the aquatic ecosystem, and (v) communicate and promote results as well as contribute to higher education programs in order to disseminate the main outcomes of this research program. ANTIBIOTOX is focused on two SMs, namely sulfamethoxazole and sulfamethazine, which are used in human medicine and in food animal production. For example, 20% of the veterinary antibiotics (147 tons of active substance per year) sold in France are in the SM class (ANSES 2015). Sulfonamides are frequently detected in various aquatic environments (Deng *et al.* 2018). Overall, this multidisciplinary project is expected to

provide new insights in the ecotoxicological impact of veterinary/human antibiotic residues on functional microbial diversity along the soil-water continuum.

References

- ANSES (2015) Rapport annuel Médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2014
- Artigas J, Romani AM, Gaudes A, Muñoz I, Sabater S (2009) Benthic structure and metabolism in a Mediterranean stream: from biological communities to the whole stream ecosystem function. *Freshw Biol* 50:2025–2036
- Ashbolt NJ, Amézquita A, Backhaus T, Borriello P, Brandt KK, Collignon P, Coors A, Finley R, Gaze WH, Heberer T, Lawrence JR, Larsson DGJ, McEwen SA, Ryan JJ, Schönfeld J, Silley P, Snape JR, Van den Eede C, Topp E (2013) Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environ Health Persp* 121:993–1001
- Baran W, Sochacka J, Wardas WAA (2006) Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions. *Chemosphere* 65:1295–1299
- Barnes KK, Koplín DW, Furlong ET, Zaugg SD, Meyer MT, Barber LB (2008) A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I groundwater. *Sci Total Environ* 402:192–200
- Barra Caracciolo A, Topp E, Grenni P (2015) Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *J Pharm Biomed Anal* 106:25–36
- Batt AL, Kostich MS, Lazorchak JM (2008) Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS. *Anal Chem* 50:5021–5030
- Bengtsson-Palme J, Larsson DGJ (2016) concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: proposed limits for environmental regulation. *Environ Int* 86:140–149
- Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ (2018) Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 1:42
- Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, Burgmann H, Sorum H, Norstrom M, Pons MN, Kreuzinger N, Huovinen P, Stefani S, Schwartz T, Kisand V, Baquero F, Martinez JL (2015) Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Micro* 13:310–317
- Bernot MJ, Smith L, Frey J (2013) Human and veterinary pharmaceutical abundance and transport in a rural Central Indiana stream influenced by confined animal feeding operations (CAFOs). *Sci Total Environ* 445–446:219–230
- Blanco G, Lemus JA, Grande J (2009) Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Microbial Environ Res* 109:405–412

- Bottoni P, Caroli S (2015) Detection and quantification of residues and metabolites of medicinal products in environmental compartments, food commodities and workplaces. A review. *J Pharm Biomed Anal* 106:3–24
- Boxall ABA (2004) The environmental side effects of medication: how are human and veterinary medicines in soils and water bodies affecting human and environmental health? *EMBO Rep* 5:1110–1116
- Brandt KK, Sjøholm OR, Krogh KA, Halling-Sørensen B, Nybroe O (2009) The environmental release and fate of antibiotics. *Environ Sci Technol* 43:2963–2968
- Brandt KK, Amézquita A, Backhaus T, Boxall A, Coors A, Heberer T, Lawrence JR, Lazorchak J, Schönfeld J, Snape JR, Zhu YG, Topp E (2015) Ecotoxicological assessment of antibiotics and other compounds with antimicrobial properties: a call for improved consideration of microorganisms. *Environ Int* 85:189–205
- Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI (2001) Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl Environ Microbiol* 67:1494–1502
- Chen J, Xie S (2018) Overview of sulfonamide biodegradation and the relevant pathways and microorganisms. *Sci Total Environ* 640-641:1465–1477
- Chitescu CL, Oosterink E, De Jong J, Stolker AAM (2012) Accurate mass screening of pharmaceuticals and fungicides in water by U-HPLC-Exactive Orbitrap MS. *Anal Bioanal Chem* 403:2997e3011
- Chunhui Z, Liangliang W, Xiangyu G, Xudan H (2016) Antibiotics in WWTP discharge into the Chaobai river, Beijing. *Arch Environ Prot* 42:48–57
- Collado N, Buttiglieri G, Marti E, Ferrando-Climent L, Rodriguez-Mozaz S, Barcelo D, Comas J, Rodriguez-Roda I (2013) Effects on activated sludge bacterial community exposed to sulfamethoxazole. *Chemosphere* 93:99–106
- Corcoll N, Casellas M, Huerta B, Guasch H, Acuña V, Rodriguez-Mozaz S, Serra-Compte A, Barcelo D, Sabater S (2015) Effects of flow intermittency and pharmaceutical exposure on the structure and metabolism of stream biofilms. *Sci Total Environ* 503-504:159–170
- De Vries SL, Zhang P (2016) Antibiotics and the terrestrial nitrogen cycle: a review. *Curr Pollution Rep* 2:51–67
- de Weert J, Smedes F (2015) Passive sampling van grondwater. Een trial in peilbuizen van het provinciaal meetnet van de provincie Noord-Brabant. Deltares, Delft, the Netherlands. Report no 210074-000-BGS-0009, 1-44
- Deng Y, Mao Y, Li B, Yang C, Zhang T (2016) Aerobic degradation of sulfadiazine by *Arthrobacter* spp.: kinetics, pathways and genomic characterization. *Environ Sci Technol* 50:9566–9575

- Deng Y, Li B, Zhang T (2018) Bacteria that make a meal of sulfonamide antibiotics: blind spots and emerging opportunities. *Environ Sci Technol* 52:3854–3868
- Di Nica V, Menabelli L, Azimonti G, Finizio A (2015) RANKVET: a new ranking method for comparing and prioritizing the environmental risk of veterinary pharmaceuticals. *Ecol Indic* 52:270–276
- Finley RL, Collignon P, Larsson DGJ, McEwen SA, Li XZ, Gaze WH, Reid-Smith R, Timinouni M, Graham DW, Topp E (2013) The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *J Clin Infect Dis* 57:704–710
- Gao P, Munir M, Xagorarakis I (2012) Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Sci Tot Environ* 421:173–183
- Gauthier H, Yargeau V, Cooper DG (2010) Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism. *Sci Tot Environ* 408:1701–1706
- Ghiglione JF, Martin-Laurent F, Pesce S (2016) Microbial ecotoxicology: an emerging discipline facing contemporary environmental threats. *Environ Sci Pollut Res* 23:3981–3983
- González-Pleiter M, Gonzalo S, Rodea-Palomares I, Leganés F, Rosal R, Boltes K, Marco E, Fernández-Piñas F (2013) Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. *Water Res* 47:2050–2064
- Grenni P, Ancona V, Caraciollo AB (2018) Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: a review. *Microchem J* 136:25–39
- Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI (2011) Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog* 7(7):e1002158
- Gutierrez IR, Watanabe N, Harter T, Glaser B, Radke M (2010) Effect of sulfonamide antibiotics on microbial diversity and activity in a Californian Mollic haploxyeralf. *J Soils Sediments* 10:537–544
- Heuer H, Schmitt H, Smalla K (2011) Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* 14:236–243
- Hirth N, Topp E, Dörfler U, Stupperich E, Munch JC, Schroll R (2016) An effective bioremediation approach for enhanced microbial degradation of the veterinary antibiotic sulfamethazine in an agricultural soil. *Chem Biol Technol Agric* 3:29
- Hou L, Yin G, Liu M, Zhou J, Zheng Y, Gao J, Zong H, Yang Y, Gao L, Tong C (2015) Effects of sulfamethazine on denitrification and the associated N₂O release in estuarine and coastal sediments. *Environ Sci Technol* 49:326–333
- Hruska K, Franek M (2012) Sulfonamides in the environment: a review and a case report. *Veterinarni Medicina* 57:1–35

- Huang X, Feng Y, Hu C, Xia X, Yu D, Zou X (2016) Mechanistic model for interpreting the toxic effects of sulfonamides on nitrification. *J Hazard Mater* 305:123–129
- Huerta B, Rodríguez-Mozaz S, Ponsatí L, Acuña V, Sabater S, Barceló D (2016) Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a waste water treatment plant-impacted river. *Sci Total Environ* 540:241–249
- Iglesias A, Nebot C, Vazquez BI, Miranda JM, Abuin CFM, Cepeda A (2014) Detection of veterinary drug residues in surface waters collected nearby farming areas in Galicia, North of Spain. *Environ Sci Pollut Res* 21:2367–2377
- Jiang B, Li A, Cui D, Cai R, Ma F, Wang Y (2014) Biodegradation and metabolic pathway of sulfamethoxazole by *Pseudomonas psychrophila* HA-4, a newly isolated cold-adapted sulfamethoxazole-degrading bacterium. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:4671–4681
- Kemper N (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 8:1–13
- Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PAI, Graham DW (2010) Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol* 44:580–587
- Koike S, Krapac IG, Oliver HD, Yannarell AC, Chee-Sanford J, Aminov RI, Mackie RI (2007) Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. *Appl Environ Microbiol* 73:4813–4823
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002) Response to comment on “Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: a national reconnaissance”. *Environ Sci Technol* 36:1202–1211
- Lacina P, Zenatova P, Vavrova M (2012) The assessment of contamination of selected river streams in the Czech Republic by human and veterinary drug residues with liquid and gas chromatography. *Fresenius Environ Bull* 21:3318–3324
- Larcher S, Yargeau V (2011) Biodegradation of sulfamethoxazole by individual and mixed bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:211–218
- Larsson DGJ, Andreumont A, Bengtsson-Palme J, Brandt KK, de Roda Husman AM, Fagerstedt P, Fick J, Flach C-F, Gaze WH, Kuroda M, Kvint K, Laxminarayan R, Manaia CM, Nielsen KM, Plant L, Ploy M-C, Segovia C, Simonet P, Smalla K, Snape J, Topp E, van Hengel AJ, Verner-Jeffreys DW, Virta MPJ, Wellington EM, Wernersson A-S (2018) Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environ Int* 117:132–138
- Lopez P, Espinosa M, Greenberg B, Lacks SA (1987) Sulfonamide resistance in *Streptomyces pneumoniae*: DNA sequence of the gene encoding dihydropteroate synthase and characterization of the enzyme. *J Bacteriol* 169:4320–4326

- Luo Y, Mao D, Rysz M, Zhou Q, Zhang H, Xu L, Alvarez PJJ (2010) Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environ Sci Technol* 44:7220–7225
- Manzetti S, Ghisi R (2014) The environmental release and fate of antibiotics. *Marine Pollut Bull* 79:7–15
- Mao F, Liu X, Wu K, Zhou C, Si Y (2018) Biodegradation of sulfonamides by *Shewanella oneidensis* MR-1 and *Shewanella* sp. strain MR-4. *Biodegradation* 29:129–140
- Martin-Laurent F, Marti R, Waglechner N, Wright GD, Topp E (2014) Draft genome sequence of the sulfonamide antibiotic-degrading *Microbacterium* sp. strain C448. *Genome Announc.* <https://doi.org/10.1128/genomeA.01113-13>
- Maskell JP, Sefton AM, Hall LMC (1997) Mechanism of sulfonamide resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2121–2126
- Matongo S, Birungi G, Moodley B, Ndungu P (2015) Occurrence of selected pharmaceuticals in water and sediment of Umgeni River, KwaZulu-Natal, South Africa. *Environ Sci Pollut Res* 22:10298–10308
- McKinney CW, Loftin KA, Meyer MT, Davis JG, Pruden A (2010) Tet and sul antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence. *Environ Sci Technol* 44:6102–6109
- Menz J, Schneider M, Kümmerer K (2015) Usage pattern-based exposure screening as a simple tool for the regional priority-setting in environmental risk assessment of veterinary antibiotics: a case study of north-western Germany. *Chemosphere* 127:42–48
- Mora-Gómez J, Freixa A, Perujo N, Barral-Fraga L (2016) In: Romaní AM, Guasch H, Dolors M, Balaguer (eds) *Aquatic biofilms: ecology, water quality and wastewater treatment*. Caister Academic Press
- Mulla SI, Hu A, Sun Q, Li J, Suanona F, Ashfaq M, Yu C-P (2018) Biodegradation of sulfamethoxazole in bacteria from three different origins. *J Environ Manag* 206:93–102
- Pei R, Kim SC, Carlson KH, Pruden A (2006) Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res* 40:2427–2435
- Peng X, Tan J, Yu Y, Wang Z (2008) Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China. *Environ Toxicol Chem* 27:73–79
- Perron MC, Juneau P (2011) Effect of endocrine disrupters on photosystem II energy fluxes of green algae and cyanobacteria. *Environ Res* 111:520–529
- Petri W (2001) In: Hardman JG, Limbird LE (eds) *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed. McGraw-Hill, New York, pp 1171–1188

- Pinna MV, Casraldi P, Deiana P, Pusino A, Garau G (2012) Sorption behavior of sulfamethazine on unamended and manure-amended soils and short-term impact on soil microbial community. *Ecotoxicol Environ Saf* 84:234–242
- Pruden A, Messner N, Pereyra L, Hanson RE, Hiibel SR, Reardon KF (2007) The effect of inoculum on the performance of sulfate-reducing columns treating heavy metal contaminated water. *Water Res* 41:904–914
- Pruden A, Larsson DGJ, Amézquita A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, Lazorchak JM, Suzuki S, Silley P, Snape JR, Topp E, Zhang T, Zhu YG (2013) Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ Health Perspect* 121:878–885
- Ratsak C, Guhl B, Zühlke S, Delschen T (2013) Veterinärantibiotikarückstände in Gülle und Gärresten aus Nordrhein-Westfalen. *Environ Sci Europe* 25:7 <http://www.enveurope.com/content/25/1/7>
- Reis AC, Cvancarova M, Liu Y, Lenz M, Hettich T, Kolvenbach BA, Corvini PFX, Nunes OC (2018) Biodegradation of sulfamethoxazole by a bacterial consortium of *Achromobacter denitrificans* PR1 and *Leucobacter* sp. GP. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:10299–10314
- Ricken B, Corvini PF, Cichocka D, Parisi M, Lenz M, Wyss D, Martínez-Lavanchy PM, Müller JA, Shahgaldian P, Tulli LG, Kohler HP, Kolvenbach BA (2013) Ipso-hydroxylation and subsequent fragmentation: a novel microbial strategy to eliminate sulfonamide antibiotics. *Appl Environ Microbiol* 79:5550–5558
- Ricken B, Fellmann O, Kohler HP, Schäffer A, Corvini PFX, Kolvenbach BA (2015) Degradation of sulfonamide antibiotics by *Microbacterium* sp. strain BR1 – elucidating the downstream pathway. *New Biotechnol* 32:710–715
- Ricken B, Kolvenbach BA, Bergesch C, Benndorf D, Kroll K, Strnad H, Vlcek C, Adaixo R, Hammes F, Shahgaldian P, Schäffer A, Kohler HPE, Corvini PFX (2017) FMNH₂-dependent monooxygenase initiate catabolism of sulfonamides in *Microbacterium* sp. strain BR1 subsisting on sulfonamide antibiotics. *Sci Rep* 7:15783
- Roose-Amsaleg C, Laverman AM (2016) Do antibiotics have environmental side-effects? Impact of synthetic antibiotics on biogeochemical processes. *Environ Sci Pollut Res* 23:4000–4012
- Sapkota AR, Curriero FC, Gibson KE, Schwab KJ (2007) Antibiotic-resistant enterococci and fecal indicators in surface water and groundwater impacted by a concentrated swine feeding operation. *Environ Health Perspect* 115:1040–1045
- Stoll C, Sidhu JPS, Tiehm A, Toze S (2012) Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environ Sci Technol* 46:9716–9726

- Storteboom H, Arabi M, Davis JG, Crimi B, Pruden A (2010) Tracking antibiotic resistance genes in the South Platte River basin using molecular signatures of urban, agricultural, and pristine sources. *Environ Sci Technol* 44:7397–7404
- Tamtam F, Mercier F, Le Bot B, Eurin J, Dinh QT, Clément M, Chevreuil M (2008) Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Sci Total Environ* 393:84–95
- Tappe W, Herbst M, Hofmann D, Koepfchen S, Kummer S, Thiele B, Groeneweg J (2013) Degradation of sulfadiazine by *Microbacterium lacus* strain SDZm4, isolated from Lysimeters previously manured with slurry from sulfadiazine-medicated pigs. *Appl Environ Microbiol* 79:2572–2577
- Topp E, Chapman R, Devers-Lamrani M, Hartmann A, Martin-Laurent F, Marti R, Sabourin L, Scott A, Sumaraha M (2013) Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure, and isolation of a sulfamethazine-degrading *Microbacterium* sp. *J Environ Qual* 42:173–178
- Vahjen W, Pietruszynska D, Starke IC, Zentek J (2015) High dietary zinc supplementation increases the occurrence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in the intestine of weaned pigs. *Gut Pathog* 23:1–7
- Van der Grinten E, Pikkemaat MG, Van den Brandhof E-J, Stroomborg GJ, Kraak MHS (2010) Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere* 80:1–6
- Veach AM, Bernot MJ (2011) Temporal variation of pharmaceuticals in an urban and agriculturally influenced stream. *Sci Total Environ* 409:4553–4563
- Vila-Costa M, Gioia R, Aceña J, Pérez S, Casamayor EO, Dachs J (2017) Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism. *Water Res* 115:309–317
- Wang J, Wang S (2018) Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:3573–3582
- Wang S, Hu Y, Wang J (2018) Biodegradation of typical pharmaceutical compounds by a novel strain *Acinetobacter* sp. *J Environ Manag* 217:240–246
- Wright GD (2010) Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol* 13:589–594
- Writer JH, Antweiler RC, Ferrer I, Ryan JN, Thurman EM (2013) In-stream attenuation of neuro-active pharmaceuticals and their metabolites. *Environ Sci Technol* 47:9781–9790
- Wunder DB, Bosscher VA, Cok RC, Hozalski RM (2011) Sorption of antibiotics to biofilm. *Water Res* 45:2270–2280

- Xia S, Jia R, Feng F, Xie K, Li H, Jing D, Xu X (2012) Effect of solids retention time on antibiotics removal performance and microbial communities in an A/O-MBR process. *Bioresour Technol* 106:36–43
- Yang LH, Ying GG, Su HC, Stauber JL, Adams MS, Binet MT (2008) Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ Toxicol Chem* 27:1201–1208
- Yargau V, Lopata A, Metcalfe C (2007) Pharmaceuticals in the Yamaska River, Quebec, Canada. Service de l'étude du milieu aquatique. 1985. La Yamaska, une rivière à rajeunir. Ministère de l'environnement du Québec, Direction générale de l'assainissement de l'eau, Direction des études du milieu aquatique, Québec
- Yergeau E, Sanschagrin S, Waiser MJ, Lawrence JR, Greer CW (2012) Sub-inhibitory concentrations of different pharmaceutical products affect the meta-transcriptome of river biofilm communities cultivated in rotating annular reactors. *Environ Microb Rep* 4:350–359
- Zhang WW, Wen YY, Niu ZL, Yin K, Xu DX, Chen LX (2012a) Isolation and characterization of sulfonamide-degrading bacteria *Escherichia* sp. HS21 and *Acinetobacter* sp. HS51. *World J Microbiol Biotechnol* 28:447–452
- Zhang WW, Xu D, Niu ZL, Yin K, Liu P, Chen LX (2012b) Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. DX7 capable of degrading sulfadoxine. *Biodegradation* 23:431–439

Article soumis à la revue *Frontiers in Microbiology* le 5 octobre 2021
(version corrigée après révision mineure)

Contrasting effects of environmental concentrations of sulfonamides on microbial heterotrophic activities in freshwater sediments

Stéphane Pesce^{1*}, Laura Kergoat¹, Laurianne Paris², Loren Billet^{1,3}, Pascale Besse-Hoggan², Chloé Bonnineau¹

¹INRAE, UR RiverLy, Villeurbanne, France

²Université Clermont Auvergne, CNRS, Sigma Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France

³AgroSup Dijon, INRAE, Université de Bourgogne Franche-Comté, Agroécologie, Dijon, France

Keywords: β -glucosidase, Benthic, Biogeochemical Cycles, Microbial ecotoxicology, Respiration, Sorption, Sulfamethazine, Sulfamethoxazole

ABSTRACT

The sulfonamide antibiotics sulfamethoxazole (SMX) and sulfamethazine (SMZ) are regularly detected in surface sediments of contaminated hydrosystems, with maximum concentrations that can reach tens of $\mu\text{g kg}^{-1}$ in stream and river sediments. Little is known about the resulting effects on the exposed benthic organisms. Here we investigated the functional response of stream sediment microbial communities exposed for 4 weeks to two levels of environmentally relevant concentrations of SMX and SMZ, tested individually. To this end, we developed a laboratory channel experiment where natural stream sediments were immersed in water contaminated with nominal environmental concentrations of 500 ng L^{-1} and 5000 ng L^{-1} of SMX or SMZ, causing their accumulation in surface sediments. The mean maximum concentrations measured in the sediment (about $2.1 \mu\text{g SMX kg}^{-1} \text{ dw}$ and $4.5 \mu\text{g SMZ kg}^{-1} \text{ dw}$) were consistent with those reported in contaminated rivers. The resulting chronic exposure had various effects on the functional potential of the sediment microbial communities, according to the substance (SMX or SMZ), the

type of treatment (high or low) and the measured activity, with a strong influence of temporal dynamics. Whereas the SMZ treatments resulted in only transient effects on the five microbial activities investigated, we observed a significant stimulation of the β -glucosidase activity over the 28 days in the communities exposed to the high concentration of SMX. Together with the stimulation of aerobic respiration at low SMX concentrations and the reduced concentration observed in the last days, our results suggest a potential biodegradation of sulfonamides by microbial communities from sediments. Given the key functional role of surface sediment microbial communities in streams and rivers, our findings suggest that the frequently reported contamination of sediments by sulfonamides is likely to affect biogeochemical cycles, with possible impact on ecosystem functioning.

Introduction

Among contaminants of emerging concern, antibiotics are increasingly detected in aquatic ecosystems worldwide, reflecting their widespread use (Chen and Zhou, 2014; Bonnineau *et al.*, 2021; Kairigo *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2021). Case reports and reviews on the contamination of these ecosystems by antibiotics show that sulfonamides, especially sulfamethoxazole (SMX) and sulfamethazine (SMZ), are among the most frequently detected substances (e.g. Kovalakova *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2021). Owing to the frequent occurrence of SMZ and SMX in surface waters, there has been growing interest in assessing their toxicity toward various aquatic organisms. These include model species, such as the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*, the protist *Tetrahymena pyriformis*, the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the crustacean *Daphnia magna*, with reported NOEC (no observed effect concentration) ranging from several $\mu\text{g L}^{-1}$ to several mg L^{-1} (Yang *et al.*, 2008; De Liguoro *et al.*, 2009; Straub, 2016; U.S. Environmental Protection Agency, 2019). However, the suitability of ecotoxicological tests at species or population level to assess the ecological effects of antibiotics is controversial (Boxall *et al.*, 2012; Brandt *et al.*, 2015). In particular, microbial communities are rarely taken into account in these types of test (Brandt *et al.*, 2015), even though they are key players in a broad range of ecological processes that are essential to ecosystem functioning and that contribute to ecosystem services (Cavicchioli *et al.*, 2019; Pesce *et al.*, 2020).

Only a few studies have investigated the effects of SMZ and SMX on aquatic microbial communities (Grenni *et al.*, 2018). Most have focused on periphytic biofilms, which are complex assemblages that develop on inert substrata, such as pebbles or cobbles (Yergeau *et al.*, 2010, 2012; Johansson *et al.*, 2014; Kergoat *et al.*, 2021). Using Biolog Ecoplates, Johansson *et al.* (2014) estimated that the effective concentrations (CE) of SMX inhibiting 10% and 50% of total carbon source utilization by marine biofilms after 4 days of exposure were respectively close to $14 \mu\text{g L}^{-1}$ (CE₁₀) and $272 \mu\text{g}$

L⁻¹ (CE₅₀). Yergeau *et al.* (2010; 2012) showed that more environmentally relevant concentrations of SMZ or SMX (500 ng L⁻¹ of either) could affect community composition and the meta-transcriptome of river biofilms exposed for 8 weeks. More recently, Kergoat *et al.* (2021) also observed changes in the bacterial and diatom composition of river biofilms exposed for 4 weeks to 500 ng L⁻¹ and 5000 ng L⁻¹ of SMX or SMZ (tested individually at these two nominal concentrations). Moreover, they observed slight and transitory effects on microbial heterotrophic functions such as the phosphatase and leucine aminopeptidase enzymatic activities (Kergoat *et al.*, 2021). Paumelle *et al.* (2021) also showed slight functional effects of SMX and SMZ on microbial decomposers associated with leaf litter. They reported a significant increase in the β-glucosidase activities of these communities throughout 16 days exposure to a nominal concentration of 5000 ng L⁻¹ of SMX or SMZ, tested individually. However, no effect was observed on the other enzymatic activities they measured (cellobiohydrolase, phenol oxidase, alkaline phosphatase, and leucine aminopeptidase) or on the decomposition rate of the colonized leaves (Paumelle *et al.*, 2021). Interestingly, the above cited studies are evidence that the microbial response to chronic exposure to SMX and SMZ can differ according to the substance, despite their similar molecular structures and modes of action (Yergeau *et al.*, 2010, 2012; Kergoat *et al.*, 2021; Paumelle *et al.*, 2021).

Besides their frequent occurrence in surface waters, SMX and SMZ are also regularly detected in surface sediments of contaminated hydrosystems (Chen and Zhou, 2014; Shi *et al.*, 2014; De Vries and Zhang, 2016; Bonnineau *et al.*, 2021; Zheng *et al.*, 2021). Experimental studies have demonstrated that the sorption rates of these antibiotics, which vary among sediments and antibiotics in water-sediment systems, can be very high (Carstens *et al.*, 2013; Li and Cui, 2020). In their recent systematic review of antibiotics in surface sediments of estuarine and coastal environments, Zheng *et al.* (2021) reported mean concentrations of SMX and SMZ close to 9 μg kg⁻¹ and 2 μg kg⁻¹ respectively, with maximum values reaching about 100 μg kg⁻¹ for SMX and 20 μg kg⁻¹ for SMZ. In freshwater ecosystems, De Vries and Zhang (2016) compiled the results of 11 studies assessing the occurrence of antibiotics in stream and river sediments mainly located in high-intensity agricultural regions and subjected to wastewater discharge and agricultural runoff. The reported median and maximum concentrations were respectively 0.52 μg kg⁻¹ and 7.86 μg kg⁻¹ for SMX and 2.87 μg kg⁻¹ and 248 μg kg⁻¹ for SMZ (De Vries and Zhang, 2016, and references therein). In a case study conducted in the Eastern province of Kenya, Kairigo *et al.* (2020) observed maximum concentrations of SMX of about 900 μg kg⁻¹ in surface sediments located downstream of the Machakos town wastewater treatment plant.

Despite very few studies on the effects of SMX and SMZ on sediment microbial communities, it has been evidenced that the contamination of sediments by this type of substance can impact

microbial processes involved in the N cycle (Hou *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021). In a sediment slurry incubation experiment with a dose-response design, Hou *et al.* (2015) described a negative exponential relationship between denitrifying gene abundances and SMZ concentrations. Increasing concentrations of SMZ led to increased depression of denitrification rates (Hou *et al.*, 2015). Similar results were obtained by Xu *et al.* (2020) and Chen *et al.* (2021), who exposed river sediments to increasing concentrations of SMX. All these studies showed that the contamination of sediments by high concentrations of SMX or SMZ could increase the emission of nitrous oxide (N₂O) and alter the ecological functioning of the benthic compartment. However, further research is needed to better assess the potential effects of environmental contamination by SMX and SMZ on sediment functioning. More generally, it is recognized that efforts are needed to improve the ecological risk assessment of freshwater sediments by better assessing the ecotoxicological effects in this compartment at community level (Pesce *et al.*, 2018).

In this context, we investigated the functional response of stream sediment microbial communities exposed for 4 weeks to two levels of environmentally relevant concentrations of SMX and SMZ, tested individually. To this end, we developed a microcosm approach, using laboratory channels where natural stream sediments were immersed in water contaminated with nominal concentrations of 500 ng L⁻¹ and 5000 ng L⁻¹ of SMX or SMZ, chosen to reflect environmental concentrations (Deng *et al.*, 2018). The recirculating water was replenished weekly and the resulting sorption of antibiotics in sediment was assessed by weekly concentration measurements in this compartment. Resulting ecotoxicological effects on the exposed sediment microbial communities were assessed over time by measuring 5 potential microbial activities (the enzymatic activities: β -glucosidase, leucine aminopeptidase, phosphatase and the metabolic activities : aerobic respiration, denitrification). This panel of activities was chosen to take into consideration the three most important nutrient cycles to which microbial communities contribute, namely the C (β -glucosidase and aerobic respiration), N (leucine aminopeptidase and denitrification) and P (phosphatase) cycles. Moreover, these activities are commonly measured in microbial ecotoxicology (e.g. Paumelle *et al.* 2021, Tlili *et al.* 2017) allowing comparison across studies.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Natural sediment and associated communities were sampled on February 2018 at the upstream section of the Morcille river (Saint Joseph, 46°10'39.1"N 4°38'10.1"E), located in a forested non-

urban area, upstream of vineyards. About 150 kg of wet surface sediment (0–3 cm) was collected using an Ekman grab, sieved at 2 mm, and brought to the laboratory. After sieving, sediment particle-size classes were distributed as follows: 48.8% [500 μm –2 mm], 30.7% of [200–500 μm], 12.5% [50–200 μm], 8.0% [$<$ 50 μm], corresponding to a relatively coarse sediment, with a low organic matter content (3.1%) and a relatively high water content (36.1%).

The microcosms used for the experiment consisted of 15 glass indoor channels (length \times width \times height = 83 \times 11 \times 10 cm), as previously described in Mahamoud Ahmed *et al.* (2018). After sediment homogenization, the bottom of each channel was spread with 7.2 kg wet weight (ww) of sediment and filled with 10 L of circulating water (2:1 v/v demineralized water:groundwater). The experimental design was similar to that used by Kergoat *et al.* (2021). Briefly, five experimental treatments (with independent triplicate channels) were tested: (i) control condition without SMX or SMZ, (ii) low-SMX: sediment immersed in water contaminated with SMX, at a nominal concentration of 500 ng L⁻¹; (iii) high-SMX: sediment immersed in water contaminated with SMX, at a nominal concentration of 5000 ng L⁻¹, (iv) low-SMZ: sediment immersed in water contaminated with SMZ, at a nominal concentration of 500 ng L⁻¹, and (v) high-SMZ: sediment immersed in water contaminated with SMZ, at a nominal concentration of 5000 ng L⁻¹. The experiment lasted 4 weeks and water was replenished weekly (for more details of the experimental procedure, see Kergoat *et al.*, 2021).

Sediments were sampled for antibiotic and microbial analyses at the beginning of the experiment (Day 0, D0) and after 7 (D7), 14 (D14), 21 (D21) and 28 (D28) days. At each sampling time (i.e. before water replenishment), about 250 g of sediment was collected uniformly in each channel (using subsamples randomly distributed over the length of the channel), homogenized, and subsampled for further analyses.

2.2. Sediment chemical analyses

SMX and SMZ concentrations in the sediment were measured at each sampling time (except for the REF treatment, for which only D0 and D28 samples were analyzed). After sampling, sediments were freeze-dried and crushed; 6.0000 \pm 0.0005 g of sediment sample was then added to Nalgene PPCO 50 mL centrifuge tubes (previously checked for lack of SMX and SMZ sorption capacity) together with 50 μL of a 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ SMX-d4 (Toronto Research Chemicals) and SMZ-d4 (LCG standards) mixture and 20 mL of MeOH/H₂O 4/1 (v/v) extractant. The tubes were stirred for 18 h using an orbital shaker (Heidolph Reax) at 50 rpm and room temperature. After centrifuging (12,500 $\times g$ for 15 min), the supernatant was concentrated in a Speed-Vac vacuum concentrator heated at 35 °C. The residue was then dissolved in 10 mL of distilled water. After adjusting the pH to 3.8 \pm 0.2, samples were concentrated 20-fold on Oasis HLB-500 mg cartridges (WatersTM)

according to the manufacturer's recommendations (elution: 10 mL methanol). The methanol fraction was concentrated in a Speed-Vac vacuum concentrator at room temperature, and the residue was dissolved in 500 μ L HPLC-grade water. Antibiotics were assayed by LC/ESI-MS on a Thermo Scientific UHPLC Ultimate 3000 RSLC coupled to an Orbitrap Q-Exactive analyzer. The analyses were carried out in positive mode. The UHPLC was equipped with a Luna Omega Polar C18 column, 100 \times 2.1 mm, 1.6 μ m (Phenomenex) at 30 $^{\circ}$ C with acetonitrile gradient + 0.1% formic acid (Solvent A) and water + 0.1% formic acid (Solvent B) 0–2.5 min, 30–64.5% A (linear) 2.5–2.6 min, 64.5–99% A (linear) 2.6–5 min, 99% A 5–5.1 min, 99–30% A 5.1–8 min, and 30% A. Flow rate was 0.45 mL min⁻¹. For the mass spectrometer, gaseous nitrogen was used as nebulizer gas (50 AU). The spray voltage was 3.0 kV. The limit of quantification for SMX and SMZ was 0.08 μ g kg⁻¹ of dry sediment.

2.3. Analyses of sediment microbial community functions

Potential microbial activities for aerobic respiration, denitrification, β -glucosidase, phosphatase and leucine aminopeptidase were measured using the protocols previously described by Mahamoud Ahmed *et al.* (2018) and adapted from Foulquier *et al.* (2013).

Briefly, to measure aerobic respiration and denitrification rates, 10 g of wet sediment was immersed in 10 mL of distilled water under aerobic conditions (aerobic respiration) or 10 mL of a KNO₃ (2.16 g L⁻¹) solution under anaerobic conditions (denitrification) in 150 mL glass flasks. After 2 h and 5 h, headspace gases were sampled and analyzed by gas chromatography on an MTI 200 microcatharometer (MTI Analytical Instruments). Aerobic respiration and denitrification were expressed as ng of CO₂ or N₂O per g of sediment dw⁻¹ h⁻¹, respectively. To measure β -glucosidase, phosphatase and leucine aminopeptidase enzymatic activities, 1.2 g of wet sediment was incubated for 30 min with pre-determined optimal concentrations of fluorogenic substrates, namely 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside (MUF-Glu, CAS No. 18997-57-4) for β -glucosidase, 4-methylumbelliferyl phosphatase (MUF-P, CAS No. 3368-04-5) for phosphatase, and L-leucine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (Leu-AMC, CAS No. 62480-44-8) for leucine aminopeptidase. The activities were stopped with glycine buffer (0.05 M glycine, 0.2 M NH₄OH, pH 10.4), the samples were centrifuged, and fluorescence was measured (excitation wavelength 360 nm, emission wavelength 460 nm) using a microplate reader (Synergy HT BioTek Instruments). Standard curves of MUF (CAS No. 90-33-5) and MCA (CAS No. 26093-31-2) were plotted to convert fluorescence values into enzymatic activities. Results were then expressed as nmol of hydrolyzed compound per g of sediment dw⁻¹ h⁻¹.

2.4. Data analyses

Data (microbial parameters and sulfonamides concentrations) were checked for normality (Shapiro-Wilk test on ANOVA (analysis of variance) residuals, Royston 1982) and homoscedasticity (Fligner-Killeen test, Conover *et al.*, 1981). For each treatment, differences in SMX or SMZ concentrations across time were assessed by a repeated measures ANOVA followed by a pairwise t-test with Bonferroni adjustment. Maximal SMX and SMZ concentrations were compared using a t-test. For each sampling time, differences in microbial parameters between treatments (low-SMX, high-SMX, low-SMZ or high-SMZ) and reference were assessed by ANOVA followed by a Dunnett post-hoc test. To explore correlations between microbial parameters and sulfonamide concentrations in sediments, Pearson correlations were estimated for certain treatments. For all analyses, results were considered as significant if $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using R software version 3.4.4 (R core team, 2020). Most figures were plotted using R package ggplot2 (Wickham 2016).

3. Results and discussion

3.1. Sulfamethazine had a greater sediment sorption capacity than sulfamethoxazole

Despite the lack of identified potential sources of contamination by sulfonamides in the sampled river section, a low concentration of SMZ was detected in the collected sediment ($0.06 \pm 0.10 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dw}$ at D0; Fig. 1B and 1D), while no SMX was detected (limit of detection $0.08 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dw}$). The SMZ and SMX analysis performed at D28 in the REF sediment confirmed the lack of SMX contamination and showed that SMZ concentrations in the non-spiked sediment were relatively stable over the experiment ($0.10 \pm 0.10 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dw}$ at D28; data not shown). Unexpectedly, sediments in the SMX treatments also contained low concentrations of SMZ.

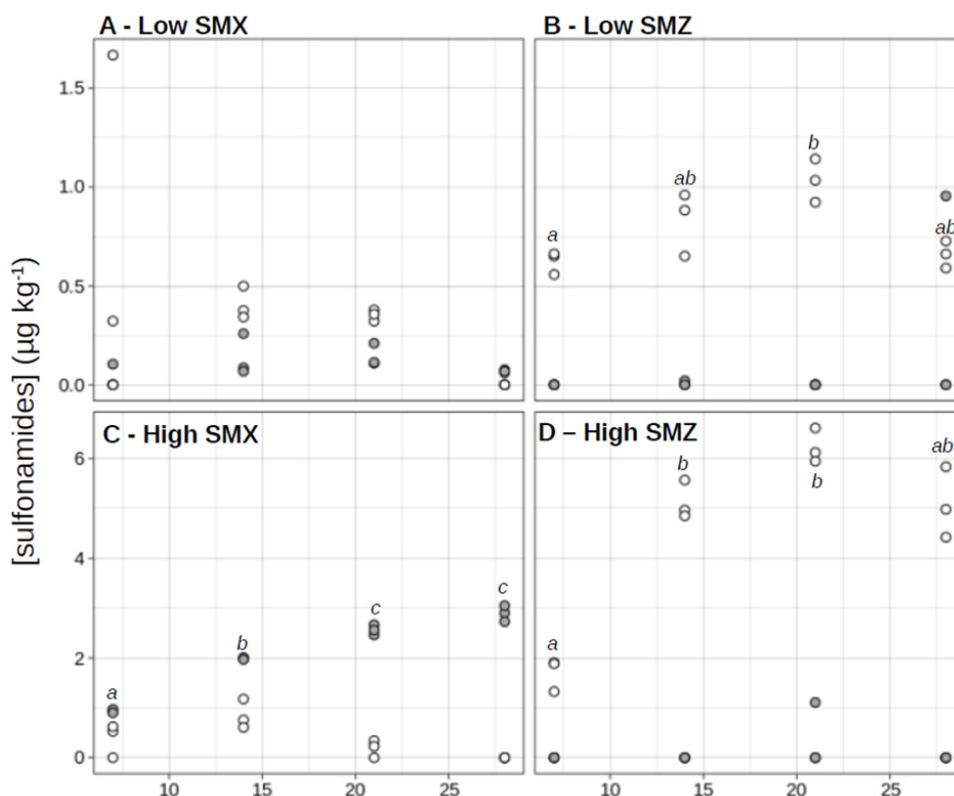


Figure 1 – Time-course evolution of sulfamethoxazole (SMX; ◻) and sulfamethazine (SMZ; ◯) concentrations in sediments exposed to water contaminated by sulfonamides at low (A-B) or high (C-D) concentrations. Different letters indicate significant differences across time between SMX or SMZ concentrations (repeated measure ANOVA followed by a pairwise *t*-test, $p < 0.05$).

The sediment sorption capacity of organic contaminants (such as sulfonamide antibiotics) depends on several variables, including the intrinsic properties of the contaminant and the physical and chemical properties of the water-sediment system (Luo *et al.*, 2019, Huang *et al.*, 2020). In our experimental conditions, SMZ accumulated more in sediment than SMX (Fig. 1). The maximum concentrations of SMZ accumulated in sediments were significantly higher than the maximum concentrations of SMX (*t*-test, $p < 0.05$). Indeed in “low” conditions, the maximal concentration in SMZ ($1.03 \pm 0.11 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dw}$ at D21; Fig. 1B) was 7-fold higher than in SMX ($0.14 \pm 0.05 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dw}$ at D21; Fig. 1A), in “high” conditions, the maximal SMZ concentration ($6.20 \pm 0.32 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dw}$ at D21; Fig. 1D) was 2-fold higher than the maximal SMX concentration ($2.89 \pm 0.16 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dw}$ at D28; Fig. 1D). This result is in line with those of Zhong *et al.* (2013), who with two types of lake sediments reported a higher sorption capacity of SMZ than of SMX. However, at both low and high treatments, SMZ concentrations increased exponentially in sediments from D0 to D21 before decreasing from about 18% (high-SMZ, Fig. 1B) and 36% (low-SMZ, Fig. 1D) between D21 and D28. Two non-exclusive hypotheses can be proposed to explain the observed decrease in the sediment concentration of SMZ at the end of the experiment. The first one is release of the tested contaminant from the sediment to the overlying water (i.e. desorption

process; Chen *et al.*, 2014). The second is photodegradation and/or biodegradation processes leading to the dissipation and/or transformation of the studied antibiotics (Carstens *et al.*, 2013; Li and Cui, 2020). These processes could be more pronounced at the end of the experiment owing to the adaptation of some sediment microorganisms after chronic exposure to the tested sulfonamide, which could enhance their ability to co-metabolize and biodegrade this antibiotic (Topp *et al.*, 2013; Ricken *et al.*, 2013; Woappi *et al.*, 2016; Martin-Laurent *et al.*, 2019).

Based on the concentrations measured weekly from D7 to D28, the mean levels of exposure of sediment microbial communities to SMX and SMZ were respectively $2.10 \pm 0.86 \mu\text{g SMX kg}^{-1} \text{ dw}$ and $4.53 \pm 1.95 \text{ SMZ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dw}$ in the high treatment and $0.09 \pm 0.05 \mu\text{g SMX kg}^{-1} \text{ dw}$ and $0.79 \pm 0.19 \text{ SMZ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dw}$ in the low treatment. Based on the existing literature, the high-treatment conditions can be considered as relatively high, but were relevant environmental concentrations, significantly lower than maximum concentrations recently reported in stream and river sediments ($8 \mu\text{g kg}^{-1}$ for SMX and $248 \mu\text{g kg}^{-1}$ for SMZ; De Vries and Zhang, 2016, and references therein) or estuarine sediments ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$ for SMX and $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ for SMZ; Zheng *et al.*, 2021). Similarly, the low-treatment conditions were representative of low environmental concentrations, the measured values being significantly lower than the mean and median values reported in the studies cited above (e.g. $0.52 \mu\text{g SMX kg}^{-1}$ and $2.87 \mu\text{g SMZ kg}^{-1}$ in stream and river sediments; De Vries and Zhang, 2016, and references therein).

3.2. Environmental concentrations of the tested sulfonamides affected sediment microbial community functions differently

The time course of the functional response of sediment microbial communities to chronic exposure to environmental concentrations of SMX or SMZ was assessed by weekly measurement of five potential activities respectively contributing to C (β -glucosidase and aerobic respiration), N (leucine-aminopeptidase and denitrification) and P (phosphatase) cycles (Fig. 2). Most of the microbial activities increased over time, reflecting microbial growth and activity. As previously reported in several studies assessing the effects of SMX and SMZ on aquatic microbial biofilms (Yergeau *et al.*, 2010, 2012; Kergoat *et al.*, 2021; Paumelle *et al.*, 2021), the functional responses observed in the present experiment varied markedly according to the antibiotic tested.

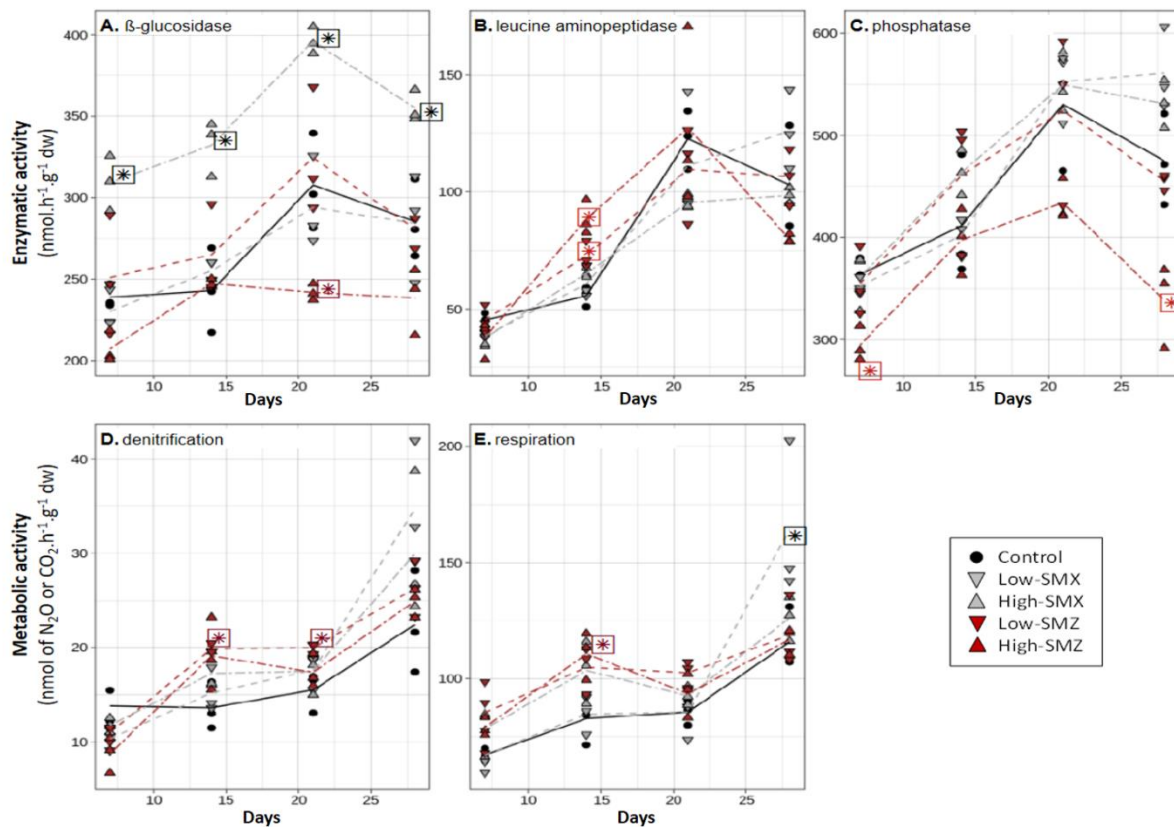


Figure 2 – Time course of β -glucosidase (A), leucine aminopeptidase (LAP, B), phosphatase (C), denitrification (D) and respiration (E) activities in sediments exposed to water contaminated by low or high concentrations of sulfamethoxazole (SMX) and sulfamethazine (SMZ). Stars indicate significant difference from control.

The SMX treatments significantly affected the two activities involved in the C cycle: β -glucosidase (Fig. 2A) and aerobic respiration (Fig. 2E). In sediments exposed to the high-SMX treatment, β -glucosidase activity was significantly higher than in the control throughout the experiment ($p < 0.05$ from D7 to D28, Fig. 2A) whereas this activity was similar to controls in sediments exposed to low concentrations of SMX. In addition, a positive correlation (Pearson correlation coefficient $r = 0.733$, $p < 0.05$) was found between glucosidase activity and SMX concentrations in sediments. A similar increase in β -glucosidase activity was already reported by Paumelle *et al.* (2021) in leaf litter-associated microbial communities exposed for 16 days to a nominal concentration of $5 \mu\text{g L}^{-1}$ of SMX or SMZ with a difference in the magnitude of the observed response according to the presence or absence of periphytic communities. They hypothesized that the β -glucosidase increase was due to the use of an external C supply in the antibiotic treatments and/or to an adaptative response to resist antibiotics (Paumelle *et al.*, 2021). By contrast, Kergoat *et al.* (2021) observed no change in the β -glucosidase activity of periphytic biofilms exposed for 28 days to SMX concentrations between 0.2 and $4 \mu\text{g L}^{-1}$. Moreover, Liu *et al.* (2016) observed a

negative effect of SMX on the β -glucosidase activity of soil microbial communities, but the concentrations they used (5 and 50 mg SMX kg⁻¹ dw soil) were far higher than the environmental concentrations tested here.

On contrary to SMX, SMZ exposure only had slight effect on β -glucosidase activity and respiration (Fig. 2A and 2E). Thus β -glucosidase activity remained similar to controls in sediments exposed to low concentrations of SMZ whereas exposure to high concentration of SMZ led to β -glucosidase activities lower than controls after 21 days of exposure (Fig. 2A). To our knowledge, this is the 1st report of β -glucosidase inhibition by exposure to environmentally relevant concentrations of SMZ. This inhibition may indicate a higher toxicity of SMZ than SMX or a higher exposure of sediment microbial communities to SMZ than SMX. Indeed, the higher concentration of SMZ than SMX indicated that microbial communities attached to sediments are likely to be more exposed to SMZ than to SMX. Nevertheless, further investigations are needed to determine whether these differences in toxicity are linked to different modes of action or to different behaviour within the aquatic ecosystem.

In the present experiment, the chronic exposure to SMX also tended to stimulate the aerobic respiration of sediment communities (Fig. 2E). It was thus positively correlated to SMX concentrations in sediment exposed to the high-SMX condition ($r = 0.726$, $p < 0.05$). In addition, after 28 days of exposure to the low-SMX condition, aerobic respiration was higher than in controls. Given the marked decrease in SMX concentrations (about 49%) observed in the low-SMX treatment between D21 and D28 (Fig. 1C), it can be hypothesized that the increased production of CO₂ observed at D28 could be at least partly due to the partial mineralization of the antibiotic. However, this hypothesis must be taken with caution, since no significant increase in aerobic respiration was observed at D28 in the high-SMZ and low-SMZ treatments (Fig. 2E), although sediment SMZ concentrations significantly decreased in both treatments between D21 and D28 (Fig. 1B and 1D).

The contamination of sediment by SMZ affected all the measured activities positively or negatively (Fig. 2), but the effects were only transient and varied according to the type of activity and the antibiotic concentration, as previously reported by Kergoat *et al.* (2021) with periphytic biofilms. Surprisingly, the effects of the high-SMZ treatment on β -glucosidase were opposite to those observed here in the high-SMX treatment (Fig. 2B) and to those previously reported by Paumelle *et al.* (2021) with leaf-litter microbial communities chronically exposed to SMZ. In the present study (Fig. 2A), β -glucosidase activity from sediments exposed to high concentration of SMZ was about 20% lower than control levels at D21 ($p < 0.05$) and D28 (not significant). In sediments under high-SMZ exposure, the phosphatase activity (Fig. 2C) was also lower than the control level,

especially at D7 (about 20% lower, $p < 0.05$) and D28 (about 30% lower, $p < 0.05$). This last observation is in line with Kergoat *et al.* (2021), who found that the phosphatase activity of periphytic biofilms could be sensitive to chronic exposure to SMZ. Yang *et al.* (2020) also observed a significant inhibition of this activity in soil exposed for 28 days to SMZ concentrations ranging from about 14 to 223 mg SMZ kg⁻¹ dw soil. Whereas β -glucosidase and phosphatase activities (Fig. 2A and C) were not sensitive to low levels of SMZ (<4 μ g SMZ kg⁻¹ dw), leucine aminopeptidase activity (Fig. 2B) was found to be transiently stimulated at both low and high levels of SMZ exposure after 14 days of exposure ($p < 0.05$). This transient microbial response had also been observed previously by Kergoat *et al.* (2021) in periphytic biofilms exposed to mean SMZ concentrations ranging from about 106 to 157 ng SMZ L⁻¹. To our best knowledge, there is no other published study investigating the chronic effect of SMZ on the leucine aminopeptidase activity. However, there is evidence that this antibiotic can impact the N-cycle in different environmental compartments including soil (D'Alessio *et al.*, 2019) and sediment (Hou *et al.*, 2015), through changes in denitrification processes. This was also the case here (Fig. 2A), where we observed a slight but significant transient inhibition of denitrification in the high-SMZ treatment at D7 ($p < 0.05$) and a significant transient stimulation of this metabolic activity in the low-SMZ treatment at D14 and D21 ($p < 0.05$).

4. Conclusions

The contamination of surface water by environmental dissolved concentrations of sulfamethoxazole and sulfamethazine led to the accumulation of these two antibiotics in surface sediments. The mean maximum concentrations measured in the sediment (about 2.1 μ g SMX kg⁻¹ dw and 4.5 μ g SMZ kg⁻¹ dw) were representative of those reported in rivers contaminated by sulfonamides. The resulting chronic exposure over the 28-day experiment had contrasting effects on the measured activities of the sediment microbial communities, depending on the substance (SMX or SMZ), the exposure level and the exposure duration. The observed differences in toxicity of 2 antibiotics from the same class, the sulfonamides SMX and SMZ, remind to be cautious when extrapolating toxicity results from one antibiotic to another from the same class. While the SMZ treatments resulted in only transient effects on the five microbial activities investigated, we observed a significant stimulation of the β -glucosidase activity over the 28 days in the communities exposed to the high concentrations of SMX. Together with the stimulation of aerobic respiration at low SMX concentrations and the reduced concentration observed in the last days, our results suggest a potential biodegradation of this sulfonamide by microbial communities from sediments. Further research is needed to determine to what extent those communities can

contribute to the biodegradation of these pharmaceuticals. Given the key functional role of surface sediment microbial communities in streams and rivers, our findings suggest that the frequently reported contamination of sediments by sulfonamides is likely to affect microbial activities supporting biogeochemical cycles with a possible impact on ecosystem functioning.

REFERENCES

- Bonnineau C, Artigas J, Chaumet B, Dabrin A, Faburé J, Ferrari BJD, Lebrun JD, Margoum C, Mazzella N, Miège C, Morin S, Uher E, Babut M, Pesce S, 2020. Role of biofilms in contaminant bioaccumulation and trophic transfer in aquatic ecosystems: current state of knowledge and future challenges. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 253, 115-153. [Doi: 10.1007/398_2019_39](https://doi.org/10.1007/398_2019_39)
- Boxall ABA, Rudd MA, Brooks BW, Caldwell DJ, Choi K, Hickmann S, Innes E, Ostapyk K, Staveley JP, Verslycke T, Ankley GT, Beazley KF, Belanger SE, Berninger JP, Carriquiriborde P, Coors A, DeLeo PC, Dyer SD, Ericson JF, Gagne F, Giesy JP, Gouin T, Hallstrom L, Karlsson MV, Larsson DGJ, Lazorchak JM, Mastrocco F, McLaughlin A, McMaster ME, Meyerhoff RD, Moore R, Parrott JL, Snape JR, Murray-Smith R, Servos MR, Sibley PK, Straub JO, Szabo ND, Topp E, Tetreault GR, Trudeau VL, Van Der Kraak G, 2012. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environ. Health Perspect.* 120, 1221-1229. [Doi: 10.1289/ehp.1104477](https://doi.org/10.1289/ehp.1104477)
- Brandt KK, Amézquita A, Backhaus T, Boxall A, Coors A, Heberer T, Lawrence JR, Lazorchak J, Schönfeld J, Snape JR, Zhu Y-G, Topp E, 2015. Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms. *Environment International* 2015, 85, 189-205. [Doi: 10.1016/j.envint.2015.09.013](https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.013)
- Carstens KL, Gross AD, Moorman TB, Coats JR, 2013. Sorption and photodegradation processes govern distribution and fate of sulfamethazine in freshwater-sediment microcosms. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1877-1883. [Doi : 10.1021/es402100g](https://doi.org/10.1021/es402100g)
- Cavicchioli R, Ripple WJ, Timmis KN, Azam F, Bakken LR, Baylis M, *et al.*, 2019. Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 247-260. [Doi: 10.1038/s41579-019-0222-5](https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5)
- Chen C-E, Jones KC, Ying G-G, Zhang H, 2014. Desorption kinetics of sulfonamide and trimethoprim antibiotics in soils assessed with diffusive gradients in thin-films. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10, 5530-5536. [Doi : 10.1021/es500194f](https://doi.org/10.1021/es500194f)
- Chen K, Zhou JL, 2014. Occurrence and behavior of antibiotics in water and sediments from the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere* 95, 604-612. [Doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.09.119](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.119)

- Chen C, Yin G, Hou L, Liu M, Jiang Y, Zheng D, Gao D, Liu C, Zheng Y, Han P, 2021. Effects of sulfamethoxazole on coupling of nitrogen removal with nitrification in Yangtze Estuary sediments. *Environmental Pollution* 271, 116382. [Doi : 10.1016/j.envpol.2020.116382](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116382)
- Conover WJ, Johnson ME, Johnson MM, 1981. A Comparative Study of Tests for Homogeneity of Variances, with Applications to the Outer Continental Shelf Bidding Data. *Technometrics*, 23, 351-361. [Doi:10.1080/00401706.1981.10487680](https://doi.org/10.1080/00401706.1981.10487680)
- D'Alessio M, Durso LM, Miller DN, *et al.* 2019. Environmental fate and microbial effects of monensin, lincomycin, and sulfamethazine residues in soil. *Environ. Pollut.*, 246, 60-68. [Doi: 10.1016/j.envpol.2018.11.093](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.093)
- De Liguoro M, Fioretto B, Poltronieri C, Gallina G, 2009. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim. *Chemosphere* 75, 1519–1524. [Doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.02.002](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.002)
- Deng Y, Li B, Zhang T, 2018. Bacteria that make a meal of sulfonamide antibiotics: blind spots and emerging opportunities. *Environ. Sci. Technol.* 52, 3854–3868. [Doi:10.1021/acs.est.7b06026](https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06026)
- De Vries SL, Zhang P, 2016. Antibiotics and the terrestrial nitrogen cycle: a review. *Curr. Pollut. Rep.* 2, 51-67. [Doi: 10.1007/s40726-016-0027-3](https://doi.org/10.1007/s40726-016-0027-3)
- Foulquier A, Volat B, Neyra M, Bornette G, Montuelle B, 2013. Long-term impact of hydrological regime on structure and functions of microbial communities in riverine wetland sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 211–226. [Doi: 10.1111/1574-6941.12112](https://doi.org/10.1111/1574-6941.12112)
- Grenni P, Ancona V, Barra Caracciolo A, 2018. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal* 136, 25-39. [Doi: 10.1016/j.microc.2017.02.006](https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006)
- Hou L, Yin G, Liu M, Zhou J, Zheng Y, Gao J, Zong H, Yang Y, Gao L, Tong C, 2015. Effects of Sulfamethazine on Denitrification and the Associated N₂O Release in Estuarine and Coastal Sediments. *Environmental Science & Technology* 49, 326-333. [Doi: 10.1021/es504433r](https://doi.org/10.1021/es504433r)
- Huang Y, Wang Y, Huang Y, Zhang L, Ye F, Wang J, Shang J, Liao Q, 2020. Impact of sediment characteristics on adsorption behavior of typical antibiotics in Lake Taihu, China. *Sci. Total Environ.*, 718, 137329.1-137329.12. [Doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137329](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137329)
- Johansson CH, Janmar L, Backhaus T, 2014. Toxicity of ciprofloxacin and sulfamethoxazole to marine periphytic algae and bacteria. *Aquat. Toxicol.* 156, 248–258. [Doi: 10.1016/j.aquatox.2014.08.015](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.015)
- Kairigo P, Ngumba E, Sundberg L-R, Gachanja A, Tuhkanen T, 2020. Contamination of surface water and river sediments by antibiotic and antiretroviral drug cocktails in low and middle-income countries: Occurrence, risk and mitigation strategies. *Water* 12, 1376. [Doi: 10.3390/w12051376](https://doi.org/10.3390/w12051376)
- Kergoat L, Besse-Hoggan P, Leremboure M, Beguet J, Devers M, Martin-Laurent F, Masson M, Morin S, Roinat A, Pesce S, Bonnineau C, 2021. Environmental Concentrations of Sulfonamides Can Alter Bacterial

- Structure and Induce Diatom Deformities in Freshwater Biofilm Communities. *Front. Microbiol.* 12: 643719. Doi: 10.3389/fmicb.2021.643719
- Kovalakova P, Cizmas L, McDonald TJ, Marsalek B, Feng M, Sharma VK, 2020. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: a review. *Chemosphere* 251: 126351. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126351
- Li J, Cui M, 2020. Kinetic study on the sorption and degradation of antibiotics in the estuarine water: an evaluation based on single and multiple reactions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 42104–42114. Doi: [10.1007/s11356-020-10194-4](https://doi.org/10.1007/s11356-020-10194-4)
- Liu A, Cao H, Yang Y, Ma X, Liu X, 2016. Combinational effects of sulfamethoxazole and copper on soil microbial community and function. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4235–4241. Doi: 10.1007/s11356-015-4892-x
- Luo Y, Chen J, Wu C, Zhang J, Tang J, Shang J, Liao Q, 2019. Effect of particle size on adsorption of norfloxacin and tetracycline onto suspended particulate matter in lake. *Environ Pollut.* 244:549-559. Doi: 10.1016/j.envpol.2018.10.066.
- Mahamoud Ahmed A, Lyautey E, Bonnineau C, Dabrin A, Pesce S, 2018. Environmental concentrations of copper, alone or in mixture with arsenic, can impact river sediment microbial community structure and functions. *Front. Microbiol.* 9:1852. Doi: 10.3389/fmicb.2018.01852
- Martin-Laurent F, Topp E, Billet L, Batisson I, Malandain C, Besse-Hoggan P, Morin S, Artigas J, Bonnineau C, Kergoat L, Devers-Lamrani M, Pesce S, 2019. Environmental risk assessment of antibiotics in agroecosystems: ecotoxicological effects on aquatic microbial communities and dissemination of antimicrobial resistances and antibiotic biodegradation potential along the soil-water continuum. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 18930–18937. Doi: 10.1007/s11356-019-05122-0
- Paumelle M, Donnadieu F, Joly M, Besse-Hoggan P, Artigas J, 2021. Effects of sulfonamide antibiotics on aquatic microbial community composition and functions. *Environ. Int.* 146:106198. Doi: 10.1016/j.envint.2020.106198
- Pesce S, Ghiglione J-F, Topp E, Martin-Laurent F, 2020. Editorial: Microbial Ecotoxicology. *Front. Microbiol.* 11:1342. Doi: 10.3389/fmicb.2020.01342
- Pesce S, Perceval O, Bonnineau C, Casado-Martinez C, Dabrin A, Lyautey E, Naffrechoux E, Ferrari BJD, 2018. Looking at biological community level to improve ecotoxicological assessment of freshwater sediments: report on a first French-Swiss workshop. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 970–974. Doi: 10.1007/s11356-017-0620-z
- Ricken B, Corvini PF, Cichocka D, Parisi M, Lenz M, Wyss D, Martínez-Lavanchy PM, Müller JA, Shahgaldian P, Tulli LG, Kohler HP, Kolvenbach BA, 2013. Ipso-hydroxylation and subsequent fragmentation: a novel microbial strategy to eliminate sulfonamide antibiotics. *Appl Environ Microbiol* 79:5550–5558. Doi : 10.1128/AEM.00911-13

- Royston JP, 1982. An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* 31, 115–124. [Doi: 10.2307/2347973](https://doi.org/10.2307/2347973)
- Shi H, Yang Y, Liu M, Yan C, Yue H, Zhou J, 2014. Occurrence and distribution of antibiotics in the surface sediments of the Yangtze Estuary and nearby coastal areas. *Mar. Pollut. Bull.* 83, 317–323. [Doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.04.034](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.034)
- Straub JO, 2016. Aquatic environmental risk assessment for human use of the old antibiotic sulfamethoxazole in Europe. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 767–779. [Doi: 10.1002/etc.2945](https://doi.org/10.1002/etc.2945)
- Tlili, A., Jabiol, J., Behra, R., Gil-Allué, C., Gessner, M.O., 2017. Chronic Exposure Effects of Silver Nanoparticles on Stream Microbial Decomposer Communities and Ecosystem Functions. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2447–2455. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05508>
- Topp E, Chapman R, Devers-Lamrani M, Hartmann A, Marti R, Martin-Laurent F, Sabourin L, Scott A, Sumarah M, 2013. Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure, and isolation of a sulfamethazine-degrading sp. *J. Environ. Qual.* 42, 173–178. [Doi: 10.2134/jeq2012.0162](https://doi.org/10.2134/jeq2012.0162)
- U.S. Environmental Protection Agency, 2019. ECOTOX User Guide: ECOTOXicology Knowledgebase System. Version 5.0.
- Wickham H, 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Woappi Y, Gabani P, Singh A, Singh OV, 2016. Antibiotrophs: the complexity of antibiotic-subsisting and antibiotic-resistant microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 17–30. [Doi: 10.3109/1040841X.2013.875982](https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.875982)
- Xu H, Lu G, Xue C, 2020. Effects of Sulfamethoxazole and 2-Ethylhexyl-4-Methoxycinnamate on the Dissimilatory Nitrate Reduction Processes and N₂O Release in Sediments in the Yarlung Zangbo River. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17, 1822. [Doi: 10.3390/ijerph17061822](https://doi.org/10.3390/ijerph17061822)
- Yang L-H, Ying G-G, Su H-C, Stauber JL, Adams MS, Binet MT, 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1201–1208. [Doi: 10.1897/07-471.1](https://doi.org/10.1897/07-471.1)
- Yang R, Xia X, Wang J, Zhu L, Wang J, Ahmad Z, Yang L, Mao S, Chen Y. 2020. Dose and time-dependent response of single and combined artificial contamination of sulfamethazine and copper on soil enzymatic activities. *Chemosphere.* 250: 126161. [Doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126161](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126161).
- Yergeau E, Lawrence JR, Waiser MJ, Korber DR, Greer CW, 2010. Metatranscriptomic analysis of the response of river biofilms to pharmaceutical products, using anonymous DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5432–5439. [Doi: 10.1128/aem.00873-10](https://doi.org/10.1128/aem.00873-10)

Yergeau E, Sanschagrin S, Waiser MJ, Lawrence JR, Greer CW, 2012. Sub-inhibitory concentrations of different pharmaceutical products affect the meta-transcriptome of river biofilm communities cultivated in rotating annular reactors. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 350–359. Doi: [10.1111/j.1758-2229.2012.00341.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00341.x)

Zheng D, Yin G, Liu M, Chen C, Jiang Y, Hou L, Zheng Y, 2021. A systematic review of antibiotics and antibiotic resistance genes in estuarine and coastal environments. *Science of The Total Environment* 777, 146009. Doi: [10.1016/j.scitotenv.2021.146009](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146009)

Zhong Z, Xu J, Zhang Y, Li L, Guo C, He Y, Fan W, Zhang B, 2013. Adsorption of sulfonamides on lake sediments. *Front. Environ. Sci. Eng.* 7, 518–525. Doi: [10.1007/s11783-013-0500-9](https://doi.org/10.1007/s11783-013-0500-9)

RÉSUMÉ

Fonction émergente dans la littérature scientifique, l'antibiotrophie est la capacité bactérienne de métabolisation des antibiotiques. Envisagée comme outil de bioremédiation, elle demeure un risque sanitaire de par son association à l'antibiorésistance. Cette thèse a eu pour premier but d'étudier sa dispersion au sein des agrosystèmes chargés en antibiotiques lors de deux évènements de coalescence que sont l'épandage de lisier sur le sol puis l'érosion de ce dernier vers le compartiment aquatique. Les expérimentations ont mis en évidence l'invasion systématique des communautés bactériennes telluriques et sédimentaires par l'antibiotrophe *Microbacterium* sp. C448 lorsque la sulfaméthazine est présente mais pas nécessairement minéralisée. L'antibiotique aurait envers cette souche une double fonction : diminuer la compétition par son action biocide sur la communauté et constituer une source nutritive exclusive lorsque cela est nécessaire. Ces travaux rapportent aussi l'isolement de deux nouvelles souches antibiotrophes, issues de sédiments naturels de rivières et qui sont phylogénétiquement et fonctionnellement proches de celles déjà répertoriées. Cela souligne l'omniprésence sous-estimée de la fonction et sa probable récente dispersion généralisée. Abordant la thématique de la dispersion bactérienne en générale, ces expériences ont mis en évidence des transferts bactériens entre compartiments environnementaux différents pouvant être influencés par la contamination en antibiotique, interpellant de ce fait sur la nécessité de s'intéresser au cas précis des bactéries antibiotrésistantes.

Mots clés : biodégradation des sulfonamides, antibiorésistance, coalescence bactérienne, communauté bactérienne, érosion, épandage.

ABSTRACT

An emerging function in the scientific literature, antibioticrophy is the bacterial capacity to metabolize antibiotics. Considered a bioremediation tool, it remains a health risk due to its association with antibiotic resistance. The first goal of this thesis was to study its dispersion within agrosystems contaminated with antibiotics during two coalescence events, i.e. manure spreading on the soil and its erosion towards the aquatic compartment. Experiments have shown the systematic invasion of the soil and sediment bacterial communities by the antibioticroph *Microbacterium* sp. C448 when sulfamethazine is present but not necessarily mineralized. The antibiotic would have a double function towards this strain: to decrease the competition by its biocidal action on the community and to constitute an exclusive nutritive source when necessary. This work also reports the isolation of two new antibioticrophic strains from natural river sediments that are phylogenetically and functionally close to those already known. This highlights the underestimated ubiquity of the antibioticrophy function and its probable recent widespread dispersal. Addressing the theme of bacterial dispersal in general, these experiments have highlighted bacterial transfers between different environmental compartments that can be influenced by antibiotic contamination, thus calling for the need to focus on the specific case of antibiotic-resistant bacteria.

Keywords: sulfonamide biodegradation, antibiotic resistance, bacterial coalescence, bacterial community, erosion, manure application.