

Résistance aux antibiotiques et aux métaux chez des *Bacillus cereus* isolés de sols aurifères provenant de régions différentes

Z. MOUREAU*, J. SWINGS**, F. BERHIN***, E. SULTEN*, K. VAN HONACKER**, J. REMACLE***, B. CHAMPENOIS* ET H. NEYBERGH****

*Institut royal des Sciences naturelles, rue Vautier 29, 1040 Bruxelles (Belgique)

**Laboratorium voor Microbiologie, Ledeganckstraat 35, 9000 Gent (Belgique)

***Laboratoire d'Ecologie microbienne, B22, Sart-Tilman, Liège (Belgique)

****Service Géologique de Belgique, rue Jenner 13, 1040 Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

Depuis 1988 nous nous intéressons au rôle des *Bacillus* du groupe *cereus* dans la localisation des gisements aurifères (Neybergh et al. 1989 et 1990). En effet, il apparaît que ces bactéries, à la fois résistantes à certains antibiotiques et à certains métaux, sont compétitivement favorisées dans les sols métallifères. Elles peuvent donc servir d'indicateurs.

Un des aspects de notre travail fut de caractériser une centaine de *Bacillus* prélevés dans des zones aurifères d'origines géographiques différentes et de vérifier leur résistance à 14 antibiotiques et à 5 métaux. Il est apparu 2 types de populations en fonction de leur résistance à des antibiotiques particuliers.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

99 souches bactériennes ont été isolées de sols présumés aurifères du Limousin (France), des Cévennes (France), de la Croix-Scaille (Belgique) et du Soudan (Afrique). La résistance aux antibiotiques suivants a été étudiée au moyen de pastilles placées sur boîtes de gélose Mueller-Hinton:

Néomycine (30 µg)	Amoxicilline (25 µg)	Streptomycine (10 µg)
Colistine (10 µg)	Pénicilline G (10 U)	Erythromycine (15 µg)
Kanamycine (30 µg)	Carbenicilline (100 µg)	Polymyxine B (300 U)
Ampicilline (10 µg)	Tétracycline (30 µg)	Chloramphenicol (30 µg)
Gentamicine (10 µg)	Rifampicine (30 µg)	

Par la suite, la CMI (concentration minimale inhibitrice) de la colistine a été vérifiée sur 9 souches au moyen de galeries ATB CMI. Les souches ont été caractérisées au moyen de galeries API CHB 50 et par analyse des acides gras suivant la méthode MIS (Microbial Identification System; Microbial ID, Inc; Delaware, USA).

Les CMI du cuivre, du zinc, de l'antimoine et de l'arsenic ont été déterminées, en milieu de culture liquide, pour un ensemble de souches appartenant au groupe précédent.

RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

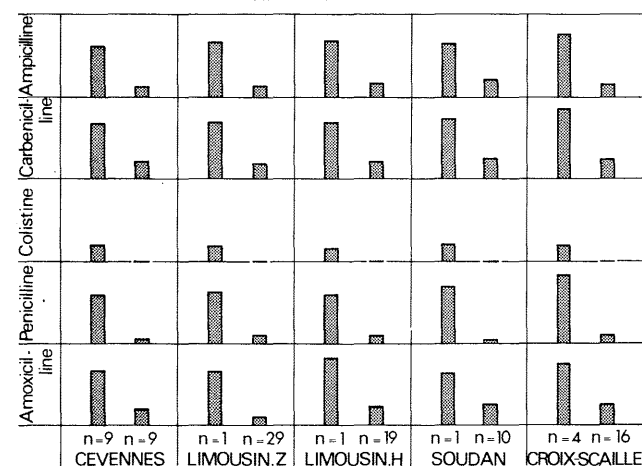
Les résultats de l'étude de la résistance aux antibiotiques ne se révélèrent significatifs que pour l'amoxicilline, la colistine, la pénicilline, l'ampicilline et la carbenicilline. En conséquence seuls ces derniers ont été pris en considération par la suite. En mettant les résultats sous forme d'un togramme on distingue 2 populations à résistance différente. Ceci est mis en évidence dans le tableau ci-joint. On y constate notamment que les souches de type II sont absolument résistantes à 10 µg de colistine par pastille. Une recherche de la CMI sur 9 souches du groupe *B. cereus* a montré que la résistance a atteint 5 fois 16 mg/l, 3 fois 32 mg/l et même 1 fois 128 mg/l.

Les souches testées se sont révélées particulièrement résistantes au zinc, à l'antimoine et à l'arsenic. Ces 2 derniers métaux sont connus comme étant souvent associés à l'or. Leurs CMI s'élevaient au maximum à 40 mM d'antimoine, 2,5 mM d'arsenic et 2 mM de zinc.

Après caractérisation des souches, on a pu constater que le type II appartient au complexe des *Bacillus cereus-mycoïdes-thuringiensis* tandis que les autres, du type I, appartiennent à des *Bacillus* divers: *B. subtilis*, *B. laterosporus*, *B. megaterium* et *B. alvei*.

La population de type II est nettement résistante à la colistine, ce qui pourrait faire de cet antibiotique un critère de détermination. En outre la colistine, qui est en fait une bactériocine produite par des *Bacillus* du sol, agit essentiellement sur les Gram-négatif, ce qui pourrait jouer un rôle dans les phénomènes de compétition dans les sols.

DIFFÉRENCIATION DES POPULATIONS I ET II PAR LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES. COMPARAISON DE LA MOYENNE DES ZONES D'INHIBITION PAR A.B. ET PAR RÉGION (n=nombre de souches dans chacune des populations)



Neybergh, H. and al. (1989) Biochemical prospection: application to gold deposit research. Study of the relationship between the *Bacillus cereus* content and gold content in the soil. Intern. symposium "Gold 89 in Europa". Toulouse 1989.

Neybergh, H. and al. (1990) Study of the *Bacillus cereus-mycoïdes-thuringiensis* complex present in auriferous soils. Intern. Symp. Geoch. Prosp. Prague, août 1990 à paraître.

Rapp. Comm. int. Mer Médit., 32, 1 (1990).

Linkage of heavy-metals and antibiotics resistance of bacterial strains isolated from the marine environment

Manuel AVILES*, Antonio DE VICENTE*, Juan C. CODINA* and Pedro ROMERO*

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071-Málaga (Spain)

Introduction.

The resistance ability of some microbial groups against heavy metals and antibiotics has been detected frequently. Some studies show that the strains resistant to these agents can be isolated from different environments, such as gastrointestinal tract of man and domestic animals, aquatic environments, soils and clinical samples (3,4,5). The high frequencies of resistant strains may be caused by the selection process induced by heavy metal pollution of these environments and the widespread use of antibiotics in agriculture and medicine. Genetic transfer is considered to be another factor responsible for increasing the isolation frequencies of these strains. The purpose of this study is to determine the relationship between heavy metal and antibiotic resistance patterns of microorganisms (bacterial indicators and pathogens) isolated from the marine environment (water, shellfish and sediments).

Material and Methods.

Samples were collected in the marine area near the Guadalhorce river mouth and in beaches affected by sewage discharges in Málaga (Spain). The studied microorganisms belong to two groups: fecal pollution indicators (Coliforms and Fecal Streptococci), and pathogens (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio* spp, and *Staphylococcus* spp). The culture media employed for isolation of the microorganisms were: Endo agar, KF agar, Cetrimide agar, XLD agar, mA agar, TCBS agar and Mannitol salt agar for each microbial group, respectively. The study of heavy metal and antibiotic resistance patterns were determined by the agar dilution method and the disk diffusion method, respectively (6).

Results and Discussion.

The results obtained are summarized in Table 1, which shows the most frequent patterns of multiresistance to metals and antibiotics of each microbial group. *Pseudomonas aeruginosa* presents the widest resistance profile; it should be noted that this is the general profile, and in addition some strains are also resistant to other agents, such as arsenate, streptomycin or sulfamides. These results are in agreement with those obtained by other authors (2,4,6).

In general, for Gram-negative microorganisms, except for *Salmonella* spp, the resistance patterns generally include the resistance to arsenate and amoxicillin, which seems to indicate a possible association of the resistance to both agents. Among Gram-positive microorganisms, the resistance pattern of *Staphylococcus* spp is more similar to the Gram-negative patterns, than to that of the Fecal Streptococci. Fecal Streptococci do not present a significant resistance to heavy metals. The linkage of resistance to mercury and amoxicillin is observed in *P. aeruginosa* and some Coliform strains, according to the results obtained by other authors (1,4).

TABLE 1. Heavy-metal and antibiotic multi-resistance patterns of bacterial strains frequently isolated from the marine environment.

MICROORGANISMS	RESISTANCE PATTERNS	FREQUENCY (%)
<i>P. aeruginosa</i> (n=25)	Cd-Cr-Hg-AMX-CF-K-C-NA-SXT	28.0
	Cd-Cr-AMX-CF-K-C-NA-SXT	28.0
	Cd-Cr-Hg-AMX-CF-K-NA-SXT	12.0
Coliforms (n=56)	As-Hg-AMX	28.5
	As-AMX-CB-S-G	8.9
<i>Salmonella</i> spp (n=15)	-	-
<i>A. hydrophila</i> (n=32)	As-AMX-CF	40.6
<i>Vibrio</i> spp (n=22)	As-AMX-TE	36.3
<i>Staphylococcus</i> spp (n=12)	Cr-AMX	41.7
Fecal Streptococci (n=41)	Zn-S-K-L-G	31.7

As: Arsenate	AMX: Amoxicillin	NA: Nalidixic Acid
Cd: Cadmium	CB: Carbenicillin	S: Streptomycin
Cr: Chromium	CF: Cephalothin	G: Sulfamides
Hg: Mercury	C: Chloramphenicol	TE: Tetracycline
Zn: Zinc	K: Kanamycin	SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazole
	L: Lincosamin	

References:

- JOLY, B.; R. CLUZEL; P. HENRI & J. BARJOT, 1976. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 127B: 57-68.
- JOLY, B.; J. ALAME; R. CLUZEL & D. PEPIN, 1979. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 130B: 341-347.
- KELCH, W.J. & J.S. LEE, 1978. Appl. Environ. Microbiol., 36: 450-456.
- MARQUES, A.M.; F. CONGREGADO & M.D. SIMON-PUJOL, 1979. J. Appl. Bacteriol., 47: 347-350.
- NAKAHARA, H.; T. ISHIKAWA; Y. SARAI; I. KONDO; H. KOZUKU & S. SILVER, 1977. Appl. Environ. Microbiol., 33: 975-976.
- DE VICENTE, A., 1986. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.

This work was supported by a grant of Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía.

Rapp. Comm. int. Mer Médit., 32, 1 (1990).