POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Priorisation des sources de contamination fécale en milieu urbain : pertinence de l'utilisation de marqueurs moléculaires et chimiques comme traceurs de rejets d'eaux usées

MOUNIA HACHAD

Département des génies civil, géologique et des mines

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiæ Doctor*

Génie civil

Décembre 2021

© Mounia Hachad, 2021.

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Cette thèse intitulée:

Priorisation des sources de contamination fécale en milieu urbain : pertinence de l'utilisation de marqueurs moléculaires et chimiques comme traceurs de rejets d'eaux usées

présentée par Mounia HACHAD

en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiæ Doctor*

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Benoit BARBEAU, président
Sarah DORNER, membre et directrice de recherche
Michèle PRÉVOST, membre et codirectrice de recherche
Émilie BÉDARD, membre
Hubert CABANA, membre externe

DÉDICACE

Les gens civilisés devraient pouvoir se débarrasser de leurs eaux usées d'une meilleure façon qu'en les mettant dans l'eau potable.

Theodore Roosevelt, 1910

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier ma directrice de recherche Sarah Dorner pour avoir encadré ce travail de recherche et pour la confiance et l'autonomie qu'elle m'a accordée. Merci sincèrement pour son aide et pour les précieux conseils et les belles opportunités qu'elle m'as offertes. Je remercie très sincèrement Michèle Prévost, ma co-directrice de projet, pour son aide, ces encouragements et les précieux conseils.

Un grand merci aussi aux membres de jury Benoit Barbeau, Émilie Bédard et Hubert Cabana pour leur temps et pour l'intérêt qu'ils ont porté à l'évaluation de mon travail.

Je tiens à remercier toute l'équipe technique de la chaire d'eau potable, Yves, Jacinthe, Julie, Mélanie, Mireille pour leur aide et tous leurs conseils, autant pour le terrain que pour les manipulations au laboratoire.

Un grand merci au professeur Sébastien Sauvé, Sung Vo Duy pour l'accueil chaleureux aux laboratoires de l'UdeM, l'aide technique ainsi que les révisions d'articles.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'INRS Laval, le professeur Richard Villemur, Karla, Rose pour l'analyses des marqueurs moléculaires, tous les échanges, révisions et interprétations des résultats.

Merci également à Jean-Baptiste Burnet, Émile Sylvestre pour les discussions, aide et conseils lors des échantillonnages ciblés. Ce fut une expérience inoubliable.

J'exprime toute ma gratitude à ma grande amie Mariam Hajj-Mohamad, pour son aide, son soutien moral et conseils tout au long du projet. Mes remerciements vont également aux stagiaires, Marwane, Rose-Mery, Céleste pour leur aide précieuse sur le terrain et au laboratoire.

Finalement, j'exprime toute ma reconnaissance à ma mère, mes deux sœurs et mon frère pour leur amour et leur soutien inconditionnel.

RÉSUMÉ

Une gestion efficace des épisodes de contamination fécale des systèmes aquatiques nécessite dans un premier temps une identification des sources de contamination avant de pouvoir mettre en place des pratiques de gestion et de restauration de la qualité d'un système. Les indicateurs bactériens classiques (*E. coli,* coliformes fécaux) utilisés dans le suivi de la qualité des eaux bien qu'ils indiquent la présence d'une charge fécale récente ne permettant pas une différenciation de l'origine de la pollution fécale. Un travail important a été réalisé ces dernières années afin de développer une nouvelle approche, dénommée le suivi de sources microbiennes (SSM) ou Microbial Source Tracking (MST). Les techniques de suivi des sources microbiennes sont destinées à permettre aux praticiens et aux chercheurs d'identifier la ou les sources de pollution fécale dans les eaux. Plusieurs recherches ont permis d'identifier des marqueurs microbiologiques et chimiques susceptibles de discriminer les différentes sources, cependant, il n'existe pas de méthodes « standard » définies pour l'approche MST. L'importance d'utiliser plusieurs marqueurs a été soulignée à plusieurs reprises dans la littérature et une approche pragmatique et pratique a semblé être l'adoption d'une « boîte à outils » ou MST « toolbox » constituées de différents marqueurs de suivi des sources. Cette thèse a été consacrée en premier lieu à l'application et la validation de boîtes à outils opérationnelle composées de marqueurs chimiques et moléculaires permettant de tracer les contaminations fécales d'origine humaine (eaux usées) et ce en différentes matrices environnementales et dans différentes conditions hydrométéorologiques et en deuxième lieu au suivi du devenir et du comportement des marqueurs dans le milieu naturel. Pour ce faire, 3 grands objectifs ont été ciblés. Le premier objectif vise à identifier et cibler par temps sec, les exutoires pluviaux contenant des rejets d'origine domestique et localiser les conduites contenant un ou des raccordements inversés, cet objectif s'inscrit dans le plan d'action visant la recherche et

l'élimination/correction des raccordements illicites dans plusieurs municipalités au Québec tels qu'exigé par le ministère des affaires municipales et de l'occupation du territoire. Le but était d'utiliser une approche innovatrice et des technologie avancées permettant de délimiter et prioriser avec précision les secteurs résidentiels problématiques, c'est-à-dire des tronçons de rues susceptibles d'être affectés par des raccordements inversés (Ri). Pour cela, nous avons testé l'utilisation d'une « boîte à outils » constituée d'un indicateur traditionnel (*E. coli*), de 3 micropolluants d'eaux usées : la caféine, la théophylline et la carbamazépine et deux marqueurs moléculaires spécifiques des contaminations fécales d'origine humaine : le marqueur *Bacteroidale* HF183 et l'ADN mitochondrial. À partir de l'approche « boîte à outils » impliquée dans cette recherche, un indice sanitaire pour identifier les Ri a été développé et testé sur le terrain. Les marqueurs étudiés en particulier le HF183, la caféine et la théophylline étaient détectés en temps sec dans plusieurs conduites pluviales avec des concentrations variables indiquant que le système de conduites pluviales étudié était largement contaminé par les eaux sanitaires. Les résultats ont permis de démontrer qu'avec *E. coli*, aucuns des marqueurs testés n'était à lui seul suffisant pour déterminer l'origine de la pollution fécale dans le réseau pluvial et que l'utilisation d'une combinaison de marqueurs spécifiques des rejets d'eaux usées était plus efficace pour détecter les raccordements illicites (Ri/ exfiltration-infiltration entre conduites). A la suite des résultats, huit maisons mal raccordées ont été identifiées et corrigées.

Les précipitations intenses et les événements de fonte des neiges représentent une menace pour les eaux de surface, sources d'eau potable. De grandes quantités de matières fécales peuvent être rejetées par les débordements d'égout unitaires et les dérivations d'eaux usées traitées ou non traitées aux stations d'épuration. Le 2ème objectif était d'évaluer l'impact des rejets d'eaux usées en temps de pluie sur la qualité microbiologique des prises d'eau potable et la pertinence des

marqueurs de suivi des sources fécales à capturer la contribution des eaux usées au pic de contamination et des pathogènes en période de haute vulnérabilité des prises d'eau. Un suivi temporel des sources microbiennes, des sources chimiques, de pathogènes, des indicateurs de qualité de l'eau (*E. coli*, turbidité) et des données hydrométéorologiques (débit, précipitations) a été effectué pour évaluer la vulnérabilité de 3 prises d'eau potable. Pour cela, des échantillons d'eau ont été prélevés lors d'événements de fonte des neiges couplés ou non aux épisodes de pluie et analysés pour les pathogènes (*Cryptospordium*, *Giardia* et virus), le marqueur d'ADN mitochondrial humain, le marqueur *Bacteroidales* HF183, les micropolluants des eaux usées y compris la caféine, la carbamazépine, la théophylline et l'acétaminophène dans le bassin versant urbain, et pour l'ADN mitochondrial humain, bovin et porcin dans le bassin versant agricole. Le suivi des événements a révélé que des pointes de contamination microbiennes et chimiques étaient déclenchées par les événements de précipitations/fonte de neige étudiées, les concentrations des marqueurs variaient généralement sur ~1Log au cours de chaque événement en comparaison avec les concentrations obtenues en temps sec. Des concentrations élevées des marqueurs spécifiques des eaux usées ont confirmé avec certitude l'impact des rejets d'eaux usées en amont de la prise d'eau. Une dynamique similaire du marqueur *Bactéroidale* HF183 d'origine humaine avec *E. coli*, *Giardia*, *Cryptospridium* et adénovirus a été observée suggérant que ce dernier pourrait être un bon marqueur de contribution d'eaux usées non traitées aux pics de contamination et la présence de pathogènes. Dans le bassin versant agricole, une pollution fécale mixte a été observée avec des occurrences d'ADN mitochondrial humain, bovin et porcin indiquant une charge accrue de polluants fécaux provenant de sources diffuses. Cette étude a démontré la valeur de l'échantillonnage ciblé lors des événements à haut risque et de l'utilisation de marqueurs de suivi de sources microbienne et chimique pour évaluer de manière plus fiable la contamination ponctuelle ou diffuse par les eaux usées sur le bassin versant.

Un des critères clé des marqueurs de contamination fécale est leur persistance dans l'environnement. Cette dernière est variable d'un composé à l'autre car elle dépend entre autres des conditions environnementales: aérobie/anaérobie, température, nature de la matrice environnementale et phase (dissoute ou particulaire). Le 3ème objectif impliquait un suivi spatio-temporel en temps sec et en temps de pluie de la dynamique d'*E. coli*, et six micropolluants traceurs d'eaux usées à savoir l'acétaminophène, la caféine, la théophylline, la carbamazépine, le 2-hydroxycarbamazépine, et l'aspartame entre la phase dissoute, la phase particulaire et les sédiments dans un cours d'eau impacté par plusieurs rejets d'effluents traités et de points de surverse. Dans les eaux de la rivière réceptrice, en plus de la phase aqueuse, *E. coli* et les micropolluants étaient présents à la fois dans la phase particulaire et dans les sédiments, même pour les micropolluants ayant une faible capacité de sorption. L'acétaminophène, la caféine, la théophylline et la carbamazépine ont montré une large distribution et ont été détectés dans toutes les matrices. Le 2-hydroxycarbamazépine (CBZ-2OH) et l'aspartame ont montré un niveau significatif d'association avec les particules en suspension, étant exclusivement détectés dans la phase particulaire. Les concentrations moyennes variaient de 8,8 ng/L (carbamazépine) à 4656 ng/L (acétaminophène) dans la phase aqueuse, de 120 (caféine) à 8441 ng/g dw (acétaminophène) dans la phase particulaire, et de 2,9 (carbamazépine) à 136 ng/g dw (aspartame) dans les sédiments. En comparant les concentrations par temps sec et par temps de pluie, trois principaux schémas ont été observés en fonction des composés: (i) les eaux usées sont diluées par les eaux pluviales dans la phase aqueuse et la phase particulaire pour les composés à faible efficacité d'élimination dans les stations de traitement des eaux usées : carbamazépine, CBZ-2OH et l'aspartame ; (ii) hausse de 39 % à 59 % des concentrations en *E. coli* attachées aux particules en suspension en temps de pluie (iii) augmentation des concentrations des micropolluants à haute efficacité d'élimination dans les stations de traitement des eaux usées (acétaminophène, la caféine, la théophylline) dans la phase

particulaire en raison des dérivations des eaux usées et de la mobilisation des sédiments dans les égouts ; (iv) aucune différence significative n'a été observée pour les concentrations de sédiments superficiels après les événements pluvieux, bien qu'une variabilité spatiale ait été observée. Les résultats soulignent l'importance de surveiller la phase particulaire, en particulier par temps de pluie, car les charges de contamination fécale véhiculées par la fraction dissoute pourraient être masquées par la dilution. Pour une meilleure compréhension du comportement des marqueurs et localisation des sources potentielles, une stratégie d'échantillonnage spatio-temporel est nécessaire.

ABSTRACT

Effective management of fecal contamination episodes in aquatic systems requires first identifying the sources of contamination before being able to put in place management practices to restore the quality of a system. Fecal indicator bacteria (*E. coli*, fecal coliforms) are used for monitoring water quality; however, they indicate the presence of a recent fecal load and do not allow a differentiation of the origin of the fecal pollution. A lot of work has been done in recent years to develop a new approach, named Microbial Source Tracking (MST). Microbial source tracking techniques are intended to allow practitioners and researchers to identify the source(s) of fecal pollution in waters. Several studies have identified microbiological and chemical markers that can discriminate among sources; however, there are no defined "standard" methods for the MST approach. The importance of using several markers has been repeatedly emphasized in the literature and a pragmatic and practical approach is the adoption of a "toolbox" or MST "toolbox" consisting of different source tracking markers. This thesis was devoted firstly to the application and validation of operational toolboxes composed of chemical and molecular markers allowing to track human fecal contamination (wastewater) in different environmental matrices and in different hydrometeorological conditions and secondly to the monitoring of the fate and behavior of markers in the natural environment. To do this, 3 main objectives have been targeted. The first objective is in line with the action plan aimed at the research and elimination/correction of illicit connections in several municipalities in Quebec as required by the Ministry of municipal affairs, regions and land occupancy. The goal was to use an innovative approach and advanced technology to accurately delineate and prioritize problematic residential areas, i.e., street sections likely to be affected by cross-connections. For this purpose, we tested the use of a "toolbox" consisting of a traditional indicator (*E. coli*), 3 wastewater micropollutants: caffeine, theophylline, and

carbamazepine, and two molecular markers specific to human fecal contamination: the Bacteroidale HF183 marker and mitochondrial DNA. Based on the "toolbox" approach involved in this research, a health index to identify Ri was developed and field tested. The markers studied, in particular HF183, caffeine, and theophylline, were detected in dry weather in several storm drains with varying concentrations indicating that the storm drain system studied was extensively contaminated with sanitary water. The results demonstrated that with *E. coli*, none of the tested markers alone was sufficient to determine the origin of fecal pollution in the stormwater system and that the index/multi-tracer approach specific to wastewater discharges was more effective in detecting illicit connections (cross-connection/ exfiltration-infiltration between pipes). As a result of the results, eight improperly connected houses were identified and corrected.

Intense precipitation and snowmelt events present a major hazard to surface water sources of drinking water. Large quantities of fecal material can be discharged from combined sewer overflows and treated or untreated wastewater by-passes to treatment plants. The second objective was to evaluate the impact of wastewater discharges during rainfall on the microbiological quality of drinking water intakes and the suitability of fecal source tracking markers to capture the contribution of wastewater to peak contamination and pathogens during periods of high intake vulnerability. Temporal monitoring of microbial sources, chemical sources, pathogens, water quality indicators (*E. coli*, turbidity) and hydrometeorological data (flow, precipitation) was conducted to assess the vulnerability of 3 drinking water intakes. To do so, water samples were collected during snowmelt events coupled or not with rain events and analyzed for pathogens (*Cryptospordium*, *Giardia* and viruses), the human mitochondrial DNA marker, Bacteroidales marker HF183, wastewater micropollutants including caffeine, carbamazepine, theophylline, and acetaminophen in the urban watershed, and for human, bovine, and swine mitochondrial DNA in

the agricultural watershed. Event monitoring revealed that spikes in microbial and chemical contamination were triggered by the precipitation/snowmelt events studied, with marker concentrations generally varying over ~1 order of magnitude during each event compared to concentrations obtained during dry weather. Elevated concentrations of the wastewater-specific markers strongly confirmed the impact of wastewater discharges upstream of the intake. Similar dynamics of the human-derived bacterial marker HF183 with *E. coli*, *Giardia, Cryptospridium* and adenovirus were observed suggesting that the latter could be a good marker of untreated wastewater contribution to peak contamination and pathogen presence. In the agricultural watershed, mixed fecal pollution was observed with occurrences of human, bovine and porcine mitochondrial DNA indicating an increased load of fecal pollutants from diffuse sources. This study demonstrated the value of targeted sampling during high-risk events and the use of microbial and chemical source tracking markers to assess point or non-point wastewater contamination more reliably in the watershed.

One of the key criteria of fecal contamination markers is their persistence in the environment. This persistence is variable from one compound to another because it depends on environmental conditions: aerobic/anaerobic, temperature, nature of the environmental matrix and phase (dissolved or particulate). The third objective involved a spatial-temporal monitoring in dry and rainy weather of the dynamics of *E. coli*, and six wastewater tracer micropollutants namely acetaminophen, caffeine, theophylline, carbamazepine, 2-hydroxycarbamazepine, and aspartame between the dissolved phase, the particulate phase, and the sediments in a river impacted by several discharges of treated effluent and overflow points. In the receiving river waters, in addition to the aqueous phase, *E. coli* and micropollutants were present in both the particulate phase and sediment, even for micropollutants with low sorption capacity. Acetaminophen, caffeine, theophylline, and

carbamazepine showed wide distribution and were detected in all matrices. 2-Hydroxycarbamazepine (CBZ-2OH) and aspartame showed a significant level of association with suspended particulate matter, being detected exclusively in the particulate phase. Mean concentrations ranged from 8.8 ng/L (carbamazepine) to 4656 ng/L (acetaminophen) in the aqueous phase, from 120 (caffeine) to 8441 ng/g dw (acetaminophen) in the particulate phase, and from 2.9 (carbamazepine) to 136 ng/g dw (aspartame) in sediment. Comparing dry and wet weather concentrations, three main patterns were observed depending on the compounds: (i) wastewater is diluted by stormwater in the aqueous and particulate phase for compounds with low removal efficiencies: carbamazepine, CBZ-2OH, and aspartame; (ii) 39% to 59% increase in *E. coli* attached to suspended particulate matter in wet weather ; (iii) increased concentrations of high removal efficiency micropollutants at wastewater treatment plants (acetaminophen, caffeine, theophylline) in the particulate phase due to wastewater by-pass and sediment mobilization in sewers occurred during wet weather; (iv) no significant differences were observed for surface sediment concentrations after rain events, although spatial variability was observed. The results emphasize the importance of monitoring the particulate phase, especially during rainy weather, as fecal contamination loads carried by the dissolved fraction could be masked by dilution. For a better understanding of marker behavior and location of potential sources, a spatial and temporal sampling strategy is required.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE III

REMERCIEMENTS IV

RÉSUMÉ V

ABSTRACT X

TABLE DES MATIÈRES XIV

LISTE DES TABLEAUX XIX

LISTE DES FIGURES XXI

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS XXIII

LISTE DES ANNEXES XXIV

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE 7

2.1 Contamination fécale et risque sanitaire 7

2.2 Sources de contamination fécale en milieu urbain 7

2.3 Microbial Source Tracking (MST) : suivi des sources microbiennes 10

2.3.1 Méthodes classiques 10

2.3.2 Méthodes moléculaires 18

2.4 Chemical Source Tracking (CST) : suivi des sources chimiques 21

2.5 Devenir et dynamique des marqueurs chimiques et microbiologiques dans l'environnement aquatique 27

2.5.1 Marqueurs et indicateurs microbiologiques 27

2.5.2 Marqueurs et micropolluants chimiques 35

CHAPITRE 3 OBJECTIFS DE RECHERCHE ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE 38

3.1 Objectif principal 39

3.2 Objectifs spécifiques 39

3.3 Hypothèses de recherche 41

3.4 Méthodologie 44

3.4.1 Échantillonnage et description des bassins versant 44

Bassin versant de la rivière des Mille-Îles 44

Sous-bassin versant de la rivière Noire 47

3.5 Méthode de prélèvements et traitement des échantillons 48

3.6 Stratégie et plan d'échantillonnage 49

3.7 Sélection des indicateurs de contamination fécale 52

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: LOCATING ILLICIT DISCHARGES IN STORM SEWERS IN URBAN AREAS USING MULTI-PARAMETER SOURCE TRACKING: FIELD VALIDATION OF A TOOLBOX COMPOSITE INDEX TO PRIORITIZE HIGH RISK AREAS 55

4.1 Abstract 55

4.2 Introduction 56

4.3 Materials and Methods 60

4.3.1 Sub catchment descriptions and water collection 60

4.3.2 Analyses of FIB, CST and MST DNA human specific markers 61

4.3.3 Data processing and statistical analysis 62

4.3.4 Composite index 63

4.4 Results 64

4.4.1 Receiving waters and storm sewer outfall monitoring 64

4.4.2 Storm sewer drains human sewage investigation 69

4.4.3 Correlation between human genetic markers and sewage chemical markers with FIB 73

4.4.4 Household misconnection and illicit discharges identification approach 74

4.5 Discussion 77

4.6 Conclusions 86

CHAPITRE 5 APPLICATION DE L'APPROCHE MST POUR ÉVALUER LA CONTRIBUTIONS DES EAUX USÉES AUX PICS DE CONTAMINATION DES PRISES D'EAU POTABLE..... 88

5.1 Résumé 88

5.2 Introduction 89

5.3 Matériel et Méthodes 93

5.3.1 Description des bassins versants et stratégie d'échantillonnage 93

5.3.2 Analyses des bactéries indicatrices de contamination fécale 93

5.3.3 Marqueurs moléculaires 94

5.3.4 Marqueurs chimiques 94

5.3.5 Analyse des pathogènes 94

5.4 Résultats et discussion 95

5.4.1 Conditions hydrométéorologiques et l'activité GLUC lors des échantillonnages ciblés..... 95

5.4.2 Dynamique à court terme des marqueurs moléculaires aux prises d'eau urbaines 97

5.4.3 Dynamique à court terme des marqueurs chimiques aux prises d'eau urbaines 101

5.4.4 Dynamique à court terme des marqueurs spécifique à l'hôte humain et animal à la prise d'eau potable agricole 106

5.4.5 Relation temporelle entre la turbidité, pathogènes et les marqueurs moléculaires .. 109

5.5 Conclusions 113

CHAPITRE 6 ARTICLE 2: OCCURRENCE AND PARTITIONING BEHAVIOR OF *E. COLI* AND WASTEWATER MICROPOLLUTANTS FOLLOWING RAINFALL EVENT.. 114

6.1 Abstract 114

6.2 Introduction 115

6.3 Material and Methods 118

6.3.1 Study area description 118

6.3.2 Sample collection and processing 118

6.3.3 Surface water partitioning and pre-treatment process 120

6.3.4 Wastewater micropollutants analysis 121

6.3.5 Fecal indicator (*E. coli)* and physico-chemical analysis 122

6.3.6 Statistics 123

6.4 Results and discussion 123

6.4.1 Occurrence of WWMPs in dissolved and suspended particulate matter in wastewater effluents 123

6.4.2 Occurrence and concentration of *E. coli* and WWMPs in river water 126

6.4.3 Occurrence and concentration of *E. coli* and WWMPs in surficial sediments 132

6.4.4 SPM-water and Sediment-water partitioning coefficient pattern under dry and weather condition 133

6.4.5 Spatial variations 142

6.4.6 Comparison between *E. coli* and WWMPs fate along the river 147

6.5 Conclusions 148

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE 150

7.1 Applications de la boîte à outils 150

7.1.1 Dépistage des raccordements illicites 151

7.1.2 Impact des rejets des débordements d'eaux usées sur les prises d'eau potable 153

7.2 Comportement et devenir des marqueurs d'eaux usées dans le milieu récepteur 155

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET PERSPECTIVES 158

RÉFÉRENCES 162

ANNEXES 182

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1. Principaux groupes et genres d'agents pathogènes responsables de maladies d'origine hydrique. Adapté de (Straub et al., 2003) 8

Tableau 2-2. Avantages et désavantages des méthodes de discrimination des sources de pollution fécale. Adapté de (Paris et al., 2010) 14

Tableau 2-3. Marqueurs utilisés pour le dépistage des sources de pollution fécale de différentes sources d'eau. Tiré de (Waso, 2017) 16

Tableau 2-4. Analyse de données sur des indicateurs chimiques de la contamination fécale des eaux de surface. Tiré et adapté de (Hajj-Mohamad, 2016) 25

Tableau 3-1. Objectifs spécifiques et hypothèses de recherche 42

Tableau 3-2. Marqueurs sélectionnés et leurs méthodes d'analyse 54

Table 4-1. Concentrations and occurrences of fecal indicator bacteria and host-specific genetic markers in surface water and storm water sewers 66

Table 4-2. Concentrations and occurrences of human chemical markers in surface water and storm water sewers 72

Table 4-3. Spearman correlation coefficients between *E. coli* concentrations, qPCR, and chemical assays for pooled samples, outfalls, and storm drain at each sub-catchment 75

Table 4-4. Molecular and chemical human markers composite index 76

Table 6-1 Concentrations of WWMPs in dissolved (µg L^{-1}) and particulate phase (adsorbed to SPM: ng/g dw) in final effluent from two WWTPs. ND-not detected, LOD = limit of detection 125

Table 6-2. Occurrence of *E. coli* and WWMPs in aqueous (ng/L), suspended particulate matter and sediment matrices (ng/g dry weight). SD-standard deviation, DF-detection frequency 128

Table 6-3. Spearman correlation rank of *E. coli* and wastewater micropollutants partitioned to suspended particulate matter. Red bolded Spearman values are significant at $p<0.05$ 131

Table 6-4. *E. coli* and wastewater micropollutants Log partitioning coefficient Kd in suspended particulate matter and sediment 134

Table 6-5. Correlation coefficients of the SPM-water and sediment-water partition coefficients (*Kd*) with water and sediment characteristics. Red bolded Spearman values are significant at $p<0.05$ 139

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1. Schéma des principaux processus environnementaux impliqués dans le devenir des indicateurs fécaux suite à une surverse d'égout dans les milieux aquatiques urbains. Tirée de (E. Walters, 2013). CSO = combined sewer overflow, FIB = fecal indicator bacteria.....27

Figure 3-1. Prises d'eaux potable et points de rejets d'eaux usées dans la rivière des Mille-Îles et le lac Deux Montagnes tiré du *(Conseil des bassins versants des Mille-Îles, 2012)* 47

Figure 3-2. Prise d'eau potable dans la rivière Noire.....48

Figure 3-3. Démarche d'inspection des regards d'égout pluvial de l'aval vers l'amont. Bibliothèque et Archives nationale du Québec ISBN 2-550-47218-7.....49

Figure 4-1. Spatial distribution of mean concentration of fecal indicator bacteria (A), human genetic markers (B) and sewage chemical markers (C) in stream water surface and storm outfalls. ND-not detected. CAF for caffeine, THEO for theophylline, ACET for acetaminophen and CBZ for carbamazepine 68

Figure 4-2. Correlation between *E. coli*, MST and CST human markers 74

Figure 5-1. Relation temporelle entre l'activité GLUC, la turbidité et les marqueurs moléculaires spécifique de l'hôte humain pendant l'évènement A-1.....96

Figure 5-2. Évolution temporelle d'*E. coli*, du marqueur *Bacteroidale* HF183 et du marqueur mitochondrial humain (ADNmt) pendants deux événements hydrométéorologiques (fonte des neiges et précipitations) en février (événement A-1) et avril (événement A- 2) 2017 à la prise d'eau potable A. Les rectangles jaunes indiquent un événement de temps sec (baseline) 99

Figure 5-3. Évolution temporelle d'*E. coli*, du marqueur *Bacteroidale* HF183 et du marqueur mitochondrial humain (Hunito) en février 2018 lors de l'événement B-1 (Dérivation d'eaux usées), de l'événement B-2 (précipitations) et de l'événement B-3 en mars 2018 (fonte des neiges) à la prise d'eau potable B. Les rectangles jaunes indiquent les événements ciblés.101

Figure 5-4. Évolution temporelle de la caféine (CAF), la théophylline (THEO) et de la carbamazépine (CBZ) pendants deux événements hydrométéorologiques (fonte des neiges et précipitations) en février (événement A-1) et avril (événement A-2) 2017 à la prise d'eau potable A. Les rectangles jaunes indiquent un événement de temps sec (background).....103

Figure 5-5. Évolution temporelle de la caféine (CAF), la théophylline (THEO) et de la carbamazépine (CBZ) en février 2018 lors de l'événement B-1 (Dérivation d'eaux usées), de l'événement B-2 (précipitations) et de l'événement B-3 en mars 2018 (fonte des neiges) à la prise d'eau potable B. Les rectangles jaunes indiquent les événements ciblés (Baseline) ..105

Figure 5-6. Évolution temporelle d'*E. coli*, du marqueur mitochondrial humain et des marqueurs mitochondriaux bovin et porcin lors des précipitations d'octobre 2017. Les rectangles jaunes indiquent un événement de temps sec ciblé (Baseline). LOQ = limite de quantification....107

Figure 5-7. Relation temporelle entre le marqueur HF183 and a) *Cryptosporidium*, b*) Giardia* and c) Adénovirus à l'évènement A-1 111

Figure 5-8. Relation temporelle entre l'ADN mitochondrial bovin et les virus entériques.....112

Fig. 6-1. Sampling locations along the river shores. Only some upstream CSOs and WWMPs are presented in this map.....120

Fig 6-2. Temporal dynamics of field Log K_d for WWMPs detected in water, SPM and sediment across the study sites. The square indicates the attached fraction (%) in both background and wet weather conditions.....136

Figure 6-3. Temporal dynamics of field Log K_d *for E. coli* detected in water, SPM and sediment across the study sites. The square indicates the attached fraction (%) in both background and wet weather conditions.....137

Fig. 6-4. Relationship between field log K_d, log K_{oc} vs log K_{ow} of WWMPs detected in water, SPM and sediment across the study sites. K_{ow}-K_{oc} linear relationship observed by Karickhoff (1981) was used for comparison (blue dotted line).....141

Fig. 6-5. Spatial-temporal distribution of mean *E. coli* concentration and total mean wastewater micropollutants concentration in A/D: aqueous/dissolved phase, B/E: attached to suspended particulate matter (SPM). Note the difference in scale on the y-axis 145

Fig. 6-6. Spatial-temporal distribution of mean *E. coli* concentration and total mean wastewater micropollutants concentration in sediment C/F. Note the difference in scale on the y-axis 146

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
FIB	Fecal Indicator Bacteria
Kd	Coefficient de distribution
MAMROT	Ministère des Affaires Municipales, des Régions et de l'Occupation du Territoire
MDDEFP	Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs du Québec
MELCC	Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques
MES	Matières en suspension
MVES	Matières volatiles en suspension
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
PMA	Propidium monoazide
PPSP	Produits Pharmaceutiques et de Soins Personnels
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RUTP	Rejets Urbains en Temps de Pluie
STEP	Station d'épuration
TSM	Traceurs de Sources Microbiennes
UdeM	Université De Montréal
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultra-Violet
QMRA	Quantitative Microbial Risk Assessment

LISTE DES ANNEXES

Annexe A Matrériel de support-Article 1 182

Annexe B Matrériel de support-Chapitre 2 186

Annexe C Matrériel de support-Article 2.....190

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte et problématique

La qualité microbiologique des eaux de surface est un aspect important de la qualité du milieu aquatique. Cette dernière est affectée par la contamination directe ou indirecte du milieu aquatique par des matières fécales humaines et animales contenant de hautes teneurs en micro-organismes entériques (Garcia-Armisen, 2006). La présence de ces derniers dans l'eau suggère la possibilité d'y retrouver des pathogènes d'origine fécale (bactéries, virus, protozoaires parasites). Ces microorganismes pathogènes représentent un danger direct et important pour la santé humaine. Parmi les problèmes de santé pouvant découler de cette contamination fécale, les maladies gastro-entériques ainsi que les infections aux yeux, aux oreilles et à la peau sont les plus répandues (MDDEFP, 2012).

La contamination fécale, selon qu'on se trouve en milieu urbain ou en milieu agricole, ne provient pas des mêmes sources. En milieu urbain, les sources de contamination fécale sont : les débordements aux ouvrages de surverses dans le réseau d'égouts, en particulier dans les réseaux unitaires; les dérivations d'eaux usées non traitées ou non désinfectées aux stations d'épuration; les rejets provenant des raccordements inversés et les eaux de ruissellement urbain évacuées par les égouts pluviaux en réseaux séparatifs et pseudo-séparatifs. Ces sources constituent une forme importante de pollution microbienne des eaux (Conseil des bassins versants des Mille-Îles, 2014).

Une grande partie des égouts des municipalités du Québec sont de type unitaire; ils acheminent à la fois les eaux usées et les eaux pluviales à une station d'épuration. En période de pluie, les capacités limitées des réseaux et des stations d'épuration peuvent être dépassées, ce qui peut engendrer des débordements d'eaux usées non traitées vers le milieu récepteur. Cette situation est reconnue comme étant une source importante de dégradation de la qualité des cours d'eau en milieu

urbain. Les flux de polluants rejetés lors des événements pluvieux sont très largement supérieurs aux flux journaliers rejetés par les stations d'épuration et ceci, pour de nombreux paramètres polluants (Weyrauch et al., 2010). En outre, les changements climatiques sont susceptibles d'aggraver les problèmes de contamination microbiologique. En effet, une fréquence plus élevée de précipitations abondantes risque d'entraîner un nombre accru de surverses dans les réseaux d'égout unitaires et pseudo-séparatifs (Dorner, 2011).

Les effluents urbains transportent des charges polluantes sous formes de particules solides, de colloïdes ou encore la matière organique dissoute. Les polluants particulaires transportés en suspension, interagissent avec le réseau d'assainissement par des processus d'accumulation et de remise en suspension des stocks de dépôts. La mobilisation des polluants sédimentés en réseau représente une part essentielle des flux en temps de pluie (Gromaire et al., 2001; Gasperi et al., 2010).

L'impact d'un épisode de débordement sur le milieu récepteur est associé aux caractéristiques de l'effluent et du milieu récepteur et il est difficile à priori d'en prévoir l'importance. À court terme, l'apport d'une masse d'eau fortement contaminée mène à l'augmentation de la turbidité du milieu (pollution visuelle), à l'anoxie, et aux contaminations bactérienne et chimique. À plus long terme, à la suite d'une succession de débordements sur un même site, les rejets conduisent à l'enrichissement des sédiments par accumulation de matière organique biodégradable, de microorganismes pathogènes et de micropolluants toxiques. Les eaux usées déversées par des mauvais raccordements dans le réseau pluvial séparé s'acheminent sans traitement aux milieux aquatiques contribuant grandement à la dégradation de la qualité de l'eau, surtout en temps sec.

Les concentrations maximales de contaminants microbiens et chimiques lors des événements pluvieux représentent les plus grands défis de traitement de l'eau potable et les périodes de risques

à la santé les plus élevées. Ainsi, la capacité à caractériser et à prédire les changements dans les critères de qualité de l'eau des surverses afin d'atténuer les impacts potentiels des contaminants sur les processus de traitement de l'eau est d'une grande importance. Comme le dépassement des critères de qualité vient restreindre les usages du milieu, il est intéressant d'estimer l'ampleur et la durée de la perturbation en des points stratégiques tels que les prises d'eau potable ou les cours d'eau à usage récréatif (plage). De plus, une meilleure connaissance des impacts peut mettre en évidence les besoins d'intervention en matière de gestion et de contrôle des débordements. Dans ce contexte, le 17 février 2009, le conseil canadien des ministres de l'Environnement (CCME) a adopté la stratégie pancanadienne pour la gestion des effluents d'eaux usées municipales. La stratégie vise principalement à réduire la fréquence des événements de débordement pour répondre aux réglementations environnementales plus strictes et couvre les eaux usées rejetées dans les eaux de surface à partir d'un réseau d'égout municipal, incluant le rejet à l'émissaire et les débordements d'égouts unitaires et domestiques. L'enjeu est devenu de plus en plus prioritaire depuis 2014, par l'adoption par le gouvernement du Québec du Règlement sur le Prélèvement des Eaux et leur Protection (RPEP), dont l'objectif principal est de protéger les sources d'eau potable du Québec. Ainsi, toutes les municipalités ayant un prélèvement de catégorie 1 (desservant plus de 500 personnes) devront, d'ici 2021, déposer une étude portant sur la vulnérabilité de leur source.

L'amélioration de la qualité microbiologique des eaux urbaines et la hiérarchisation des différentes pollutions dans un bassin versant impliquent d'en définir les sources. Les indicateurs fécaux bactériens traditionnels (*Escherichia coli*, coliformes fécaux, entérocoques) présents à la fois dans les selles humaines et les fèces des animaux, ne permettent pas de distinguer entre la contamination fécale d'origine humaine ou animale et entre une contamination récente ou ancienne, d'autant plus si cette pollution provient d'une source diverse et diffuse (Scott et al., 2002; Simpson et al., 2002).

Dans ce contexte, depuis une dizaine d'années, de nombreux outils alternatifs de dépistage des sources de contamination fécale ont été proposés (USEPA, 2005). Il s'agit du *Microbial Source Tracking* (MST). Parmi ces outils, certains marqueurs (pathogènes ou non) ont été proposés comme traceurs microbiens en raison de leur forte prévalence, et leur spécificité d'hôte. Actuellement, deux principaux marqueurs sont utilisés : (i) les marqueurs microbiens incluant des cibles très variées telles que des ADN mitochondriaux et des bactéries appartenant à l'ordre des *Bactéroidales*, et (ii) les marqueurs chimiques (stérols, et produits de soins pharmaceutiques). Ces marqueurs semblent être prometteurs dans l'identification des sources de pollution fécale. Cependant, plus de recherches sont nécessaires avant leur application pour le contrôle de routine de la qualité de l'eau. En effet, des articles de revue récents ont mis en évidence les différentes lacunes, avantages et désavantages des recherches qui doivent être abordées pour une meilleure utilisation de ces méthodes (Harwood et al., 2014). Parmi ces lacunes; (i) il y a un manque général de compréhension de la nature et du rôle des associations microorganismes (indicateurs)/sédiments dans l'infection humaine; (ii) la viabilité des pathogènes, leur transport, et leur destin dans les systèmes aquatiques, et (iii) la non-prise en compte de la dynamique temporelle de sources de contamination qui peut être d'une grande importance, en particulier pendant les événements de pluie (Dorner et al., 2007b). En effet, il peut y avoir un changement dans l'importance relative des sources et il est possible que les sources les plus importantes puissent être mal identifiées sous divers régimes hydrologiques. (Wu et al., 2011). Également, les méthodes de dépistage des sources et les méthodes de surveillance de la contamination microbiologique d'origine fécale, actuellement en vigueur, montrent qu'après un rejet dans le milieu naturel, les indicateurs et les micropolluants fécaux disparaissent ; or il se trouve que leur dynamique est beaucoup plus complexe, notamment en ce qui concerne leur association avec les colloïdes, la matière en suspension et par conséquent leur sédimentation. En effet, les bactéries et les micropolluants de faible polarité montrent souvent une

affinité pour la phase particulaire (Jamieson, Joy, et al., 2004; Liss et al., 1996). Les MES et les sédiments représentent un environnement bénéfique en étant un moyen de transport, une source de nutriments (carbone organique dissous) ou encore une source de protection contre le stress environnemental (prédation, lumière, oxygène dissous… etc.) (Gerba et al., 1976).

La mise en œuvre de nouveaux procédés de traitement de l'eau potable a abouti à des investissements importants pour les municipalités canadiennes. Comme plusieurs provinces canadiennes se dirigent vers la réglementation du traitement de l'eau en fonction de la qualité de l'eau de source, il y a une forte nécessité d'outils pour évaluer la qualité microbiologique des eaux de surface. En effet, des données sont nécessaires sur le devenir et le transport des contaminants chimiques et microbiologiques dans l'environnement, en particulier par rapport à leur association avec les matières en suspensions dans le continuum urbain. En conséquence, le suivi des microorganismes pathogènes et les marqueurs fécaux devraient être effectués dans l'ensemble des compartiments du cours d'eau, à savoir; la phase aqueuse et la phase particulaire; celle-ci comprend les MES et le sédiment superficiel. Ce suivi contribuera à une meilleure compréhension et évaluation de la source, du devenir et de l'effet de ces pathogènes et/ou indicateurs. Une bonne compréhension du devenir de ces marqueurs dans les milieux naturels a beaucoup d'importance d'un point de vue sanitaire, puisque les activités de baignade, d'aquaculture et de production d'eau potable à partir d'eaux de surface sont directement menacées par les contaminations d'origine fécale.

À ce jour, seules quelques études ont utilisé des marqueurs spécifiques à l'hôte comme traceurs de pollution fécale dans les ouvrages de surverse d'égouts unitaires, le réseau pluvial (Madoux-Humery et al., 2013) et les sédiments (Guerineau et al., 2014; Hajj-Mohamad et al., 2014; Kim et al., 2014). De plus, aucun des indicateurs proposés dans la littérature ne s'avère suffisant pour

déterminer à lui seul l'origine de la pollution fécale. Une combinaison de plusieurs indicateurs fournirait probablement une estimation plus robuste de sources de contamination et leur contrôle possible.

1.2 Structure de la thèse

Ce manuscrit est réparti en plusieurs chapitres qui correspondent essentiellement à l'applicabilité des marqueurs chimiques et génétiques choisies pour dépister les sources de contamination fécale dans les cours d'eau urbains.

Le **Chapitre 1** introductif est dédié à la présentation du contexte, de la problématique de la thèse et présente son organisation. **Le Chapitre 2** est consacré à la présentation d'une synthèse des données bibliographiques. Le **Chapitre 3** présente les objectifs de recherche ainsi que la démarche expérimentale. Les **Chapitres 4, 5 et 6** présentent l'essentiel des résultats de la recherche sous forme de trois publications scientifiques couvrant l'application et la validation d'une boite à outils de marqueurs spécifiques des rejets d'eaux usées ainsi que la répartition de certains de ces marqueurs entre la phase particulaire et la phase dissoute. Enfin, le **Chapitre 7** présente une synthèse des travaux ainsi qu'une discussion générale pour finalement, mener à la conclusion et aux perspectives au C**hapitre 8**.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Contamination fécale et risque sanitaire

La contamination fécale des écosystèmes aquatiques qu'elle soit d'origine humaine ou animale entraine des répercussions néfastes sur la santé publique et l'économie dans plusieurs collectivités canadiennes. Un grand nombre d'avis d'ébullition de l'eau, des fermetures de plage et des fermetures de zones coquillières est enregistré chaque année (Environnement Canada, 2013). La contamination microbienne de l'eau représente le plus grand risque pour la santé humaine (Ashbolt, 2004). En effet, l'eau contaminée par des matières fécales humaines ou animales sert de vecteur de transmission pour de nombreux microorganismes pathogènes. Ces micro-organismes pathogènes peuvent générer une multitude de pathologies plus ou moins graves, dont les plus communes sont résumées dans le Tableau 2-1.

2.2 Sources de contamination fécale en milieu urbain

Les sources de pollution fécale en milieu urbain peuvent être classées en deux types, soit les sources diffuses et les sources ponctuelles (Seurinck et al., 2005). Les sources ponctuelles sont communément définies comme étant des rejets de pollution perceptibles pouvant être facilement identifiés et donc mesurés. Par exemple, les rejets continus d'effluents traités des stations d'épuration des eaux usées (STEP), les rejets d'eaux usées incorrectement ou partiellement traités (dérivations), des trop-pleins d'égout unitaire, les rejets issus de collecteurs d'eaux pluviales dus aux raccordements illicites, etc. Les sources diffuses se définissent comme étant des rejets non identifiables, multiples, issus du lessivage de toute la surface d'un bassin versant et sont généralement le résultat du ruissellement en provenance des précipitations ou de la fonte des neiges. Les sources diffuses, dominantes dans les bassins urbains (Savichtcheva et al., 2007), sont

difficilement contrôlables et peuvent être plus dommageables pour l'environnement que les sources de pollution d'origine ponctuelle (Schueler, 1987).

En milieu urbain, les débordements des réseaux unitaires en temps de pluie ou fonte des neiges constituent une forme importante de pollution des eaux. Bien que la qualité des eaux usées déversées en temps de pluie diffère de celle prévalant en temps sec, ces eaux demeurent lourdement polluées. Les eaux usées sont principalement composées de matières en suspension, de matière organique biodégradable, de microorganismes pathogènes, de nutriments et de micropolluants.

Tableau 2-1. Principaux groupes et genres d'agents pathogènes responsables de maladies d'origine hydrique. Adapté de (Straub et al., 2003)

Groupes de micro-organismes	Pathogènes	Pathologie
Virus	Entérovirus (polio, écho,coxsackie)	Méningite,paralysie,fièvres,problèmes respiratoires et diarrhée
	Hépatite A et E	Infections hépatiques
	Norwalk virus	Diarrhée/gastro-entérite
	Sapporo	Diarrhée/gastro-entérite
	Rotavirus	Diarrhée/gastro-entérite
	Astrovirus	Diarrhée
	Adenovirus	Diarrhée, infections oculaires et problèmes respiratoires
	Reovirus	Problèmes respiratoires et entériques
Bactéries	*Salmonella*	Fièvre typhoïde et diarrhée
	Shigella	Diarrhée
	Campylobacter	Diarrhée (cause première des intoxications alimentaires
	Yersinia enterolitica	Diarrhée
	Escherichia coli O157:H7 et certaines autres souches	Diarrhée risque de complications (urémie hémolytique) chez les enfants à bas âge
	Legionella pneumophila	Pneumonie et autres infections respiratoires
Protozoaires	*Naegleria*	Méningo-encéphalite
	Entomoeba Hystolitica	Dysenterie amibienne
	Giardia lamblia	Diarrhée chronique
	Cryptosporidium pavum	Diarrhée sévère, mortelle chez les sujets immunodéprimés
	Cyclospora	Diarrhée
Cyanobactéries	*Microcystis*	Diarrhée par ingestion des toxines produites par ces organismes, la toxine microcystine est impliquée dans des lésions hépatiques
Helminthes	*Ascaris lumbricoides*	Ascariasis

2.2.1 Phase particulaire en tant que vecteur de pollution fécale

Quels que soient l'urbanisation et le type de réseau, la pollution engendrée par les ruissèlements et les débordements de réseaux unitaires est fortement associée aux solides en suspension. Ces solides, qualifiés de vecteurs de pollution, démontrent en effet une très forte tendance à fixer les contaminants de nature organique et métallique. Par exemple, des études menées en France, ont montré que les solides en suspension fixent environ 85 % de la pollution totale en DCO, 80 % de la DBO_5, 70 % du cadmium, 95 % du cuivre, 95 % du plomb, 85 % du zinc et 90 % des HAP (Gasperi, 2006; Gasperi et al., 2012).

Ashley et Gasperi (2004) ont mis en évidence 4 sources principales de pollution particulaire dans un réseau unitaire en temps de pluie : (i) l'atmosphère qui produit principalement des particules fines et des aérosols; (ii) le lessivage des polluants accumulés sur les surfaces des bassins versants (les toits, routes, stationnements, trottoirs, etc.); (iii) Les eaux usées domestiques; (iv) les dépôts en réseau. En effet, en temps sec, une partie des particules en suspension se dépose dans les collecteurs unitaires conduisant à la formation de dépôts. Une augmentation des débits lors des événements pluviaux mène à la mobilisation de ces dépôts, par conséquent des flux importants de contaminants sont transportés dans les réseaux unitaires

La granulométrie et la vitesse de sédimentation des particules solides, ainsi que la pollution associée dans les réseaux d'égout unitaire, changent entre le temps sec et le temps de pluie. D'après Benoist et al. (1990), de 30 à 50 % des solides contenus dans les débordements de réseaux unitaires sont de nature à sédimenter à proximité des émissaires. En temps de pluie, les particules fines (< 100 µm) sont majoritaires et représentent 66 à 85 % de la masse totale avec diamètre moyen compris entre 25 et 44 µm (Chebbo et al., 1995; Chebbo, 1992), alors qu'en temps sec, les particules en suspension

ont un diamètre médian de l'ordre de 30 à 40 µm et sont en grande majorité organique, avec des teneurs en MVES de 70 à 80 % et une densité faible de l'ordre de 1 à 1.5.

Chebbo (1992) et Verbanck et al. (1994) en effectuant des analyses granulométriques des eaux usées en temps sec, ont trouvé que 45 % de la masse de particules ont un diamètre de 11 à 45 µm, et 25 % des particules en masse ont un diamètre supérieur à 125 µm. Ces particules fines qui sont constituées à 90 % de matière organique avaient une densité relative proche de 1. Ces particules fines et organiques sédimentent difficilement. Par ailleurs, Lessard et Beck (1988), dans leur étude sur la modélisation des impacts reliés aux rejets de temps de pluie, insistent sur l'importance prioritaire qui doit être accordée au transport des matières solides en suspension.

2.3 Microbial Source Tracking (MST) : suivi des sources microbiennes

2.3.1 Méthodes classiques

La surveillance de routine de la pollution fécale dans l'environnement aquatique est généralement basée sur la détection d'organismes indicateurs. Depuis les années 1980, un membre du groupe de coliformes fécaux, *Escherichia coli* (*E. coli*) et le genre Entérocoques, abondants dans la flore intestinale humaine et animale, sont utilisés comme indicateurs de contamination fécale réglementés pour surveiller les eaux de surface sources d'eau potable et les eaux récréatives. La présence de ces indicateurs dans l'eau de surface signifie que cette dernière est contaminée par une pollution d'origine fécale et qu'elle peut donc contenir des microorganismes pathogènes même s'ils ne sont généralement pas bien corrélés (Wu et al., 2011).

Bien que la surveillance de la qualité de l'eau basée sur ces indicateurs ait grandement contribué à la gestion de la sécurité de l'eau au cours des dernières décennies, ils présentent plusieurs limites à leur application (Li et al., 2021; Holcomb et al., 2020). D'une part, comme ils sont présents à la fois

dans les selles humaines et les fèces des animaux, ils ne permettent pas de distinguer entre la contamination fécale d'origine humaine ou animale, d'autant plus si cette pollution provient d'une source diverse et diffuse (Scott et al., 2002; Simpson et al., 2002). D'autre part, ils sont capables de se multiplier après la libération dans la colonne d'eau (Desmarais et al., 2002; H. M. Solo-Gabriele et al., 2000).

Le besoin d'une surveillance plus rapide et plus fréquente d'*E. coli* dans les eaux de surface et les réseaux de distribution d'eau potable a amené les chercheurs à explorer de nouvelles technologies de détection en ligne de la qualité de l'eau capables de détecter en temps réel une contamination par *E. coli.* Parmi ces technologies, la méthode enzymatique automatisée ColiMinder® (Vienna Water Monitoring Solutions, Autriche) est de plus en plus utilisée. Il s'agit d'une technologie autonome qui détecte la fluorescence de l'enzyme β-glucuronidase, propre à la bactérie *E. coli*, permettant de faire le suivi de la contamination microbiologique des échantillons d'eau en quasi-temps réel (aux 30 minutes). La mesure de l'activité beta-D-glucuronidase (GLUC) se base sur le même principe que pour le dénombrement d'*E. coli* cultivables par les méthodes de filtrations sur membrane avec gélose sélective et par la technologie Colilert (Quanti-Tray2000, IDEXX). L'enzyme spécifique à *E. coli* catalyse une réaction qui génère un sous-produit fluorescent lequel est détecté par des capteurs de fluorescence hautement sensibles. Aucune étape de culture n'est nécessaire ici pour dénombrer *E. coli*, c'est l'activité enzymatique qui est directement mesurée à travers une cinétique enzymatique. L'appareil renvoie ainsi des mesures en Unités de Fishman modifiées (UFM) par 100mL, correspondant à une activité enzymatique spécifique par unité de volume, l'augmentation linéaire de l'intensité de fluorescence émise durant la réaction, indique ensuite l'activité enzymatique totale de l'échantillon. Cela quantifie indirectement la présence *d'E. coli* dans ce même échantillon (Demeter et al., 2020; Burnet et al., 2019; Cazals, 2019).

La source de contamination fécale influence le degré de risque pour la santé associé à l'exposition. L'exposition à des excréments d'origine humaine est présumée exercer un plus grand risque de santé, en partie, en raison de la présence de virus entériques spécifiques à l'humain (Pina et al., 1998). Les fèces des ruminants sont des réservoirs des microorganismes pathogènes tels que *Salmonella* et *Escherichia coli* (Ishii et al., 2007; Kaper et al., 2004). En outre, les excréments d'oiseaux sauvages peuvent héberger une variété de virus, bactéries et protozoaires pathogènes (Saunders et al., 2009; Drozd et al., 2013), particulièrement *Cryptosporidium,* un protozoaire pathogène fréquemment associé aux éclosions de maladies d'origine hydrique (Graczyk et al., 2008). Cependant, L'humain, les ruminants et la faune sauvage peuvent excréter les mêmes organismes pathogènes, donc, dans la plupart des cas, la source de contamination ne peut pas être déduite de la présence d'un agent pathogène particulier (Bicudo et al., 2003).

Afin de remédier ou atténuer la pollution fécale dans les eaux récréatives et les eaux de surfaces sources d'eau potable, la ou les sources de contamination doivent être déterminées. Depuis une quinzaine d'années, le concept du *Microbial Source Tracking* (MST) ou Traceurs des Sources de pollution microbienne (TSM) a été développé. Ce concept définit l'ensemble des techniques moléculaires, chimiques ou biochimiques (Scott et al., 2002; Meays et al., 2004; Glassmeyer et al., 2005) permettant de déterminer et de mesurer, l'origine majoritaire d'une contamination fécale. De nombreuses méthodes ont été développées, elles sont classées selon la nécessité d'une culture bactérienne préalable et selon la nécessité d'une banque de matériel. Les avantages et désavantages de ces méthodes sont décrits dans le Tableau 2-2.

Parmi les méthodes MST développées à ce jour (Tableau 2-2), celles basées sur l'amplification des gènes codant l'ARNr 16S des marqueurs *Bactéroidales* spécifiques de l'hôte par PCR ou PCR quantitative sont les plus utilisées (Schriewer et al., 2010; Warish et al., 2011; Solo-Gabriele et al.,

2011; Bernhard et al., 2000b). Elles présentent l'avantage de permettre une détection plus rapide et peuvent être adaptées à la détection de bactéries non ou difficilement cultivables.

Les essais qPCR pour les marqueurs associés à l'hôte présentent quelques désavantages à leur utilisation. On peut citer entre autres : (i) une abondance variable du marqueur génétique chez les individus, (ii) amplification non spécifique par des amorces d'hôtes non-cibles, (iii) l'absence d'amplification par un ensemble d'amorces conçues pour un hôte cible, et (iv) les erreurs de mesure pendant l'essai qPCR (Wang et al., 2010). Dans un effort pour réduire l'incertitude des méthodes MST basées sur la qPCR (MST-qPCR), un modèle probabiliste basé sur la loi de probabilité totale a été développé (Wang et al., 2010; 2013). La performance de plusieurs essais MST-qPCR a été testée dans une comparaison inter- laboratoire (Boehm et al., 2013; Harwood et al., 2013; Ebentier et al., 2013; Layton et al., 2013; Sinigalliano et al., 2013) et certains essais ont démontré une application potentielle à l'échelle mondiale, notamment la qPCR HF183 TaqMan (Reischer et al., 2013). En outre de l'analyse moléculaire de la communauté microbienne par la méthode (TRFLP), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction, la microsonde phylogénétique (PhyloChip), et le séquençage de nouvelle génération tels qu'illumina ou 454-pylosequencing ont été évalués comme des approches complémentaires utiles pour les méthodes MST-qPCR. Ces méthodes peuvent identifier les sources de contamination mineures ou plusieurs sources simultanément (Cao et al., 2013a; Cao et al., 2013b; Dubinsky et al., 2012).

Tableau 2-2. Avantages et désavantages des méthodes de discrimination des sources de pollution fécale. Adapté de (Paris et al., 2010)

Méthode	Cible testée	Culture	Avantages	Désavantages
Profils de résistance aux antibiotiques (ARA et MAR)	*E. coli* *Streptocoques fécaux* *Enterococcus spp.*	Souches isolées	Rapide et facile à réaliser Nécessite peu d'expertise Peut être utile pour déterminer l'hôte source	Nécessite une base de données Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données Pas de méthode standardisée
Profils d'utilisation de Carbone (CUP)	*E. coli* *Streptocoques fécaux* *Enterococcus spp.*	Souches isolées	Rapide et facile à réaliser Nécessite peu d'expertise	Nécessite une base de données Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données Pas de méthode standardisée Résultats souvent peu exploitables
Analyse des séquences répétitives d'ADN (rep-PCR)	*E. coli*	Souches isolées	Très reproductible Rapide et facile à réaliser Nécessite peu d'expertise Peut être utile pour déterminer l'hôte source	Nécessite une base de données Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données
Analyse d'ADN Polymorphique aléatoirement amplifié (RAPD)	*E. coli*	Souches isolées	Rapide et facile à réaliser Peut être utile pour différencier l'hôte source	Nécessite une base de données Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données Très peu utilisée pour la recherche de source de contamination
Analyse du polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP)	*E. coli*	Souches isolées	Très reproductible Peut être utile pour déterminer l'hôte source	Représente une importante quantité de travail Nécessite une base de données Nécessite un entraînement spécifique Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données

Tableau 2-2. Avantages et désavantages des méthodes de discrimination des sources de pollution fécale (suite)

Méthode	Cible testée	Culture	Avantages	Désavantages
Électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE)	*E. coli* *Enterococcus spp.*	Souches isolées	Très reproductible Peut être utile pour déterminer l'hôte source	Représente une importante quantité de travail Nécessite une base de données Nécessite un entraînement spécifique Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données
Ribotypage	*E. coli* *Streptocoques fécaux* *Enterococcus spp.*	Souches isolées	Très reproductible Peut-être automatisé Peut être utile pour déterminer l'hôte source	Représente une importante quantité de travail Nécessite une base de données Nécessite un entraînement spécifique Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données
PCR gène spécifique	*E. coli (gènes produisant des toxines)*	Enrichissement de l'échantillon	Peut être adaptée pour quantifier le nombre de copie du gène Les gènes de virulence peuvent être ciblés fournissant des preuves directes de la présence d'organismes potentiellement dangereux Ne nécessite pas de base de données	Nécessite un enrichissement en organismes cibles Nécessite un personnel qualifié Les amorces ne sont pas disponibles pour tous les hôtes
(q)PCR à cibles spécifiques	*Bactéroïdes* *Bifidobacteria* *Enterococcus* *Rhodococcus* *Phages ARN-f* *Entérovirus* *Adénovirus*	Pas de culture	Ne nécessite pas la culture de l'organisme cible Rapide et facile à réaliser Ne nécessite pas de base de données Spécifique de l'hôte	Peu de connaissance sur la distribution et la survie des organismes cibles dans l'eau Les amorces ne sont pas toutes disponibles

Tableau 2-3. Marqueurs utilisés pour le dépistage des sources de pollution fécale de différentes sources d'eau. Tiré de (Waso, 2017)

Organisme	**Marqueur (Spécifique à l'hôte)**	**Gène cible**	**Source d'eau**
Bactéroides	HF183 (Humain)	ARNr 16S	Eaux usées, eaux pluviales de ruissellement, eaux douces, eau de mer, eaux de rivières, eaux de surface, eaux de pluie récupérées
	HuBac (Humain)		Eaux de surface, eaux usées
	BacHum-UCD (Humain)		Eaux usées
	BacH (Humain)		Eaux usées
	Human-Bac1 (Humain)		Eaux de rivières
	HumM2 (Humain)	Protéine Hypothétique B3236	Eaux usées
	HumM3 (Humain)	Facteur sigma putatif de l'ARN polymerase	Eaux usées
	B. theta α (Humain)	*B. thetaiotomicron* α-mannanase	Eaux usées
	CF128 (Bovine)	ARNr 16S	Eaux usées
	AllBac (*Bacteroides* spp.)		Eaux de surface, eaux usées, eaux de rivières

Tableau 2-3. Marqueurs utilisés pour le dépistage des sources de pollution fécale de différentes sources d'eau (suite)

Organisme	Marqueur (Spécifique à l'hôte)	Gène cible	Source d'eau
Bactéroides	GenBac (*Bacteroides* spp.)	ARNr 16S	Eaux de surface, eaux douces,
	Rum-2-Bac (Bovine spp.) Pig-1-Bac (Porcine spp.) Pig-2-Bac (Porcine spp.)		Eaux usées, eaux de rivières
	BacPre1 (Général *Bacteroides-Prevotella*) Cow-Bac2 (Bovine spp.) Pig-Bac2 (Porcine spp.)		Eaux de rivières
	BoBac (Bovine spp.)		Eaux de surface
Bifidobacterium spp.	*Bifidobacterium* (Humain)	ARNr 16S	Eaux usées, eaux de surface
Lachnospiraceae	Lachno2 (Human)	Région V6 de l'ARNr 16S	Eaux usées, eaux du port, eaux douces
Enterococcus	*Esp*-1 (Humain)	Protéine de surface entérococcique (*esp*-1)	Eaux usées, installations septiques
	E. faecium esp (Humain)		
Methanobrevibacter smithii	*nif*H (Humain)	*nifH*	Eaux usées, eau de mer, eaux de surface, eaux de ruissellement
Coliphages à ARN F+	FRNAPH I / IV (Animal) FRNAPH II / III (Humain)	Génome viral	Eaux usées, eaux de rivières
Virus de la marbrure douce du poivre	PMMoV (Humain)	Génome viral	Eaux usées
Teschovirus	PTV (Porcine)	Polyprotéine	Eaux usées

2.3.2 Méthodes moléculaires

2.3.2.1 Marqueurs Bactéroidales

D'un point de vue taxonomique, les *Bactéroidales* appartiennent au règne des procaryotes, au domaine des *Bacteria*, au phylum des *Bacteroidetes* et à la classe des *Bacteroidia*. Ce sont des bacilles ou des coccobacilles, polymorphes à Gram négatif, non sporulés, anaérobies stricts et immobiles ou mobiles. Les *Bactéroidales* sont représentés par deux genres : les *Bactéroïdes* et les *Prevotella* (Coyne et al., 2008). Les membres dominants du genre *Bacteroïdes* comprennent *B. vulgatus* (31 % de tous les *Bacteroidetes*), *B. thetaiotaomicron* (12 % de tous les *Bacteroidetes*), *B. fragilis* (5 % de tous les *Bacteroidetes*), *B. distasonis* (0,8 % de tous les *Bacteroidetes*) (Eckburg et al., 2005; Hong et al., 2008).

Les marqueurs *Bactéroidales* font partie des méthodes les plus en développement et les plus utilisées actuellement dans la discrimination de l'origine de la contamination fécale. Il y a plusieurs raisons pour lesquelles les *Bactéroidales* sont considérés comme d'excellents marqueurs génétiques. En effet, ce sont des bactéries de la flore dominante du microbiote digestif de l'humain et des animaux à sang chaud, à l'exception des oiseaux (Jeter et al., 2009; Lu et al., 2007). Les concentrations des *Bactéroidales* dans le tube digestif humain ou animal dépassent largement ceux des *E. coli* (Backhed et al., 2005). Les *Bactéroidales* sont anaérobies strictes, se répliquent difficilement dans l'environnement (Kreader, 1995), ainsi leur prévalence au sein d'un échantillon d'eau peut fournir une indication sur la durée de la contamination (contamination récente). Cependant, la caractéristique la plus attrayante pour l'utilisation de *Bactéroidales* comme un indicateur MST est la mise en évidence de la particularité qu'ont certaines espèces des *Bactéroidales* à posséder une répartition spécifique de l'hôte, ce qui permet de différencier les contaminations fécales humaines des contaminations animales, mais également de différencier les contaminations fécales animales

porcines, bovines, équines ou canines (Dick et al., 2005; Kildare et al., 2007; Bernhard & Field, 2000b). Des marqueurs *Bactéroidales* associés à l'hôte ont été développés pour les humains, les bovins, les porcs, les wapitis, les chiens, les chevaux, les mouettes, entre autres animaux (Roslev et al., 2011). Le Tableau 2-3 présente les marqueurs les plus utilisés pour le dépistage des sources de pollution fécale dans différentes sources d'eau par les techniques de PCR et qPCR conventionnels.

Selon (USEPA, 2005) un bon traceur ou marqueur génétique de contamination fécale doit répondre à plusieurs critères. Il doit être :

- Spécifique, c'est-à-dire qu'il ne doit pas être présent dans l'environnement dans d'autres circonstances que dans celles d'une contamination fécale et posséder un pouvoir discriminant pour l'hôte;
- Sensible c'est-à-dire qu'il doit être présent à chaque fois qu'une contamination fécale est détectée sans croître dans le milieu;
- Corrèle avec les indicateurs de contamination fécale classique en termes de persistance et avec les agents pathogènes;
- Présente une stabilité temporelle et géographique;
- Être en quantité suffisante pour être détecté et quantifié;
- La méthodologie employée doit être rapide, facile à réaliser et peu onéreuse.

L'utilisation des *Bactéroidales* comme marqueurs génétiques pour détecter les sources potentielles de la pollution fécale a été largement appliquée, montrant une large stabilité et répartition géographique (Fremaux et al., 2009). Toutefois, afin de développer des marqueurs appropriés pour détecter les différentes sources fécales et pour les applications pratiques, il est primordial de tester

la spécificité (pourcentage de vrais négatifs parmi les échantillons des autres hôtes) et la sensibilité (pourcentage de vrais positifs parmi les échantillons d'un hôte donné) de tous les marqueurs *Bactéroidales* publiés au niveau des sources locales (Ahmed et al., 2009; Roslev & Bukh, 2011). À travers la panoplie des marqueurs *Bactéroidales* spécifiques de l'hôte développés jusqu'à présent, le marqueur humain HF 183F a été le plus étudié à travers le monde. L'ensemble de ces résultats lui confère une présence cosmopolite, car il a été testé avec succès dans des échantillons de diverses origines (Europe, États-Unis, Australie et Canada). En effet, à l'exception des études de (Lamendella et al., 2007), le marqueur HF183F a conduit aux résultats de sensibilité et de spécificité les plus intéressants (> 87,5 %), et a été retrouvé dans la totalité des effluents urbains testés (Warish et al., 2012). De même, il est essentiel de comprendre la stabilité temporelle (saisonnière) et géographique des marqueurs *Bactéroidales* dans les eaux environnementales. Bien qu'il y ait un accroissement de la recherche, il existe encore de nombreuses lacunes sur la survie et la persistance des *Bactéroidales* après avoir été libérées dans les eaux environnementales. En outre, les recherches sur la relation entre les *Bactéroidales* ou la persistance des *Bactéroides* et la persistance des microorganismes pathogènes doivent aussi être effectuées (Balleste et al., 2010).

2.3.2.2 L'ADN mitochondrial des cellules eucaryotes

Cette approche consiste à aller cibler directement un élément eucaryote de l'organisme hôte, l'ADN mitochondrial (ADNmt), plutôt que de cibler l'ADN de bactéries associées à un organisme hôte. C'est une des nouvelles approches proposées pour déterminer l'origine de la contamination fécale. L'ADNmt est indépendant de l'ADN génomique. C'est un génome circulaire d'environ 16 000 à 18 000 pb, ayant plusieurs copies dans la cellule eucaryote de tous les vertébrés (10^6 copies mL^{-1} chez les humains, 10^2 copies mL^{-1} chez les chiens, 10^4 copies mL^{-1} chez les bovins et 10^3 copies mL^{-1} chez les porcs) et présente des séquences non conservées différentes d'un hôte à l'autre. Il se

retrouve dans les fèces en grande quantité lors du phénomène apoptotique des cellules épithéliales de l'intestin (Caldwell et al., 2007). Une étude a démontré que le nombre de copies d'ADNmt par gramme de fèces pouvait atteindre jusqu'à 1,7 x 10^7 (Schill et al., 2008), ce qui est largement suffisant pour l'utiliser comme marqueur de contamination fécale. Des amorces ont été développées pour cibler des régions de l'ADN mitochondrial qui sont spécifiques et ainsi identifier l'origine de la contamination. Il a été utilisé pour différencier des contaminations fécales d'origine humaine et animale (porcine, bovine, ovine, aviaire). De récentes études ont démontré que la détection d'ADNmt dans l'eau est assez spécifique et sensible pour l'utiliser comme indicateur de la source d'une contamination fécale. Dans certains conditions, l'ADNmt retrouvé dans la viande consommée peut résister à la digestion des humains et se retrouver dans les fèces à un niveau détectable (Roslev & Bukh, 2011; Caldwell et al., 2009; Kortbaoui et al., 2009; Martellini et al., 2005).

La détection de l'ADNmt dans l'eau peut être plus difficile que celle d'autres marqueurs comme les *Bacteroides* du fait que l'ADNmt se retrouvent généralement en quantité plus faible dans l'eau. Pour remédier à ce problème, un volume d'eau supérieur pour la filtration peut être utilisé. Ajoutons qu'un soin particulier doit être pris lors de l'échantillonnage sur le terrain et des analyses au laboratoire par PCR de la contamination humaine afin de ne pas contaminer les échantillons avec des cellules épidermiques humaine (Blais et al., 2015).

2.4 Chemical Source Tracking (CST) : suivi des sources chimiques

Au cours des dernières années, des marqueurs chimiques d'origine humaine ont reçu une attention considérable comme des indicateurs alternatifs potentiels des sources de pollution associée aux activités humaines. Néanmoins, l'application de ces indicateurs chimiques a été recommandée comme supplément de validation de sources fécales plutôt qu'en remplacement de marqueurs

microbiens classiques (Hagedorn et al., 2009). Trois groupes de marqueurs chimiques sont utilisés pour tracer les sources de contaminations fécales (Glassmeyer et al., 2005) :

1) Les stéroïdes et les acides biliaires (dans les déjections humaines et animales);

2) Les marqueurs ingérés par l'homme et excrétés dans les fèces humaines. Ces marqueurs sont soit des composés chimiques naturels ou de synthèse. Les plus couramment utilisés sont les produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPSP) (Daneshvar et al., 2012; Sauve et al., 2012) et les édulcorants artificiels, marqueurs associés aux eaux usées des STEPs (Oppenheimer et al., 2011; Buerge et al., 2009);

3) Les molécules de synthèse (produits d'hygiène et d'entretien, etc.) traitées et rejetées dans les stations d'épuration en même temps que les fèces humaines.

Le deuxième groupe des marqueurs chimiques est le plus étudié dans la littérature. La caféine (CAF), la carbamazépine (CBZ), l'acétaminophène (ACE) et la théophylline (THEO) sont les PPSP les plus fréquemment détectés dans les eaux usées de la grande région de Montréal (Viglino et al., 2011). La caféine est le composé le plus utilisé comme traceur de contamination fécale humaine (Glassmeyer et al., 2005; Buerge et al., 2009). Elle est présente dans plusieurs boissons (café, thé, cacao et cola), ainsi que dans de nombreux produits alimentaires (chocolat, etc.) et se retrouve donc associée aux matières fécales humaines. Le Tableau 2-4 présente une analyse de données sur les indicateurs chimiques de la contamination fécale des eaux de surface utilisés dans notre étude qui appartiennent au deuxième groupe des marqueurs chimiques.

Nakada et al (2008) dans leur étude sur l'occurrence des composés pharmaceutiques, rapportent, la carbamazépine comme indicateur conservateur de contamination par les eaux usées dans les rivières étudiées au Japon. Dans une autre étude, menée sur 40 sites d'échantillonnage à travers les États-

Unis et portant sur l'utilisation potentielle de 110 composés chimiques comme traceurs spécifiques de contamination humaine, la caféine, la carbamazépine et le diphenhydramine ont été parmi les sept meilleurs indicateurs prometteurs de matière fécale d'origine humaine (Glassmeyer et al., 2005). Sauve et al (2012) ont démontré une assez bonne corrélation entre les coliformes fécaux et les concentrations de caféine dans les systèmes de collecte des eaux pluviales, et ont suggéré la caféine comme un indicateur de contamination sanitaire. Par ailleurs, il a été également suggéré que la combinaison de marqueurs stables (par exemple carbamazépine) et labiles (par exemple la caféine) pourrait être bénéfique pour évaluer le pourcentage des eaux usées brutes et traitées rejetées dans les milieux aquatiques (Kasprzyk-Hordern et al., 2009; Nakada et al., 2008). Ekklesia et al. (2015b) recommandent l'utilisation de l'acétaminophène et le coprostanol comme des traceurs chimiques des zones résidentielles de haute densité tandis que la caféine a été suggérée pour zones résidentielles de faible densité.

Les édulcorants artificiels sont largement utilisés dans les aliments et les boissons. La plupart de ces édulcorants ne sont pas métabolisés dans l'organisme et sont excrétés inchangés dans l'urine et les fèces. Ceci a conduit à les examiner comme traceurs potentiels de contamination par les eaux usées domestiques. Cinq édulcorants (aspartame, acésulfame, le cyclamate, la saccharine, et le sucralose) ont été les plus étudiés en fonction de leur aptitude comme traceurs d'eau souterraine contaminée par les eaux usées. L'acésulfame-K a été le traceur le plus approprié, il a été détecté dans les eaux usées traitées ou non (12-46 pg/L), les eaux de surface et les eaux souterraines. De plus, il a été détecté avec aussi peu que 0,05 % de contaminants d'eaux usées dans les eaux souterraines (Buerge et al., 2009). Le sucralose et l'acésulfame-K sont à la fois très stables et solubles dans l'eau, résistant au métabolisme, à la décomposition et à la perte par adsorption dans le traitement des eaux usées et dans l'environnement. D'autres travaux, soutiennent l'utilisation du sucralose et de l'acésulfame

non biodégradables comme marqueurs conservateurs de la contamination des eaux de surface et souterraines par les eaux usées (Mawhinney et al., 2011; Soh et al., 2011; Oppenheimer et al., 2011; Spoelstra et al., 2013) .

Bien qu'un nombre croissant de publications suggèrent l'utilisation de marqueurs chimiques pour le suivi de contamination fécale , une évaluation géographique-temporelle parait souhaitable à cause des variations dans le mode d'utilisation, les habitudes de consommation, la consommation d'eau, et l'élimination par le traitement des eaux usées (Hagedorn & Weisberg, 2009).

Un marqueur chimique « idéal » pour identifier la présence d'eaux usées dans les eaux de surface doit réunir les caractéristiques suivantes (Petelet-Giraud et al., 2019) :

- Être spécifique à ce type de rejet ;
- Être présent en quantité suffisante pour être détecté (i.e. supérieure aux limites de quantification analytique, même si des méthodes intégratives ou de préconcentration sont possibles) ;
- Être conservatif, c'est-à-dire ne pas interagir avec le milieu.

Tableau 2-4. Analyse de données sur des indicateurs chimiques de la contamination fécale des eaux de surface. Tiré et adapté de (Hajj-Mohamad, 2016)

	Indicateurs	Sources	Taux de persistance	Avantages/Limites	Références
Indicateurs fécaux	**Carbamazépine**	Affluents urbains (50% de CBZ administré et ses métabolites sont excrétés dans les urines et les fèces), 700 Kg de CBZ entrent dans les réseaux d'égouts/année Effluents de STEP (seulement 7%-8,1% de CBZ entrant dans la STEP est éliminé)	Persistance élevée (t½ = 328 j) Dans de l'eau pure, t½ = 121,6 j (en présence de la lumière naturelle). t½ diminue en présence de nitrate (11,2-69 j) et du carbone organique dissous (8,3-14,4 h) à cause de la génération du radical HO· Dans l'eau douce : t½ = 82 ± 11 j et de 1 j (avec simulateur solaire)	Indicateur d'une ancienne contamination fécale Le plus fréquemment détecté dans les effluents des STEP (jusqu'à 6,3 µg/L), dans les eaux de surface (jusqu'à 2,1 µg/L), les eaux souterraines (jusqu'à 0,41 µg/L), l'eau potable (jusqu'à 0,26 µg/L) et dans les sédiments (jusqu'à 49 ng/g) Son adsorption est irréversible et proportionnelle à la teneur en matière organique et en argile et à la salinité (dans le sol), à la force ionique (adsorption à l'albumine). Elle est dépendante de la nature de matière organique dans le sol	(Kolpin et al., 2004; Clara et al., 2004; Loffler et al., 2005; Mohle et al., 2001; Tixier et al., 2003; C. F. Williams et al., 2006; Lienert et al., 2007; Stein et al., 2008; Guo et al., 2009; Ternes, 1998; W. H. Zhang et al., 2010; Y. J. Zhang et al., 2008; Andreozzi et al., 2002; Matamoros et al., 2009; Lam et al., 2004)
	Acétaminophène	Utilisation annuelle de 1310 t (Japon 2002) Ratio d'excrétion du composé parental = 68% Détecté dans les eaux usées	Probablement, rapidement biodégradable dans l'environnement aquatique : 80% biodegradation dans une période de 72 h (t½ = 2.1 j) dans l'eau de rivière Son attachement au sédiment et à la matière organique dissoute est peu probable La lumière solaire affecte sa persistance (t½ = 0,9 ±0,2 j) : photolyse indirecte par réaction avec le radical HO· Sa biodégradation est plus importante que sa photolyse	Son adsorption est basse sur la silice (- à pH neutre), l'alumine (+ à pH neutre) et sur une matrice synthétique hydrophobe Son devenir dans l'environnement aquatique n'est pas significativement affecté par la sorption Légèrement bioaccumulatif % d'abattement par boues activées (MLSS = 3000 mg/L, 6h) >99,5% et la fraction sorbée = 2,9%	(Yamamoto et al., 2005; Lam et al., 2004; Lorphensri et al., 2006; Yamamoto et al., 2009)

Tableau 2-4. Analyse de données sur des indicateurs chimiques de la contamination fécale des eaux de surface (suite)

	Indicateurs	Sources	Taux de persistance	Avantages/Limites	Références
Indicateurs fécaux	**Théophylline**	Sous-produit de la caféine (par catabolisme chez les humains) Excrétée dans l'urine Se trouve sous forme de trace dans le cocoa, les graines vertes du café (5 mg/Kg) et le thé noir (200-400 mg/Kg poids sec) Production de 1000 à 5000 tonnes/an Ajouté aux boissons (Guarana), aux médicaments et aux produits cosmétiques	Biodégradable par *Pseudomonas putida* CBB5 (oxydase) isolée d'un sol enrichi par la caféine : 1-Méthylxanthine et 3-méthylxanthine sont les deux produits de dégradation Dégradation par photolyse indirecte par réaction avec le radical $HO^{\cdot}$, t½ = 20 h Sa persistance dans l'eau est >1 an Son transport dans l'eau (99.98%), dans l'air, le sédiment, le sol et le biote (<0.1%)	La dégradation de la caféine par les bactéries ne produit pas de la théophylline (spécifique aux humains)	(Mohapatra et al., 2006; Yu et al., 2009; Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2004)
	Caféine	Se présente naturellement dans plus de 60 espèces de plantes, y compris les graines du café, cacao, les arbres du cola et dans les feuilles de thé Ajoutée aux boissons et aux ingrédients pharmaceutiques (consommation de 80-400 mg/personne/jour) Déchet agro-industriel majeur généré par les stations de traitement du café et du thé (décaféination) 20-300 mg/L dans les eaux usées, ≤0,15 mg/personne par jour dans les eaux usées traitées Les surverses de réseaux unitaires sont les principales sources de la caféine	Biodégradable par des bactéries de genres *Pseudomonas* et Serratia, par *Klebsiella* sp. et *hodococcus* sp. (Isolées des eaux usées), par *Alcaligenes* sp. CF8 (isolée de l'eau de surface) et par des champignons appartenant aux genres *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus* et *Stemphyllium* (par des enzymes dé-méthylase ou oxidase) Dégradable en présence de la lumière solaire (photolyse indirecte, t½ = 1,5 ± 0,4 j) Adsorption aux sols : *Pahokee* Peat Soil et *Elliott Silt Loam Soil* (K_F =16,85 (mg/g) $(L/mg)^{1/n}$; 1/n = 1,05 et K_F = 15,32 ; 1/n = 1,28 respectivement). Se présente dans les eaux de surface et souterraines (à concentrations plus basses)	Soluble dans l'eau Traité efficacement dans les STEP (> 99%) Par ozonation (dose 100 µM) : 100% d'élimination après 5 min Exige sa présence en concentration élevée et près de la source de contamination Pas de sorption au carbone organique particulaire, donc ne peut pas suivre les microorganismes décantés (dans les sédiments) Production des denrées alimentaires contenant de la caféine à proximité d'une source en cours d'évaluation limite son utilisation comme indicateur Utilisé comme indicateur de contamination fécale des eaux de surface par les eaux usées non traitées (surverses de réseaux unitaires, rejets directs, etc.) mais sa sensibilité dépend des conditions régionales et diminue avec la diminution de l'efficacité de son abattement dans les STEP Corrélation avec la présence de pathogènes dans les eaux de surface	(K. G. Field et al., 2007; Piocos et al., 2000; Young et al., 2008; Buerge et al., 2003; Buerge et al., 2006; Lam et al., 2004; Mohapatra et al., 2006; Scott et al., 2002; Gokulakrishnan et al., 2005; Mazzafera, 2002; Madyastha et al., 1999; Soh et al., 2011)

2.5 Devenir et dynamique des marqueurs chimiques et microbiologiques dans l'environnement aquatique

2.5.1 Marqueurs et indicateurs microbiologiques

La capacité des eaux de surface à éliminer progressivement les bactéries d'origine entérique par un ensemble de processus naturels divers est un fait reconnu depuis longtemps. On observe en effet qu'une fois rejetées dans les milieux aquatiques, ces bactéries disparaissent relativement rapidement de la colonne d'eau. La disparition des bactéries de contamination de l'eau est la conséquence de 3 phénomènes : mortalité, dilution et principalement la sédimentation. (Borrego et al., 1983). Selon Sayler et al. (1975) plus de 80 % des germes indicateurs fécaux sont associés aux particules, parmi lesquels 53 % sont des bactéries viables. La Figure 2-1 schématise les principaux processus environnementaux impliqués dans le devenir des indicateurs fécaux, suite par exemple à une surverse d'égout dans les milieux aquatiques urbains.

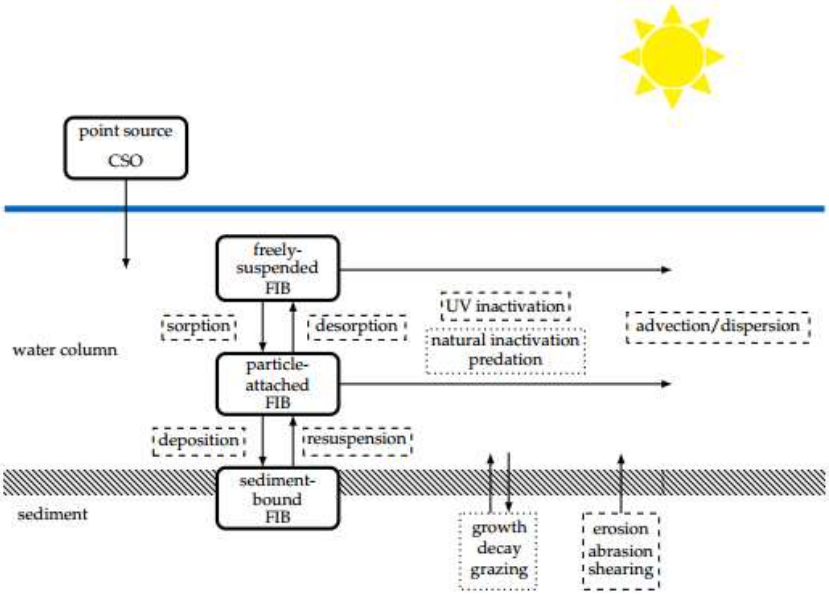


Figure 2-1. Schéma des principaux processus environnementaux impliqués dans le devenir des indicateurs fécaux suite à une surverse d'égout dans les milieux aquatiques urbains. Tirée de (E. Walters, 2013). CSO = combined sewer overflow, FIB = fecal indicator bacteria

2.5.1.1 Inactivation

Parmi les principaux paramètres qui mènent à la mortalité des bactéries ou indicateurs d'origine fécale dans le milieu aquatique, on peut citer les facteurs biotiques et les facteurs abiotiques (Bell et al., 2009). La température, la salinité, l'effet de la lumière, l'oxygène dissous et la prédation ont été les facteurs les plus étudiés (Kreader, 1998; Saunders et al., 2009; S. P. Walters et al., 2009).

Plusieurs expériences ont été effectuées pour suivre la décroissance des *Bactéroïdes spp.* et les marqueurs *Bactéroidales* afin de déterminer l'influence des paramètres biotiques et abiotiques. Ces expériences se faisaient principalement dans des microcosmes et mésocosmes (Bell et al., 2009; Okabe et al., 2007). Mais, comme aucune des souches associées aux marqueurs *Bactéroidales* n'a été cultivée ou identifiée à ce jour, deux des principales espèces de Bacteroides dans l'intestin humain (*B. fragilis et B. thetaiotaomicron*) ont été les premières à être utilisées dans plusieurs études pour simuler le modèle de survie et de la persistance des marqueurs *Bactéroidales* une fois libérés dans l'environnement. Ainsi, (Fiksdal et al., 1985) ont démontré que 1 % des colonies de *B. fragilis* pouvait être détecté après une semaine dans une eau à 12 °C en présence d'oxygène, 2 % pour *E. coli* et 9 % pour *Streptococcus faecalis*.

Balleste and Blanch (2010), ont examiné la survie de *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, et des *Bactéroides spp.* environnementales (eaux usées) en deux saisons (hiver et été). Deux types d'expériences ont été réalisées : (i) des expériences *in situ* (rivière), dans lesquelles les bactéries ont été exposées à plusieurs paramètres environnementaux (température, oxygène dissous, la prédation, etc.), et (ii) des essais en microcosme dans le laboratoire simulant les mêmes conditions et à des températures contrôlées. Ils sont arrivés aux conclusions suivantes : (1) il y avait différents schémas de survie dépendamment des saisons et ces variations saisonnières étaient principalement dues aux variations de la température et de la concentration en oxygène dissous dans l'eau. Ainsi,

la décroissance *de B. fragilis* a été fortement affectée par l'effet combiné des températures élevées et des prédateurs, qui étaient plus importants dans des conditions plus chaudes (été). Cependant, les taux de survie *B. thetaiotaomicron* et les *Bactéroides spp.* d'origine environnementale (eaux usées) ont été plus touchés par la concentration de l'oxygène dissous (hiver). En effet, la concentration en oxygène dans l'eau dépend de paramètres physiques tels que la température et la pression atmosphérique, et des paramètres biologiques, tels que les activités photosynthétiques et respiratoires des organismes dans l'eau. Ceci a été expliqué par le fait qu'en hiver, où les températures sont plus basses, la concentration en oxygène dans l'eau est plus élevée (Lewis, 2006), par conséquent, *B. fragilis* connue pour survivre pendant 48 à 72 h en conditions aérobies, persistait mieux que *B. thetaiotaomicron*. (2) Toutes les *Bactéroides spp.* isolées à partir de l'environnement (eau usée) persistaient mieux aux différentes conditions en comparaison avec *B. fragilis et B. thetaiotaomicron* utilisées en laboratoire. Ceci indique que les souches environnementales sont mieux adaptées à une pression sélective induite par des facteurs environnementaux. Toutefois, leur période de survie était plus courte que celle observée pour les coliformes fécaux et entérocoques, ce qui suggère que les espèces *Bactéroïdes* pourraient être plus utiles en tant que marqueurs de la pollution fécale récente. (3) Les périodes de persistance de *B. fragilis* et *B. thetaiotaomicron* dans des microcosmes en conditions contrôlées étaient plus longues que les périodes observées dans l'environnement. Par conséquent, l'utilisation de ces conditions expérimentales peut conduire les chercheurs à mal interpréter la survie des bactéries dans l'environnement. Ainsi, la combinaison des deux types d'expériences est importante pour comprendre la survie des *Bactéroides* dans l'environnement (Balleste & Blanch, 2010). Un autre paramètre qui affecte la survie et la persistance des *Bactéroides* dans l'environnement et qui est en lien avec les variations saisonnières est la prédation. Comme exemple, l'étude de Ballesté et al.

(2010), où en présence de températures d'eau élevées (27,3 °C à 32,6 °C), l'activité des prédateurs a été beaucoup plus accentuée, menant à une persistance faible de cellules cultivables *B. fragilis.*

2.5.1.2 Dispersion/dilution

Le transport des bactéries suit généralement le processus d'advection-dispersion-sorption (ADS) (De Marsily, 1986). La dilution et la dispersion dépendent uniquement de l'hydrodynamique du système. Le problème de l'impact polluant de rejets urbains est donc très lié à l'étude de la dispersion et la décantation des particules solides dans le milieu récepteur.

La distance de transport des particules est un paramètre utilisé pour définir la distance longitudinale moyenne des particules après l'introduction ou la réintroduction dans la colonne d'eau jusqu'à ce qu'ils soient déposés.

Newbold et al. (1981) ont affirmé que lorsque la turbulence maintient les particules bien mélangées dans la colonne d'eau, la concentration de la matière particulaire diminue de façon exponentielle avec la distance parcourue en aval. La contamination ne reste pas localisée au point de rejet; (Shiaris et al., 1987) ont trouvé des coliformes et entérocoques fécaux jusqu'à 460 m de l'émissaire alors que Loutit et al. (2010) ont détecté des coliformes jusqu'à 8 km du point de rejet en fonction des différents courants.

2.5.1.3 Sédimentation

La sédimentation est conditionnée par l'attachement des bactéries fécales à des matières en suspension (flocs). La répartition des bactéries entre les particules et l'eau influence fortement la décantation des bactéries attachées par sédimentation (Jeng et al., 2005). Les bactéries associées aux particules inorganiques à densité élevée décantent plus vite (Characklis et al., 2005). La sédimentation des bactéries à la sortie d'un rejet fait l'objet de diverses études : selon Eriksson &

Axberg (1981), les composés polluants issus de rejets et les polymères extracellulaires tendent à former des ponts entre les bactéries ce qui favorise la sédimentation. Ce constat a été appuyé et confirmé par (Droppo, 2004; Droppo et al., 1996). Ces chercheurs, par un examen microscopique des flocs, ont trouvé que ces derniers étaient composés de polymères extracellulaires, de microorganismes et de substances organiques et inorganiques adsorbés. Les polymères fibreux et polysaccharidiques permettent de renforcer la structure de flocs en augmentant la surface disponible pour la sorption des nutriments et des contaminants. L'importance de la floculation au sein du transport d'une suspension est reliée au caractère cohésif des particules considérées. Le mécanisme de floculation peut modifier considérablement les caractéristiques hydrodynamiques des particules. La masse volumique diminue, alors que la porosité, la vitesse de chute et la teneur en matière organique et en eau croissent lorsque la taille de floc augmente (Droppo et al., 2002).

Au contraire, Milne et al. (1986) ont noté que si le taux de sédimentation dans une eau d'estuaire augmente proportionnellement avec la concentration en matière en suspension, dans un mélange rejet de surverse/eau d'estuaire par exemple, il n'y avait plus de corrélation. Les particules issues des rejets présentaient de faibles capacités de sédimentation.

Plusieurs études montrent que les sédiments sont un réservoir très important de bactéries fécales et que les concentrations en bactéries fécales observées dans les sédiments sont souvent de 10 à 1000 fois supérieures à celles de la colonne d'eau sus-jacente (Buckley et al., 1998; Crabill et al., 1999). Les sédiments protègent, en effet, les bactéries des radiations solaires, de la prédation par les protozoaires et offrent une pénétration limitée de l'oxygène. Néanmoins, l'avantage principal offert par les sédiments est la matière organique disponible et la possibilité de formation de biofilms. La nature des sédiments auxquels les bactéries fécales sont associées semblerait aussi avoir une influence sur leur survie. Les études d'impact de rejet montrent que les plus fortes concentrations de bactéries fécales sont dans les sédiments vaseux plutôt que sableux (Volterra et al., 1985). Les

particules de petite taille avec un contenu élevé en carbone organique favoriseraient davantage la persistance de ces bactéries (Burton et al., 1987; Craig et al., 2003, 2004).

La survie prolongée des bactéries de contamination fécale dans les sédiments provoque un risque sanitaire important, lequel n'est pas souvent pris en compte. Certains auteurs proposent que l'évaluation de la qualité des eaux en zones de baignade devrait inclure une évaluation des concentrations de bactéries fécales dans les sédiments (Burton et al., 1987; Craig et al., 2003, 2004). Ce risque vient surtout de la remise en suspension, qui peut constituer une source de contamination au même titre qu'un rejet. De nombreux facteurs peuvent remettre en suspension les particules de surface : les courants, la marée, le vent, mais aussi les poissons et l'humain (pêche, nautisme, baignade, etc.) (Craig et al., 2003; Shiaris et al., 1987; Pettibone et al., 1996).

2.5.1.4 Attachement des bactéries fécales aux matières en suspension (phase particulaire)

Un des processus importants pour la dynamique des bactéries fécales en milieux naturels est l'attachement aux particules. Les bactéries attachées peuvent, comme les particules, sédimenter et être remises en suspension.

L'adhésion de bactéries à des surfaces solides dans un système aqueux est une interaction complexe entre la bactérie, le substrat solide et la phase liquide. Les caractéristiques de la surface d'adhésion et la tension superficielle de surface sont des facteurs déterminants pour l'adhérence bactérienne. Par exemple, il a été montré par Fletcher et al. (1985) que de nombreuses bactéries adhèrent aux surfaces hydrophobes et à basse énergie.

Les facteurs favorisant les contacts avec la surface et augmentant l'adhésion sont le plus souvent de nature biologique (exo-polysaccharides d'origine microbienne). Par contre, Fletcher (1977) a trouvé une similitude avec les modèles cinétiques décrivant l'adsorption bactérienne (en solution) sur des surfaces (particules). Le fait que les caractéristiques de l'adsorption peuvent être décrites

par une équation de type Langmuir suggère que les éléments incitatifs à l'attachement bactérien pourraient être contrôlés par des phénomènes non biologiques, le plus souvent la force ionique et l'hydrophobicité des particules.

Dans les systèmes naturels, les bactéries et les surfaces de la plupart des particules/sédiments sont chargées négativement et donc normalement, les deux se repousseraient mutuellement. Cependant, comme souligné dans Jamieson et al. (2005), l'adsorption microbienne est décrite le plus souvent par la théorie DLVO (Deryagin - Landau et Verwey-Overbeek) de la double couche (Derjaguin et al., 1993; Verwey, 1947; van Loosdrecht et al., 1989). D'après cette théorie, il existe deux degrés d'adsorption bactérienne avec les sédiments dans le milieu aquatique : l'adsorption faible et l'adsorption forte. La faible adsorption se produit lorsque les forces répulsives sont surpassées par les forces de Van der Waals. Dans de tels cas, les bactéries ne sont pas nécessairement liées aux particules, mais sont juste étroitement associées à leurs surfaces. Le résultat est un type de liaison qui est considéré comme réversible. Les microorganismes peuvent également se lier de manière irréversible aux particules en excrétant des substances polymériques extracellulaires (EPS) ou avec des appendices cellulaires tels que le pili ou fimbriae (Madigan et al., 2004). Cette liaison leur permet de rester collées aux surfaces des particules, malgré l'exposition aux forces de cisaillement élevées, souvent trouvées dans les rivières.

Dans les systèmes fluviaux, il est bien documenté que les deux communautés microbiennes allochtones et autochtones peuvent être fortement associées aux particules (Jamieson, R., et al., 2004; Fries et al., 2008; Droppo et al., 2009; Rehmann et al., 2009). Dans leur étude d'un estuaire, Plummer et al. (1987) ont mis en évidence trois groupes de bactéries dans l'eau : les bactéries libres, les bactéries associées aux particules toujours en suspension et les bactéries associées aux particules qui sédimentent et peuvent être remises en suspension.

Les particules en suspension riches en matière organique procurent un environnement favorable à l'activité bactérienne. Plusieurs études ont été menées pour déterminer la fraction des bactéries qui s'attachent aux particules. La recherche de cette fraction a été réalisée soit par la technique de filtration et/ou filtration fractionnelle (Mahler et al., 2000; Jeng et al., 2005) , la sédimentation statique (Jeng et al., 2005) ou par la centrifugation (Characklis et al., 2005; Krometis et al., 2007). Jeng et al.(2005) ont combiné les techniques de sédimentation statique et de filtration fractionnelle pour déterminer la vitesse de décantation de coliformes fécaux, *E. coli* et E*nterococci* attachées aux particules et leur répartition sur les différentes classes de particules dans l'eau de ruissellement urbain. Ils ont trouvé qu'en moyenne, 82 % des particules de plus de 5 µm ont décanté en cinq heures jusqu'à une profondeur de 40 cm. Et que respectivement 95 %, 97 % et 97 % des coliformes fécaux, *E. coli* et *Enterococci* sont attachées aux particules inférieures à 30 µm, un diamètre qui correspond aux argiles et à la glaise. Les travaux de Jeng et al.(2005) ont été confirmés par d'autres chercheurs. Oliver et al. (2007) ont étudié et comparé l'attachement d'*E. coli* sur différentes tailles de sédiments (<2, 2-3, 4-15, 16-30, et ≥ 31 µm). 65 % d'*E. coli* étaient attachées à des particules d'une taille inférieure à 2 µm.

Krometis et al.(2007), en utilisant la même technique de centrifugation de Characklis et al. (2005) ont suivi l'attachement d'*E. coli* aux particules en suspension dans deux rivières qui reçoivent les eaux de ruissellement de zones résidentielles et institutionnelles. La fraction moyenne attachée en *E. coli* était de 27% en temps sec et variait de 21 à 86% en temps de pluie.

Luef et al. (2007) ont démontré qu'entre 30 et 42 % de la population de bactéries échantillonnées à partir d'une plaine d'inondation sur le Danube, ont été attachées à des particules pendant les précipitations. Fries et al. (2006) ont examiné la fraction d'attachement d'*E. coli* et des entérocoques dans les deux conditions climatiques : temps sec et en temps de pluie d'un estuaire

en Caroline du Nord. Les fractions moyennes attachées en *E. coli* dans des conditions de temps sec et de pluie ainsi que les entérocoques pendant les tempêtes étaient de 0,08± 0,02 et environ 0,38 ± 0,04 respectivement.

Mahler et al.(2000) ont étudié les eaux souterraines des régions karstiques très sensibles aux contaminations par des microorganismes pathogènes, ils ont constaté que 100 % de coliformes fécaux étaient attachés aux MES après les précipitations, alors qu'environ 50 % l'étaient en temps sec. À la suite de ces résultats, les bactéries attachées aux particules ont été prises en considération dans les pratiques de gestion des eaux souterraines.

2.5.2 Marqueurs et micropolluants chimiques

Une fois dans les égouts et les cours d'eau, les marqueurs chimiques peuvent subir une série de processus, tels que la dilution, la photolyse, la biodégradation, les transformations abiotiques (comme l'hydrolyse) et la sorption aux matières en suspension et aux sédiments du fond, qui peuvent contribuer à leur élimination de l'eau de l'environnement (Yamamoto et al. 2009). Ces processus influencent les concentrations des marqueurs dans l'environnement et dépendent de la nature des composés organiques et des conditions environnementales. (Warren et al., 2003). En effet, après rejet dans le compartiment récepteur, eau de surface, égout ou sédiments, le devenir des traceurs sanitaires dépendra de leurs caractéristiques intrinsèques propres mais aussi des caractéristiques du milieu environnemental y compris le pH, la teneur en carbone organique, la teneur en oxyde de métal, la force ionique, et la capacité d'échange cationique (ter Laak et al. 2006).

La sorption est un des processus clé dans le devenir des traceurs ou polluants organiques dans les compartiments récepteurs. Il s'agit d'un processus par lequel une substance sous forme liquide (ou gazeuse) est adsorbée, en adhérant à la surface d'un solide, ou absorbée, en s'incorporant dans la totalité du volume d'un solide. La sorption peut avoir un impact sur la dispersion (transport de

particules liées) et la (bio) disponibilité des produits pharmaceutiques dans l'environnement. La forte interaction des composés pharmaceutique avec les particules, notamment les colloïdales, peut fournir un réservoir à long terme aux produits pharmaceutiques, par conséquent, ces composés sont plus persistants dans l'environnement, et leur biodégradabilité est réduite (Warren et al., 2003). En conséquence, la sorption peut résulter en une estimation biaisée des risques. Les composés organiques qui s'associent fortement aux sédiments naturels, notamment les composés hydrophobes, disparaîtront plus vite de la colonne d'eau par sédimentation, dès lors, un suivi de leurs concentrations dans la phase dissoute ne fournirait pas une évaluation exacte du risque (Maskaoui et al., 2010). Par exemple, (Nakada et al., 2008) ont démontré que le triclosan relativement hydrophobe, s'adsorbait plus sur les particules, son taux d'enlèvement de la colonne d'eau était plus élevé au printemps (91 %), avec des concentrations de MES de 4,4 à 23,3 mg/L, qu'en été (70 %), où les concentrations de MES étaient de 2,6 à 12,6 mg/L. Un contre-exemple, dans les travaux de Buerg et al. (2003), la caféine, plus hydrophile, a montré une adsorption très négligeable, son enlèvement de la colonne d'eau était principalement dû à l'hydrolyse et la biodégradation.

Le coefficient de distribution solide- eau (Kd) est un paramètre clé pour comprendre la sorption et la mobilité d'un produit pharmaceutique à travers les compartiments environnementaux et sa disponibilité pour la dégradation. Kd correspond à la quantité d'un composé chimique adsorbée sur un solide par rapport à celui dissous dans une solution à l'équilibre. Ce coefficient dépend des propriétés physico-chimiques du composé et de la teneur en matière organique. En effet, les interactions des composés hydrophobes avec la phase solide sont entièrement dépendantes des propriétés de la matière organique dans la solution (Mader et al., 1997). C'est pour cela que ce Coefficient est souvent normalisé ou corrigé en coefficient $K_{OC} = K_D/F_{OC}$ lequel est fonction de

la fraction de la matière organique (f_{OC}) des solides. Le coefficient octanol-eau (Kow) est une valeur souvent utilisée en modélisation ou en industrie pour prédire la sorption d'un composé chimique dans un système eau/solide. Elle correspond au rapport des concentrations du composé ou traceur étudié dans l'octanol et dans l'eau à l'équilibre et permet d'estimer le caractère hydrophile ou hydrophobe de ce dernier. Le Kow permet d'anticiper la capacité d'un composé à se concentrer (bioconcentration) et à s'accumuler (bioaccumulation) dans les organismes. Par exemple, un composé qui possède un Kow élevé sera plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, montrant ainsi son caractère lipophile. En parallèle, son caractère hydrophobe est également reflété; les traceurs sanitaires montrant une répulsion vis-à-vis de l'eau et ayant un fort Kow auront généralement une préférence pour la phase solide (sols, sédiments, particules en suspension dans la colonne d'eau). Les traceurs chimiques hydrophobes sont apolaires et peu solubles dans l'eau (solubilité de quelques ng/L à 1 mg/L) (Schwarzenbach et al., 2003).

Le coefficient de partitionnement, est très utile pour prédire le comportement des traceurs ou composés chimiques qui ont une charge neutre ou non ionisable (Martínez-Hernández et al., 2014). Néanmoins, quelques auteurs pensent que ce coefficient en supposant que les tous les composés sont présents sous forme neutre, ne prend pas en considération l'état d'ionisations des traceurs chimiques souvent rencontrés dans l'environnement (Schaffer et al., 2012). Par ailleurs, les composés chimiques, en particulier les composés pharmaceutiques affichent un large éventail de comportements de sorption et de désorption. Un même composé peut montrer différents comportements (sorption ou désorption) dans différents types de sol (Tolls, 2001).

CHAPITRE 3 OBJECTIFS DE RECHERCHE ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

La synthèse bibliographique a mis en avant le risque de santé publique que peuvent entraîner les contaminations fécales des eaux. La stratégie de protection et de conservation des sources destinées à l'alimentation en eau potable (Gouvernement du Québec, 2012) et les exigences de réalisation d'une analyse de vulnérabilité formulées dans le RPEP constituent un premier pas pour assurer une meilleure protection des sources d'eau potable au Québec (MELCC, 2018). Néanmoins, ces exigences imposent des objectifs en termes d'identification et de priorisation des sources potentielles de contaminations fécales des sources d'eau potable. Présentement, les seuls outils à disposition des collectivités sont des indicateurs microbiologiques traditionnels qui indiquent la présence d'une charge fécale récente mais ne permettent pas une différenciation de l'origine de la pollution fécale. Il s'avère alors indispensable de tester et valider des nouveaux outils/ marqueurs capables d'identifier les sources de contaminations fécales d'origine humaine particulièrement dans des systèmes multi-sources.

La sélection des marqueurs les plus pratiques est une analyse préliminaire pour améliorer la prise de décision concernant l'utilisation de l'approche MST. A l'heure actuelle, il est difficile de considérer qu'un marqueur unique résoudra le problème de l'identification de l'origine de la contamination fécale dans chaque cours d'eau. L'approche la plus recommandée est l'utilisation d'une combinaison (boîte à outils) de marqueurs qui pourraient d'une part augmenter le taux de réussite dans l'identification des principales sources de pollution fécale dans l'eau et d'autre part, permettrait de prévenir les limites de certains marqueurs (absence de signal, faible persistance dans l'environnement …etc.). En effet, plusieurs facteurs pourraient affecter l'utilisation combinée des marqueurs lorsqu'ils sont appliqués en identification de sources, tels que la dilution des marqueurs

dans la masse d'eau, l'adsorption, leur inactivation environnementale et la complexité de plusieurs sources de pollution. Dès lors, la persistance et le devenir environnemental de tout marqueur MST appliqué doivent être préalablement évalués pour les stratégies de gestion.

3.1 Objectif principal

Le projet de recherche vise à tester une boîte à outils opérationnelle composée de marqueurs chimiques et moléculaires permettant à tracer des contaminations fécales d'origine humaine (des eaux usées urbaines) et ce en différentes matrices environnementales et dans différentes conditions hydrométéorologique (temps sec vs temps de pluie/fonte de neige).

3.2 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques de ce projet ont fait l'objet de 3 publications:

Article 1

1. Tester la "robustesse" et l'utilité de la boite à outils MST à :
    - Cibler et identifier par temps sec, les exutoires pluviaux contenant des rejets d'origine domestique et localiser les conduites contenant un ou des raccordements inversés,
    - À partir d'une combinaison optimale de traceurs d'eau usée, proposer un indice sanitaire basé sur l'approche "poids de la preuve" et évaluer son intégration dans un protocole d'échantillonnage pratique et rentable pour la détection des raccordements inversés dans les réseaux d'égouts pluviaux.

Article 2

2. Évaluer l'utilisation de la mesure en ligne et à haut fréquence de l'activité glucuronidase (GLUC) installée aux prises d'eau brutes à déclencher l'échantillonnage ciblé.
3. Évaluer en différents événements critiques (pluie/fonte de neige), la contribution des eaux usées aux pointes de contaminations fécales à l'entrée des usines de traitement d'eau potable.
4. Évaluer la pertinence des marqueurs humains à capturer le pic des pathogène en période de haute vulnérabilité des prises d'eau.

Article 3

5. Comprendre la dynamique d'*E. coli* et les marqueurs chimiques entre la phase dissoute, la phase particulaire (matières en suspension) et les sédiments dans un cours d'eau source d'eau potable et ce dans des conditions de temps sec et des conditions pluvieuses.
6. Vérifier le comportement conservateur des marqueurs chimiques dans la rivière réceptrice des rejets d'eau usées (c'est-à-dire ne pas interagir avec le milieu par la sorption ou encore, ne pas être sensible à la (bio)dégradation.

L'atteinte de ces objectifs permettra de répondre à plusieurs questions de recherche relatives à la mise en place de mesure correctives rapides à la problématique des raccordements inversés en temps sec et répondre en partie aux exigences de réalisation d'une analyse de vulnérabilité aux microorganismes formulées dans le Règlement sur le prélèvement des eaux et leur protection (RPEP):

- Quels sont les niveaux de marqueurs et la fréquence de détection dans les eaux de surface sources d'eau potable ?

- Les résultats des marqueurs moléculaires (HF183 et l'ADN mitochondrial) ou chimiques (PPSP) sont-ils en corrélation avec les concentrations de *E. coli* ?
- Les marqueurs moléculaires et les marqueurs chimiques peuvent-ils être utilisés comme traceur d'eaux usées pour identifier les raccordements inversés ?
- Les marqueurs moléculaires et les marqueurs chimiques peuvent-ils être utilisés comme traceur de surverse au niveau des prises d'eau potable ?
- La présence d'un marqueur humain était-elle due à un seul événement de contamination fécale ou représentatif d'une pollution persistante ?
- Un indice sanitaire ou l'utilisation combinée de plusieurs marqueurs est-il nécessaire pour accroître la confiance dans les résultats des échantillons ?
- Comment, en pratique, intégrer les méthodes MST et CST, surtout dans des circonstances différentes ?
- Comment les résultats de ces deux méthodes peuvent-ils être raisonnablement intégrés et validés afin d'obtenir des résultats plus solides et plus fiables ?
- L'utilité des marqueurs anthropiques change-t-elle de façon temporelle dans les cours d'eau ?
- Les concentrations des marqueurs MST dans la phase particulaire et dans les sédiments offrent-elles une plus grande précision que les concentrations dans l'eau pour le suivi des rejets d'eaux usées ?

3.3 Hypothèses de recherche

Le Tableau 3-1 présente les hypothèses de recherche et leurs originalités.

Tableau 3-1. Objectifs spécifiques et hypothèses de recherche

Objectifs spécifiques	Hypothèses	Originalité	Réfutabilité
1. Cibler et identifier par temps sec, les exutoires pluviaux contenant des rejets d'origine domestique et localiser en amont les conduites contenant un ou des raccordements inversés.	L'utilisation de marqueurs spécifiques des rejets anthropiques permettra de répertorier les cours d'eau et les exutoires pluviaux contaminés par les eaux usées.	En comparaison avec les méthodes conventionnelles, très peu d'études ont investigué l'utilisation combinée de plusieurs indicateurs et marqueurs de contamination fécale, notamment l'ADN mitochondrial, les Bactéroïdes et les composés pharmaceutiques pour identifier les rejets urbains en temps sec.	L'hypothèse sera réfutée si les niveaux de contamination dans le bassin versant en étude ne dépassent pas les limites de détection des marqueurs ciblés.
2. Proposer un indice sanitaire basé sur l'approche "poids de la preuve" et évaluer son intégration dans un protocole d'échantillonnage pratique et rentable pour la détection des raccordements inversés dans les réseaux d'égouts pluviaux.	Un ensemble optimal de marqueurs chimiques et microbiologiques devrait permettre l'identification des sources des pollutions fécales humaines.	**A.** Il n'y aucun indice sanitaire basé sur les marqueurs MST qui a été testé et validé sur le terrain pour les raccordements inversés **B.** Des recherches complémentaires sont nécessaires pour bien cibler les meilleurs marqueurs de dépistage de sources microbiennes et qui sont les mieux corrélés avec les indicateurs standards.	Les hypothèses seront réfutées si les niveaux des marqueurs sont trop variables et ne permettent pas de confirmer ou identifier la source fécale, ou encore sont mal corrélées avec les indicateurs standards (*E. coli*).
3. Évaluer l'utilisation de la mesure en ligne et à haut fréquence de l'activité glucuronidase (GLUC) installée aux prises d'eau brutes pour déclencher l'échantillonnage ciblé.	**A.** La dérivation à l'usine d'épuration et les débordements d'égouts unitaires en période de pluie et de fonte de neige sont des évènements transitoires qui constituent les périodes critiques de contamination microbiologique des prises d'eau potable situées en aval.	Aucune des études ne prenait en compte la dynamique de ces indicateurs dans différentes conditions météorologiques et n'évaluait pas leurs performances et spécificités à identifier efficacement les sources de contamination fécale.	L'hypothèse sera réfutée si l'activité GLUC ne nous permet pas de capter la pointe de contamination par les eaux usées.
4. Évaluer en différents événements critiques (pluie/fonte de neige), la contribution des eaux usées aux pointes de contaminations fécales à l'entrée des usines de traitement d'eau potable.	**B.** Les conditions environnementales (pluie et fonte de neige) peuvent exercer une influence marquée sur la concentration et la validité des marqueurs dans l'eau brute. **C.** Une boite à outils de marqueurs chimiques (PPSP) et génétiques (HF183 et ADN mitochondrial) peut être utilisée comme traceur de contamination fécale provenant des surverses associées aux événements critiques au niveau des prises d'eau potable.		Les concentrations mesurées au niveau des prises d'eau après les surverses/dérivations sont plus faibles ou du même ordre de grandeur que celles mesurées en temps sec.

Tableau 3-1. Objectifs spécifiques et hypothèses de recherche (suite)

Objectifs spécifiques	Hypothèses	Originalité	Réfutabilité
5. Comprendre la dynamique d'*E. coli* et des marqueurs chimiques d'origine fécale (PPSP) entre la phase dissoute, la phase particulaire (matières en suspension) et les sédiments dans un cours d'eau source d'eau potable et ce, dans des conditions de temps sec et des conditions pluvieuses.	**A.** Le transport et le devenir d'*E. coli* et des micropolluants chimiques d'origine entérique sont principalement contrôlés par la nature dynamique de leur association avec la matière particulaire et les sédiments. **B.** La remise en suspension des sédiments de la rivière et les dépôts cumulés du réseau d'égout sont la source principale des pics de contamination fécale et de MES après un évènement pluvieux. **C.** La fraction des marqueurs chimiques et microbiologiques associés aux particules variera selon le type d'indicateur et les conditions météorologiques.	Aucune étude à notre connaissance n'a suivi en combinaison la dynamique spatio-temporelle d'un indicateur classique (*E. coli*) et des marqueurs MST dans ce cas-ci les PPSP dans la phase dissoute et particulaire (sorption) pour évaluer leur pertinence comme traceurs de contamination par les eaux usées; dans la littérature, la persistance et le devenir des indicateurs sont principalement axées sur les effets de la salinité, la température, la lumière et la prédation.	Les hypothèses seront réfutées si les marqueurs étudiés ne s'associent peu ou pas aux particules et qu'ils se trouvent principalement dans la phase dissoute quelle que soit la concentration de MES dans le milieu aquatique, et que ces concentrations demeurent stables même en conditions pluviales.
6. Évaluer la pertinence des marqueurs humains à capturer le pic des pathogènes en période de haute vulnérabilité des prises d'eau.	**A.** Les pathogènes mesurés au niveau de la prise d'eau sont essentiellement d'origine humaine. **B.** Les marqueurs spécifiques de présence d'eaux usées au niveau de prises d'eau seront de meilleurs indicateurs de certain pathogènes que l'indicateur classique *E. coli.*	La capture des pics de pathogènes au niveau des prises d'eau par l'utilisation de l'activité GLUC et les marqueurs MST n'a pas encore été réalisée.	L'hypothèse sera réfutée si les pointes de contamination des marqueurs et des pathogènes ne sont pas reliées dans le temps.

3.4 Méthodologie

3.4.1 Échantillonnage et description des bassins versant

Bassin versant de la rivière des Mille-Îles

La rivière des Mille-Îles a été choisie comme site d'étude pour l'application de la boite à outils "Toolbox" des marqueurs de dépistage de la contamination fécale d'origine humaine. Elle prend source au lac de deux montagnes et constitue l'un des cinq exutoires de la rivière des Outaouais. De sa source, à l'ouest, jusqu'à son embouchure dans la rivière des Prairies, à l'est, la rivière des Mille Îles parcourt une quarantaine de kilomètres. Quatre cours d'eau principaux (tributaires) se déversent dans la rivière des Mille Îles et drainent 73 % de son bassin versant : il s'agit des rivières du Chêne, du Chicot, aux Chiens et Mascouche (Conseil des bassins versants des Mille-Îles, 2011) (Figure 3-1). Avec un débit moyen variable de 140 à 315 m^3/s selon les saisons (Burnet et al, 2019), elle approvisionne en eau potable environ 556 000 personnes dans la couronne nord de Montréal et à Laval. L'occupation du territoire est constituée de 45 % agricole et 19 % urbaine (Conseil des bassins versants des Mille-Îles, 2014).

La rivière des Mille-Îles constitue un excellent choix pour le présent projet pour les raisons suivantes :

1) Elle est sous une forte influence urbaine en raison de :
   - Surverses dans le réseau d'égouts : il y a 157 ouvrages de surverse sur la rive nord de la rivière et 37 sur sa rive sud. Ces surverses servent à évacuer l'eau des réseaux d'égout en cas de saturation, entraînant le rejet d'eaux usées non traitées à l'environnement (Figure 3-1);
   - Mille cinq cent débordements se sont produits en 2013 (MAMROT, 2013) et les exigences du ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP) ne sont

pas respectées quant aux débordements des eaux usées en temps de pluie, et ce pour les années 2008 à 2011. Deux-Montagnes, Saint-Eustache et Terrebonne sont les secteurs les plus touchés;

- Rejets d'eau usée non traitée ou partiellement traitée (dérivations) par les stations d'épuration : quatorze stations d'épuration rejettent leurs effluents dans la rivière des Mille-Îles ou dans ses tributaires dont neuf se situent en amont d'une prise d'eau potable;
- Ruissellements urbains : le développement urbain du bassin versant de la rivière a réduit sa capacité naturelle à retenir les eaux lors de précipitations ou de la fonte des neiges. En effet, le temps de réponse hydrologique des bassins versants de la zone des Mille-Îles est rapide en raison d'un réseau de drainage densifié, une forte imperméabilisation des sols, plus la nature argileuse des sols (Conseil des bassins versants des Mille-Îles, 2011);
- Raccordements croisés : il est fort possible que les conduites d'eau usée de certaines résidences (construites après 1980) soient branchées volontairement ou non sur le réseau d'égout pluvial, ou des conduites d'eau pluviale peuvent être branchées aux conduites d'eau usée entraînant par conséquent soit un déversement sans traitement dans l'environnement dans le premier cas, soit une surcharge dans le réseau d'égout augmentant ainsi les probabilités de débordement aux ouvrages de surverse dans le deuxième cas (Conseil des bassins versants des Mille-Îles, 2014);

2) Les prises d'eau potable et les points de rejet d'eaux usées (effluents de stations d'épuration traités ou non et d'ouvrages de surverse) se succèdent tout au long de la rivière, par conséquent l'eau brute destinée aux stations d'eau potable peut donc présenter une importante contamination microbiologique;

3) Les critères de contact primaire, approvisionnement en eau potable (200 *E. coli*/100mL) et de contact secondaire (1000 *E. coli*/100mL) sont fréquemment dépassés et sont plus élevés en aval de la rivière des Mille-Îles qu'en amont (Conseil des bassins versants des Mille-Îles, 2014);

4) Une étude réalisée sur la qualité de l'eau dans la rivière des Mille-Îles entre 2000 et 2005 (Brouillette, 2007), et une étude plus récente (Burnet et al. 2019) sur la qualité microbiologique à l'eau brute de deux prises d'eau potables indiquent que les concentrations les plus élevées en coliformes fécaux et *E. coli* étaient observées après des précipitations importantes et à la fonte des neiges et que ces dernières étaient des périodes critiques pour les prises d'eau.

Par ailleurs, la contamination microbiologique dans la rivière des Mille Îles a été identifiée comme une des quatre priorités du plan directeur de l'eau par le conseil des bassins versants des Mille Îles (COBAMIL) dévoilé en avril 2014. Ainsi, des efforts importants sont requis, pour s'assurer des meilleures pratiques en matière de gestion des eaux usées. La nécessité d'identifier, de déterminer le devenir et de quantifier les sources précises de contamination fécale et d'y remédier représente donc de grands défis à relever par l'ensemble des acteurs du secteur de l'eau.

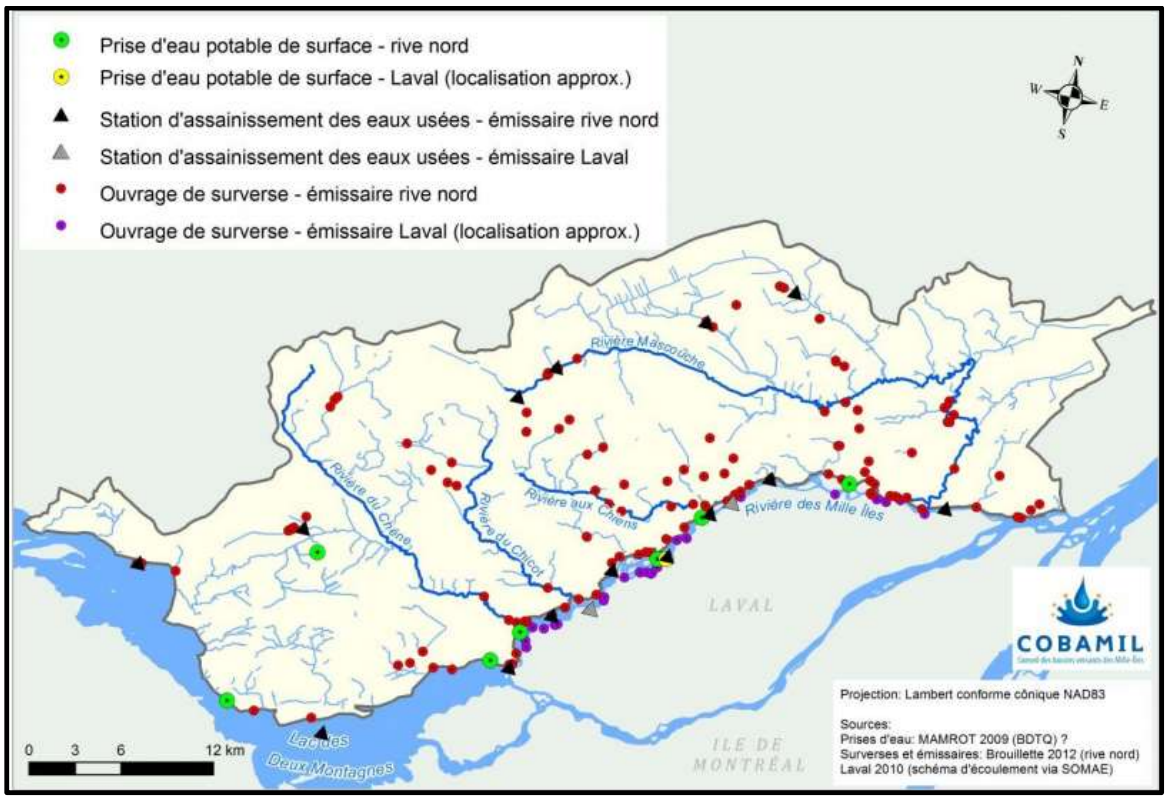


Figure 3-1. Prises d'eaux potable et points de rejets d'eaux usées dans la rivière des Mille-Îles et le lac Deux Montagnes tiré du *(Conseil des bassins versants des Mille-Îles, 2012)*

<u>Sous-bassin versant de la rivière Noire</u>

L'usine de traitement d'eau potable étudiée (Figure 3-2) tire l'eau de la rivière noire, une rivière de 42 km de long et un débit annuel moyen de 16 m^3/s, située dans la grande région de Montréal, dans le sud-ouest du Québec, Canada. La rivière Noire est le plus important tributaire de la rivière Yamaska. La rivière Noire coule sur la Rive-Sud du fleuve Saint-Laurent, au Québec, Canada. Selon une étude de la qualité de l'eau de la rivière Yamaska, effectuée par le ministère de l'Environnement et de la Faune en 1990, le secteur rivière Noire présente une eau de qualité détériorée. Les problèmes rencontrés sont principalement causés par un enrichissement en

substances nutritives et une contamination bactériologique généralisée, provenant du mauvais traitement des eaux usées des milieux urbains et de la pollution agricole diffuse.

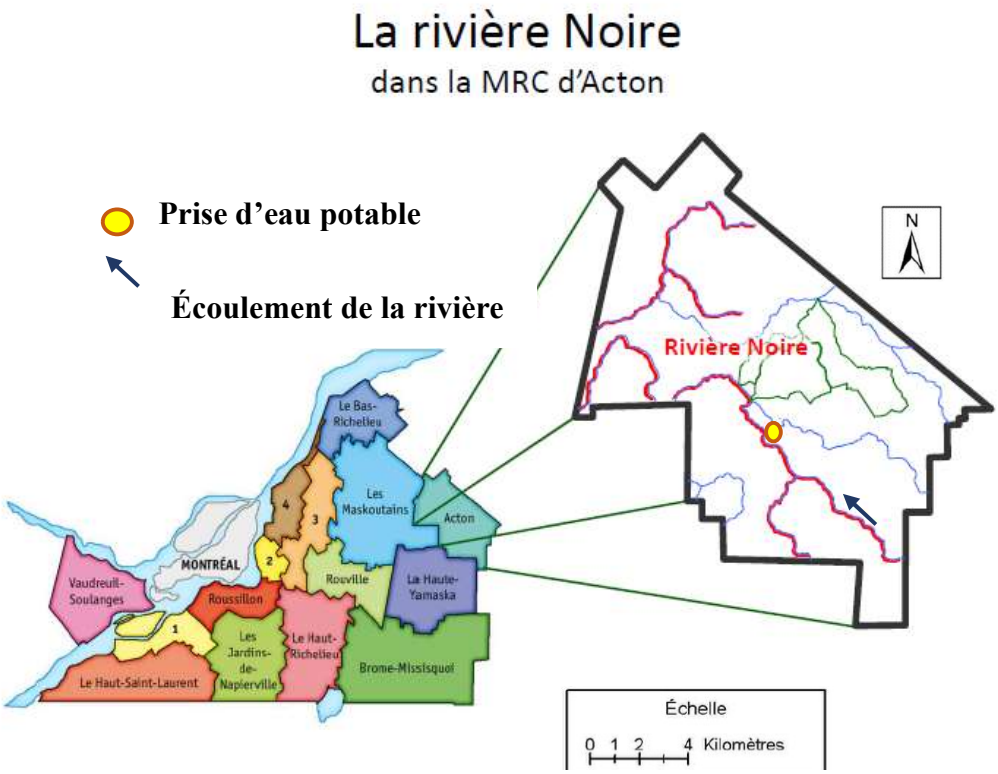


Figure 3-2. Prise d'eau potable dans la rivière Noire

3.5 Méthode de prélèvements et traitement des échantillons

Pour les eaux de surface, les prélèvements ont été effectués manuellement dans des bouteilles en polypropylène préalablement rincées et autoclavées et dans la mesure du possible dans une zone où l'eau n'était pas stagnante et dans le sens du courant. Les bouteilles ont été remplies de façon à laisser le moins d'air possible afin d'éviter d'une part, d'éventuelles contaminations et d'autre part, l'évolution des échantillons au cours du temps.

3.6 Stratégie et plan d'échantillonnage

L'échantillonnage de l'égout pluvial consistait à suivre l'écoulement, en temps sec, à partir d'un point de déversement dans le milieu récepteur où une contamination était observée. Par la suite, les regards d'égout pluvial ont été ouverts de l'aval vers l'amont afin de vérifier la présence d'un écoulement d'eau jusqu'au regard où il y a absence d'écoulement. Le raccordement inversé serait probablement situé entre ce regard de contrôle et celui en amont (McFadden, 2006). La Figure 3-4 illustre cette démarche.

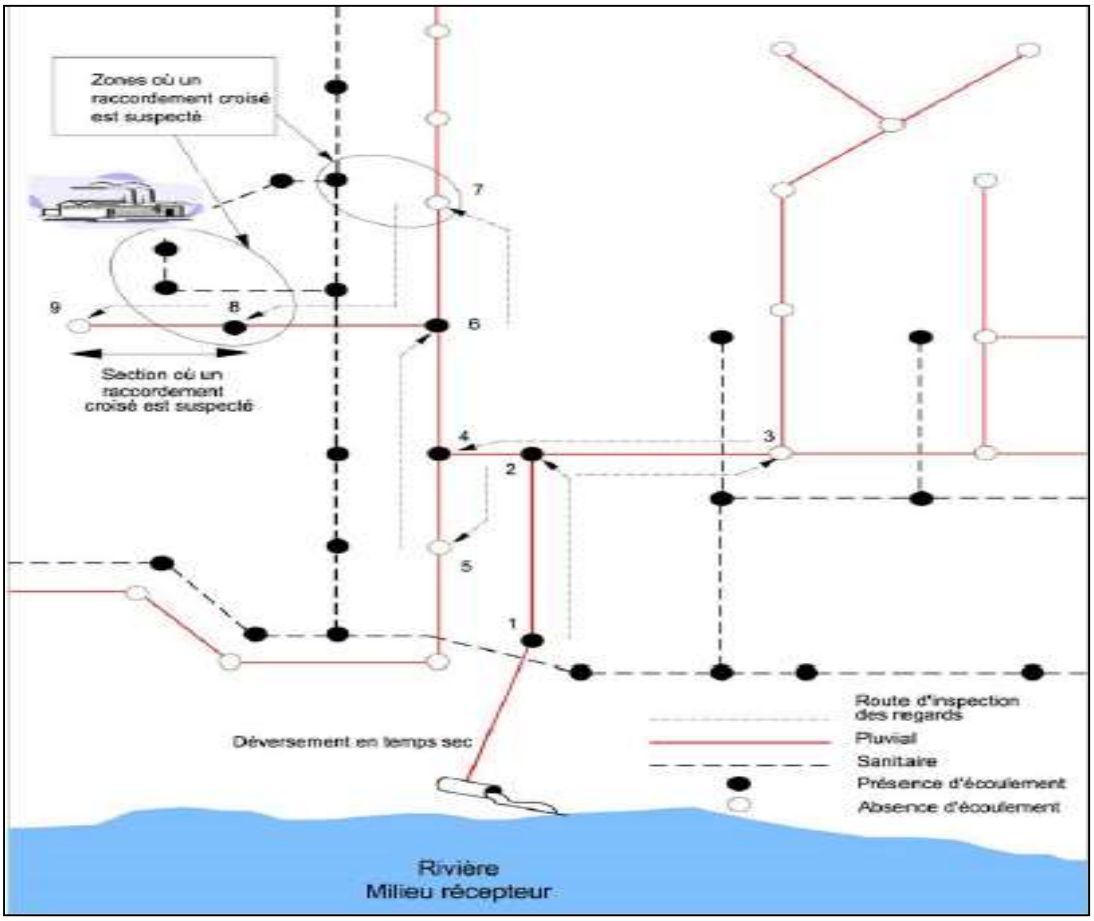


Figure 3-3. Démarche d'inspection des regards d'égout pluvial de l'aval vers l'amont. Bibliothèque et Archives nationale du Québec ISBN 2-550-47218-7

L'échantillonnage a été conçu de manière à permettre le suivi de la qualité microbiologique à l'eau brute de 3 prises d'eau (l'entrée de l'usine); deux prises d'eau potable (A et B) dans le bassin versant de la rivière des Mille-Îles (milieu urbain) et une prise d'eau potable (C) dans le sous-bassin versant de la rivière Noire (milieu forestier/agricole). L'échantillonnage a été réalisé en deux temps :

Échantillonnage de base « baseline/background » en temps sec pour évaluer l'état initial de la contamination fécale à (i) l'eau brute des 3 prises d'eau et (ii) à l'affluent et l'effluent d'une STEP située à 5 Km en amont de la prise d'eau potable B.

Échantillonnage ciblé « event-based » en temps de pluie et/ou fonte de neige printanière pour caractériser les pointes de contamination, leur durée et amplitude et vérifier l'impact du déversement/dérivations en amont des prises d'eau.

Le déclenchement d'échantillonnage en conditions de base (temps sec) et en conditions de pointe de contamination a été basé et identifié à l'aide de mesures de l'activité de la β-D-glucuronidase (GLUC) à l'eau brute et suivant les conditions météorologiques locales (Environnement Canada). L'activité GLUC a été utilisée comme indicateur du niveau de contamination fécale et a été mesurée par la technologie ColiMinder (ColiMinderTM VWMS GmbH, Vienne, Autriche). La technologie Coliminder a été installée à chaque prises d'eau soit pour un suivi routinier de longue durée soit juste avant des épisodes de précipitation et/ou fonte de neige pour surveiller les variations de la contamination fécale à l'eau brute. Afin d'identifier les périodes critiques de contamination, l'activité GLUC a été mesurée à haute fréquence lors des pluies intenses et/ou fonte de neige et s'exprime en ligne en unités Fishman modifiées (mMFU 100 ml^{-1}). Par ailleurs, les niveaux de turbidité ont été mesurés en continu dans l'eau brute.

Les conditions de base ont été définies comme des périodes de faible niveau d'activité du GLUC (<20 mMFU / 100 ml) et des conditions météorologiques sèches (précipitations quotidiennes <1 mm et température de l'air <5 ° C sur 24 heures) et les conditions en pointe de contamination (échantillonnage ciblé) ont été définies selon les conditions météorologiques locales suivantes : précipitations quotidiennes > 15 mm ou température de l'air> 5 ° C sur 24 heures et les niveaux d'activité du GLUC (variation > +5 mMFU 100 mL-1 sur 1 heure).

À la prise d'eau potable **A (**Annex B, Figure S1), cinq campagnes d'échantillonnage ont été réalisées. Deux échantillonnages en temps sec et 3 échantillonnages ciblés dont deux en période de pluie intense couplée à une fonte de neige (événement A-1 le 25 février et A-2 le 4 avril 2017 respectivement). Un événement additionnel (A-3) a été échantillonné du 6 au 10 avril au début des inondations printanières qu'a connu le sud de la province du Québec en 2017. C'est un événement météorologique de crue exceptionnelle des cours d'eau due à la fonte des neiges au printemps, à laquelle se sont ajoutés de nombreux épisodes de pluie qui ont donné des cumuls anormalement élevés pour avril et mai. À chaque échantillonnage ciblé, une série temporelle d'échantillons ponctuels ou "grab samples" ont été prélevés à une fréquence de 3 à 4 heures pendant environ 24 heures (évènement A-1 et A-2) ou à raison d'un échantillon ou plus par jours pendant l'événement A-3 dépendamment des moyens logistiques déployés et du suivi de l'activité GLUC.

À la prise d'eau potable **B** (Annexe B, Figure S2), quatre campagnes d'échantillonnage ont été réalisées : trois échantillonnages ciblés (pluie +fonte des neiges) et un échantillonnage en temps sec (une moyenne de 3 échantillons). Un échantillonnage ciblé (évènement B-1) a été prélevé le 7 février 2018 ; il s'agit d'une dérivation planifiée d'eaux usées brutes (durée de 4 heures) qui a été entreprise pour entretenir le réseau d'égouts principal d'une station d'épuration municipale (STEP) située à 5 kilomètres en amont de la prise d'eau potable B. La STEP dessert une population de

37000 résidents et traite en moyenne 28 000 m^3 d'eaux usées brutes par jour. Dans des conditions normales, les eaux usées sont traitées à l'aide de lagunes aérées. Le deuxième échantillonnage ciblé a été prélevé le 20 février 2018 (évènement B-2) ou une pluie de 15 mm a été enregistrée. Le troisième échantillonnage ciblé (B-3) d'une durée de 5 jours a été prélevé en période d'une légère ou graduelle fonte de neige uniquement (absence de pluie) et ce du 28 février jusqu'au 4 mars 2018. En parallèle, pour avoir une meilleure caractérisation et comparaison des pointes de contamination après dérivation et/ou fonte de neige, un échantillon d'affluent et d'effluent de la STEP ont également été prélevés lors de l'évènement B-3.

À la prise d'eau potable C (Annexe B, Figure S3) dans le sous-bassin versant agricole. Similaire à la stratégie d'échantillonnage discutée plus haut pour les prises d'eau potable A et B ; un échantillonnage temps sec : une moyenne de 3 échantillons prélevés le 18, 23 octobre et le 2 décembre 2017 et un échantillonnage ciblé (pluie de ~24mm) d'une durée de 20h prélevé le 30 et 31 octobre 2017.

3.7 Sélection des indicateurs de contamination fécale

Une revue de littérature détaillée nous a permis de déterminer quels sont les marqueurs microbiologiques et chimiques les plus prometteurs comme traceurs de contamination fécale. La contamination fécale d'origine humaine demeure un problème de santé public, pour cela les indicateurs de contaminations fécales sélectionnés sont tous spécifiques des rejets humains. Le suivi de la qualité microbiologique sera donc effectué avec les indicateurs et marqueurs suivants (Tableau 3-2) :

(i) *E. coli* avec Colilert®/Quanti-Tray® 2000 selon la méthode du centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Les bactéries *E. coli* sont considérées comme le meilleur indicateur

de contamination fécale. Leur présence dans l'eau signifie que cette dernière est contaminée par une pollution d'origine fécale (humaine ou animale) récente et qu'elle peut donc contenir des microorganismes pathogènes.

(ii) les marqueurs moléculaires : le marqueuer Bactéroidale HF183 et l'ADN mitochondrial avec qPCR.

(iii) les marqueurs chimiques : composés pharmaceutiques avec les méthodes LC-ESI(PI)-MS/MS et LDTD-APCI-MS/MS. Les marqueurs chimiques sélectionnés dans ce travail de thèse sont les suivants : la caféine (CAF) et son métabolite la théophylline (THEO), la carbamazépine (CBZ) et son métabolite; l'hydroxycarbamazepine (CBZ-20H), l'acétaminophène (ACE) plus un édulcorant; l'aspartame (ASP). Ces marqueurs appartiennent à différentes classes thérapeutiques en plus d'un édulcorant artificiel. Ils sont par ailleurs les plus consommés au Canada et par conséquent sont fréquemment détectés dans les eaux usées brutes et dans les eaux de surface. Exclusivement d'origine humaine, leur présence indiquerait donc une contamination fécale par les eaux usées.

Tableau 3-2. Marqueurs sélectionnés et leurs méthodes d'analyse

Substance ou paramètre	Classe thérapeutique	Méthode	Eau	Sédiments	Particulaire	Références
Paramètres microbiologiques						
Escherichia coli (E. coli)	-	IDEXX (Quanti-tray 2000)	✓	✓	✓	(Centre d'expertise en analyse environnemental e du Québec 2009)
Marqueur Bactéroidale (HF183)	-	qPCR	✓	-	-	(Seuring et al. 2005, Villemur et al. 2015)
ADN mitochondrial (humain, bovin et porcin)	-		✓	-	-	
Paramètres chimiques						
Caféine /Théophylline	Stimulant	LC-ESI(PI)-MS/MS et LDTD-APCI-MS/MS	✓	✓	✓	(Darwano et al. 2014, Viglino et al. 2008)
Acétaminophène	Analgésique		✓	✓	✓	
Carbamazépine /CBZ-2OH	Antiépileptique		✓	✓	✓	
Aspartame	Édulcorants		✓	✓	✓	

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: LOCATING ILLICIT DISCHARGES IN STORM SEWERS IN URBAN AREAS USING MULTI-PARAMETER SOURCE TRACKING: FIELD VALIDATION OF A TOOLBOX COMPOSITE INDEX TO PRIORITIZE HIGH RISK AREAS

Article publié dans Science of the Total Environnement

Mounia Hachad [a]*, Martine Lanoue [b], Sung Vo Duy [c], Richard Villlemur [f], Sébastien Sauvé [c], Michèle Prévost [a,d], Sarah Dorner [a,e], ,

[a] Civil, Geological and Mining Engineering Department, Polytechnique de Montréal, CP 6079, succ. Centre-Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3A7

[b] City of Laval, soutien technique eau et salubrité, service de l'environnement et de l'écocitoyenneté, 480, boulevard Armand-Frappier, Laval, QC, Canada H7V 3Z4

[c] Department of Chemistry, Université de Montréal, P.O. Box 6128, succ, Centre-Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3J7

[d] NSERC Industrial Chair on Drinking Water, Civil, Geological and Mining Engineering Department, Polytechnique de Montréal, QC, Canada

[e] Canada Research Chair in Microbial Contaminant Dynamics in Source Waters, Civil, Geological and Mining Engineering Department, Polytechnique de Montréal, QC, Canada

[f] Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7.

4.1 Abstract

In urban areas served by separate sewerage systems, illicit connections to the storm drain system from residences or commercial establishments are frequent whether these misconnections were made accidentally or deliberately. As a result, untreated and contaminated wastewater enter into storm sewers leading to pollution of receiving waters and non-compliance with water quality standards. Typical procedures for detecting illicit connections to the storm sewer system are time consuming and expensive, especially in a highly urbanized area. In this study, we investigated the

use of human wastewater micropollutants (WWMPs): caffeine, theophylline, and carbamazepine and advanced DNA molecular markers (human specific *Bacteroides* HF183 and mitochondrial DNA) as anthropogenic tracers to assist identifying potential cross connections.

Water samples from storm outfalls and storm sewer pipes in three urban sub-catchments were collected in dry weather from 2013 to 2018. All samples contained various concentrations of these markers especially HF183, caffeine and theophylline, suggesting that the storm pipe system studied is widely contaminated by sanitary sewers. None of the traditional indicators or markers tested is sufficient alone to determine the origin of faecal pollution. In a highly urbanized area, the combination of at least three specific human markers is needed to locate the household section susceptible to contain misconnections. The human specific *Bacteroides* HF183, and theophylline appeared to be the most effective tracers including *E. coli*. In the light of the results, eight misconnected houses were identified and corrected. The result shows the « Microbial and chemical Source Tracking toolbox » as a strong tool for sustainable storm water management.

4.2 Introduction

In an urban catchment, where separate sewer and storm networks have been developed, there is growing evidence that storm drainage system can be contaminated with untreated wastewater and is an important source of dry-weather flow (Pitt, 2004; Xu et al., 2016; Revitt et al., 2016; Ellis et al., 2015). The main reasons for wastewater entry into storm sewers in dry weather, are (i) inappropriate illicit connections, (ii) cross-connections between sanitary and storm sewers, and (iii) leakages through broken sewers due to failing or aging sewer infrastructure (Pitt, 2004). Such discharges may account for significant fecal pollution of receiving waters, impair their quality and increase the risks to public health. Detecting wastewater contamination and locating its input

into storm sewer systems in a timely and cost-efficient manner can be a challenging task for municipalities, particularly when dealing with large systems. To date, a number of traditional methods and indicator parameters have been used for the detection of wastewater contamination in stormwater outfall and sewers (Panasiuk et al., 2015). These methods rely upon microbiological parameters such common fecal indicator bacteria (FIB) (*E. coli*, fecal coliforms, total coliforms, etc...) (Irvine et al., 2011; Ram et al., 2007; Katharine G. Field et al., 2007), sensory methods such, public complaints, visual or CCTV (closed circuit television) inspections, physical and chemical methods, such temperature, ammonium, conductivity, surfactants or optical brighteners (Pitt, 2004; Deffontis et al., 2013; Hoes et al., 2009; Butler et al., 2018; Hyer, 2007). Recently the development and improvement of positioning of online sensors for water/wastewater quality monitoring combining hydraulic, quality simulation tool storm water management model (SWMM) and Bayesian decision network (BDN) showed promising results in characterizing and detecting illicit intrusion to sewer systems (Sambito et al., 2019; Banik et al., 2017). However, the sole monitoring of FIB levels in stormwater provides no indication of the source(s) of fecal contamination which is a major shortcoming of such evaluations. The traditional technologies are often too detail-focused and labor-intensive to achieve system-wide tracking of contaminated sources in sewer dry-weather flow (Yin et al., 2019), Additionally, these methods less effectively identify small leaks from sanitary sewers or cross connections, leading to a need for alternative technology. While no single traditional method can yet produce results in a precise, fast and inexpensive way and to combat deficiencies linked to using only FIB concentrations to assess water quality, advanced molecular and chemical fecal source tracking (FST) methods have been used to directly determine the source(s) of contamination in environmental waters included urban stormwater (Katharine G. Field & Mansour Samadpour, 2007; Hagedorn & Weisberg, 2009; Sankararamakrishnan et al.,

2005; Sauve et al., 2012). Among the most commonly used FST methods is microbial source tracking (MST), which utilizes host-specific DNA markers and has been used to identify multiple sources of contamination including human sewage (USEPA, 2005; Bernhard et al., 2000a). MST methods detect regions of genetic material in fecal bacteria or intestinal cells associated with human hosts, or animal using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) techniques. These marker genes are sensitive and accurate analytical approaches of fecal contamination due to high host-specificity and abundance in human and animal feces (Malla et al., 2020; Boehm et al., 2013; Layton et al., 2013; Griffith et al., 2013). Among DNA MST markers, the human-specific *Bacteroides* HF183 marker provide the best combination of sensitivity and specificity (Layton et al., 2013), thus, has been worldwide used as an indicator of human fecal contamination in surface and storm water (Edge et al., 2020; Hajj-Mohamad et al., 2019; Sauer et al., 2011; Staley et al., 2018; Harwood et al., 2014). Recently, mitochondrial DNA (mtDNA) markers targeting mitochondrial genes from epithelial cells in the host feces, have been developed for MST (Martellini et al., 2005; Caldwell et al., 2007; Kortbaoui et al., 2009). Although, there have been few published studies that directly test the performance of mtDNA methods to other MST approaches or to infer human sewage contamination (Kapoor et al., 2013; Villemur et al., 2015; Edge et al., 2020); mtDNA markers when assessed, showed comparable or higher performances in comparison to host-associated *Bacteroidales* markers, suggesting the potential use of host-specific mtDNA markers in combination with other bacterial MST markers in a toolbox approach (Waso et al., 2016; Malla & Haramoto, 2020).

During the past decade, chemical source tracking (CST) markers, such as pharmaceuticals and personal care products, artificial sweeteners, fluorescent whitening agents, sterols and stanols has

been utilized to detect wastewater contamination in aquatic environment (Glassmeyer et al., 2005; Nakada et al., 2008; Lim et al., 2017). CST markers, such as caffeine, carbamazepine, acetaminophen, and theophylline have been proven as useful wastewater micropollutants (WWMPs) markers (Daneshvar et al., 2012; Madoux-Humery et al., 2013; Sidhu et al., 2013; Sauve et al., 2012). Persistent markers such as carbamazepine are useful for tracing cumulative treated sewage (Daneshvar et al., 2012), whereas labile compounds such as caffeine, theophylline and acetaminophen are indicators of untreated wastewater (Sidhu et al., 2013).

There are strengths and limitations of both microbial and chemical fecal source tracking, no single parameter is a perfectly reliable indicator of sewage contamination (Lim et al., 2017). It has been recommended that a "toolbox" approach involving advanced MST and CST tools are most successfully used as part of a weight-of-evidence approach to be identifying fecal sources (Mauffret et al., 2012; Warish et al., 2012; Ellis & Butler, 2015; Sidhu et al., 2013). Application of a set of markers, can help provide an additional line of evidence that human fecal sources are present or absent, help differentiate between recent and prior sewage contamination events and gives increased confidence in the results. More importantly, a combination of fecal source tracking markers greatly reduces the chance of false positive results; the consequence of inaccurate source tracking based on false positive results particularly for detecting and correcting household cross-correction may lead to expensive infrastructure that may not actually improve the water quality of the receiving water. Moreover, illicit discharge, detection, and elimination would require prioritization of high-risk areas for efficient and focused implementation of substantial efforts. Only a few studies have evaluated the advantages of using both MST and CST markers for the assessment of human sewage contamination in storm sewer drain (Sauve et al., 2012; Hajj-

Mohamad et al., 2019; Staley et al., 2016), most published studies on the characterizing of human fecal contamination are limited to stormwater runoff or outfalls and mostly to MST markers only (Sercu et al., 2008; Sauer et al., 2011; Sidhu et al., 2013).

In sewage polluted storm sewers, there is a strong need to have more field studies and application of advanced molecular and chemical markers with large sample sizes to develop statistically valid source allocations or to accurately distinguish specific source contributions. Additionally, guidance for selecting the most effective combinations of detection methods, will facilitate the identification and quantification of dry-weather sewage contamination. The specific aims were to determine; (i) the frequency of detection and occurrence of sewage pollution in stormwater outfalls and storm sewer drains in urban sub-catchments; (ii) to assess the efficacy of using a set of MST and CST markers in detecting inappropriate sewage connections to storm drains; (iii) to propose a potential use of CST markers as a novel tool to differentiate between leaky sewers and household cross connections (as no studies are available having proposed making such a distinction); and (iv) to evaluate a composite "toolbox" index to locate high risk area with potential illicit discharges at a field scale so that improper connections may be corrected.

4.3 Materials and Methods

4.3.1 Sub catchment descriptions and water collection

Water samples were collected from one urban stream including 4 storm outfalls and from 3 storm sewers sub-catchment located northwest of the great region of Montreal and discharging to the stream (Fig. S1, Annexe A) or river within the city limit (Fig. S2 and Fig. S3, Annexe A). All sampling was conducted during dry weather conditions (minimum of 72 h with no rainfall) to prevent storm runoff and/or authorized CSO (in STR storm sub-catchment, Fig S1) from

interfering with results. Based on the results of the outfall sampling (discussed in 3.1 section), storm sewer sampling was conducted progressively downstream to upstream. Sewers were accessed through manholes; grab samples were collected with bottles held at the end of a long pole. No samples were collected if there was no flow or safe access to the sampling location. All samples were collected between 7:00 and 10:00 am in sterile polypropylene bottles and transported on ice to the laboratories and processed within 6 h of collection. In total, 35 water samples (1 to 2 L) collected during 3 dry weather events from urban stream in the summer of 2013 and 131 storm drain samples were collected over a period of 4 years (2014-2018). All storm drain samples were tested for the presence of fecal indicator bacteria (FIB): total coliforms and *E. coli*, human-specific *Bacteroides* 16S rRNA gene sequence (HF183) and human-specific mtDNA markers (Humito), and WWMPs: caffeine (CAF), theophylline (THEO), carbamazepine (CBZ). For stormwater outfall analysis, excluding Humito, the same analyses were performed, in addition to general *Bacteroidales* (GenBac) and acetaminophen (ACET).

4.3.2 Analyses of FIB, CST and MST DNA human specific markers

Details of traditional and advances human specific markers measures, sensitivity of analytical methods and the choice of WWMPs are fully detailed in (Hajj-Mohamad et al., 2019). Briefly, the enumeration of *E. coli* and total coliforms were analysed following the method developed by the Quebec center of expertise in environmental analysis which using the Colilert® Quanti-Tray®/2000 system (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine). The results produce positive and negative series from which a most probable number (MPN) of colony forming units can be determined (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2009). A concentration of 1 MPN 100 mL^{-1} for water was used as minimal detectable threshold for statistical validation.

Occurrence (absence/presence) and quantification of the human-specific *Bacteroides* HF183 marker and human-specific mitochondrial marker (Humito) were measured using previously validated real time PCR (qPCR) as described in (Villemur et al., 2015). Using the qPCR, the limit of quantification was 500 copies /100 mL. DNA extraction and PCR detection of the *Bacteroidales* general marker (GenBac) were previously described in detail in (Besner et al., 2009). The four WWMPs selected for the study: caffeine (CAF), theophylline (THEO), carbamazepine (CBZ) and acetaminophen (ACET) were analysed by an on-line solid-phase extraction combined with liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry with positive electrospray ionisation (SPE-LC-ESI-MS/MS) first developed by Viglino et al. (2008), analytical method is available in Sauve et al. (2012). Detection limits (DLs) were estimated as three times the standard deviation of 5 replicate measurements of a field sample and were 0.5 ng L^{-1} for CAF, 0.2 ng L^{-1} for CBZ, 2 ng L^{-1} for THEO and 10 ng L^{-1} for ACE. All samples were analyzed in duplicate. For each event, laboratory blanks and field blanks were analyzed for all parameters. All blank values were below DLs.

4.3.3 Data processing and statistical analysis

All data from measures of *E. coli*, MST (copies per 100 mL) and CST markers (ng/L) were log transformed prior to statistical analysis. One-way or two-way multivariate analysis of variance (MANOVA) was used to determine the main effect of sampling sub-catchment. To examine the hypothesis that *E. coli*, MST markers (HF183 and Humito) and CST markers (CAF, THEO and CBZ) are predictive for the presence of human sewage and to test their reliability to track cross-connections in sewers, logistic pairwise regression and spearman correlation confirmation analysis were used to evaluate the relationship between *E. coli* and human sewage markers. We compared

$\log_{10}$-transformed concentrations across the dataset with the expectation that positive correlations would be consistent with prediction of similar source. Significance was assessed at an alpha level of 0.05. Tukey's post hoc test was performed if a significant effect was detected. All statistical tests were performed with statistical software (STATISTICA 13 - Ultimate Academic Bundle, StatSoft Inc., Tulsa OK, USA).

4.3.4 Composite index

A chemical and microbial markers composite index value was used to prioritize household areas where cross-connections are most likely to be found. Thus, all the human specific marker measurements (HF183, Humito, CAF, THEO and CBZ) were combined to generate a composite index value, which allows comparison of the human sewage contamination based on multiple markers between sites. The equation below was used to calculate the composite index. First, the index value for each indicator group at each site was calculated by dividing the concentration (copies/100 mL or ng L^{-1}) measured over the course of the study by the highest concentration observed for each sub catchment, which normalized widely varying marker concentrations (Shehane et al., 2005). The five index values calculated for each specific markers were then added together to generate a composite index for the degree of human contamination that would allow us to attribute a score to each manhole based on a weight of evidence approach and thus prioritize the areas of higher concerns.

$$\text{Composite index} = \sum \frac{\textbf{Concentration of each sewage marker (MST and CST markers)}}{\textbf{Maximum concentration at each sub-catchment}}$$

4.4 Results

4.4.1 Receiving waters and storm sewer outfall monitoring

4.4.1.1 FIB occurrence and concentration

Water samples were collected along the receiving stream and storm outfalls in summer 2013. In total, 35 surface water samples were collected from dry weather stream monitoring (3 dry weather events). Total coliforms and *E. coli* were detected in all stream water samples; the mean concentrations were 4.6±06 and 2.9±0.7 Log_{10} MPN/100mL, ranging from 3.7 to 6.2 and 1.4 to 4.3 Log_{10} MPN/100mL respectively for total coliforms and *E. coli* (Table 4-1). Mean concentration of *E. coli* in all samples exceeded the recommended limits for the lowest water quality category D (<200 *E. coli* per 100 mL) under the Canadian guidelines for managing risks in recreational water. The general Bacteroidales (GenBac) marker was only measured in stream water samples and was used as an indication of general fecal contamination (Fig 4-1A). 97% of water samples tested positive for this marker; the mean concentration for all samples was 7.0±1.0 Log10 copies/ 100 mL, ranging from 3.9 to 9.1 Log10 copies/ 100 mL. There were no differences in total coliforms and GenBac marker concentrations by sampling locations (one way, ANOVA, $p>0.05$), but differences were observed in *E. coli* concentrations ($P=0.011$). A post hoc Tukey's multiple comparison test indicated high E. coli concentrations in samples from outfall 2 (mean concentration 4.1±0.2 log10 MPN/100 mL) in comparison to outfalls 1, 3 and 4, and downstream stream sampling locations (Fig 4-1A).

4.4.1.1 MST and CST markers occurrence and concentrations

Overall, all the stream sites, were found to be highly impacted by fecal pollution and by the prevalence of both MST and CST appear to have sewage as the major source.

Fifteen of the 35 samples (43%) contained the human *Bacteroides* marker HF183. The sampling points along the stream included stormwater outfalls that were intermittently positive for the human *Bacteroides* marker, which was detected in at least one sample (Fig 4-1B). Only outfall2 was positive for the *Bacteroides* marker in 100% of samples. All samples that were positive for the occurrence of the human *Bacteroides* genetic marker were tested by qPCR. The mean concentration in all samples was 3.9±0.7 Log_{10} copies/100mL, ranging from < LOQ (limit of quantification) to 5.3 Log_{10} copies/100mL. The average concentration of the human *Bacteroides* genetic marker for each location showed no differences among sites due to the moderate prevalence of the marker ($p<0.05$). However, high levels of the human *Bacteroides* genetic marker were found in storm outfall 2 with mean concentration of 4.9±0.5 Log_{10} copies/100mL. We examined the ratio of the human *Bacteroides* (HF183) to total *Bacteroidales* (GenBac) for all sampling locations where the human *Bacteroides* marker was positive for more information on sewage pollution to the receiving water. The four outfalls had ratios of human to general *Bacteroides* marker ranging from 2% (outfall 4) to 9% (outfall 1) indicating the likelihood of sanitary sewer infiltration into the stormwater conveyance system (Sauer et al., 2011), and that the outfalls may be a direct source of human contamination to the stream STR.

Table 4-1. Concentrations and occurrences of fecal indicator bacteria and host-specific genetic markers in surface water and storm water sewers

		Fecal Indicator Bacteria (FIB)				Human DNA markers (MST)			
		Total coliforms		*E. coli*		HF183		Humito*	
		Log_{10} MPN/100mL		Log_{10} MPN/100mL		Log_{10} Copies/100 mL		Log_{10} Copies/100 mL	
		Mean±SD (range)	Occurrence (%)	Mean±SD (range)	Occurrence (%)	Mean±SD (range)	Occurrence (%)	Mean±SD (range)	Occurrence (%)
Stream surface water	**STR (n=35)**	4.6±0.6 (3.7-6.2)	35/35 (100%)	2.9±0.7 (1.4-4.3)	35/35 (100%)	3.9±0.7 (<LOQ - 5.3)	15/35 43%	-	-
Storm sewers	**STR (n=68)**	4.3±0.7 (2.6-5.9)	68/68 (100%)	2.8±1.2 (0.0-4.9)	66/68 (97%)	4.7±1.4 (<LOQ-7.7)	31/68 (46%)	3.6±1.0 (<LOQ-5.3)	15/67 (22%)
	BAV (n=47)	3.8±0.9 (1.9-5.4)	47/47 100%	2.2±1.6 (0.0-5.4)	41/47 87%	4.5±1.8 (<LOQ-8.3)	25/47 53%	4.2±0.9 (<LOQ-5.5)	8/29 28%
	BDB (n=16)	2.6±2.0 (0.0-5.0)	11/16 69%	1.4±1.5 (0.0-4.4)	9/16 56%	3.7±1.2 (<LOQ-6.0)	9/16 56%	3.0±0.7 (<LOQ-3.6)	3/16 3%
	Total (n=131)	3.9±1.1 (0.0-5.9)	126/131 96%	2.4±1.5 (0.0-5.4)	116/131 89%	4.5±1.5 (<LOQ-8.3)	66/131 50%	3.3±1.1 (<LOQ-5.5)	26/112 23%

*112 samples were analysed for human mtDNA marker. SD. standard deviation

CST markers showed high prevalence and were detected in almost all outfalls and stream points (except point 12 and 13) for the three dry weather sampling events (Fig 4-1C). Among the 35 stormwater samples tested, (91%), (86%), (80%), and (31%) of samples were positive for carbamazepine, theophylline, caffeine, and acetaminophen, respectively. Theophylline had the highest concentrations among all the CST markers ranging from below the limit of detection to 4.2 Log10 (ng/L) followed by caffeine and then acetaminophen with concentrations ranging from below the limit of detection to 3.5 Log10 (ng/L). Carbamazepine had mean concentration one order of magnitude lower with 1.1 ±0.4 log10 (ng/L). Across sampling sites, the CST mean concentration was highly variable (Fig 4-1), there were no difference in acetaminophen and carbamazepine mean concentrations by sampling locations (one way, ANOVA, $p>0.05$), but differences were observed in caffeine ($p = 0.0021$) and theophylline concentrations ($P=0.0003$). As with *E. coli* and human genetic *Bacteroides* marker HF183, post hoc Tukey's multiple comparison test indicated high concentrations in samples from outfall 2 (mean concentration of 3.4±0.5 and 4.1±0.1 log10 (ng/L) respectively corresponding to 2.5 and 13.1µg/L).

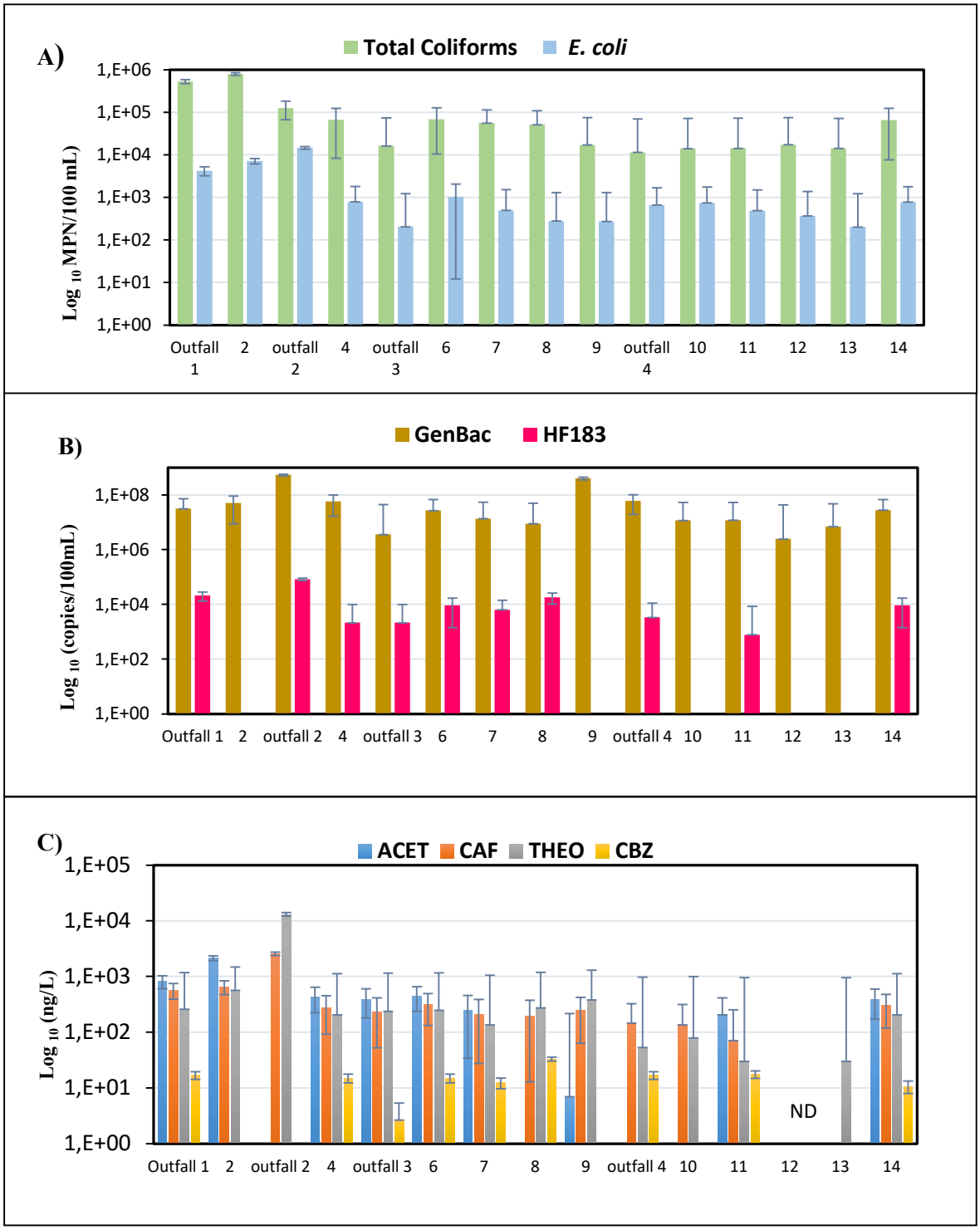


Figure 4-1. Spatial distribution of mean concentration of fecal indicator bacteria (A), human genetic markers (B) and sewage chemical markers (C) in stream water surface and storm outfalls. ND-not detected. CAF for caffeine, THEO for theophylline, ACET for acetaminophen and CBZ for carbamazepine

4.4.2 Storm sewer drains human sewage investigation

Based on individual samples of dry weather water quality, the threshold of 1000 to 5000 MPN/100 ml and 12 000 of *E. coli* was recommended to flag streams with high potential for storm sewer misconnections and storm sewer drain respectively (Pitt, 2004). A threshold of 1000 MPN/100 mL *E. coli* was used, and MST/ CST markers were measured for all samples to include a large proportion of sites suspected of sewage contamination and reduce the extent of false positive and false negative results from both indicators. Based on the results of outfall monitoring discussed above, outfalls 2, 1 and 4 were, in that order, selected for up the pipe investigations to pinpoint the area of contamination. The stormwater system upstream of outfall 2 was the first to be investigated. *E. coli* exceeded 10 000 MPN/100 ml in all sampling events. The ratio of human *Bacteroides* to general *Bacteroidales* was consistently greater than 2%, indicating illicit discharges (Sauer et al., 2011). In addition, sewage chemical markers were detected in almost 100% of samples with concentrations up to 13 µg/L. A sanitary sewage cross-connection to the storm drain was then found and corrected in 2 houses immediately upstream in the drainage basin.

For outfalls 1 and 4, 68 manholes were checked for sanitary contamination in the upstream storm sewer STR. Additionally, dry weather flow sampling at more storms drains outfalls in 2 other small sub-watersheds (Annexe A) resulted in positive samples for indicators of sewage contamination and reported high levels of FIB, human *Bacteroides* and chemical markers (data not shown). Thus, more samples were added to the storm sewer investigation and were collected over a period of 4 years (2014-2018). In total 131 manholes were checked for total coliforms, *E. coli*, MST markers (HF183 and Humito) and CST markers (CAF, THEO and CBZ). The measured

concentrations (those above the method detection limits), the range and occurrences are shown in (Table 4-1) for FIB and MST markers and in (Table 4-2) for CST markers.

4.4.2.1 Occurrence and concentration of FIB and MST markers

Total coliforms and *E. coli* were found in 96% and 89% of the storm sewer manholes (pipes) samples whereas the human *Bacteroides* marker (HF183) and Humito were found in 50% and 71% of the samples, respectively, with a high total concurrence (80%). The percentage of total concurrence was calculated by adding the percentage of concurrence and non-concurrence for each pairwise comparison. Samples positive for the human genetic markers were subjected to qPCR. Respectively, 77% and 44% among the samples positive for the occurrence of HF183 and Humito were above the LOQ in qPCR assays. When both markers were quantified, the concentration of HF183 was approximately one to 3 orders of magnitude higher than the concentration of Humito. Storm sewer samples from sub-catchment STR had significantly greater total coliforms, *E. coli and HF183* concentrations than sub-catchment BAV and BDB ($F=7.86$, $p \leq 0.008$), and that BAV had significantly greater Humito concentrations than sub catchment STR ($F=3.177$, $P \leq 0.004$). No variations in the concentrations of HF183 ($p > 0.05$) were observed between the different sub-catchments locations and between the urban stream and its upstream storm drainage basin (STR) for FIB indicators indicating minimal dilution occurring in the small stream.

4.4.2.2 Occurrence and concentration of CST markers

A high incidence of CST markers was observed, especially for CAF and THEO with an 89% and 72% above detection limits in the storm sewer samples, respectively. CBZ was detected in only 52% of samples (Table 4-2). Among the 131 samples tested with the CST markers, CAF marker

and THEO were concurrently positive in 94 samples and negative in 14 samples, representing 82% of total occurrence for these markers. Two-way analysis of variance revealed differences in mean log-transformed *CST* concentrations with sampling location ($F = 4.83$; $P < 0{\cdot}00001$). *Post hoc* analysis revealed that storm sewer samples collected from STR drainage basin had higher concentrations of CAF, THEO, and CBZ than the other 2 sub-catchments ($P < 0.05$).

Table 4-2. Concentrations and occurrences of human chemical markers in surface water and storm water sewers

		Human chemical markers (CST)							
		Acetaminophen (ng/L)		Caffeine (ng/L)		Theophyline (ng/L)		Carbamazepine (ng/L)	
		Mean±SD (range)	Occurrence (%)	Mean±SD (range)	Occurrence (%)	Mean±SD (range)	Occurrence (%)	Mean±SD (range)	Occurrence (%)
Stream surface water	**STR (n=35)**	2.5±0.6 (ND-3.3)	11/35 (31%)	2.5±0.4 (ND-3.5)	28/35 (80%)	2.3±0.7 (ND-4.2)	30/35 (86%)	1.1±0.4 (ND-2.1)	32/35 (91%)
Storm sewers	**STR (n=68)**	ND	-	2.2±08 (ND-4.0)	68/68 (100%)	2.1±0.8 (ND-3.7)	55/68 (81%)	0.8±0.9 (ND-2.9)	38/68 (56%)
	BAV (n=47)	ND	-	1.1±0.9 (ND-3.8)	33/47 (70%)	1.3±1.1 (ND-3.9)	25/47 (53%)	0.2±0.3 (ND-0.9)	22/47 (47%)
	BDB (n=16)	ND	-	1.1±0.9 (ND-3.2)	16/16 (100%)	1.6±0.8 (ND-3.6)	14/16 (88%)	0.2±0.7 (ND-1.3)	8/16 (50%)
	Total (n=131)	ND	-	1.7±1.0 (ND-4.0)	117/131 (89%)	1.8±1.0 (ND-3.9)	94/131 (72%)	0.5±0.8 (ND-2.9)	68/131 (52%)

4.4.3 Correlation between human genetic markers and sewage chemical markers with FIB

Logistic pairwise linear regression and Spearman's rank correlation coefficients were calculated between FIB, microbial source tracking DNA markers and chemical source tracking markers for pooled dataset and grouping by sites (outfalls and storm drains) and by sub catchment (Fig 4-2, Fig S4Fig S5 Table 4-3 and Annexe A). There was a moderate ($0.4<\rho s<0.6$) correlation between total coliforms or *E. coli* with concentrations of HF183, CAF and THEO. Both FIB were not correlated with Humito across all study areas. *E. coli* was correlated with HF183 in outfalls and storm drains located at STR and BAV. The highest correlations for *E. coli* and the HF183 DNA marker were at manholes located in the BAV sub-watershed ($\rho s = 0.7$). *E. coli* was correlated with the CAF marker at stream outfalls and all storm drains with the highest correlation observed in outfalls and storm drain BDB (Table 4-3). A strong correlation was observed between *E. coli* and THEO for pooled samples (Fig 4-2). HF183 and all CST markers were correlated between each other (Table 4-3). The highest correlation was observed with THEO in both stream outfalls ($\rho s = 0.88$) and storm drains ($\rho s = 0.72$ for BAV and $\rho s = 0.64$ for BDB). For all the study sites, no correlation ($p < 0.05$) was observed between Humito and CST markers.

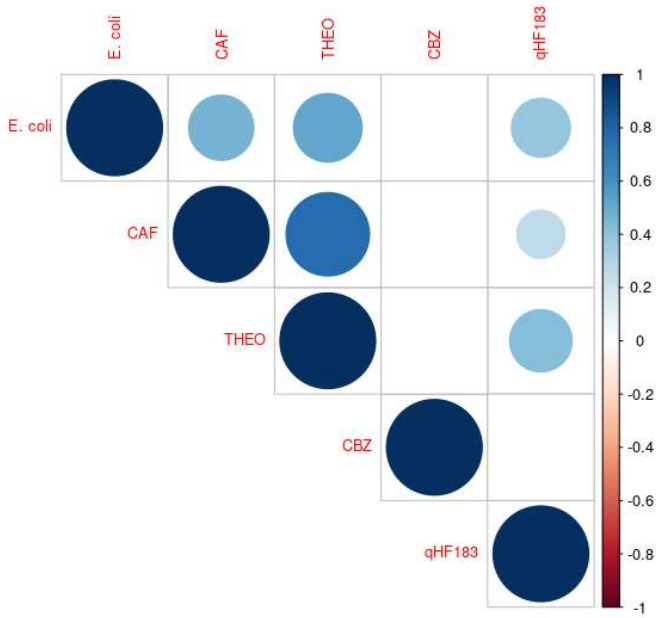


Figure 4-2. Correlation between *E. coli*, MST and CST human markers

4.4.4 Household misconnection and illicit discharges identification approach

We examined how samples from each storm sewer (manholes) would be ranked differently based on culture results for *E. coli* and the composite index value. Sewer samples were distributed among different priority of cross connection: "high" (index ≥ 3), "moderate" (2 < index > 3 and "low " (index < 2). While the composite index was calculated for all samples, only samples with levels of *E. coli* exceeding 1000 MPN/100 mL with high and moderate priority were subject to dye tracing to potentially identify household cross connection or other indirect illicit discharges. Among the 131 storm sewer samples collected, 53 samples had *E. coli* concentrations above 1000 MPN/100mL, among which 24 samples (45%) had *E. coli* concentration >10 000 MPN/100 mL. Eighteen out of 53 samples with "moderate" to "high" priority for cross-connected sewers were

then selected and 3 sanitary sewage cross-connections to storm drain from 6 household were identified and confirmed: 2 in sub-catchment BAV and one in BDB. Thirty-five samples that had high *E. coli* levels but low index (Table S2, Annexe A) were flagged, but not as priority. Interestingly, 6 storm sewer drains samples with low *E. coli* concentrations (<1000 *E. coli* 100 mL−1) had high to moderate priority for cross-connected sewers.

Table 4-3. Spearman correlation coefficients between *E. coli* concentrations, qPCR, and chemical assays for pooled samples, outfalls, and storm drain at each sub-catchment

Spearman test		All samples	Outfalls	Storm drains		
				High residential density	Low residential density	
			STR	**STR**	**BAV**	**BDB**
E. coli	+ qHF183	0.47	0.53	0.67	NS	NS
	+ qHumito	NS	NA	NS	NS	NS
	+ CAF	0.56	0.64	0.47	0.47	0.66
	+ THEO	0.60	0.53	0.66	0,70	NS
	+ CBZ	NS	NS	NS	NS	NS
qHF183	+ qHumito	0.55	NA	0.52	0.90	NS
	+ CAF	0.53	0.92	0.54	0.83	NS
	+ THEO	0.70	0.88	0.72	0.88	0.93
	+ CBZ	NS	NS	0.65	NS	NS
CAF	+ THEO	0.81	0.88	0.70	0.85	NS
	+ CBZ	0.38	NS	NS	0.53	NS
THEO	+ CBZ	0.41	NS	0.47	NS	NS

NS=not significative/NA=not applicated

Table 4-4. Molecular and chemical human markers composite index

Storm drain Sub-catchment	Manholes ID	*E. coli* (MPN/100mL)	CAF	THE	CBZ	qHF183	qHumito	∑Index	Priority	Illicit discharges confirmation (dye tracing)
STR	EGN35829	1986.3	0.6	0.6	0.3	0.7	0.6	2.7	Medium	No
	EGN35824	4352	0.7	0.7	0.2	0.7	0.5	2.8	Medium	No
	EGN35927	72700	0.7	0.8	0.0	0.9	0.8	3.1	High	Leaky sewer
	EGN35919	19863	0.7	0.8	0.2	0.8	0.7	3.1	High	Leaky sewer
	EGN33810	24196	0.9	0.9	0.3	1.0	1.0	4.3	High	Leaky sewer*
	EGN35835	8164	0.8	0.7	0.4	0.9	0.0	2.7	Medium	No
	EGN35945	6131	0.6	0.7	0.2	0.9	0.0	2.5	Medium	No
	EGN36013	12033	0.6	0.7	0.5	0.8	0.6	3.2	High	Leaky sewer
	EGN33810	4352	0.5	0.5	0.4	0.7	0.7	3.0	High	Leaky sewer*
	EGN34706	1732.9	0.7	0.5	0.0	0.6	0.7	2.4	Medium	No
	EGN35972	4106	0.4	0.5	0.3	0.7	0.5	2.5	Medium	No
	EGN35968	41060	0.6	0.7	0.4	0.7	0.0	2.4	Medium	No
	EGN35959	1872	0.5	0.5	0.0	0.7	0.5	2.4	Medium	No
	EGN33808	19863	0.8	0.8	0.5	0.0	0.0	2.2	Medium	No
BAV	EGN93789	155310	0.7	0.8	0.0	0.5	0.0	2.0	Medium	No
	EGN93789	36540	1.0	0.9	0.8	1.0	0.0	3.7	High	Cross-connection
	EGN81237	6488	0.6	1.0	0.0	0.9	1.0	3.5	High	Cross-connection
BDB	EGN36893	24196	1.0	1.0	0.0	1.0	0.0	3.0	High	Cross-connection

* EGN33810 measured two times.

4.5 Discussion

Detecting and locating sewage cross-connections to stormwater systems is an important challenge for municipalities struggling with aging sanitary sewer and stormwater infrastructure. This study sought to investigate the microbial water quality of storm water outfalls and drains, and then rank by priority outfalls and/or storm pipe in terms of their potential to have human fecal contamination and upstream cross-connection / illicit discharges. The ranking was based primarily on the observed *E. coli* levels and the co-occurrence index of human sewage markers (MST+CST) as part of a weight-of-evidence approach.

The results showed that stormwater outfalls and storm drain networks located in the urban sub-catchments studied are widely polluted by human sewage, as indicated by the frequent and ubiquitous presence of both MST and CST markers (Table 4-1 and Table 4-2). To assess the effectiveness of the MST and CST markers detected in the current study to identify and locate human inputs into storm sewer system and outfalls, correlations between the fecal indicator organisms *(E. coli*) and the source tracking markers were investigated. Understanding the strength of the correlation between the two is important if quantitative MST and CST markers are to complete FIB results and/or to be integrated within a toolbox investigating storm illicit dry weather flow. Based on pooled data, a significant positive correlation was observed for the human specific HF183 marker with *E. coli* ($R^2 = 0.19$; $p < 0.001$ indicating that human fecal pollution was predominant in the study areas (Fig 4-2). By sub-catchment sites, a strong significant correlation with *E. coli* was only observed in STR (Table 4-3). Because fewer samples were collected at sub catchment BAV and BDB, more samplings are necessary to determine if the relationships among markers noted here are site-specific.

These observations were in accordance with previous studies where weak to strong correlations between human-specific *Bacteroides* markers HF183 quantified by qPCR and *E. coli* enumerated with culture based techniques have been observed (Sercu et al., 2011; Nshimyimana et al., 2014; Staley et al., 2016; Ahmed et al., 2015). Humito was not correlated with either *E. coli* or CST markers ($p=0.14$). Weak correlation was observed with the *Bacteroides* marker HF183 ($R^2= 0.25$, $p<0.02$). By sub catchment sites, strong correlations were observed with HF183 in STR and BAV (Table 4-3). In this study, the highly human specific mitochondrial DNA marker was more efficient in confirming the absence or very low sewage contamination sources along with human *Bacteroides* HF183 (concurrence of 68% for negative or <LOQ samples). This is particularly valuable when high concentrations of CST markers in some samples would indicate sewage contamination and potential illicit discharges if only CST markers were considered as sewage markers. However, although HF183 *Bacteroides* marker performs highest among the markers on sensitivity, it has been shown to occasionally "cross-react" with dog feces in an urban catchment (Warish et al., 2010; Kildare et al., 2007). Also, a potential challenge in using Humito as human fecal marker, is that somatic cells such as dead skin or hair cells not associated with the intestinal tract, might shed at high numbers by field or laboratory technicians in contact with water, therefore potentially lowering diagnostic specificity as a human fecal indicator (Malla & Haramoto, 2020). While in most of samples where Humito and HF183 were above of limit of quantification, the positive results for chemical markers and co-occurrence of both DNA markers provided further confirmation that fecal human inputs and not cross reaction or contamination of samples were causing high DNA-based markers in the storm drains or outfalls. Besides, some samples were analysed more than twice, confirming the results.

Overall, a weak correlation between HF183 vs *E. coli* and Humito was observed. Therefore, correlation results should be interpreted cautiously for the following reasons: (i) only limited number of samples harboring quantifiable HF183 (37%) and Humito (23%), (ii) the potential presence of non-fecal FIB sources (e.g., sediments, decaying plant matter) and non-anthropogenic fecal sources (e.g., domestic and wildlife) contributing to the overall *E. coli* concentration measured which might yield high false positive rates for human fecal pollution and cross connection location.

This is supported by the fact that several storm sewers samples (45%) had high *E. coli* (> 1000 MPN/100 mL) with low or no human specific markers (HF183 and Humito) and low CST marker levels. Thus, markers targeting animal species that might be found in storm drains or residential urban sub-catchment (e.g., rats, racoons, dogs) need to be included in the toolbox to obtain more information on the magnitude of animal fecal pollution in addition to sewage inputs (Ahmed et al., 2019), (iii) differential decay and persistence of markers compared to *E. coli*. Most *Bacteroides* spp. are obligate anaerobes and die quickly in oxygenated surface water after release from their hosts (Kapoor et al., 2013; Layton et al., 2013). Hence the HF183 marker suggests fresh human contamination from untreated sewage. Differences in the decay of human-associated *Bacteroides* and human mtDNA markers in the environment were reported in literature (Martellini et al., 2005). Human-associated *Bacteroides* can decay in 7 days after release from a host, whereas human mtDNA can be detected for up to 15 days in the environment. Human-associated *Bacteroides* marker (HF183) appears to persist longer than human mtDNA marker at a low temperature (8°C) and dark light, while at higher temperatures (20°C and 30°C), the mtDNA markers persisted longer (X. He et al., 2016).

CST markers results confirmed the wide human sewage input (Table 4-2). CAF and THEO were correlated with *E. coli* and the human qPCR marker HF183 at almost all sub-catchment (see Table 4-3, Fig 4-2, and Annexe A for more details), supporting their use as predictors of raw sewage contamination in storm sewer drains. The pattern of occurrence of CAF and its metabolite THEO marker was similar, and the two markers were correlated in all study areas except in the sub-catchment BDB (Table 4-3). The detection of these chemical markers was also consistent with the human specific *Bacteroides* marker HF183 and Humito in confirming sewage sources and cross connection to stormwater systems in dry weather. CAF and THEO are labile indicators (biodegradable) of the presence of untreated wastewater in stormwater outfall and storm drain. Their co-occurrence, especially at µg/l levels in stormwater suggests more recent contamination from raw sewage (Staley et al., 2016; Sidhu et al., 2013). Several studies have reported correlations between caffeine and fecal coliform bacteria or *E. coli* in stormwater collection pipes (Hajj-Mohamad et al., 2019; Sauve et al., 2012) and stormwater discharge outfalls or surface water (Ekklesia et al., 2015a; Sauve et al., 2012; Staley et al., 2018; Daneshvar et al., 2012). Reported correlations suggested that caffeine is a promising marker for domestic wastewater in urban catchment impacted by human activities. THEO in comparison to CAF, is less used as a surrogate marker for untreated wastewater contamination or leaky sewers (Madoux-Humery et al., 2013; Guerineau et al., 2014; Edge et al., 2020). Correlations were also found between THEO, *E. coli* and HF183 (Hajj-Mohamad et al., 2019).

We explored the distribution and correlation of human specific markers with *E. coli* above or below the threshold of 12 000 *E. coli* CFU/100 ml, proposed by (Pitt, 2004) as indicative of wastewater contamination in storm drain and to track down the points of waste contamination entry into the storm system. CAF, THEO and human *Bacteroides* HF183 had significantly higher concentrations

in the group with *E. coli* > 12 000 MPN/100 mL compared to the group with *E. coli* < 1000 ($p < 0.05$). A particularly strong correlation between specific human DNA markers (Humito, HF183) and CAF and THEO were observed when *E. coli* concentration was above 12 000 MPN/100 mL. However, the correlation results should be interpreted with caution. While high concentration of HF183/Humito occurred with high CAF and THEO suggesting recent human contamination and provided a strong indication of human faecal pollution, this was not true when human specific DNA markers were negative or <LOQ. In this study, regardless of *E. coli* concentration, in 87 and 61% of storm sewer drain samples positive for CAF and THEO respectively, both human DNA markers were not detected or were < LOQ. Among these positive samples, 21 and 26% of samples had CAF and THEO concentrations above 300 ng/L and up to 9 ug/L. Therefore, they may result from sources other than sewage or persistent old contamination. CAF may be present in the environment from surface deposition as dumping coffee down stream drains or down kitchen drains. CAF and THEO naturally occur in a wide variety of foods and beverages, such as coffee, cocoa, tea, as well as in energizing drinks (Martínez-López et al., 2014). Consequently, MST DNA marker methodologies provide more reliable identification of the sources of fecal contamination than chemical marker tracking because it uses known host-specific gene sequences from the DNA of fecal microorganisms or cells (Staley et al., 2016; Panasiuk et al., 2015). CAF or THEO can be used as a predictor of HF183/Humito or be used individually to locate inputs of sanitary sewage in storm drains.

As part of a weight-of-evidence approach and with high variability of markers occurrence and concentrations observed within and between storm drain sub catchment, a chemical and microbial markers composite index value was used to prioritize household areas where cross-connections are most likely to be found. The co-occurrence of multiple human specific markers was not sufficient

to locate potential cross connection or indirect illicit discharge, but the magnitude of human fecal contamination does. The use of an index to weigh each specific marker is crucial to locate potential cross connection with the minimum of false positive particularly in highly urbanised or populated area. For example, in sub catchment STR with high human contamination, the mean concentration of HF183, CAF and THEO were 1 order higher ($P < 0.05$) in the storm sewer samples compared to low residential sub-catchments. Consequently, repeated background signal of human waste was observed (14 out of 18 samples chosen for dye tracing were located at STR sub-catchment), suggesting the presence of at least one upstream cross-connection. However, none of the households investigated had sewer cross connections to the storm drain (Table 4-4). Failing infrastructure and sewer leaks were suspected, CCTV systems are programmed as a confirmatory tool. While in this situation, the toolbox index priority can not differentiate between household cross-connexion and leaky sewer, it remains a valuable tool to identify and refine the area with potential illicit discharge taking into consideration the cost of false positives (expensive detailed investigation for illicit discharges that are not there). CAF, THEO and qHF183 performed the best and were more reliable in locating illicit discharges when the combined index ≥3. Moreover, index approaches would help integrate information from a variety of sources, often to help rank or prioritize subsequent action. The idea here was to propose a simple approach that could be more broadly applied to urban stormwater catchments. Although the study is based on samples from three sewersheds, an index could easily be applied more broadly within municipal programs for identifying cross-connected sewers and prioritizing sectors for remedial work.

In low contaminated/populated sub-catchment (BAV and BDB), CAF and THEO had the highest correlation with HF183 (Table 4-3) supporting the finding of some studies that these markers might best serve as a markers in locations with low background levels of the compound and when paired

with another chemical marker (Oppenheimer et al., 2011; Daneshvar et al., 2012). CAF or THEO could be used with *E. coli* and HF183. However, considering the proportion of false positives and false negatives, THEO would be the best option to use with HF183 based on correlation results. Additionally, based on the results of dye tracing, the threshold of 12 000 *E. coli*/100mL proposed by (Pitt, 2004) is justifiable to limit false positives in a populated sub-catchment. However, in a sub catchment with low background human waste signal, a threshold ≥ 5000 *E. coli*/100 mL would be reasonable to limit false negatives.

Similarly, based on the chemical line evidence markers used to trace sewage presence in a storm drain system, carbamazepine was the least useful to pinpoint the area of contamination or refine the number of houses that should be dye traced in search of potential cross-connections. For the 3 cross connections identified, it was measured only once (Table 4-4). Indeed, in pooled data, carbamazepine showed no clear correlation with *E. coli* or HF183 ($R^2 = 0.071$ and 0.023 respectively). Low correlation was observed with CAF and THEO ($R^2 = 0.042$). Similar results were found by (Hajj-Mohamad et al., 2019; Sauve et al., 2012). The weak correlations might be explained either by the presence of nonhuman sources or limited household consumption. Carbamazepine is a an anticonvulsant drug used in treatment of epilepsy and bipolar syndromes, thus the probability that is consumed by high population percentage is very low. However, it is highly stable in the environment (Sauve et al., 2012; Daneshvar et al., 2012) and in the absence of FIB and other markers, CBZ could be indicative of distant or non recent fecal sources in the sub catchment at a larger scale. The sampling data suggest that there is a potential to differentiate between illicit discharges, in this study, between cross-connections to a storm sewer (household cross-connection) and leaking sanitary sewers by focusing on carbamazepine concentration. In some hotspot manholes with the highest human sewage MST and CST markers but no cross

connections confirmed, CBZ had some spikes in concentration, therefore could indicate an upstream leaky sewer. While CCTV is programmed as a further step to confirm or not the presence of leaky sewer, it is recommended in this situation to include an additional conservative but infrequently used markers. For example, sulfamethoxazole was used by (James et al., 2016) for septic systems. The co-detection of both conservative markers in storm drains would only occur in the presence of sewage and is not likely from only a few households' cross connections. Additionally, the lack of correlations with the genetic markers HF183 and CST markers at these sites may also indicate a site-specific utility for CBZ. Strong to moderate correlations were observed in the highly residential area STR with HF183 (R^2=0.39, p=0.002) and with THEO (R^2=0.15, p=0.017).

The source tracking toolbox in this study was important for detecting evidence of sewage cross-connections when low stormwater *E. coli* concentrations might suggest otherwise. We detected human specific DNA markers; HF183 and mtDNA, CST markers: CAF and THEO, CBZ in stormwater samples when *E. coli* concentrations were less than 1000 CFU/100 mL (Table.S1, Annexe A). Although these sites were flagged as not priority, frequent sampling and further research is recommended if receiving water quality still do not meet the required regulatory standards after illicit discharges were corrected. Meanwhile, even a moderate but harmful input of untreated sewage that results in a small increase in fecal indicator bacteria concentrations can pose an increased health risk from pathogens (Ashbolt et al., 2010).

In storm drains, the totality of evidence demonstrates that the suitability of CST and MST markers may vary depending on different factors associated with the location of the sampling site. Each storm water outfall can exhibit a different and/or distinctive "upstream" storm drain watershed pattern (Staley et al., 2016) whether in terms of storm connections per km, intermittent or different

consumption or use of the WWMPs studied. Different half-lives in the human body and excretion pathways of the various WWMPs (Madoux-Humery et al., 2013), in addition differences in persistence and attenuation mechanisms might compromise the relationships between chemical and human qPCR markers. Therefore, using a toolbox of combined MST/CST techniques creates a multiple lines of evidence approach, which increases the robustness and accuracy of the data set and the reliability of source prediction.

Current stormwater monitoring procedures rely on grab or automatic sampling (Leecaster et al., 2002). Intermittent dry weather discharges into stormwater systems such as those created by illicit connections are infrequent, occur over a shorter period of time (e.g., a few hours per day) and are hard to detect. Thus, many studies have revealed that for those types of discharges, more frequent sampling or an intensive sampling program such as passive samplers and online monitoring would be a better sampling approach (Maharjan et al., 2016). However, several water quality parameters, such as indicator bacteria, are not easily measured by automatic composite samplers (H. Lee et al., 2007). Online and automated composite samplers are time consuming process of equipment installation and maintenance as compared with the grab sampling (Panasiuk et al., 2015) and typically limited by their ability to only collect samples at a single fixed intake point (Maharjan et al., 2016). Passive samplers in other hand have been extensively studied and deployed in the field over the last two decades for numerous inorganic and organic substances (Vrana et al., 2005). However, for compounds showing high, fast-changing temporal variations in concentrations such micropollutants, the passive samplers were less accurate (Criquet et al., 2017); direct deployment of passive samplers is particularly difficult for pharmaceuticals where intensive preliminary laboratory and more available rate sampling determination are needed (Criquet et al., 2017) or yet to be developed like for microbial markers (Panasiuk et al., 2015). This study has demonstrated

that grab samples with appropriate sampling time (7 to 10 am) were easy to set up and were sufficient to detect and locate illicit discharges efficiently, which was the objective.

4.6 Conclusions

The following conclusions were obtained from the analyses:

- Human waste markers were present throughout each storm system and were entering the stream/river from storm drains discharging flow during dry weather.
- The microbial and chemical source tracking tools in this study were important for (i) confirming that elevated levels of fecal indicator bacteria (FIB) particularly *E. coli* observed at storm outfalls studied were from human origin and thus indicative of illicit sewage at least in one of sub catchment stormwater systems investigated and (ii) were used to identify and confirm the suspected illicit discharge including cross-connection into storm drain.
- Based on the pooled dataset, CAF, THEO and human *Bacteroides* HF183 DNA markers performed the best in identifying human waste and further identify and confirm cross connections.
- When *E. coli* concentration was greater than 10 000 MPN/100 mL, these markers were better able to track the source of the pollution in the storm sewer.
- By comparing a direct marker of human feces (human mtDNA) with bacterial fecal indicators, we were able to overcome the limitations of conventional fecal indicators such as *E. coli* that yield false positives from bacteria already living in the environment.
- CST and human *Bacteroides* HF183 DNA markers performed the best in identifying human waste at storm sewer outfalls. CAF and THEO had the highest correlation with HF183 and *E. coli* in outfalls (r=0.9). However, in storm drains, the totality of evidence demonstrates

that the suitability of CST and MST markers may vary depending on different factors associated with the location of the sampling site.

- The combination of molecular and chemical human-specific markers into a composite index to prioritize high risk area (potentially having illicit discharges), provided a broad assessment but a reliable way to locate and rank multiple sites (storm sewer drains) based on frequency and magnitude of human fecal pollution present at each site/manhole.

- Considering the cost of false positive (investigation for illicit discharges that are not there), it is recommended in highly urbanised catchment to only consider samples with top priority index ≥ 3.

CHAPITRE 5 APPLICATION DE L'APPROCHE MST POUR ÉVALUER LA CONTRIBUTIONS DES EAUX USÉES AUX PICS DE CONTAMINATION DES PRISES D'EAU POTABLE

5.1 Résumé

Les précipitations intenses et la fonte des neiges présentent un risque majeur pour la qualité de l'eau potable. En effet, de grandes quantités de matières fécales peuvent être déversées lors les dérivations d'eaux usées non traitées ou encore des débordements d'égouts unitaires. Dans ce projet, nous avons utilisé des marqueurs de suivi des sources microbiennes (SSM), des marqueurs de suivi des sources chimiques (SSC), des pathogènes, des indicateurs de qualité de l'eau (*E. coli*, turbidité) et des données hydrométéorologiques (débit, précipitations) pour évaluer la vulnérabilité microbiologique de 3 prises d'eau potable et identifier les potentielles sources de contamination fécale. Les échantillons d'eau ont été prélevés lors d'es événements de fonte des neiges et/ou de pluie dans des bassins versants urbains et agricoles (Québec, Canada). Dans le bassin versant urbain, la contribution des eaux usées aux pics de contamination des prises d'eau a été évaluée par l'analyse des marqueurs suivants: le marqueur d'ADN mitochondrial (ADNmt) humain, le marqueur *Bacteroidale* HF183 spécifique à l'humain et les micropolluants d'eaux usées incluant la caféine, la carbamazépine, la théophylline et l'acétaminophène. Le suivi des événements a révélé que les concentrations maximales des marqueurs chimiques et microbiologiques, ont été enregistrées pendant les événements de précipitations. La dynamique d'*E. coli*, de HF183 et des micropolluants était similaire et les concentrations variaient généralement de plus d'un ordre de grandeur au cours de chaque événement. Des concentrations élevées de marqueurs spécifiques à l'hôte humain lors ces événements ont identifié avec précision que les prises d'eau potable urbaines

explorées ont été impactées par des rejets d'eaux usées locales récents situés en amont. Dans le bassin versant agricole, une pollution fécale mixte a été observée avec les occurrences d'ADNmt humain, d'ADNmt bovin et d'ADNmt porcin. La concentration élevée du marqueur mitochondrial bovin a montré des niveaux élevés de pollution fécale d'origine bovine à la suite d'épisodes de pluie, indiquant une charge accrue de polluants fécaux d'origine animale à partir de sources non ponctuelles. Cette étude a démontré la valeur d'une stratégie d'échantillonnage des événements à haut risque et de l'utilisation des méthodologies SSM et SSC pour évaluer de manière plus fiable la contribution des eaux usées et du ruissèlement aux pics de contamination microbiologiques des prises d'eau.

5.2 Introduction

La variabilité de la qualité microbiologique de l'eau est influencée par les événements climatiques et hydrométéorologiques (Scheili et al., 2016). Par temps de pluie ou de fonte des neiges printanière, les débordements d'égouts unitaires (DEUs), les ruissellements d'eaux pluviales et les dérivations d'eaux usées non traitées sont très préoccupants et sont considérés comme la principale cause de dégradation de la qualité de l'eau dans les bassins versants urbains (Olds et al., 2018; Marsalek et al., 2004; Warish et al., 2019). Les DEUs peuvent contaminer les sources d'eau avec des micro-organismes pathogènes associés aux eaux usées non traitées, notamment des protozoaires, les virus entériques et les bactéries telles que *Cryptosporidium* sp., Campylobacter sp., les adénovirus et norovirus (Chahal et al., 2016). La contamination fécale humaine provenant des eaux usées pose le plus grand risque pour la santé en raison de la spécificité d'hôte de nombreux agents pathogènes (Unno et al., 2018; Eisenberg et al., 2016). Le ruissellement agricole dans les bassins versants ruraux est également une préoccupation majeure car les excréments des animaux contiennent de nombreux agents pathogènes zoonotiques qui peuvent être nocifs pour la santé

humaine (Mateo-Sagasta et al., 2017).). De plus, les DEUs représentent une pollution fécale aiguë qui se manifeste presque instantanément dans les eaux réceptrices entraînant à court terme des pics de concentrations de pathogènes dans l'eau brute ce qui pourrait augmenter considérablement les risques d'exposition aux agents pathogènes et entraîner des épidémies d'origine hydrique (Marsalek & Rochfort, 2004). Cann et al. (2013), ont identifié quatre-vingt-sept épidémies d'origine hydrique impliquant des événements météorologiques extrêmes (ex. fortes pluies et inondations). Les dérivations d'eaux usées non traitées ou partiellement traitées en temps sec contribuent également aux contaminations microbiologiques des sources d'approvisionnement en eau, elles peuvent occasionnellement se produire en raison du blocage des égouts ou des stations de pompage, de la maintenance du système d'égout sanitaire (Warish et al., 2019).

La surveillance de la qualité de l'eau brute à l'entrée des usines d'eau potable est un élément clé pour évaluer la vulnérabilité des sources d'eau aux contaminations microbiennes et assurer une production d'eau potable saine (Besmer et al., 2017). Actuellement, les stratégies de surveillance de la qualité microbiologique de l'eau brute sont généralement basées sur des échantillonnages à faibles fréquences (par exemple, toutes les deux semaines ou tous les mois). Cependant, étant donné la nature transitoire des DEUs et des dérivations d'eaux usées, il est nécessaire de mettre en place des programmes de surveillance de la qualité de l'eau plus ciblés « event-based », notamment lors des évènements de pluie et de fonte de neige. La mise en œuvre de ces programmes de surveillance en plus de documenter les concentrations critiques aux prises d'eau brute, peut contribuer à une meilleure compréhension de la dynamique des contaminants (Mackay & Taylor, 2012).

Les bactéries indicatrices de contamination fécale (BICF) y compris *E. coli*, ainsi que la turbidité sont des indicateurs courants de la qualité de l'eau. Plus récemment, la surveillance in situ de

l'activité β-d-glucuronidase (GLUC) en temps quasi réel est désormais disponible pour caractériser la dynamique temporelle de la pollution fécale dans les eaux environnementales (Demeter et al., 2020; Burnet et al., 2019; Sylvestre. et al., 2021b). La turbidité est régulièrement utilisée comme indicateur principal des niveaux de contamination microbienne, néanmoins, la turbidité reflète la charge de particules organiques et inorganiques, de sorte que des échantillons d'eau supplémentaires sont nécessaires pour une analyse plus précise des contaminants microbiens (Tornevi et al., 2014). Les BICF, bien qu'elles indiquent la présence d'une contamination fécale et sont généralement utilisées pour prédire une potentielle présence de pathogènes dans les sources d'eau potable. Leurs applications dans la surveillance de la qualité de l'eau est souvent critiquée pour plusieurs raisons : (i) sont capables de survivre et de se développer dans divers environnements, (ii) ne sont pas nécessairement en corrélation avec des pathogènes dans les eaux usées et les eaux de surface et (iii) Les BICF ne proviennent pas exclusivement de sources humaines, ils proviennent également des excréments d'autres animaux à sang chaud (par exemple, vache, chien, oiseau). Ainsi, les BICF et/ou l'activité GLUC ne sont pas spécifiques à la source de contamination fécale.

Il est difficile de mettre en œuvre des stratégies et des plans appropriés pour la protection des sources d'eau et l'évaluation des risques pour la santé humaine sans une identification des sources de pollution possibles dans le bassin versant (McLellan et al., 2014; Harwood et al., 2014). Pour identifier les sources de contamination fécale, les méthodes alternatives de suivi des sources microbiennes font référence à l'utilisation de marqueurs spécifiques à l'hôte qui peuvent inclure soit des marqueurs génétiques ou chimiques spécifiques aux matières fécales des espèces humaines et animales (Griffith et al., 2013). Un marqueur génétique spécifique à l'hôte fait référence à une séquence unique d'acide nucléique (c'est-à-dire d'ADN) qui est exclusivement ou fortement

associée à des sources d'hôtes particulières. Cette séquence peut être soit une séquence d'acide nucléique de cellules fécales (par exemple, bactéries et virus) ou de cellules hôtes tel que l'ADN mitochondrial (Zheng et al., 2018). Les marqueurs génétiques, tels que le marqueur *Bacteroidale* humain HF183 et les cellules hôtes (ADN mitochondrial) sont largement appliqués et utilisés comme indicateurs des eaux usées (Tanvir Pasha et al., 2019; McGinnis et al., 2018). Les marqueurs chimiques spécifiques à l'hôte utilisés dans les stratégies de suivi des sources chimiques sont des composés chimiques ou des micropolluants d'origine humaine. Divers marqueurs chimiques ont été identifiés comme des indicateurs potentiels de la contamination par les eaux usées, notamment la caféine, la carbamazépine et d'autres produits pharmaceutiques (Tran et al., 2015). L'utilisation de marqueurs génétiques et chimiques est maintenant considérée comme une méthode plus précise pour déterminer les principales sources de contamination. L'application des techniques SSM et SSC pour évaluer la vulnérabilité des prises d'eau potable lors des événements critiques de la qualité de l'eau brute n'a pas été entièrement exploitée. Les objectifs de cette partie du projet étaient de : (i) en suivant l'activité de la β-D-glucuronidase (GLUC) è l'eau brute, mieux comprendre la dynamique à court terme d'*E. coli*, des marqueurs humains/animaux et des pathogènes après des évènements de DEUs (ii) démontrer dans divers événements critiques (DEUs, dérivations d'eaux usées en temps sec ou en temps de pluie) l'utilité d'une boîte à outils multi-traceurs pour évaluer la contribution des eaux usées et/ou pluviales aux pics de contamination fécale à l'entrée des usines d'eau potable et (iii) évaluer la pertinence des marqueurs humains à capter le pic de pathogènes après des événements critiques tels que la fonte des neiges printanière et/ou précipitations.

5.3 Matériel et Méthodes

5.3.1 Description des bassins versants et stratégie d'échantillonnage

Une description détaillée des bassins versants urbain et agricole des rivières étudiées et le plan d'échantillonnage des prises d'eau potable est présentée au chapitre 2, section 3.6.

5.3.2 Analyses des bactéries indicatrices de contamination fécale

La méthode Quanti-Tray®/2000 (IDEXX, Maine, États-Unis) a été utilisée pour l'énumération d'*E. coli*. Cette méthode approuvée par l'USEPA, se base respectivement sur l'activité des enzymes ß -D-galactosidase (coliformes totaux) et ß -D-glucuronidase (*E. coli*). En effet, ces enzymes hydrolysent spécifiquement des substrats chromogéniques, l'ortho-nitrophenyl--D-galactopyranoside (ONPG) et 4-methylumbelliferyl-D-glucuronide (MUG), présents dans le milieu de culture Colilert® (réactif DST : Defined Substrate Technology). Ainsi, lorsqu'un échantillon d'eau contient des bactéries coliformes, celles-ci métabolisent le nutriment indicateur, ONPG, et l'échantillon vire au jaune après une incubation de 24h à 35 ± 0,5 ˚C. Lorsque les bactéries *E. coli* sont présentes, elles métabolisent le nutriment indicateur MUG, l'échantillon devient alors fluorescent sous illumination UV à 366 nm (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2009). Le Quanti-Tray/2000 IDEXX est une méthode de numération semi-automatisées basées sur les méthodes de référence de la technique du Nombre le plus probable (Most Probable Number- MPN). Quanti-Tray/2000 permet d'obtenir des numérations allant de 1 à 2 419/100 mL avec une limite de détection de 1MPN/100 mL pour les échantillons d'eau.

5.3.3 Marqueurs moléculaires

5.3.3.1 Extraction d'ADN et analyse qPCR

Les étapes de filtration des échantillons d'eau, l'extraction d'ADN et la quantification des marqueurs de contamination fécale du marqueur *Bacteroidale* HF183 spécifique à l'hôte humain et marqueurs d'ADN mitochondrial spécifique à l'animal et à l'humain par la méthode PCR en temps réel (qPCR) sont préalablement décrites et validées par (Villemur et al., 2015). La limite de quantification était de 500 copies/100 mL.

5.3.4 Marqueurs chimiques

La sensibilité des méthodes d'analyse et le choix des micropolluants sont entièrement détaillés dans (Hajj-Mohamad et al., 2019). Les cinq marqueurs chimiques sélectionnés pour l'étude sont : la caféine (CAF), la théophylline (THEO), la carbamazépine (CBZ), la dihydro-carbamazépine (CBZ-2OH) et l'acétaminophène (ACET). Les marqueurs ont été analysés par une extraction en phase solide en ligne combinée à une spectrométrie de masse en tandem (SPE-LC-ESI-MS/MS) initialement développée par (Viglino et al., 2008). La méthode analytique est disponible dans (Sauve et al., 2012). Les limites de détection ont été estimées à trois fois l'écart type de 5 mesures répétées d'un échantillon de terrain et étaient de 0,5ngL−1 pour CAF, 0,2ngL−1 pour CBZ, 2ngL−1 pour THEO et 10ngL −1 pour l'ACE. Tous les échantillons ont été analysés en double. Pour chaque événement, des blancs de laboratoire et des blancs de terrain ont été analysés pour tous les paramètres. Toutes les valeurs à blanc étaient inférieures aux limites de détections.

5.3.5 Analyse des pathogènes

Deux protozoaires (*Cryptosporidium* et *Giardia*) et 7 virus entériques, dont norovirus, rotavirus, réovirus, sapovirus, astrovirus, entérovirus, adénovirus et un virus non entérique John Cunningham

(JC) ont été analysés dans l'évaluation de la vulnérabilité des prises d'eau potable. Le matériel et méthodes utilisés pour l'analyse des pathogènes sont détaillés dans nos publications suivantes (Sylvestre. et al., 2021b; Sylvestre. et al., 2020b; Sylvestre. et al., 2020a; Sylvestre. et al., 2021a).

5.4 Résultats et discussion

5.4.1 Conditions hydrométéorologiques et l'activité GLUC lors des échantillonnages ciblés

La stratégie d'échantillonnage pour capter les pics de contamination par les eaux usées et les pics de contamination d'origine animale au niveau des prises d'eau a été déclenchée par les conditions météorologiques locales et/ou les variations à court terme de l'activité GLUC. Figures S1, S2 et S3 (Annexe B) montrent respectivement l'évolution temporelle à court et à long terme de l'activité GLUC, la turbidité et les conditions hydrométéorologiques aux prises d'eau potable urbaines (A et B) et agricole (C). Les échantillons ont été prélevés lorsque les conditions suivantes étaient remplies : (i) précipitations cumulées supérieures à 15 mm ou température de l'air supérieure à 5 °C mesurées en 24 heures, et (ii) augmentation de l'activité GLUC de 5 mMFU /100 mL observé en une heure. Pour l'activité GLUC, le seuil de 5 mMFU/100 mL a été sélectionné sur la base des augmentations à court terme de l'activité GLUC mesurées lors d'événements hydrométéorologiques antérieurs au niveau de ces même prises d'eau (Sylvestre. et al., 2020a; Burnet et al., 2019). Au cours de tous les événements (échantillonnages ciblés) où l'activité GLUC a été utilisée pour déclencher l'échantillonnage, tous les pics d'eaux usées ont été captés et une dynamique similaire a été observée entre les marqueurs d'eaux usées et l'activité GLUC (Figure 5-1).

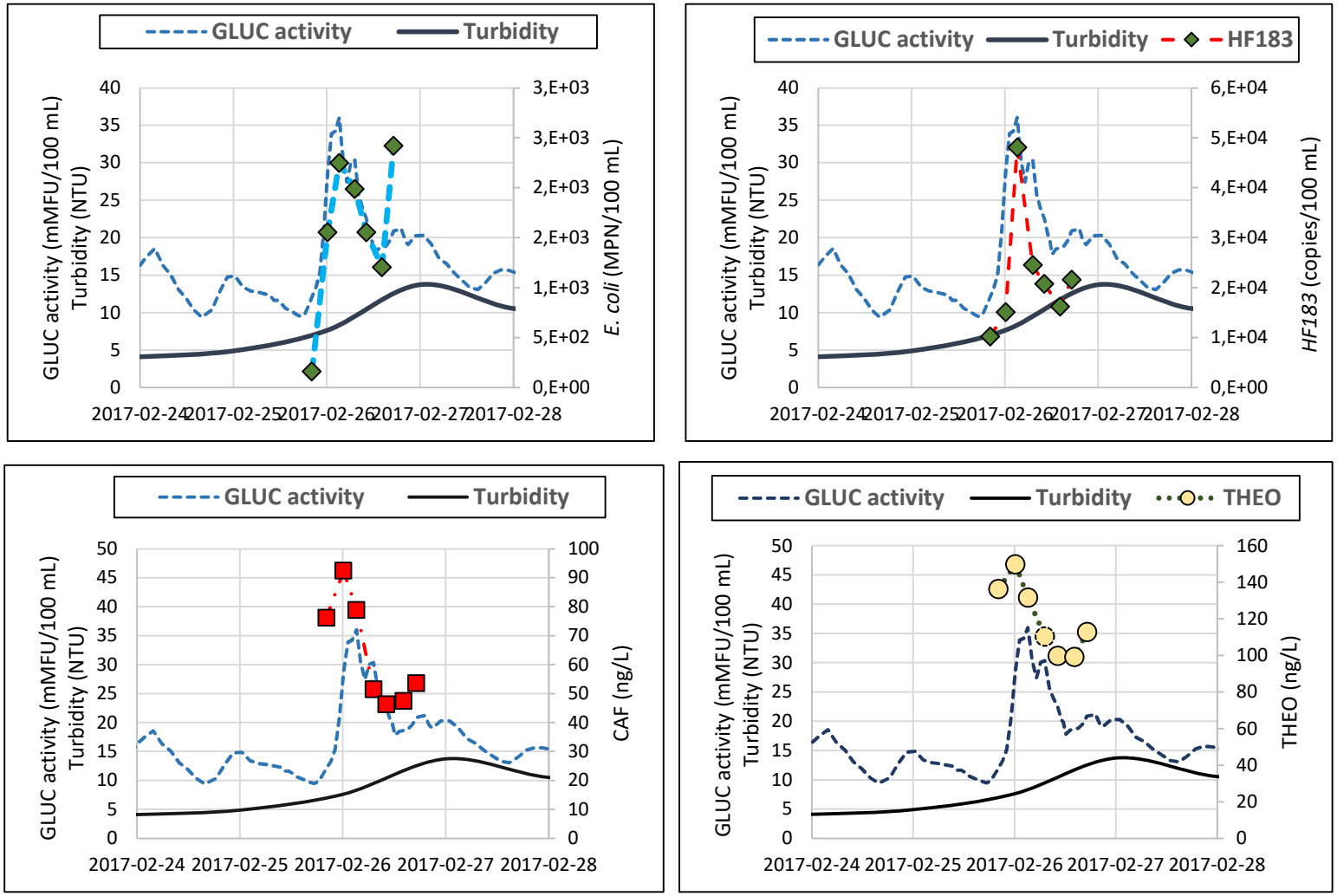


Figure 5-1. Relation temporelle entre l'activité GLUC, la turbidité et les marqueurs moléculaires spécifique de l'hôte humain pendant l'évènement A-1

5.4.2 Dynamique à court terme des marqueurs moléculaires aux prises d'eau urbaines

Pour évaluer l'impact des débordements d'égouts unitaires (DEUs) en temps de pluie et les dérivations d'eaux usées partiellement traitées ou non traitées sur la qualité microbiologique de l'eau brute, nous avons suivi les fluctuations à court terme des marqueurs d'eaux usées au cours de deux épisodes de fonte des neiges/pluies dans 2 sous-bassins versant. Pour cela, nous avons mesuré les concentrations d'*E. coli* cultivables et deux marqueurs ADN associés aux eaux usées; le marqueur *Bacteroidale* humain (HF183) et le marqueur mitochondrial humain (ADNmt humain). Les concentrations d'*E. coli* et de HF183 étaient plus élevées dans les échantillons d'eau prélevés lors des événements temps pluie et /ou fonte de neige par rapport aux événements de temps sec (Figure 5-2). Lors de la fonte des neiges/précipitations du février 2017 (événement A-1, Figure 5-2), *E. coli* et le marqueur *Bacteroidale* HF183 spécifique de l'humain ont atteint respectivement un maximum de 2 420 MPN/100 mL et 4,8 x 10^4 copies/100 mL. Les concentrations d'*E. coli* et du marqueur d'eaux usées HF183 ont augmenté respectivement d'environ 1,1 et 0,9 Log par rapport aux conditions de base (temps sec), ce qui suggère que les DEUs et les dérivations contribuaient aux pics de contamination observés à l'eau brute. La synchronisation du pic de contamination d'*E. coli* avec celui du marqueur *Bacteroidale* HF183 montre que les eaux usées pourraient être la principale source de contamination fécale lors de l'événement A-1.

Lors des échantillonnages ciblés effectués en avril 2017 (événement-A2 et A-3, Figure S4-Annexe B), des précipitations intenses couplées à une forte augmentation du débit de la rivière (jusqu'à 800 m^3/s) ont été enregistrés. *E. coli* a montré un pic de moindre amplitude (1414 MPN/100 ml) en comparaison avec l'évènement A-1, avec une augmentation de 0,4 Log pendant les événements du mois d'avril (Figure 5-2). Le marqueur HF183 semblait moins sensible aux effets de dilutions par

les eaux pluviales et aux augmentations du débit de la rivière, une augmentation de 0,9 Log (concentration maximale de 9,3 x 10^4 copies/100 ml) a été observée. Lors de l'événement A-2 (Figure 5-2), une dynamique variable (pics non synchrones) entre *E. coli* et HF183 a été observée avec le pic d'*E. coli* qui a duré ~ 24h à de faibles concentrations de marqueurs d'eaux usées. Les résultats obtenus suggèrent qu'en dehors des DEUs locaux , les précipitations intenses mobilisent davantage de sources non ponctuelles comme le ruissellement urbain/la remise en suspension des sédiments qui pourraient contribuer à la pollution fécale totale (Unno et al., 2018). Il y a 4 STEPs et 37 ouvrages de surverse en amont du la prise d'eau potable A avec 3 STEPs et 30 ouvrages de surverse qui se trouvent dans la zone de protection intermédiaire de la prise d'eau (Burnet et al., 2019). Au cours de la période d'échantillonnage ciblé, plusieurs DEUs et des dérivations d'eaux usées partiellement traitées ont été déversés dans la rivière juste en amont de la prise d'eau Concrètement, de multiples dérivations d'eaux usées partiellement traitées et des DEUs se sont produits du 4 au 12 avril, la durée totale du déversement était de 192h.

À la prise d'eau potable B (Figure 5-3), la stratégie d'échantillonnage ciblé était basée uniquement sur les augmentations de l'activité GLUC pendant les événements B-1 et B-3. Une augmentation de respectivement 0,7 et 0,9 Log d'*E. coli* et des marqueurs moléculaires a été observée à l'événement B-1 montrant qu'en plus des DEUs, les dérivations d'eaux usées en temps sec sont également considérées comme des périodes de forte vulnérabilité des prises d'eau.

Durant l'événement B-2 (Figure 5-3), seules les conditions météorologiques locales (précipitations de 15 mm) ont été considérées pour déclencher l'échantillonnage ciblé. Cependant, un seul échantillon ponctuel a été prélevé et comparé aux autres évènements. Les résultats indiquent qu'aucune différence significative entre *E. coli* et les marqueurs moléculaires n'a été observée. Il est fort possible que la stratégie d'échantillonnage utilisé (ponctuelle) ait manqué les événements

de contamination fécales sporadiques et démontre en outre l'utilité des stratégies de surveillance ciblé basées sur l'activité GLUC

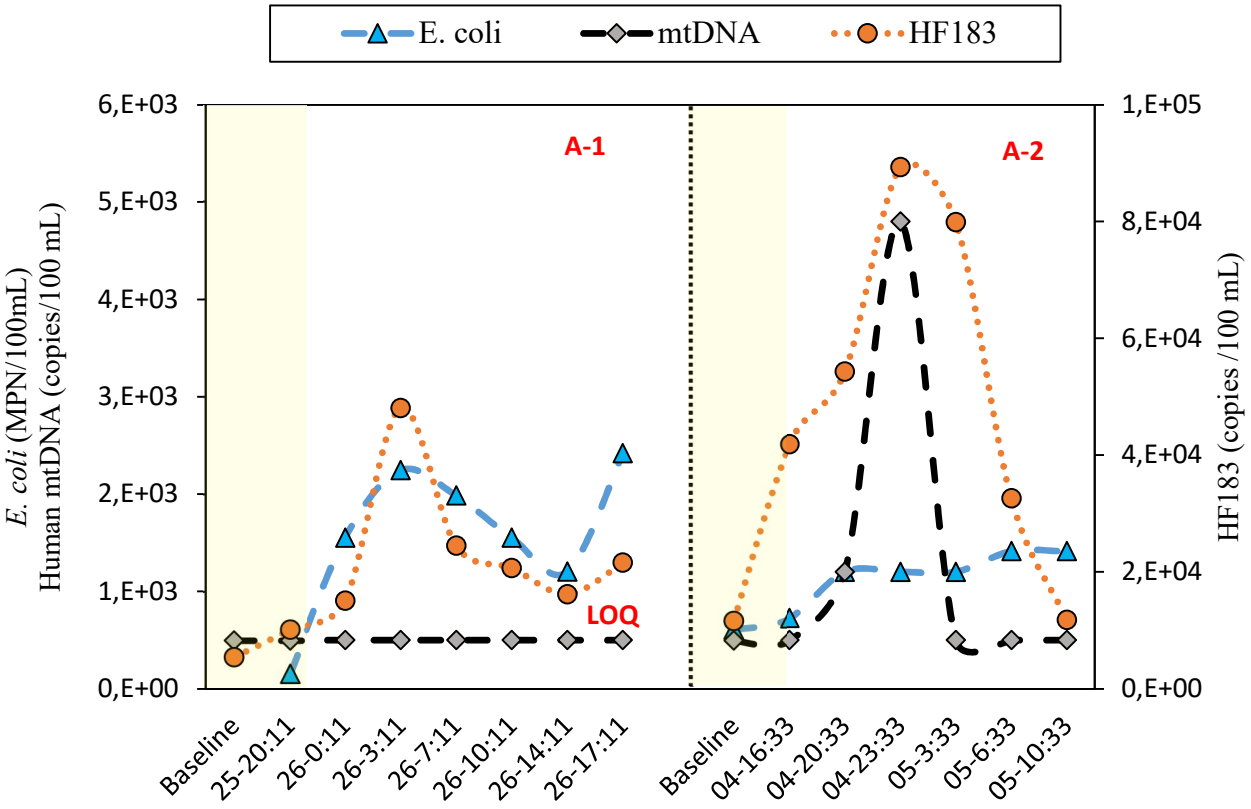


Figure 5-2. Évolution temporelle d'*E. coli*, du marqueur *Bacteroidale* HF183 et du marqueur mitochondrial humain (ADNmt) pendants deux événements hydrométéorologiques (fonte des neiges et précipitations) en février (événement A-1) et avril (événement A- 2) 2017 à la prise d'eau potable A. Les rectangles jaunes indiquent un événement de temps sec (baseline)

Lors de l'événement de fonte des neiges (événement-B3), les concentrations d'*E. coli*, de HF183 et d'ADNmt humain des échantillons d'eau prélevés en temps sec et en fonte des neiges étaient relativement similaires. Aucun DEU connu n'a été enregistré en amont de prise d'eau B pendant l'échantillonnage des événements. Cette observation montre que la fonte des neiges printanière non

associée aux DEUs pourrait être une période non critique. Cependant, l'activité GLUC de l'eau brute a progressivement augmenté de 20 à 50 mMFU 100 mL−1 au cours des cinq jours (Figure S3-Annexe B). Le signal enzymatique pourrait être dû à la présence d'*E. coli* viables mais non cultivables emportées lors de la fonte des neiges (Burnet et al., 2019).

Par rapport au marqueur HF183, l'ADNmt humain a été détecté pendant toutes les compagnes d'échantillonnage (Figure 5-2, Fig.S4 (Annexe B)) confirmant la contamination par les eaux usées. Cependant, les concentrations étaient la plupart du temps inférieures aux limites de quantifications sauf à l'événement A-2 où la concentration d'ADNmt a atteint un maximum de 4,8 x 10^3 copies/100 mL avec un pic synchrone avec celui du marqueur HF183. Les concentrations maximales du marqueur *Bacteroidale* humain et de l'ADNmt enregistrées lors de l'événement A-2 indiquent probablement des niveaux élevés de pollution fécale humaine. Ces résultats suggèrent que l'ADNmt, bien que hautement spécifique à l'hôte, ne pouvait pas indiquer l'amplitude de la contamination fécale de l'eau brute. Par conséquent, ce marqueur peut être associé au marqueur HF183 si d'avantage de preuves sont nécessaires pour indiquer la présence d'une contamination par les eaux usées. La différence de concentrations et d'amplitudes observée entre les deux marqueurs peut refléter une capacité de survie/persistance différente de ces marqueurs dans l'environnement (Kapoor et al., 2013). Dans l'ensemble, par rapport à tous les autres indicateurs, le marqueur *Bacteroidale* était l'indicateur le plus spécifique des DEUs/ dérivations, et était un indicateur plus sensible que l'ADNmt humain pendant tous les évènements étudiés. Des résultats similaires ont été trouvés par (McGinnis et al., 2018).

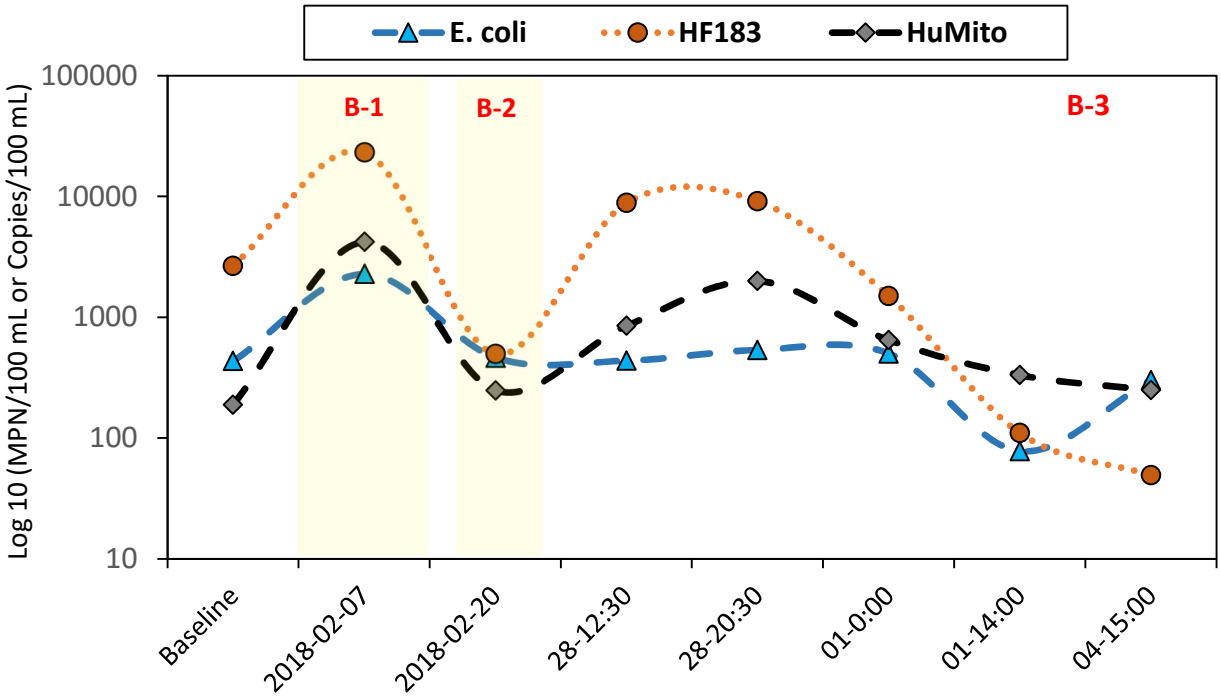


Figure 5-3. Évolution temporelle d'*E. coli*, du marqueur *Bacteroidale* HF183 et du marqueur mitochondrial humain (Hunito) en février 2018 lors de l'événement B-1 (Dérivation d'eaux usées), de l'événement B-2 (précipitations) et de l'événement B-3 en mars 2018 (fonte des neiges) à la prise d'eau potable B. Les rectangles jaunes indiquent les événements ciblés

5.4.3 Dynamique à court terme des marqueurs chimiques aux prises d'eau urbaines

La pertinence des marqueurs chimiques à évaluer l'impact des DEUs/Dérivations d'eaux usées sur les prises d'eau a été uniquement étudiée dans le bassin versant urbain. Dans l'ensemble, des différences d'amplitude et d'occurrences ont été observées entre les différents marqueurs dans les sous bassins-versants de chaque prise d'eau. Par exemple, l'ACET et le CBZ-2OH n'ont été détectées qu'à la prise d'eau potable B. De plus, la concentration de la CAF et de la THEO était 10 fois plus élevée à la prise d'eau potable B et était représentative des concentrations observées des

effluents traités de la STEP en amont (Figure 5-4, Figure S5-Annexe B). Ces résultats mettent en évidence la pertinence d'utiliser plusieurs marqueurs d'eaux usées pour anticiper soit la faible détection de certains marqueurs et également la nécessité de tester la pertinence des marqueurs dans différents emplacements géographiques et sous-bassin versants avant de choisir les marqueurs les plus performants.

Les fluctuations à court terme des concentrations des marqueurs chimiques en temps sec et en conditions critiques sont illustrées dans les Figures 5-4 et 5-5. À la prise d'eau potable A, comme pour les marqueurs moléculaires, des concentrations plus élevées des marqueurs chimiques ont été observées en évènement critique en comparaison avec les concentrations mesurées en temps sec (événement-A1). L'amplitude des marqueurs chimiques soutient la contribution des eaux usées au pic de contamination fécale de l'eau brute. Néanmoins, la CAF, la THEO et la CBZ bien qu'ils aient une dynamique similaire, ne partageaient pas une tendance/un pic similaire avec *E. coli* et les marqueurs ADN spécifiques à l'humain. En effet, en raison de leur présence principalement sous la forme dissoute dans les eaux réceptrices, les marqueurs chimiques ont rapidement atteint les prises d'eau suggérant qu'ils pourraient être utilisés comme indicateurs précoces de la qualité de l'eau après des DEUs.

De plus, lors des événements A-2 et A-3, à l'exception de la CBZ qui a montré un comportement conservateur avec une augmentation de la concentration aux multiples DEUs et dérivations d'eaux usées, les concentrations de la CAF et de la THEO étaient similaires ou inférieures aux conditions de base (temps sec). Comme expliqué précédemment, la longue durée des précipitations/inondations lors des événements A-2 et A-3 a généré plus de ruissellement et des DEUs caractérisés par des eaux usées domestiques plus diluées.

Par conséquent, il ne serait pas pertinent d'utiliser la CAF et la THEO en tant que marqueurs de présence d'eaux usées non traitées en période de forte dilution de la rivière. Le même comportement a été observé lors de l'événement B3 où une lente fonte des neiges (Figure 5-5, Figure S4-Annexe B) a entraîné un débit élevé de la rivière et des niveaux inférieurs de tous les marqueurs à l'exception de l'ACET.

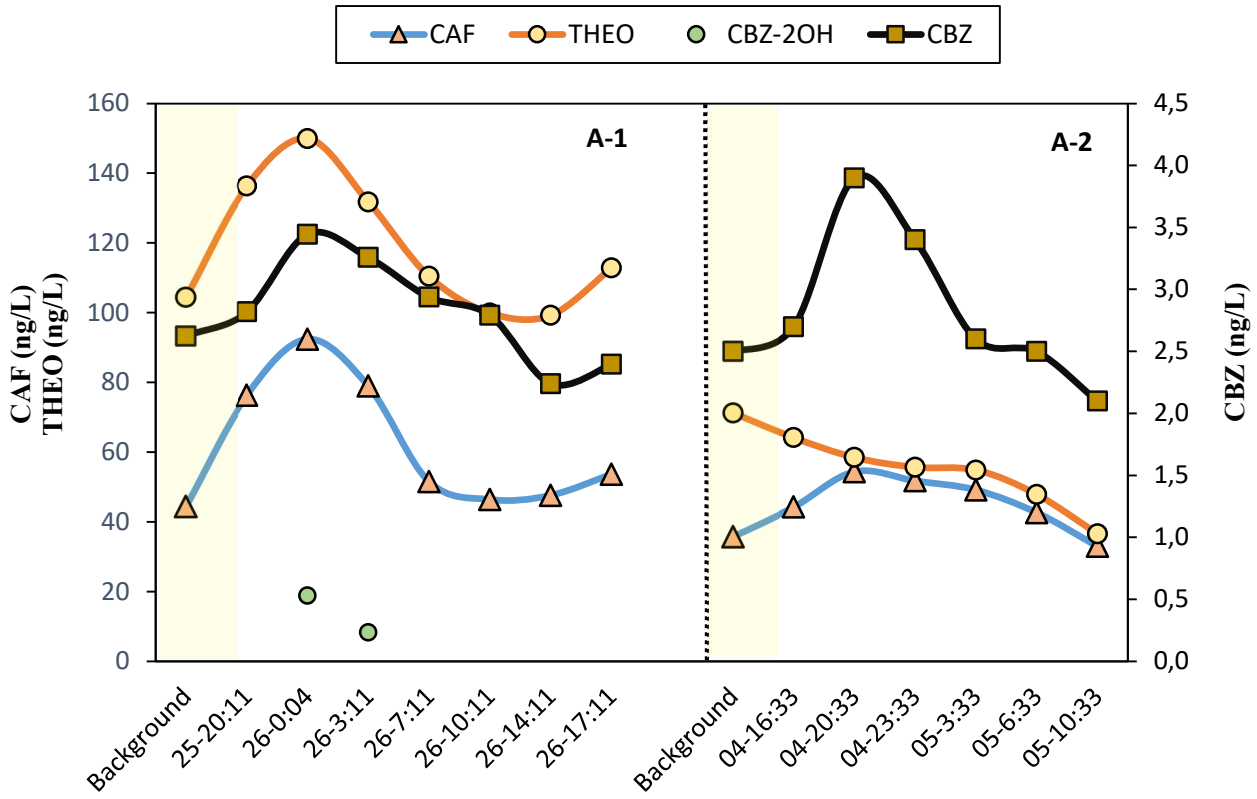


Figure 5-4. Évolution temporelle de la caféine (CAF), la théophylline (THEO) et de la carbamazépine (CBZ) pendants deux événements hydrométéorologiques (fonte des neiges et précipitations) en février (événement A-1) et avril (événement A-2) 2017 à la prise d'eau potable A. Les rectangles jaunes indiquent un événement de temps sec (background)

Les eaux usées brutes et traitées rejetées par la STEP en amont la prise d'eau potable B ont également été surveillées par temps sec et dans des conditions critiques (fonte des neiges). Dans les conditions de base, à l'exception de l'ACET qui a montré une réduction de ~ 2Log entre les eaux usées brutes et les effluents traités (Figure S5), il n'y avait pas de différence significative dans les concentrations de la CAF, la THEO, la CBZ et la CBZ-2OH. Si on s'attendait à ce que dans une période de forte dilution comme les événements A2, A3 et B3, que toutes les concentrations des marqueurs soient similaires aux conditions de base ou même inférieures (Benotti et al., 2007; Poopipattana et al., 2021), la CBZ a montré un comportement conservateur avec une augmentation de la concentration après la dérivation d'eaux usées en temps sec (évènement B-2) et les multiples DEUs. Compte tenu de la teneur élevée en matières organiques des dépôts d'égouts sanitaires, il est probable que la CBZ puisse être adsorbée sur les dépôts d'égouts, puis désorbée lorsqu'elle est diluée avec des eaux pluviales (Madoux-Humery et al., 2013; Hajj-Mohamad et al., 2017). Par conséquent, la CBZ serait un meilleur marqueur d'eaux usées en raison de sa persistance élevée et peut potentiellement indiquer la remise en suspension des égouts combinés lors d'événements hydrométéorologiques.

L'ACET était le marqueur le plus approprié pour les débordements d'égouts sanitaires déclenchés en temps de pluie/fonte des neiges (événement B-2 et B3) et par temps sec (événement B-1) pour les raisons suivantes : (i) l'ACET n'a été détectée qu'après des événements de débordement indiquant une contamination par les eaux usées, (ii) l'ACET a montré un comportement similaire avec *E. coli* et les marqueurs ADN, suggérant une utilisation potentielle comme indicateur fécal chimique, (iii) fait intéressant, l'ACET a été détecté durant tout l'événement B-3 alors que tous les

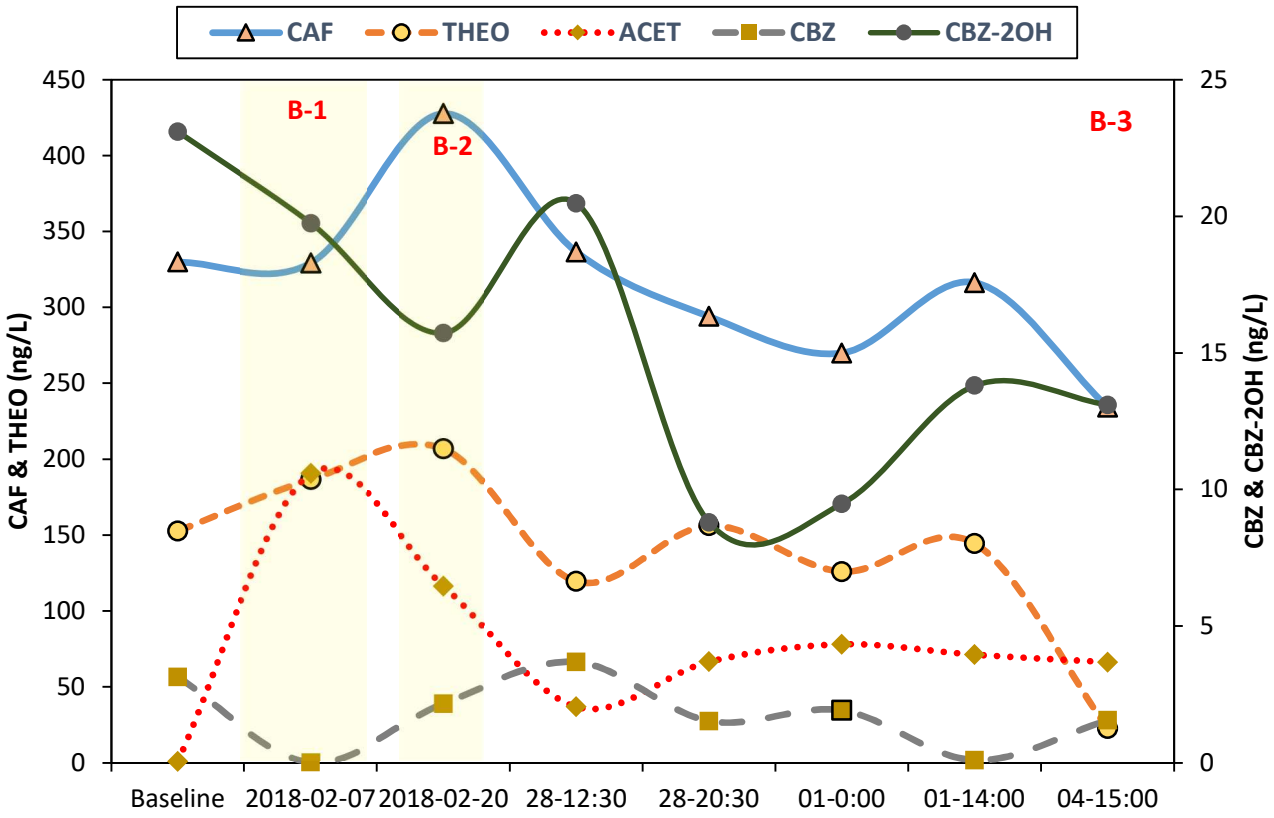


Figure 5-5. Évolution temporelle de la caféine (CAF), la théophylline (THEO) et de la carbamazépine (CBZ) en février 2018 lors de l'événement B-1 (Dérivation d'eaux usées), de l'événement B-2 (précipitations) et de l'événement B-3 en mars 2018 (fonte des neiges) à la prise d'eau potable B. Les rectangles jaunes indiquent les événements ciblés (Baseline)

autres marqueurs étaient inférieurs aux concentrations de temps sec indiquant la présence possible d'une source d'eaux usées supplémentaire en amont (Figure 5-5). La prise d'eau potable B est située à l'extrémité de la rivière en aval de tous les émissaires des STEPs et les ouvrages de surverses, par conséquent, une contamination cumulée des eaux usées pourrait atteindre cette prise (Madoux-Humery et al., 2016). En outre , l'ACET a été signalé comme un marqueur approprié du rejet d'eaux usées non traitées en raison de son élimination élevée pendant le traitement des eaux usées (Munro et al., 2019).

5.4.4 Dynamique à court terme des marqueurs spécifique à l'hôte humain et animal à la prise d'eau potable agricole

Dans un bassin agricole, il est fortement probable de trouver diverses sources de contamination fécale (Villemur et al., 2015). Bien que moins d'échantillons aient été collectés dans les conditions de base (temps sec), les marqueurs spécifiques à l'hôte ont révélé que la contamination fécale atteignant la prise d'eau potable était à la fois d'origine anthropique (humaine) et animale (bovine) tel que montré dans la Figure 5-6. La concentration d'ADNmt bovin était environ 3,5 fois plus élevée (moyenne de 7168 copies/100 mL) que la concentration d'ADNmt humain (moyenne de 2050 copies/100 mL). Le marqueur *Bacteroidale* HF183 n'a été détecté dans aucun échantillon en temps sec, ce qui suggère une incidence plus faible de contamination par les eaux usées. L'échantillonnage ciblé a mis en évidence l'impact du ruissellement agricole, car il a induit une augmentation de 0,9 Log des niveaux d'*E. coli* correspondant à une concentration maximale de 5,3 x 10^3 MPN/100 mL, une augmentation de 0,8 Log de l'ADNm bovin correspondant à une concentration maximale de 4,4x10^4 copies/100 mL et une augmentation de 0,6 Log de l'ADNm

humain correspondant à une concentration maximale de 7,9 x10^3 copies/100 mL par rapport aux conditions de temps sec (Figure 5-6).

Le marqueur d'ADNmt porcin n'a pas été détecté dans les conditions de base mais a été détecté au cours des 12 premières heures de l'événement ciblé. Néanmoins, tous les échantillons positifs avaient une concentration en dessous de la limite de quantification. Les marqueurs d'ADNmt humains et animaux ont montré une dynamique similaire au début de l'événement pluvieux et ont rapidement diminué à fur et à mesure que les précipitations et le ruissellement de surface diminuaient suggérant une réponse plus rapide du ruissellement lors de fortes précipitations.

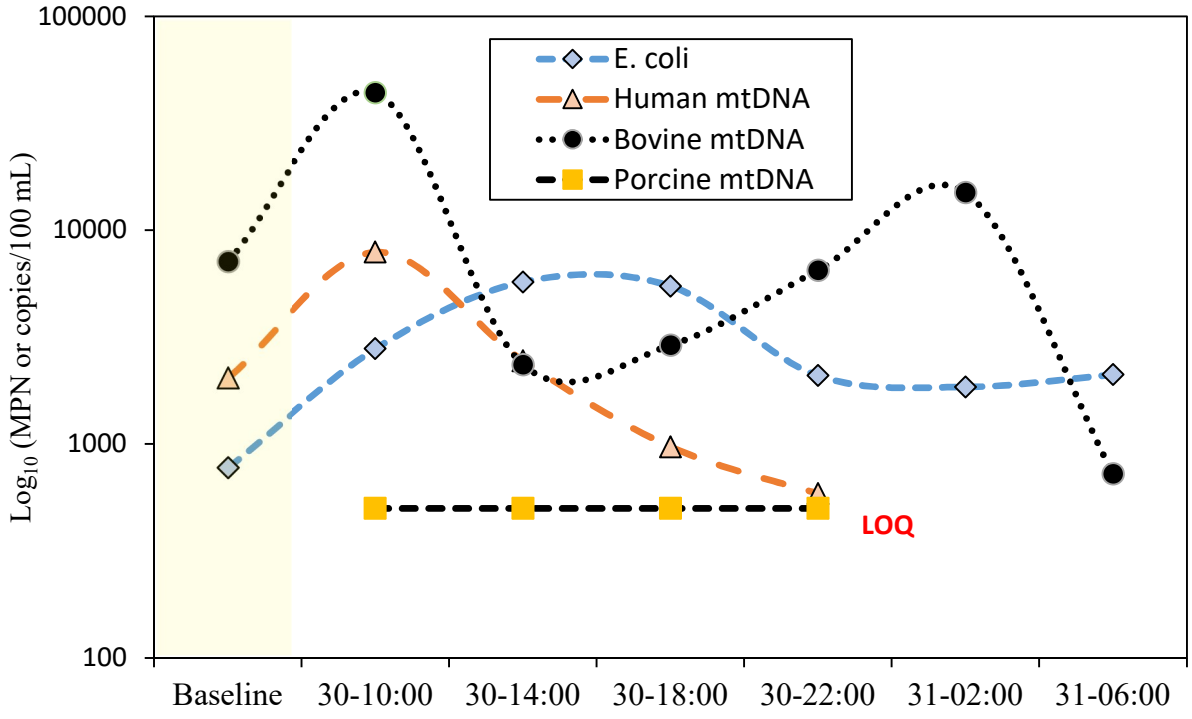


Figure 5-6. Évolution temporelle d'*E. coli*, du marqueur mitochondrial humain et des marqueurs mitochondriaux bovin et porcin lors des précipitations d'octobre 2017. Les rectangles jaunes indiquent un événement de temps sec ciblé (Baseline). LOQ = limite de quantification

En revanche, la concentration maximale d'*E. coli* a eu lieu 4 h plus tard en comparaison avec les marqueurs et était relativement stable pendant la durée de l'événement même en l'absence (ou à des niveaux inférieurs) des marqueurs spécifiques de l'hôte étudiés. Ce résultat indique que d'autres sources de contamination fécale que les sources bovines ou porcines pourraient contribuer à la concentration élevée d'*E. coli* observée. Les sources non ponctuelles provenant des chiens, de poulets et d'autres animaux d'élevage y compris les moutons, les chevaux et les chèvres couramment présentes à faible densité dans les bassins versants agricoles peuvent également être drainées par les précipitations et le ruissellement de l'ensemble du bassin versant. La présence des marqueurs humains pourrait être attribuée aux rejets des effluents traités des STEPs municipales, des surverses (McGinnis et al., 2018) ainsi qu'aux fuites des fosses septiques fréquemment présentes dans les bassins versants agricoles (Villemur et al., 2015). Une STEP municipale et quatre ouvrages de surverses sont situés à 10 km en amont de la prise d'eau potable. Fait intéressant, le marqueur *Bacteroidale* HF183 n'a pas non plus été détecté lors de l'événement de pluie. Compte tenu de la concentration environnementale initiale élevée du *Bacteroidale* HF183 par rapport à l'ADNmt humain observé dans les prises d'eau potable urbaines, nous nous attendions à une concurrence entre les deux marqueurs. Bien que les variations de la stabilité et de la persistance des marqueurs dans l'environnement pourraient probablement joué un rôle sur les fréquences de détections et l'amplitude des deux marqueurs humains, il est aussi documenté que les marqueurs d'ADNmt spécifiques à l'homme peuvent réagir de manière croisée avec des échantillons de source fécale provenant de vache, de porc et de volaille (Ballesté et al., 2010). Par conséquent, dans cette étude, il est difficile d'établir si des matières fécales ou des eaux usées humaines sont présentes ou absentes des échantillons testés négatifs pour le marqueur HF183 mais positifs pour l'ADNmt humain.

En outre, il existe une faible possibilité que des marqueurs d'ADNmt spécifiques aux animaux, en particulier l'ADNmt bovin soient également détectés dans les eaux usées (Malla & Haramoto, 2020). Caldwell et al. (2007) ont montré que l'ADNmt bovin était détecté dans les matières fécales de deux humains sur seize qui consommaient du bœuf. Néanmoins, la concentration élevée du marqueur bovin observée lors de l'épisode sec ou pluvial confirme fortement la contamination bovine dominante au niveau de la prise d'eau.

Les résultats mettent en évidence la pertinence d'utiliser une approche multi-traceurs de marqueurs. En outre, l'utilisation de marqueurs chimiques dans le sous-bassin agricole pourrait être pertinente pour confirmer la contamination des eaux usées avec plus de confiance et de précision. Pour les sources bovines, un candidat idéal pour une enquête plus approfondie est le marqueur Bac-Bovine, qui peut être détecté à des concentrations plus faibles (D. Y. Lee et al., 2010).

5.4.5 Relation temporelle entre la turbidité, pathogènes et les marqueurs moléculaires

La turbidité est un des plus importants paramètres utilisés pour déterminer le changement de qualité de l'eau brute, de l'eau traitée et de l'eau circulant dans les réseaux de distribution (World Health Organization, 2017). Certains événements (p. ex. fonte printanière, fortes précipitations, rejets d'eaux usées, inondations) peuvent entraîner des fluctuations soudaines de la turbidité et des concentrations de pathogènes dans les eaux de surface (Dorner et al., 2007b). Lors d'un évènement de fonte de neige, Sylvestre et al. (2020) ont observé que la dynamique de la turbidité à l'eau brute ne suivait pas celle des virus et des protozoaires étudiés. En revanche, l'activité GLUC était un meilleur substitut que la turbidité pour identifier les pics transitoires de contamination microbiologique. Ce constat a été confirmé par nos résultats puisqu'aucune relation temporelle entre les marqueurs d'eaux usées et la turbidité n'a été observée (Figure 5-1). En effet, le pic de

turbidité de l'eau brute a eu lieu après celui de l'activité GLUC, *E. coli* et les marqueurs moléculaires et chimiques.

Nous avons aussi exploré la relation entre les marqueurs moléculaires et certains pathogènes (voir section 1.3.6) lors des échantillonnages ciblés. La relation la plus forte a été observée à la prise d'eau potable A lors de l'événement A-1. Le marqueur humain HF183 présentait un pic synchrone et une dynamique similaire avec Adénovirus (Figure 5-7c), *Giardia* (Figure 5-7b) et *Cryptosporidium* (Figure 5-7a), ce qui suggère que ces pathogènes sont principalement d'origine humaine. Bien que la présence de pathogènes ait été sporadique et intermittente, chaque fois qu'un pathogène a été détecté, et ce pour tous les événements, le marqueur HF183 a été détecté montrant une concurrence de 100 % (données non présentées). Par conséquent, une augmentation de la concentration du marqueur HF183 pourrait indiquer ou prédire la présence de protozoaires et de virus. Des indicateurs alternatifs tels que les marqueurs de suivi des sources microbiennes spécifiques à l'hôte, ont été utilisés comme substituts possibles pour mieux estimer l'abondance des pathogènes et les risques pour la santé humaine dans les eaux récréatives. Dans une analyse quantitative du risque microbien, une concentration seuil de 4100 copies /100 mL du marqueur HF183 a été estimée représentative d'un risque élevé pour la santé humaine associé à la baignade dans les eaux de surface contaminées par les eaux usées (Boehm et al., 2018). Par ailleurs, Marti et al. (2013) ont étudié les relations entre les *Bacteroides,* les bactéries indicatrices fécales et les pathogènes, ils ont conclu que la présence et l'absence des marqueurs *Bacteroidales* n'étaient pas corrélées aux bactéries indicatrices fécales, mais corrèlent positivement avec des pathogènes tels que *Cryptosporidium* et *Giardia.*

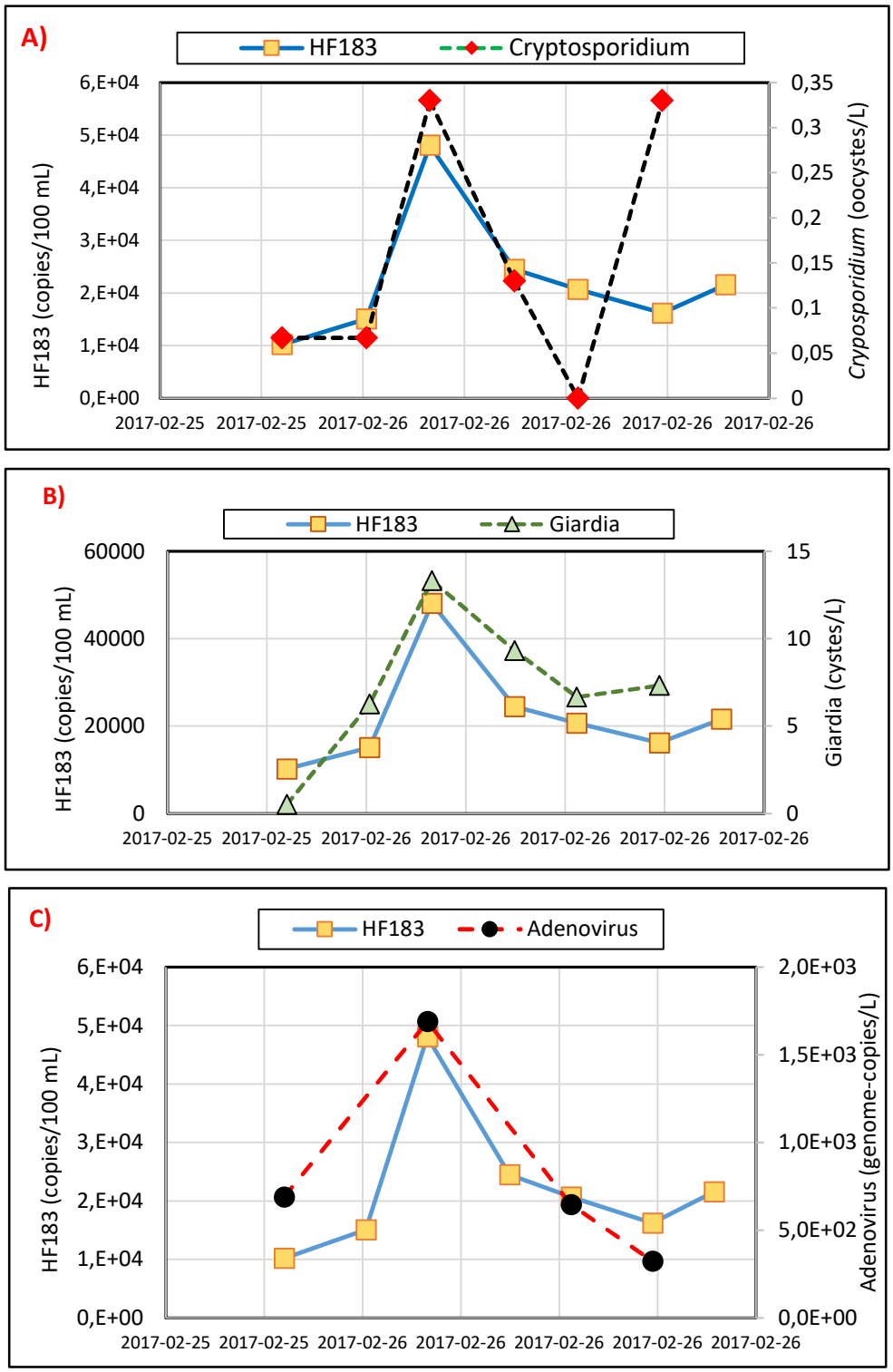


Figure 5-7. Relation temporelle entre le marqueur HF183 and a) *Cryptosporidium*, b*) Giardia* and c) Adénovirus à l'évènement A-1

Des résultats similaires ont été observés dans le bassin versant agricole, l'ADNmt bovin présentait une dynamique et des pics similaires avec les entérovirus et les rotavirus à l'entrée de l'usine d'eau potable (Figure 5-8), ce qui suggère que les virus entériques sont d'origine animale.

Ces résultats suggèrent non seulement que les marqueurs spécifiques à l'hôte peuvent être des prédicteurs efficaces de la présence de certains agents pathogènes, mais ils peuvent également donner un aperçu des agents pathogènes spécifiques à l'hôte qui sont les plus susceptibles d'être présents. Toutefois, des compagnes d'échantillonnage ciblé supplémentaires devraient être effectuées dans différentes conditions environnementales pour confirmer et générer des résultats MST significatifs et précis pour les parasites d'origine hydrique.

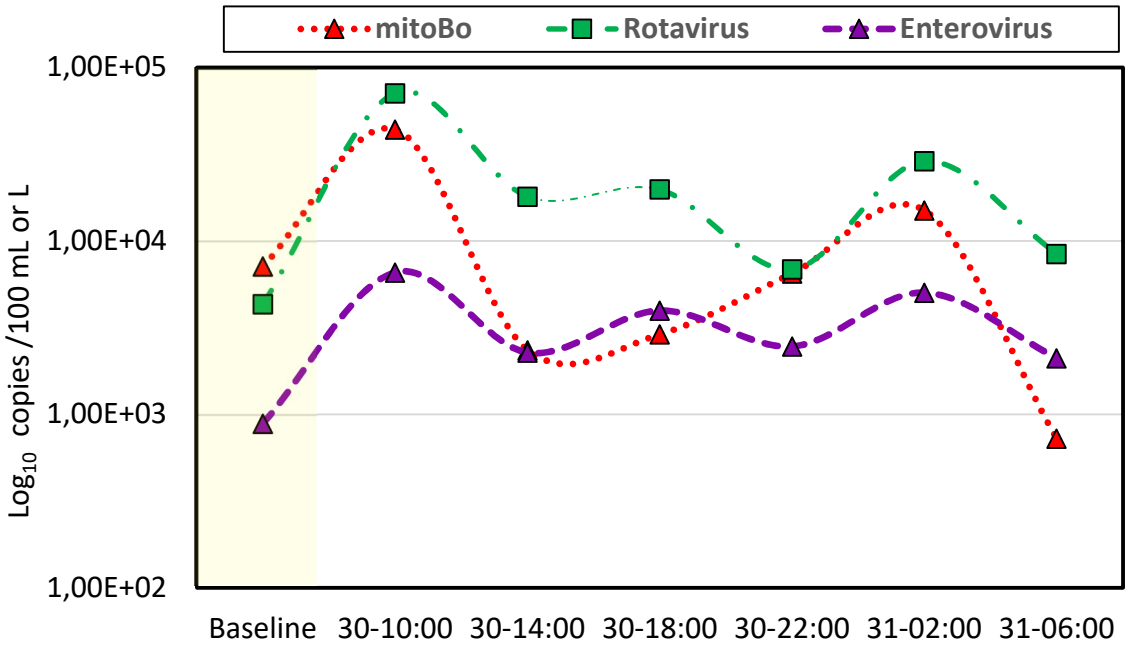


Figure 5-8. Relation temporelle entre l'ADN mitochondrial bovin et les virus entériques

5.5 Conclusions

Les principales conclusions sont les suivantes :

• Le suivi de l''activité GLUC à l'eau brute a été une meilleure stratégie d'échantillonnage des évènements critiques en comparaison avec les conditions hydrométéorologiques.

• Les résultats confirment que les précipitations et la fonte des neiges représentent des périodes critiques pour les prises d'eau potable situées en milieu urbain et agricole.

• L'utilisation simultanée des marqueurs d'origine humaine (moléculaires et chimiques) est pertinente pour le suivi de la contamination de l'eau brute par les eaux usées non traitées.

• HF183, la CBZ et l'ACET étaient les marqueurs associés aux eaux usées les plus performants.

• CAF et THEO étaient plus sensibles aux effets de dilution après les DEUs déclenchées par la fonte des neiges.

• En combinaison avec *E. coli,* L'ADN mitochondrial peut s'avérer être une bonne option à utiliser pour distinguer les sources de contamination dans les bassins versants agricoles.

• Le marqueur HF183 a le potentiel d'être un indicateur de la présence de parasites et de certains virus.

• L'ADNmt bovin était le marqueur le plus performant et a le potentiel d'être un indicateur de la présence d'entérovirus et des rotavirus.

• Les programmes de surveillance de la qualité des sources d'eau devraient être conçus pour échantillonner intensivement pendant et/ou après les événements de pluie et de fonte des neiges afin de déterminer quelles quantités critiques peuvent avoir un impact négatif sur les prises d'eau potable.

CHAPITRE 6 ARTICLE 2: OCCURRENCE AND PARTITIONING BEHAVIOR OF *E. COLI* AND WASTEWATER MICROPOLLUTANTS FOLLOWING RAINFALL EVENT

Article soumis au Journal of Environmental Managment

Mounia Hachad [a]*, Hadis Yarahmadi [a], Sung Vo Duy [b], Sébastien Sauvé [b], Michèle Prévost [a,c], Sarah Dorner [a,d], ,

[a] Civil, Geological and Mining Engineering Department, Polytechnique de Montréal, CP 6079, succ. Centre-Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3A7

[b] Department of Chemistry, Université de Montréal, P.O. Box 6128, succ. Centre-Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3J7

[c] NSERC Industrial Chair on Drinking Water, Civil, Geological and Mining Engineering Department, Polytechnique de Montréal, QC, Canada

[d] Canada Research Chair in Microbial Contaminant Dynamics in Source Waters, Civil, Geological and Mining Engineering Department, Polytechnique de Montréal, QC, Canada

6.1 Abstract

The fate of indicator bacteria and wastewater micropollutants (WWMPs) discharged from wastewater treatment effluents (WWTPs) and combined sewer overflows (CSOs) needs to be understood for the protection of drinking water sources and recreational activities. Contaminants are associated with suspended particulate matter and vary according to hydrometeorological conditions. This study investigated the spatial distribution and partitioning behavior of *E. coli* and 6 WWMPs including acetaminophen, caffeine, theophylline, carbamazepine, 2-hydroxycarbamazepine, and the artificial sweetener aspartame between the water, suspended particulate matter (SPM), and sediments. The study sites were selected along an urban river impacted by multiple CSOs and WWTPs discharge points. Partitioning between water and suspended solids in two WWTP effluents was assessed during dry and wet weather conditions. In

the effluents of wastewater treatment plants, the concentration of total WWMPs adsorbed to suspended particles was 12 to 87 times higher than the dissolved fraction. In the receiving river water, in addition to the aqueous phase, *E. coli* and WWMPs were present in both the suspended particulate phase and sediments, even for WWMPs having low sorption capacity. Acetaminophen, caffeine, theophylline, and carbamazepine showed large distribution and were detected in all matrices. In contrast, 2-hydroxycarbamazepine (CBZ-2OH) and aspartame exhibited a significant level of association with suspended particles, being exclusively detected in SPM and sediments. The mean concentrations ranged from 8.8 ng/L (carbamazepine) to 4656 ng/L (acetaminophen) in the aqueous phase, from 120 (caffeine) to 8441 ng/g dw (acetaminophen) in SPM, and from 2.9 (carbamazepine) to 136 ng/g dw (aspartame) in sediments. The spatial distribution of the contaminants indicated that they persist and reflect the variability of WWTP discharges. When comparing dry to wet weather concentrations, three main patterns were observed depending on the compounds and CSO location: (i) wastewater is diluted by stormwater in the aqueous and SPM phase for compounds with low removal efficiency: CBZ, CBZ-2OH and ASP ; (ii) the particle-associated fraction increased for *E. coli* (from 39% to 59%) and WWMPs with high removal efficiencies : ACET, CAF and THEO (from 12-43% to 42-91%) due to sewage by-passes and in-sewer sediment mobilisation ; (iii) no significant difference was observed for surficial sediment concentrations after rainfall events, although spatial variability was observed. Results highlight the importance of monitoring the SPM phase, especially during wet weather as the aqueous fraction loads could be masked by dilution.

6.2 Introduction

In urban areas, the release of untreated sewage through combined sewer overflows (CSOs) and stormwater discharges during or following rainfall events is the major pathway for the introduction

of waterborne pathogens and wastewater micropollutants (WWMPs) into receiving waters. While waterborne pathogenic microorganisms and organic micropollutants (e.g., artificial sweeteners (ASWs), pharmaceuticals and personal care products (PPCPs)) could represent an important health and environmental risk, the degree and the dynamics of their association to suspended particulate matter (SPM) and bed sediment compartments of aquatic systems is an important factor describing their environmental fate (Droppo et al., 2009). Indeed, partitioning to SPM and later sedimentation of attached bacteria and micropollutants can affect their fate and transport characteristics in aquatic systems as particle-associated pollutants will be less mobile in the environment than their free phase (i.e. unattached). The sorbed phase hinders biodegradation due to reduced bioavailability (Cizek et al., 2008; Boulard et al., 2020; Alexander, 2000). This is especially critical in a water body used as drinking water supply and where recreational activities and human contact take place.

Additionally, partitioning to suspended solids may be even more significant during wet weather flows, given the increases in both microbial, wastewater micropollutants (Phillips et al., 2012) and suspended particle concentrations via surface runoff, sediment resuspension, and mobilization of sediments accumulated in combined sewers during the antecedent drier period (Madoux-Humery et al., 2013; Krometis et al., 2007; Jamieson, R., et al., 2004; Cizek et al., 2008). Moreover, more than 80% of adsorbed pollutants are linked to totals suspended solids (TSS) during rainfall events (Rossi et al., 2005). Recognizing that suspended particles act as vectors of contamination and could be a critical factor for the fate and survival of pathogens and micropollutants in receiving waters, it is of great interest to consider both aqueous and particulate phases including sediments in monitoring programs for a more comprehensive source and fate studies of pollutants in the environment. However, except for trace metals, and hydrophobic pollutants (e.g., PCBs, PAHs) (Feng et al., 2017), most studies of wastewater treatment plant (WWTP) discharges and river water

have focused only on the aqueous phase. WWMP sorption to suspended particulate matter and sediments have received less attention owing to their perceived hydrophilic nature (Aminot et al., 2018). Few studies reported the concentration of PPCPs/ASW measured in this study in both dissolved and suspended solid phase for influent and/or effluent (Darwano et al., 2014; Subedi & Kannan, 2014; J. Wang et al., 2018) or surface water (Aminot et al., 2018; Boulard et al., 2020; Lahti et al., 2011; Wilkinson et al., 2017; da Silva et al., 2011) . Meanwhile, THEO and CBZ-2OH have never been studied in wastewater particulate phase.

To adequately characterise the fate of fecal bacteria and WWMPs in the environment, monitoring campaigns should combine temporal and spatial trend analysis to better understand the effects of watershed conditions such as variable temperature, river hydrometeorology, or pH, to determine the sources of contamination. Despite growing research on spatial and temporal distribution, studies are often conducted using grab sampling methods at a limited number of locations. Reasonable spatial and temporal dynamics at each location should be considered.

Recently, PPCPs and ASWs have gained more interest as potential sewage markers due to their specificity to sources of human pollution as compared to traditional fecal indicators including *Escherichia coli* (Lim et al., 2017). As such, similarities or dissimilarities in the partitioning behavior of indicator organisms and WWMPs may have an impact on the suitability of a particular indicator to act as a fecal marker and few studies have simultaneously examined the dynamics of partitioning behaviour of bacterial and chemical fecal indicators and markers. The purpose of this work was therefore to 1) characterize and compare the partitioning behavior of *Escherichia coli* and wastewater micropollutants under both wet and dry weather conditions, 2) determine the field partition coefficients of the pharmaceuticals and to identify potential controlling factors and 3) investigate the spatial dynamic and temporal changes in *E. coli* and WWMPs following rain events.

The results of this work should improve understanding of the behavior and transport mechanisms of microbial and WWMPs in surface waters and sediments and provide critical inputs in fate and transport models designed to track sources of pathogens and micropollutants transport in aquatic systems.

6.3 Material and Methods

6.3.1 Study area description

Located in the province of Quebec, Canada, the studied river counts 6 drinking water intakes (DWIs) and represents the main source of drinking water for ~ 600,000 people. From its source, in the west, to its mouth into the east, the river runs through approximately 42 kilometers, its immediate catchment area drains a territory of 1,018 km^2. The water quality of the river is strongly influenced by urban discharges, although agricultural activities cover 45% of the territory. The river receives the discharges of 194 CSOs (157 on the north shore and 37 on its south shore) and 14 WWTPs with nine outfalls located upstream of DWIs. Thus, the river is classified as among the most microbiologically contaminated in the province of Québec, particularly during wet weather.

6.3.2 Sample collection and processing

In total, 96 water and sediment grab samples were collected under dry (background) and wet weather conditions for a total of 288 analyses (aqueous + particulate phases). Background (dry) conditions were defined as at least 2 days without appreciable precipitation (<3 mm) whereas wet sampling events were characterized as days with cumulative rainfall >10 mm prior to sample collection. A total of four events were carried out for this project. Two dry weather events (one in July 2014 and the second in September 2017) and two wet weather events (October and November 2017). The first dry event sampling occurred in July 2014 was conducted over 2 separate days

while the follow up events only required a single day sampling. The date, river flowrates and cumulative rainfall during or prior to the sampling period are presented in Supplementary Data (Annexe C, Table S1).

All samples were collected from downstream to upstream. Twelve water and twelve sediment samples were collected along the river sides during each event. The sampling locations are shown in Fig 6-1 and correspond to samples collected upstream and downstream WWTPs outfalls (discharge), downstream CSOs outfalls, one sample at the entrance and one sample at the end of the river.

For each location, water samples were collected in 5L polypropylene containers for WWMPs analysis, and in 250 mL sterilized polypropylene bottles for and *E. coli* enumeration. As for the sediment, 5 cm of surficial sediment was collected using a hand core sampler and placed in 100 mL sterile container (Guerineau et al., 2014). Samples were then stored on ice or ice packs and transported immediately to the laboratory.

For sediment samples, 10 g in duplicate were used for *E. coli* enumeration. Sediments were also frozen at −20 °C and later freeze-dried, ground, and sieved to separate the fraction of particles smaller than 80 µm ($f_{<80\mu m}$). Sieved samples were stored at −20 °C prior to WWMPs analysis, using a sample intake of 500 mg.

In order to determine the contribution of WWTP discharges to the river and better discuss and understand the fate and transport of pharmaceuticals and artificial sweetener monitored in river samples during dry and wet weather; wastewater final effluent of two wastewater treatment plans (WWTP1 and WWTP2) located at south river were investigated in dissolved and particulate phase respectively (Fig 6-1).

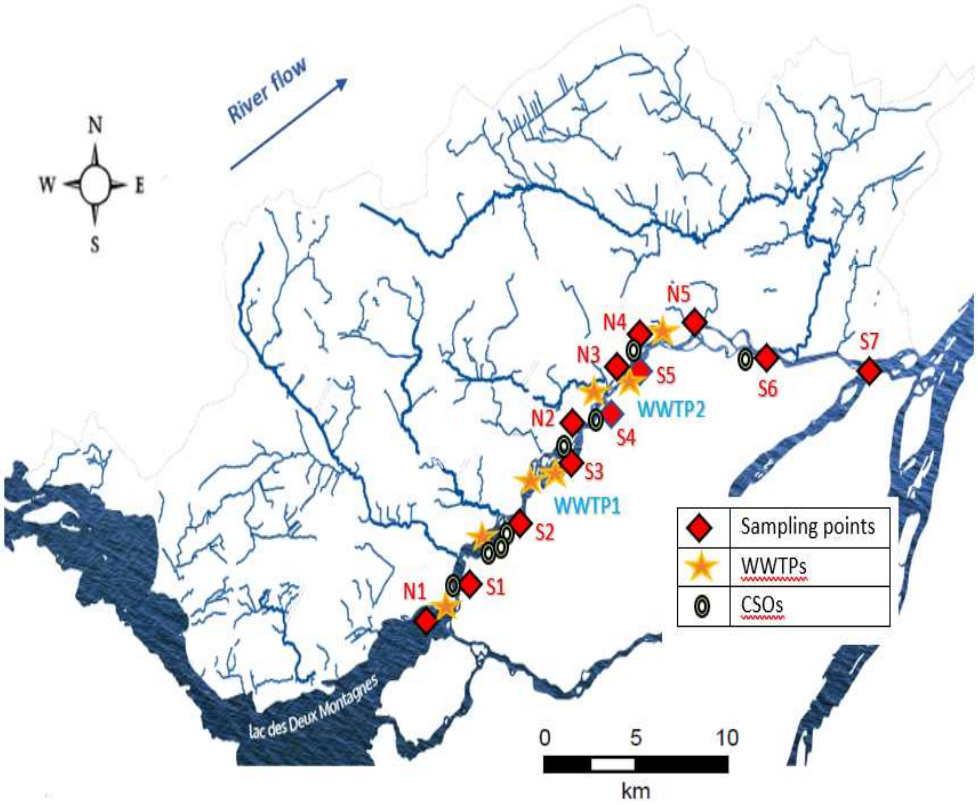


Fig. 6-1. Sampling locations along the river shores. Only some upstream CSOs and WWMPs are presented in this map

6.3.3 Surface water partitioning and pre-treatment process

Upon returning to the lab, and prior to analysis, each sample container/bottle was slowly inverted several times for homogenization purposes. For the quantification of dissolved and particulate phases of WWMPs, the same approach and methodology of our previous work was followed (Yarahmadi et al., 2018). Briefly, the 5L river water samples were immediately filtered through 2.6 µm and 0.3 µm pore size filters until the filters clogged (between 350 mL to 4L depending on the sample). To avoid biodegradation, filtrates were kept at 4 °C and analyzed within 24 h , meanwhile, the filters were dried at 30 °C overnight, re-weighed and stored at 4 °C

before ultrasonic solvent extraction or frozen at −25 °C if the analysis was not performed within the next few days.

Since the characteristics of suspended particles may vary depending on water systems, a standard method to partition between free living (FL) and particle-associated (PA) bacteria is currently nonexistent (Fang et al., 2018). It should be noted that the definition of free living bacteria may also include those partitioned to very small particles or bio-flocculated cells (Soupir et al., 2008). Whereas, a variety of techniques have been used to assess microbial partitioning, filtration techniques have been widely used (Garcia-Armisen et al., 2009; Mahler et al., 2000; Henry, 2004; Qualls et al., 1983; Soupir et al., 2008; Fang et al., 2018; Bižić-Ionescu et al., 2015; E. Walters et al., 2013). The operational distinction between free-living (FL) and particle-associated (PA) bacteria relied on a (1-10 µm) pore-size filtration (G. Liu et al., 2013), hence differents pore sizes (1.2 µm, 3 µm, 5 µm, 8 µm) filtration were used (Henry, 2004; Mahler et al., 2000; Soupir et al., 2008; Rösel et al., 2012; G. Liu et al., 2013; Parveen et al., 2011; Garcia-Armisen & Servais, 2009). For the purpose of this study, we selected the 8-µm nitrocellulose filter to separate particle attached fractions, since a typical bacteria cell is 1.1 to 1.5 µm wide by 2 to 6 µm long (*E. coli*). The partitioning process was as follows: the water samples were passed through an 8 µm filter to extract the particle-associated *E. coli*. The filtrate was processed and enumerated as the unattached or free-living *E. coli*, while the unfiltered sample was processed and enumerated as the total *E. coli* concentration (i.e., both attached and unattached bacteria). The difference between the total and the free-living fraction was considered as the attached fraction.

6.3.4 Wastewater micropollutants analysis

Both dissolved, particulate and the *f*<80µm sediment fractions underwent analysis for acetaminophen (ACET), caffeine (CAF) and its metabolite theophylline (THEO), carbamazepine

(CBZ) and its metabolite: dihydro-carbamazepine (CBZ-2OH) and finally the artificial sweetener aspartame (ASP). The wastewater micropollutants in the dissolved phase were measured by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization and tandem mass spectrometry (SPE-LC-APCI-MS/MS). The WWMPs in particulate fraction and sediments were measured using LDTD-APCI interface developed and manufactured by Phytronix Technologies (Quebec, Canada). Before each LDTD-APCI-MS/MS analysis, an ultrasonic solvent extraction and sample clean-up were performed. Extraction procedures, instrumental methods, and quality assurance/quality control are fully described by (Yarahmadi et al., 2018).

6.3.5 Fecal indicator (*E. coli)* and physico-chemical analysis

For *E. coli*, sediment, raw water (total concentration), free floating (unattached) were analysed following the standard regulatory method developed by the Quebec Environmental Ministry Laboratory (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2009) which involved using the Colilert® Quanti-Tray®/2000 system (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine). The results produce positive and negative series from which a most probable number (MPN) of colony forming units can be determined. The measurement of *E. coli* in sediment samples was performed as described by (Guerineau et al., 2014) with a slight modification in that 10 g of wet sediment mass was used instead of 5g. Sediment concentrations are expressed as MPN per gram of dry weight and the limit of detection (LOD) was 0.51 MPN/g dw. Total suspended solids (TSS) were determined by Standard Method 2540D (American Public Health Association et al., 1997). Total, dissolved organic carbon in water samples and fraction of organic carbon (f_{OC}) in sediment were analysed using standard methods (see Table S2 in Annexe C).

6.3.6 Statistics

Statistical analyses were carried out with STATISTICA software (version 13). Normality of the variables was tested with a Shapiro-Wilk W test. Given that the majority of raw and log10 transformed data were not normally distributed, non-parametric tests were performed. Kruskal-Wallis ANOVA statistical test was used to assess differences and characterize variability between dry and wet weather concentrations. Nonparametric Spearman correlation test was also applied to describe covariations and correlation between FIB and WWMP concentrations. The significance level was set to alpha = 5% for all statistical analyses. EPA's ProUCL software (Singh and Maichle, 2013) was used to impute values below the limit of detection.

6.4 Results and discussion

6.4.1 Occurrence of WWMPs in dissolved and suspended particulate matter in wastewater effluents

Individual concentration of dissolved (µg/L) and particulate WWMPs (ng/g dw) measured in treated effluent (WWTP1 and WWTP2) during one sampling dry event are summarized in Table 6-1. The results showed that out of six PPCPs investigated, four were detected in all dissolved effluents in the order of ACET > CAF ~ THEO > CBZ at concentrations ranging from 0.1 µg/L (CBZ) to 29.9 µg/L (ACET). CBZ-2OH and ASP were below detection limits (0.09 and 0.012 µg/L respectively) for both wastewater treatment plant effluents studied. Interestingly, all compounds were detected in the effluent SPM, showing high affinity to suspended particulate mater. The concentration of total PPCPs adsorbed to suspended particles in the two WWTPs was 12 to 87 times higher in SPM effluent compared to the dissolved phase. The fraction of total mass of WWMPs adsorbed to SPM was on average in the order of acetaminophen (71%), carbamazepine (13%), CBZ-2OH and aspartame (5%) and finally theophylline and caffeine with 3 and 2%,

respectively. The primary effluent of WWTP1 was also analysed (Annexe C, Table S3) on one occasion in order to have additional information on primary treatment as bypasses of WWTP1 are typically primary effluents discharging into the receiving river (when the amount of wastewater influent exceeds the capacity of treatment plant). The concentration of total PPCPs per gram of suspended particles in the two WWTPs was twice higher in the WWTP effluents as compared to the primary effluent. The results were in agreement with those found for steroids in the same WWTPs by (Yarahmadi et al., 2018) and (Darwano et al., 2014). Although the WWTPs were efficiently removing most of large, suspended solids (Annexe C, Table S4) by primary sedimentation and biofiltration (>90% TSS removal), the smaller particles with greater specific surface area found in the effluent seem to have a higher load of pharmaceuticals compounds. The concentration of CBZ partitioned to SPM was always much higher than its metabolite, which was expected giver that 2OH-CBZ it's not the main metabolite for CBZ. On the other hand, theophylline showed a similar distribution to the parent compound (caffeine).

For SPM effluents, the concentration found in this study were much higher in comparison with those found previously for ASP (J. Wang et al., 2018; Subedi & Kannan, 2014). In fact, our result confirms the finding of (Petrie et al., 2015; Baker et al., 2013) that highlights the importance of particulate phase in routine monitoring. Indeed, in this study, partitioning to SPM was high. For example, CBZ, 2OH-CBZ and ASP with the analysis of only the aqueous phase would under-report the real concentrations and fate in the water column. Moreover, ACET which is reported to be really more hydrophilic and biodegradable (Čelić et al., 2019; Fairbairn et al., 2015) is detected at high levels in the SPM fraction.

Table 6-1 Concentrations of WWMPs in dissolved (µg L^{-1}) and particulate phase (adsorbed to SPM: ng/g dw) in final effluent from two WWTPs. ND-not detected, LOD = limit of detection

Compound	**WWTP1**		**WWTP2**		**Literature data**	
	Dissolved	**SPM**	**Dissolved**	**SPM**	**Dissolved**	**SPM**
	(µg/L)	(ng/g dw)	(µg/L)	(ng/g dw)	(µg/L)	(ng/g dw)
ACET	29.9	33613.2	16.0	33648.1	Up to 0.04[a] /11,7[b]	LOD-25.3
CAF	16.0	1270.0	4.3	601.8	13.8-34.4[c]	16.7-815
THEO	15.3	1383.9	4.3	1467.6	0.02	-
CBZ	0.1	10839.9	0.1	2502.9	0.26[c]/up to 3.1	LOD-8.85
CBZ-2OH	< LOD	4053.4	< LOD	1410.2	< LOD/ up to 0.05[f]	-
ASP	< LOD	4148.0	< LOD	1353.0	0.08[e]/ ND[d]	-

(Daneshvar et al., 2012)

(Y. Wang et al., 2018)

(Petrie et al., 2015)

(Darwano et al., 2014)

(Subedi & Kannan, 2014)

(Leclercq et al., 2008)

6.4.2 Occurrence and concentration of *E. coli* and WWMPs in river water

A summary of individual concentration (mean and maximum) and frequency of detection determined of *E. coli* and the 6 targeted wastewater micropollutants in surface water (aqueous phase and suspended particulate matter), measured in dry weather and following rainfall are listed in Table 6-2. Overall, all WWMPs found in river waters were also present in WWTP effluents. Lower concentrations were observed in river waters pointing to WWTP discharges as important sources of these contaminants with dilution in the river (Daneshvar et al., 2012).

6.4.2.1 Aqueous phase

Four of the six WWMPs analysed were present in the dissolved phase in dry weather conditions, namely CAF, THEO, CBZ and ACET. ACET and CAF were detected at all sampling sites. Similarly, CBZ and THEO showed high occurrence with respectively 96% and 75% of samples above detection limits. ACET exhibited the highest mean and maximum concentrations with 4465 and 10 500 ng/L respectively, followed by CAF and its metabolite THEO with mean concentrations of 275 and 116 ng/L, respectively. CBZ had the lowest mean concentration with 8.8 ng/L. Dissolved 2OH-CBZ and ASP were not detected in dry weather which concurs with the absence of any detectable levels of these compounds in WWTP effluents. The results measured in dissolved phase are in good agreement with previous studies with regard to prevalence and occurrence in surface water (da Silva et al., 2011; Fairbairn et al., 2015; Lv et al., 2014) . The detection frequency and concentration of ACET, CAF/THEO and CBZ found in this study were higher, although within expected ranges with regard to levels found in WWTP effluents studied. Concentrations reflect the high consumption of stimulant and analgesic pharmaceuticals in the urban catchments and the low degradation rate of CBZ. Further, the lack of detection of aspartame in aqueous environmental matrices has also been reported in other studies (Berset et al., 2012; Scheurer et al., 2009).

6.4.2.2 Suspended particulate phase

In contrast to the aqueous phase, all target compounds were detected in the SPM under dry weather conditions. The most hydrophobic compounds, CBZ and its metabolite 2OH-CBZ (log K_{ow} 2.45 and 1.42), showed the most affinity for SPM with detection frequencies of 75% and 71% and average concentrations of 412 and 514 ng/g dw, respectively. The other compounds (CAF, THEO, ACET, ASP) although more hydrophilic with low sorption affinities (see Table 6-2) were found at relatively similar detection frequencies ranging between 67 and 71%, suggesting their widespread occurrence in SPM. In fact, the highest mean concentration determined was for ACET with 942 ng/g dry weight (dw). The concentrations of ACET and CBZ bound to SPM measured in dry weather were slightly higher than previous studies by (da Silva et al., 2011; Darwano et al., 2014; Azuma et al., 2017) and in the same range of steroid hormones studied in the same river (Yarahmadi et al., 2018).

Table 6-2. Occurrence of *E. coli* and WWMPs in aqueous (ng/L), suspended particulate matter and sediment matrices

	Dry weather (n= 24)			**Wet weather (n= 24)**		
	Aqueous/dissolved phase (ng/L)					
Compound	**Mean ± SD**	**Max**	**% DF**	**Mean ± SD**	**Max**	**% DF**
E. coli (MPN/100 mL)	119± 366	663	100%	309 ± 474	2382	100%
CAF	275 ± 405	1180	100%	23 ± 8.0	32	38%
THEO	116 ± 54	228	75%	52± 23	93	38%
CBZ	8.8 ± 7.1	28.2	96%	3.1 ± 0.7	3.9	38%
20H-CBZ	N. D	N. D	-	N. D	N. D	-
ACET	4465 ± 2666	10500	100%	< LOQ	< LOQ	-
ASP	N. D	N. D	-	N. D	N. D	-
TSS (mg/L)	6.3 ± 3.7	2.1-16.6	-	11 ± 7	3.9-39	-
	Suspended particulate phase (SPM)					
E. coli (MPN/100mL)	635 ± 830	328	100%	574± 1125	5319	100%
CAF	120± 11305	602	67%	1186 ± 1410	4415	88%
THEO	127 ± 2583	1468	67%	2110 ± 3390	12155	92%
CBZ	412± 556	2503	75%	132± 344	1574	17%
20H-CBZ	514 ± 472	1627	71%	156 ± 292	1436	75%
ACET	942 ± 8328	5176	71%	8414 ±10507	45082	100%
ASP	260 ± 283	1353	71%	N. D	N. D	-
	Sediment					
E. coli (MPN/g dw)	577 ± 1531	6031	100%	216 ± 426	1847	100%
CAF	109 ± 241	752	42%	157 ± 257	949	96%
THEO	6.6 ± 14	93.2	33%	5.3 ± 5.9	28.5	58%
CBZ	2.9 ± 9.4	18.9	58%	7.0 ± 12	53.9	92%
20H-CBZ	40 ± 59	368	54%	3.1 ± 3.9	16.2	17%
ACET	28 ± 62	150	75%	32 ± 81	396	58%
ASP	136± 172	1023	67%	14 ± 21	109	79%

6.4.2.3 Influence of rainfall events

Weather conditions influenced the concentrations and the frequency of detection in the aqueous and particulate phases in river samples (Table 6-2). In the aqueous phase, concentrations of WWMPs decreased significantly (Kruskal-Wallis ANOVA, $p < 0.05$) following the end of the heavy rains. ACET, despite being present during dry conditions was below the detection limit after rainfall events. CAF, THEO and CBZ exhibited concentrations 2 to 12 times lower during wet concentrations as compared to dry conditions, with a detection frequency as low as 38%. Indeed, measured concentrations of CAF decreases on average from 275 ng/L to 23 ng/L, from 116 ng/L to 52 ng/L for THEO and from 8.8 ng/L to 3.1 ng/L for CBZ. Dissolved 20H-CBZ and ASP were also not detected in wet weather.

Similar to the dissolved phase, the suspended particulate phase was also influenced by short-term variation of stream flow and fresh input occurred in wet weather conditions. Maximum and average concentrations in wet weather flows were higher than in dry weather, except for CBZ and CBZ-2OH, which had concentrations that decreased after rainfall events. Aspartame was not detected at any of the sampling sites (see suspended particulate matter in Table 2). The high detection frequency of CBZ-2OH in SPM (75%) as compared to CBZ (17%) is worth highlighting, possibly because CBZ-2OH is one of the metabolites of CBZ. Hence, a decrease in the concentration of CBZ may increase the concentration of CBZ-2OH. After rainfall occurs, the concentration of suspended solids, *E. coli*, ACET, CAF and THEO partitioned to SPM, were significantly higher (Kruskal-Wallis ANOVA, $p < 0.05$), ultimately approaching or exceeding concentrations of untreated sewage (primary influent) at some locations across the river. Thus, ACET, CAF and THEO were detected at 100%, 92% and 88 %, respectively. The highest average concentrations were for ACET 8414 ng/g (up to 45082 ng/g dw) followed by THEO with 2210 ng/g (up to 12152 ng/g dw) and finally CAF with mean concentration of 1187 (up to 4415 ng/g dw). *E. coli* attached to the SPM displayed similar behavior to WWMPs with

mean concentration increasing from 62.5 to 574 MPN/100mL with a maximum of 5319 MPN/100 mL (Table 6-2). Interestingly, *E. coli* in the aqueous phase had the opposite behavior as WWMPs with mean concentrations relatively similar.

The variation in concentrations of the WWMPs and *E. coli* in surface water under wet weather is likely to be due to sewer overflows during the heavy rain event. On rainfall events sampling period in this study, 4 documented CSO events occurred on the sampling days along the southern shore (communication MDDEFP). Although CSO events occurred on the north shore of the river, information was not available with regards to the specific times of their occurrences. The increase in the particulate fraction in wet weather may be attributed to either the resuspension of the CSO's sewer deposits or the attachment/sorption of free floating/dissolved *E. coli* and WWMPs to an increasing suspended solid from raw wastewater or runoff. Thus, the lower concentrations of dissolved WWMPs observed during wet weather might be the result of dilution and/or adsorption on suspended solids or on sewer deposits. TSS showed similar behavior with elevated wet weather concentration from 4.5 to 11.3 mg/L with a maximum of 39.2 mg/L. Meanwhile, spearman rank correlation showed a good correlation ($R \geq 0.50$, $p<0.05$) between TSS, *E. coli*, CAF, THEO and ACET (Table 6-3). *E. coli* was also significantly positively correlated with THEO, CAF and ACET. Co-occurrences and positive correlations among *E. coli* and WWMPs would be expected for compounds with similar sources and transport.

Table 6-3. Spearman correlation rank of *E. coli* and wastewater micropollutants partitioned to suspended particulate matter. Red bolded Spearman values are significant at $p<0.05$

ALL=48	*E. coli*	CAF	THEO	ACET	CBZ	CBZ-2OH	ASP
CAF	**0.75**						
THEO	**0.78**	**0.91**					
ACET	**0.52**	**0.79**	**0.82**				
CBZ	-0.23	-0.03	0.10	0.14			
CBZ-2OH	**-0.59**	**-0.44**	-0.40	-0.10	**0.46**		
ASP	-0.43	0.15	0.15	0.36	0.19	0.39	
TSS	**0.50**	**0.53**	**0.60**	**0.58**	0.07	-0.23	0.09

Our results are consistent with the conclusions of (M. Williams et al., 2009; Benotti & Brownawell, 2007): for micropollutants that are not usually removed by treatment, concentrations can decrease during times of CSOs in both aqueous and particulate phase because of the dilution by large runoff volumes. This was the case for ASP with 68.2% removal efficiency (Subedi & Kannan, 2014) and carbamazepine and its metabolite 2OH-CBZ with removal rate (< 40%) in conventional wastewater treatment plants (Benotti & Brownawell, 2007; Kasprzyk-Hordern et al., 2009). In contrast, WWMPs that have high removal during wastewater treatment, bypassing treatment increases their concentrations to receiving waters flows compared to treated WWTP flows. ACET, CAF are frequently used as markers for untreated wastewater because they have (along with THEO) a reasonable removal efficiency ranging from 80 to 100% (Kasprzyk-Hordern et al., 2009; K. He et al., 2018). In this study, the particulate fraction investigation, shows that conversely to (Benotti & Brownawell, 2007), ACET does not increase in the aqueous phase. Micropollutants with higher removal rates in the WWTPs also showed higher (i) affinity to adsorption on solid phase and (ii) mobilization in wet weather associated with partitioning and the washout of sediments in combined sewers.

Similar findings were reported earlier where highly soluble acesulfame was diluted by inflow during wet weather (Tolouei et al., 2019). They concluded that soluble and degradable WWMPs could be diluted and that WWMPs that accumulate in sewer sediments could see concentrations increase with the addition of stormwater as increased flowrates lead to sediment resuspension. Moreover, theophylline, caffeine and acetaminophen had been measured at high concentrations in combined sewer sediments as compared to CBZ (Hajj-Mohamad et al., 2014).

6.4.3 Occurrence and concentration of *E. coli* and WWMPs in surficial sediments

The occurrence in surficial sediments in the river was similar to those of suspended solids; thus, all compounds were detected. Nevertheless, concentrations of WWMPs were about in average 3 to 120 times lower as compared to the corresponding concentrations in SPM samples (Table 6-2). In dry weather, the most frequently detected compounds were ACET (75%), aspartame (67%) and carbamazepine/2OH-CBZ with 58 and 54% respectively. Mean concentrations measured were 27.7 ng/g dw for acetaminophen, 136 ng/g dw for aspartame, and 39.5 ng/g for 2OH-CBZ. Similar to SPM, mean *E. coli* measured in sediment fall within the low range of reported *E. coli* concentrations in river sediment (Guerineau et al., 2014; Pachepsky et al., 2011) with 577 MPN/g dw and a maximum of 6031 MPN/g. No significant differences in concentration were observed in wet weather (Kruskal-Wallis ANOVA, $p>0.05$) for (ACET, CAF, THEO and CBZ). The detection frequency increased in wet weather up to 96 and 92% for CAF and CBZ respectively. 20H-CBZ and aspartame exhibited different behavior in wet weather, showing a significant decrease of concentrations at sampling sites.

6.4.4 SPM-water and Sediment-water partitioning coefficient pattern under dry and weather condition

Based on the above results for river samples, we determined field-based Log partitioning coefficient (Log Kd) values for *E. coli* and wastewater micropollutants detected in both the aqueous and solid phases.

Average Log K_d values in the suspended matter-water and sediment-water systems are presented in (Table 6-4**).** SPM-water was on average relatively similar ranging from 3.0±1.6 (ACET) to 3.9±1.6 (L/Kg) for CBZ. CAF had a similar partitioning coefficient to THEO in the SPM-water system, yet CAF showed a greater tendency to sorb to sediment than its metabolite THEO and ACET by more than one order of magnitude with a K_d of 3.1±1.3 (L/Kg). The WWMP sorption affinity was relatively similar among SPM and sediment water distribution, hence the partitioning pattern was as follows: CBZ>CAF~THEO>ACET in suspended matter and CAF>CBZ>THEO>ACET in sediment. Similar dynamics in both SPM and sediment water suggest similar composition in the river section. Due to the low concentrations in sediments, the sediment-water partitioning coefficient was significantly lower as compared to suspended particulate matter for CBZ, THEO and ACET (ANOVA, $p<0.05$). The finding was in agreement with other studies (Feng et al., 2017; Hajj-Mohamad et al., 2017) suggesting that suspended particulate matter with smaller particle size had higher specific area and organic matter content and consequently shows more sorption affinity. Interestingly, *E. coli* had significantly higher sediment-water partition which suggests sediments act as a reservoir in the river studied at some sampling sites. Survival and persistence of *E. coli* in sediments is strongly influenced by particle size and suitable organic substrate. Slower die-off of *E. coli* was demonstrated in sediments containing larger amounts of clay and silt particles. Moreover, biofilm formation can increase the survival of bacteria in sediments (Pachepsky & Shelton, 2011).

Table 6-4. *E. coli* and wastewater micropollutants Log partitioning coefficient Kd in suspended particulate matter and sediment

Compound	SPM-water Log Kd	Sediment-water Log Kd	Log Kow	Solubility (mg/L)	Pka	Literature Log Kd	
E. coli	1.4 ± 1.3	2.1 ± 3.4	-	-	-	1.6-5.2[b]	-
ACET	2.9 ± 1.2	1.4 ± 0.9	0.46[a]	14000[a]	9.4	3.3-5.0[b] -2.2 [b. d]	2.5-3.0[c] -2.4 [c. d]
CAF	3.8 ± 1.5	3.1 ± 1.3	-0.07[a]	21600[a]	14	4.7-5.0[b] 0.3[b. d]	1.2-1.9[c] 0.0 [c. d]
THEO	3.6± 1.1	1.8 ± 0.6	-0.02[a]	7360[a]	8.8	4.0-4.6[b] -0.9[b. d]	1.5-1.6[c] -0.1[c. d]
CBZ	3.7 ± 1.1	2.9 ± 0.7	2.45a	17.66[a]	13.9	1.8-4.4[b] 1.2-1.6[b] 4.3-4.9[b]	1.5-2.1[c] -0.1[c. d] 1.1-1.9[c]
2OH-CBZ	N/A	N/A	1.42[a]	109.9[a]	10.3	n. d [b] -	- -
ASP	N/A	N/A	0.07[a]	564.7[a]	7.3	3.7[e]	-

EpuiSuite and NCBI experimental Database, [b] Suspended particulate matter, [c] Sediment, [d] Laboratory experiment, [e] Wastewater influent

(Azuma et al., 2017), (da Silva et al., 2011), (Lara-Martín et al., 2014a), (Cantwell et al., 2016), (Hajj-Mohamad et al., 2017), (Subedi et al., 2014)

(Jamieson et al., 2005). DW &WW = dry weather & wet weather. N/A=not applicable, n.d =not detected

As ASP and 20H-CBZ were not detected in aqueous phase; the partitioning coefficient could not be measured which suggests high sorption affinity to the solid phase and consequently, a high partitioning coefficient. However, the amount of 2OH-CBZ and ASP associated with river water suspended particles and sediments was compared by measuring partitioning coefficient in the particulate phase and sediment ($Kp = C_{SPM}/C_{Sed}$). As expected from measured concentrations in both SPM and sediment, the Kp for CBZ-2OH was ~ one order of magnitude higher in SPM than ASP in dry conditions with Kp values of 4.2±0.7 and 3.4±0.6 respectively.

A temporal dynamic of Log K_d was clearly observed in (Fig 6-2) as the partitioning to SPM increased significatively in wet weather (ANOVA, $p< 0.0001$) for all contaminants except for CBZ. The highest increase of Log K_d was observed for CAF in both SPM and sediments from 2.3±0.9 to 4.5±0.3 (12% to 91% in SPM fraction) and from 2.5±1.2 to 4.2 ±0.4 (L/Kg) respectively followed by ACET from 1.7±0.6 to 4.4±0.2 in SPM (2% to 81%) and from 0.6±0.4 to 1.9±0.5 in sediments. *E. coli* exhibited a different temporal pattern in sediment-water distribution (Fig 6-3) with K_d significantly decreasing in wet weather. During wet weather, storm water runoff, and CSO loads mix with river water with higher flowrates. Processes such as dilution, turbulence, sedimentation, sediment re-suspension strongly influence the partitioning dynamics. Thus, the variation of K_d for WWMPs, is essentially driven by variations of in-stream aqueous and particulates phases rather than sediments because sediments concentrations were relatively stable between wet and dry weather. However, for *E. coli*, the resuspension of sediments and thus the associated *E. coli* might contribute to the observed K_d changes.

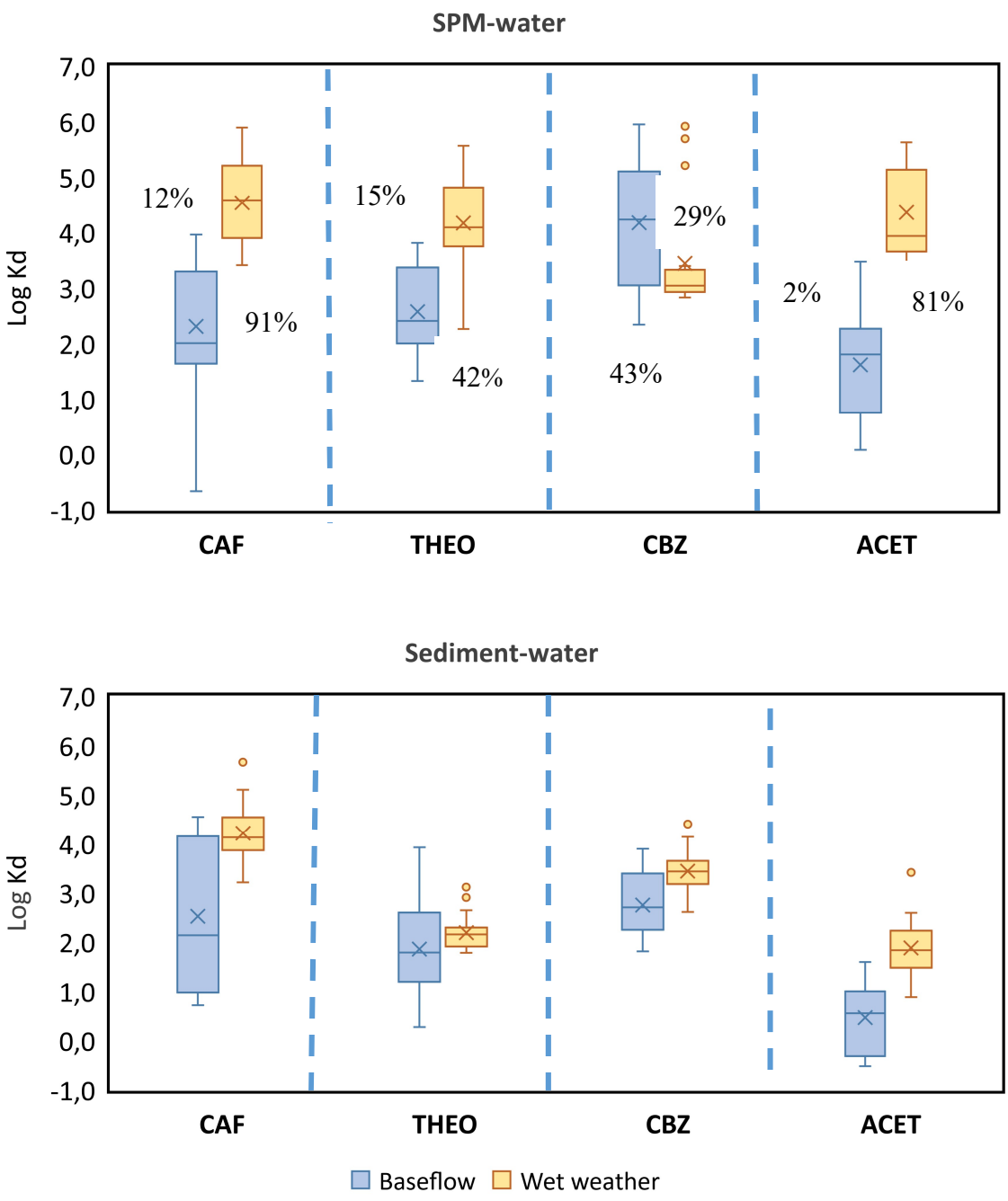


Fig 6-2. Temporal dynamics of field Log K_d for WWMPs detected in water, SPM and sediment across the study sites. The square indicates the attached fraction (%) in both background and wet weather conditions

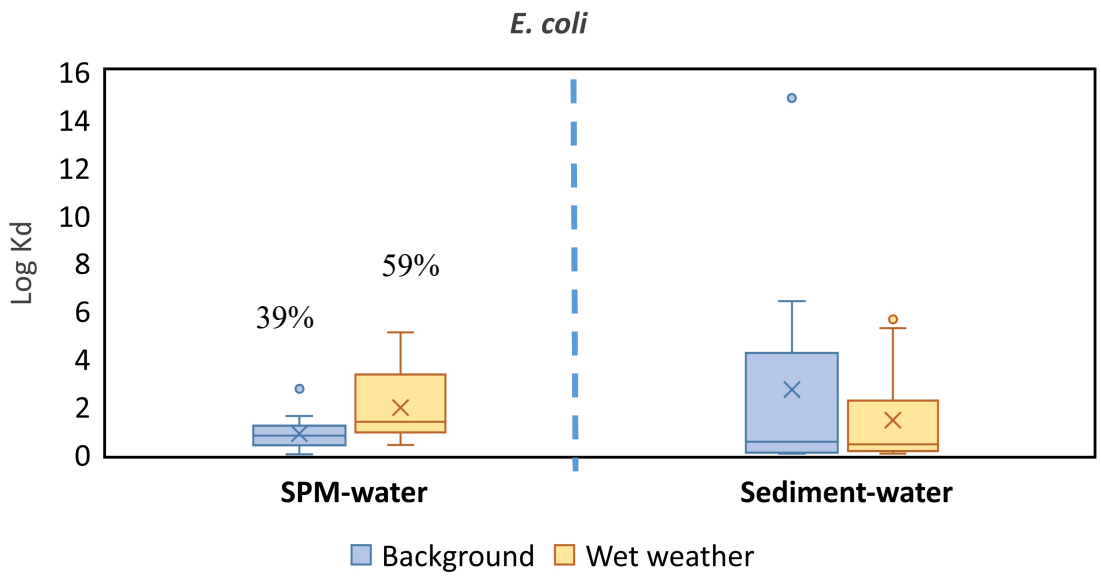


Figure 6-3. Temporal dynamics of field Log K_d *for E. coli* detected in water, SPM and sediment across the study sites. The square indicates the attached fraction (%) in both background and wet weather conditions

The log K_d values obtained were compared with values in the literature (Table 6-4), few studies have reported field-based partitioning of pharmaceuticals to both suspended matter and sediments under similar hydrometeorological variation in river water. The K_d for *E. coli* were within the range of suspended particulate distribution coefficients found by (Jamieson et al., 2005). da Silva et al. (2011) investigated the partition of 43 pharmaceuticals including CBZ and ACET between water, suspended solids, and sediments from a river and reported SPM-water partition coefficient ranging from 3.3-5.0 and 1.8-4.1 (L/Kg) respectively for ACET and CBZ, which was on average in agreement with our values. Cantwell et al. (2016) deployed sediment traps to investigate partitioning of active pharmaceuticals in natural waters and found a median SPM-water K_d of CBZ ranging between 1.2 and 2.6 up to two orders of magnitude lower than our study. On other hand, the K_d values observed in this study for CAF, THEO and CBZ were on average lower than those reported by (Azuma et al., 2017). As compared to literature values of sediment-water partition

coefficients, the K_d values were higher in comparison with values reported in literature for field-based survey except for ACET (Fairbairn et al., 2015).

In addition, partitioning coefficients using laboratory spiked sediment or suspended solids (see Table 6-4) were much lower than those found in field studies (Hernández et al., 2007; Hajj-Mohamad et al., 2017). The discrepancy in studies between field-based and laboratory partitioning coefficient has been reported by several authors (Bagnis et al., 2018; Hajj-Mohamad et al., 2017), and are likely attributed and not limited to several factors: (i) the slow equilibrium of sorption to SPM from newly added laboratory spikes, (ii) the variability in the physicochemical characteristics of the sediments and suspended particulate matter (particularly organic carbon content, solubility, octanol water coefficient) used in various studies, and (iii) the variability in the experimental methods used to differentiate between free/aqueous and associated bacteria or pharmaceuticals, (iv) total load discharged into the river and (v) spatial and temporal variations. Except for the field study by (Cantwell et al., 2016) which lasted over 1 year integrating short-term variation, the other studies mentioned above were all performed to our knowledge in dry weather. Laboratory and batch experiments are usually conducted under conditions which are likely not representative of field-based studies in terms of equilibrium, kinetics, or relative concentrations.

The partitioning dynamic and behavior of *E. coli* and wastewater derived pharmaceuticals could be attributed as discussed to water, suspended matter and sediment properties (Liang et al., 2013). Therefore, TSS, TOC and dissolved organic carbon (DOC) in water surface and %OC (fraction of organic carbon) in sediment were investigated by multiple linear regression analysis as shown in (Table 6-5**)**. Except for CBZ, the partition coefficient for all target compound showed a significant, although weak, positive correlation with TSS. The correlation analyses demonstrated that caffeine and acetaminophen were strongly correlated ($\rho s>0.6$) to TOC (mg/L) in surface water, while *E.*

coli moderately correlated to DOC (mg/L) (ρs=0.6). No significant difference was observed for sediment-water K_d regarding (%TSS) or % *f* < 80 µm, however, caffeine and carbamazepine were strongly correlated to %OC in sediments.

Table 6-5. Correlation coefficients of the SPM-water and sediment-water partition coefficients (*Kd*) with water and sediment characteristics. Red bolded Spearman values are significant at p<0.05

Matrice	**Parameter**	**ACET**	**CAF**	**THEO**	**CBZ**	***E. coli***
	K_d SPM-Water					
Surface water	TSS (mg/L)	**0.38**	**0.38**	**0.37**	0.11	**0.30**
	TOC (mg/L)	**0.71**	**0.75**	**0.11**	**0.52**	**0.36**
	DOC (mg/L)	0.30	0.24	0.15	0.27	**0.61**
	K_d Sediment-water					
Sediment	%TSS	-0.18	-0.37	-0.26	-0.55	0.24
	% OC	-0.09	**0.62**	0.32	**0.77**	-0.12
	% *f* < 80 µm	0.44	0.23	0.37	0.27	0.12

Since the organic carbon content plays an important role in the partitioning of hydrophobic/organic compounds to sediment/SPM; using the K_{oc}, instead of the K_d, allows for better comparison of distribution between sediments and/or SPM and aqueous phase for a specific compound. Therefore, the distribution coefficients K_d were normalized to the %OC of the sediment resulting in the Koc coefficient (Annexe C, Table S5). Log K_{oc} values, calculated from our experimental data for sediments, were then plotted vs. log K_{ow}, and compared with the correlation model (linear line) proposed by (Karickhoff, 1981) from aromatic hydrocarbon compounds (Fig 6-4). The correlation suggested that using equations based upon the log K_{ow} to predict the log K_{oc} worked relatively well for the neutral compounds CBZ and ACET, suggesting hydrophobic interactions as the dominant

mechanism. With high water solubility (14.000 mg/L), very low hydrophobicity (log K_{ow}~0.46) and a p*K*a of 9.4, acetaminophen exists almost in the neutral form under experimental river pH. On the other hand, acetaminophen was found to be engaged in few hydrophobic interactions at neutral pH values (Lin et al., 2010), and these properties help explain the low sorption to both sediment and SPM. Carbamazepine is more hydrophobic (log K_{ow}~2.5), and with a pK_a of 13.9, exists almost in neutral form at the river pH range, hydrophobic partitioning was anticipated as the dominant mechanism. However, field results were higher than theoretically derived log K_{oc} values for CAF and THEO and also for ASP and 2OH-CBZ, most likely because these models based on K_{ow} and K_{oc} coefficients, reflects hydrophobic interactions and does not accurately account for polar and ionic interactions (pharmaceuticals often contain polar functional groups (e.g. hydroxyl, carboxylic acid, aldehydes and amines); such as electrostatic interactions, surface complexation, hydrogen bonding, cation-exchange, or bridging that may vary significantly with changes in pH, organic matter, clay/minerals and ionic strength (Morissette et al., 2015). Because caffeine, was also neutral throughout the river pH range, pKa:14, and has a very small log K_{ow} = - 0.07, it was expected that it would have little tendency to sorb to the sediments/SPM. The high partitioning of CAF to the sediments/SPM could then be associated with their high cationic exchange capacities as it has been previously described by (Biel-Maeso et al., 2018). The same behavior could be expected for theophylline, with pKa values of 8.8 and therefore could be positively charged at the environmental pH, electrostatic interactions between positively charged compound and negative charged sediments/SPM surfaces are probably the main interaction mechanism. In addition, at river pH, aspartame is present in both neutral and anionic forms. Therefore, both hydrophobic and electrostatic sorption mechanisms are expected to be important.

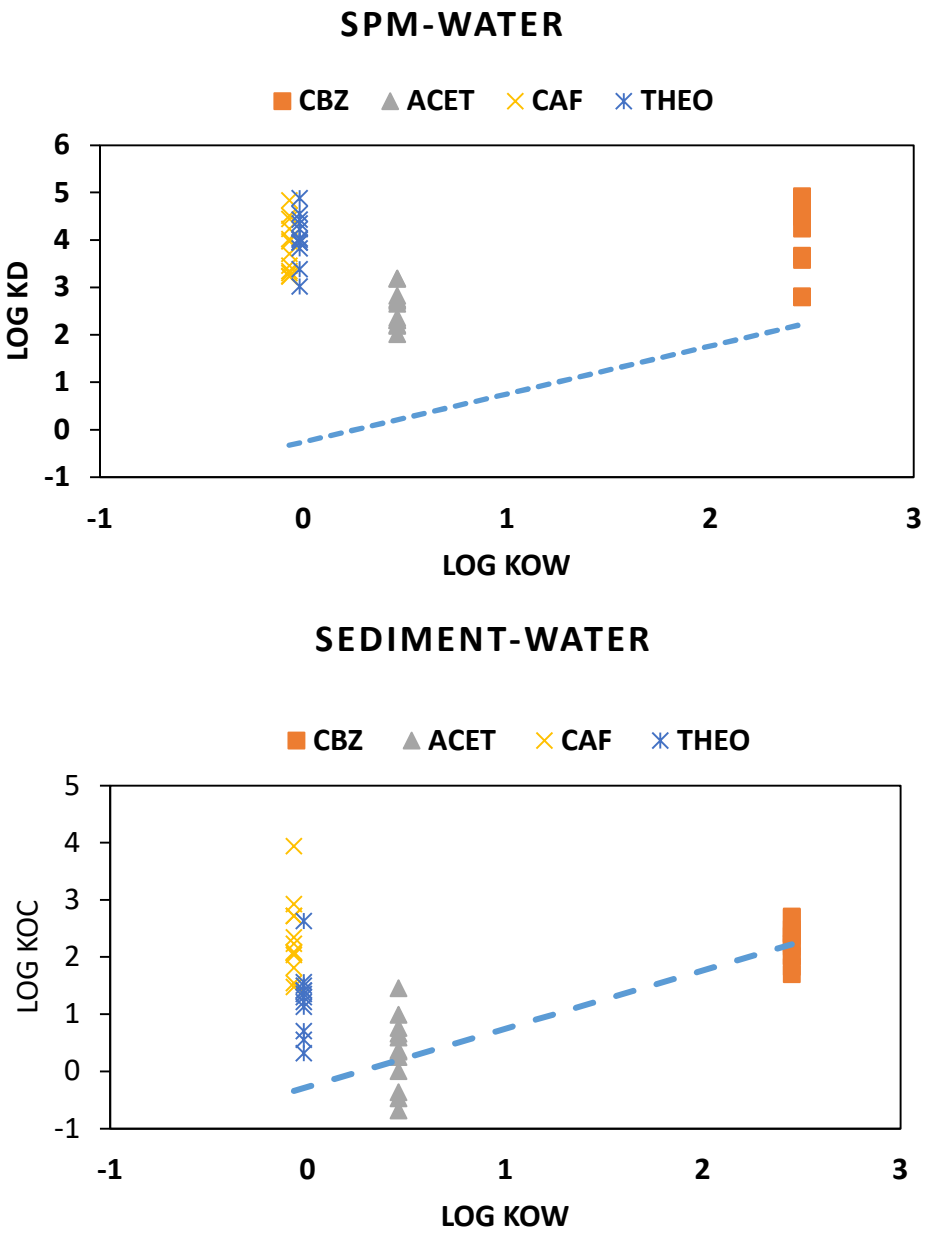


Fig. 6-4. Relationship between field log K_d, log K_{oc} vs log K_{ow} of WWMPs detected in water, SPM and sediment across the study sites. K_{ow}-K_{oc} linear relationship observed by Karickhoff (1981) was used for comparison (blue dotted line)

6.4.5 Spatial variations

Spatial trends of the average cumulative concentration of the most frequently detected compounds in the aqueous phase, SPM and sediments was compared to *E. coli* over the two sampling events to provide information on their sources, partitioning and transport (Fig 6-5). Divergent patterns among phases (aqueous and particulate) and sediments and among sampling sites were observed. In surface water, a distinct inverse gradient was observed along the south shore of the river between the aqueous and particulate phases in dry weather (Fig 6-5A and Fig 6-5B).

6.4.5.1 Dry weather

There are only 2 WWTPs discharging along the south shore; downstream of S3 (WWTP1) and S5 (WWTP2) compared to 5 WWTPs discharging on the north shore located upstream of sampling points (N2 to N5). Sampling points upstream of WWTP1 showed also increasing total mean concentrations of SPM WWMPs, however, there is no known point source upstream of S1 and S2, but these sampling points are located immediately downstream from 2 WWTPs on the opposite north shore which could explains the upstream distribution. In this section of river, septic systems and storm sewers are likely to contribute to *E. coli* and WWMP loads.

Overall, the increase in concentration of target analytes in dissolved or particulate phases after each WWTP discharges is consistent with WWTP effluent as a source of surface water contamination. Nonetheless, the increase or decrease in cumulative concentration seen downstream of each WWTP might be largely dependent on local size population and the dilution of WWTP discharge in relation to river water flow (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2013). In addition, the WWTP effluent concentrations could be related with the concentrations in the influent, and the removal efficiencies in aqueous and particulate fractions in different treatment processes (Jelic et al., 2011). Indeed,

WWTPs discharging into the river have different treatments: aerated lagoon, biofiltration versus physicochemical treatment. More importantly, the removal in WWTPs has been mainly studied in dissolved phase, without specifying the removal mechanism such as biodegradation or sorption (Miege et al., 2009). Monitoring the influent and effluent SPM fraction is essential for spatial interpretation.

The variations in sediment across the river suggests that the partitioning onto sediments may be mainly due to sorption and settling (Fig 6-6C). In fact, positive correlations were found between *E. coli,* CAF, THEO, ACET and ASP measured in sediments and partitioned to SPM (Spearman correlation coefficient ranging from 0.30 to 0.51, $p<0.05$). Similarly, to SPM, the spatial distribution was site and compound specific. The sedimentation of suspended particulate setting into sediment may be related to the (i) flow velocity; hydrodynamic conditions of the river studied implies the alternation of fast and slow flowing segments, (ii) SPM and sediment properties (low %OC in downstream sites), or to (iii) differences in depositional histories at sampling sites due to time lag between discharge and accumulation into sediment (J. Liu et al., 2018; Lara-Martín et al., 2014b).

6.4.5.2 Wet weather

In wet weather, dissolved and particulate fractions were affected differently by dilution and sorption (Fig 6-5D and Fig 6-5E). Immediately following rainfall, both river shores in aqueous phase are impacted similarly by CSO discharges, thus more uniform occurrence and spatial distribution patterns appeared. High detection frequency of ACET, CAF, THEO, and *E. coli* in all matrices (Table 6-1) indicate recent contamination by untreated wastewater. On the other hand, *E. coli* and WWMPs attached to particles in the receiving water appear to be strongly influenced by

the CSO effluent during wet weather, although it is known that wastewater treatment efficiency decreases during higher flows (Tolouei et al., 2019).

Although on average, *E. coli* and most of WWMPs sediment concentrations did not vary significantly flowing precipitation events, concentrations of *E. coli* , CAF, THEO and CBZ (Fig 6-6F) in sediments did increase at some sampling sites (N3) exhibiting variations of an order of magnitude due to deposition of fresh sediments having differing concentrations than existing sediments, or resuspension and mixing of sediments with different concentrations (N3 and S3) (Fairbairn et al., 2015). As for dry weather, the highest increase of SPM concentrations following precipitation did not induce high sedimentation at corresponding sites, which suggests the presence of very fine particles remained in suspension and did not settle but travelled further downstream. Natural attenuation (*e.g.* dilution, hydrolysis, biotransformation and photo-transformation) increases the variability in SPM concentrations among sites.

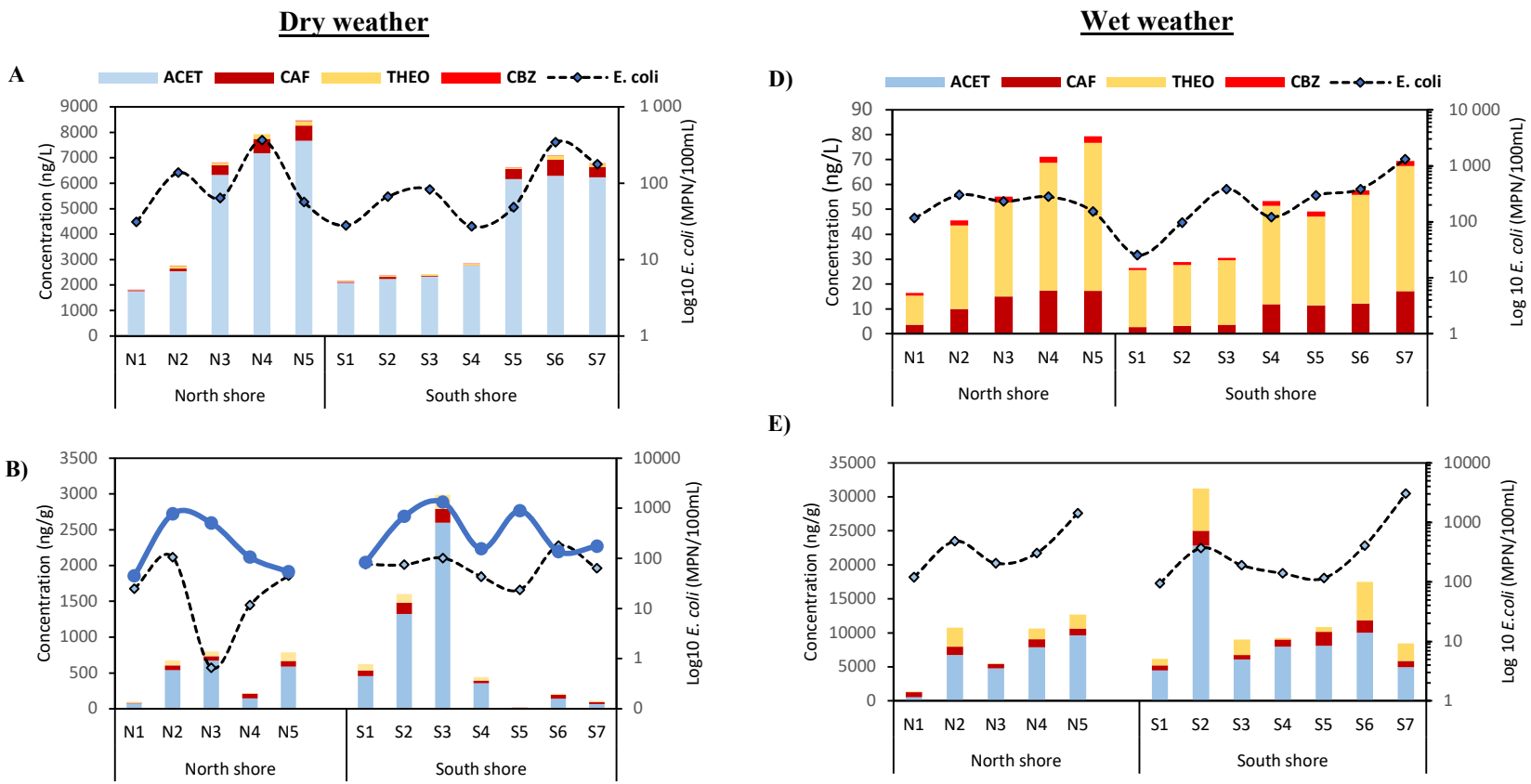


Fig. 6-5. Spatial-temporal distribution of mean *E. coli* concentration and total mean wastewater micropollutants concentration in A/D: aqueous/dissolved phase, B/E: attached to suspended particulate matter (SPM). Note the difference in scale on the y-axis

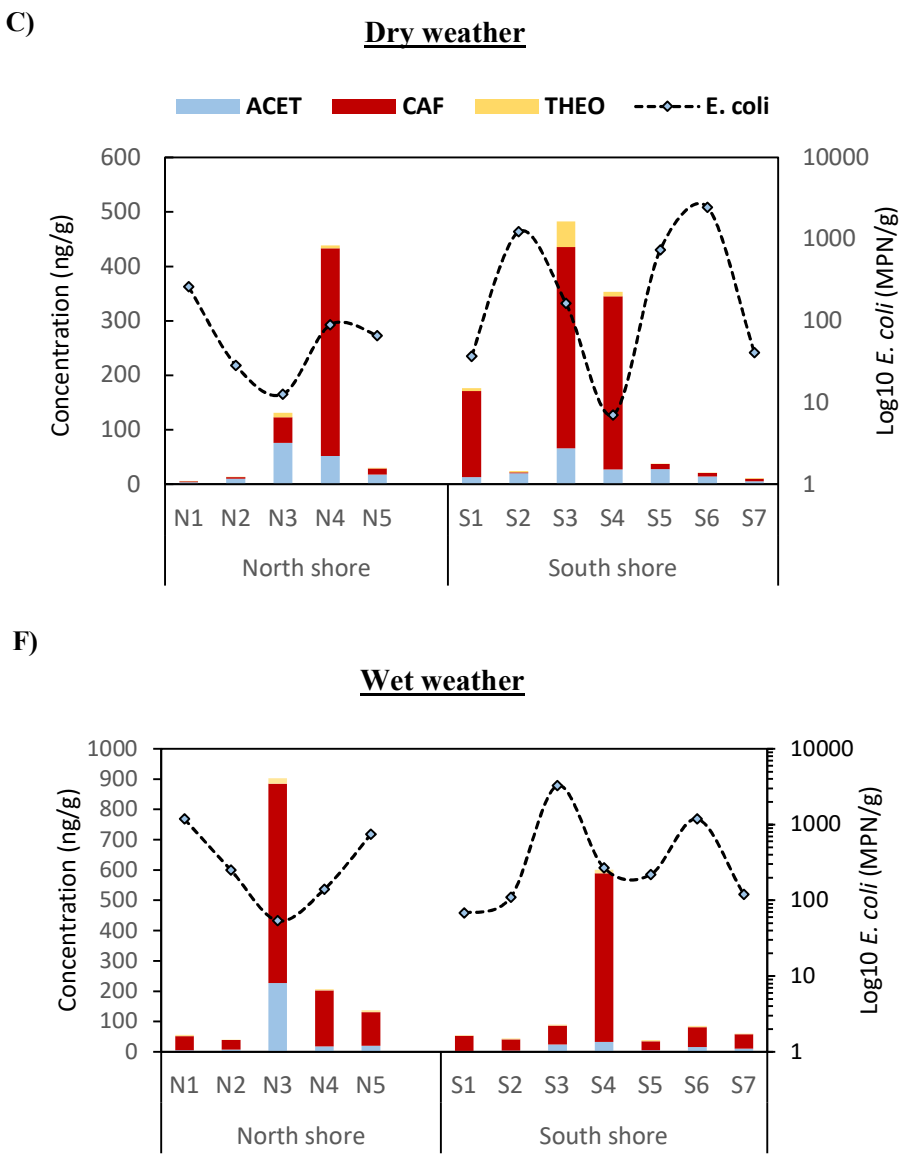


Fig. 6-6. Spatial-temporal distribution of mean *E. coli* concentration and total mean wastewater micropollutants concentration in sediment C/F. Note the difference in scale on the y-axis

6.4.6 Comparison between *E. coli* and WWMPs fate along the river

Behavior and partitioning of any potential wastewater marker would ideally be similar to that of indicator bacteria during transport (James et al., 2016). In this study, investigation of similar patterns within *E. coli* and mean individual WWMPs concentration revealed comparable behavior and spatial trends in surface water with ACET, CAF and THEO (wet weather dissolved and particulate phase) between sampling locations in comparison to CBZ/2OH-CBZ and ASP (Fig 6-4); the one exception to this trend is the data point at S7, which appears to have high increase in concentrations of *E. coli* with 1318 and 3027 MPN/100mL in aqueous and SPM respectively which was not the case in WWMPs. This may reflect a local influence of stormwater runoff and/or failing septic systems from upsteam rural areas. While *E. coli* exhibited similar dynamics with WWMPs in surface water; in the aqueous phase, WWMPs were mainly diluted and degraded below detection limits during wet weather. Conversely, *E. coli* showed relatively increasing concentrations across the river section and thus, remains the best indicator of fecal contamination in all conditions.

ACET, CAF and THEO sorbed to suspended particles strongly correlated to *E. coli* (Table 6-5) and could be a suitable tracer to both untreated sewage presence by CSOs and bacteria. Even though the combination of partitioning and transport mechanisms of a given WWMPs likely result in a behavior profile similar to that of *E. coli*, the particle deposition may not experience the same suite of influences, as completely different profile was observed in sediments between *E. coli* and WWMPs. Indeed, various physical, biological and chemical factors may affect bacterial transport, how and what percentage of bacteria attach to particles (Tufenkji, 2007).

6.5 Conclusions

This study examined dissolved, suspended particulate and surficial sediment concentrations of *E. coli* and WWMPs to understand the variables controlling transport and partitioning behavior. Notable findings included:

- WWTPs and/or CSO discharges were the main sources of fecal contamination in the urban river.
- The occurrence and partitioning behavior of each compound changes between dry and wet weather conditions. In dry weather, the partitioning between water and suspended solids was consistent with chemical properties and sorption capacity of each compound. After heavy rainfall and the occurrence of CSOs, an increase of the fraction associated with particles was observed. If monitoring programs using WWMPs as fecal markers are not considering the particulate phase, they might not observe the increased loads as dilution is a dominant driver of the aqueous phase.
- To overcome dilution effects in dissolved phase, analysing suspended particulate phase with regards to micropollutants and indicator bacteria may be more relevant for risk assessment and to assess the relative contribution of CSO bypass flows and treated wastewater effluents loads to the river.
- In the surficial sediment phase, the highest concentrations of measured contaminants were observed downstream of a sewage discharge demonstrating an accumulation in sediments.
- Traditional equilibrium K_{ow} approaches fail to estimate field K_d in both SPM and sediment (except hydrophobic CBZ and ACET). Thus, in addition to spatial and temporal dynamics, environmental factors such as pH/p*K*a, organic content and non-

hydrophobic interactions contribute to the underestimation of water-SPM/sediment distributions.

- Statistical tests revealed strong correlations between the concentrations and /or partitioning behavior of *E. coli*, CAF, THEO and ACET suggesting that these compounds may exhibit similar transport behavior in the environment and would be useful markers for both the presence of fecal bacteria and untreated sewage.
- It may be crucial to consider sub-watershed and local wet weather events when planning monitoring activities, as these may affect, SPM and sediments *E. coli* and WWMPs concentrations by temporarily affecting partitioning, deposition, and resuspension.

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

7.1 Applications de la boîte à outils

La contamination des sources d'eau potable par des matières fécales (eaux usées) est à l'origine de pollutions microbiologiques pouvant entraîner des pathologies plus ou moins graves chez l'humain. Elle contribue également à l'augmentation des coûts de la production d'une eau potable saine. Déterminer la ou les sources de ces contaminations est un enjeu de santé publique et constitue un premier pas pour assurer une meilleure protection des sources destinées à l'alimentation en eau potable au Québec. Cet enjeu devient de plus en plus prioritaire depuis 2014 afin de répondre aux exigences de la réalisation d'une analyse de vulnérabilité formulées dans le Règlement sur le prélèvement des eaux et leur protection (RPEP) et de l'obligation des collectivités de procéder à l'identification et à la hiérarchisation de toutes les sources potentielles ou effectives de contamination (MELCC, 2018).

Malgré les avancées significatives sur le suivi de sources microbiennes, il est généralement difficile de les déterminer avec certitude et cela conduit à des difficultés dans la mise en place de stratégies visant l'amélioration de la qualité de l'eau. Des investigations complémentaires *in situ* sont nécessaires afin de valider la fiabilité des nouveaux indicateurs dans l'identification des sources de pollution fécale.

L'objectif général de cette thèse était de tester l'utilisation d'une boîte à outils composée de marqueurs chimiques et moléculaires en tant qu'outil de traçage de l'origine des contaminations fécales des eaux de surface urbaines. Le choix fait dans cette thèse de cibler une approche multi-traceurs composée de d'ACET, CAF, THEO, CBZ, CBZ-2OH, ASP, *E. coli*, HF183 et d'ADN mitochondrial, découle des travaux publiés (Hajj-Mohamad et al., 2019) démontrant les potentialités de ces composés en termes de traçage en raison de leurs caractéristiques propres, telles que leurs spécificités élevées, leurs seuils de détection faible ou leurs persistances dans l'environnement.

Le travail présenté ici ayant des visées opérationnelles, il s'est inscrit dans des bassins versants (urbains et agricoles) affectés par des problèmes de contaminations fécales récurrentes multi-sources (raccordements inversés, surverses et ruissèlement agricole).

Le travail réalisé au cours de cette thèse s'est articulé en trois grandes étapes.

7.1.1 Dépistage des raccordements illicites

La première étape a été de déterminer l'origine de la pollution fécale dans les eaux des réseaux d'égouts pluviaux des bassins versants urbains dotés des réseaux d'assainissements séparatifs en combinant des indicateurs classiques non discriminants et des marqueurs discriminants chimiques et moléculaires. Dans cette étude, nous avons testé 2 marqueurs MST par qPCR (HF183 et d'ADN mitochondrial) et 3 marqueurs CST (CAF, THEO et CBZ) en plus d'*E. coli*. Les résultats obtenus par l'analyse des marqueurs apportent des informations précieuses pour lutter contre les contaminations du réseau pluvial. En effet, ils ont démontré et/ou confirmé qu'aucun des indicateurs classiques ou marqueurs proposés ne se révèle suffisant pour déterminer à lui seul l'origine de la pollution fécale. En effet, sur les sous bassins versants complexes soumis à de nombreux facteurs de pression, la localisation des RI par le biais d'analyses *Escherichia coli* ne suffit généralement pas pour déterminer d'où proviennent les pollutions. L'utilisation de l'indice sanitaire multiparamétrique proposé dans ce projet a permis d'orienter des actions correctives dans les réseaux d'assainissement visant l'amélioration de la qualité de l'eau rejetée sans traitement dans les cours d'eau destinés à l'alimentation en eau potable. Cet indice combine cinq indicateurs en une échelle de < 2 à > 3. Plus la valeur de l'indice est élevée, plus les chances que le raccordement illicite (raccordement inversé ou exfiltration du réseau sanitaire) soit la source de la contamination fécale augmentent. L'application terrain de cet indice sur des secteurs problématiques du réseau d'assainissement séparé a permis avec succès de localiser les raccordements inversés et les travaux de réfection du système de drainage réalisés dans ce cas-ci permettent d'éliminer et/ou de réduire l'impact

des raccordements illicites en tant que sources de vulnérabilité des prises d'eau potable situées en aval.

Le projet ayant pour ambition l'application et le transfert de la boîte à outils à d'autres bassins-versants avec la problématique des RI ainsi que les laboratoires d'analyses des eaux. Il s'agit à terme de montrer que l'utilisation de boîtes à outils telles que celle qui est proposée dans cette étude est nécessaire ou souhaitable à la réalisation d'un diagnostic fiable des raccordements illicites en temps sec, permettant ainsi de faciliter la mise en place d'actions correctives efficaces. Comme l'indice proposé combine 5 marqueurs de présence d'eaux usées, le coût des analyses pourraient éventuellement freiner l'utilisation de la boite à outils par les acteurs de la sphère opérationnelle, particulièrement la combinaison des analyses spectrophotométriques et moléculaires coûteuses. Néanmoins, cette limite est à relativiser : en effet, les méthodes présentement utilisées par les municipalités pour le dépistage des RI (analyses bactériologiques, pose de grillage, inspection télévisée par caméra…etc.) que ce soit le long du réseau ou bien au niveau du cours d'eau constituent un travail fastidieux et coûteux en termes de main d'œuvre, tandis que la méthode MST nécessite de réaliser relativement peu d'analyses pour acquérir des informations exploitables et factuelles dans un délai relativement court et par conséquent mettre en place des actions correctives adaptées. Par ailleurs, tel que démontré par les résultats de corrélations et l'exploitation de 3 différents sous-bassins, l'indice multi-traceurs proposé se veut adaptable aux caractéristiques de chaque bassins versants (peu ou fortement urbanisés), ainsi, il n'est pas nécessaire d'utiliser les 5 marqueurs d'eaux usées testées, les composés pharmaceutiques (CAF et/ou THEO) avec le marqueur *Bacteroidale* HF183 semblent être une bonne combinaison pour identifier les eaux usées d'origine humaine et confirmer la présence de raccordements inversés particulièrement avec des concentrations d'*E. coli* (> 10.000 MPN/100 mL).

7.1.2 Impact des rejets des débordements d'eaux usées sur les prises d'eau potable

La deuxième étape a eu pour objectif d'utiliser la boite à outils de marqueurs d'eaux usées pour évaluer la vulnérabilité microbienne des prises d'eau potable durant les événements critiques (débordements d'eaux usées lors d'épisodes de précipitation intense ou de fonte de neige et rejets d'eaux usées non traitées lors des dérivations en cas d'urgence et en temps sec). En comparaison avec la boite à outils utilisée pour le dépistage des raccordements illicites, plus de marqueurs chimiques ont été testés à savoir l'ACET et CBZ-2OH. De plus, le suivi en continu de la charge bactérienne par l'activité glucuronidase (GLUC) et le suivi de certaines pathogènes (Chapitre 5) ont été également effectués pour une meilleure exploitation des résultats.

Lors des évènements critiques (échantillonnage ciblé), des dynamiques très similaires entre l'activité glucuronidase, les concentrations en *E. coli* cultivables, les marqueurs moléculaires spécifiques, les marqueurs chimiques et les pathogènes durant la pointe de contamination fécale ont permis de confirmer l'impact d'eaux usées municipales ou de ruissellement agricole en amont de la prise d'eau brute. Si l'utilisation en tandem des marqueurs humains CST et MST améliore la fiabilité du suivi de la contamination par les eaux usées non traitées/récentes à l'entrée des usines de traitement d'eau potable, la boite à outil testée ne pourrait être transférable d'une prise d'eau à une autre du moins pour la rivière étudiée où il y a plusieurs sources potentielles de contamination fécale avec les émissaires d'effluents d'eaux usées, les points de surverses et exutoires pluviaux se chevauchant le long du cours d'eau. En effet des dynamiques variables et une perte du "signal eau usée" de certains marqueurs dépendamment des conditions hydrométéorologiques ont été observées au niveau des 3 prises d'eau étudiées. Il est donc important de tenir le plus grand compte possible des spécificités locales du sous bassin versant de chaque prise d'eau. Contrairement aux conditions de fond (temps sec) où les eaux usées proviennent principalement des effluents traités des STEPs et présentent à peu près les mêmes compositions en micropolluants, lors des événements critiques, l'augmentation du débit,

l'hydrodynamique locale impliquant des phénomènes d'adoption, de remise en suspension et de bio (dégradation) qui pourraient agir sur le comportement et le devenir des marqueurs dans le milieu récepteur. Ce constat est d'ailleurs confirmé par les résultats du 3ème article (Chapitre 6). Il est donc judicieux pour évaluer la contribution des eaux usées au pics de contamination des prises d'eau lors des précipitations/fonte de neige, de concentrer les analyses sur les marqueurs les plus répandus présents à des concentrations assez élevées dans le milieu et les moins influencés par les dilutions ou l'adsorption. Dans notre travail de recherche, HF183 et CBZ étaient les seuls marqueurs humains associés aux eaux usées qui présentait des résultats relativement similaires pendant les conditions critiques que ce soit de point de vue fréquence de détection, amplitude, dynamique similaire avec l'activité GLUC, *E. coli* et certains pathogènes. La CAF et la THEO étaient par ailleurs plus sensibles aux effets de dilution après les déversements d'eaux usées non traités. L'ADN mitochondrial peut s'avérer être une bonne option à utiliser en combinaison avec *E. coli* dans les bassins versants agricoles pour distinguer les sources de contamination.

Un autre résultat important de ce travail de recherche, c'est la mise en évidence de de l'intérêt d'utiliser l'activité GLUC pour le déclenchement des compagnes d'échantillonnage et d'autre part la caractérisation de la dynamique temporelle de la charge fécale à l'entrée des usines de traitement et par conséquent l'évaluation de manière plus représentative leur vulnérabilité aux pics de contamination fécale, surtout en période de fonte des neiges et de précipitations intenses. Aussi, les pointes de turbidité ont été souvent observées quelques heures après les pointes de contamination fécale (eaux usées), ce résultat remettrait en question l'utilisation régulière des pointes de turbidité comme premier indicateur du niveau de vulnérabilité microbienne. Des réactions tardives de la part des producteurs d'eau potable pourraient générer des coûts de traitement additionnels ou mener potentiellement a des éclosions.

7.2 Comportement et devenir des marqueurs d'eaux usées dans le milieu récepteur

En plus de leur présence récurrente dans les rejets de STEP, les potentiels marqueurs doivent présenter un caractère conservatif pour pouvoir être suivi à l'aval des points de rejet, cependant ,l'occurrence et la concentration des marqueurs de suivi des sources de pollution fécale dans les eaux de surface réceptrices des rejets d'eaux usées traitée ou non dépendent largement entre autres facteurs de la dilution, l'adsorption, la nature de la matrice environnementales (phase dissoute, colloïdale ou particulaire et les sédiments), de l'atténuation naturelle et du degré de traitement des eaux usées appliqué dans les stations d'épuration. Par conséquent, les différents indicateurs de contamination fécale et les marqueurs MST ne persistent pas nécessairement de façon similaire.

Les études sur le devenir et la mobilité de ces marqueurs dans l'environnement est un paramètre essentiel pour évaluer leur pertinence et fiabilité dans la détection des sources de pollution. La 3éme étape du projet avait pour objectif de répondre aux questions suivantes : (i) la persistance des micropolluants traceurs d'eaux usées change-t-elle de façon temporelle dans le milieu aquatique? et (ii) les concentrations dans la phase particulaire et dans les sédiments offrent-elles une plus grande précision que les concentrations dans l'eau pour le suivi des rejets d'eaux usées sans le milieu récepteur.

La stratégie d'échantillonnage impliquait donc un suivi spatio-temporel (de l'amont en aval en temps sec et en temps de pluie) de la dynamique d'*E. coli*, et six micropolluants traceurs d'eaux usées à savoir l'acétaminophène, la caféine, la théophylline, la carbamazépine, le 2-hydroxycarbamazépine, et l'aspartame entre la phase dissoute, la phase particulaire et les sédiments dans un cours d'eau impacté par plusieurs rejets d'effluents traités et de points de surverse.

Un gradient amont- aval des concentrations de micropolluants a été observé le long du cours d'eau étudié a permis de mettre en avant l'effet cumulatif des rejets continus des émissaires des

STEPs et des rejets de surverses en temps de pluie rendant plus vulnérables les prises d'eau en aval. Une corrélation positive entre *E. coli* et les micropolluants a permis de confirmer la pertinence de ces derniers pour tracer la présence d'eaux usées domestiques dans les masses d'eau.

Du fait de la complexité du bassin versant à l'étude, notamment la présence de plusieurs émissaires de stations d'épuration et de nombreux points de surverses de trop-pleins et d'émissaires pluviaux, le comportement conservatif propre à chaque micropolluant n'a pu être clairement mis en évidence, néanmoins, les résultats ont montré une hausse des concentrations des micropolluants attachés aux particules mettant en évidence la présence dans la phase particulaire des molécules peu ou très polaire (ACET, CAF, THEO et ASP) démontrant d'une part la pertinence de considérer la phase particulaire particulièrement pour évaluer l'impact des rejets en temps de pluie ou fonte de neige.

D'après ces résultats, les Kd mesurés s'écartent largement des prédictions d'équilibre et les unes des autres, souvent d'un ordre de grandeur ou plus soulignant la limite du coefficient du partage Octanol-eau (log Kow) pour caractériser la mobilité des composés organiques. De nombreuses études de laboratoire et les quelques études de terrain existantes ont rapporté des distributions spatio-temporelles variables de PPSP polaires/ionisable (tels que les marqueurs suivi dans notre travail dans les sédiments/particules en suspension et l'eau) , qui s'écartent souvent des prédictions d'un ordre de grandeur ou plus (Fairbairn, 2015). Selon ces études, cette variation a été attribuée à des interactions non hydrophobes, à des facteurs hydrologiques, au degré d'ionisation, le pH de l'environnement, aux interactions potentielles comprenant l'échange de cations, la liaison hydrogène, la complexation minérale avec les aluminosilicates, ou encore les composants ionisables de la matière organique du sol (Karnjanapiboonwong et al., 2010; Figueroa-Diva et al., 2010; Fairbairn, 2015).

Outre les influences temporelles et spatiales, comme discuté ci-dessus, d'autres facteurs eux-mêmes liés au système non en équilibre et l'impact des colloïdes pourraient affecter le devenir dans l'environnement et la précision de ces prédictions. En effet, en raison de leur grand site de surface et de leur grande densité, les colloïdes peuvent présenter une affinité de sorption accrue pour les contaminants organiques tels que les produits pharmaceutiques et les antibiotiques (Yang et al., 2011a; Duan et al., 2013; Cheng et al., 2017). À titre d'exemples, Yang et al. (2011b) ont étudié la présence et le comportement de neuf composés pharmaceutiques dans le fleuve Yangtze et ont constaté qu'entre 4 et 45% des produits pharmaceutiques sont associés aux particules colloïdales de l'eau. Duan et al. (2013), ont trouvé 10-14% du kétoprofène, 8-26% du naproxène, 17-36% de l'acide clofibrique, 22-33% du diclofénac, et 9-28% de l'ibuprofène étaient attachés aux colloïdes dans le système aquatique. Bowman et al. (2002), ont constaté que la capacité de sorption du 17α-éthynylestradiol (EE2) était de deux ordres de grandeur plus élevée dans les colloïdes estuariens que dans les sédiments. Tous ces résultats ont confirmé la grande affinité des composés pharmaceutiques relativement polaires pour les colloïdes aquatiques provenant principalement de différentes sources (eaux de rivière et eaux usées). Par conséquent, il est judicieux de considérer la phase colloïdale dans le transport et répartition phasique des marqueurs sélectionnés en suivi de sources et aussi d'évaluer pour quels composés la sorption est régie principalement par une partition hydrophobe, par des interactions polaires-ioniques avec des composants minéraux ou par un mélange d'influences, et dans quelles conditions (Mackay & Vasudevan, 2012). Dans notre étude, seul le CBZ (moins polaires et plus hydrophobes) et ACET était le mieux prédit par le Log Kow et Koc. Le comportement et le transport de CBZ-2OH, CAF, THEO et ASP dans le différent compartiment environnemental a été en revanche plus attribuables aux conditions hydrométéorologiques et aux caractéristiques chimiques du milieu récepteurs.

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les différentes méthodes MST, ne font toujours pas l'objet de protocoles et de méthodes bien normalisées, ceci complique leur application par les acteurs de la sphère opérationnelle. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse par l'analyse des marqueurs chimiques et microbiologique apportent des informations précieuses pour lutter contre les origines de contaminations fécales des eaux et représentent un outil supplémentaire mis à disposition des acteurs de l'eau pour identifier des zones plus problématiques que d'autres et prioriser les secteurs d'intervention. Dans des bassins versants soumis à de nombreux facteurs de pression et impactés par plusieurs types de rejets, la localisation des foyers de contamination par le biais d'analyses d'*E. coli* ne suffit généralement pas pour déterminer d'où proviennent les pollutions. Les marqueurs d'eaux usées présentent l'avantage de discriminer la part des pollutions domestiques parmi les autres sources dans un délai relativement court, permettant d'agir de manière ciblée pour réduire l'impact des rejets d'eaux usées sur les milieux naturels.

En conclusion, utilisés conjointement, les marqueurs appliqués au cours de cette étude paraissent suffisamment spécifiques pour identifier l'origine des pollutions fécales. Les résultats obtenus amènent des éléments de validation sur l'utilisation conjointe des marqueurs testés, sous la forme d'une « MST toolbox » ou d'une « boite à outils de marqueurs » en tant que marqueurs/traceurs opérationnels de l'origine des contaminations fécales d'origine humaine. En effet, la corrélation positive entre les marqueurs avec *E. coli*, la co-occurrence et cohérence des informations fournies observées dans ce projet représentent un argument de poids pour déterminer avec plus de certitude l'origine ou la source de contamination fécale; l'indice sanitaire établi dans le cadre de cette étude pour le dépistage des raccordements illicites constitue un bon exemple.

Par ailleurs, une « boite à outils de marqueurs » fournit une alternative plus robuste car moins sensible aux variabilité et/ou limite propres à chaque marqueur. Elle peut toutefois s'avérer

intéressante pour palier à l'absence du « signal eau usée » du fait de la faible persistance/attachement aux particules possible pour certains marqueurs dans l'environnement sous certaines conditions.

Les résultats confirment : (i) qu'un échantillonnage spatio-temporel est jugé pertinent pour tester le caractère conservatif des marqueurs ou l'impact cumulatif des sources de contamination, (ii) l'importance de l'échantillonnage ciblé (event-based) pour caractériser correctement la vulnérabilité microbiologique de la source d'eau, les résultats d'analyse temporelle des tendances des niveaux d'*E. coli,* des marqueurs génétiques et chimiques ont démontré que les périodes de pluie intense, de fonte de neige et de dérivation d'eaux usées, constituent une période de vulnérabilité accrue des prises d'eau.

D'un point de vue méthodologique et compte tenu de la polarité des composés pharmaceutiques proposés comme traceurs des eaux usées, l'ensemble des mesures du suivi de ces composants dans l'environnement est principalement axé sur la fraction dissoute. Le rôle de la phase particulaire est souvent négligé dans les processus d'analyse et d'échantillonnage. Les résultats obtenus dans cette thèse mettent en évidence le rôle que ce compartiment pouvait jouer notamment dans la dissémination et le transfert de la charge fécale entre la phase dissoute et particulaire particulièrement dans des conditions de haut débit et dilutions des eaux.

Un certain nombre de perspectives et recommandations pourrait être proposé au terme de ce travail de thèse :

Pour fournir une meilleure estimation du risque sanitaire de contamination à la prise d'eau en situation critique, la caractérisation à l'eau brute (*E. coli*, turbidité, etc.) doit comprendre des échantillons prélevés durant des évènements de pointe (pluies, surverses, fonte de neige, dérivations en temps sec, etc.) mais devrait également inclure des marqueurs spécifiques pour indiquer la source probable de contamination. Le marqueur *Bacteroidale* HF183 constitue un

bon candidat du fait de sa grande spécificité et corrélation avec les pathogènes (*Cryptospridium*, *Giardia* et Adénovirus) observées dans ce projet.

La nature des événements critiques ciblés : dérivation d'eaux usées en temps sec, fonte printanière couplée ou non aux épisodes de pluie, causant ou non des surverses ou dérivations d'eaux usées, a généré des profils de vulnérabilité à la contamination fécale qui diffèrent d'une prise d'eau potable a une autre, dépendamment de leur localisation et le type de traitements des eaux usées des STEP en amont, pour confirmer les tendances observées, et avoir une meilleur idée sur les pic de contaminations susceptibles d'atteindre la prise d'eau, il est donc recommandé d'effectuer plusieurs compagnes d'échantillonnage ciblés dans différentes saisons (automne, été).

Dans une optique d'amélioration de la boite à outils, il semblerait pertinent d'inclure des marqueurs spécifiques des contaminations animales et d'étudier d'autres sources pouvant contribuer aux contaminations fécales au sein des bassins versants urbains, Par exemple, les sources animales liée aux faunes domestiques et sauvage en particulier celle liée aux chiens, aux oiseaux sauvages (tels que les goélands, les bernaches) souvent présents dans les eaux de surfaces, ou encore les ratons-laveurs au niveau des égouts pluviaux .

Par ailleurs, l'approche « Microbial Source Tracking » est un champ de recherche très évolutive, chaque année, de nouvelles méthodes et nouveaux marqueurs spécifique de l'hôte (humain ou animal) sont développes et publiées, les marqueurs utilisés dans ce projet sont performants, combinés, ils possèdent un pouvoir discriminant élevé, néanmoins, il est important de se tenir au courant des dernières connaissances scientifiques et la littérature évolutive sur les nouveaux tests et leurs performances. Récemment, deux indicateurs viraux de contamination fécale les plus abondant dans le système digestif humain ont reçu beaucoup d'attention dans la littérature. Il s'agit du bactériophage crAssphage et le PMMoV ou virus de la marbrure douce du poivre,

Les données environnementales sur les marqueurs spécifiques des sources de contamination fécale produites dans ce projet, obtenus sur différents milieux/matrices et dans différentes conditions hydro-climatiques sont un important apport aux diverses études de modélisation du devenir de ces marqueurs dans l'environnement et dans l'évaluation quantitative des risques microbiens (QMRA). En effet, de plus en plus de recherches travaillent sur une combinaison de l'approche MST et QMRA pour prédire les risques pour la santé liés aux activités récréatives en milieu aquatique.

RÉFÉRENCES

Ahmed, W., Goonetilleke, A., Powell, D., Chauhan, K., & Gardner, T. (2009). Comparison of molecular markers to detect fresh sewage in environmental waters. *Water Res, 43*(19), 4908-4917. doi:10.1016/j.watres.2009.09.047

Ahmed, W., Hamilton, K., Toze, S., Cook, S., & Page, D. (2019). A review on microbial contaminants in stormwater runoff and outfalls: Potential health risks and mitigation strategies. *Science of the Total Environment, 692*, 1304-1321. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.055

Ahmed, W., et al. (2015). Toolbox approaches using molecular markers and 16S rRNA gene amplicon data sets for identification of fecal pollution in surface water. *Applied and environmental microbiology, 81*(20), 7067-7077.

Alexander, M. (2000). Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. *Environmental Science & Technology, 34*(20), 4259-4265. doi:10.1021/es001069+

Aminot, Y., Fuster, L., Pardon, P., Le Menach, K., & Budzinski, H. (2018). Suspended solids moderate the degradation and sorption of waste water-derived pharmaceuticals in estuarine waters. *Science of the Total Environment, 612*, 39-48. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.162

Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G., & Pollio, A. (2002). Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research, 36*(11), 2869-2877. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6V73-44PDC2J-1-1J&_cdi=5831&_user=2101137&_pii=S0043135401005000&_origin=search&_coverDate=06%2F30%2F2002&_sk=999639988&view=c&wchp=dGLzVlz-zSkWW&md5=420d229310641ee733d2ddc6e23b1b8e&ie=/sdarticle.pdf

Ashbolt, N. J. (2004). Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology, 198*(1–3), 229-238. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2004.01.030

Ashbolt, N. J., Schoen, M. E., Soller, J. A., & Roser, D. J. (2010). Predicting pathogen risks to aid beach management: The real value of quantitative microbial risk assessment (QMRA). *Water Research, 44*(16), 4692-4703. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.048

Ashley, R. M., & Gasperi, J. (2004). *Solids in sewers characteristics, effects and control of sewer solids and associated pollutants*. London: IWA Publishing.

Azuma, T., et al. (2017). Distribution of six anticancer drugs and a variety of other pharmaceuticals, and their sorption onto sediments, in an urban Japanese river. *Environ Sci Pollut Res Int, 24*(23), 19021-19030. doi:10.1007/s11356-017-9525-0

Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science, 307*(5717), 1915-1920. doi:10.1126/science.1104816

Bagnis, S., Fitzsimons, M., Snape, J., Tappin, A., & Comber, S. (2018). Sorption of active pharmaceutical ingredients in untreated wastewater effluent and effect of dilution in freshwater: Implications for an "impact zone" environmental risk assessment approach. *Science of the Total Environment, 624*, 333-341. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.092

Baker, D. R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2013). Spatial and Temporal Occurrence of Pharmaceuticals and Illicit Drugs in the Aqueous Environment and During Wastewater Treatment: New Developments. *Science of the Total Environment, 454–455*, 442.

Balleste, E., & Blanch, A. R. (2010). Persistence of Bacteroides species populations in a river as measured by molecular and culture techniques. *Appl Environ Microbiol, 76*(22), 7608-7616. doi:10.1128/AEM.00883-10

Ballesté, E., Bonjoch, X., Belanche, L. A., & Blanch, A. R. (2010). Molecular Indicators Used in the Development of Predictive Models for Microbial Source Tracking. *Applied and Environmental Microbiology, 76*(6), 1789-1795. doi:10.1128/aem.02350-09

Banik, B. K., Di Cristo, C., Leopardi, A., & de Marinis, G. (2017). Illicit intrusion characterization in sewer systems. *Urban Water Journal, 14*(4), 416-426. doi:10.1080/1573062X.2016.1176220

Bell, A., Layton, A. C., McKay, L., Williams, D., Gentry, R., & Sayler, G. S. (2009). Factors influencing the persistence of fecal Bacteroides in stream water. *J Environ Qual, 38*(3), 1224-1232. doi:10.2134/jeq2008.0258

Benoist, A. P., & Lijklema, L. (1990). Distribution of Sedimentation-Rates of Suspended-Solids and Heavy-Metals in Combined Sewer Overflows. *Water Science and Technology, 22*(10-11), 61-68. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1990EK03400010

Benotti, M. J., & Brownawell, B. J. (2007). Distributions of Pharmaceuticals in an Urban Estuary during both Dry- and Wet-Weather Conditions. *Environmental Science & Technology, 41*(16), 5795-5802. doi:10.1021/es0629965

Bernhard, A. E., & Field, K. G. (2000a). Identification of Nonpoint Sources of Fecal Pollution in Coastal Waters by Using Host-Specific 16S Ribosomal DNA Genetic Markers from Fecal Anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology, 66*(4), 1587-1594. doi:10.1128/aem.66.4.1587-1594.2000

Bernhard, A. E., & Field, K. G. (2000b). A PCR assay To discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in Bacteroides-Prevotella genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol, 66*(10), 4571-4574. doi:10.1128/aem.66.10.4571-4574.2000

Berset, J. D., & Ochsenbein, N. (2012). Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Chemosphere, 88*(5), 563.

Besmer, M. D., Hammes, F., Sigrist, J. A., & Ort, C. (2017). Evaluating Monitoring Strategies to Detect Precipitation-Induced Microbial Contamination Events in Karstic Springs Used for Drinking Water. *Frontiers in Microbiology, 8*(2229). doi:10.3389/fmicb.2017.02229

Besner, M.-C., Broséus, R., Lavoie, J., Giovanni, G. D., Payment, P., & Prévost, M. (2009). Pressure Monitoring and Characterization of External Sources of Contamination at the Site of the Payment Drinking Water Epidemiological Studies. *Environmental Science & Technology, 44*(1), 269-277. doi:10.1021/es901988y

Bicudo, J. R., & Goyal, S. M. (2003). Pathogens and manure management systems: a review. *Environ Technol, 24*(1), 115-130. doi:10.1080/09593330309385542

Biel-Maeso, M., Corada-Fernández, C., & Lara-Martín, P. A. (2018). Monitoring the occurrence of pharmaceuticals in soils irrigated with reclaimed wastewater. *Environmental Pollution, 235*, 312-321. doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.085

Bižić-Ionescu, M., et al. (2015). Comparison of bacterial communities on limnic versus coastal marine particles reveals profound differences in colonization. *Environmental microbiology, 17*(10), 3500-3514.

Blais, M.-A., Côté, C., Villemur, R., Généreux, M., Cantin, P., & Villion, M. (2015). *Revue des méthodes de détermination de sources de contamination fécale de l'eau. Rapport présenté au ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques*. Retrieved from

Boehm, A. B., Graham, K. E., & Jennings, W. C. (2018). Can we swim yet? Systematic review, meta-analysis, and risk assessment of aging sewage in surface waters. *Environmental Science & Technology, 52*(17), 9634-9645.

Boehm, A. B., et al. (2013). Performance of forty-one microbial source tracking methods: a twenty-seven lab evaluation study. *Water Res, 47*(18), 6812-6828. doi:10.1016/j.watres.2012.12.046

Borrego, J. J., Arrabal, F., de Vicente, A., Gomez , L. F., & Romero, P. (1983). Study of Microbial Inactivation in the Marine Environment. *Water Pollution Control Federation, 55*, 297-302.

Boulard, L., Dierkes, G., Schlüsener, M. P., Wick, A., Koschorreck, J., & Ternes, T. A. (2020). Spatial distribution and temporal trends of pharmaceuticals sorbed to suspended particulate matter of German rivers. *Water Research, 171*, 115366. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115366

Bowman, J., Zhou, J., & Readman, J. (2002). Sediment–water interactions of natural oestrogens under estuarine conditions. *Marine Chemistry, 77*(4), 263-276.

Brouillette, D. (2007). Qualité de l'eau de la rivière des Mille-îles 2000-2005. Québec : Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. Direction du suivi de l'état de l'environnement.

Buckley, R., Clough, E., Warnken, W., & Wild, C. (1998). Coliform bacteria in streambed sediments in a subtropical rainforest conservation reserve. *Water Research, 32*(6), 1852-1856. doi:Doi 10.1016/S0043-1354(97)00414-4

Buerg, I. J., Poiger, T., Müller, M. D., & Buser, H.-R. (2003). Caffeine, an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters. *Environmental Science & Technology, 37*(4), 691-700. doi:10.1021/es020125z

Buerge, I. J., Buser, H. R., Kahle, M., Müller, M. D., & Poiger, T. (2009). Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: An ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater. *Environ. Sci. Technol., 43*(12), 4381.

Buerge, I. J., Poiger, T., Müller, M. D., & Buser, H. R. (2003). Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environmental Science & Technology, 37*(4), 691-700. doi:DOI 10.1021/es02015z

Buerge, I. J., Poiger, T., Müller, M. D., & Buser, H. R. (2006). Combined sewer overflows to surface waters detected by the anthropogenic marker caffeine. *Environ. Sci. Technol., 40*(13), 4096-4102. Retrieved from http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es052553l

Burnet, J.-B., Dinh, T. Q., Imbeault, S., Servais, P., Dorner, S., & Prévost, M. (2019). Autonomous online measurement of β-D-glucuronidase activity in surface water: is it suitable for rapid E. coli monitoring? *Water Research*. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.060

Burton, G. A., Gunnison, D., & Lanza, G. R. (1987). Survival of pathogenic bacteria in various freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology, 53*(4), 633-638. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC203727/

Butler, D., Digman, C. J., Makropoulos, C., & Davies, J. W. (2018). *Urban drainage*: Crc Press.

Caldwell, J. M., & Levine, J. F. (2009). Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *Journal of microbiological methods, 77*(1), 17-22.

Caldwell, J. M., Raley, M. E., & Levine, J. F. (2007). Mitochondrial multiplex real-time PCR as a source tracking method in fecal-contaminated effluents. *Environmental Science & Technology, 41*(9), 3277-3283.

Cann, K. F., Thomas, D. R., Salmon, R. L., Wyn-Jones, A. P., & Kay, D. (2013). Extreme water-related weather events and waterborne disease. *Epidemiology and infection, 141*(4), 671-686. doi:10.1017/S0950268812001653

Cantwell, M. G., Katz, D. R., Sullivan, J. C., Ho, K., Burgess, R. M., & Cashman, M. (2016). Selected pharmaceuticals entering an estuary: Concentrations, temporal trends, partitioning, and fluxes. *Environmental Toxicology and Chemistry, 35*(11), 2665-2673. doi:10.1002/etc.3452

Cao, Y., et al. (2013a). Evaluation of molecular community analysis methods for discerning fecal sources and human waste. *Water Res, 47*(18), 6862-6872. doi:10.1016/j.watres.2013.02.061

Cao, Y., Van De Werfhorst, L. C., Scott, E. A., Raith, M. R., Holden, P. A., & Griffith, J. F. (2013b). Bacteroidales terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) for fecal source differentiation in comparison to and in combination with universal bacteria TRFLP. *Water Res, 47*(18), 6944-6955. doi:10.1016/j.watres.2013.03.060

Cazals, M. (2019). *Application d'une nouvelle technologie de détection enzymatique pour le suivi en quasi-temps réel de la dynamique d'Escherichia coli dans des eaux récréatives.* Ecole Polytechnique, Montreal (Canada),

Čelić, M., Gros, M., Farré, M., Barceló, D., & Petrović, M. (2019). Pharmaceuticals as chemical markers of wastewater contamination in the vulnerable area of the Ebro Delta (Spain). *Sci Total Environ, 652*, 952-963. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.290

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. (2009). Méthode d'analyse. Recherche des coliformes totaux et de Escherichia coli avec le milieu de culture Colilert® : méthode présence/absence. Québec, Canada: Ministère du Développement durable, de

l'Environnement et des Parcs du Québec. Consulté le 01 mars 2015, tiré de http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA700Ecct10.pdf.

Chahal, C., van den Akker, B., Young, F., Franco, C., Blackbeard, J., & Monis, P. (2016). Pathogen and Particle Associations in Wastewater: Significance and Implications for Treatment and Disinfection Processes. *Advances in applied microbiology, 97*, 63-119. doi:10.1016/bs.aambs.2016.08.001

Characklis, G. W., Dilts, M. J., Simmons, O. D., 3rd, Likirdopulos, C. A., Krometis, L. A., & Sobsey, M. D. (2005). Microbial partitioning to settleable particles in stormwater. *Water Res, 39*(9), 1773-1782. doi:10.1016/j.watres.2005.03.004

Chebbo, G. (1992). *Solides des rejets pluviaux urbains: caractérisation et traitabilité.* Ecole Nationale des Ponts et Chaussées,

Chebbo, G., Bachoc, A., Laplace, D., & Leguennec, B. (1995). The Transfer of Solids in Combined Sewer Networks. *Water Science and Technology, 31*(7), 95-105. doi:Doi 10.1016/0273-1223(95)00327-J

Cheng, D., Liu, X., Zhao, S., Cui, B., Bai, J., & Li, Z. (2017). Influence of the natural colloids on the multi-phase distributions of antibiotics in the surface water from the largest lake in North China. *Science of the Total Environment, 578*, 649-659.

Cizek, A. R., et al. (2008). Comparing the partitioning behavior of Giardia and Cryptosporidium with that of indicator organisms in stormwater runoff. *Water Research, 42*(17), 4421-4438. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.06.020

Clara, M., Strenn, B., & Kreuzinger, N. (2004). Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Research, 38*(4), 947-954. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.058

Conseil des bassins versants des Mille-Îles. (2011). *Portrait préliminaire de la zone de gestion intégrée des ressources en eau des Mille-Îles - Résumé. 21 pages.* Retrieved from

Conseil des bassins versants des Mille-Îles. (2012). Contamination microbiologique. Consulté le 12 février 2015. http://www.cobamil.ca/sites/default/files/files/prob_A.pdf.

Conseil des bassins versants des Mille-Îles. (2014). *Diagnostic de la zone de gestion intégrée de l'eau par bassins versants du COBAMIL. Dans : Plan directeur de l'eau. 1ère édition, volume 3, vol. 1-5. Sainte-Thérèse, Québec*. Retrieved from

Coyne, M. J., & Comstock, L. E. (2008). Niche-specific features of the intestinal bacteroidales. *J Bacteriol, 190*(2), 736-742. doi:10.1128/JB.01559-07

Crabill, C., Donald, R., Snelling, J., Foust, R., & Southam, G. (1999). The impact of sediment fecal coliform reservoirs on seasonal water quality in Oak Creek, Arizona. *Water Research, 33*(9), 2163-2171. doi:Doi 10.1016/S0043-1354(98)00437-0

Craig, D. L., Fallowfield, H. J., & Cromar, N. J. (2003). Effectiveness of guideline faecal indicator organism values in estimation of exposure risk at recreational coastal sites. *Water Science and Technology, 47*(3), 191-198. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000181785000033

Craig, D. L., Fallowfield, H. J., & Cromar, N. J. (2004). Use of microcosms to determine persistence of Escherichia coli in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *J Appl Microbiol, 96*(5), 922-930. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02243.x

Criquet, J., et al. (2017). Comparison of POCIS passive samplers vs. composite water sampling: A case study. *Science of the Total Environment, 609*, 982-991. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.227

da Silva, B. F., Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A. A., Petrovic, M., & Barceló, D. (2011). Occurrence and Distribution of Pharmaceuticals in Surface Water, Suspended Solids and Sediments of the Ebro River Basin, Spain. *Chemosphere, 85*, 1331.

Daneshvar, A., et al. (2012). Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region. *Chemosphere, 88*(1), 131-139. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.03.016

Darwano, H., Duy, S. V., & Sauve, S. (2014). A new protocol for the analysis of pharmaceuticals, pesticides, and hormones in sediments and suspended particulate matter from rivers and municipal wastewaters. *Arch Environ Contam Toxicol, 66*(4), 582-593. doi:10.1007/s00244-014-0007-9

De Marsily, G. (1986). *Quantitative hydrogeology*. Retrieved from

Deffontis, S., Breton, A., Vialle, C., Montréjaud-Vignoles, M., Vignoles, C., & Sablayrolles, C. (2013). Impact of dry weather discharges on annual pollution from a separate storm sewer in Toulouse, France. *Science of the Total Environment, 452–453*(0), 394-403. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.014

Demeter, K., Burnet, J.-B., Stadler, P., Kirschner, A., Zessner, M., & Farnleitner, A. H. (2020). Automated online monitoring of fecal pollution in water by enzymatic methods. *Current Opinion in Environmental Science & Health, 16*, 82-91.

Derjaguin, B., & Landau, L. (1993). Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged-Particles in Solutions of Electrolytes. *Progress in Surface Science, 43*(1-4), 30-59. doi:Doi 10.1016/0079-6816(93)90013-L

Desmarais, T. R., Solo-Gabriele, H. M., & Palmer, C. J. (2002). Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl Environ Microbiol, 68*(3), 1165-1172. doi:10.1128/aem.68.3.1165-1172.2002

Dick, L. K., et al. (2005). Host distributions of uncultivated fecal Bacteroidales bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl Environ Microbiol, 71*(6), 3184-3191. doi:10.1128/AEM.71.6.3184-3191.2005

Dorner, S. (2011). *Impacts et adaptations aux changements climatiques des infrastructures municipales en eau de la rivière des Prairies. 5e Symposium scientifique d'Ouranos* . . Retrieved from http://www.ouranos.ca/fr/symposium/documents/Dorner2012.pdf

Dorner, S., et al. (2007b). Pathogen and indicator variability in a heavily impacted watershed. *J Water Health, 5*(2), 241-257. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17674573

Droppo, I. G. (2004). Structural controls on floc strength and transport. *Canadian Journal of Civil Engineering, 31*(4), 569-578. doi:Doi 10.1139/L04-015

Droppo, I. G., Flannigan, D. T., Leppard, G. G., Jaskot, C., & Liss, S. N. (1996). Floc stabilization for multiple microscopic techniques. *Appl Environ Microbiol, 62*(9), 3508-3515. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535412

Droppo, I. G., Irvine, K. N., & Jaskot, C. (2002). Flocculation/aggregation of cohesive sediments in the urban continuum: implications for stormwater management. *Environ Technol, 23*(1), 27-41. doi:10.1080/09593332508618433

Droppo, I. G., Liss, S. N., Williams, D., Nelson, T., Jaskot, C., & Trapp, B. (2009). Dynamic Existence of Waterborne Pathogens within River Sediment Compartments. Implications for Water Quality Regulatory Affairs. *Environmental Science & Technology, 43*(6), 1737-1743. doi:DOI 10.1021/es802321w

Drozd, M., Merrick, N. N., Sanad, Y. M., Dick, L. K., Dick, W. A., & Rajashekara, G. (2013). Evaluating the occurrence of host-specific , general fecal indicators, and bacterial pathogens in a mixed-use watershed. *J Environ Qual, 42*(3), 713-725. doi:10.2134/jeq2012.0359

Duan, Y.-P., Meng, X.-Z., Wen, Z.-H., Ke, R.-H., & Chen, L. (2013). Multi-phase partitioning, ecological risk and fate of acidic pharmaceuticals in a wastewater receiving river: The role of colloids. *Science of the Total Environment, 447*, 267-273. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.017

Dubinsky, E. A., Esmaili, L., Hulls, J. R., Cao, Y., Griffith, J. F., & Andersen, G. L. (2012). Application of phylogenetic microarray analysis to discriminate sources of fecal pollution. *Environ Sci Technol, 46*(8), 4340-4347. doi:10.1021/es2040366

Ebentier, D. L., et al. (2013). Evaluation of the repeatability and reproducibility of a suite of qPCR-based microbial source tracking methods. *Water Res, 47*(18), 6839-6848. doi:10.1016/j.watres.2013.01.060

Eckburg, P. B., et al. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science, 308*(5728), 1635-1638. doi:10.1126/science.1110591

Edge, T. A., Boyd, R. J., Shum, P., & Thomas, J. L. (2020). Microbial source tracking to identify fecal sources contaminating the Toronto Harbour and Don River watershed in wet and dry weather. *Journal of Great Lakes Research*. doi:https://doi.org/10.1016/j.jglr.2020.09.002

Eisenberg, J. N., Bartram, J., & Wade, T. J. (2016). The water quality in Rio highlights the global public health concern over untreated sewage. *Environmental health perspectives, 124*(10), A180-A181.

Ekklesia, E., Shanahan, P., Chua, L. H., & Eikaas, H. S. (2015b). Associations of chemical tracers and faecal indicator bacteria in a tropical urban catchment. *Water Res, 75*(0), 270-281. doi:10.1016/j.watres.2015.02.037

Ekklesia, E., Shanahan, P., Chua, L. H. C., & Eikaas, H. S. (2015a). Temporal variation of faecal indicator bacteria in tropical urban storm drains. *Water Research, 68*(0), 171-181. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.049

Ellis, J. B., & Butler, D. (2015). Surface water sewer misconnections in England and Wales: Pollution sources and impacts. *Science of The Total Environment, 526*(0), 98-109. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.042

Environnement Canada. (2013). Les pathogènes d'origine hydrique, Consulté le 26 mars 2015 Retrieved from http://www.ec.gc.ca/inre-nwri/default.asp?lang=Fr&n=2EA63F0E-1

Eriksson, L., & Axberg, C. (1981). Direct influence of wastewater pollutants on flocculation and sedimentation behaviour in biological wastewater treatment—I model system E. coli B. *Water Research, 15*(4), 421-431. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(81)90052-X

Fairbairn, D. J. (2015). *Sources, Transport, and Sediment-Water Distributions of Contaminants of Emerging Concern in a Mixed-Use Watershed.* University of Minnesota,

Fairbairn, D. J., et al. (2015). Sediment–water distribution of contaminants of emerging concern in a mixed use watershed. *Science of the Total Environment, 505*, 896-904. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.046

Fang, T., et al. (2018). Distribution comparison and risk assessment of free-floating and particle-attached bacterial pathogens in urban recreational water: Implications for water quality management. *Science of The Total Environment, 613-614*, 428-438. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.008

Feng, C., Guo, X., Yin, S., Tian, C., Li, Y., & Shen, Z. (2017). Heavy metal partitioning of suspended particulate matter–water and sediment–water in the Yangtze Estuary. *Chemosphere, 185*, 717-725. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.075

Field, K. G., & Samadpour, M. (2007). Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research, 41*(16), 3517-3538. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.056

Field, K. G., & Samadpour, M. (2007). Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research, 41*(16), 3517-3538. doi:10.1016/j.watres.2007.06.056

Figueroa-Diva, R. A., Vasudevan, D., & MacKay, A. A. (2010). Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. *Chemosphere, 79*(8), 786-793.

Fiksdal, L., Maki, J. S., LaCroix, S. J., & Staley, J. T. (1985). Survival and detection of Bacteroides spp., prospective indicator bacteria. *Appl Environ Microbiol, 49*(1), 148-150. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3919638

Fletcher, M. (1977). The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology, 23*(1), 1-6. doi:10.1139/m77-001

Fletcher, M., & Pringle, J. H. (1985). The effect of surface free energy and medium surface tension on bacterial attachment to solid surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science, 104*(1), 5-14. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0021-9797(85)90004-9

Fremaux, B., Gritzfeld, J., Boa, T., & Yost, C. K. (2009). Evaluation of host-specific Bacteroidales 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a prairie watershed. *Water Res, 43*(19), 4838-4849. doi:10.1016/j.watres.2009.06.045

Fries, J. S., Characklis, G. W., & Nobl, R. T. (2006). Attachment of Fecal Indicator Bacteria to Particles in the Neuse River Estuary, N.C. *Journal of Environmental Engineering, 132*(10), 1338-1345. doi:doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2006)132:10(1338)

Fries, J. S., Characklis, G. W., & Noble, R. T. (2008). Sediment-water exchange of Vibrio sp. and fecal indicator bacteria: implications for persistence and transport in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Water Res, 42*(4-5), 941-950. doi:10.1016/j.watres.2007.09.006

Garcia-Armisen, T. (2006). *Etude de la dynamique des Escherichia coli dans les rivières du bassin de la Seine.* Université Libre de Bruxelles,

Garcia-Armisen, T., & Servais, P. (2009). Partitioning and fate of particle-associated E. coli in river waters. *Water Environ Res, 81*(1), 21-28. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19280896

Gasperi, J. (2006). *Introduction et transfert des hydrocarbures à différentes échelles spatiales dans le réseau d'assainissement parisien.* Available from http://www.theses.fr/2006ENPC0615

Gasperi, J., Gromaire, M. C., Kafi, M., Moilleron, R., & Chebbo, G. (2010). Contributions of wastewater, runoff and sewer deposit erosion to wet weather pollutant loads in combined sewer systems. *Water Research, 44*(20), 5875-5886. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.008

Gasperi, J., Zgheib, S., Cladiere, M., Rocher, V., Moilleron, R., & Chebbo, G. (2012). Priority pollutants in urban stormwater: part 2 - case of combined sewers. *Water Res, 46*(20), 6693-6703. doi:10.1016/j.watres.2011.09.041

Gerba, C. P., & McLeod, J. S. (1976). Effect of sediments on the survival of Escherichia coli in marine waters. *Appl Environ Microbiol, 32*(1), 114-120. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/788634

Glassmeyer, S. T., et al. (2005). Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: Potential use as indicators of human fecal contamination. *Environ. Sci. Technol., 39*, 5157.

Gokulakrishnan, S., Chandraraj, K., & Gummadi, S. N. (2005). Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and Microbial Technology, 37*(2), 225-232. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.03.004

Gouvernement du Québec. (2012). Stratégie de protection et de conservation des sources destinées à l'alimentation en eau potable. In.

Graczyk, T. K., Majewska, A. C., & Schwab, K. J. (2008). The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends Parasitol, 24*(2), 55-59. doi:10.1016/j.pt.2007.10.007

Griffith, J. F., et al. (2013). The California microbial source identification manual: A tiered approach to identifying fecal pollution sources to beaches. *Southern California Coastal Water Research Project, Costa Mesa, CA*.

Gromaire, M. C., Garnaud, S., Saad, M., & Chebbo, G. (2001). Contribution of different sources to the pollution of wet weather flows in combined sewers. *Water Res, 35*(2), 521-533. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00261-X

Guerineau, H., et al. (2014). Source tracking of leaky sewers: a novel approach combining fecal indicators in water and sediments. *Water Res, 58*(0), 50-61. doi:10.1016/j.watres.2014.03.057

Guo, Y. C., & Krasner, S. W. (2009). Occurrence of primidone, carbamazepine, caffeine, and precursors for N-nitrosodimethylamine in drinking water sources impacted by wastewater. *Journal of the American Water Resources Association, 45*(1), 58-67. doi:10.1111/j.1752-1688.2008.00289.x

Hagedorn, C., & Weisberg, S. B. (2009). Chemical-based fecal source tracking methods: current status and guidelines for evaluation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 8*(3), 275-287. doi:10.1007/s11157-009-9162-2

Hajj-Mohamad, M. (2016). *Sources de contamination fécale des cours d'eau urbains.* (Ph.D.). Polytechnique Montréal, Montréal, QC, Canada. Retrieved from https://publications.polymtl.ca/2159/

Hajj-Mohamad, M., et al. (2014). Wastewater micropollutants as tracers of sewage contamination: analysis of combined sewer overflow and stream sediments. *Environ Sci Process Impacts, 16*(10), 2442-2450. doi:10.1039/c4em00314d

Hajj-Mohamad, M., et al. (2017). The distribution dynamics and desorption behaviour of mobile pharmaceuticals and caffeine to combined sewer sediments. *Water Research, 108*, 57-67. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.053

Hajj-Mohamad, M., et al. (2019). Fecal contamination of storm sewers: Evaluating wastewater micropollutants, human-specific Bacteroides 16S rRNA, and mitochondrial DNA genetic markers as alternative indicators of sewer cross connections. *Science of the Total Environment, 659*, 548-560. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.378

Harwood, V. J., et al. (2013). Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. *Water Res, 47*(18), 6929-6943. doi:10.1016/j.watres.2013.04.064

Harwood, V. J., Staley, C., Badgley, B. D., Borges, K., & Korajkic, A. (2014). Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol Rev, 38*(1), 1-40. doi:10.1111/1574-6976.12031

He, K., Echigo, S., Asada, Y., & Itoh, S. (2018). Determination of Caffeine and Its Metabolites in Wastewater Treatment Plants Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Sci, 34*(3), 349-354. doi:10.2116/analsci.34.349

He, X., et al. (2016). Evaluation of five microbial and four mitochondrial DNA markers for tracking human and pig fecal pollution in freshwater. *Scientific reports, 6*, 35311.

Henry, L.-A. (2004). *Partitioning between Soil-adsorbed and Planktonic Escherichia coli.* Virginia Tech,

Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., & Guerrero, C. (2007). Antibiotic Residue Determination in Environmental Waters by LC-MS. *TrAC, Trends Anal. Chem., 26*, 466.

Hoes, O. A. C., Schilperoort, R. P. S., Luxemburg, W., Clemens, F., & Van de Giesen, N. (2009). Locating illicit connections in storm water sewers using fiber-optic distributed temperature sensing. *Water Research, 43*(20), 5187-5197.

Holcomb, D. A., & Stewart, J. R. (2020). Microbial Indicators of Fecal Pollution: Recent Progress and Challenges in Assessing Water Quality. *Current Environmental Health Reports, 7*(3), 311-324. doi:10.1007/s40572-020-00278-1

Hong, P. Y., Wu, J. H., & Liu, W. T. (2008). Relative abundance of Bacteroides spp. in stools and wastewaters as determined by hierarchical oligonucleotide primer extension. *Appl Environ Microbiol, 74*(9), 2882-2893. doi:10.1128/AEM.02568-07

Hyer, K. E. (2007). *A multiple-tracer approach for identifying sewage sources to an urban stream system* (2328-0328). Retrieved from

Irvine, K., Rossi, M. C., Vermette, S., Bakert, J., & Kleinfelder, K. (2011). Illicit discharge detection and elimination: Low cost options for source identification and trackdown in stormwater systems. *Urban Water Journal, 8*(6), 379-395.

Ishii, S., Meyer, K. P., & Sadowsky, M. J. (2007). Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of Escherichia coli strains from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol, 73*(18), 5703-5710. doi:10.1128/AEM.00275-07

James, C. A., Miller-Schulze, J. P., Ultican, S., Gipe, A. D., & Baker, J. E. (2016). Evaluating Contaminants of Emerging Concern as tracers of wastewater from septic systems. *Water Research, 101*, 241-251. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.046

Jamieson, R., Joy, D. M., Lee, H., Kostaschuk, R., & Gordon, R. (2005). Transport and deposition of sediment-associated Escherichia coli in natural streams. *Water Res, 39*(12), 2665-2675. doi:10.1016/j.watres.2005.04.040

Jamieson, R., Joy, D. M., Lee, H., Kostaschuk, R., & Gordon, R. J. (2004). Persistence of enteric bacteria in alluvial streams. *Journal of Environmental Engineering & Science, 3*(3), 203-212. doi:10.1139/S04-001

Jamieson, R., R., G., Joy, D., & Lee, H. (2004). Assessing microbial pollution of rural surface waters - A review of current watershed scale modeling approaches. *Agricultural Water Management, 70*(1), 1-17. doi:DOI 10.1016/j.agwat.2004.05.006

Jelic, A., et al. (2011). Occurrence, Partition and Removal of Pharmaceuticals in Sewage Water and Sludge During Wastewater Treatment. *Water Res., 45*, 1165.

Jeng, H. C., England, A. J., & Bradford, H. B. (2005). Indicator organisms associated with stormwater suspended particles and estuarine sediment. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 40*(4), 779-791. doi:10.1081/ESE-200048264

Jeter, S. N., et al. (2009). Bacteroidales diversity in ring-billed gulls (Laurus delawarensis) residing at Lake Michigan beaches. *Appl Environ Microbiol, 75*(6), 1525-1533. doi:10.1128/AEM.02261-08

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Microbiol, 2*(2), 123-140. doi:10.1038/nrmicro818

Kapoor, V., Smith, C., Santo Domingo, J. W., Lu, T., & Wendell, D. (2013). Correlative Assessment of Fecal Indicators using Human Mitochondrial DNA as a Direct Marker. *Environmental Science & Technology, 47*(18), 10485-10493. doi:10.1021/es4020458

Karnjanapiboonwong, A., Morse, A. N., Maul, J. D., & Anderson, T. A. (2010). Sorption of estrogens, triclosan, and caffeine in a sandy loam and a silt loam soil. *Journal of Soils and Sediments, 10*(7), 1300-1307.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2009). Illicit drugs and pharmaceuticals in the environment--forensic applications of environmental data, Part 2: Pharmaceuticals as chemical markers of faecal water contamination. *Environ Pollut, 157*(6), 1778-1786. doi:10.1016/j.envpol.2009.02.019

Kildare, B. J., Leutenegger, C. M., McSwain, B. S., Bambic, D. G., Rajal, V. B., & Wuertz, S. (2007). 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: a Bayesian approach. *Water Res, 41*(16), 3701-3715. doi:10.1016/j.watres.2007.06.037

Kim, M., Gutierrez-Cacciabue, D., Schriewer, A., Rajal, V. B., & Wuertz, S. (2014). Evaluation of detachment methods for the enumeration of Bacteroides fragilis in sediments via propidium monoazide quantitative PCR, in comparison with Enterococcus faecalis and Escherichia coli. *J Appl Microbiol, 117*(5), 1513-1522. doi:10.1111/jam.12630

Kolpin, D. W., Skopec, M., Meyer, M. T., Furlong, E. T., & Zaugg, S. D. (2004). Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of the Total Environment, 328*(1-3), 119-130. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.01.015

Kortbaoui, R., Locas, A., Imbeau, M., Payment, P., & Villemur, R. (2009). Universal mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-tracking method of human, bovine, chicken, ovine, and porcine in fecal-contaminated surface water. *Water Research, 43*(7), 2002-2010.

Kreader, C. A. (1995). Design and evaluation of Bacteroides DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. *Appl Environ Microbiol, 61*(4), 1171-1179. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7538270

Kreader, C. A. (1998). Persistence of PCR-detectable Bacteroides distasonis from human feces in river water. *Appl Environ Microbiol, 64*(10), 4103-4105. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9758854

Krometis, L. A., Characklis, G. W., Simmons, O. D., 3rd, Dilts, M. J., Likirdopulos, C. A., & Sobsey, M. D. (2007). Intra-storm variability in microbial partitioning and microbial loading rates. *Water Res, 41*(2), 506-516. doi:10.1016/j.watres.2006.09.029

Lahti, M., & Oikari, A. (2011). Pharmaceuticals in settleable particulate material in urban and non-urban waters. *Chemosphere, 85*(5), 826-831. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.084

Lam, M. W., et al. (2004). Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry, 23*(6), 1431-1440. Retrieved from <Go to ISI>://000221825600010

Lamendella, R., Domingo, J. W., Oerther, D. B., Vogel, J. R., & Stoeckel, D. M. (2007). Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and phylogenetic analyses of Bacteroidetes 16S rRNA gene. *FEMS Microbiol Ecol, 59*(3), 651-660. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00211.x

Lara-Martín, P. A., González-Mazo, E., Petrovic, M., Barceló, D., & Brownawell, B. J. (2014a). Occurrence, distribution and partitioning of nonionic surfactants and pharmaceuticals in the urbanized Long Island Sound Estuary (NY). *Marine Pollution Bulletin, 85*(2), 710-719. doi:https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.022

Lara-Martín, P. A., González-Mazo, E., Petrovic, M., Barceló, D., & Brownawell, B. J. (2014b). Occurrence, distribution and partitioning of nonionic surfactants and pharmaceuticals in the urbanized Long Island Sound Estuary (NY). *Marine Pollution Bulletin, 85*(2), 710-719. doi:https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.022

Layton, B. A., et al. (2013). Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. *Water Res, 47*(18), 6897-6908. doi:10.1016/j.watres.2013.05.060

Leclercq, M., Mathieu, O., Gomez, E., Casellas, C., Fenet, H., & Hillaire-Buys, D. (2008). Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 56*(3), 408. doi:10.1007/s00244-008-9202-x

Lee, D. Y., Weir, S. C., Lee, H., & Trevors, J. T. (2010). Quantitative identification of fecal water pollution sources by TaqMan real-time PCR assays using Bacteroidales 16S rRNA genetic markers. *Applied Microbiology and Biotechnology, 88*(6), 1373-1383. doi:10.1007/s00253-010-2880-0

Lee, H., Swamikannu, X., Radulescu, D., Kim, S. j., & Stenstrom, M. K. (2007). Design of stormwater monitoring programs. *Water Research, 41*(18), 4186-4196.

Leecaster, M. K., Schiff, K., & Tiefenthaler, L. L. (2002). Assessment of efficient sampling designs for urban stormwater monitoring. *Water Research, 36*(6), 1556-1564.

Lessard, P., & Beck, M. B. (1988). Dynamic Modeling of Primary Sedimentation. *Journal of Environmental Engineering, 114*(4), 753-769. doi:10.1061/(asce)0733-9372(1988)114:4(753)

Li, E., Saleem, F., Edge, T. A., & Schellhorn, H. E. (2021). Biological Indicators for Fecal Pollution Detection and Source Tracking: A Review. *Processes, 9*(11), 2058. Retrieved from https://www.mdpi.com/2227-9717/9/11/2058

Lienert, J., Gudel, K., & Escher, B. I. (2007). Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. *Environmental Science & Technology, 41*(12), 4471-4478. doi:10.1021/es0627693

Lim, F., Ong, S., & Hu, J. (2017). Recent Advances in the Use of Chemical Markers for Tracing Wastewater Contamination in Aquatic Environment: A Review. *Water, 9*(2), 143. Retrieved from http://www.mdpi.com/2073-4441/9/2/143

Lin, A. Y.-C., Lin, C.-A., Tung, H.-H., & Chary, N. S. (2010). Potential for biodegradation and sorption of acetaminophen, caffeine, propranolol and acebutolol in lab-scale aqueous environments. *Journal of Hazardous Materials, 183*(1), 242-250. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.017

Liss, S. N., Droppo, I. G., Flannigan, D. T., & Leppard, G. G. (1996). Floc architecture in wastewater and natural riverine systems. *Environmental Science & Technology, 30*(2), 680-686. doi:DOI 10.1021/es950426r

Liu, G., Ling, F. Q., Magic-Knezev, A., Liu, W. T., Verberk, J. Q. J. C., & Van Dijk, J. C. (2013). Quantification and identification of particle-associated bacteria in unchlorinated drinking water from three treatment plants by cultivation-independent methods. *Water Research, 47*(10), 3523-3533. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.058

Liu, J., Dan, X., Lu, G., Shen, J., Wu, D., & Yan, Z. (2018). Investigation of pharmaceutically active compounds in an urban receiving water: Occurrence, fate and environmental risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 154*, 214-220. doi:https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.052

Loffler, D., Rombke, J., Meller, M., & Ternes, T. A. (2005). Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environ Sci Technol, 39*(14), 5209-5218.

Lorphensri, O., Intravijit, J., Sabatini, D. A., Kibbey, T. C. G., Osathaphan, K., & Saiwan, C. (2006). Sorption of acetaminophen, 17α-ethynyl estradiol, nalidixic acid, and norfloxacin to silica, alumina, and a hydrophobic medium. *Water Research, 40*(7), 1481-1491. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.02.003

Loutit, M. W., & Lewis, G. (2010). Faecal bacteria from sewage effluent in sediments around an ocean outfall. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 19*(2), 179-185. doi:10.1080/00288330.1985.9516085

Lu, J., Santo Domingo, J., & Shanks, O. C. (2007). Identification of chicken-specific fecal microbial sequences using a metagenomic approach. *Water Res, 41*(16), 3561-3574. doi:10.1016/j.watres.2007.05.033

Luef, B., Aspetsberger, F., Hein, T., Huber, F., & Peduzzi, P. (2007). Impact of hydrology on free-living and particle-associated microorganisms in a river floodplain system (Danube, Austria). *Freshwater Biology, 52*(6), 1043-1057.

Lv, M., et al. (2014). Pharmaceuticals and personal care products in a mesoscale subtropical watershed and their application as sewage markers. *Journal of Hazardous Materials, 280*, 696-705. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.054

Mackay, A., & Taylor, M. (2012). Event-based water quality sampling method for application in remote rivers. *River Research and Applications, 28*(8), 1105-1112.

Mackay, A., & Vasudevan, D. (2012). Polyfunctional ionogenic compound sorption: challenges and new approaches to advance predictive models. *Environmental Science & Technology, 46*(17), 9209-9223.

Mader, B. T., Uwe-Goss, K., & Eisenreich, S. J. (1997). Sorption of Nonionic, Hydrophobic Organic Chemicals to Mineral Surfaces. *Environmental Science & Technology, 31*(4), 1079-1086. doi:10.1021/es960606g

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Fernández, M. G., Fernández, C. R., & Pérez, M. S. (2004). *Brock Biología de los microorganismos* (Vol. 10): prentice hall.

Madoux-Humery, A. S., et al. (2013). Temporal variability of combined sewer overflow contaminants: evaluation of wastewater micropollutants as tracers of fecal contamination. *Water Res, 47*(13), 4370-4382. doi:10.1016/j.watres.2013.04.030

Madoux-Humery, A. S., et al. (2016). The effects of combined sewer overflow events on riverine sources of drinking water. *Water Res, 92*, 218-227. doi:10.1016/j.watres.2015.12.033

Madyastha, K. M., Sridhar, G. R., Vadiraja, B. B., & Madhavi, Y. S. (1999). Purification and partial characterization of caffeine oxidase - A novel enzyme from a mixed culture consortium. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 263*(2), 460-464. Retrieved from <Go to ISI>://000083016400035

Maharjan, B., Pachel, K., & Loigu, E. (2016). Towards effective monitoring of urban stormwater for better design and management. *Estonian Journal of Earth Sciences, 65*(3), 176.

Mahler, B. J., Personne, J. C., Lods, G. F., & Drogue, C. (2000). Transport of free and particulate-associated bacteria in karst. *Journal of Hydrology, 238*(3-4), 179-193. doi:Doi 10.1016/S0022-1694(00)00324-3

Malla, B., & Haramoto, E. (2020). Host-specific mitochondrial DNA markers for tracking the sources of fecal pollution. *Current Opinion in Environmental Science & Health, 16*, 34-46. doi:https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.02.006

MAMROT. (2013). Suivi des Ouvrages Municipaux d'Assainissement des Eaux (SOMAE). Portail gouvernemental des affaires municipales et régionales. [Consulté le 16 février 2015]. Disponible à l'adresse : https://somae.mamr.gouv.qc.ca/SOMAE.nsf.

Marsalek, J., & Rochfort, Q. (2004). URBAN WET-WEATHER FLOWS: SOURCES OF FECAL CONTAMINATION IMPACTING ON RECREATIONAL WATERS AND THREATENING DRINKING-WATER SOURCES. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 67*(20-22), 1765-1777. doi:10.1080/15287390490492430

Martellini, A., Payment, P., & Villemur, R. (2005). Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Research, 39*(4), 541-548. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.012

Marti, R., et al. (2013). Quantitative multi-year elucidation of fecal sources of waterborne pathogen contamination in the South Nation River basin using Bacteroidales microbial source tracking markers. *Water Research, 47*(7), 2315-2324. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.009

Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Herrera, S., Arranz, E., & de Bustamante, I. (2014). Sorption/desorption of non-hydrophobic and ionisable pharmaceutical and personal care products from reclaimed water onto/from a natural sediment. *Science of the Total Environment, 472*(0), 273-281. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.036

Martínez-López, S., Sarriá, B., Gómez-Juaristi, M., Goya, L., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2014). Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *Food Research International, 63*, 446-455. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.009

Maskaoui, K., & Zhou, J. L. (2010). Colloids as a sink for certain pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research, 17*(4), 898-907. doi:DOI 10.1007/s11356-009-0279-1

Matamoros, V., Duhec, A., Albaiges, J., & Bayona, J. M. (2009). Photodegradation of Carbamazepine, Ibuprofen, Ketoprofen and 17 alpha-Ethinylestradiol in Fresh and Seawater. *Water Air and Soil Pollution, 196*(1-4), 161-168. doi:10.1007/s11270-008-9765-1

Mateo-Sagasta, J., Zadeh, S. M., Turral, H., & Burke, J. (2017). Water pollution from agriculture: a global review. Executive summary.

Mauffret, A., Caprais, M.-P., & Gourmelon, M. (2012). Relevance of Bacteroidales and F-specific RNA bacteriophages for efficient fecal contamination tracking at the level of a catchment in France. *Applied and environmental microbiology, 78*(15), 5143-5152.

Mawhinney, D. B., Young, R. B., Vanderford, B. J., Borch, T., & Snyder, S. A. (2011). Artificial sweetener sucralose in U.S. drinking water systems. *Environ Sci Technol, 45*(20), 8716-8722. doi:10.1021/es202404c

Mazzafera, P. (2002). Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. *Scientia Agricola, 59*, 815-821. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162002000400030&nrm=iso

McFadden, N. (2006). *Guide d'élaboration d'un plan d'action pour l'élimination des raccordements inversés dans les réseaux de collecte d'eaux usées municipales*. Retrieved from http://www.mamr.gouv.qc.ca

McGinnis, S., et al. (2018). Human Bacteroides and total coliforms as indicators of recent combined sewer overflows and rain events in urban creeks. *Science of the Total Environment, 630*, 967-976. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.108

McLellan, S. L., & Eren, A. M. (2014). Discovering new indicators of fecal pollution. *Trends in microbiology, 22*(12), 697-706.

MDDEFP. (2012). La qualité de l'eau et les usages récréatifs. [Consulté le 20 mars 2015]. http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/recreative/consequence.htm. Retrieved from http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/recreative/consequence.htm

Meays, C. L., Broersma, K., Nordin, R., & Mazumder, A. (2004). Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *J Environ Manage, 73*(1), 71-79. doi:10.1016/j.jenvman.2004.06.001

MELCC. (2018). *Guide de réalisation des analyses de la vulnérabilité des sources destinées à l'alimentation en eau potable au Québec*. Retrieved from http://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/prelevements/guide-analyse-vulnerabilite-des-sources.pdf

Miege, C., Choubert, J., Ribeiro, L., Eusèbe, M., & Coquery, M. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants–conception of a database and first results. *Environmental Pollution, 157*(5), 1721-1726.

Milne, D., Curran, J., & Wilson, L. (1986). Effects of sedimentation on removal of faecal coliform bacteria from effluents in estuarine water. *Water Research, 20*(12), 1493-1496. doi:10.1016/0043-1354(86)90112-0

Mohapatra, B. R., Harris, N., Nordin, R., & Mazumder, A. (2006). Purification and characterization of a novel caffeine oxidase from Alcaligenes species. *Journal of Biotechnology, 125*(3), 319-327. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.03.018

Mohle, E., & Metzger, J. W. (2001). Drugs in municipal sewage effluents: Screening and biodegradation studies. *ACS Symposium Series, 791*, 192-205.

Morissette, M. F., Vo Duy, S., Arp, H. P. H., & Sauvé, S. (2015). Sorption and desorption of diverse contaminants of varying polarity in wastewater sludge with and without alum. *Environmental Science: Processes & Impacts, 17*(3), 674-682. doi:10.1039/C4EM00620H

Munro, K., et al. (2019). Evaluation of combined sewer overflow impacts on short-term pharmaceutical and illicit drug occurrence in a heavily urbanised tidal river catchment (London, UK). *Science of the Total Environment, 657*, 1099-1111. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.108

Nakada, N., et al. (2008). Evaluation of pharmaceuticals and personal care products as water-soluble molecular markers of sewage. *Environmental Science & Technology, 42*(17), 6347-6353. doi:DOI 10.1021/es7030856

Newbold, J. D., Elwood, J. W., O'Neill, R. V., & Winkle, W. V. (1981). Measuring Nutrient Spiralling in Streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 38*(7), 860-863. doi:10.1139/f81-114

Nshimyimana, J. P., Ekklesia, E., Shanahan, P., Chua, L. H. C., & Thompson, J. R. (2014). Distribution and abundance of human-specific Bacteroides and relation to traditional indicators in an urban tropical catchment. *Journal of Applied Microbiology*, n/a-n/a. doi:10.1111/jam.12455

Okabe, S., & Shimazu, Y. (2007). Persistence of host-specific Bacteroides-Prevotella 16S rRNA genetic markers in environmental waters: effects of temperature and salinity. *Applied Microbiology and Biotechnology, 76*(4), 935-944. doi:10.1007/s00253-007-1048-z

Olds, H. T., Corsi, S. R., Dila, D. K., Halmo, K. M., Bootsma, M. J., & McLellan, S. L. (2018). High levels of sewage contamination released from urban areas after storm events: A quantitative survey with sewage specific bacterial indicators. *PLoS medicine, 15*(7), e1002614-e1002614. doi:10.1371/journal.pmed.1002614

Oliver, D. M., Clegg, C. D., Heathwaite, A. L., & Haygarth, P. M. (2007). Preferential attachment of Escherichia coli to different particle size fractions of an agricultural grassland soil. *Water Air and Soil Pollution, 185*(1-4), 369-375. doi:DOI 10.1007/s11270-007-9451-8

Oppenheimer, J., Eaton, A., Badruzzaman, M., Haghani, A. W., & Jacangelo, J. G. (2011). Occurrence and suitability of sucralose as an indicator compound of wastewater loading to surface waters in urbanized regions. *Water Res, 45*(13), 4019-4027. doi:10.1016/j.watres.2011.05.014

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2004). *Theophilline (CAS-No. 58-55-9)*. Retrieved from http://www.inchem.org/documents/sids/sids/THEOPHIL.pdf

Pachepsky, Y. A., & Shelton, D. R. (2011). Escherichia Coli and Fecal Coliforms in Freshwater and Estuarine Sediments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 41*(12), 1067-1110. doi:10.1080/10643380903392718

Panasiuk, O., Hedström, A., Marsalek, J., Ashley, R. M., & Viklander, M. (2015). Contamination of stormwater by wastewater: A review of detection methods. *Journal of Environmental Management, 152*, 241-250. doi:https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.01.050

Paris, T., & Chesnot, T. (2010). *Étude concernant l'origine fécale des contaminations microbiennes*. Retrieved from IPL Santé environnement durable EST:

Parveen, B., et al. (2011). Diversity and dynamics of free-living and particle-associated Betaproteobacteria and Actinobacteria in relation to phytoplankton and zooplankton communities. *FEMS microbiology ecology, 77*(3), 461-476.

Petelet-Giraud, E., Baran, J., David, J., Soulier, C., & Coureau, C. (2019). *Identifier la présence d'eaux usées domestiques dans les ressources en eaux : approche méthodologique*. Retrieved from https://docplayer.fr/197415929-Identifier-la-presence-d-eaux-usees-domestiques-dans-les-ressources-en-eaux-approche-methodologique-rapport-final.html

Petrie, B., Barden, R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A Review on Emerging Contaminants in Wastewaters and the Environment: Current Knowledge, Understudied Areas and Recommendations for Future Monitoring. *Water Res., 72*, 3.

Pettibone, G. W., Irvine, K. N., & Monahan, K. M. (1996). Impact of a ship passage on bacteria levels and suspended sediment characteristics in the Buffalo River, New York. *Water Research, 30*(10), 2517-2521. doi:Doi 10.1016/0043-1354(96)00135-2

Phillips, P. J., Chalmers, A. T., Gray, J. L., Kolpin, D. W., Foreman, W. T., & Wall, G. R. (2012). Combined Sewer Overflows: An Environmental Source of Hormones and Wastewater Micropollutants. *Environmental Science & Technology, 46*(10), 5336-5343. doi:10.1021/es3001294

Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., & Girones, R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology, 64*(9), 3376-3382. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000075892200037

Piocos, E. A., & de la Cruz, A. A. (2000). Solid phase extraction and high performance liquid chromatography with photodiode array detection of chemical indicators of human fecal contamination in water. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 23*(8), 1281-1291. Retrieved from <Go to ISI>://000087345800010

Pitt, R. (2004). Illicit Discharge Detection and Elimination. A Guidance Manual for Program Development and Technical Assessments. *Tech. Rep*.

Plummer, D. H., Owens, N. J., & Herbert, R. A. (1987). Bacteria—particle interactions in turbid estuarine environments. *Continental Shelf Research, 7*(11), 1429-1433.

Poopipattana, C., Suzuki, M., & Furumai, H. (2021). Impact of long-duration CSO events under different tidal change conditions on distribution of microbial indicators and PPCPs in Sumida river estuary of Tokyo Bay, Japan. *Environmental Science and Pollution Research, 28*(6), 7212-7225. doi:10.1007/s11356-020-11046-x

Qualls, R. G., Flynn, M. P., & Johnson, J. D. (1983). The Role of Suspended Particles in Ultraviolet Disinfection. *Journal (Water Pollution Control Federation), 55*(10), 1280-1285. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/25042084

Ram, J. L., Thompson, B., Turner, C., Nechvatal, J. M., Sheehan, H., & Bobrin, J. (2007). Identification of pets and raccoons as sources of bacterial contamination of urban storm sewers using a sequence-based bacterial source tracking method. *Water Research, 41*(16), 3605-3614.

Rehmann, C. R., & Soupir, M. L. (2009). Importance of interactions between the water column and the sediment for microbial concentrations in streams. *Water Res, 43*(18), 4579-4589. doi:10.1016/j.watres.2009.06.049

Reischer, G. H., et al. (2013). Performance characteristics of qPCR assays targeting human- and ruminant-associated bacteroidetes for microbial source tracking across sixteen countries on six continents. *Environ Sci Technol, 47*(15), 8548-8556. doi:10.1021/es304367t

Revitt, D. M., & Ellis, J. B. (2016). Urban surface water pollution problems arising from misconnections. *Science of the Total Environment, 551-552*, 163-174. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.198

Rösel, S., Allgaier, M., & Grossart, H.-P. (2012). Long-term characterization of free-living and particle-associated bacterial communities in Lake Tiefwaren reveals distinct seasonal patterns. *Microbial ecology, 64*(3), 571-583.

Roslev, P., & Bukh, A. S. (2011). State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Applied Microbiology and Biotechnology, 89*(5), 1341-1355. doi:10.1007/s00253-010-3080-7

Rossi, L., Krejci, V., Rauch, W., Kreikenbaum, S., Fankhauser, R., & Gujer, W. (2005). Stochastic modeling of total suspended solids (TSS) in urban areas during rain events. *Water Research, 39*(17), 4188-4196. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.041

Sambito, M., Di Cristo, C., Freni, G., & Leopardi, A. (2019). Optimal water quality sensor positioning in urban drainage systems for illicit intrusion identification. *Journal of Hydroinformatics, 22*(1), 46-60. doi:10.2166/hydro.2019.036

Sankararamakrishnan, N., & Guo, Q. (2005). Chemical tracers as indicator of human fecal coliforms at storm water outfalls. *Environment International, 31*(8), 1133-1140. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2005.04.002

Sauer, E. P., VandeWalle, J. L., Bootsma, M. J., & McLellan, S. L. (2011). Detection of the human specific Bacteroides genetic marker provides evidence of widespread sewage contamination of stormwater in the urban environment. *Water Research, 45*(14), 4081-4091. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.049

Saunders, A. M., Kristiansen, A., Lund, M. B., Revsbech, N. P., & Schramm, A. (2009). Detection and persistence of fecal Bacteroidales as water quality indicators in unchlorinated drinking water. *Syst Appl Microbiol, 32*(5), 362-370. doi:10.1016/j.syapm.2008.11.004

Sauve, S., Aboulfadl, K., Dorner, S., Payment, P., Deschamps, G., & Prevost, M. (2012). Fecal coliforms, caffeine and carbamazepine in stormwater collection systems in a large urban area. *Chemosphere, 86*(2), 118-123. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.09.033

Savichtcheva, O., Okayama, N., & Okabe, S. (2007). Relationships between Bacteroides 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Res, 41*(16), 3615-3628. doi:10.1016/j.watres.2007.03.028

Sayler, G. S., Nelson, J. D., Jr., Justice, A., & Colwell, R. R. (1975). Distribution and significance of fecal indicator organisms in the Upper Chesapeake Bay. *Appl Microbiol, 30*(4), 625-638. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/811167

Schaffer, M., Boxberger, N., Börnick, H., Licha, T., & Worch, E. (2012). Sorption influenced transport of ionizable pharmaceuticals onto a natural sandy aquifer sediment at different pH. *Chemosphere, 87*(5), 513-520. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.053

Scheili, A., Delpla, I., Sadiq, R., & Rodriguez, M. J. (2016). Impact of Raw Water Quality and Climate Factors on the Variability of Drinking Water Quality in Small Systems. *Water Resources Management, 30*(8), 2703-2718. doi:10.1007/s11269-016-1312-z

Scheurer, M., Brauch, H. J., & Lange, F. T. (2009). Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Anal. Bioanal. Chem., 394*(6), 1585.

Schill, W., & Mathes, M. (2008). Real-time PCR detection and quantification of nine potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome b targets. *Environmental Science & Technology, 42*(14), 5229-5234. doi:10.1021/es800051z

Schriewer, A., et al. (2010). Presence of Bacteroidales as a predictor of pathogens in surface waters of the central California coast. *Appl Environ Microbiol, 76*(17), 5802-5814. doi:10.1128/AEM.00635-10

Schueler, T. R. (1987). Controlling urban runoff: a practical manual for planning and designing urban BMPs. *Department of Environmental Programs. Metropolitan Washington Council of Governments, Washington, DC.* Schwarzenbach, R., Gschwend, P., & Imboden, D. (2003). *Environmental organic chemistry*.

Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., & Lukasik, J. (2002). Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol, 68*(12), 5796-5803. doi:10.1128/aem.68.12.5796-5803.2002

Sercu, B., Van De Werfhorst, L. C., Murray, J. L. S., & Holden, P. A. (2011). Sewage Exfiltration As a Source of Storm Drain Contamination during Dry Weather in Urban Watersheds. *Environmental Science & Technology, 45*(17), 7151-7157. doi:10.1021/es200981k

Sercu, B., Werfhorst, L. C. V. D., Murray, J., & Holden, P. A. (2008). Storm Drains are Sources of Human Fecal Pollution during Dry Weather in Three Urban Southern California Watersheds. *Environmental Science & Technology, 43*(2), 293-298. doi:10.1021/es801505p

Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W., & Siciliano, S. D. (2005). Detection and quantification of the human-specific HF183 Bacteroides 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environ Microbiol, 7*(2), 249-259. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00702.x

Shehane, S. D., Harwood, V. J., Whitlock, J. E., & Rose, J. B. (2005). The influence of rainfall on the incidence of microbial faecal indicators and the dominant sources of faecal pollution in a Florida river. *Journal of Applied Microbiology, 98*(5), 1127-1136. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02554.x

Shiaris, M. P., et al. (1987). Distribution of indicator bacteria and Vibrio parahaemolyticus in sewage-polluted intertidal sediments. *Appl Environ Microbiol, 53*(8), 1756-1761. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3116932

Sidhu, J. P. S., et al. (2013). Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence of multiple microbial and chemical source tracking markers. *Science of the Total Environment, 463–464*(0), 488-496. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.020

Simpson, J. M., Santo Domingo, J. W., & Reasoner, D. J. (2002). Microbial source tracking: state of the science. *Environ Sci Technol, 36*(24), 5279-5288. doi:10.1021/es026000b

Sinigalliano, C. D., et al. (2013). Multi-laboratory evaluations of the performance of Catellicoccus marimammalium PCR assays developed to target gull fecal sources. *Water Res, 47*(18), 6883-6896. doi:10.1016/j.watres.2013.02.059

Soh, L., Connors, K. A., Brooks, B. W., & Zimmerman, J. (2011). Fate of sucralose through environmental and water treatment processes and impact on plant indicator species. *Environ Sci Technol, 45*(4), 1363-1369. doi:10.1021/es102719d

Solo-Gabriele, Boehm, A., Scott, T., & Sinigalliano, C. (2011). Beaches and Coastal Environments. In C. Hagedorn, A. R. Blanch, & V. J. Harwood (Eds.), *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies* (pp. 451-483): Springer New York.

Solo-Gabriele, H. M., Wolfert, M. A., Desmarais, T. R., & Palmer, C. J. (2000). Sources of Escherichia coli in a coastal subtropical environment. *Appl Environ Microbiol, 66*(1), 230-237. doi:10.1128/aem.66.1.230-237.2000

Soupir, M. L., Mostaghimi, S., & Love, N. G. (2008). Method to Partition Between Attached and UnattachedE. coliin Runoff From Agricultural Lands1. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association, 44*(6), 1591-1599. doi:10.1111/j.1752-1688.2008.00262.x

Spoelstra, J., Schiff, S. L., & Brown, S. J. (2013). Artificial sweeteners in a large Canadian river reflect human consumption in the watershed. *PLoS One, 8*(12), e82706. doi:10.1371/journal.pone.0082706

Staley, Z. R., Boyd, R. J., Shum, P., & Edge, T. A. (2018). Microbial source tracking using quantitative and digital PCR to identify sources of fecal contamination in stormwater, river water, and beach water in a Great Lakes Area of Concern. *Applied and environmental microbiology, 84*(20).

Staley, Z. R., Grabuski, J., Sverko, E., & Edge, T. A. (2016). Comparison of Microbial and Chemical Source Tracking Markers To Identify Fecal Contamination Sources in the Humber River (Toronto, Ontario, Canada) and Associated Storm Water Outfalls. *Applied and Environmental Microbiology, 82*(21), 6357-6366. doi:10.1128/aem.01675-16

Stein, K., Ramil, M., Fink, G., Sander, M., & Ternes, T. A. (2008). Analysis and sorption of psychoactive drugs onto sediment. *Environ. Sci. Technol., 42*(17), 6415-6423. doi:10.1021/es702959a

Straub, T. M., & Chandler, D. P. (2003). Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *Journal of microbiological methods, 53*(2), 185-197. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00023-X

Subedi, B., & Kannan, K. (2014). Fate of Artificial Sweeteners in Wastewater Treatment Plants in New York State, U.S.A. *Environmental Science & Technology, 48*(23), 13668-13674. doi:10.1021/es504769c

Sylvestre, É., et al. (2020). Impact of Hydrometeorological Events for the Selection of Parametric Models for Protozoan Pathogens in Drinking-Water Sources. *Risk Analysis*.

Sylvestre., É., et al. (2020a). Impact of Hydrometeorological Events for the Selection of Parametric Models for Protozoan Pathogens in Drinking-Water Sources. *Risk Analysis*.

Sylvestre., É., et al. (2021a). Demonstrating the reduction of enteric viruses by drinking water treatment during snowmelt episodes in urban areas. *Water research X, 11*, 100091.

Sylvestre., É., et al. (2021b). Using surrogate data to assess risks associated with microbial peak events in source water at drinking water treatment plants. *Water Research*, 117296.

Sylvestre., É., et al. (2020b). Importance of Distributional Forms for the Assessment of Protozoan Pathogens Concentrations in Drinking-Water Sources. *Risk Analysis*.

Tanvir Pasha, A. B. M., Hinojosa, J., Phan, D., Lopez, A., & Kapoor, V. (2019). Detection of human fecal pollution in environmental waters using human mitochondrial DNA and correlation with general and human-associated fecal genetic markers. *Journal of Water and Health, 18*(1), 8-18. doi:10.2166/wh.2019.197

Ternes, T. A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res., 32*(11), 3245-3260. Retrieved from http___www.sciencedirect.com_science__ob=MImg&_imagekey=B6V73-3V7BJ7D-5-1&_cdi=5831&_user=2101137&_orig=search&_coverDate=11%2F30%2F1998&_sk=999679988&view=c&wchp=dGLzVlz-zSkWW&md5=b864ac1156f84e3ff2ddc8b4d8550796&ie=_sdarticle.pdf

Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S., & Muller, S. R. (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science & Technology, 37*(6), 1061-1068. doi:10.1021/es025834r

Tolls, J. (2001). Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environ. Sci. Technol., 35*, 3397.

Tolouei, S., et al. (2019). Temporal variability of parasites, bacterial indicators, and wastewater micropollutants in a water resource recovery facility under various weather conditions. *Water Research, 148*, 446-458. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.068

Tornevi, A., Bergstedt, O., & Forsberg, B. (2014). Precipitation effects on microbial pollution in a river: lag structures and seasonal effect modification. *PloS one, 9*(5), e98546-e98546. doi:10.1371/journal.pone.0098546

Tran, N. H., Gin, K. Y.-H., & Ngo, H. H. (2015). Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. *Science of The Total Environment, 538*, 38-57. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.155

Tufenkji, N. (2007). Modeling microbial transport in porous media: Traditional approaches and recent developments. *Advances in water resources, 30*(6-7), 1455-1469.

Unno, T., Staley, C., Brown, C. M., Han, D., Sadowsky, M. J., & Hur, H.-G. (2018). Fecal pollution: new trends and challenges in microbial source tracking using next-generation sequencing. *Environmental Microbiology, 20*(9), 3132-3140. doi:https://doi.org/10.1111/1462-2920.14281

USEPA. (2005). Microbial source tracking guide document. *National Risk Management Research Laboratory, Office of Research and Development US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, 45268*. Retrieved from https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=2000D20V.TXT

van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., & Zehnder, A. J. (1989). Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microb Ecol, 17*(1), 1-15. doi:10.1007/BF02025589

Verbanck, M. A., Ashley, R. M., & Bachoc, A. (1994). International Workshop on Origin, Occurrence and Behavior of Sediments in Sewer Systems - Summary of Conclusions. *Water Research, 28*(1), 187-194. doi:Doi 10.1016/0043-1354(94)90133-3

Verwey, E. J. (1947). Theory of the stability of lyophobic colloids. *J Phys Colloid Chem, 51*(3), 631-636. doi:10.1021/j150453a001

Viglino, L., Aboulfadl, K., Mahvelat, A. D., Prevost, M., & Sauve, S. (2008). On-line solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry to quantify pharmaceuticals, pesticides and some metabolites in wastewaters, drinking, and surface waters. *J Environ Monit, 10*(4), 482-489. doi:10.1039/b800861b

Viglino, L., Prevost, M., & Sauve, S. (2011). High throughput analysis of solid-bound endocrine disruptors by LDTD-APCI-MS/MS. *J Environ Monit, 13*(3), 583-590. doi:10.1039/c0em00550a

Villemur, R., Imbeau, M., Vuong, M. N., Masson, L., & Payment, P. (2015). An environmental survey of surface waters using mitochondrial DNA from human, bovine and porcine origin as fecal source tracking markers. *Water Research, 69*(0), 143-153. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.063

Volterra, L., Tosti, E., Vero, A., & Izzo, G. (1985). Microbiological pollution of marine sediments in the southern stretch of the Gulf of Naples. *Water, Air, and Soil Pollution, 26*(2), 175-184. doi:10.1007/bf00292067

Vrana, B., et al. (2005). Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 24*(10), 845-868.

Walters, E. (2013). *Fate and Transport of Fecal Indicator Bacteria in Flume Systems Mimicking an Oligotrophic River*.

Walters, E., Graml, M., Behle, C., Müller, E., & Horn, H. (2013). Influence of Particle Association and Suspended Solids on UV Inactivation of Fecal Indicator Bacteria in an Urban River. *Water, Air, & Soil Pollution, 225*(1), 1-9. doi:10.1007/s11270-013-1822-8

Walters, S. P., Yamahara, K. M., & Boehm, A. B. (2009). Persistence of nucleic acid markers of health-relevant organisms in seawater microcosms: implications for their use in assessing risk in recreational waters. *Water Res, 43*(19), 4929-4939. doi:10.1016/j.watres.2009.05.047

Wang, D., Farnleitner, A. H., Field, K. G., Green, H. C., Shanks, O. C., & Boehm, A. B. (2013). Enterococcus and Escherichia coli fecal source apportionment with microbial source tracking genetic markers--is it feasible? *Water Res, 47*(18), 6849-6861. doi:10.1016/j.watres.2013.02.058

Wang, D., Silkie, S. S., Nelson, K. L., & Wuertz, S. (2010). Estimating true human and animal host source contribution in quantitative microbial source tracking using the Monte Carlo method. *Water Res, 44*(16), 4760-4775. doi:10.1016/j.watres.2010.07.076

Wang, J., Liu, G., Wu, H., Zhang, T., Liu, X., & Li, W. (2018). Temporal-spatial variation and partitioning of dissolved and particulate heavy metal(loid)s in a river affected by mining activities in Southern China. *Environ Sci Pollut Res Int, 25*(10), 9828-9839. doi:10.1007/s11356-018-1322-x

Wang, Y., et al. (2018). Monitoring, mass balance and fate of pharmaceuticals and personal care products in seven wastewater treatment plants in Xiamen City, China. *Journal of Hazardous Materials, 354*, 81-90. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.064

Warish, A., Kirs, M., & Gilpin, B. (2011). Source Tracking in Australia and New Zealand: Case Studies. In C. Hagedorn, A. R. Blanch, & V. J. Harwood (Eds.), *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies* (pp. 485-513): Springer New York.

Warish, A., Masters, N., & Toze, S. (2012). Consistency in the host specificity and host sensitivity of the Bacteroides HF183 marker for sewage pollution tracking. *Lett Appl Microbiol, 55*(4), 283-289. doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03291.x

Warish, A., Sudhi, P., Michele, C., & Colin, B. (2019). Enhanced insights from human and animal host-associated molecular marker genes in a freshwater lake receiving wet weather overflows. *Scientific Reports, 9*(1), 12503. doi:10.1038/s41598-019-48682-4

Warish, A., Yusuf, R., Hasan, I., Goonetilleke, A., & Gardner, T. (2010). Quantitative PCR assay of sewage-associated Bacteroides markers to assess sewage pollution in an urban lake in Dhaka, Bangladesh. *Can J Microbiol, 56*(10), 838-845. doi:10.1139/w10-070

Warren, N., Allan, I. J., Carter, J. E., House, W. A., & Parker, A. (2003). Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments—a review. *Applied Geochemistry, 18*(2), 159-194. doi:10.1016/s0883-2927(02)00159-2

Waso, M. (2017). *Identifying the Primary Microbial and Chemical Source Tracking Markers in Harvested Rainwater for the Detection of Faecal Contamination.* (Master). Stellenbosch University,

Waso, M., Ndlovu, T., Dobrowsky, P. H., Khan, S., & Khan, W. (2016). Presence of microbial and chemical source tracking markers in roof-harvested rainwater and catchment systems for the detection of fecal contamination. *Environmental Science and Pollution Research, 23*(17), 16987-17001. doi:10.1007/s11356-016-6895-7

Weyrauch, P., et al. (2010). Contribution of combined sewer overflows to trace contaminant loads in urban streams. *Water Res, 44*(15), 4451-4462. doi:10.1016/j.watres.2010.06.011

Wilkinson, J. L., Hooda, P. S., Swinden, J., Barker, J., & Barton, S. (2017). Spatial distribution of organic contaminants in three rivers of Southern England bound to suspended particulate material and dissolved in water. *Science of the Total Environment, 593-594*, 487-497. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.167

Williams, C. F., Williams, C. E., & Adamsen, E. J. (2006). Sorption-desorption of carbamazepine from irrigated soils. *Journal of Environmental Quality, 35*(5), 1779-1783. doi:10.2134/jeq2005.0345

Williams, M., Ong, P. L., Williams, D. B., & Kookana, R. S. (2009). ESTIMATING THE SORPTION OF PHARMACEUTICALS BASED ON THEIR PHARMACOLOGICAL DISTRIBUTION. *Environmental Toxicology and Chemistry, 28*(12), 2572-2579. Retrieved from http://search.proquest.com/docview/210336139?accountid=40695

World Health Organization. (2017). Water quality and health-review of turbidity: information for regulators and water suppliers.

Wu, J., Long, S. C., Das, D., & Dorner, S. (2011). Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *J Water Health, 9*(2), 265-278. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21942192

Xu, Z., Wang, L., Yin, H., Li, H., & Schwegler, B. R. (2016). Source apportionment of non-storm water entries into storm drains using marker species: Modeling approach and verification. *Ecological Indicators, 61*, 546-557. doi:https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.10.006

Yamamoto, H., Hayashi, A., Nakamura, Y., & Sekizawa, J. (2005). Fate and partitioning of selected pharmaceuticals in aquatic environment. *Environ. sci. : an international journal of environmental physiology and toxicology, 12*(6), 347-358.

Yamamoto, H., et al. (2009). Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water Research, 43*(2), 351-362. doi:10.1016/j.watres.2008.10.039

Yang, Y., Fu, J., Peng, H., Hou, L., Liu, M., & Zhou, J. (2011a). Occurrence and Phase Distribution of Selected Pharmaceuticals in the Yangtze Estuary and Its Coastal Zone. *J. Hazard. Mater., 190*, 588.

Yang, Y., Fu, J., Peng, H., Hou, L., Liu, M., & Zhou, J. L. (2011b). Occurrence and phase distribution of selected pharmaceuticals in the Yangtze Estuary and its coastal zone. *Journal of Hazardous Materials, 190*(1), 588-596. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.092

Yarahmadi, H., Duy, S. V., Hachad, M., Dorner, S., Sauvé, S., & Prévost, M. (2018). Seasonal variations of steroid hormones released by wastewater treatment plants to river water and sediments: Distribution between particulate and dissolved phases. *Science of the Total Environment, 635*, 144-155. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.370

Yin, H., et al. (2019). Identification of sewage markers to indicate sources of contamination: Low cost options for misconnected non-stormwater source tracking in stormwater systems. *Science of The Total Environment, 648*, 125-134. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.448

Young, T. A., et al. (2008). Ab initio and in situ comparison of caffeine, triclosan, and triclocarban as indicators of sewage-derived microbes in surface waters. *Environmental Science & Technology, 42*(9), 3335-3340. doi:10.1021/es702591r

Yu, C. L., Louie, T. M., Summers, R., Kale, Y., Gopishetty, S., & Subramanian, M. (2009). Two distinct pathways for metabolism of theophylline and caffeine are coexpressed in *Pseudomonas putida* CBB5. *Journal of Bacteriology, 191*(14), 4624-4632. Retrieved from http://jb.asm.org/cgi/reprint/191/14/4624

Zhang, W. H., Ding, Y. J., Boyd, S. A., Teppen, B. J., & Li, H. (2010). Sorption and desorption of carbamazepine from water by smectite clays. *Chemosphere, 81*(7), 954-960. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.053

Zhang, Y. J., Geissen, S. U., & Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere, 73*(8), 1151-1161. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.07.086

Zheng, G., & Shen, Z. (2018). Host-specific genetic markers of fecal bacteria for fecal source tracking in food and water. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene, 3*(1), 1-8.

ANNEXE A MATRÉRIEL DE SUPPORT-ARTICLE 1

Locating illicit discharges in storm sewers in urban areas using multi-parameter source tracking: field validation of a toolbox composite index to prioritize high risk areas

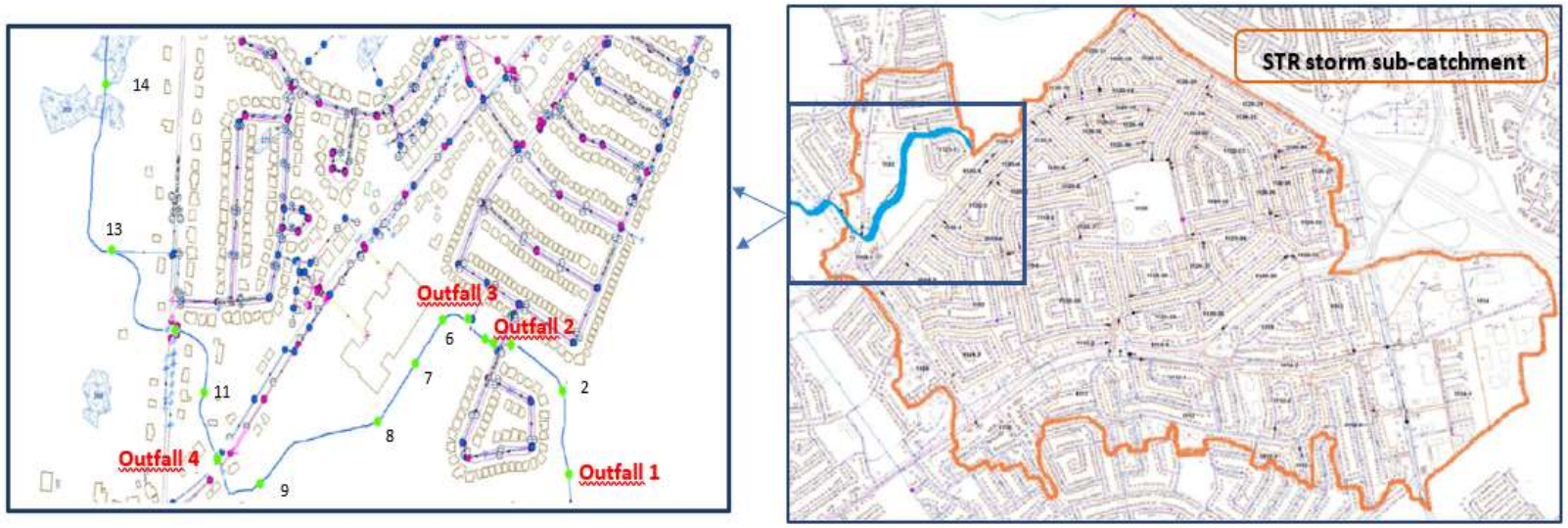


Fig. S1: STR stream, storm outfalls and sub-catchment maps

Fig. S2. BDB sub-catchments

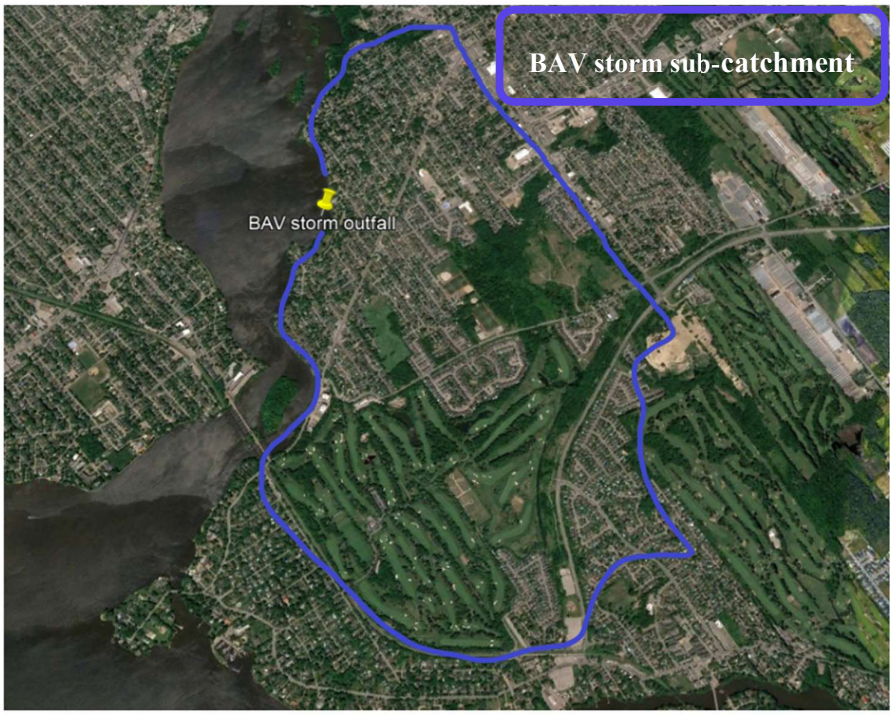


Fig. S3.BAV sub-catchments

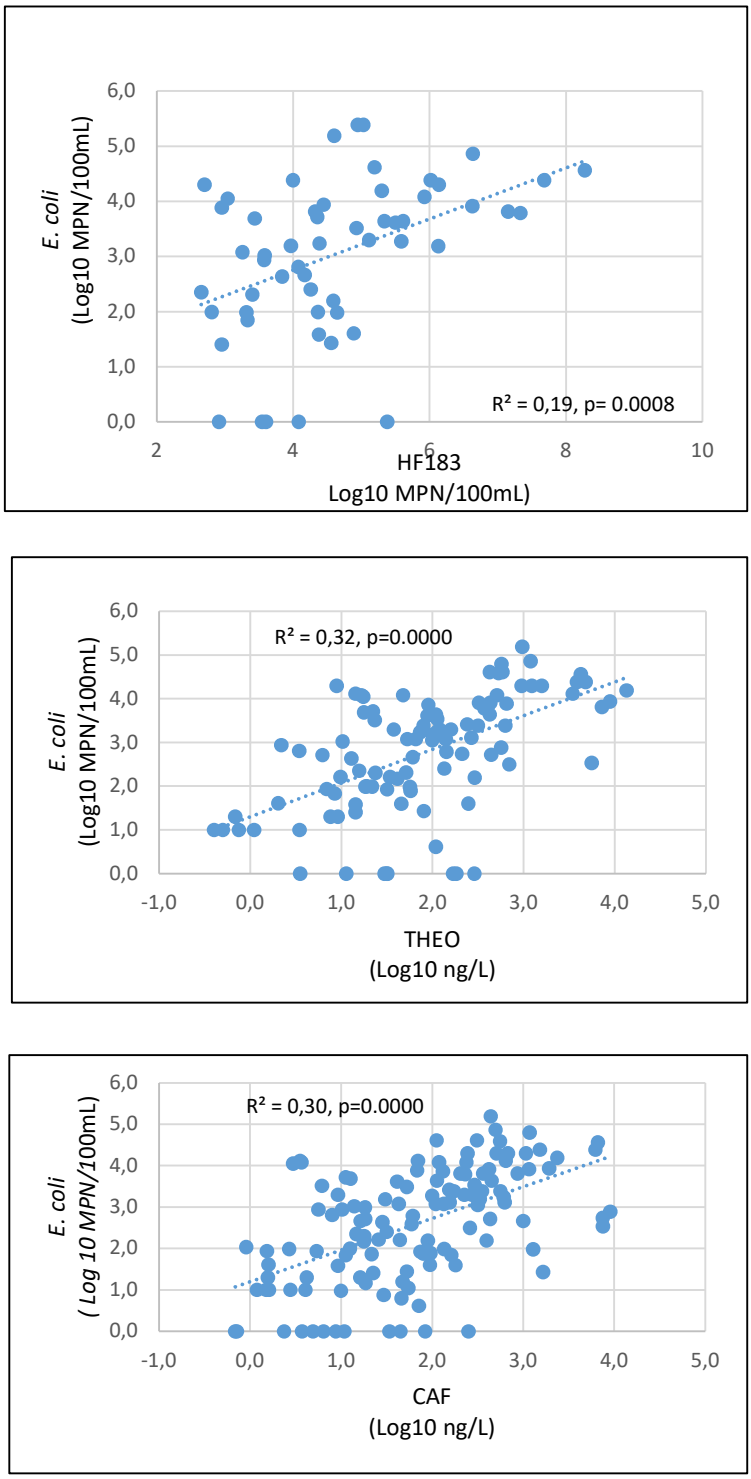
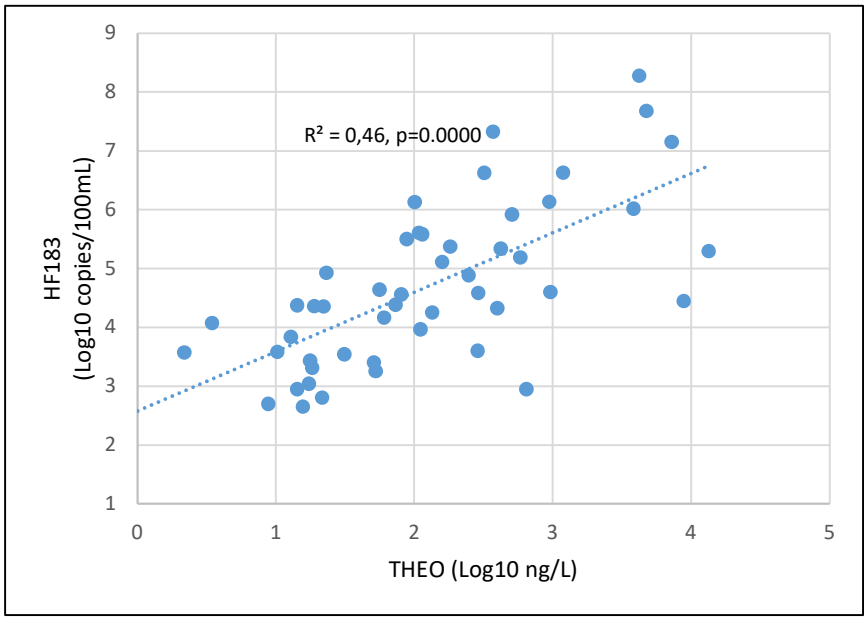


Fig S4. Correlation between *E. coli* vs human specific markers (HF183, THEO and CAF)



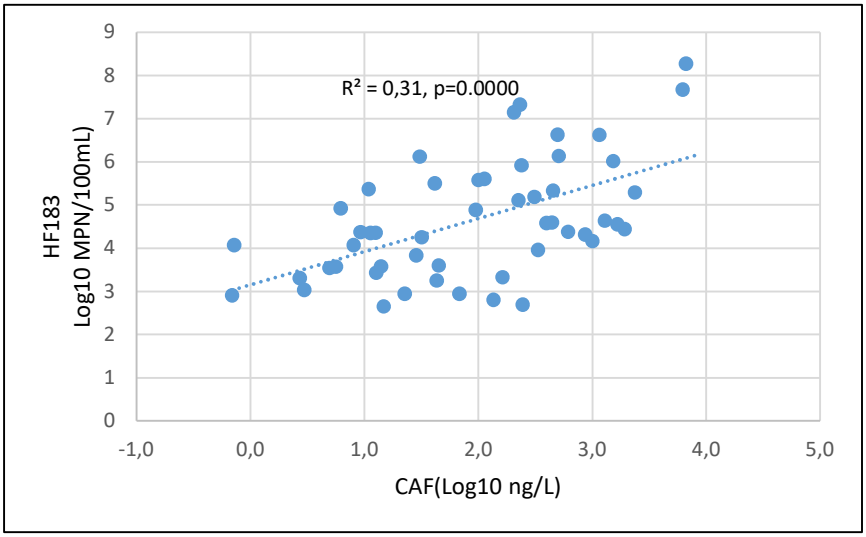


Fig S5. Correlation between human specific Bacteroides marker HF183 and chemical markers CAF and THEO

ANNEXE B MATRÉRIEL DE SUPPORT-CHAPITRE 2

APPLICATION DE L'APPROCHE MST POUR ÉVALUER LA CONTRIBUTIONS DES EAUX USÉES AUX Pics DE CONTAMINATION DES PRISES D'EAU POTABLE

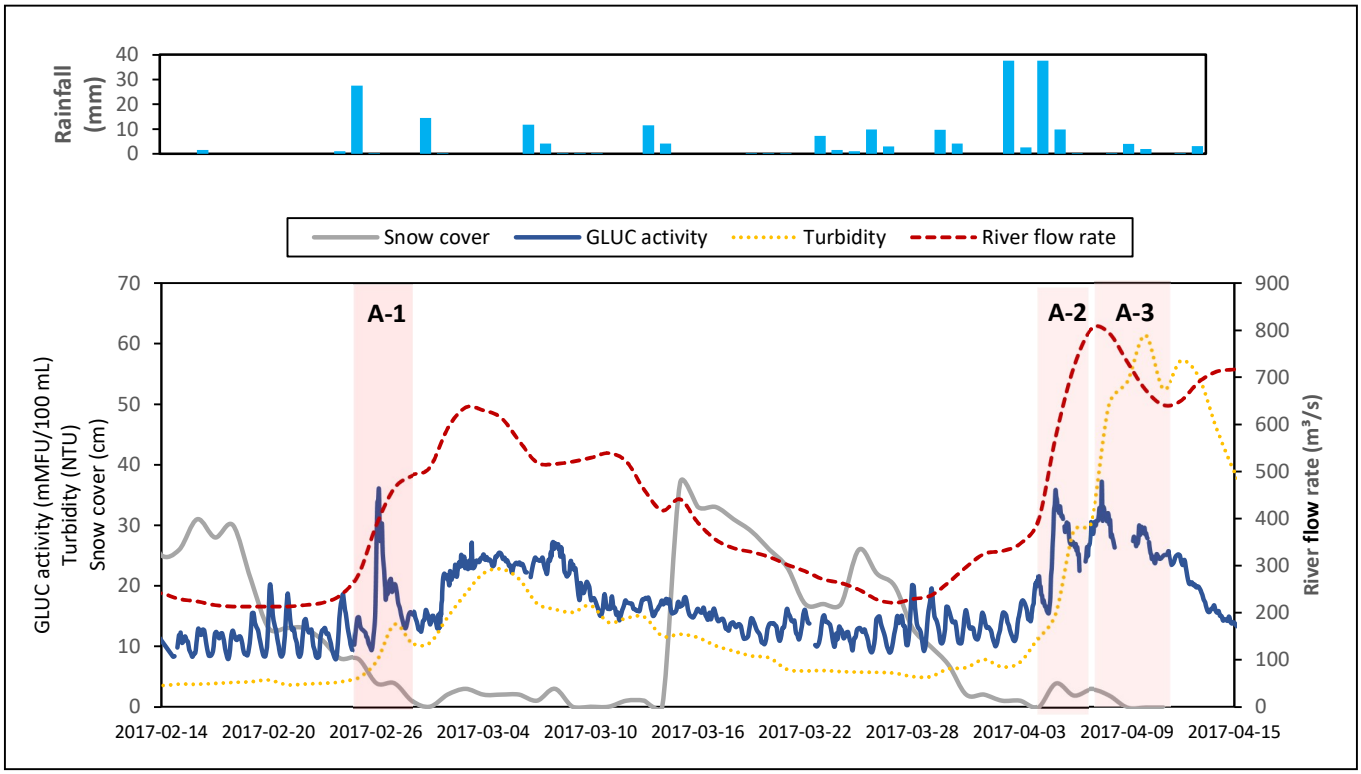


Figure S1. Time series of daily rainfall, β-d-glucuronidase (GLUC), snow cover, turbidity, and river flow rate during event-based periods at urban DWI A. Orange rectangles indicate targeted events.

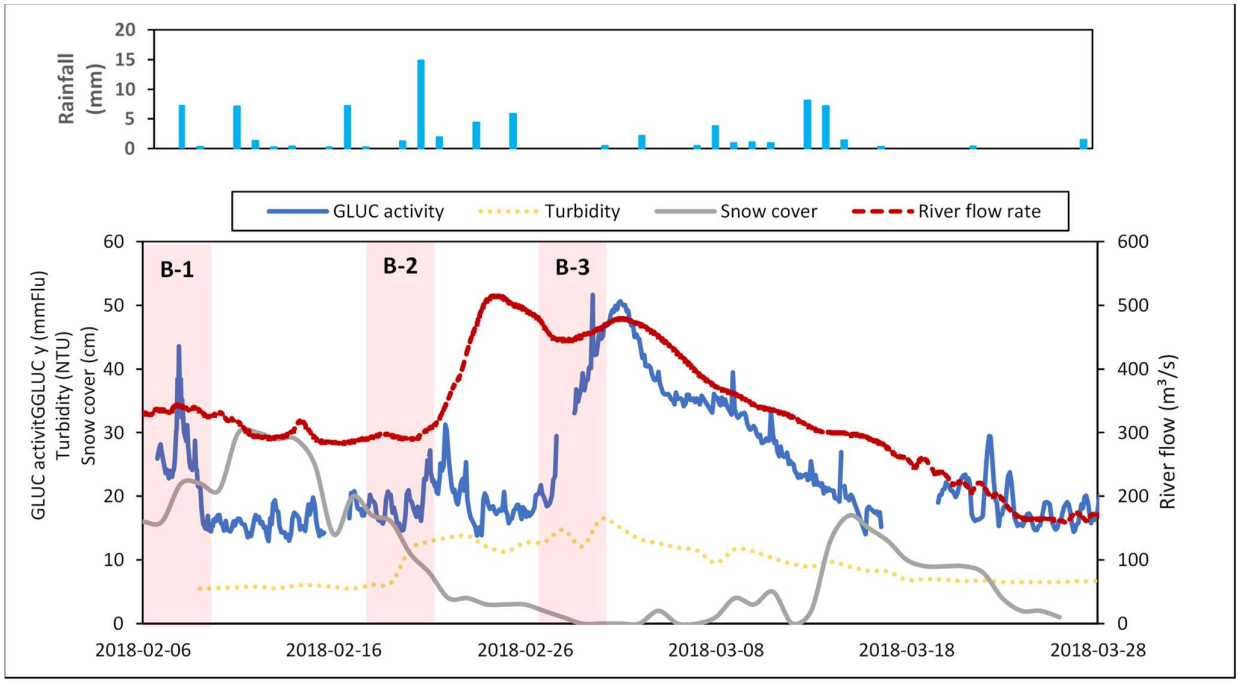


Figure S2. Time series of daily rainfall, β-d-glucuronidase (GLUC) activity, snow cover, turbidity, and river flow rate during sampling periods at urban DWI B. Orange rectangles

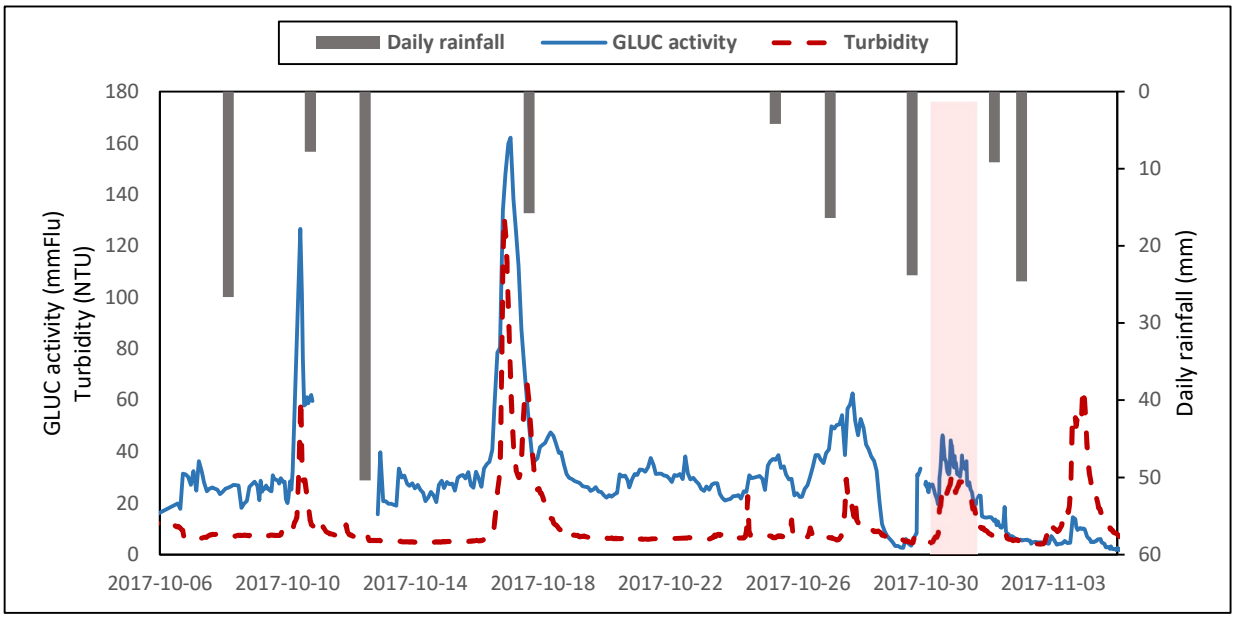


Figure S3. Time series of daily rainfall, β-d-glucuronidase (GLUC) activity and turbidity during rainfall period at the agricultural DWI. Orange rectangles indicate targeted event.

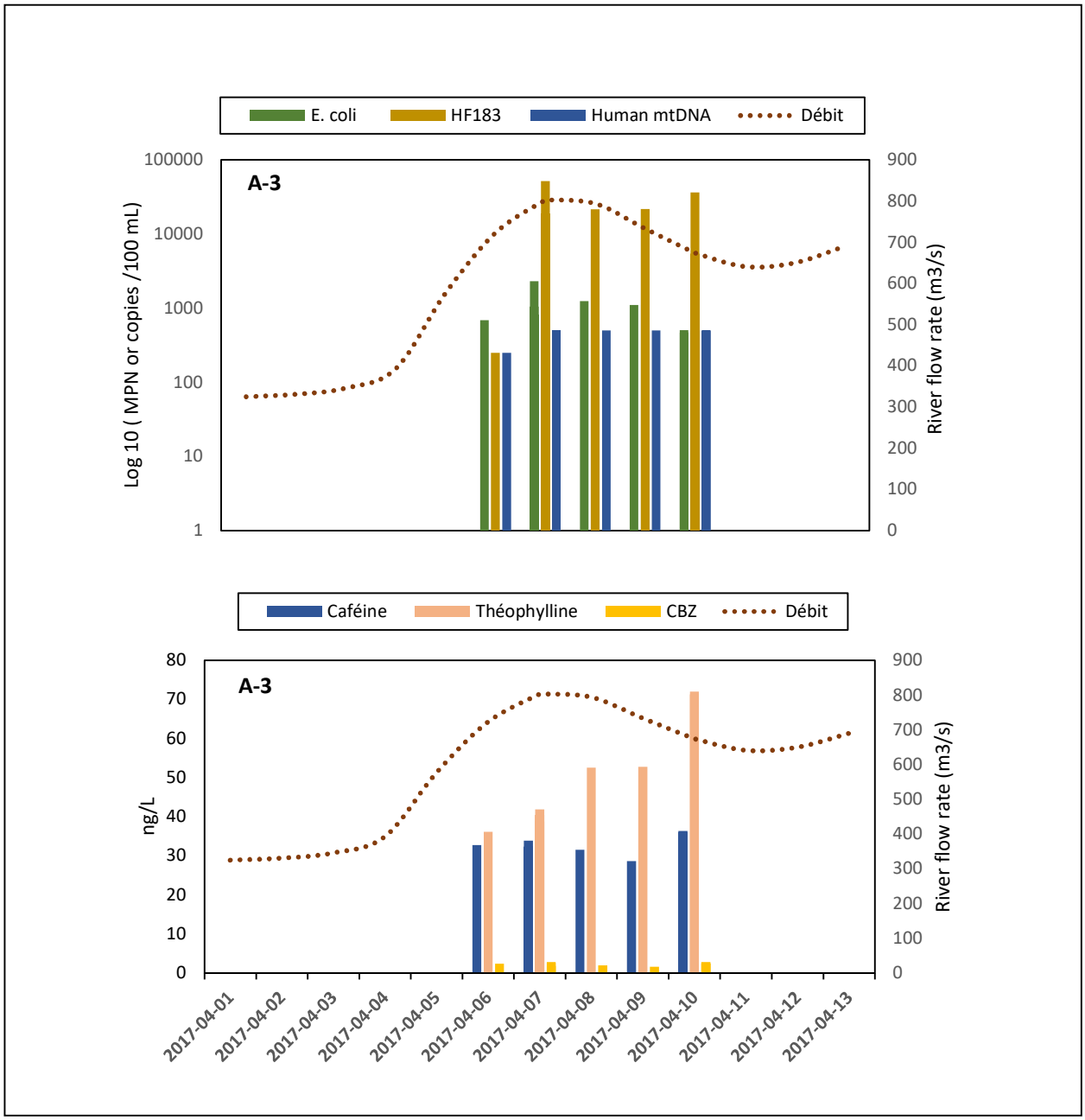


Figure S4. Short-term variations in *E. coli*, MST and CST human specific markers at event A-3.

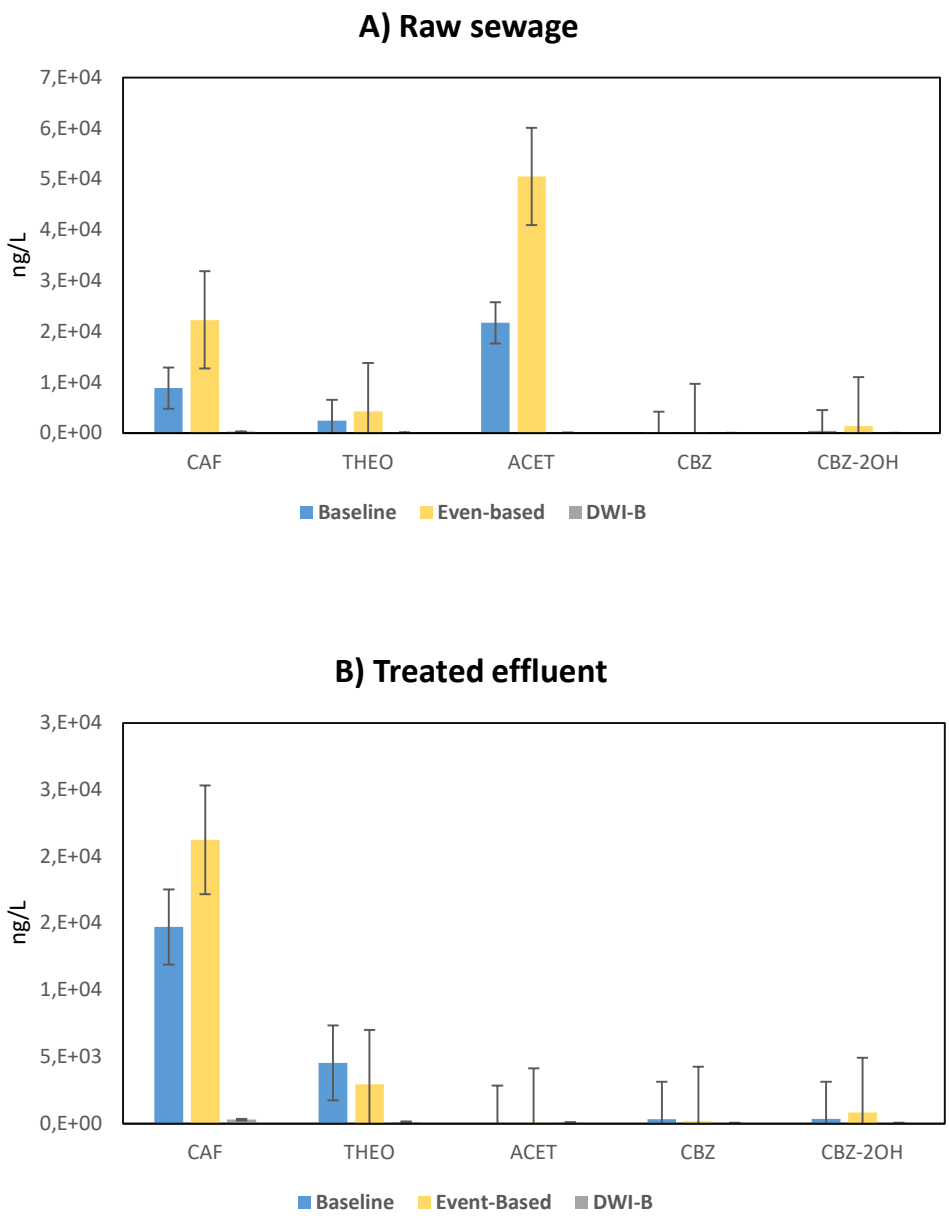


Figure S5. Comparison of the dynamic of CST markers in intreated sewage (A) and (B) treated effluent during the baseline, event-based and at the DWI-B.

ANNEXE C MATRÉRIEL DE SUPPORT-ARTICLE 2

Occurrence and partitioning behavior of *E. coli* and wastewater micropollutants following rainfall event

Table S1. Rainfall and flowrate data reported by local hydrometric stations during the sampling events. DW=dry weather; WW=wet weather

Sampling date	Rainfall befor sampling (mm)	Rainfall on sampling date (mm)	Flowrate (m3/s)	Water samples (n)	Sediment samples (n)	DW or WW
16/07/2014	D-1= 2.8 D-2= 0.0 D-3= 11.0	Trace	135	6	6	DW
22/07/2014	4 days without rain	0.0	135	6	6	DW
19/09/2017	9 days without rain	0.0	140	12	12	DW
10/10/2017	D-1=29.6 D-2= 6.4 D-3= 4.8	0.0	121	12	12	WW
20/11/2017	D-1= 12.4 D-2= 1.2 D-3= Trace	Trace	314	12	12	WW

Table S2. Surface water and sediments characteristics. Values represents mean value of 12 samples taken along the river ± STDV and values in parentheses are minimum and maximum levels. n.m. means not measured.

	Surface water					River sediment		
	pH	**TOC (mg L−1)**	**DOC (mg L−1)**	**Turbidity (NTU)**	**TSS (mg L−1)**	**Organic matter (% dry wt)**	**f<80µm (%)**	**80 µm < f < 120 µm (%)**
Autumn	7.6 ± 0.1	7.9 ± 2	7.6 ± 1	12.8 ± 3	n.m.	56 ± 14	4 ± 2 (1–6.3)	61 ± 22 (18–98)
Spring	7.5 ± 0.1	8.07 ± 3.8 (7.8–8.9)	7.7 ± 3.5 (7.4–8.4)	12.36 ± 1 (9.5–12)	20.48 ± 8 (10.3–22.5)	54 ± 16 (31–82)	3 ± 2 (0.3–8)	28 ± 24 (1–79)
Summer	7.8 ± 0.2	7.9 ± 0.2 (7.6–8.3)	7.5 ± 0.2 (7.3–7.8)	13.4 ± 5.4 (7–28)	9.7 ± 3.7 (4–16)	57 ± 21 (28–81)	9 ± 9.4 (1−31)	85 ± 14 (52–99)

Table S3. Concentrations of pharmaceuticals and artificial sweetener aspartame in dissolved (µg L−1) and suspended particulate matter (ng/g dw) in wastewater treatment primary effluent from WWTP1. LOD = limit of detection

	Primary Effluent		**Literature data**	
Compound	Dissolved	SPM	Dissolved	Particulate
	(µg/L)	(ng/g dw)	(µg/L)	(ng/g dw)
ACET	43	11996,7	0.5-38.0	-
CAF	31,6	2509,4	13-100	542
THEO	37,7	2390,1	-	-
CBZ	0,2	6258,7	-	147
CBZ-2OH	0,4	1184,7	-	-
ASP	< LOD	1538,7	0.46/0.52a	-

Table S4. Applied treatment processes, discharge flow and water quality of the two WWTPs involved in this study. Inf = influent. Eff= effluent

Treatment plant	Applied treatment	Effluent rate (m^3 d^{-1})	DO (mg O_2 L^{-1})		DOC (mg C L^{-1})		TSS (%VSS) (mg L^{-1})		Turbidity (NTU)		Particles >0.3 µm (mg L^{-1})		Particles >0.3 µm /TSS	
			Inf.	Eff.	Inf.	Eff.	Inf.	Eff.	Inf.	Eff.	Inf.	Eff.	Inf.	Eff.
WWTP1	Physico-Chemical/UV	42692	3.6	6.5	16	8.2	67.9 (87)	8.9 (63)	56	6	79.6	11.1	1.2	1.3
WWTP2	Biofiltration/UV	31153	6.7	3.9	11	12	67.5 (63)	7.1 (89)	44	14	110	15	1.6	2.1

Table S5. Sediment organic carbon % measured along the river

Sampling points	f_{OC} (%)
N1	**10,5**
N2	**9,1**
N3	**10,2**
N4	**1,8**
N5	**1,7**
S1	**7,8**
S2	**2,1**
S3	**1,4**
S4	**51,5**
S5	**1,5**
S6	**0,9**
S7	**3,5**