

Titre:	Évaluation et validation des performances de traitement des eaux usées pour réduire la présence de bactéries et gènes de résistance aux antibiotiques
Auteur:	Malek Harrabi
Date:	2024
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence:	Harrabi, M. (2024). Évaluation et validation des performances de traitement des eaux usées pour réduire la présence de bactéries et gènes de résistance aux antibiotiques [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/59283/
Citation:	

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/59283/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Émilie Bédard, Sarah Dorner, & Benoit Barbeau
Advisors:

Programme: Génie civil
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Évaluation et validation des performances de traitement des eaux usées pour
réduire la présence de bactéries et gènes de résistance aux antibiotiques**

MALEK HARRABI

Département des génies civil, géologique et des mines

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie civil

Août 2024

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé:

**Évaluation et validation des performances de traitement des eaux usées pour
réduire la présence de bactéries et gènes de résistance aux antibiotiques**

présenté par **Malek HARRABI**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

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

Dominique CLAVEAU-MALLET, présidente

Émilie BÉDARD, membre et directrice de recherche

Sarah DORNER, membre et codirectrice de recherche

Benoit BARBEAU, membre et codirecteur de recherche

Caroline KY, membre

DÉDICACE

À la mémoire de mon cher père **Abdelmalek**,

Ta bienveillance et tes sacrifices ont été les piliers de ma réussite. Ton absence est un vide immense, mais ton amour et ton soutien continuent de me guider chaque jour.

Pour tout ce que tu as fait pour moi, pour tous les sacrifices que tu as consentis, je te dédie cet hommage avec gratitude et amour éternel.

Repose en paix, Papa. Ton esprit vivra toujours en moi.

A l'âme de ma chère mère Zohra

Pour tous tes rêves qu tu n'arrives pas à les réaliser, pour tous les moments qu'on a vécus ensemble, pour le grand amour maternel que tu ma portée, pour tous les souvenirs, pour tous les larmes qui tu as écoulés de la peur de notre séparation et pour toutes les nuits qui tu as passé pour s'occuper de moi.

A ma chère belle-mère Samia

Pour l'éducation et le grand amour dont elle m'a entourée. Et pour sa patience et ces sacrifices.

A mon cher mari Faker

Pour le grand amour et le soutien continu dont il m'a offert depuis notre rencontre.

A mon bébé d'amour Arken

Tu es la lumière de ma vie et ma plus grande joie. Chaque jour avec toi est un trésor inestimable. Que ton avenir soit rempli de bonheur, de rires et d'amour, tout comme tu remplis le mien

A mes chères sœurs : Marwa, Sihem et Rima;

A tous ceux que j'aime.

Je dédie ce mémoire.

Malek HARRABI

REMERCIEMENTS

C'est avec un grand plaisir que je réserve cette page en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Je commence par adresser mes sincères remerciements à ma directrice de recherche Professeur Émilie Bédard pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour son esprit et pour sa patience. J'ai une grande reconnaissance pour le soutien continu qu'elle m'a offert durant ces deux années.

Je tiens à exprimer mes sincères gratitude et respects à mes co-directeurs, Professeur Benoit Barbeau et Professeure Sarah Dorner de m'avoir si bien accueillie. Leurs qualités scientifiques, leur passion pour la recherche et leurs connaissances m'ont permis de travailler sereinement à leurs côtés et m'ont donné l'envie de poursuivre mes recherches scientifiques.

Mes vifs remerciements vont également à Juan Francisco Guerra Maldonado, Helena Ferreira Leal et Arthur Ouradou pour leur disponibilité et l'intérêt qu'ils m'ont conféré, je ne trouve pas de mots pour exprimer mes sentiments à votre égard, je vous dirai simplement merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Je n'oublie pas de remercier aussi tout le personnel du laboratoire CREDEAU pour leur contribution précieuse à ce travail.

Mes remerciements s'adressent également aux responsables de stations d'épuration qui nous ont donnés l'accès à tous les équipements et les installations.

Enfin mes meilleurs et vifs remerciements s'adressent aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce projet.

RÉSUMÉ

Le traitement des eaux usées est crucial pour protéger l'environnement et la santé publique, en particulier dans un contexte où la résistance aux antibiotiques est en augmentation. Les stations d'épuration jouent un rôle essentiel dans la réduction des contaminants, mais leur efficacité sur les gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs) reste peu étudiée.

Cette recherche explore l'impact de la désinfection par l'ozone en conditions réelles sur 23 ARGs dans une station d'épuration (STEP) au Québec, qui traite à la fois des eaux usées domestiques et industrielles. Le processus de traitement de cette STEP inclut un traitement biologique utilisant des boues activées, suivi d'une ozonation durant la saison estivale (de mai à octobre). L'objectif principal du projet de recherche est d'évaluer l'efficacité des traitements secondaire et tertiaire sur l'abondance relative des gènes de résistance aux antimicrobiens ciblés. Les objectifs spécifiques sont d'évaluer la corrélation entre l'abondance relative des ARGs et les paramètres physico-chimiques, et d'évaluer le potentiel d'utiliser les mycobactéries non-tuberculeuses (NTM) comme proxy. Une campagne d'échantillonnage a été menée à l'automne 2023, du 28 août au 21 novembre, à raison d'une fois par semaine. Les températures de l'eau variaient entre 21 à 14 °C, et un total de 54 échantillons ont été collectés. Les prélèvements ont été effectués à quatre endroits différents du traitement: l'eau brute à l'entrée de la station (Affluent), l'eau après traitement secondaire par boues activées (Effluent secondaire), l'eau après ozonation (Effluent final), et les boues déshydratées combinées (non ozonées). Les mycobactéries non-tuberculeuses (NTM) ont été quantifiées par réaction en chaîne polymérase (qPCR) afin d'évaluer l'efficacité de la désinfection. Les concentrations en bactéries totales et de 23 gènes ciblés (*blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA*, *blaCTX-M*, *blaIMP*, *blaVIM*, *qnrA*, *qnrD*, *qnrS*, *ermB*, *ermF*, *mefA*, *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS*, *mcr-1*, *intI-1*, *sul-1*, *sul-2*, *vanA*, *aadA1*, et *aadA2*) ont été évaluées par la réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) à haut débit. Une analyse physico-chimique complète des échantillons d'eau a été réalisée, incluant pH, conductivité, demande chimique en oxygène, solides totaux, alcalinité, nitrites, sulfures, et concentrations en métaux (fer, zinc, cuivre, cadmium, cobalt et aluminium). Cette analyse visait à caractériser la qualité de l'eau et à étudier les différents facteurs influençant l'efficacité de l'ozonation pour l'élimination des ARGs. Les résultats ont montré la présence de 22 des 23 ARGs dans les échantillons étudiés, couvrant des gènes de résistance aux bêta-lactamines

(6), aux sulfonamides (2), à la vancomycine (1) et à la colistine (1). Le gène *intII* avait l'abondance relative la plus élevée dans l'affluent. Les traitements biologiques sont responsables d'une réduction significative de certains ARGs comme *qnrD*, *qnrS*, *tetS* et *aadA1*, similaire à la réduction observée pour les bactéries totales (16S). Cependant, certains ARGs sont toujours présents, bien que réduits, tels que *sull*, *mefA* et *ermF*, qui ont diminué de 0.3 à 2.5 logs mais demeurent détectables après l'ozonation, tandis que l'abondance de quelques ARGs tels que *ermF* augmente après le traitement par l'ozone. De plus, les gènes *blaVIM*, *blaSHV-1*, *vanA*, *mcr-1*, *intI1*, *aadA2* et *tetO* ont affiché des niveaux d'abondance relative plus élevés dans les boues comparativement à l'affluent. En outre, l'analyse a révélé une association notable entre certaines concentrations de métaux (par exemple, le Fe) et l'abondance relative des ARGs *intII*, *vanA* et *sull*, ainsi qu'une corrélation entre les macrolides et les tétracyclines dans les boues, suggérant une influence potentielle de la présence de métaux sur la co-sélection des ARGs. L'étude conclut que bien que l'ozonation puisse réduire certains ARGs comme *qnrD*, *qnrS*, *tetS*, et *aadA1* à des niveaux proches de la limite de quantification, elle n'est pas aussi efficace pour réduire l'abondance totale des ARGs sélectionnés dans les effluents des STEP. Par exemple, l'ozonation n'a pas réduit de manière significative l'abondance de *sull*, *mefA* et *ermF*. En revanche, le traitement biologique a montré une réduction plus significative de la majorité des ARGs, comme *qnrD*, *qnrS*, *tetS* et *aadA1*, qui sont devenus indétectables après traitement. Cependant, certains gènes, tels que *blaVIM*, *blaSHV-1*, *vanA*, *mcr-1*, *intI1*, *aadA2* et *tetO*, ont montré une accumulation accrue dans les boues, ce qui suggère que ces traitements déplacent plutôt les ARGs vers les boues au lieu de les éliminer complètement, facilitant potentiellement leur dissémination dans l'environnement (sol et eau) via les biosolides utilisés pour l'application au sol. Ces résultats sont confirmés par la persistance des NTM dans les effluents ozonés, soulignant la nécessité de poursuivre les efforts de surveillance et de recherche pour mettre en œuvre des mesures de traitement efficaces à la source. Il est nécessaire de poursuivre les études pour évaluer si un traitement des boues est nécessaire en vue d'une utilisation en agriculture, afin de limiter la dissémination des gènes de résistance dans l'environnement.

ABSTRACT

Wastewater treatment is crucial for protecting the environment and public health, especially in a context where antibiotic resistance is increasing. Wastewater treatment plants (WWTPs) play an essential role in reducing contaminants, but their effectiveness on antibiotic resistance genes (ARGs) remains under-studied.

This study explores the impact of ozone disinfection under real conditions on 23 ARGs in a WWTP in Quebec, which treats both domestic and industrial wastewater. The treatment process of this WWTP includes a biological treatment using activated sludge, followed by ozonation during the summer season (from May to October). The main objective of the research project is to evaluate the efficiency of secondary and tertiary treatments on the relative abundance of targeted antimicrobial resistance genes. The specific objectives are to assess the correlation between the relative abundance of ARGs and physico-chemical parameters, and to evaluate the potential of using non-tuberculous mycobacteria (NTM) as a proxy.

A sampling campaign was conducted in the fall of 2023, from August 28 to November 21, with weekly collections. Water temperatures ranged from 21 to 14 °C, and a total of 54 samples were collected. Sampling was conducted at four different treatment stages: raw water at the plant inlet (Influent), water after secondary treatment by activated sludge (Secondary effluent), water after ozonation (Final effluent), and dewatered combined sludge (non-ozonated). Non-tuberculous mycobacteria (NTM) were quantified by polymerase chain reaction (qPCR) to evaluate the disinfection efficiency. The concentrations of total bacteria and 23 targeted genes (*blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA*, *blaCTX-M*, *blaIMP*, *blaVIM*, *qnrA*, *qnrD*, *qnrS*, *ermB*, *ermF*, *mefA*, *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS*, *mcr-1*, *intI-1*, *sul-1*, *sul-2*, *vanA*, *aadA1*, and *aadA2*) were evaluated by high-throughput quantitative polymerase chain reaction (qPCR). A comprehensive physico-chemical analysis of the water samples was performed, including pH, conductivity, chemical oxygen demand, total solids, alkalinity, nitrites, sulfides, and metal concentrations (iron, zinc, copper, cadmium, cobalt, and aluminum). This analysis aimed to characterize water quality and study the different factors influencing the effectiveness of ozonation for ARG removal.

The results showed the presence of 22 out of 23 ARGs in the samples studied, covering genes resistant to beta-lactams (6), sulfonamides (2), vancomycin (1), and colistin (1). The *intI1* gene had

the highest relative abundance in the influent. Biological treatments are responsible for a significant reduction of certain ARGs like *qnrD*, *qnrS*, *tetS*, and *aadA1*, similar to the reduction observed for total bacteria (16S). However, some ARGs are still present, although reduced, such as *sul1*, *mefA*, and *ermF*, which decreased by 0.3 to 2.5 logs but remain detectable after ozonation, while the abundance of some ARGs such as *ermF* increases after ozone treatment.

Furthermore, the genes *blaVIM*, *blaSHV-1*, *vanA*, *mcr-1*, *intI1*, *aadA2*, and *tetO* exhibited higher relative abundance levels in sludge compared to the influent. Additionally, the analysis revealed a notable association between certain metal concentrations (e.g., Fe) and the relative abundance of *intI1*, *vanA*, and *sul1*, as well as a correlation between macrolides and tetracyclines in sludge, suggesting a potential influence of metals on the co-selection of ARGs.

The study concludes that although ozonation can reduce some ARGs like *qnrD*, *qnrS*, *tetS*, and *aadA1* to levels close to the limit of quantification, it is not effective in reducing the total abundance of the selected ARGs in WWTP effluents. For example, ozonation did not significantly reduce the abundance of *sul1*, *mefA*, and *ermF*. In contrast, biological treatment showed a more significant reduction of the majority of ARGs, such as *qnrD*, *qnrS*, *tetS*, and *aadA1*, which became undetectable after treatment. However, certain genes, such as *blaVIM*, *blaSHV-1*, *vanA*, *mcr-1*, *intI1*, *aadA2*, and *tetO*, showed increased accumulation in sludge, suggesting that these treatments may displace ARGs to sludge rather than completely eliminate them, potentially facilitating their dissemination in the environment (soil and water) through biosolids used for land application.

These findings are confirmed by the persistence of NTM in ozonated effluents, highlighting the need to continue monitoring and research efforts to implement effective treatment measures at the source. Further studies are needed to evaluate sludge should be treated before it can be used in agriculture, to limit the spread of resistance genes in the environment.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIV
LISTE DES ANNEXES.....	XVI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	5
2.1 Les gènes de résistance aux antibiotiques	5
2.1.1 Modalité de résistance chez la bactérie	6
2.1.2 Transfert des gènes	6
2.1.3 La co-sélection des ARG avec les métaux lourds	7
2.2 Occurrence et répartition des ARG dans les stations d'épuration.....	8
2.2.1 Occurrence	8
2.2.2 Répartition des ARG au sein des différents procédés de traitement	10
2.2.3 Facteur affectant la prolifération des ARG dans les STEPs.....	12
2.2.4 Le devenir des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement.	13
2.3 Réduction des ARG par ozonation.....	15
2.3.1 Principes de l'ozonation	15
2.3.2 Ozonation comme traitement tertiaire des eaux usées	17

2.3.3	Efficience de l'ozonation pour enlever les ARG	18
2.3.4	Facteur et paramètres opérationnels affectant l'efficacité de l'ozonation.....	22
2.3.5	L'ARN 16S comme indicateur de nombre de bactérie totale	23
2.3.6	Les mycobactéries (NTM) comme indicateur de l'efficacité de l'ozonation.....	24
CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT INDIQUANT LA COHÉRENCE DES ARTICLES PAR RAPPORT AUX OBJECTIFS DE LA RECHERCHE		26
3.1	Choix de la station d'échantillonnage et des gènes cibles	26
3.2	Campagne d'échantillonnage.....	27
3.3	Choix des paramètres à analyser et efficacité du processus de traitement.....	28
3.3.1	Pourquoi choisir STEP utilisant l'ozonation comme procédé avancé au Québec?28	
3.3.2	Choix des paramètres pour analyser la performance de l'ozonation	28
3.3.3	Justification de l'utilisation du HT-qPCR pour l'analyse des ARG.....	30
3.3.4	Pourquoi utiliser uniquement les culots pour l'extraction d'ADN?.....	30
CHAPITRE 4 ARTICLE 1: EFFECT OF OZONATION ON THE REDUCTION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES AND NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN FULL-SCALE WASTEWATER TREATMENT PLANT EFFLUENTS		32
4.1	Introduction	34
4.2	Materials and methods	36
4.2.1	Study site.....	36
4.2.2	Sample collection	36
4.2.3	Assessment of heavy metals and other physicochemical characteristics	37
4.2.4	Sample concentration and DNA extraction.....	38
4.2.5	High-throughput qPCR of ARGs/16s and q-PCR of NTM.....	38
4.2.6	Data analysis and visualization	39

4.3	Results and discussion.....	40
4.3.1	Impact of Treatment Processes on Key Wastewater and Sludge Parameters	40
4.3.2	Diversity and abundance of ARGs along the wastewater treatment steps	44
4.3.3	Accumulation of ARGs in dewatered sludge.....	50
4.3.4	NTM as an indicator of ARG removal in WWTPs	51
4.3.5	Co-occurrence of ARG and heavy metal	52
4.4	Conclusions	55
CHAPITRE 5 DISCUSSION DES RÉSULTATS		57
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		61
RÉFÉRENCES		64
ANNEXES		77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Les antibiotiques les plus détectés dans le monde et leurs ARG associés dans différents effluents des stations d'épuration.....	10
Tableau 2-2 : Comparaison de l'effet d'ozonation sur l'élimination des ARGs dans les eaux usée.....	20
Tableau 2-2 : Comparaison de l'effet d'ozonation sur l'élimination des ARGs dans les eaux usée (suite).....	21
Tableau 4-1: Average concentration of heavy metals in wastewater samples (mg/L) and sludge samples (mg/g) during the 13 sampling campaigns.	43
Tableau 4-2: Log removal of ARGs, NTM and 16S observed between influent and secondary effluent samples, and between secondary effluent and final effluent samples.	49

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 : Voies d'action de l'ozone sur les molécules à dégrader adapté d' Azaïs (2015)	17
Figure 3-1 : Comparaison de l'abondance relative des Gènes de Résistance aux Antimicrobiens (ARG) entre le culot et le surnageant dans les eaux usées	31
Figure 4-1:Diagram showing the locations of sample collection points.....	37
Figure 4-2: Spearman Correlation Heatmap for Physicochemical Parameters relative to ozone treatment.	42
Figure 4-3: Percent positivity for the presence of each ARG per sample type.....	45
Figure 4-4: Distribution of ARGs was analyzed using (A) Heatmap depicting the log value of the relative abundance of ARGs across various samples and (B) Histogram illustrating the average relative abundance of ARGs at the different sampling locations.	47
Figure 4-6: Log of the relative abundance of NTM/16S rRNA during the 10 ozonation campaigns and the 3 campaigns after ozonation cessation (A), and log of NTM concentration (cg/ml) during the same periods (B).....	52
Figure 4-7: Correlation analysis among metals and ARGs for sludge and influent (A) and between secondary and ozonated effluent (B).. ..	53

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

La liste des sigles et abréviations présente, dans l'ordre alphabétique:

ADNr16S : ADN ribosomal 16S

Al : Aluminium

AMR : Résistance aux antimicrobiens (Antimicrobial Resistance)

ARB : Bactéries résistantes aux antibiotiques (Antibiotic-Resistant Bacteria)

ARG : Gènes de résistance aux antibiotiques (Antibiotic Resistance Genes)

Cd : Cadmium

CE : Conductivité électrique

Co : Cobalt

COT : Carbone organique total

Cu : Cuivre

DBO5 : Demande biologique en oxygène sur 5 jours

DCO : Demande chimique en oxygène

Fe : Fer

HGT : Transfert horizontal de gènes (Horizontal Gene Transfer)

HVT : Transfert vertical de gènes (Vertical Gene Transfer)

MES : Matières en suspension

MVES : Matières volatiles en suspension

NTM : Mycobactéries non tuberculeuses (Non-Tuberculous Mycobacteria)

PH : Potentiel hydrogène (pH)

qPCR : PCR quantitative (quantitative Polymerase Chain Reaction)

S2- : Sulfure

NO2- : Nitrite

STEP : Station d'épuration

T : Température

O3 : Ozone

Zn : Zinc

LISTE DES ANNEXES

Annexe A Supplementary material	77
---------------------------------------	----

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Chaque jour, des millions de mètres cubes d'eaux usées sont rejetés dans les égouts municipaux par les foyers, les entreprises, les institutions et les industries. Les eaux usées municipales et industrielles sont l'une des sources majeures de pollution des eaux de surface (Preisner et al., 2020). Plusieurs études ont montré que les eaux traitées provenant des stations d'épuration des eaux usées municipales constituent une source importante de contamination du milieu aquatique par les antibiotiques issus de la consommation humaine (Preisner, 2020; Rodriguez-Mozaz et al., 2020; Wang et al., 2021) car elles ne sont pas conçues pour les éliminer (Huang et al., 2019; Langbehn et al., 2021). Des antibiotiques ont été détectés dans le milieu naturel, à savoir les eaux souterraines (Huang et al., 2020; Zainab et al., 2020), les eaux de surface (Proia et al., 2016; Kairigo et al. 2020; Yi et al. 2019), les sols et les sédiments (J. Chen et al., 2020; Yi et al., 2019) ainsi que chez les organismes aquatiques (Liu et al., 2018). De plus, l'application des eaux usées traitées aux champs agricoles pour l'irrigation peut contaminer ces derniers (J. Chen et al., 2020; Yi et al., 2019) et entraîner l'absorption des antibiotiques par les plantes (Cerqueira et al., 2019a). En résumé, les antibiotiques présentent un comportement pseudo-persistant dans l'environnement (Kairigo et al., 2020; Rodriguez-Mozaz et al., 2020) et leur accumulation dans différents compartiments environnementaux peut menacer les écosystèmes aquatiques et terrestres et avoir un impact sur la santé humaine et animale (Amador et al., 2015; Kairigo et al., 2020). Les résidus d'antibiotiques présents dans l'écosystème offrent un cadre idéal pour l'acquisition et la propagation des gènes résistante aux antibiotiques, entraînant des graves problèmes environnementaux et de santé humaine (J. Chen et al., 2020; Huang et al., 2019; Zainab et al., 2020). En effet, en 2019, les bactéries résistantes aux antibiotiques ont entraîné plus de 2,8 millions d'infections et 35 000 décès aux États-Unis (Contrôle et Prévention, 2019). On estime que les infections par des bactéries de résistance aux antibiotiques pourraient causer 10 millions de décès dans le monde d'ici 2050 (O'Neill, 2016). Bien que les bactéries résistantes aux antibiotiques en elles-mêmes représentent un risque pour la santé publique, les ARG sont responsables du développement de communautés bactériennes tolérantes aux antibiotiques.

Les ARG sont considérés comme des contaminants émergents (Guo et Kong, 2019), ce qui permet leur plus large dissémination par divers microbes environnementaux et pathogènes humains par transfert horizontal de gènes (HGT) (Lerminiaux and Cameron, 2019; Lu et al., 2019). Les processus de traitement des eaux usées actuellement en place visent entre autres à réduire la concentration des micro-organismes présents dans les eaux usées, avant le rejet vers les milieux récepteurs. Plus précisément, les effluents d'eaux usées traitées doivent respecter différents niveaux de qualité, notamment la concentrations en *Escherichia coli* comme paramètres biologiques (Tétreault, 2022). Malgré les traitements appliqués pour atteindre ces objectifs, des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) ont été détectés dans les effluents des différentes stations d'épuration (Amador et al., 2015; Azuma et al., 2022; Baghal Asghari et al., 2021a; Zainab et al., 2020). Bien que la concentration de bactéries totales diminue avec le traitement des eaux usées, le pourcentage de bactéries résistantes aux antibiotiques reste élevé et peut même augmenter lors du traitement des eaux usées dans certains cas (Czekalski et al., 2016a; Zhang et al., 2009). Par conséquent, une quantité considérable de bactéries résistantes aux antimicrobiens est présente dans les eaux usées même après traitement (Baghal Asghari et al., 2021a; Foroughi et al., 2022). La détection des ARG n'est toutefois pas incluse dans les normes de rejets à ce jour, ni en Europe ni en Amérique du Nord. Des études antérieures ont évalué la persistance des ARG dans les effluents après différents procédés de désinfection : chloration, UV et ozonation (McKinney and Pruden, 2012; Zhuang et al., 2015). Cependant, malgré la réduction significative des ARG, un grand nombre étaient toujours présents après le traitement et ensuite rejetés dans les milieux aquatiques (Ben et al., 2017 ; Wang et al., 2018).

Au Québec, la majorité des stations d'épuration des eaux usées (STEP) fonctionnent à un niveau de traitement primaire avancé, avec des étangs aérés et des procédés similaires largement répandus dans la région (ROMAEU, 2022). Ces traitements primaires avancés sont efficaces pour réduire la charge organique et les solides en suspension, mais ils sont moins performants pour éliminer les ARGs (Foroughi et al., 2022). Des études ont montré que les ARGs restent présents en quantités significatives dans ces procédés, ce qui indique un risque potentiel de leur libération dans l'environnement.

Bien que l'ozonation tertiaire ne soit pas encore courante au Québec, représentant moins de 6 % (ROMAEU, 2022) de toutes les STEP, son utilisation est en augmentation, en particulier après l'interdiction de l'usage du chlore pour la désinfection des eaux usées, introduite pour respecter les limites sur les coliformes fécaux. Le passage à l'ozonation est motivé par son efficacité supérieure à réduire les micropolluants (Wu et al., 2021). Un exemple marquant de cette tendance est la construction de la plus grande unité d'ozonation au monde, actuellement en cours à la station d'épuration des eaux usées Jean-R.-Marcotte. Ce développement souligne l'importance croissante des procédés d'oxydation avancée pour protéger la santé publique et l'environnement, justifiant ainsi l'accent mis sur l'ozonation tertiaire dans des études comme celle-ci.

OBJECTIFS

Le projet de recherche vise à approfondir les connaissances sur l'efficacité de l'ozonation des ARGs dans une station d'épuration des eaux usées au Québec, et à déterminer l'impact de divers paramètres physico-chimiques et métaux lourds sur la persistance et le développement de ces ARGs à travers la chaîne de traitement, incluant l'ozonation.

Les objectifs spécifiques du projet sont :

- Comparer l'effet d'un traitement secondaire par boues activées et d'un traitement tertiaire à l'ozonation sur l'abondance relative de 23 gènes de résistance aux antibiotiques par rapport aux bactéries totales (16S rRNA).
- Examiner les divers paramètres physicochimiques influençant la variation des ARG dans l'eau usée.
- Analyser la corrélation entre la concentration des métaux lourds et l'abondance relative des ARG.
- Évaluer les mycobactéries non tuberculeuses (NTM) comme indicateur de l'efficacité du traitement sur l'enlèvement des ARG.
- Comprendre les variations des ARG dans un milieu naturel en présence de plusieurs paramètres variables simultanément (paramètres physicochimiques, métaux, ozone, NTM, ADNr16s).

PLAN DU MÉMOIRE

Ce mémoire est organisé en quatre parties. Dans le chapitre 2, une synthèse de la littérature est proposée, abordant les connaissances générales sur l'occurrence et l'évolution des ARG dans les stations d'épuration, ainsi que les différents paramètres qui influencent leur propagation et l'efficacité de l'ozonation. Le chapitre 3 expose la méthodologie adoptée pour atteindre les objectifs de l'étude, ainsi que les outils utilisés. Le chapitre 4 présente un article scientifique soumis à la revue *Science of the Total Environment*, détaillant les méthodes et les actions entreprises pour répondre aux objectifs spécifiques énoncés. Ensuite, le chapitre 5 présente une discussion générale autour de ces données et aborde les limites du projet. Enfin, la conclusion et les recommandations sont présentées dans le dernier chapitre qui évoque également les perspectives futures.

CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

L'objectif de ce chapitre était de faire une revue de la littérature au sujet de l'occurrence d'ARG dans les stations d'épuration, y compris les facteurs influençant leur propagation dans l'environnement ainsi que d'étudier l'efficience de l'ozonation comme un traitement tertiaire pour réduire ces ARG.

2.1 Les gènes de résistance aux antibiotiques

Il existe deux types de résistance bactérienne aux antibiotiques : la résistance naturelle (Kümmerer et al. 2004) et la résistance acquise (Martines et al., 2009). La résistance naturelle se manifeste par la synthèse de protéines codées par le chromosome bactérien qui ont une structure qui empêche la pénétration de l'antibiotique (comme des membranes imperméables ou l'absence d'un système de transport) ou qui inactivent l'antibiotique (par exemple, les bêta-lactamases chromosomiques) (Murina et al., 2019). La résistance acquise, quant à elle, survient lorsque certaines souches d'une même espèce normalement sensibles deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutagenèse, formant ainsi une résistance chromosomique, ou par l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) via des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons et les intégrons. Les ARG jouent un rôle crucial en codant pour des protéines qui modifient la cible de l'antibiotique, inactivent l'antibiotique ou empêchent son entrée dans la cellule bactérienne (Y. Chen et al., 2020).

Cette section explore les mécanismes de résistance acquise, les facteurs favorisant son apparition, et les implications cliniques de cette résistance. Il est crucial de comprendre pourquoi et comment cette résistance acquise se développe. Comprendre ces aspects, y compris le rôle des ARG, est essentiel pour élaborer des stratégies efficaces de prévention et de traitement des infections bactériennes résistantes aux antibiotiques.

2.1.1 Modalité de résistance chez la bactérie

Les bactéries déploient diverses stratégies pour résister aux antibiotiques, qu'elles soient acquises ou naturelles (Martines et al., 2009.). Tout d'abord, la stratégie de brouillage se manifeste par la production de protéines qui neutralisent l'effet des antibiotiques, que ce soit à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule. Ensuite, la stratégie de camouflage survient lorsque la cible de l'antibiotique est modifiée pour la rendre insensible à son action. La stratégie de blindage se caractérise par le renforcement de la membrane cellulaire pour bloquer l'entrée des antibiotiques ou par l'utilisation de pompes membranaires pour les expulser. Enfin, l'esquive se produit lorsque la bactérie remplace la cible de l'antibiotique par une molécule inoffensive, contrecarrant ainsi son effet attendu (Baymay et al., 2016).

2.1.2 Transfert des gènes

Les bactéries peuvent acquérir une résistance aux antimicrobiens de plusieurs manières, notamment : par transmission verticale (vertical gene transfer, VGT), par mutation génétique ou par transmission horizontale (horizontal gene transfer, HGT).

La transmission verticale se produit lorsque les bactéries résistantes transmettent leurs gènes de résistance à leur descendance lors de la division cellulaire (Li et al., 2021). En outre, les mutations génétiques spontanées peuvent altérer les cibles des antimicrobiens ou les mécanismes de transport, conférant ainsi une résistance aux bactéries mutantes (Li et al., 2021).

La transmission horizontale peut se produire par trois voies : (1) transformation via des plasmides, de l'ADN chromosomique et d'autres ADN d'organismes mourants intégrés dans les chromosomes (Li et al., 2021), (2) conjugaison par le transfert direct d'ADN entre bactéries, et (3) transduction via des phages (Dantas and Sommer, 2014; Founou et al., 2016).

Le transfert se fait à travers des éléments génétiques mobiles comprenant des plasmides, des intégrons et des transposons, tous considérés comme des déterminants de gènes à multirésistance. Le principal mécanisme par lequel les cellules acquièrent des éléments de résistance aux antimicrobiens est le transfert horizontal de gènes (HGT) par conjugaison, qui implique l'échange de plasmides entre cellules. Le transfert horizontal d'ARG n'est pas spécifique à l'espèce, et cette

facilité d'acquisition trans-espèces rend le lien entre les ARG environnementaux et les agents pathogènes de plus en plus probable (Wright, 2010).

Les ARG se présentent sous deux formes dans les milieux naturels: intracellulaire (iARG) et extracellulaire (eARG). Les eARG peuvent infecter des bactéries par transformation naturelle, entraînant une propagation supplémentaire de la résistance, tandis que les iARG peuvent être transmises à la génération suivante par autoréplication (transfert vertical de gènes) ou à d'autres espèces bactériennes par transduction ou conjugaison (transfert horizontal) (Dong et al., 2019). Il est possible que des déterminants de la résistance aux antimicrobiens, y compris des ARG qui peuvent être hébergés dans des plasmides ou de l'ADN chromosomique provenant de matériel cellulaire lysé, existent de manière extracellulaire. Ce potentiel d'existence d'ARG extracellulaires dans l'environnement pourrait être problématique en raison de la petite taille moléculaire des plasmides, ce qui leur permet d'être facilement mobilisables dans l'environnement. Par exemple, les plasmides impliqués dans le transfert horizontal d'ARG sont des molécules d'ADN extra chromosomiques relativement petites, autoréplicatives (Amábile et al., 1993).

2.1.3 La co-sélection des ARG avec les métaux lourds

La co-sélection de la résistance aux antibiotiques en présence de métaux est un phénomène complexe où les microorganismes, notamment les bactéries, acquièrent simultanément une résistance aux antibiotiques et aux métaux (Pal et al. 2015; Engin et al. 2023). Ce phénomène est particulièrement préoccupant dans les environnements contaminés par des métaux lourds, comme les zones industrielles et les stations d'épuration des eaux usées (Dickinson et al., 2019).

Les métaux tels que le cuivre et le zinc sont souvent impliqués dans ce processus de co-sélection (Pal et al., 2015). Leur présence en concentrations élevées peut favoriser la résistance bactérienne en exerçant une pression sélective qui incite les bactéries à développer des mécanismes de survie. Les métaux présents dans les boues d'épuration ont été rapportés comme étant favorables à cette co-sélection de la résistance aux antibiotiques (Zhang et al., 2017).

L'un des mécanismes clés de la co-sélection repose sur les éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons (Di-Cesare et al., 2015). Ces éléments peuvent transporter à la fois des gènes de résistance aux métaux et des gènes de résistance aux antibiotiques. Lorsqu'une bactérie acquiert un plasmide contenant des gènes de résistance aux métaux, elle peut

simultanément acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques (Arya et al., 2021; Di-Cesare et al., 2015; Dickinson et al., 2019). Ce phénomène augmente la difficulté de traiter les infections bactériennes, car les options thérapeutiques se réduisent.

Les eaux usées contaminées par des métaux lourds représentent une source majeure de ce problème (Pal et al., 2017). Les bactéries présentes dans ces eaux peuvent activer ou développer des mécanismes de résistance pour survivre à la toxicité des métaux. Ces mécanismes sont souvent codés par des gènes situés sur des plasmides qui peuvent également contenir des gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, une bactérie résistante à un métal peut être simultanément résistante à plusieurs antibiotiques si ces résistances sont portées par le même plasmide (Arya et al., 2021).

Pour atténuer ce problème, il est crucial de surveiller et de contrôler la qualité des eaux usées et des sols contaminés. Des traitements adéquats des eaux usées peuvent réduire la présence de métaux lourds. La gestion responsable des déchets industriels et pharmaceutiques est également essentielle.

Enfin, une recherche continue est nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes de co-sélection et pour développer de nouvelles stratégies de lutte contre la résistance aux antibiotiques. Cela inclut l'étude des interactions entre les métaux et les antibiotiques au niveau moléculaire, ainsi que le développement de nouvelles technologies de traitement des eaux et des sols contaminés (Al-Gheethi et al., 2018).

2.2 Occurrence et répartition des ARG dans les stations d'épuration

2.2.1 Occurrence

Le traitement des eaux usées est essentiel pour la protection de la santé publique et du milieu aquatique. En outre, les stations de traitement des eaux usées intègrent plusieurs procédés de traitement y compris des étapes de traitement physiques, chimiques et biologiques (Rodriguez-Mozaz et al., 2020). Le traitement biologique implique l'utilisation de micro-organismes pour éliminer les contaminants des eaux usées (le carbone organique, les nutriments et les micropolluants...). Les micro-organismes responsables de ce traitement sont extrêmement diversifiés et la structure de la communauté microbienne de chaque système de traitement est

unique et évolue dans le temps (García et al., 2020). Cette communauté joue un rôle essentiel dans le développement de gènes de résistance aux antibiotiques en favorisant le transfert horizontal de gènes de résistance, en permettant une sélection naturelle des micro-organismes résistants, et en facilitant l'adaptation rapide des populations microbiennes aux antibiotiques. Plusieurs facteurs chimiques, y compris les désinfectants, les métaux (par exemple: le cuivre et le zinc), les divers produits pharmaceutiques, tels que les antibiotiques, et d'autres composés organiques présents dans les eaux usées tout au long du traitement dans une station d'épuration, sont parmi les nombreuses pressions de sélection qui influencent la transmission des gènes de résistance, l'expression et la mobilisation des ARG et conduisent l'émergence, la persistance, et la prolifération des bactéries résistantes aux antibiotiques (Guo et al., 2015 ; Li et al., 2019 ; Zhang et al., 2017). Guo et al. (2015) ont montré que les ARG, lorsqu'ils sont activés et transférés dans des environnements divers, favorisent significativement la propagation de la résistance aux antibiotiques au sein des communautés bactériennes. Li et al. (2019) se sont concentrés sur des environnements cliniques, révélant des corrélations entre l'expression spécifique des ARG et une résistance accrue aux antibiotiques chez les pathogènes, mettant en avant les mécanismes génétiques dans l'évolution de la résistance. Zhang et al. (2017) ont exploré la mobilisation des ARG dans les installations de traitement des eaux usées, constatant que des facteurs environnementaux tels que la contamination par les métaux lourds peut faciliter le transfert des ARG entre les souches bactériennes, favorisant ainsi la résistance aux antibiotiques (Zhang et al., 2017).

Les ARG s'assemblent souvent à proximité les uns des autres sur des éléments génétiques mobiles générant des régions de résistance complexes. Dans de tels cas, l'acquisition d'un seul plasmide peut conférer un phénotype de résistance multiple à la bactérie hôte qui l'acquiert (Porse et al., 2016). De ce fait, les conditions trouvées dans les stations d'épuration créent un environnement idéal pour le développement et le transfert horizontal des ARGs vers de nouveaux hôtes (Shao et al., 2018).

A ce propos, plusieurs ARG conférant une résistance aux sulfamides, quinolones, macrolides et tétracyclines (sul, qnr, erm et tet, respectivement) ont été identifiés dans les effluents des stations d'épuration italiennes et des stations d'épuration en Chine (Lee et al., 2017). Les gènes de résistance à la tétracycline (tet) se sont révélés être l'un des ARG les plus courants dans les systèmes de traitement des eaux usées de nombreux pays (Zhang et al., 2009).

En outre, 30 ARG codant pour la résistance à la tétracycline, aux sulfamides, aux quinolones ou aux macrolides ont été détectés dans les boues activées de deux stations d'épuration en Chine dont 10 d'entre eux (*sull*, *sulII*, *qnrB*, *tetB*, *tetH*, *tetS*, *tetG*, *tetT*, *tetX*, and *ermC*) présentaient des valeurs significativement élevées par rapport à l'abondance total des ARG (Mao et al., 2015). Malgré la diminution de la population bactérienne après le traitement secondaire des eaux usées, une augmentation de l'abondance relative des ARG a été détectée dans l'effluent. Par conséquent, des grandes quantités d'ARG s'écoulent vers les eaux souterraines et dans les eaux de surface (Pazda et al., 2019). Le tableau 2.1 présente les antibiotiques et les ARG les plus détecté dans plusieurs stations d'épuration (STEPs) dans le monde entier.

Tableau 2-1 : Les antibiotiques les plus détectés dans le monde et leurs ARG associés dans différents effluents des stations d'épuration (Nuguan et al., 2021)

Famille d'antibiotique	Antibiotique	ARG relié	Ref(s)
Aminoglycoside	Kanamycin, Tobramycin, Gentamicin	aadA, aacA4, aadB, aadE, strB	Tang et al. (2017)
β-lactam	Amoxicillin, Cloxacillin, Penicillin V, Ampicillin	blaCTX-M, blaTEM, blaOXA-A, blaSHV, mecA	Zhang et al. (2019); ZiemińskaBuczyńska et al. (2015)
Macrolides	Clarithromycin, Erythromycin/erythromycinH2O, Azithromycin, Roxithromycin	ereA, ermB, ermC, erm43, mefC and mphG	Sugimoto et al. (2017); Wang et al. (2020)
Quinolone	Ofloxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin	qnrS, qnrC, qnrD	Castrignanò et al. (2020); Castrignanò et al. (2020)
Sulfonamides	Sulfamethoxazole	sul1, sul2	Chen et al. (2019); Lorenzo et al. (2018); Lye et al. (2019); Rolbiecki et al. (2020)
Tetracyclines	Tetracycline	tetA, tetB, tetE, tetG, tetH, tetS, tetT, tetX	Huang et al. (2016); Wang et al. (2020)
Trimethoprim	Trimethoprim	dhfrA1, dhfr14	ZiemińskaBuczyńska et al. (2015)

2.2.2 Répartition des ARG au sein des différents procédés de traitement

Il est important de comprendre le fractionnement des ARG entre l'eau et les solides à différentes étapes du procédé. Cette section fait un survol des différentes catégories de procédés présents dans les STEP en détaillant le processus mis de l'avant et la distribution des ARG dans chacun d'eux.

Mécanismes de décantation (DECANTEUR PRIMAIRE+ DECANTEUR SECONDAIRE)

- **Processus :** La décantation primaire est l'étape où les solides de plus grande densité, y compris ceux auxquels les ARGs peuvent être attachés, sont séparés de l'eau par gravité. Les ARGs qui sont adsorbés sur les particules solides plus légères ou associés aux flocs sont principalement retirés de la phase liquide lors de la décantation secondaire, après la flocculation. (Quach-Cu et al., 2018)
- **Distribution des ARGs :** Les ARGs peuvent se retrouver majoritairement dans les boues (fraction solide) après la décantation. Cependant, une fraction non négligeable des ARGs reste en suspension dans la phase aqueuse, ce qui nécessite des traitements supplémentaires.

Mécanismes de flocculation

- **Processus :** La flocculation est un processus où les particules fines se regroupent pour former des flocs plus grands sous l'effet de coagulants. Ce processus favorise l'agglomération des particules colloïdales, auxquelles les ARGs peuvent être liés, ainsi que des bactéries abritant les ARGs, facilitant ainsi leur élimination lors de la décantation secondaire qui suit.(Hou et al., 2019)
- **Distribution des ARGs :** Les ARGs associés aux colloïdes et aux particules fines se retrouvent dans les flocs. Ces flocs, une fois décantés, intègrent les boues, diminuant ainsi la concentration des ARGs dans la phase liquide.

Synthèse cellulaire et production de biomasse (BASSIN BIOLOGIQUE)

- **Processus :** Pendant le traitement biologique, les micro-organismes dégradent les matières organiques et se multiplient, produisant de la biomasse. Certains ARGs, notamment ceux associés à des bactéries résistantes, peuvent être intégrés dans cette biomasse (Chen et al., 2013).
- **Distribution des ARGs :** Une proportion des ARGs est incorporée dans la biomasse sous forme de cellules vivantes ou mortes. La biomasse, une fois séparée de la phase aqueuse, transfère les ARGs vers les boues activées. Toutefois, des ARGs peuvent également rester

dans la phase liquide, dans la fraction de matière organique restante, sous forme dissoute ou libre.

Cheminement des ARGs dans les chaînes de procédés :

- Les ARGs suivent un parcours complexe à travers la chaîne de traitement. Initialement, une partie des ARGs est éliminée lors de la décantation primaire. Ceux qui restent peuvent être réduits lors de la flocculation, où ils se lient aux flocs pour être éliminés avec les boues. Cependant, une fraction des ARGs persiste dans la phase liquide et peut passer dans le traitement secondaire (Chen, 2013).
- Au sein du traitement biologique, certains ARGs sont intégrés dans la biomasse, tandis que d'autres demeurent dans la phase aqueuse. Les processus d'ozonation tertiaire ou de filtration avancée peuvent être nécessaires pour traiter ces ARGs résiduels, en particulier ceux qui ne sont pas capturés par les étapes précédentes (Zhai et al., 2016).

En résumé, l'intégration d'une analyse par bilans de masse permettrait de clarifier où les ARGs sont le plus susceptibles de se retrouver dans les différents procédés de traitement, ainsi que de mieux comprendre l'efficacité des différentes étapes dans leur élimination. Cela fournirait également des indications précieuses sur les améliorations possibles des chaînes de traitement pour minimiser la dispersion des ARGs dans l'environnement

2.2.3 Facteur affectant la prolifération des ARG dans les STEPs

De nombreux facteurs peuvent influencer la prolifération et la multiplication des ARG dans les stations d'épuration. On cite les facteurs dits abiotiques (pH, température, conductivité électrique et le temps de rétentions ...) qui jouent un rôle important dans le développement de la communauté bactérienne, agissant sur la sélection des bactéries résistante au antibiotique (ARB) lors de traitement des eaux (Duan et al., 2019). Par exemple, une diminution des ARG a été observée lorsque le pH était plus élevé (Csavina et al., 2014). La température représente cependant le facteur le plus important, pouvant accélérer le processus de transfert horizontale des gènes résistantes (HGT) (Yue et al., 2022). En outre Schages et al ont prouvé qu'il y avait une corrélation négative entre la température et l'abondance d'ARG, ce qui suggère qu'une diminution de la température

conduit à une augmentation des ARG, un résultat aussi observé par une étude précédente (Schages et al., 2020; Yue et al., 2022).

Le temps de rétention des solides biologiques affecte aussi les chances de recombinaison génétique en augmentant le transfert horizontal d'ARG. Par exemple, il a été montré que le temps de rétention plus long des boues peut augmenter l'abondance relative des ARG dans celle-ci (Zhang et al., 2018; (Duan et al., 2019). D'autre part, la concentration en matières organiques (évaluée par le biais de la demande chimique en oxygène) et plusieurs éléments nutritifs tels que l'azote et le phosphore influencent la survie et la croissance des bactéries. Par exemple, Sabri et al. (2020) ont identifié que les gènes *ermB* et *tetW* étaient positivement corrélés avec NH_4^+ (Sabri et al., 2020). Dans le même contexte, Sabri et al ont montré que la plupart des ARG étaient positivement corrélées avec la demande chimique en oxygène (DCO) et la turbidité des effluents (Sabri et al., 2020). Finalement les charges croissantes d'antibiotiques pourraient favoriser la sélection des ARG dans les bactéries hôtes et favoriser leur transfert horizontal vers d'autres souches (Shao et al., 2018). À ce propos, une importante corrélation ($R^2 = 0,97$, $P < 0,05$) a été détectée entre la concentration en sulfamides et les gènes *sulI* dans les effluents de STEPs utilisant un traitement conventionnel (Xu et al., 2015). Cependant, la présence de fortes concentrations en métaux dans les boues d'épuration favorise également la co-sélection pour la résistance aux antibiotiques (Zhang et al., 2017). Des corrélations positives entre les concentrations de cuivre et de zinc et les ARG ont été observées (Pal et al., 2017).

2.2.4 Le devenir des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement.

La quantification des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) dans l'environnement est complexe en raison de la diversité des mécanismes d'acquisition de la résistance et des éléments génétiques impliqués. Les bactéries peuvent acquérir des ARG par des processus tels que la transformation, la transduction et la conjugaison, qui leur permettent d'intégrer de nouveaux gènes provenant d'autres bactéries (Kümmerer, 2004). De plus, certaines bactéries possèdent déjà des gènes de résistance innés (josé L 2009.). Lorsqu'elles sont exposées à des antimicrobiens, ces bactéries résistantes survivent et se multiplient, ce qui augmente la proportion de la population

bactérienne qui est résistante. Cette pression de sélection favorise les bactéries résistantes, qu'elles aient acquis cette résistance récemment ou qu'elles en soient naturellement dotées. Il existe des ARG conférant une résistance à presque tous les types d'antimicrobiens disponibles dans le commerce aujourd'hui, compliquant ainsi la lutte contre les infections résistantes. Des études ont montré que les ARG peuvent être présents dans divers environnements, y compris les sols, les eaux, les déchets et les dépôts atmosphériques dans les zones urbaines (García et al., 2020) (Preisner, 2020; Shao et al., 2018). Le transport des contaminants microbiens sur une longue distance a également été suggéré, impliquant un potentiel de dépôt atmosphérique d'ARG dans les régions arctiques (Mayol et al., 2019). Les ARG se développent dans l'environnement autour de diverses sources telles que les effluents d'eaux usées municipales des stations d'épuration (Marti et al., 2014; Wang et al., 2021), les effluents hospitaliers (Rodriguez-Mozaz et al., 2015), l'aquaculture (J. Zhang et al., 2023) et l'agriculture (Cerqueira et al., 2019b). Ainsi, il est nécessaire de surveiller et de contrôler la propagation de ces gènes de résistance pour préserver l'efficacité des traitements antibiotiques.

Les ARG présents dans les eaux de surface proviennent principalement des effluents des stations d'épuration des eaux usées, des rejets agricoles et des ruissellements urbains (Marti et al., 2013) (Marti et al., 2014). Ces gènes peuvent persister et se propager dans les rivières, les lacs et autres plans d'eau, affectant les écosystèmes aquatiques et potentiellement la qualité de l'eau potable. Dans le sol, les ARG sont souvent introduits par l'épandage de boues d'épuration, l'utilisation de fertilisants organiques et les activités agricoles (Cheng et al., 2016). Une fois dans le sol, les ARG peuvent être absorbés par les plantes ou transportés vers les eaux souterraines, contribuant à la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement (Murray et al., 2021). Les ARG absorbés par les racines des plantes peuvent ensuite être internalisés dans les tissus végétaux et transférés aux animaux ou aux humains par la consommation de ces plantes, bouclant ainsi le cycle de dissémination des résistances (Guo and Kong, 2019). En outre, les ARG peuvent être présents dans les sédiments aquatiques, où ils peuvent persister pendant de longues périodes en raison des conditions physico-chimiques stables qui favorisent leur conservation (Akçil et al., 2015). Les sédiments agissent comme des réservoirs pour les ARG, et les perturbations de ces sédiments, telles que les activités de dragage ou les inondations, peuvent remobiliser ces gènes dans l'eau de surface.

Malgré l'expansion des connaissances sur les sources environnementales des ARG, de nombreuses questions restent sans réponses sur les méthodes les plus efficaces pour réduire leur formation à la source, notamment dans les stations d'épuration des eaux usées et les installations de traitement des eaux hospitalières. Des stratégies de gestion rigoureuse et des technologies avancées de traitement des eaux sont nécessaires pour atténuer ce problème croissant.

2.3 Réduction des ARG par ozonation

Les traitements de désinfection appliqués aux eaux usées sont essentiels pour réduire la charge organique et respecter les limites réglementaires, en particulier pendant la saison estivale où les cours d'eaux sont utilisés à des fins récréatives. Parmi ces traitements, la chloration est utilisée en raison de son efficacité à éliminer une large gamme de pathogènes (Zheng et al., 2017), bien qu'elle puisse produire des sous-produits potentiellement nocifs qui nécessitent une gestion attentive (Mazhar et al., 2020). Pour cette raison, la chloration des eaux usées est interdite au Québec (Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements and climatiques, 2022). L'utilisation des rayons ultraviolets (UV) est le traitement tertiaire le plus répandu au Québec. Cette méthode désinfecte l'eau en perturbant l'ADN des microorganismes, les empêchant ainsi de se reproduire (Guo and Kong, 2019). Les traitements biologiques, comme les biofiltres et les lagunes d'épuration, sont également importants pour réduire la charge organique en dégradant les matières organiques grâce à l'activité microbienne, bien que ces traitements ne soient pas de la désinfection. Enfin, l'ozonation est une méthode encore peu utilisée mais pour laquelle il y a un intérêt croissant. L'ozone permet de détruire les bactéries, les virus et autres microorganismes (Foroughi et al., 2022). Bien que plus coûteuse, l'ozonation est particulièrement intéressante car elle offre une désinfection complète et ne génère pas de sous-produits dangereux, faisant de cette technique un sujet de recherche prometteur pour améliorer la qualité des eaux usées traitées.

2.3.1 Principes de l'ozonation

L'ozone, reconnu pour sa forte capacité oxydante, est largement utilisé dans les procédés de traitement des eaux pour dégrader une variété de contaminants organiques. En se décomposant, il scinde les composés polluants complexes en molécules plus petites et souvent plus biodégradables. Le mécanisme d'ozonation repose sur deux voies distinctes d'oxydation (Azaïs, 2015) La première

voie, appelée voie directe, consiste en une réaction entre l'ozone et les polluants, conduisant à leur destruction sans intermédiaire chimique. La seconde, dite indirecte, implique une série de réactions où l'ozone, au contact de l'eau, forme du peroxyde d'hydrogène, lequel se décompose en radicaux hydroxyles. Ces radicaux, particulièrement réactifs, jouent un rôle clé dans l'oxydation de nombreuses substances complexes, rendant cette voie particulièrement intéressante pour les composés résistants aux traitements conventionnels.

L'efficacité de l'ozonation dépend de multiples paramètres environnementaux et opératoires, parmi lesquels le pH de la solution joue un rôle central (Wu et al., 2021b). À un pH acide, l'ozone moléculaire prédomine, favorisant la réaction directe sur les polluants. Cependant, à un pH basique (≥ 9), la génération de radicaux hydroxyles augmente, ce qui rend la voie indirecte plus dominante. Outre le pH, d'autres facteurs influencent la performance du processus, tels que la concentration initiale des polluants, la température, et la présence de co-substances comme les ions de métaux lourds, qui peuvent agir comme catalyseurs ou inhibiteurs des réactions d'oxydation (Czekalski et al., 2016b). Par exemple, des ions fer ou cuivre peuvent catalyser la formation de radicaux libres, améliorant ainsi l'efficacité de l'ozonation dans certaines conditions (Zaviska et al., 2009). La Figure 2.1 représente les différentes voies par lesquelles l'ozone réagit avec les polluants dans divers contextes opératoires.

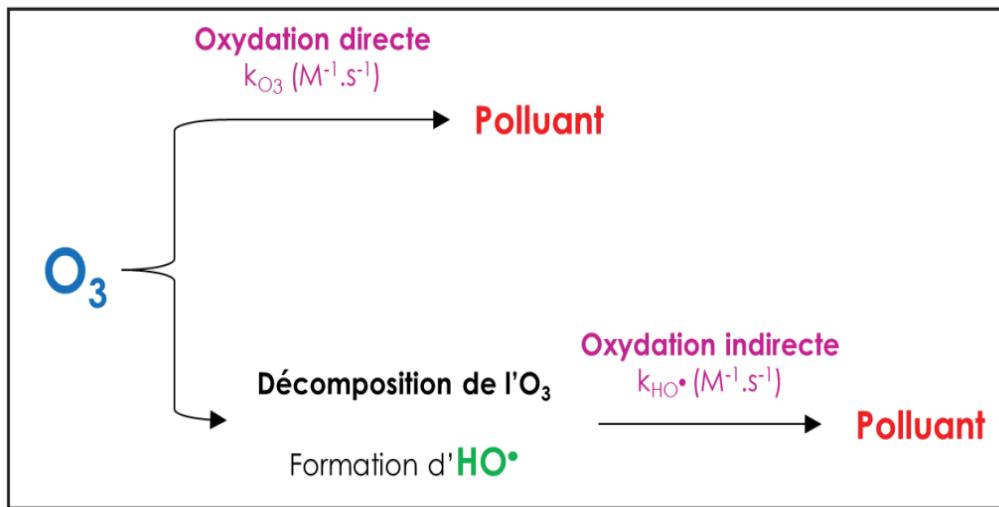


Figure 2-1 : Voies d'action de l'ozone sur les molécules à dégrader adapté d' Azaïs (2015)
(Azaïs, 2015)

2.3.2 Ozonation comme traitement tertiaire des eaux usées

L'ozone est l'un des plus puissants agents oxydants disponibles sur le marché (Foroughi et al., 2022) et peut être utilisé pour le traitement des eaux usées. En plus de ses propriétés d'oxydation, il constitue une méthode de traitement écologique. Les polluants, substances colorées, odeurs et microorganismes sont immédiatement détruits par l'oxydation, sans générer de produits dérivés chlorés ou résidus nocifs (Khan and Akhtar, 2019).

L'ozonation est utilisée comme traitement autonome ou préalable pour améliorer la biodégradabilité ou augmenter l'efficacité des traitements ultérieurs. Grâce à son fort pouvoir d'oxydation, l'ozone réagit avec une variété de composés organiques et inorganiques dans l'eau. Les recherches antérieures montrent que l'ozone attaque les composés aromatiques et insaturés, ce qui altère la composition chimique et la qualité générale de l'eau (Bader and Hoigné, 1981). Après l'ozonation de quatre effluents secondaires municipaux, Montgomery et al. (2016) ont observé une diminution de la Demande Chimique en Oxygène (DCO) (Montgomery et al., 2016), une augmentation initiale suivie d'une diminution de la Demande Biochimique en Oxygène sur 5 jours (DBO5), ainsi qu'une réduction du Carbone Organique Total (COT) et de la concentration en matières en suspension. L'ozone a également permis de réduire de manière significative les

détergents anioniques et non anioniques, ainsi que plusieurs types de pesticides et de phénols introduits dans les échantillons d'effluents (Gardiner et al. 1987). En outre, Lüddeke et al. (2015) ont démontré que l'ozonation suivie d'une filtration sur charbon actif ou sur sable a conduit à une diminution des niveaux *d'E. coli*, d'entérocoques et de staphylocoques totaux par rapport aux concentrations obtenues par simple filtration par flocculation (Lüddeke et al., 2015). Ces résultats soulignent l'efficacité du traitement avancé des eaux usées par ozonation pour éliminer davantage les micro-organismes avant leur rejet dans l'environnement récepteur.

De plus, l'ozonation est employée en traitement tertiaire pour éliminer les micro-organismes et les bactéries pathogènes des eaux usées. Son impact sur ces organismes a été étudié par divers chercheurs. Alexandre et al. (2016) ont examiné l'effet de l'ozonation sur les bactéries opportunistes (entérocoques, *Pseudomonas aeruginosa*, staphylocoques et entérobactéries) présentes dans les eaux usées après traitement conventionnel en station d'épuration (Alexander et al., 2016). Ils ont noté une sensibilité variable des espèces aux traitements à l'ozone, attribuée aux différences dans la structure de l'ADN (riche en GC versus riche en AT) et à la réactivité différentielle des liaisons hydrogène. Par exemple, les entérocoques ont montré une sensibilité élevée (réduction de 99 %), tandis que *P. aeruginosa* a montré une augmentation de l'abondance relative (42 %). Cette étude a également révélé une perte de diversité au sein de la population bactérienne des eaux usées après ozonation (Alexander et al., 2016).

2.3.3 Efficience de l'ozonation pour enlever les ARG

Le traitement conventionnel des eaux usées (boues activées, disques biologiques rotatifs, lits percolant) a une capacité limitée à réduire les ARG car ces polluants sont difficiles à éliminer (Y. Chen et al., 2020; Foroughi et al., 2022; Shao et al., 2018). Les procédés d'oxydation avancés peuvent être utilisés comme traitement complémentaire aux procédés conventionnels pour réduire la charge bactérienne. L'ozone est un traitement prometteur pour réduire les ARG dans les eaux usées et suscite beaucoup d'intérêt dans le traitement tertiaire des eaux usées (Ghernaout and Elboughdiri, 2020). Les ARG extracellulaires (ARGe) ont des réponses différentes aux processus de désinfection. Dans ce contexte, il a été démontré par Hang lui et al que l'élimination des ARGe pourrait être jusqu'à 4 log supérieure à celle des ARGi par la désinfection par HOCL, contrairement

à l'ozone qui, grâce à sa forte capacité oxydante, peut facilement provoquer la destruction membranaire des bactéries hébergeant des ARGi (Liu et al., 2022). Une altération de l'intégrité structurelle des cellules pourrait être rapidement observée pendant l'ozonation, et une exposition accrue à l' O_3 pourrait induire de graves dommages à l'ensemble du matériel cellulaire. En plus de l'ozonation directe des ARG, le OH[·] formé secondairement dans le processus d'ozonation peut réagir avec les ARG. En fait, la fragmentation des brins de l'ADN a été principalement induite par OH[·] expliquant le pouvoir oxydant fort de l'ozone contre la majorité des gènes de résistance (Liu et al., 2022). En outre, une étude a montré qu'une inactivation substantielle se poursuivait après la disparition de l'ozone résiduel, ce qui indique que l'ozonation peut aboutir à des éliminations plus importantes en maintenant les sous-produits désinfectants à un niveau bas (Haas and Jacangelo, 2022).

Dans certains cas, une réduction 96 à 100 % a été atteinte pour *ermB*, *vanA*, *blaTEM*, *sulI* et *qnrS* après un temps de contact de 30 min et une dose de 0.9 ± 0.1 g d'ozone per gramme de DCO (Alexander et al., 2016). Ceci est en accord avec les résultats obtenus précédemment par Hembach et al qui ont montré que l'ozonation est capable de réduire jusqu'à 97 % de *BlaTEM*, 82% de *CTX-M-3228* et une élimination quasi totale de *BlaOXA*. Au contraire, d'autres ARG comme *vanA* et *blaVIM* persistent et augmentent, probablement car ces ARG sont situés sur des éléments génétiques très mobiles (Tn1546 et Tn402, respectivement) facilitant leur transfert entre différentes espèces (Hembach et al., 2019). Dans le même contexte, des études ont observé que trois jours après l'ozonation, les ARG étaient détectés à des niveaux comparables à ceux pré-traitement, suggérant une inactivation microbienne transitoire plutôt que permanente (Sousa et al., 2017). À ce propos, Zheng et al. (2017) ont déclaré que les gènes *intI1* sont revenus à leurs valeurs préliminaires après trois jours de stockage de la solution (Zheng et al., 2017).

L'efficacité d'élimination des ARG est variable et dépend du type de gène ainsi que la dose de d'ozone et le temps de contact (Tableau 2). Dans l'ensemble, l'ozone contribue à éliminer au moins 2 log d'ARG dans les échantillons mentionnés (Tableau 2). L'ozonation semble une bonne solution pour éliminer plusieurs ARG comme *blaCTX*, *blaTEM* et *blaOXA* (Lamba and Ahammad, 2017), mais reste inefficace pour le traitement de certains gènes plus résistants comme Sul1(Czekalski et al., 2016a)

Tableau 2-2 : Comparaison de l'effet d'ozonation sur l'élimination des ARGs dans les eaux usées

Eaux usées	Temps de contact	Dose d'ozone	ARGs	Taux de réduction d'ARGs	REF
STEP urbaine	40 min	0.75 g/g	aadA1, dfrA1, sulI	Tous les ARG ont été réduits de 4 à 6 unités logarithmiques.	(Iakovides et al., 2019)
STEP urbaine		0.73 mg ozone/mg DOC			(Lüddeke et al., 2015)
STEP municipale	5 min	1 g ozone/g DOC	sulI blaTEM tetM CTX-M30 CTX-M-3228 blaOXA-48 blaVIM CMY-2 vanA mcr-1 blaNDM	2 log <2 log (97%) 2 log 4 log <2 log (81.77%) 100% ND ND ND ND ND	(Hembach et al., 2019)
Eau synthétique	0.047 to 1.3 s.	1 mg O ₃ /L		>90%	(He et al., 2019)
STEP urbaine	20 min	90 ppm	- blaCTX - blaOXA - blaTEM - blaNDM-1	100%	(Lamba and Ahammad, 2017)
STEP urbaine		0.5 to 11 mg O ₃ /L		Jusqu'à 50% Jusqu'à 50%	(Luczkiewicz et al., 2011)
STEP urbaine	15 min	0.3 mg O ₃ /L		100%	(Michael-Kordatou et al., 2017)
STEP urbaine		0.9 ± 0.1 g O ₃ /1 g DOC	<i>ErmB</i> <i>vanA</i> , <i>blaVIM</i>	Ils ont été réduits de près de 99 %	(Alexander et al., 2016)
Boues de déchets pharmaceutiques	2H	0.11 mg O ₃ /g dry sludge	ereA ermB ermF wrM mphB mefA/E) tetM tetO intI1	L'abondance absolue totale d'ARG a été réduite de 1,09 log copies/g	(Tong et al., 2017)

Tableau 2-2 : Comparaison de l'effet d'ozonation sur l'élimination des ARGs dans les eaux usées (suite)

Eaux usées	Temps de contact	Dose d'ozone	ARGs	Taux de réduction d'ARGs	REF
Eaux usées hospitalières	5 min	11 to 45 mg/L	<i>sulI</i> > <i>bla_{tem}</i> > <i>bla_{ctx}</i> > <i>qnrS</i> > <i>bla_{vim}</i>	Plus d'ozone = plus de réduction	(Baghal Asghari et al., 2021a)
STEP urbaine	<=30min	0–1.72 g ozone/g DOC	Sul1	Non affecté par ozonation	(Czekalski et al., 2016a)

*COD : Carbone organique dissous

*STEP : Station d'épuration des eaux usées

*ARG : Gènes résistants aux antibiotiques

* Eaux synthétiques : Solutions artificielles préparées en laboratoire avec une composition contrôlée.

*STEP urbaine : Traitement des eaux usées dans des zones urbaines.

*STEP municipale : Traitement des eaux usées géré par les autorités locales.

2.3.4 Facteur et paramètres opérationnels affectant l'efficacité de l'ozonation

Plusieurs facteurs peuvent affecter le taux d'élimination des ARG par ozonation. La dose d'ozone et le temps de contact affectent l'efficacité de l'ozonation, ainsi que les type des ARG retrouvés dans l'échantillon. Pour une réduction efficace des ARG, une combinaison dose-temps de contact minimale est requise. Dans une étude en laboratoire, 90 % des ARG ont été éliminés par une concentration d'ozone de 1 mg/L dans un temps de contact variant de 0.047 à 1.3 s (He et al., 2019). Ce court temps de contact combiné à une faible dose a mené à une faible réduction de 1 log des ARGs étudiés. En prolongeant le temps de contact à 5 minutes avec une dose de 1 g d'O₃/g de DOC, la réduction des ARGs variait de 81 % pour *CTX-M-3228* à 100 % (Iakovides et al., 2019). Une augmentation drastique du temps de contact à 40 minutes combiné à une dose de 0,75 g O₃/g DOC a permis d'éliminer tous les ARG étudiés (*aadA1*, *dfrA1*, *sull*) de 4 à 6 unités logarithmiques dans les eaux usées urbaines (Iakovides et al., 2019). En outre, certains chercheurs ont déclaré que l'efficacité d'élimination n'était pas remarquablement améliorée avec l'augmentation de la concentration d'O₃ (Bouki et al., 2013). Au contraire, l'augmentation peut imposer la génération du sous-produit cancérigène sous forme de bromates ou de nitrosamines (Hiller et al., 2019), alors que d'autres auteurs ont déclaré que l'augmentation de la dose d'ozone améliore l'efficacité d'élimination (Zheng et al., 2017; Zhuang et al., 2015) qui peut être due à l'auto-décomposition plus accélérée de l'ozone à haute concentration (Macauley et al., 2006).

Bien que la dose et le temps de contact soient les deux paramètres les plus sensibles pendant le processus de l'ozonation, il reste plusieurs autres facteurs qui peuvent affecter l'efficacité de traitement tels que le pH, la température, la conductivité, l'alcalinité ainsi que la matière organique naturelle (Yang et al., 2012).

La majeure partie de l'ozone appliquée pour la désinfection des eaux usées réagit avec la matière organique présente dans l'eau, en particulier à de faibles doses d'ozone (Macauley et al., 2006). En plus à présence d'alcalinité sous forme de bicarbonates (HCO₃⁻) et de carbonates (CO₃²⁻) peut en effet inhiber les réactions responsables de la génération de radicaux hydroxyle (OH[•]). Ces ions peuvent réagir avec les radicaux OH[•] issus de la décomposition de l'ozone et avoir un effet négatif

sur l'efficacité (Deng et al., 2020). La présence de radicaux libres permet de retenir l'ozone résiduel pendant de plus longues périodes, ce qui est important du point de vue de la désinfection. Le pH affecte aussi l'activité de piégeage des radicaux (CO_3^-) qui s'améliore à des valeurs de pH plus élevées (Deng et al., 2020). À l'inverse, un pH élevé diminue la concentration d'ozone mais génère plus de radicaux.

2.3.5 L'ARN 16S comme indicateur de nombre de bactérie totale

L'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) est une molécule d'ARN présente dans le ribosome des bactéries, essentielle pour la synthèse des protéines. Utilisé pour mesurer l'abondance relative des bactéries (Huerta et al., 2013), l'ARNr 16S est très utile en raison de ses régions conservées et variables, permettant à la fois l'identification précise des groupes bactériens et la différenciation entre espèces. Sa présence en plusieurs copies dans chaque cellule bactérienne assure une sensibilité élevée, permettant de détecter et quantifier efficacement les bactéries, même en faibles abondances (Arango-Argoty et al., 2018). En fait, L'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) est couramment utilisé comme indicateur du nombre total de bactéries en raison de sa présence universelle chez la quasi-totalité des bactéries, ce qui en fait un excellent biomarqueur pour divers types d'échantillons environnementaux ou cliniques. Ce gène est hautement conservé, avec des régions variables permettant de distinguer différentes espèces bactériennes tout en facilitant la quantification globale des bactéries. Des techniques telles que la PCR quantitative en temps réel (qPCR) permettent de mesurer précisément la quantité d'ARNr 16S, fournissant ainsi une estimation fiable du nombre total de bactéries dans un échantillon. De plus, l'ARNr 16S, essentiel à la synthèse des protéines ribosomiques, reflète le potentiel de croissance et d'activité cellulaire des bactéries, ce qui renforce sa pertinence en tant qu'indicateur du nombre total de bactéries et de leur activité potentielle. L'utilisation de l'ARNr 16S pour la quantification bactérienne est bien documentée dans la littérature scientifique, notamment dans des études telles que celles de Muyzer et al. (1993), qui a souligné l'importance de ce gène dans l'écologie microbienne et la taxonomie moléculaire (Muyzer et al., 1993).

2.3.6 Les mycobactéries (NTM) comme indicateur de l'efficacité de l'ozonation

Les mycobactéries non tuberculeuses (NTM) sont un ensemble varié de bactéries du genre *Mycobacterium*, qui se distinguent des espèces responsables de la tuberculose et de la lèpre (Amha et al., 2017a). Elles sont largement répandues dans l'environnement, présentes dans le sol, l'eau et divers habitats naturels (Barbier et al., 2023). Certaines espèces NTM sont des bactéries opportunistes et peuvent causer des infections cutanées et pulmonaires chez l'humain (Pavlik et al., 2022). L'environnement peut être une source d'exposition par voie d'inhalation de bioaérosols contenant ces bactéries, même provenant des eaux de baignade et pouvant provoquer une pneumonie (Bell et al., 2023). Les NTM sont reconnues pour leur résistance aux méthodes de désinfection comme l'ozonation (Conyers and Saunders, 2024) en raison de leur paroi cellulaire épaisse et riche en lipides, ainsi qu'à leur capacité à former des biofilms protecteurs (Conyers and Saunders, 2024). Elles sont ainsi plus résistantes que les coliformes totaux et fécaux, ainsi que *E. coli* (Gan et al., 2022). Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer le potentiel de NTM comme indicateur de l'efficacité du traitement par ozonation. Une concentration élevée de NTM après traitement suggère une efficacité réduite de l'ozonation, soulignant la nécessité d'améliorer les protocoles de désinfection pour mieux éliminer ces bactéries résistantes et protéger la santé publique. De plus, NTM regroupe des espèces de bactéries opportunistes et est documentée comme une problématique de santé publique émergente (Amha et al., 2017a).

La présence de NTM est bien établie dans l'environnement, se retrouvant dans les affluents et effluents des stations d'épuration (Pavlik et al., 2022), dans différentes matrices environnementales telles que l'eau de surface, l'eau souterraine (Falkinham et al., 2001), le sol, et même les poissons marins (Irshath et al., 2023), ainsi que dans les usines de traitement d'eau potable (Castillo-Rodal et al., 2012) et les réseaux de plomberie des bâtiments (Falkinham et al., 2011). Bien que la présence des NTM dans l'environnement soit bien documentée, la principale source de transmission reste encore inconnue., leur présence dans les rejets des stations d'épuration est bien établie (Amha et al., 2017a) et est associée à leur persistance dans ces milieux marins. Ceci suggère que les stations d'épuration des eaux usées (STEP) sont une source possible de propagation de NTM dans l'environnement. Le risque associé à cette bactérie opportuniste émergente, ainsi que la résistance

aux différents types de traitement, en font un bon indicateur pour évaluer l'efficacité des traitements.

Malgré la disponibilité d'informations concernant la détection des ARG dans les STEP, il reste difficile d'évaluer la relation entre leur abondance relative, leur concentration aux différentes étapes du procédé et les facteurs opérationnels de la station. Les effluents, même après traitement des stations d'épuration, contiennent des concentrations en ARG qui sont rejetés dans les milieux aquatiques, causant possiblement un risque à l'environnement ainsi que pour la santé humaine. Ainsi, il est important de documenter et mesurer les différents facteurs opérationnels dans le traitement conventionnel des STEP qui pourraient influencer l'efficacité du traitement pour l'enlèvement des ARG (T, pH, DCO, TR, débit) et de mieux comprendre comment ces facteurs affectent l'efficacité de l'ozonation pour différents types d'eaux usées.

En fin de compte, malgré l'énorme quantité d'informations disponibles dans la littérature, les résultats obtenus restent difficiles à interpréter, car les données n'ont pas été standardisées pour l'expression des unités. Certaines études rapportent l'élimination en termes d'abondance absolue, tandis que d'autres normalisent les données par rapport à la quantité de gène d'ARNr 16S, c'est-à-dire l'abondance relative. L'abondance relative permet une meilleure comparaison des résultats entre différentes études en tenant compte des variations dans les quantités totales d'ADN, ce qui rend l'évaluation de l'efficacité de l'ozonation plus précise et cohérente.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT INDIQUANT LA COHÉRENCE DES ARTICLES PAR RAPPORT AUX OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Ce chapitre est consacré à décrire la démarche du projet de recherche, structuré en fonction des objectifs du projet et des étapes nécessaires pour y répondre. La partie centrale du projet repose sur une importante campagne d'échantillonnage, visant à atteindre l'objectif global. D'autres activités ont été complétées pour atteindre des objectifs spécifiques, permettant ainsi la rédaction d'un article (voir chapitre 4) soumis à la revue *Science of the Total Environment* (STOTEN) le 26 juillet 2024. Cet article propose des recommandations concrètes pour contrôler le risque des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG). Ce chapitre complétera également les informations manquantes de l'article en précisant les choix méthodologiques et analytiques réalisés, tels que le choix des paramètres pour évaluer la performance de l'ozonation, le choix d'une station équipée d'un procédé d'ozonation au Québec malgré la prédominance des étangs aérés, l'utilisation du HT-qPCR pour l'analyse des ARG, et l'utilisation des culots pour l'extraction de l'ADN.

3.1 Choix de la station d'échantillonnage et des gènes cibles

Le processus de sélection de la station d'échantillonnage a été réalisé avec soin et rigueur. Nous avons opté pour une station d'épuration recevant une variété d'eaux, y compris celles provenant d'hôpitaux, domestiques et industrielles, afin de couvrir un large spectre de sources potentielles d'antibiorésistance. Les eaux usées brutes entrant dans cette station, subissent un traitement préliminaire, comprenant le dégrillage et le dessablage, avant d'être dirigées vers des cuves de prémélange. Dans ces cuves, les eaux usées sont mélangées avec des boues activées pour créer un mélange homogène avant d'entrer dans les bassins d'aération (quatre bioreacteurs), où les polluants sont dégradés par l'action bactérienne, avec un temps de rétention hydraulique de 15 heures. L'eau s'écoule ensuite dans trois clarificateurs conçus pour la séparation mécanique des solides et des particules en suspension. À ce stade, l'élimination du phosphore est réalisée par injection de sulfate

ferrique dans les clarificateurs. L'eau clarifiée provenant des clarificateurs est soit évacuée de l'usine, soit dirigée vers un système de traitement à l'ozone, en fonction de la saison.

Concernant le traitement des boues : Les boues sont extraites des clarificateurs, une partie étant recirculée vers les bassins d'aération (liquide mixte), tandis que le reste est dirigé vers l'unité de flottation (avec dosage de polymère pour épaisser les boues). Les boues épaissees sont ensuite envoyées vers des centrifugeuses (avec un ajout supplémentaire de polymère) pour la déshydratation. Les boues déshydratées sont destinées à un usage agricole ou à l'élimination dans des sites miniers.

Après une visite détaillée de la station, 4 points de prélèvement ont été identifiés pour assurer une représentativité maximale des échantillons. Le choix des gènes ciblés s'est appuyé sur une revue bibliographique exhaustive (chapitre 2), couvrant les antibiotiques les plus couramment utilisés au Québec ainsi que les ARG ayant montré une résistance à l'ozonation. Cette sélection minutieuse visait à garantir la pertinence des résultats par rapport aux objectifs de la recherche.

3.2 Campagne d'échantillonnage

La campagne d'échantillonnage s'est déroulée sur une période de 13 semaines, du 28 août 2023 au 21 novembre 2023. Débutant en août, lorsque les températures sont généralement élevées, et se terminant en novembre, lorsque les conditions sont plus fraîches, cette période d'échantillonnage a permis d'explorer les effets de l'ozonation dans des contextes environnementaux différents. Toutes les conditions d'échantillonnage ont été rigoureusement contrôlées, avec une stérilisation préalable des bouteilles de prélèvement pour éviter toute contamination. De plus, deux phases distinctes d'échantillonnage ont été planifiées : une pendant la période d'ozonation et une après son arrêt le 15 octobre, afin de mieux comprendre l'impact spécifique de ce traitement sur les résultats obtenus. La première partie s'étend sur 10 semaines, du 28 août au 31 octobre. Chaque semaine, quatre échantillons ponctuels ont été collectés (Fig. 4.1, chapitre 4) : eau brute à l'entrée de l'usine (Influents - INF), effluent du traitement biologique par boues activées (Effluent secondaire - EF-S), effluent du traitement tertiaire avec O₃ (Effluent final - EF-F), et boues déshydratées combinées qui résultent de la combinaison des boues provenant des traitements primaire (séparation des solides par décantation) et secondaire (traitement biologique pour décomposer la matière organique). (SL, qui ne sont pas ozonées). La deuxième partie de la campagne d'échantillonnage s'est déroulée trois semaines après l'arrêt de l'ozonation (du 1er au 21 novembre), pendant

lesquelles les échantillons ont été collectés aux mêmes quatre emplacements, sauf que l'effluent secondaire n'a pas été soumis à l'ozonation. Par conséquent, l'effluent final n'a pas été ozoné et est identifié comme EF-F'. Au total, 54 échantillons ont été collectés au cours des deux parties.

3.3 Choix des paramètres à analyser et efficacité du processus de traitement

3.3.1 Pourquoi choisir STEP utilisant l'ozonation comme procédé avancé au Québec?

Bien que plus de 90 % des stations d'épuration au Québec utilisent des étangs aérés comme procédé de traitement des eaux usées, nous avons choisi de focaliser notre étude sur une station équipée d'une technologie d'ozonation. Ce choix s'explique par le fait que l'ozonation est l'un des procédés d'oxydation avancée les plus prometteurs pour l'élimination des contaminants émergents, y compris les ARG. Étudier une station utilisant l'ozonation permet de comprendre l'efficacité de cette technologie dans un contexte réel et de fournir des données pertinentes pour son potentiel déploiement à plus grande échelle dans la province. De plus, la construction en cours à Montréal d'une grande unité d'ozonation pour le traitement des eaux usées, destinée à être la plus grande au monde, souligne l'importance de cette technologie.

3.3.2 Choix des paramètres pour analyser la performance de l'ozonation

Le **pH** joue un rôle crucial dans la formation de radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$), qui sont les oxydants principaux lors de l'ozonation. un pH plus élevé favorise la production de ces radicaux, augmentant l'efficacité de l'ozonation. Cependant, une augmentation excessive du pH peut entraîner une consommation non optimale de l'ozone, diminuant ainsi l'efficacité globale du processus. Nos résultats confirment les tendances théoriques observées dans la littérature et indique que l'optimisation du pH est essentielle pour maximiser les bénéfices de l'ozonation Toutefois, la variabilité du pH dans les systèmes de traitement réels doit être soigneusement contrôlée pour éviter une consommation excessive d'ozone et garantir une efficacité optimale.

L'**alcalinité**, principalement due à la présence d'ions bicarbonate (HCO_3^-) et carbonate (CO_3^{2-}), peut réduire la disponibilité des radicaux hydroxyles en agissant comme des piégeurs de radicaux. Une diminution de l'efficacité de l'ozonation dans des eaux à forte alcalinité, ce qui est en accord

avec nos résultats confirmant l'impact de l'alcalinité sur la formation des sous-produits d'ozonation et sur la qualité de l'eau traitée est significatif. Il est crucial de développer des stratégies de traitement en amont pour réduire l'alcalinité et améliorer l'efficacité globale du processus d'ozonation.

Les **matières en suspension** (MES) peuvent protéger les polluants de l'oxydation en limitant l'accès des radicaux hydroxyles et de l'ozone à ces derniers. Nos résultats montrent que des niveaux élevés de MES réduisent l'efficacité du traitement. Cela souligne l'importance d'une pré-filtration ou d'autres traitements en amont efficace pour éliminer les MES avant l'ozonation. En réduisant les MES, on peut améliorer la distribution de l'ozone dans l'eau, augmentant ainsi l'efficacité du traitement des polluants.

La **demande chimique en oxygène** (DCO), indicateur de la charge organique dans l'eau, est un facteur déterminant pour la consommation d'ozone. Une DCO élevée nécessite davantage d'ozone pour dégrader la matière organique. Nos observations montrent une corrélation positive entre la DCO et l'efficacité de l'ozonation, mais aussi une interaction complexe avec d'autres paramètres tels que les MES, les MVES, et l'ABS-UV. Cela s'explique par le fait que ces paramètres mesurent différents aspects de la matière organique dans l'eau : les MES et MVES représentent les particules solides et organiques en suspension, tandis que l'ABS-UV reflète la concentration de matière organique dissoute. Ainsi, une haute DCO est associée à une forte charge organique dans les effluents, visible à travers ces autres mesures.

Les **sulfures** réagissent rapidement avec l'ozone, ce qui peut réduire l'efficacité de l'ozonation pour d'autres composés. Les **nitrites**, en réagissant avec l'ozone pour former des nitrates, consomment également une partie de l'ozone disponible. Nos résultats montrent une consommation d'ozone significative en présence de ces composés confirmées par leur absence totale dans les effluents finales, confirmant leur impact négatif sur l'efficacité globale du processus. La présence de sulfures et de nitrites dans les eaux usées pose un défi important pour l'ozonation. Des stratégies pour minimiser leur concentration, comme l'ajustement des conditions d'ozonation ou des traitements en amont, devraient être envisagées.

Une **turbidité** élevée, causée par les particules en suspension, peut entraver la diffusion uniforme de l'ozone dans l'eau. Nos observations montrent que la turbidité réduit l'efficacité de l'ozonation,

surtout en présence de MES, confirmant la nécessité de la réduction de la turbidité avant le traitement est cruciale pour assurer une diffusion optimale de l'ozone et maximiser son efficacité.

La **température** influence directement la solubilité et la stabilité de l'ozone dans l'eau. Une température élevée diminue la solubilité de l'ozone tout en accélérant sa décomposition, ce qui peut réduire l'efficacité du traitement. Cependant, nos résultats montrent que la production accrue de radicaux hydroxyles à des températures plus élevées peut compenser cette perte d'ozone, confirmé par nos résultats qui n'ont pas montré d'impact significatif de la variation de température, allant de 13,7 à 21°C, au cours des 13 points d'échantillonnage.

3.3.3 Justification de l'utilisation du HT-qPCR pour l'analyse des ARG

L'utilisation de la technologie HT-qPCR (quantitative PCR à haut débit) pour l'analyse des ARG a été motivée par la nécessité de quantifier avec précision un large éventail de gènes de résistance dans les échantillons d'eaux usées. Le HT-qPCR offre une sensibilité élevée et la capacité de détecter plusieurs cibles génétiques simultanément, ce qui en fait un outil idéal pour évaluer l'impact de l'ozonation sur les ARG présents dans les effluents. Ce choix méthodologique permet également de comparer nos résultats avec ceux d'autres études similaires, renforçant ainsi la robustesse de notre analyse.

3.3.4 Pourquoi utiliser uniquement les culots pour l'extraction d'ADN?

Lors de l'extraction d'ADN pour l'analyse des ARG, nous avons opté pour l'utilisation exclusive des culots des échantillons, en laissant de côté le surnageant. Cette décision a été prise car les culots contiennent la majorité des cellules microbiennes et des particules sur lesquelles les ARG sont majoritairement associés. Le surnageant, contenant principalement de l'eau et des substances dissoutes, aurait fourni une faible concentration en ADN de bonne qualité pour l'analyse. Ce choix méthodologique assure une extraction d'ADN plus concentrée et de meilleure qualité, essentielle pour des analyses précises et fiables, résultats confirmés par la figure suivante :

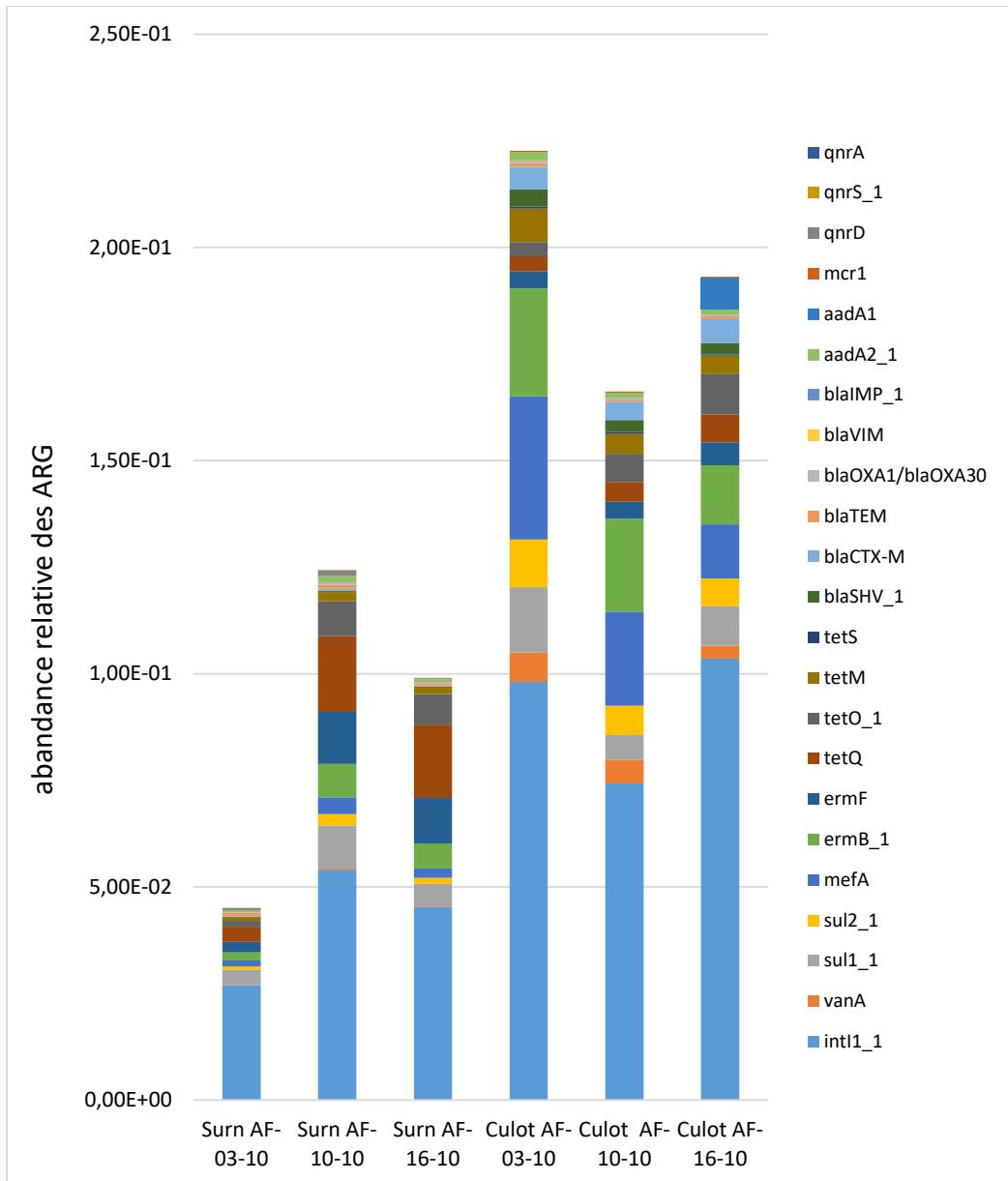


Figure 3-1 : Comparaison de l'abondance relative des Gènes de Résistance aux Antimicrobiens (ARG) entre le culot et le surnageant dans les eaux usées

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: EFFECT OF OZONATION ON THE REDUCTION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES AND NON- TUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN FULL-SCALE WASTEWATER TREATMENT PLANT EFFLUENTS

Ce chapitre présente les résultats sous forme d'article scientifique, soumis à la revue *Science of the Total Environment* le 26 juillet 2024.

**Malek Harrabi¹, Helena Ferreira Leal², Arthur Ouradou¹, Sarah Dorner¹, Benoit Barbeau¹,
Emilie Bédard¹**

¹Department of civil engineering, Polytechnique Montréal, Québec, Canada

²Departement of Microbiology, Infectious Diseases, and Immunology, Faculty of medicine, Université de Montréal, Québec, Canada

Abstract

Weekly samples were collected over 3 months at the influent, activated sludge effluent, ozonation effluent and sludge of a wastewater treatment plant. Physico-chemical analysis and metal concentrations (iron, zinc, copper, cadmium, cobalt, and aluminum) were performed for all samples. In total, 22 of 23 targeted ARGs were detected in influent samples, including those coding for resistance to beta-lactams (*blATEM*, *blasHV*, *blaCTX-M*, *blaOXA-1/30*, *blaVIM*, and *blaIMP*), sulfonamides (*sul1* and *sul2*), vancomycin (*vanA*), and colistin (*mcr-1*). The activated sludge treatment was the largest contributor to reduce ARG concentrations by at least 2.5 log, with *qnrD*, *qnrS*, *tetS*, and *aada1* below detection limit. Ozonation induced an additional but smaller 0.4 to 1.5 log removal. Only the gene *ermF* increased in concentration after ozonation. A concentration above 100 μ g/mL was still detected in the ozonated effluent for *sul1*, *mefA* and *ermF* despite the observed reduction. The relative abundance of *blaVIM*, *blasHV-1*, *vanA*, *mcr1*, *intI1*, *aada2* and *tetO* were significantly higher in sludge compared to influents. NTM was representative of the lowest ARG log removal, suggesting it could be a good surrogate to evaluate treatment efficiency toward ARG removal. Results also unveiled an association between specific metal concentrations (e.g.,

Fe) and *intI1*, *vanA*, and *sul1* levels. A correlation between macrolides and tetracyclines in sludge suggests a potential influence of metal presence on the co-selection of ARGs. Results suggest the need to define treatment goals based on representative indicators such as NTM, to limit the dissemination of ARGs in the environment via the discharged effluents and biosolids used in land application.

Keywords

Activated sludge, antibiotic resistance, NTM, wastewater treatment, biological treatment, metal-ARGs co-occurrence

Highlights

- Full-scale activated sludge and ozonation treatment reduced ARGs by 2.8 to 7.2 log
- Activated sludge treatment was the largest contributor to reduce ARG and NTM in wastewater
- Ozonation reduced all ARGs by 0.4 to 1.5 log, except *emrF* which increased by 1.5 log
- NTM are possible indicators for treatment efficiency on removal
- Co-occurrence or co-selection of *intI1*, *vanA*, and *sul1* with metals in sludge

4.1 Introduction

The massive consumption of antimicrobials worldwide is causing growing concern about its environmental impact. These drugs are extensively used in various sectors, including medical, veterinary and agricultural activities and they can persist in the environment (A et al., 2020; Lu et al., 2019; Rodriguez-Mozaz et al., 2020), contributing to the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR). Wastewater is a significant reservoir of antimicrobial resistance genes (ARGs) (J. Chen et al., 2020). Once introduced into aquatic environments, these genes can spread rapidly, increasing the risk of resistance in surrounding microbial communities (Amarasiri et al., 2020).

Despite their prevalence, ARG detection is not yet included in wastewater effluent standards or regulations for aquatic environments. Wastewater treatment plants (WWTPs) typically apply a combination of biological and physicochemical treatment methods to reduce chemical contaminants, coarse solids, organic compounds, and microorganisms. Nevertheless, ARGs have been detected in the effluents of WWTPs (Amador et al., 2015; Azuma et al., 2022; Baghal Asghari et al., 2021a; Zainab et al., 2020). Recent evidence shows that ARGs circulate through the urban water cycle and can be detected from wastewater to drinking water (Leal et al., 2024; Rodriguez-Mozaz et al., 2015). Moreover, ARGs can persist in effluents even after different disinfection processes, such as chlorination, UV, and ozonation (Guo et al., 2015; McKinney and Pruden, 2012; Zhuang et al., 2015). Previous studies indicate that although ozone can reduce the number of microorganisms and ARGs, it does not completely eradicate them (Baghal Asghari et al., 2021b; Chiellini et al., 2014; Deng, 2020).

Several factors influence the effectiveness of ozonation treatment in removing ARGs, including the ozone dose, water pH, alkalinity, and the presence of metals in wastewater (Foroughi et al., 2022). Metals can interact with bacteria and ARGs, facilitating their spread or persistence in the environment. For example, metals like copper and zinc can co-select for antimicrobial resistance by promoting the growth of bacteria that harbour both metal and antimicrobial resistance genes (Bédard et al., 2021; Pal et al., 2017, 2015). Additionally, the presence of metals can increase horizontal gene transfer among bacteria through mechanisms such as conjugation, further spreading ARGs across microbial communities.

Specific genes for heavy metal resistance are often situated on mobile genetic elements such as plasmids or transposons, which can also harbour genes for antimicrobial resistance. Consequently,

bacteria that develop resistance to heavy metals may also acquire resistance to certain antimicrobials (Di Cesare, Eckert, and Corno 2015; Arya et al. 2021; Dickinson et al. 2019). The complex relationship between metals and ARGs highlights the importance of understanding these interactions to improve wastewater treatment strategies and reduce the spread of antimicrobial resistance (Pal et al., 2017, 2015).

Wastewater treatment is often designed and monitored to ensure the reduction of biological oxygen demand below regulatory requirements, total phosphorus and to achieve low *Escherichia coli* concentrations when the effluent can impact recreational and drinking water sources (Baghal Asghari et al., 2021b; Elmund et al., 1999; Oliveira and Von Sperling, 2008). However, these targets are not necessarily good indicators of the process efficacy to reduce ARGs. Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are emerging opportunistic pathogens widely present in the environment, including in wastewater treatment plant effluents, surface waters, drinking water distribution networks, and household plumbing systems (Haig et al., 2018; Loret and Dumoutier, 2019). NTM are resistant to various treatments, including ozonation. Its cellular composition, rich in mycolic acids, makes it resistant to conventional water disinfection techniques (Gupta et al., 2018), as well as being acid-resistant and resistant to certain antibiotics (Falkinham, 2003). Some NTM strains can regulate their internal pH to survive in acidic environments (Rao et al., 2001). They are also present in high concentrations in municipal wastewater (Amha et al., 2017b; Han et al., 2020; Radomski et al., 2011).

Although the correlation between non-optimized disinfection methods, metals, and resistance genes is evidenced across multiple investigations, there is a lack of full-scale studies simultaneously investigating the relationships among these different factors. The main objective of this study is to fill this gap by assessing the impact of biological treatment and ozonation in a full scale municipal wastewater treatment plant on ARG removal. More specifically, the study aims to identify how factors such as influent raw quality, physicochemical parameters, metal concentration vary and correlate with ARGs, and to evaluate NTM as an indicator of wastewater treatment efficacy to reduce ARGs. The results of this study will provide insights for improving wastewater treatment processes and mitigating the public health risks associated with the dissemination of antimicrobial resistance.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Study site

The study took place in a municipal wastewater treatment plant (WWTP) located in the province of Quebec, which receives both domestic and industrial wastewater. This WWTP serves a population of close to 100,000 inhabitants and is designed to treat urban wastewater with a daily average flow rate of 65,000 m³ per day. The treatment process involves a biological treatment using activated sludge followed by ozonation during the summer season (between the month of May and October) to maintain discharge water quality. The processes employed in the treatment at this WWTP are detailed in Figure 1. Average ozone dose was 1.81mg/L and varied depending on water quality and daily flow rate, ranging between 0 and 2.42 mg/L (Table S3). The dosage was set to achieve *Escherichia coli* reduction goals.

4.2.2 Sample collection

A sampling campaign was conducted weekly from August 28th to November 21st, 2024, with air temperatures between 32 and -10 °C and influent wastewater temperatures between 21 and 14 °C. This campaign was divided into two parts. The first part spans over 10 weeks, from August 28th to October 31st. Each week, four grab samples were collected (Fig. 1): raw water at the plant inlet (Influent - INF), biological treatment with activated sludge effluent (Secondary effluent– EF-S), tertiary treatment effluent with O₃ (Final Effluent – EF-F), and dehydrated sludge (SL, which are not ozonated). The second part of the sampling campaign consists of three weeks after ozonation was stopped (November 1st to 21st), during which the samples were collected in the same four locations, except that the secondary effluent was not subjected to ozonation. Therefore, the final effluent was not ozonated and is identified as EF-F'. In total, 54 samples were collected during the two parts. Water samples were collected in sterile 1 L polypropylene bottles, while sludge samples were collected in sterile 250 mL containers. All samples were kept at 4 °C until microbiological processing, within 24 hours following sampling.

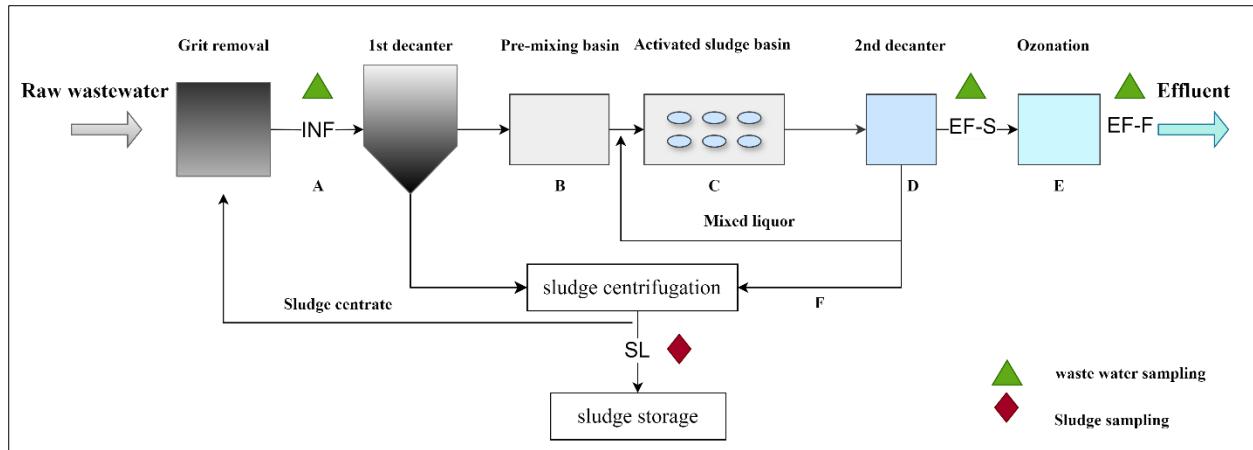


Figure 4-1:Diagram showing the locations of sample collection points.

The raw wastewater undergoes pretreatment including screening and grit removal (A) before entering to the pre-mixing basins (B). These basins allow mixing of the wastewater with activated sludge to form a homogeneous mixture before entering the activated sludge basin (4 bioreactors) where pollutants and organic matter are degraded by bacteria, with a retention time of 15 hours (C). Subsequently, the water passes through 2nd decanter designed for mechanical separation of solids (D). At this stage, phosphate removal is also achieved by injecting ferric sulfate $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ into the clarifiers. The clarified effluent is directed either to the plant outlet or to an ozone treatment system depending on the time of year (E). Sludge is extracted from the clarifiers, with a portion being recycled to the aeration basins (mixed liquor) and the remaining sludge being directed to the flotation tank (with polymer dosage for thickening) (F). Sampling points are indicated as follows: INF – Influent; EF-S- Secondary; EF-F – ozonated final effluent or EF-F' – non ozonated final effluent and SL – Sludge.

4.2.3 Assessment of heavy metals and other physicochemical characteristics

The pH, temperature, conductivity, alkalinity, turbidity, and suspended solids (Total – TSS and Volatile - VSS) were measured according to the Quebec Environmental Analysis Expertise Center (CEAEQ) protocols. For Chemical Oxygen Demand (COD), nitrite, and sulfide, analyses were conducted according to manufacturer instructions, using the following Hach kits respectively: USEPA1 Reactor Digestion Method2 (method 8000), TNT 840 Nitrite and TNT plus R 861. For UV Absorbance at 254nm, it was measured according to the Online Standard Methods from the National Environmental Method Index (NEMI): 5910B, Standard Methods, 22nd Edition, 2012. In summary, 50 mL of sample was filtered through 0.45 μm , 47 mm PES (polyethersulfone)

membranes (Pall/Supor-450) and measured on a spectrophotometer at 254 nm using a 10 mm quartz cell.

The concentration of iron (Fe), aluminium (Al), cadmium (Cd), cobalt (Co), copper (Cu), and zinc (Zn), were measured in both sludge and water samples. Metal digestion was performed using an Express HotBlock™ Digestion System as per manufacturer instructions. For water samples, the EPA 200.2 method, Revision 2.8, was employed. Regarding sludge samples, three different methods were tested: EPA 200.7, EPA 3050B, and the method described by Almquist (Almquist et al., 2014). Based on the results, EPA 200.7 was selected due to its superior performance. For analysis, 2-mL duplicates were measured on a Perkin Elmer 900F atomic absorption technique.

4.2.4 Sample concentration and DNA extraction

For wastewater samples, a 200 mL aliquot of each sample was centrifuged (15,000 rpm, 15 min) prior to DNA extraction. Pellets were recovered, ensuring that the mass did not exceed 250 mg per sample. For sludge samples, DNA extraction was conducted directly on 250 mg (wet weight). DNA was isolated using the *DNeasy PowerSoil Pro* Kit (Qiagen, DE) according to the manufacturer's protocol. A DNA extraction negative control (PBS) was incorporated during the process. The quality and concentration of the extracted DNA were assessed using ultraviolet-absorbance (NanoDrop, One spectrophotometer Thermo Scientific™). Total DNA was eluted using C6 solution (80 µl) and stored at -80°C until further use.

4.2.5 High-throughput qPCR of ARGs/16s and q-PCR of NTM

For each sample (wastewater and sludge), the concentrations of total bacteria (16S) and ARGs, were quantified using High-throughput quantitative Polymerase Chain Reaction (HT-qPCR). The HT-qPCR was performed by Resistomap Ltd. (Finland) using the qPCR SmartChip Real-Time PCR cycler (Takara Bio Inc., Japan) to analyse ARGs and 16s. The qPCR cycling conditions and initial data processing followed the methodology outlined by (Wang et al., 2014). The analysis utilized a 384-well primer template. A total of 23 genes were selected: *blatem*, *blas hv*, *bla ox a*, *bla CTX-M*, *bla IMP*, *bla VIM*, *qnrA*, *qnrD*, *qnrS*, *ermB*, *ermF*, *mefA*, *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS*, *mcr-1*, *intI1*,

sul1, *sul2*, *vanA*, *aadA1* and *aadA2*. The ARG 2.1 primer sets were used according to the current antimicrobial resistance gene database (CARD). All samples adhered to specific criteria: 260/280 ratio of 1.8-2.0 and a concentration ≤ 10 ng/ μ l. The threshold cycle (Ct) values were calculated using default parameters provided by the SmartChip analysis software. All samples for each primer set underwent qPCR efficiency and melting curve analysis. Amplicons with unspecific melting curves and multiple peak profiles were considered false positives and excluded from further analysis. Samples meeting the following criteria were selected for analysis: (1) Ct ≤ 27 , (2) at least two replicates, (3) amplification efficiency 1.8 - 2.2. Gene copy numbers were computed by normalizing the relative copy numbers per 16S rRNA gene copy numbers.

NTM were quantified using Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR). NTM were quantified according to the adapted protocol described by Haig et al. (Haig et al., 2018) focusing on the *rpoB* gene. Quantified DNA from the K-10 strain of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (ATCC®, Manassas, Virginia, USA) was used to prepare the standard curves. Quantification was performed in duplicate using the BioRad® CFX96 Opus thermocycler, with negative controls included in each run and variation between duplicates ≤ 1.3 %. Data analysis was carried out using CFX Maestro V.2.0 software (BioRad Laboratories®, Hercules, California, USA).

4.2.6 Data analysis and visualization

The relative abundance of ARGs was calculated by normalizing the ARG concentration by the total bacterial concentration estimated by the number of copies of the 16s rRNA gene. The normality of heavy metal content, physicochemical properties, and the relative abundance of ARGs was assessed using R software version V.4.4.0 in combination with Python scripts. To examine the relationships between ARGs, heavy metal content, and physicochemical properties, Spearman's rank correlation tests were conducted. Additionally, Principal Component Analysis (PCA) and Principal Coordinates Analysis (PCoA) were performed using R software version V.4.4.0. The Adonis coefficient was calculated based on the Bray-Curtis distance to determine the significance of the observed differences. These analyses allowed for the visualization of sample distribution

based on treatment types and the assessment of the impact of treatments on physicochemical parameters.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Impact of Treatment Processes on Key Wastewater and Sludge Parameters

A total of 54 samples were collected from a wastewater treatment plant using activated sludge (secondary treatment) followed by ozonation (tertiary treatment) and sludge dehydration. Four types of samples were collected: raw wastewater at the inlet (INF), secondary treatment effluent (EF-S), final effluent (EF-F or F'), and dehydrated sludge (SL). The final effluent was ozonated for the first 10 weeks of the study (EF-F) and non-ozonated for the last three weeks (EF-F'). Overall, the final effluent water characteristics met the standards imposed by the Quebec Wastewater Treatment Works Regulation (Tétreault, 2021). The removal efficiency exceeded 90% for total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS), COD (Chemical Oxygen Demand) and turbidity, while ranging between 48-73% and 42-63% for UV absorbance (UVA254) and alkalinity (ALK). pH levels remained relatively stable, ranging from 7.05 to 7.70 in the influent samples and 6.48 to 7.50 in the final effluent. Water sample temperature fluctuated between 14 to 21 °C during the sampling campaign (August to November) (Table S.1).

As expected, the activated sludge process was responsible for a reduction of 93.6% in TSS, 94.2% in VSS, 93.3% in COD and 95.7% in turbidity (Table S1; Figure S.1). Microorganisms in activated sludge play a key role in breaking down organic materials, transforming them into biomass (Tran et al., 2022). The clarifier helps remove biomass, reducing TSS, VSS and turbidity levels in the treated secondary effluent. Further reduction of those parameters was achieved after ozonation, likely due to the oxidizing effect of ozone (Lin et al., 2022). A significant difference between the ozonated (final effluent) and the secondary effluents was observed as calculated with Adonis coefficient, based on Bray-Curtis distance, with a p-value of 0.001 and R^2 of 0.21119. The homogeneity of results was confirmed by the betadisper analysis ($F = 0.5093$, $P = 0.1939$). However, when looking at the distribution of physico-chemical parameters through a principal coordinate analysis, it was

observed that the final effluent samples collected when the ozonation system was off (Nov. 1st to Nov 21st) displayed a profile similar in the vertical component to the samples collected when the ozonation system was ON for TSS/VSS, COD, and turbidity (Fig. S.1). This suggests that the canal connecting the primary effluent to the final effluent could induce further sedimentation and be partly responsible for the decrease observed for these parameters.

To gain a deeper understanding of the effect of ozonation on various physicochemical parameters, the correlations between these parameters and ozonation were analyzed (Figure. 2). The correlations observed suggest that ozonation effectively improves the quality of the effluent by reducing suspended solids, refractory organic compounds, and the chemical oxygen demand. A strong correlation was observed between ozonation and the reduction in TSS, VSS, ABS-UV, and COD (Figure. 2). This finding is consistent with those of Phan and colleagues which show that ozonation is efficient in breaking down complex organic matter into simpler and more oxidizable compounds, thus reducing the suspended solids load and reducing the oxygen demand of the water (Phan et al., 2022). Additionally, ozonation reduces complex organic compounds, particularly aromatics, which tend to absorb UV light, and decrease the refractory substances.



Figure 4-2: Spearman Correlation Heatmap for Physicochemical Parameters relative to ozone treatment. The secondary effluent was represented as a 0 value and the final effluent as a 1 value. A negative correlation indicates a reduction between the secondary and the final effluent.

In our study, iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), cobalt (Co) and aluminum (Al) were detected in at least one sample (Table 1). Aluminum and iron were found in higher concentrations in the influent, and aluminum was not detected in any of the effluent or sludge samples, except for one secondary treatment effluent sample. In that sample, higher concentrations of metals were found in the sludge compared to all water samples. Iron remained present throughout all the treatment steps and in the sludge. According to the existing literature, high concentrations of aluminium in influent samples can be attributed to the use of aluminium sulfate as a coagulant in raw water, industrial discharges from factories using aluminium compounds, and municipal wastewater containing aluminium from household products like antacids and antiperspirants (Moussaron et al., 2023). However, the absence of aluminium in the sludge and effluent indicates that aluminium is retained by the activated sludge process, as Al^{3+} readily precipitates, aiding in the removal of biomass and other contaminants (Ojo and Ifelebuegu, 2019). A 60% increase in iron concentration was observed between the influent and the primary effluent. This increase is attributed to the addition of ferric

sulfate (FeSO_4) into the settling tanks for phosphorus removal. The concentration of Zn, Cu and Co remained stable throughout the process (Table 1).

Tableau 4-1. Average concentration of heavy metals in wastewater samples (mg/L) and sludge samples (mg/g) during the 13 sampling campaigns. The min-max value is provided below the average, in italics. EF_S: secondary effluent; EF_F: finale effluent, ozonation ON; EF_F': finale effluent, ozonation OFF.

	Influent (mg/L)	EF_S (mg/L)	EF_F (10) (mg/L)	EF_F' (3) (mg/L)	Sludge (mg/g)
Fe	1.09 <i>0.55-2.18</i>	1.65 <i>0.32-2.36</i>	1.40 <i>0.34-2.31</i>	1.18 <i>0.22-2.07</i>	9.75 <i>6.13-11.83</i>
Zn	0.11 <i>0.02-0.22</i>	0.03 <i>0.01-0.06</i>	0.06 <i>0.01-0.17</i>	0.04 <i>0.03-0.05</i>	0.11 <i>0.09-0.145</i>
Cu	0.06 <i>0.03-0.18</i>	0.03 <i>0.01-0.05</i>	0.03 <i>0.02-0.05</i>	0.02 <i>0.01-0.03</i>	0.027 <i>nd-0.042</i>
Cd	nd <i>nd</i>	nd <i>nd</i>	nd <i>nd</i>	nd <i>nd</i>	0.3×10^{-3} <i>nd -3.4 \times 10^{-3}</i>
Co	0.032 <i>nd-0.06</i>	nd <i>nd</i>	nd <i>nd</i>	nd <i>nd</i>	5.9×10^{-3} <i>nd -0.15</i>
Al	1.88 <i>nd-7.67</i>	nd <i>nd</i>	0.78 <i>nd-3.30</i>	nd <i>nd</i>	2.05 <i>1.55-3.02</i>

4.3.2 Diversity and abundance of ARGs along the wastewater treatment steps

The rRNA16S gene and 23 selected ARGs (Fig. 3) were targeted by HT-qPCR. Macrolide, β -lactam, tetracycline, aminoglycoside, and sulfonamide resistance genes are the most commonly recovered ARGs in untreated sewage worldwide (Hendriksen et al., 2019). Here, while the *qnra* gene was absent in all samples, the remaining 22 ARGs were detected in at least one sample. Influent samples could harbour as many as 20 distinct ARGs (Fig. 3). The influent samples exhibited the highest number of different ARGs detected ranging from 19/23 and 21/23 ARGs. In contrast, the final effluent after ozonation displayed the lowest number, with one sample showing 0/23 and others up to 12/23 ARGs detected, except for one week where 17 out of the 23 targeted ARGs were detected. This week corresponds to the day where ozonation was not operating properly and no ozone was added to the water. Furthermore, when comparing the first 10 effluent samples (EF-F) during ozonation with the last 3 effluent samples (EF-F') without ozonation, 75% of targeted genes were found in all non-ozonated samples. This suggests an impact of the ozonation on the diversity of genes detected from week to week as opposed to what was observed with physico-chemical results (Figure S.1).

		Influent (IN)	Secondary Effluent (EF_S)	Final Effluent Ozone ON (EF_F)	Final Effluent Ozone OFF (EF_F')	Sludge (SL)
Integrons	<i>intI1</i>	100%	15%	10%	0%	100%
Vancomycin	<i>vanA</i>	100%	46%	50%	67%	100%
Sulfonamide	<i>sul1</i>	100%	46%	40%	100%	100%
	<i>sul2</i>	100%	62%	40%	100%	100%
MLSB	<i>mefA</i>	100%	62%	50%	100%	100%
	<i>ermB</i>	100%	46%	40%	67%	100%
	<i>ermF</i>	100%	54%	60%	100%	100%
Tetracycline	<i>tetQ</i>	100%	38%	40%	100%	92%
	<i>tetO</i>	100%	38%	30%	67%	100%
	<i>tetM</i>	100%	46%	20%	67%	100%
	<i>tetS</i>	100%	0%	0%	0%	67%
Beta Lactam	<i>bla_{SHV}</i>	100%	54%	50%	67%	92%
	<i>bla_{CTX}</i>	100%	62%	40%	100%	100%
	<i>bla_{TEM}</i>	100%	15%	10%	0%	100%
	<i>bla_{OXA1}</i>	100%	31%	10%	33%	83%
	<i>bla_{VIM}</i>	46%	23%	10%	67%	100%
	<i>bla_{IMP}</i>	0%	0%	10%	0%	25%
Aminoglycoside	<i>aadA2</i>	100%	46%	40%	67%	92%
	<i>aadA1</i>	31%	0%	0%	0%	0%
Other	<i>mcr1</i>	100%	38%	20%	67%	100%
Quinolone	<i>qnrD</i>	100%	0%	0%	33%	67%
	<i>qnrS</i>	100%	0%	0%	0%	42%
	<i>qnrA</i>	0%	0%	0%	0%	0%

Figure 4-3: Percent positivity for the presence of each ARG per sample type. In total, 13 samples were collected and analysed for Influent, Secondary Effluent and Sludge. For Final Effluent, 10 samples were collected with ozonation system on, and 3 samples were collected with ozonation system off.

The relative abundance of ARGs was calculated by normalizing the ARGs over the total bacterial concentration estimated by the number of copies of the 16s rRNA gene. Relative abundance varied greatly through the treatment steps, with high relative abundance in influent and sludge samples compared to secondary and final effluents (Fig. 4). The general trend shows that the relative abundance of certain ARGs fluctuates significantly depending on the treatment applied. The *intI1* had the highest relative abundance and showed significant variations at a given sampling location throughout the 13 campaigns as reported in previous studies (Cacace et al., 2019; Shin et al., 2022). A high relative abundance, close to 10%, was observed in the influent and sludge samples, while it was near the limit of quantification in most secondary and final effluents (Fig. 4B, Fig. S.2). The *intI1* gene is an integron commonly used as a marker for detecting and monitoring antimicrobial

resistance in various environments. It plays a crucial role in the evolutionary dynamics of certain members of the microbiome containing ARGs, facilitating horizontal gene transfer of ARGs among microorganisms (Mazhar et al., 2020).

The resistance genes to the MLSB, vancomycin and sulfonamides antimicrobial families were still present in more than 40% of the final effluent samples, after ozonation (Fig. 3). Similar findings were observed by (Xu et al., 2016), (Czekalski et al., 2016a) and (Wu et al., 2010). Sulfonamide ARGs have been shown to resist to ozonation better than other ARGs, especially *sul1* and *sul2* genes (Czekalski et al., 2016; Sousa et al., 2017). Furthermore, Sousa et al. (2017) observed an increase of *sul1* levels after 3 days of storage, back to the pre-treatment levels (Sousa et al., 2017). On the other hand, previous research report contradictory results on the impact of ozonation on *vanA*. Johannes et al. (2016) observed increase after ozone treatment while Sousa et al. (2016) demonstrated that *vanA* concentrations were reduced to below the limit of quantification following ozonation (Sousa et al., 2017). With 50% samples still positive for *vanA* after ozonation in this study, this gene appears to have some level of resistance to ozonation. However, the reported variability in previous studies might be linked to the operating conditions of the ozone treatment.

The most abundant ARGs in influent samples were *intI1*, *ermF*, *ermB*, *mefA*, and *vanA* (Fig. 4A). Variations in the diversity of ARGs across the influent samples may stem from the specific properties of the wastewater affluent feeding the plant, particularly in presence of industrial wastewater, which can introduce a diverse range of chemicals and/or medical products, potentially favouring the presence of specific ARGs or even the prevalence of multidrug-resistant genes (MDRGs). Further variations can be induced by wastewater flow rate, which would be greatly impacted by rainfall. During the sampling period, rainfall events were between 0 and 24 mm, and the flowrate was between 42 147 m³/d and 74 372 m³/d (Supp. Table S3). In the final effluent, *tetQ*, *aadA2*, and *Sul2* were the most prevalent. On the other hand, *intI1*, *vanA*, *blasHV*, *blavIM*, *mcr-1*, and *sul1* showed increased relative abundance in sludge compared to the influent (Fig. 4A), suggesting that the activated sludge process could retain a large majority of the ARGs. These ARGs were not detected in ozonated effluents, except for a single campaign (C5). As previously mentioned, this campaign corresponds to a week during which the ozonation was out of service and no ozone was applied to the water.

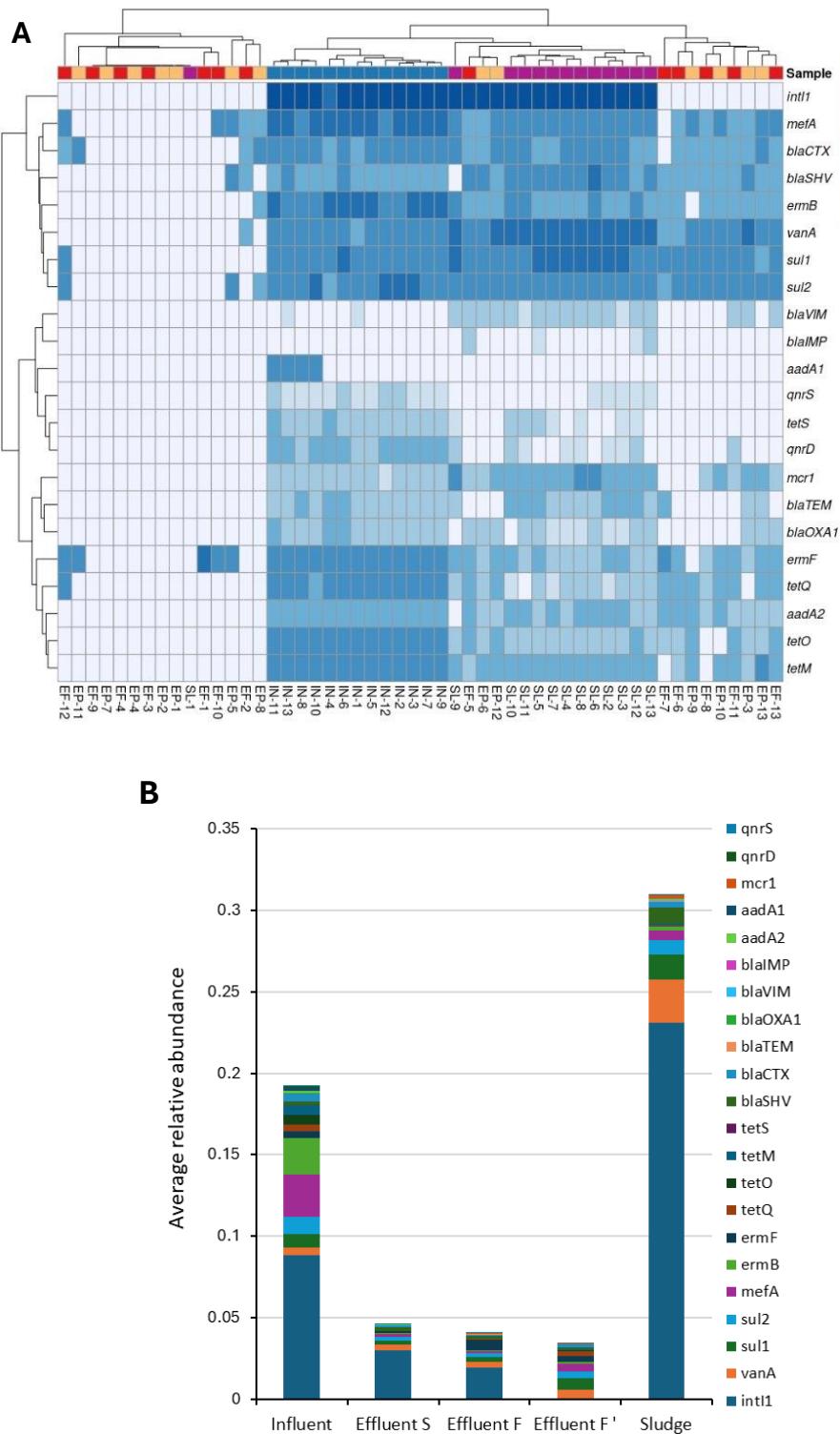


Figure 4-4: Distribution of ARGs was analyzed using (A) Heatmap depicting the log value of the relative abundance of ARGs across various samples and (B) Histogram illustrating the average relative abundance of ARGs at the different sampling locations. The relative abundance was calculated by dividing the ARGs by the total bacterial concentration estimated by the number of copies of the 16s rRNA gene.

When comparing the relative abundance of all ARGs in the influent vs. the secondary effluent (after activated sludge), a significant difference was observed for *intI1*, *aadA2*, *tetQ*, *sul2*, and *bla_{CTX-M}* ($p < 0.05$). In contrast, the difference between the secondary effluent and the final effluent (ozonated) was not significant for all ARGs ($p > 0.05$).

To evaluate the effect of biological treatment and ozonation on the relative abundance of ARGs, 9 ARGs were selected and analysed in more detail (Fig. S.3). A significant reduction was observed after biological treatment (EF_S) for *intI1*, *aadA2*, *tetQ*, *sul2*, and *bla_{CTX-M}*. However, *mcr-1*, *bla_{VIM}*, *bla_{SHV}*, and *vanA* did not show significant differences, suggesting that these ARGs are not as effectively reduced by biological treatment as total bacteria. When comparing the effluent after ozonation (EF_F) to the secondary treatment effluent (EF_S), none of the differences were significant. The increase in relative abundance observed in week 5, corresponded to a higher flow rate and a shutdown of the ozone generator (Table S.2).

To better understand the contribution of secondary treatment and ozonation in reducing ARGs, the log removal was monitored across the treatment chain for the three weeks before stopping ozonation and the three weeks after (Table 2). A log reduction between 2.4 and 7.2 was observed after activated sludge treatment, with nearly total removal efficiency of the *intI1* gene (Table 2). This is in line with the important decrease in relative abundance observed in the final effluent samples (Fig. 4A).

Tableau 4-2: Log removal of ARGs, NTM and 16S observed between influent and secondary effluent samples, and between secondary effluent and final effluent samples. Results from weeks 8, 9 and 10 were used for the ozone treatment ON data, and from weeks 11, 12 and 13 for the ozone treatment OFF data. The overall log removal is a combination of the secondary treatment removal and the ozone treatment removal. EF_S: Secondary effluent after activated sludge; EF_F: Final effluent with ozonation system ON; EF_F': Final effluent with ozonation system OFF

Target genes	Influent water (gc/mL)	Secondary treatment		Ozone treatment ON		Overall Log removal	Influent water (gc/mL)	Secondary treatment		Ozone treatment OFF		Overall Log removal
		EF_S (gc/mL)	Log removal	EF_F (gc/mL)	Log removal			EF_S (gc/mL)	Log removal	EF_F' (gc/mL)	Log removal	
<i>intI1</i>	1.0E+07	6.4E-01	7.2	2.8E-01	0.4	7.6	1.0E+07	4.7E+04	2.3	5.2E-01	5.0	7.3
<i>vanA</i>	3.7E+05	3.2E+02	3.1	5.0E+01	0.8	3.9	5.0E+05	3.4E+03	2.2	7.5E+02	0.7	2.8
<i>sul1</i>	8.7E+05	4.0E+02	3.3	1.0E+02	0.6	3.9	8.9E+05	1.3E+03	2.8	6.3E+02	0.3	3.2
<i>sul2</i>	1.1E+06	6.3E+02	3.2	8.3E+01	0.9	4.1	8.5E+05	1.4E+03	2.8	4.5E+02	0.5	3.3
<i>mefA</i>	1.4E+06	4.8E+02	3.5	1.8E+02	0.4	3.9	1.5E+06	1.5E+03	3.0	5.5E+02	0.5	3.4
<i>ermB</i>	1.4E+06	8.8E+01	4.2	1.2E+01	0.9	5.1	1.2E+06	5.7E+02	3.3	1.2E+02	0.7	4.0
<i>ermF</i>	4.5E+05	8.7E+00	4.7	2.2E+02	-1.4	3.3	3.5E+05	9.7E+02	2.6	2.2E+02	0.6	3.2
<i>tetQ</i>	4.7E+05	9.2E+01	3.7	3.8E+00	1.4	5.1	4.0E+05	4.1E+02	3.0	1.4E+02	0.5	3.5
<i>tetO</i>	6.8E+05	5.5E+01	4.1	2.8E-01	2.3	6.4	2.9E+05	1.8E+02	3.2	8.0E+01	0.4	3.6
<i>tetM</i>	3.7E+05	8.9E+01	3.6	2.8E-01	2.5	6.1	3.5E+05	6.4E+02	2.7	1.3E+02	0.7	3.4
<i>tetS</i>	2.8E+04	6.4E-01	4.6	2.8E-01	0.4	5.0	3.4E+04	1.8E+00	4.3	5.2E-01	0.5	4.8
<i>bla_{SHV}</i>	2.1E+05	1.0E+02	3.3	1.3E+01	0.9	4.2	2.4E+05	2.9E+02	2.9	1.8E+02	0.2	3.1
<i>bla_{CTX}</i>	5.3E+05	2.8E+02	3.3	8.0E+00	1.5	4.8	5.0E+05	1.4E+03	2.5	1.9E+02	0.9	3.4
<i>bla_{TEM}</i>	4.5E+04	6.4E-01	4.8	2.8E-01	0.4	5.2	3.4E+04	3.7E+01	3.0	5.2E-01	1.9	4.8
<i>bla_{OXA1}</i>	5.0E+04	6.4E-01	4.9	2.8E-01	0.4	5.3	4.6E+04	1.1E+02	2.6	4.8E+01	0.4	3.0
<i>bla_{VIM}</i>	5.1E+02	6.4E-01	2.9	2.8E-01	0.4	3.3	1.9E+03	5.8E+01	1.5	1.4E+01	0.6	2.1
<i>bla_{IMP}</i>	5.1E+02	6.4E-01	2.9	2.8E-01	0.4	3.3	4.0E+02	1.8E+00	2.4	5.2E-01	0.5	2.9
<i>aadA2</i>	1.2E+05	9.1E+01	3.1	5.9E+00	1.2	4.3	1.2E+05	1.1E+02	3.0	3.2E+01	0.5	3.6
<i>aadA1</i>	6.7E+05	6.4E-01	6.0	2.8E-01	0.4	6.4	8.4E+05	1.8E+00	5.7	5.2E-01	0.5	6.2
<i>mcr1</i>	2.3E+04	6.2E+00	3.6	3.3E+00	0.3	3.8	3.3E+04	1.9E+02	2.2	5.2E+01	0.6	2.8
<i>qnrD</i>	6.4E+04	6.4E-01	5.0	2.8E-01	0.4	5.4	6.1E+04	1.8E+00	4.5	1.2E+00	0.2	4.7
<i>qnrS</i>	9.6E+03	6.4E-01	4.2	2.8E-01	0.4	4.5	7.9E+03	1.8E+00	3.7	5.2E-01	0.5	4.2
NTM	1.3E+06	5.7E+03	2.4	1.1E+03	0.7	3.1	1.0E+06	1.5E+04	2.4	3.7E+03	0.6	3.0
16S	1.0E+08	1.3E+05	2.8	5.6E+04	0.4	3.2	8.0E+07	3.5E+05	1.8	1.0E+05	0.5	2.4

The impact of ozonation on ARG removal was less significant than that of biological treatment, with a reduction of less than 0.5 log for 75% of the studied genes (Table 2). The contribution of ozonation was more important for 3 of the 4 tetracycline resistance genes (*tetQ*, *tetO* and *tetM*) that were not reduced as much in the secondary treatment (Table 2). *bla_{CTX-M}* and *aadA2* were also further impacted by ozonation with close to 1.5 log removal after the ozonation step.

Even though ARGs such as *bla_{SHV}*, *bla_{VIM}*, *vanA*, and *mcr-1* showed significant reductions in their relative abundance after ozonation (Fig S.4), they were still detected in 10 to 50% of ozonated effluents (Fig. 3), although in concentrations below 5×10^1 gc/mL. Bacteria can enter a viable but non-culturable state following exposure to ozone, but they have been shown to recover and multiply during the post-ozonation phase (Jäger et al., 2018). This recovery period remains

undefined and varies from one bacterium to another. A previous study indicated that *intI1* resurged 3-day post-ozonation (Zheng et al., 2017). However, this aspect was not investigated in the present study.

Despite the high overall log removals observed, it is interesting to mention that *sul1*, *mefA* and *ermF* had average concentrations $\geq 10^2$ gc/mL in the ozonated effluent (Table 2). These genes were present in high concentrations in the influent ($\geq 10^5$ gc/mL) and were not reduced as well by the secondary treatment as other genes.

The overall decrease in ARG concentrations observed underscores the crucial role of secondary biological treatment in diminishing ARGs, with ozonation offering an additional but variable reduction (Table 2). The biological treatment was effective in reducing all targeted genes by at least 2.5 log, reaching more than 4 log for 45 % of the 22 genes present in the influent. Ozonation had a lesser contribution, achieving between 0.3 and 2.5 log additional reduction. The only exception was for *sul1*, which increased by 1.4 log after ozonation. These results are consistent with previous studies. For instance, Wang et al. (2020) also found that ARGs can persist even after advanced treatments such as ozonation. Additionally, Zhang et al. (2023) showed that the efficiency of ARG removal is highly dependent on the type of treatment and the specific characteristics of the ARGs (Wang et al., 2020; X. Zhang et al., 2023). Despite the efficiency of the treatment to reduce the concentration of ARGs, low level concentrations may persist and their fate in the environment after effluent discharge should be monitored.

4.3.3 Accumulation of ARGs in dewatered sludge

ARGs such *intI1*, *vanA*, *blasHV*, *blavIM*, *mcr-1* and *sul1* displayed increased relative abundance in sludge compared to influent. This may be due to preferential selection and accumulation of these genes in this organic-rich environment, offering favorable conditions for ARG multiplication and facilitating horizontal gene transfer (Tian et al., 2022). These findings are concerning as the sludge can be used as biosolids and applied to agricultural lands. This could help the spread of these ARGs in the soil and the environment. The variety and concentration of detectable ARGs suggest that activated sludge could serve as a significant repository for ARGs. This type of sludge creates an optimal environment for the growth and settlement of bacteria, as well as for biofilm development, which are potential carriers of ARGs (Sabri, 2020). Consequently, the prevalence of ARG-carrying microorganisms influences their distribution in both liquid and solid phases, with a decrease in

aquatic environments and an increase in sludge (X. Zhang et al. 2023, Zhang et al., 2018). As a result, ARGs may accumulate in sediments and soil exposed to wastewater effluent (Chen et al., 2019, 2016). Regarding the dewatered sludge, it appears to be effective in significantly reducing several ARGs (*mcr-1*, *blavIM*, *plashV*, *vanA*, *intI1*, *aadA2*, and *tetQ*), although some (*sul2* and *blaCTX-M*) persist.

4.3.4 NTM as an indicator of ARG removal in WWTPs

The analysis of the relative abundance of Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM/16S) indicates an increase in both secondary and tertiary effluents compared to the influent concentrations (Fig. 5A). However, when considering the NTM concentrations, a reduction is observed in effluent samples (Fig. 5B, Table 2). These results suggest that although the treatment contributes to reduce NTM concentrations in wastewater, they are more persistent than total bacterial population, resulting in increased relative abundance despite the reduction in concentrations. The log removal observed for NTM corresponds to the lowest removal observed for the 23 genes analysed (Table 2). This may be attributed to the bacteria's resistance to ozonation and the physicochemical parameters of the water (Gupta et al., 2018). Those are promising results to use NTM as a surrogate marker for ARG removal by wastewater treatment.

In dehydrated sludge, increases in NTM relative abundance and concentrations were observed (Fig. 5), suggesting that NTM accumulates in the sludge extracted from the activated sludge basin. The hydrophobic properties of the NTM cell wall may partly explain their preponderance in dewatered sludge rather than in the supernatant of the activated sludge process (Falkinham, 2003; Gupta et al., 2018). This is observed with 2.4 log average removal achieved in the secondary treatment (Table 2). Further detailed investigation on the mass balance between the influent concentration, the removal by secondary treatment and the concentration found in the dehydrated sludge could help confirm this hypothesis.

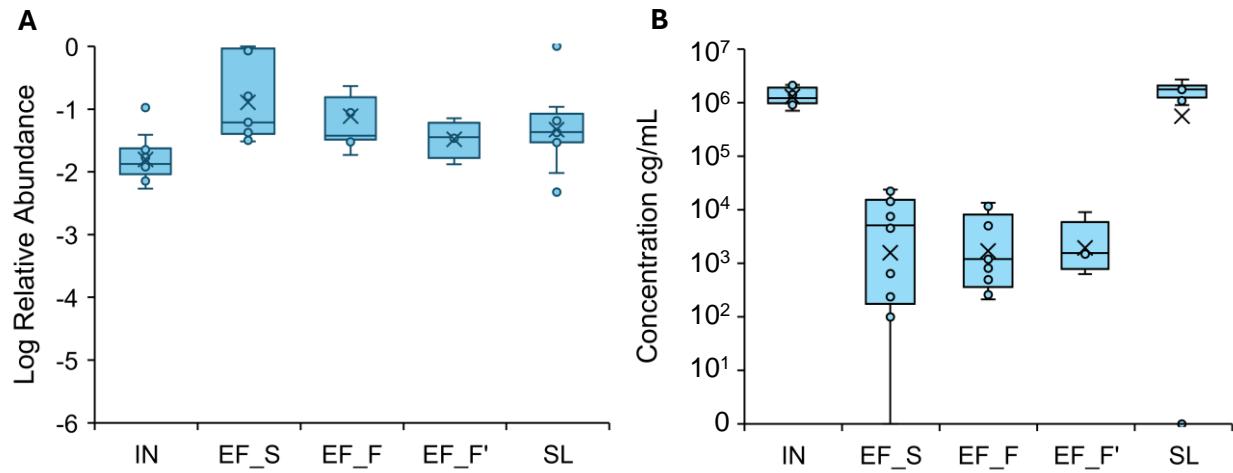


Figure 4-5: Log of the relative abundance of NTM/16S rRNA during the 10 ozonation campaigns and the 3 campaigns after ozonation cessation (A), and log of NTM concentration (cg/ml) during the same periods (B). IN = Influent; EF_S = Secondary effluent; EF_F = Final effluent with ozonation ON; EF_F' = Final effluent with ozonation OFF.

4.3.5 Co-occurrence of ARG and heavy metal

The choice of heavy metals was based on the surrounding industries and research on metals significant in ARG co-selection, such as copper and zinc (Engin et al., 2023; Pal et al., 2015). Spearman correlation analysis was used to assess the co-occurrence of ARGs and metals in sludge vs. influent (Fig. 6A), and in final effluent vs. secondary effluent (Fig. 6B) to assess the effect of ozonation on co-selection.

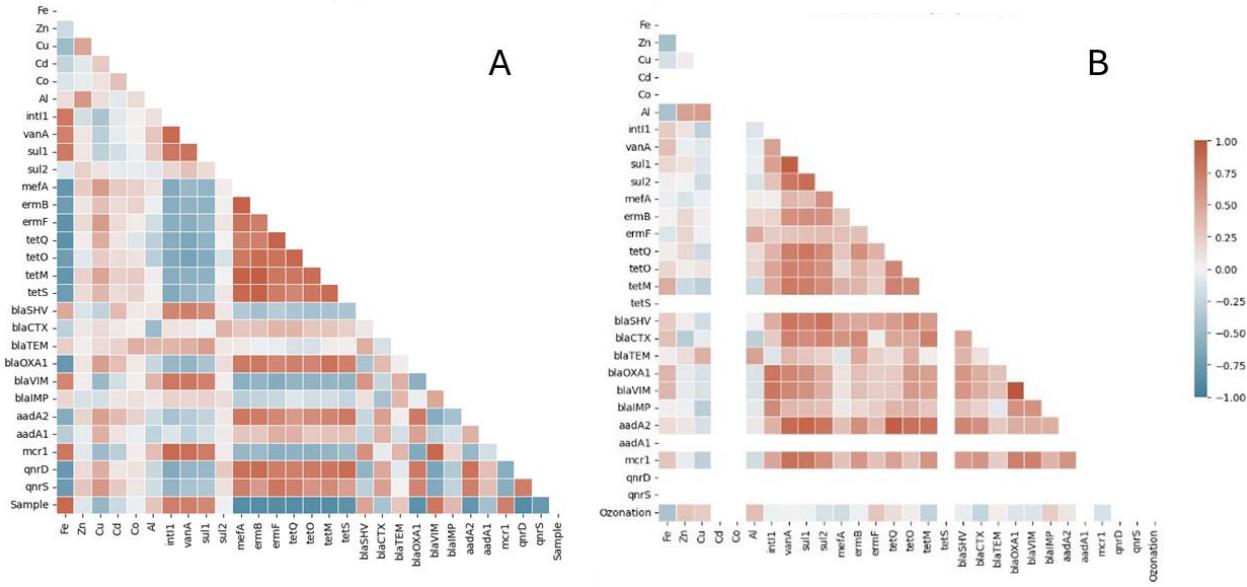


Figure 4-6: Correlation analysis among metals and ARGs for sludge and influent (A) and between secondary and ozonated effluent (B). The ‘Sample’ variable in (A) represents the influent (0) or the sludge (1). A positive correlation of an ARG with the sample variable means that there is an increase in relative abundance between the influent and the sludge. The ‘Ozonation’ variable (B) represents the secondary effluent (0) and the final effluent (1). A positive correlation with the ozonation variable means that there is an increase in relative abundance between the secondary influent and the final effluent.

A strong correlation between *blaVIM* and *blaOXA-1* was observed in effluent samples, as well as a strong correlation between *aadA2* and *tetQ* (Fig. 6B). This could be due to a co-selection of those pairs of ARGs or to similar behaviors. It is interesting to note that relative abundance of *emrF* and *blaIMP* displayed the highest positive correlation with ozonation, while *tetM* and *blaCTX* had the strongest negative correlation with ozonation. These results illustrate how different ARGs will behave differently relative to each other (Fig. 6B). When looking at log removal by ozonation process, only *emrF* increased after ozonation (Table 2). A persistent correlation in sludge and post-ozonation was observed between *sul1* and *vanA* (Fig. 6).

Overall, iron (Fe) was strongly associated with sludge (Fig. 6A) while it was negatively correlated with ozonation (Fig. 6B), with decreased concentration in final effluent compared to secondary effluent. The higher concentrations in secondary effluent are attributed to the use of iron (FeSO₄) in the clarifiers for dephosphatation. Iron predominantly precipitates with bacterial biomass in sludge during treatment processes, increasing its concentration in sludge and reducing it in the final

effluent. This change is therefore not caused by the ozonation. A strong positive correlation was also observed between the presence of iron and the ARGs *intl1*, *vanA*, and *sul1*, while a negative correlation was found with *tetS*, *tetM*, *tetQ*, *ermF*, *ermB*, and *mefA* (Fig. 6A). This aligns with recent studies showing that iron can facilitate the proliferation of certain ARGs by promoting bacterial survival and gene transfer mechanisms in wastewater environments (Tang et al., 2022). Conversely, copper (Cu) exhibited moderate positive correlations with *qnrS*, *aadA2*, *blaOXA-1*, *tetM*, *tetS*, *tetQ*, *ermF*, and *mefA*, and negative correlations with *mcr-1*, *blavIM*, and *intl1*. Recent research highlights the complex role of copper in influencing ARG profiles, where copper presence can either enhance or suppress specific ARGs depending on the environmental context (Zhang et al., 2020). Notably, copper was positively correlated with the largest number of ARGs in influent and sludge samples, reflecting its potential role in ARG accumulation and persistence in these matrices. In contrast, positive correlations with iron were predominantly observed in secondary and final effluent samples, suggesting that iron might play a more significant role in the downstream stages of wastewater treatment (Kazadi Mbamba et al., 2019; Wilfert et al., 2015).

The presence of heavy metals in high concentrations in sewage sludge was positively correlated with ARGs, suggesting a co-occurrence or a co-selection for antimicrobial resistance, as seen by (Zhang et al., 2017). In fact, it has been observed that certain heavy metal resistance genes are found on mobile genetic elements, such as plasmids or transposons, which can also carry antimicrobial resistance genes. Thus, when bacteria acquire resistance to a metal, they can simultaneously acquire resistance to certain antimicrobials (Arya et al., 2021; Di Cesare et al., 2015; Dickinson et al., 2019). Since strong co-selection has been observed in the sludge, it is not advisable to use the sludge for land application. Additional research is needed to ensure that the sludge is treated before use, for example, through incineration or methanization, and to verify whether ARGs persist after treatment. It is recommended to treat the sludge before disposal or using it as biosolids to avoid favoring the spread of ARGs when applying this sludge on land

4.4 Conclusions

Wastewater treatment is designed to reduce organic matter and concentrations of *E. coli* before release of the treated effluent to receiving water bodies. However, antimicrobial resistance genes might persist through treatment and be disseminated in the environment through effluents or sludge. In this study, an activated sludge process followed by ozonation was evaluated in a full-scale municipal wastewater treatment plan.

- Activated sludge achieved between 2.8 and 7.2 log removal for the 23 ARGs studied, while the contribution of ozonation was lesser, with 0.3 to 2.5 log removal, except for *emrF* which increased by 1.4 log after ozonation. A high variability was observed on the log removal depending on the treatment step and the ARG studied.
- Overall, the combined treatment achieved at least 2.5 log removal of ARGs, comparable to the observed removal of NTM. The use of NTM as an indicator of treatment performance for the removal of ARGs is promising and should be further considered. However, it should be evaluated against a broader range of ARGs and with different types of treatment. For example, when testing only the efficacy of ozonation, NTM was not a good predictor for the removal of *emrF* which increased by 1.5 log after ozonation.
- High concentrations of the integron *IntI1* were detected in the influent (1×10^7 cg/mL) but were well removed by the treatment process (7 log). Despite the log reduction achieved overall, the *sul1*, *mefA* and *ermF* genes still had concentrations of more than 100 gene copies/mL in the final effluent after ozonation, suggesting possible impact in the receiving environment. A high positive correlation was observed between metal (iron and copper) concentrations and ARGs, suggesting a co-occurrence or a co-selection, especially in the sludge. The use of iron-based chemicals for the precipitation of the biosolids in the clarifier likely explains the high concentration of iron measured in the sludge, co-occurring with high concentrations of ARGs removed with the biosolids. The accumulation of ARG observed in the sludge raises concerns about the risk of ARG dissemination if it is used for land application in agriculture. The impact of thermal treatment of the sludge on ARGs should be investigated.

Acknowledgements

The authors would like to thank Juan Guerra for helping with the statistical and bioinformatics analysis. The authors are also thankful for the technical support provided by Jérôme Ducret, Jérôme Leroy, Mélanie Bolduc and Gabriel St-Jean. The authors wish to express their gratitude to the WWTP staff for their help in data and sample collection.

CHAPITRE 5 DISCUSSION DES RÉSULTATS

Ce chapitre explore certains aspects du projet qui n'ont pas été abordés dans l'article principal, mais qui pourraient apporter des perspectives enrichissantes pour l'amélioration de l'élimination des gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs). L'article n'a pas exploré certains paramètres cruciaux comme l'impact des variations de la dose d'ozone ou du temps de contact entre l'ozone et les effluents. Ces aspects, pourtant essentiels, offrent des pistes de recherche prometteuses pour optimiser les processus de traitement.

En plus de ces considérations méthodologiques, nous discuterons également des solutions possibles pour réduire les ARGs, en questionnant leur nature : s'agit-il de solutions d'ingénierie à court terme, ou bien de stratégies à long terme nécessitant une planification complexe à plusieurs échelles ? Les approches à court terme peuvent répondre à des objectifs immédiats, mais une réduction durable des ARGs dans l'environnement pourrait nécessiter une intégration de solutions à long terme, impliquant une collaboration entre différents secteurs et une planification systématique. Nous explorerons comment ces approches peuvent être mises en place pour garantir un impact durable sur la réduction des ARGs.

Développement Méthodologique

L'article n'a pas exploré certains aspects du développement méthodologique qui pourraient offrir des perspectives précieuses pour améliorer l'élimination des ARGs. Parmi ces aspects, l'impact des variations de dose d'ozone sur la dégradation des ARGs mérite une attention particulière. Des études antérieures suggèrent que l'augmentation de la dose d'ozone pourrait accroître l'efficacité de la destruction des ARGs. Par exemple, une recherche de Li et al. (2018) a démontré que des doses plus élevées d'ozone augmentaient la dégradation des ARGs dans les effluents, tandis que Zhang et al. (2020) ont noté des améliorations significatives dans l'élimination des ARGs à des doses optimisées d'ozone. L'impact du temps de contact entre l'ozone et les effluents n'a pas été suffisamment détaillé dans notre étude, mais des travaux comme ceux de Cao et al. (2021) ont montré que des temps de contact plus longs peuvent améliorer la dégradation des ARGs en favorisant une oxydation plus complète. De plus, le traitement des boues avec de l'ozone représente une avenue prometteuse. Les recherches de Khan et al. (2022) ont révélé que l'ozonation des boues activées améliore la décontamination et réduit la charge d'ARGs. Il serait pertinent de réaliser des

études supplémentaires pour déterminer les conditions optimales d'ozonation pour le traitement des boues et les impacts sur la concentration d'ARGs.

Implications pour les Partenaires Industriels

Les résultats de l'étude présentent des implications importantes pour les partenaires industriels, notamment ceux impliqués dans les secteurs du nettoyage et du lavage, de la fabrication de papier, de la production d'amidon, et de l'agroalimentaire. Nos résultats ont mis en évidence des concentrations élevées de fer et d'aluminium dans les effluents, probablement dues à l'utilisation de coagulants et floculants dans les processus de traitement. Les travaux de Zhang et al. (2019) et Patel et al. (2021) soulignent que ces métaux sont souvent associés à des produits chimiques utilisés pour la coagulation et la floculation, ce qui peut contribuer à des niveaux élevés de métaux lourds dans les effluents. Il est crucial que les industries reconnaissent leurs méthodes de traitement et explorent des alternatives aux coagulants et floculants conventionnels. Les technologies émergentes, telles que les biofloculants, les coagulants naturels, et les procédés électrolytiques, montrent un potentiel significatif pour remplacer les produits chimiques traditionnels tout en réduisant la charge métallique (Zhou et al., 2019; Rodriguez et al., 2022). Une réévaluation des processus de traitement au sein des stations peut également conduire à des améliorations substantielles. La mise en œuvre de solutions alternatives, comme l'optimisation des conditions de traitement ou l'adoption de technologies plus écologiques, est nécessaire pour réduire les impacts environnementaux et améliorer la durabilité des processus de traitement des effluents. Les recherches futures devraient se concentrer sur l'évaluation en temps réel de ces alternatives et sur la mesure de leurs effets pour garantir leur efficacité et leur viabilité à long terme.

Vers une stratégie globale pour combattre la résistance aux antibiotiques : un système à réinventer

Malgré les avancées technologiques dans le traitement des eaux usées, la persistance de la résistance aux antibiotiques demeure inquiétante. En effet, des études récentes, y compris celles réalisées au cours de cette recherche, montrent une augmentation de certains gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) dans les effluents finaux par rapport aux affluents. Cette situation peut être exacerbée par la co-sélection des métaux provenant de rejets industriels, lesquels peuvent favoriser la prolifération de certains ARG. Face à cette réalité, il n'existe pas de solution immédiate pour réduire ce problème, malgré son urgence et sa gravité croissante.

La nature complexe et systémique de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement requiert une transformation profonde des façons de penser et d'agir. Selon les estimations mondiales, d'ici 2050, les infections dues à des bactéries résistantes pourraient causer jusqu'à 10 millions de décès par an. Cette projection alarmante souligne l'urgence de trouver des solutions à long terme capables de s'attaquer à la racine du problème. Le défi majeur auquel nous faisons face est qu'aucune nouvelle famille d'antibiotiques n'a été découverte depuis les années 1980. Il est donc primordial à ce stade de minimiser la prolifération et la propagation de la résistance aux antimicrobiens. Tel qu'illustré par la Figure 4.3, les résultats de la recherche nous permettent de prioriser les gènes de résistances qui semblent persister après traitement secondaire ou tertiaire, et révèlent l'importance d'étudier le comportement des ARG dans les boues. Il ressort également que le traitement par boues activées peut avoir un impact important sur la répartition des ARG entre l'eau et les boues (Figure 4.4), confirmant l'importance de mieux étudier ces dernières.

De plus, il n'existe actuellement aucune norme mondiale régissant la concentration des antibiotiques ou des ARG dans les rejets des stations d'épuration des eaux usées (STEP) dans l'environnement (voir chapitre 1)). Il n'y a pas non plus de consensus sur les concentrations seuils à cibler par le traitement, ce qui rend difficile l'évaluation des résultats obtenus dans le cadre de ce projet en terme d'impact sur la santé humaine, animale et environnementale. De plus, la grande diversité de gènes présents dans les effluents (Figure 4.5) rend difficile la sélection de seulement quelques ARG représentatifs qui permettraient un suivi de l'évolution de la présence des ARG dans les eaux usées brutes et traitées. Une étude récente des échantillons d'affluents et d'effluents provenant de 12 STEP à travers le monde a détecté 1079 ARGs provenant de diverses bactéries. Les résultats montrent que dans 91,7 % des STEP (11 sur 12), l'abondance relative des ARG a diminué. Cependant, dans une des STEP, 40 % des ARG ont vu leur abondance relative augmenter. L'étude souligne l'importance de surveiller les ARG comme indicateurs de la performance des traitements et du risque de résistance aux antibiotiques (Garner et al., 2024). En fait, lorsque des cibles auront été identifiées et des concentrations seuils définies, la mise en place d'une réglementation permettra d'identifier les stations ayant des concentrations plus élevées dans l'eau usée brute et d'identifier si des effluents industriels ou hospitaliers en sont responsables.

Un autre aspect crucial de cette stratégie globale est la réduction de l'utilisation massive des antibiotiques, en particulier dans l'agriculture et l'élevage. L'utilisation d'antibiotiques pour accroître le rendement des animaux est non seulement une pratique irresponsable d'un point de vue de la résistance aux antimicrobiens, mais elle constitue également une menace pour la santé publique. Cette pratique favorise la transmission des ARG de l'animal à l'environnement, puis à l'homme, créant un cercle vicieux difficile à rompre.

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Cette étude met en évidence l'importance de comprendre les mécanismes de résistance aux antibiotiques dans les environnements aquatiques et l'efficacité des méthodes de traitement des eaux usées pour atténuer ce problème. Elle souligne également la nécessité de surveiller et de réguler les contaminants, y compris les métaux lourds, pour préserver la qualité de l'eau et réduire les risques pour la santé publique.

Notre étude met en lumière plusieurs aspects clés concernant l'efficacité du traitement des eaux usées par boues activées et à l'ozone dans les STEP et la persistance des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) dans certains cas.

Contributions à l'avancement des connaissances et au développement des technologies

- Les résultats montrent que l'ozonation n'est pas efficace contre certains ARG comme *sull* et *mefA* et peut même augmenter leur abondance relative le cas de *ermF*.
- Il existe une corrélation significative entre l'ozonation et plusieurs paramètres physico-chimiques (TSS, VSS, ABS-UV et COD). L'ozone en faible dose est efficace pour dégrader la matière organique particulaire en formes plus simples ou dissoutes, et permet d'améliorer la limpideur de l'eau et de réduire la demande en oxygène chimique.
- Une concentration supérieure à 100 µg/mL a encore été détectée dans l'effluent ozoné pour les gènes *sull*, *mefA* et *ermF*, malgré la réduction observée. L'abondance relative des gènes *blaVIM*, *blaSHV-1*, *vanA*, *mcr1*, *intI1*, *aadA2* et *tetO* était significativement plus élevée dans les boues comparativement aux affluents.
- Les résultats montrent que la présence de métaux lourds à des concentrations élevées dans les boues d'épuration favorise la co-sélection pour la résistance aux antibiotiques.

Limites et contraintes

- Manque de données longitudinales : L'absence de données à long terme limite notre compréhension des tendances temporelles et des impacts à long terme des ARGs dans les environnements aquatiques.

- Échantillonnages ponctuels : Les échantillons ont été prélevés à un moment précis et ne sont donc pas nécessairement représentatifs de la variabilité temporelle des eaux usées.
- Échantillons non pairés : Les échantillons provenant de l'affluent, de l'effluent secondaire (eff-S) et de l'effluent final (eff-F) sont prélevés à une même date, mais ne sont pas nécessairement pairés en fonction du temps de rétention hydraulique, ce qui peut introduire des biais dans l'analyse comparative.
- Variabilité de la dose d'ozone, des débits et de la température : Les conditions expérimentales, telles que la dose d'ozone, les débits et la température, ont varié au cours des essais. Ces conditions non-contrôlées peuvent affecter la reproductibilité et la comparabilité des résultats.

Recommandations

- Traitement à la source : Il est important d'étudier l'impact d'un traitement à la source, notamment pour les effluents d'industries pharmaceutiques et hospitaliers riches en résidus d'antibiotiques, ainsi que les rejets industriels contenant des métaux lourds.
- Gestion des boues d'épuration : La nécessité d'un traitement des boues d'épuration doit être évaluées. Pour se faire, une meilleure compréhension des seuils d'action est nécessaire, afin d'évaluer si la présence d'ARG à une concentration donnée peut contribuer à la propagation de la résistance aux antimicrobiens lors de l'application de biosolides en milieu agricole.
- Surveillance continue : Il est nécessaire de poursuivre les efforts de surveillance et de recherche pour mieux comprendre l'étendue de la contamination par les ARG dans les environnements aquatiques et développer des stratégies de gestion appropriées.
- Évaluation de l'impact de différents procédés sur l'enlèvement des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) et détermination des conditions optimales
- Études sur la dissémination des ARG : Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour étudier la dissémination des ARG dans divers compartiments environnementaux, tels que les eaux de surface, les sols et les plantes, afin de mieux comprendre leurs impacts écologiques et sanitaires.

Nouvelles voies de recherche

- Impact des ARG sur les écosystèmes : Les futures recherches devraient se concentrer sur l'impact des ARG sur les écosystèmes aquatiques et terrestres, notamment en termes de biodiversité et de dynamique des communautés microbiennes.
- Études longitudinales : Des études longitudinales sont nécessaires pour suivre les tendances temporelles de la présence des ARG et évaluer l'efficacité des interventions mises en place pour les réduire.

En conclusion, bien que notre étude ait fourni des informations importantes sur l'efficacité d'un procédé de boues activées suivi d'un traitement tertiaire d'ozonation contre certains ARG, il reste beaucoup à faire pour améliorer les traitements existants et développer de nouvelles stratégies pour gérer efficacement la résistance aux antibiotiques dans l'environnement.

RÉFÉRENCES

- A, D., Zhang, X., Dai, Y., Chen, C., Yang, Y., 2020. Occurrence and removal of quinolone, tetracycline, and macrolide antibiotics from urban wastewater in constructed wetlands. *Journal of Cleaner Production* 252, 119677. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119677>
- Akcil, A., Erust, C., Ozdemiroglu, S., Fonti, V., Beolchini, F., 2015. A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes. *Journal of Cleaner Production* 86, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.08.009>
- Alexander, J., Knopp, G., Dötsch, A., Wieland, A., Schwartz, T., 2016. Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Science of The Total Environment* 559, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.154>
- Al-Gheethi, A.A., Efaq, A.N., Bala, J.D., Norli, I., Abdel-Monem, M.O., Ab. Kadir, M.O., 2018. Removal of pathogenic bacteria from sewage-treated effluent and biosolids for agricultural purposes. *Appl Water Sci* 8, 74. <https://doi.org/10.1007/s13201-018-0698-6>
- Almquist, C., Krekeler, M., Jiang, L., 2014. An investigation on the structure and catalytic activity of cryptomelane-type manganese oxide materials prepared by different synthesis routes. *Chemical Engineering Journal* 252, 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.102>
- Amador, P.P., Fernandes, R.M., Prudêncio, M.C., Barreto, M.P., Duarte, I.M., 2015. Antibiotic resistance in wastewater: Occurrence and fate of *Enterobacteriaceae* producers of Class A and Class C β -lactamases. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 50, 26–39. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.964602>
- Amarasiri, M., Sano, D., Suzuki, S., 2020. Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 50, 2016–2059. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1692611>
- Amha, Y.M., Anwar, M.Z., Kumaraswamy, R., Henschel, A., Ahmad, F., 2017a. Mycobacteria in Municipal Wastewater Treatment and Reuse: Microbial Diversity for Screening the Occurrence of Clinically and Environmentally Relevant Species in Arid Regions. *Environ. Sci. Technol.* 51, 3048–3056. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05580>
- Amha, Y.M., Anwar, M.Z., Kumaraswamy, R., Henschel, A., Ahmad, F., 2017b. Mycobacteria in Municipal Wastewater Treatment and Reuse: Microbial Diversity for Screening the Occurrence of Clinically and Environmentally Relevant Species in Arid Regions. *Environ. Sci. Technol.* 51, 3048–3056. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05580>
- Arango-Argoty, G., Garner, E., Pruden, A., Heath, L.S., Vikesland, P., Zhang, L., 2018. DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome* 6, 23. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0401-z>

- Arya, S., Williams, A., Reina, S.V., Knapp, C.W., Kreft, J.-U., Hobman, J.L., Stekel, D.J., 2021. Towards a general model for predicting minimal metal concentrations co-selecting for antibiotic resistance plasmids. *Environmental Pollution* 275, 116602. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116602>
- Azaïs, A., 2015. Ozonation des concentrats de nanofiltration dans le cadre de la réutilisation des eaux usées urbaines (These de doctorat). Montpellier.
- Azuma, T., Katagiri, M., Sekizuka, T., Kuroda, M., Watanabe, M., 2022. Inactivation of Bacteria and Residual Antimicrobials in Hospital Wastewater by Ozone Treatment. *Antibiotics* 11, 862. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070862>
- Bader, H., Hoigné, J., 1981. Determination of ozone in water by the indigo method. *Water Research* 15, 449–456. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(81\)90054-3](https://doi.org/10.1016/0043-1354(81)90054-3)
- Baghal Asghari, F., Dehghani, M.H., Dehghanzadeh, R., Farajzadeh, D., Shanehbandi, D., Mahvi, A.H., Yaghmaeian, K., Rajabi, A., 2021a. Performance evaluation of ozonation for removal of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and genes from hospital wastewater. *Sci Rep* 11, 24519. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04254-z>
- Baghal Asghari, F., Dehghani, M.H., Dehghanzadeh, R., Farajzadeh, D., Shanehbandi, D., Mahvi, A.H., Yaghmaeian, K., Rajabi, A., 2021b. Performance evaluation of ozonation for removal of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and genes from hospital wastewater. *Sci Rep* 11, 24519. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04254-z>
- barbier, E., 2023. Prévalence de *Mycobacterium bovis* dans les agroécosystèmes : analyse de réservoirs environnementaux potentiels (sol, eau douce, faune du sol et faune aquatique) et traçage de la circulation de cette bactérie entre les différents compartiments - TEL - Thèses en ligne [WWW Document]. URL <https://theses.hal.science/tel-01486776/> (accessed 7.17.24).
- BAYMY, M., 2016. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance | Science [WWW Document]. URL <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.aad3292> (accessed 7.16.24).
- Bédard, E., Trigui, H., Liang, J., Doberova, M., Paranjape, K., Lalancette, C., Allegra, S., Faucher, S.P., Prévost, M., 2021. Local Adaptation of *Legionella pneumophila* within a Hospital Hot Water System Increases Tolerance to Copper. *Applied and Environmental Microbiology* 87, e00242-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00242-21>
- Bell, P.T., Anderson, J., Coulter, C., Detrick, A.J., Burke, A., Baird, T., 2023. A mariner's tale: Invasive endotracheal *Mycobacterium marinum* infection. *Respirology Case Reports* 11, e01211. <https://doi.org/10.1002/rcr2.1211>
- Bouki, C., Venieri, D., Diamadopoulos, E., 2013. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.016>
- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C.M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., Karaolia, P., Schwartz, T., Alexander, J., Merlin, C., Garellick, H., Schmitt, H., de Vries, D., Schwermer, C.U., Meric, S., Ozkal, C.B., Pons, M.-N., Kneis, D., Berendonk, T.U., 2019. Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European

- survey of urban settings. *Water Research* 162, 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.039>
- Castillo-Rodal, A.I., Mazari-Hiriart, M., Lloret-Sánchez, L.T., Sachman-Ruiz, B., Vinuesa, P., López-Vidal, Y., 2012. Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 683–694. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1359-y>
- Cerqueira, F., Matamoros, V., Bayona, J., Elsinga, G., Hornstra, L.M., Piña, B., 2019a. Distribution of antibiotic resistance genes in soils and crops. A field study in legume plants (*Vicia faba* L.) grown under different watering regimes. *Environmental Research* 170, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.007>
- Cerqueira, F., Matamoros, V., Bayona, J.M., Berendonk, T.U., Elsinga, G., Hornstra, L.M., Piña, B., 2019b. Antibiotic resistance gene distribution in agricultural fields and crops. A soil-to-food analysis. *Environmental Research* 177, 108608. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108608>
- Chen, H., 2013. Effects of Advanced Treatment Systems on the Removal of Antibiotic Resistance Genes in Wastewater Treatment Plants from Hangzhou, China | Environmental Science & Technology [WWW Document]. URL <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es401091y> (accessed 9.10.24).
- Chen, H., Bai, X., Li, Y., Jing, L., Chen, R., Teng, Y., 2019. Characterization and source-tracking of antibiotic resistomes in the sediments of a peri-urban river. *Science of The Total Environment* 679, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.063>
- Chen, J., Zhang, Z., Lei, Z., Shimizu, K., Yao, P., Su, Z., Wen, D., 2020. Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the coastal sediments of effluent-receiving areas of WWTPs, China. *Bioresource Technology Reports* 11, 100511. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100511>
- Chen, Q., An, X., Li, H., Su, J., Ma, Y., Zhu, Y.-G., 2016. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environment International* 92–93, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026>
- Chen, Y., Guo, X., Niu, Z., Lu, D., Sun, X., Zhao, S., Hou, L., Liu, M., Yang, Y., 2020. Antibiotic resistance genes (ARGs) and their associated environmental factors in the Yangtze Estuary, China: From inlet to outlet. *Marine Pollution Bulletin* 158, 111360. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111360>
- Chiellini, C., Gori, R., Tiezzi, A., Brusetti, L., Pucciarelli, S., D'Amato, E., Chiavola, A., Sirini, P., Lubello, C., Petroni, G., 2014. Ozonation effects for excess sludge reduction on bacterial communities composition in a full-scale activated sludge plant for domestic wastewater treatment. *Environmental Technology* 35, 1462–1469. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.870588>
- Conyers, Saunders, 2024. Frontiers | Treatment for non-tuberculous mycobacteria: challenges and prospects [WWW Document]. URL <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1394220/full> (accessed 7.17.24).

- Czekalski, N., Imminger, S., Salhi, E., Veljkovic, M., Kleffel, K., Drissner, D., Hammes, F., Bürgmann, H., von Gunten, U., 2016a. Inactivation of Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes by Ozone: From Laboratory Experiments to Full-Scale Wastewater Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 50, 11862–11871. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02640>
- Czekalski, N., Imminger, S., Salhi, E., Veljkovic, M., Kleffel, K., Drissner, D., Hammes, F., Bürgmann, H., von Gunten, U., 2016b. Inactivation of Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes by Ozone: From Laboratory Experiments to Full-Scale Wastewater Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 50, 11862–11871. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02640>
- Dantas, G., Sommer, M., 2014. How to Fight Back Against Antibiotic Resistance. *Am. Sci.* 102, 42. <https://doi.org/10.1511/2014.106.42>
- Deng, H., 2020. Ozonation mechanism of carbamazepine and ketoprofen in RO concentrate from municipal wastewater treatment: Kinetic regimes, removal efficiency and matrix effect. *Science of The Total Environment* 717, 137150. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137150>
- Di Cesare, A., Eckert, E., Corno, G., 2015. Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. *Journal of limnology* 75. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1198>
- Dickinson, A.W., Power, A., Hansen, M.G., Brandt, K.K., Piliposian, G., Appleby, P., O'Neill, P.A., Jones, R.T., Sierocinski, P., Koskella, B., Vos, M., 2019. Heavy metal pollution and co-selection for antibiotic resistance: A microbial palaeontology approach. *Environ Int* 132, 105117. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105117>
- Dong, L., Anderson, A.J., Malkowski, M.G., 2019. Arg-513 and Leu-531 Are Key Residues Governing Time-Dependent Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Aspirin and Celebrex. *Biochemistry* 58, 3990–4002. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00659>
- Duan, M., Gu, J., Wang, X., Li, Y., Zhang, R., Hu, T., Zhou, B., 2019. Factors that affect the occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in soils from livestock and poultry farms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 180, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.005>
- Elmund, G.K., Allen, M.J., Rice, E.W., 1999. Comparison of *Escherichia coli*, Total Coliform, and Fecal Coliform Populations as Indicators of Wastewater Treatment Efficiency. *Water Environment Research* 71, 332–339. <https://doi.org/10.2175/106143098X121752>
- Engin, A.B., Engin, E.D., Engin, A., 2023. Effects of co-selection of antibiotic-resistance and metal-resistance genes on antibiotic-resistance potency of environmental bacteria and related ecological risk factors. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 98, 104081. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104081>
- Falkinham, J.O., 2011. Nontuberculous Mycobacteria from Household Plumbing of Patients with Nontuberculous Mycobacteria Disease. *Emerg Infect Dis* 17, 419–424. <https://doi.org/10.3201/eid1703.101510>
- Falkinham, J.O., 2003. Mycobacterial Aerosols and Respiratory Disease. *Emerg Infect Dis* 9, 763–767. <https://doi.org/10.3201/eid0907.02-0415>

- Falkinham, J.O., Norton, C.D., LeChevallier, M.W., 2001. Factors Influencing Numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and Other *Mycobacteria* in Drinking Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1225–1231. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1225-1231.2001>
- Foroughi, M., Khiadani, M., Kakhki, S., Kholghi, V., Naderi, K., Yektay, S., 2022. Effect of ozonation-based disinfection methods on the removal of antibiotic resistant bacteria and resistance genes (ARB/ARGs) in water and wastewater treatment: a systematic review. *Science of The Total Environment* 811, 151404. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151404>
- Founou, L.L., Founou, R.C., Essack, S.Y., 2016. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>
- Gan, Y., Rahmatika, I., Kurisu, F., Furumai, H., Simazaki, D., Fukano, H., Hoshino, Y., Kasuga, I., 2022. The fate and risk of nontuberculous mycobacteria in the water supply system: a review. *H2Open Journal* 5, 180–197. <https://doi.org/10.2166/h2oj.2022.144>
- García, J., García-Galán, M.J., Day, J.W., Boopathy, R., White, J.R., Wallace, S., Hunter, R.G., 2020. A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresouce Technology* 307, 123228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>
- Garner, E., Maile-Moskowitz, A., Angeles, L.F., Flach, C.-F., Aga, D.S., Nambi, I., Larsson, D.G.J., Bürgmann, H., Zhang, T., Vikesland, P.J., Pruden, A., 2024. Metagenomic Profiling of Internationally Sourced Sewage Influent and Effluent Yields Insight into Selecting Targets for Antibiotic Resistance Monitoring. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.4c03726>
- Ghernaout, D., Elboughdiri, N., 2020. Removing Antibiotic-Resistant Bacteria (ARB) Carrying Genes (ARGs): Challenges and Future Trends. *OALib* 07, 1–16. <https://doi.org/10.4236/oalib.1106003>
- Guo, M.-T., Kong, C., 2019. Antibiotic resistant bacteria survived from UV disinfection: Safety concerns on genes dissemination. *Chemosphere* 224, 827–832. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.004>
- Guo, M.-T., Yuan, Q.-B., Yang, J., 2015. Distinguishing Effects of Ultraviolet Exposure and Chlorination on the Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Municipal Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 49, 5771–5778. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00644>
- Gupta, R.S., Lo, B., Son, J., 2018. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>
- Haas, C.N., Jacangelo, J., 2022. Inactivation of Giardia Cysts by Ozone after Residual Disappearance. *J. Environ. Eng.* 148, 06021007. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001969](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001969)

- Haig, S.-J., Kotlarz, N., LiPuma, J.J., Raskin, L., 2018. A High-Throughput Approach for Identification of Nontuberculous Mycobacteria in Drinking Water Reveals Relationship between Water Age and *Mycobacterium avium*. *mBio* 9, e02354-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02354-17>
- Han, Y., Yang, T., Yan, X., Li, L., Liu, J., 2020. Effect of aeration mode on aerosol characteristics from the same wastewater treatment plant. *Water Res* 170, 115324. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115324>
- He, H., Zhou, P., Shimabuku, K.K., Fang, X., Li, S., Lee, Y., Dodd, M.C., 2019. Degradation and Deactivation of Bacterial Antibiotic Resistance Genes during Exposure to Free Chlorine, Monochloramine, Chlorine Dioxide, Ozone, Ultraviolet Light, and Hydroxyl Radical. *Environ. Sci. Technol.* 53, 2013–2026. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04393>
- Hembach, N., Alexander, J., Hiller, C., Wieland, A., Schwartz, T., 2019. Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant. *Sci Rep* 9, 12843. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49263-1>
- Hendriksen, R.S., Munk, P., Njage, P., van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S.K., Kjeldgaard, J., Kaas, R.S., Clausen, P.T.L.C., Vogt, J.K., Leekitcharoenphon, P., van de Schans, M.G.M., Zuidema, T., de Roda Husman, A.M., Rasmussen, S., Petersen, B., Amid, C., Cochrane, G., Sicheritz-Ponten, T., Schmitt, H., Alvarez, J.R.M., Aidara-Kane, A., Pamp, S.J., Lund, O., Hald, T., Woolhouse, M., Koopmans, M.P., Vigre, H., Petersen, T.N., Aarestrup, F.M., 2019. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun* 10, 1124. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>
- Hiller, C.X., Hübner, U., Fajnorova, S., Schwartz, T., Drewes, J.E., 2019. Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. *Science of The Total Environment* 685, 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.315>
- Hou, J., Chen, Z., Gao, J., Xie, Y., Li, L., Qin, S., Wang, Q., Mao, D., Luo, Y., 2019. Simultaneous removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from pharmaceutical wastewater using the combinations of up-flow anaerobic sludge bed, anoxic-oxic tank, and advanced oxidation technologies. *Water Research* 159, 511–520. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.034>
- Huang, F., An, Z., Moran, M.J., Liu, F., 2020. Recognition of typical antibiotic residues in environmental media related to groundwater in China (2009–2019). *Journal of Hazardous Materials* 399, 122813. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122813>
- Huang, Y.-H., Liu, Y., Du, P.-P., Zeng, L.-J., Mo, C.-H., Li, Y.-W., Lü, H., Cai, Q.-Y., 2019. Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistant genes in water and sediments of urban rivers with black-odor water in Guangzhou, South China. *Science of The Total Environment* 670, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.168>
- Huerta, B., Martí, E., Gros, M., López, P., Pompéo, M., Armengol, J., Barceló, D., Balcázar, J.L., Rodríguez-Mozaz, S., Marcé, R., 2013. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. *Science of The Total Environment* 456–457, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.071>

- Iakovides, I.C., Michael-Kordatou, I., Moreira, N.F.F., Ribeiro, A.R., Fernandes, T., Pereira, M.F.R., Nunes, O.C., Manaia, C.M., Silva, A.M.T., Fatta-Kassinos, D., 2019. Continuous ozonation of urban wastewater: Removal of antibiotics, antibiotic-resistant *Escherichia coli* and antibiotic resistance genes and phytotoxicity. *Water Research* 159, 333–347. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.025>
- Irshath, A.A., Rajan, A.P., Vimal, S., Prabhakaran, V.-S., Ganesan, R., 2023. Bacterial Pathogenesis in Various Fish Diseases: Recent Advances and Specific Challenges in Vaccine Development. *Vaccines* 11, 470. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020470>
- Jäger, T., Alexander, J., Kirchen, S., Dötsch, A., Wieland, A., Hiller, C., Schwartz, T., 2018. Live-dead discrimination analysis, qPCR assessment for opportunistic pathogens, and population analysis at ozone wastewater treatment plants. *Environmental Pollution* 232, 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.089>
- josé L, M., n.d. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria | Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences [WWW Document]. URL <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rspb.2009.0320> (accessed 7.16.24).
- Kairigo, P., Ngumba, E., Sundberg, L.-R., Gachanja, A., Tuhkanen, T., 2020. Occurrence of antibiotics and risk of antibiotic resistance evolution in selected Kenyan wastewaters, surface waters and sediments. *Science of The Total Environment* 720, 137580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137580>
- Kazadi Mbamba, C., Lindblom, E., Flores-Alsina, X., Tait, S., Anderson, S., Saagi, R., Batstone, D.J., Gernaey, K.V., Jeppsson, U., 2019. Plant-wide model-based analysis of iron dosage strategies for chemical phosphorus removal in wastewater treatment systems. *Water Research* 155, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.048>
- Khan, S.B., Akhtar, K., 2019. Photocatalysts: Applications and Attributes. BoD – Books on Demand.
- Kümmerer, K., 2004. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, 311–320. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh325>
- Lamba, M., Ahammad, S.Z., 2017. Performance comparison of secondary and tertiary treatment systems for treating antibiotic resistance. *Water Research* 127, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.025>
- Langbehn, R.K., Michels, C., Soares, H.M., 2021. Antibiotics in wastewater: From its occurrence to the biological removal by environmentally conscious technologies. *Environmental Pollution* 275, 116603. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116603>
- Leal, H., Klimova, N., Gibson, C., Fortin, É., Frigon, D., Dorner, S., Bédard, É., 2024. Association of population's lifestyles and behaviours with the prevalence of antimicrobial resistance in municipal wastewater. Flash oral presentation and poster presented at EDAR7: Environmental Dimensions of Antibiotic Resistance Conference, Montreal, 2024.
- Lee, J., Jeon, J.H., Shin, J., Jang, H.M., Kim, S., Song, M.S., Kim, Y.M., 2017. Quantitative and qualitative changes in antibiotic resistance genes after passing through treatment processes in municipal wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment* 605–606, 906–914. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.250>

- Lerminiaux, N.A., Cameron, A.D.S., 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can. J. Microbiol.* 65, 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Li, Y., Xu, Z., Han, W., Cao, H., Umarov, R., Yan, A., Fan, M., Chen, H., Duarte, C.M., Li, L., Ho, P.-L., Gao, X., 2021. HMD-ARG: hierarchical multi-task deep learning for annotating antibiotic resistance genes. *Microbiome* 9, 40. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01002-3>
- Lin, Y., Lou, Y., Li, A., Wei, Y., Li, H., Zhou, M., Li, Y., 2022. Effects of pre-oxidation by ozone, permanganate and ferrate on generation and toxicities of disinfection byproducts. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 19, 5969–5984. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03526-5>
- Liu, H., Li, Z., Liu, C., Qiang, Z., Karanfil, T., Yang, M., 2022. Elimination and Redistribution of Intracellular and Extracellular Antibiotic Resistance Genes in Water and Wastewater Disinfection Processes: A Review. *ACS EST Water* 2, 2273–2288. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.2c00286>
- Liu, L., Wu, W., Zhang, J., Lv, P., Xu, L., Yan, Y., 2018. Progress of research on the toxicology of antibiotic pollution in aquatic organisms. *Acta Ecologica Sinica* 38, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.01.006>
- Loret, J.-F., Dumoutier, N., 2019. Non-tuberculous mycobacteria in drinking water systems: A review of prevalence data and control means. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 222, 628–634. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.01.002>
- Lu, J., Zhang, Y., Wu, J., Wang, J., Zhang, C., Lin, Y., 2019. Occurrence and spatial distribution of antibiotic resistance genes in the Bohai Sea and Yellow Sea areas, China. *Environmental Pollution* 252, 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.143>
- Luczkiewicz, A., Jankowska, K., Bray, R., Kulbat, E., Quant, B., Sokolowska, A., Olanczuk-Neyman, K., 2011. Antimicrobial resistance of fecal indicators in disinfected wastewater. *Water Science and Technology* 64, 2352–2361. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.769>
- Lüddeke, F., Heß, S., Gallert, C., Winter, J., Güde, H., Löffler, H., 2015. Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Research* 69, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.018>
- Macauley, J.J., Qiang, Z., Adams, C.D., Surampalli, R., Mormile, M.R., 2006. Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone. *Water Research* 40, 2017–2026. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.03.021>
- Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., Hou, J., Mu, Q., Alvarez, P.J.J., 2015. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research* 85, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.010>
- Marti, E., Variatza, E., Balcázar, J.L., 2014. Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clinical Microbiology and Infection* 20, O456–O459. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12446>

- Mayol, E., Campillo, M., Cordomí, A., Olivella, M., 2019. Inter-residue interactions in alpha-helical transmembrane proteins. *Bioinformatics* 35, 2578–2584. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty978>
- Mazhar, M.A., Khan, N.A., Ahmed, S., Khan, A.H., Hussain, A., Rahisuddin, Changani, F., Yousefi, M., Ahmadi, S., Vambol, V., 2020. Chlorination disinfection by-products in municipal drinking water – A review. *Journal of Cleaner Production* 273, 123159. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123159>
- McKinney, C.W., Pruden, A., 2012. Ultraviolet Disinfection of Antibiotic Resistant Bacteria and Their Antibiotic Resistance Genes in Water and Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 46, 13393–13400. <https://doi.org/10.1021/es303652q>
- Michael-Kordatou, I., Andreou, R., Iacovou, M., Frontistis, Z., Hapeshi, E., Michael, C., Fatta-Kassinos, D., 2017. On the capacity of ozonation to remove antimicrobial compounds, resistant bacteria and toxicity from urban wastewater effluents. *Journal of Hazardous Materials* 323, 414–425. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.02.023>
- Ministère de l’Environnement et de la Lutte contre les changements, climatiques, 2022. Guide pour l’évaluation du risque associé aux rejets d’eaux chlorées dans le milieu aquatique.
- Montgomery, M.R., Raska-Emery, P., Balis, J.U., 1987. Age-related difference in pulmonary response to ozone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 890, 271–274. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(87\)90028-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(87)90028-4)
- Moussaron, A., Alexandre, J., Chenard, M.-P., Mathelin, C., Reix, N., 2023. Correlation between daily life aluminium exposure and breast cancer risk: A systematic review. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 79, 127247. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127247>
- Murina, V., Kasari, M., Takada, H., Hinnu, M., Saha, C.K., Grimshaw, J.W., Seki, T., Reith, M., Putrinš, M., Tenson, T., Strahl, H., Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., 2019. ABCF ATPases Involved in Protein Synthesis, Ribosome Assembly and Antibiotic Resistance: Structural and Functional Diversification across the Tree of Life. *Journal of Molecular Biology, The molecular basis of antibiotic action and resistance* 431, 3568–3590. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.013>
- Murray, A.K., Stanton, I., Gaze, W.H., Snape, J., 2021. Dawning of a new ERA: Environmental Risk Assessment of antibiotics and their potential to select for antimicrobial resistance. *Water Research* 200, 117233. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117233>
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59, 695–700.
- Ojo, P., Ifelegebu, A.O., 2019. The Effects of Aluminium- and Ferric-Based Chemical Phosphorus Removal on Activated Sludge Digestibility and Dewaterability. *Processes* 7, 228. <https://doi.org/10.3390/pr7040228>
- Oliveira, S.C., Von Sperling, M., 2008. Reliability analysis of wastewater treatment plants. *Water Research* 42, 1182–1194. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.09.001>

- Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D.J., Larsson, D.G.J., Hobman, J.L., 2017. Chapter Seven - Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance, in: Poole, R.K. (Ed.), *Advances in Microbial Physiology, Microbiology of Metal Ions*. Academic Press, pp. 261–313. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.02.001>
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2015. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics* 16, 964. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>
- Pavlik, I., Ullmann, V., Falkinham, J.O., 2022. Nontuberculous Mycobacteria: Ecology and Impact on Animal and Human Health. *Microorganisms* 10, 1516. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081516>
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., Mulkiewicz, E., 2019. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Science of The Total Environment* 697, 134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>
- Phan, L.T., Schaar, H., Saracevic, E., Krampe, J., Kreuzinger, N., 2022. Effect of ozonation on the biodegradability of urban wastewater treatment plant effluent. *Science of The Total Environment* 812, 152466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152466>
- Porse, A., Schønning, K., Munck, C., Sommer, M.O.A., 2016. Survival and Evolution of a Large Multidrug Resistance Plasmid in New Clinical Bacterial Hosts. *Molecular Biology and Evolution* 33, 2860–2873. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw163>
- Preisner, M., 2020. Surface Water Pollution by Untreated Municipal Wastewater Discharge Due to a Sewer Failure. *Environ. Process.* 7, 767–780. <https://doi.org/10.1007/s40710-020-00452-5>
- Quach-Cu, J., Herrera-Lynch, B., Marcinia, C., Adams, S., Simmerman, A., Reinke, R.A., 2018. The Effect of Primary, Secondary, and Tertiary Wastewater Treatment Processes on Antibiotic Resistance Gene (ARG) Concentrations in Solid and Dissolved Wastewater Fractions. *Water* 10, 37. <https://doi.org/10.3390/w10010037>
- Radomski, N., Betelli, L., Moilleron, R., Haenn, S., Moulin, L., Cambau, E., Rocher, V., Gonçalves, A., Lucas, F.S., 2011. Mycobacterium Behavior in Wastewater Treatment Plant, A Bacterial Model Distinct From *Escherichia coli* and *Enterococci*. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5380–5386. <https://doi.org/10.1021/es104084c>
- Rao, M., Streur, T.L., Aldwell, F.E., Cook, G.M., 2001. Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology* 147, 1017–1024. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-1017>
- Rapport de données quotidiennes pour mai 2024 - Climat - Environnement et Changement climatique Canada [WWW Document], n.d. URL https://climat.meteo.gc.ca/climate_data/daily_data_f.html?StationID=26892 (accessed 5.5.24).
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Martí, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Barceló, D., Balcázar, J.L., 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research* 69, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>

- Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Varela Della Giustina, S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., Berendonk, T.U., Michael-Kordatou, I., Fatta-Kassinos, D., Martinez, J.L., Elpers, C., Henriques, I., Jaeger, T., Schwartz, T., Paulshus, E., O'Sullivan, K., Pärnänen, K.M.M., Virta, M., Do, T.T., Walsh, F., Manaia, C.M., 2020. Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environment International* 140, 105733. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105733>
- ROMAEU, 2022. Eaux usées domestiques, communautaires et municipales [WWW Document]. URL <https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/eaux-usees/domest-communautaire-municipal.htm> (accessed 7.11.24).
- Sabri, N. 'Azzyati binti, 2020. Antibiotics and antibiotic resistance genes in wastewater: occurrence and removal technologies (phd). Wageningen University, Wageningen.
- Sabri, N.A., Schmitt, H., Van der Zaan, B., Gerritsen, H.W., Zuidema, T., Rijnaarts, H.H.M., Langenhoff, A.A.M., 2020. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8, 102245. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.004>
- Schages, L., Wichern, F., Kalscheuer, R., Bockmühl, D., 2020. Winter is coming – Impact of temperature on the variation of beta-lactamase and mcr genes in a wastewater treatment plant. *Science of The Total Environment* 712, 136499. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136499>
- Shao, S., Hu, Y., Cheng, J., Chen, Y., 2018. Research progress on distribution, migration, transformation of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in aquatic environment. *Critical Reviews in Biotechnology* 38, 1195–1208. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1471038>
- Shin, J., Choi, S., Park, C.M., Wang, J., Kim, Y.M., 2022. Reduction of antibiotic resistome in influent of a wastewater treatment plant (WWTP) via a chemically enhanced primary treatment (CEPT) process. *Chemosphere* 286, 131569. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131569>
- Sousa, J.M., Macedo, G., Pedrosa, M., Becerra-Castro, C., Castro-Silva, S., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2017. Ozonation and UV254nm radiation for the removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from urban wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 323, 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.096>
- Tang, H., Liu, Z., Hu, B., Zhu, L., 2022. Effects of iron mineral adhesion on bacterial conjugation: Interfering the transmission of antibiotic resistance genes through an interfacial process. *Journal of Hazardous Materials* 435, 128889. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128889>
- Tétreault, R., 2022. Guide d'interprétation du règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées.
- Tian, L., Li, Q., Cai, X., Wang, Yicheng, Wang, Yuexing, Mao, Y., 2022. Dynamic distribution and potential transmission of antibiotic resistance genes in activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 106, 6785–6797. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12162-z>
- Tong, J., Lu, X., Zhang, J., Sui, Q., Wang, R., Chen, M., Wei, Y., 2017. Occurrence of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in enterococci and genomic DNA during

- anaerobic digestion of pharmaceutical waste sludge with different pretreatments. *Bioresource Technology* 235, 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.104>
- Tran, H.T., Lesage, G., Lin, C., Nguyen, T.B., Bui, X.-T., Nguyen, M.K., Nguyen, D.H., Hoang, H.G., Nguyen, D.D., 2022. Chapter 3 - Activated sludge processes and recent advances, in: Bui, X.-T., Nguyen, D.D., Nguyen, P.-D., Ngo, H.H., Pandey, A. (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 49–79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99874-1.00021-X>
- Wang, F.-H., Qiao, M., Su, J.-Q., Chen, Z., Zhou, X., Zhu, Y.-G., 2014. High throughput profiling of antibiotic resistance genes in urban park soils with reclaimed water irrigation. *Environ Sci Technol* 48, 9079–9085. <https://doi.org/10.1021/es502615e>
- Wang, J., Chu, L., Wojnárovits, L., Takács, E., 2020. Occurrence and fate of antibiotics, antibiotic resistant genes (ARGs) and antibiotic resistant bacteria (ARB) in municipal wastewater treatment plant: An overview. *Science of The Total Environment* 744, 140997. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140997>
- Wang, R., Ji, M., Zhai, H., Guo, Y., Liu, Y., 2021. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in WWTP effluent-receiving water bodies and reclaimed wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment* 796, 148919. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148919>
- Wilfert, P., Kumar, P.S., Korving, L., Witkamp, G.-J., van Loosdrecht, M.C.M., 2015. The Relevance of Phosphorus and Iron Chemistry to the Recovery of Phosphorus from Wastewater: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 49, 9400–9414. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00150>
- Wu, J., Jiang, Y., Zha, L., Ye, Z., Zhou, Z., Ye, J., Zhou, H., 2010. Tetracycline degradation by ozonation, and evaluation of biodegradability and toxicity of ozonation byproductsPaper submitted to the Journal of Environmental Engineering and Science. *Can. J. Civ. Eng.* 37, 1485–1491. <https://doi.org/10.1139/L10-100>
- Wu, Q.-Y., Yang, Z.-W., Du, Y., Ouyang, W.-Y., Wang, W.-L., 2021. The promotions on radical formation and micropollutant degradation by the synergies between ozone and chemical reagents (synergistic ozonation): A review. *Journal of Hazardous Materials* 418, 126327. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126327>
- Xu, L., Ouyang, W., Qian, Y., Su, C., Su, J., Chen, H., 2016. High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems. *Environmental Pollution* 213, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.013>
- Yang, F., Zhao, M., Zheng, B., Xiao, D., Wu, L., Guo, Y., 2012. Influence of pH on the fluorescence properties of graphene quantum dots using ozonation pre-oxide hydrothermal synthesis. *J. Mater. Chem.* 22, 25471–25479. <https://doi.org/10.1039/C2JM35471C>
- Yi, X., Lin, C., Ong, E.J.L., Wang, M., Zhou, Z., 2019. Occurrence and distribution of trace levels of antibiotics in surface waters and soils driven by non-point source pollution and anthropogenic pressure. *Chemosphere* 216, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.087>

- Yue, Z., Zhang, J., Zhou, Z., Ding, C., Zhang, T., Wan, L., Wang, X., 2022. Antibiotic degradation dominates the removal of antibiotic resistance genes during composting. *Bioresource Technology* 344, 126229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126229>
- Zainab, S.M., Junaid, M., Xu, N., Malik, R.N., 2020. Antibiotics and antibiotic resistant genes (ARGs) in groundwater: A global review on dissemination, sources, interactions, environmental and human health risks. *Water Research* 187, 116455. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116455>
- Zaviska, F., Drogui, P., Mercier, G., Blais, J.-F., 2009. Procédés d'oxydation avancée dans le traitement des eaux et des effluents industriels: Application à la dégradation des polluants réfractaires. *rseau* 22, 535–564. <https://doi.org/10.7202/038330ar>
- Zhai, W., Yang, F., Mao, D., Luo, Y., 2016. Fate and removal of various antibiotic resistance genes in typical pharmaceutical wastewater treatment systems. *Environ Sci Pollut Res* 23, 12030–12038. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6350-9>
- Zhang, C., Xia, F., Long, J., Peng, B., 2017. An integrated technology to minimize the pollution of chromium in wet-end process of leather manufacture. *Journal of Cleaner Production* 154, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.216>
- Zhang, J., Zhang, X., Zhou, Y., Han, Q., Wang, X., Song, C., Wang, S., Zhao, S., 2023. Occurrence, distribution and risk assessment of antibiotics at various aquaculture stages in typical aquaculture areas surrounding the Yellow Sea. *Journal of Environmental Sciences* 126, 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.01.024>
- Zhang, R., Gu, J., Wang, X., Li, Y., 2020. Antibiotic resistance gene transfer during anaerobic digestion with added copper: Important roles of mobile genetic elements. *Science of The Total Environment* 743, 140759. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140759>
- Zhang, T., Zhang, M., Zhang, X., Fang, H.H., 2009. Tetracycline Resistance Genes and Tetracycline Resistant Lactose-Fermenting *Enterobacteriaceae* in Activated Sludge of Sewage Treatment Plants. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3455–3460. <https://doi.org/10.1021/es803309m>
- Zhang, X., Liu, S., Sun, H., Huang, K., Ye, L., 2023. Impact of different organic matters on the occurrence of antibiotic resistance genes in activated sludge. *Journal of Environmental Sciences* 127, 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.04.021>
- Zheng, J., Su, C., Zhou, J., Xu, L., Qian, Y., Chen, H., 2017. Effects and mechanisms of ultraviolet, chlorination, and ozone disinfection on antibiotic resistance genes in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants. *Chemical Engineering Journal* 317, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.076>
- Zhuang, Y., Ren, H., Geng, J., Zhang, Yingying, Zhang, Yan, Ding, L., Xu, K., 2015. Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 7037–7044. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3919-z>

ANNEXE A SUPPLEMENTARY MATERIAL

Effect of ozonation on the reduction of antimicrobial resistance genes and non-tuberculous mycobacteria in full-scale wastewater treatment plant effluents

Table S.1: Variation of physicochemical parameters during the 13 sampling campaigns (C1 to C13)

Table S.2: The variations in water and air temperature. precipitation. statio flow rate. and daily ozone dose.

Figure S.1: Distribution and variation of different physicochemical parameters across various sample types throughout the sampling campaign

Figure S.2: Average of number of genes detected per sample type. For each of the antimicrobial family listed. the maximum number of ARGs that could be detected are: beta-lactams - 6. fluoroquinolones - 2. MLSB (macrolide-lincosamide-streptogramin B) - 3. tetracyclines - 4. aminoglycosides - 2. sulfonamides - 2. vancomycin - 1. colistin - 1. Intl-1 - 1 and horizontal gene transfer (HGT) - 1 type.

Figure S.3: Distribution of physicochemical parameters primary effluent and final effluent was analyzed using Principal Coordinate Analysis (PCoA).

Figure S.4: Relative Abundance for selected ARGs throughout the treatment steps(A) and analysis of significant differences between pairs of sample types (B). INF: Influent; EF-S: secondary influent, after activated sludge treatment; EF-F: final effluent after ozonation; SL: sludge

Table S. 1: Physicochemical parameters measured throughout the 13 sampling campaigns

		PH	T	CE	TSS	VSS	TUR	ABS-UV	COD	ALK	NO ₂ ⁻	S ²⁻
		°C	MS/cm	(mg/l)	(mg/l)	(NTU)	(cm ⁻¹)	(mg/l)	(mg CaCO ₃ /L)	(mg N/L)	(mg NO ₂ - /L)	(mg S ₂ /L)
C-1	INF	7.42	20.70	1140.33	165.07	142.12	69.30	NM	498.00	295.00	1.12	0.22
	EF-S	7.23	20.53	979.33	18.20	12.85	3.80	NM	38.67	159.00	ND	ND
	EF- F	7.24	21.13	973.00	11.85	6.15	2.97	NM	32.33	135.00	ND	ND
C-2	INF	7.48	17.83	1091.67	296.33	220.17	72.13	0.21	389.33	261.67	1.41	0.14
	EF-S	7.13	19.83	982.33	13.67	10.90	2.70	0.12	37.67	146.67	0.30	ND
	EF- F	7.10	17.00	960.67	8.73	6.13	2.42	0.10	17.67	117.67	0.30	ND
C-3	INF	7.35	18.83	1060.33	273.17	250.43	74.10	0.24	431.33	268.67	ND	0.03
	EF-S	6.74	19.07	975.00	13.83	11.07	2.96	0.12	30.33	117.67	ND	ND
	EF- F	7.09	18.73	966.00	7.90	4.83	2.21	0.07	16.67	131.00	ND	ND
C-4	INF	7.19	18.23	1094.67	342.1	305.03	99.43	0.28	389.67	266.33	ND	0.35
	EF-S	7.06	18.50	965.00	17.4	13.06	2.05	0.13	31.00	117.33	ND	ND
	EF- F	6.45	18.47	956.67	11.02	8.27	1.69	0.11	21.67	104.00	ND	ND
C-5	INF	7.33	18.70	1079.00	223.33	190.00	174.67	0.30	590.33	273.33	1.64	0.38
	EF-S	6.48	18.33	975.67	15.00	10.83	3.09	0.14	35.00	102.33	ND	ND
	EF- F	6.13	19.00	911.00	10.83	8.33	2.56	0.11	22.00	92.67	ND	ND
C-6	INF	7.05	18.27	1066.67	124.52	104.68	60.27	0.29	606.00	241.00	ND	0.35
	EF-S	7.04	18.90	893.67	16.67	13.33	3.29	0.15	25.00	85.67	ND	ND
	EF- F	7.02	18.80	893.00	4.67	2.67	3.39	0.11	13.00	100.00	ND	ND

Table S. 1: Physicochemical parameters measured throughout the 13 sampling campaigns (suite)

PH	T	CE	TSS	VSS	TUR	ABS-UV	COD	ALK	NO ₂ ⁻	S ²⁻
	°C	MS/cm	(mg/l)	(mg/l)	(NTU)	(cm ⁻¹)	(mg/l)	(mg CaCO ₃ /L)	(mg NO ₂ -N/L)	(mg S ₂ /L)
C-7	INF	7.47	17.90	1111.00	104.00	81.33	52.83	0.31	282.00	275.67
	EF-S	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
	EF- F	7.40	18.27	1023.33	9.2	4.2	1.51	0.11	12.00	99.33
C-8	INF	7.31	19.80	949.67	224.33	204.76	55.47	0.18	436.67	284.00
	EF-S	7.17	20.50	891.67	14.29	11.11	2.63	0.11	30.33	147.67
	EF- F	7.06	20.30	918.00	5.19	2.96	2.36	0.09	16.67	121.00
C-9	INF	7.34	17.93	1037.67	257.78	217.78	41.53	0.18	389.67	279.00
	EF-S	7.25	18.83	919.67	11.93	11.05	3.13	0.10	23.67	157.67
	EF- F	7.17	18.80	984.67	13.69	9.05	4.36	0.08	10.67	117.67
C-10	INF	7.61	16.80	1010.00	176.52	154.77	108.33	0.17	276.67	283.00
	EF-S	7.25	17.13	926.00	17.43	12.61	4.57	0.10	29.67	160.33
	EF- F	7.41	14.77	929.67	11.01	8.46	4.45	0.09	12.33	151.67
C-11	INF	7.50	15.33	1036.67	538.33	180.00	94.43	0.26	419.00	287.33
	EF-S	7.40	16.07	1010.33	12.50	6.67	3.58	0.12	21.00	165.00
	EF- F	7.41	17.10	1008.33	8.67	6.67	3.42	0.13	19.00	163.33
C-12	INF	7.70	13.97	1035.67	318.33	280.00	72.43	0.25	660.00	279.33
	EF-S	7.16	16.40	1005.33	12.50	9.17	3.63	0.12	34.67	151.00
	EF- F	7.16	15.83	992.67	8.00	6.00	3.53	0.10	36.67	146.00

Table S. 1: Physicochemical parameters measured throughout the 13 sampling campaigns (suite)

Table S.2: The variations in water and air temperature, precipitation, WWTP flow rate and daily ozone dose.

	Date	*Air T (max)	*Air T (min)	Water T*** (moy)	*Precipitation mm	**Flow rate m ³ /day	**kg/day O ₃	**mg O ₃ /ml
C-1	28/08/2023	-	-	20.70	-	-	-	-
C-2	05/09/2023	32	18.3	17.83	0.00	52475	107.7	2.05
C-3	12/09/2023	22.6	10.7	18.83	8.00	47874	115.7	2.42
C-4	19/09/2023	16.3	14.2	18.23	3.00	46238	109.6	2.37
C-5	26/09/2023	20.6	5.3	18.70	0.00	75363	0	0.00
C-6	03/10/2023	29.2	11.9	18.27	0.00	42147	74.1	1.76
C-7	10/10/2023	13.5	7.8	17.90	0.50	43106	56.4	1.31
C-8	17/10/2023	15.1	5.4	19.80	0.00	51470	109.5	2.13
C-9	24/10/2023	11.7	0	17.93	3.60	71855	154.5	2.15
C-10	30/10/2023	4	-0.2	16.80	-	74372	155.5	2.09
C-11	07/11/2023	8.8	-4.6	15.33	4.20	62990	0	0.00
C-12	14/11/2023	3	-0.8	13.97	0.00	53986	0	0.00
C-13	21/11/2023	1.5	-10.3	14.77	24	51767	0	0.00

- Value not found

* Values according to the Québec database. Precipitation represents the mm of rain on the day prior to the sampling.

** Value measured by the WWTP

*** Value measured by us in the lab (« Rapport de données quotidiennes pour mai 2024 - Climat - Environnement et Changement climatique Canada ». s. d.)

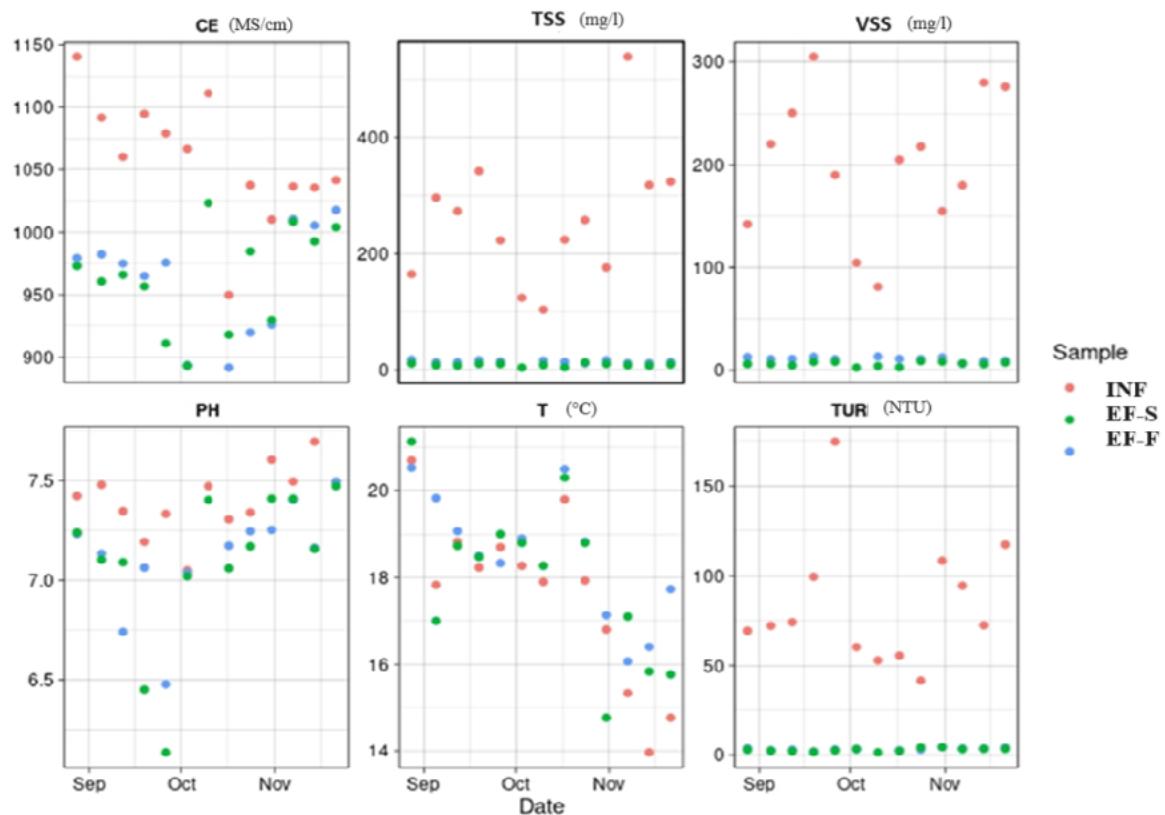


Figure S.1: Distribution and variation of different physicochemical parameters across various sample types throughout the sampling campaign

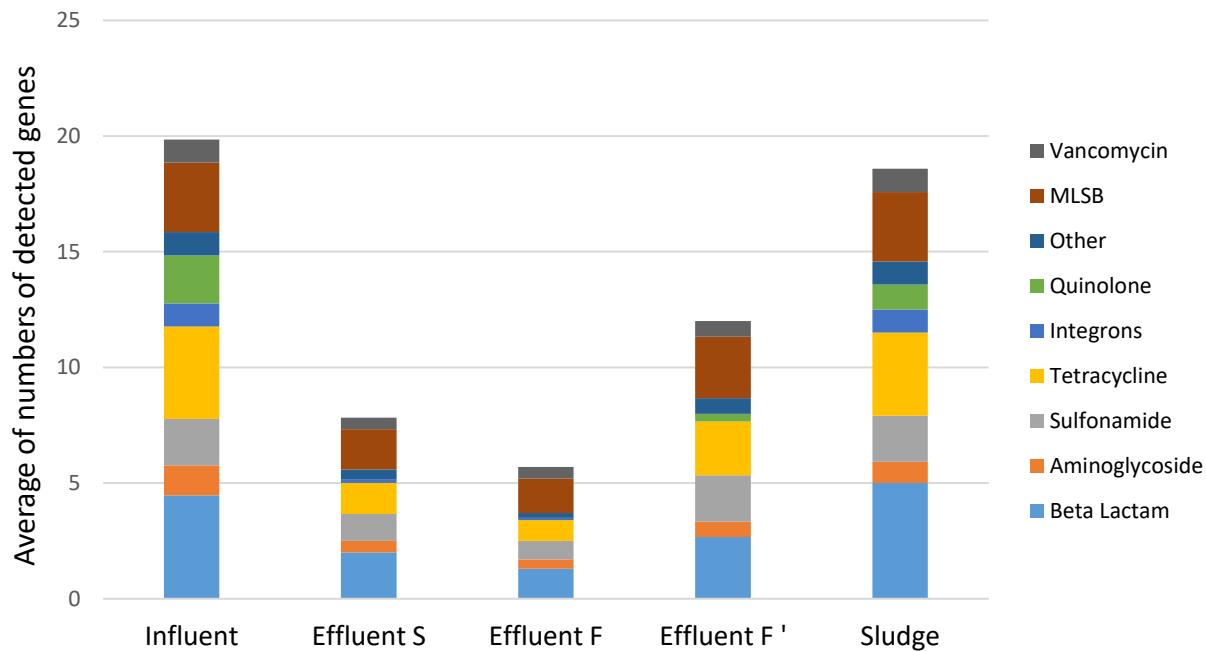


Figure S.2. Average of number of genes detected per sample type. For each of the antimicrobial family listed. the maximum number of ARGs that could be detected are: beta-lactams - 6. fluoroquinolones - 2. MLSB (macrolide-lincosamide-streptogramin B) - 3. tetracyclines - 4. aminoglycosides - 2. sulfonamides - 2. vancomycin - 1. colistin - 1. Intl-1 - 1 and horizontal gene transfer (HGT) - 1 type.

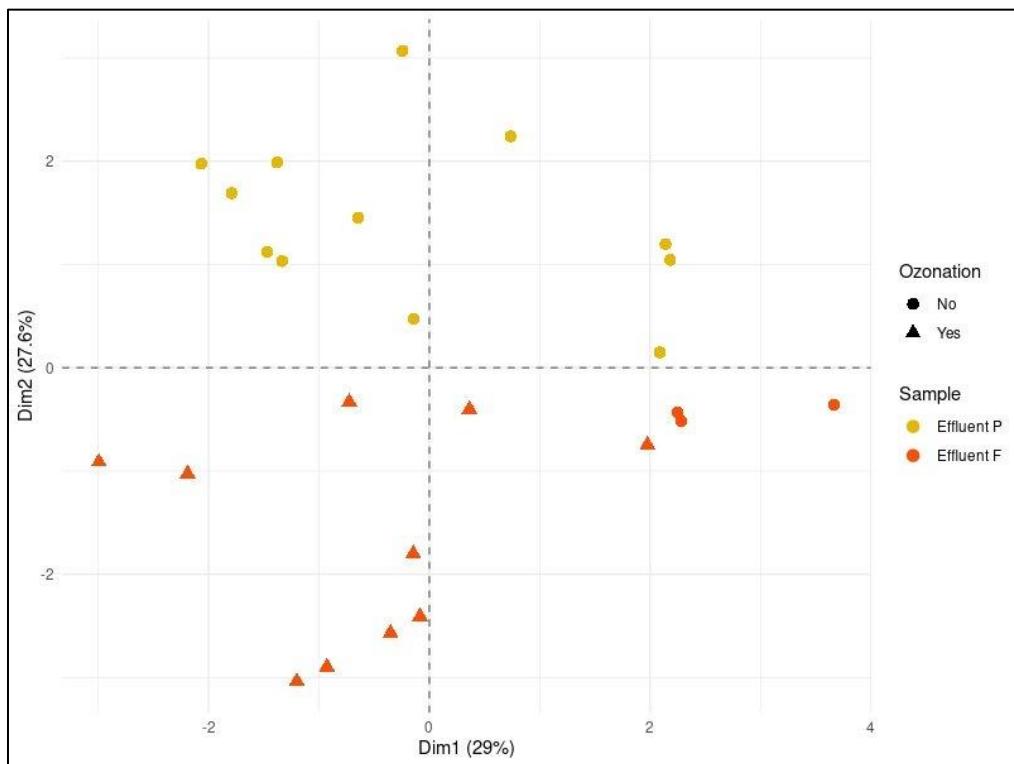
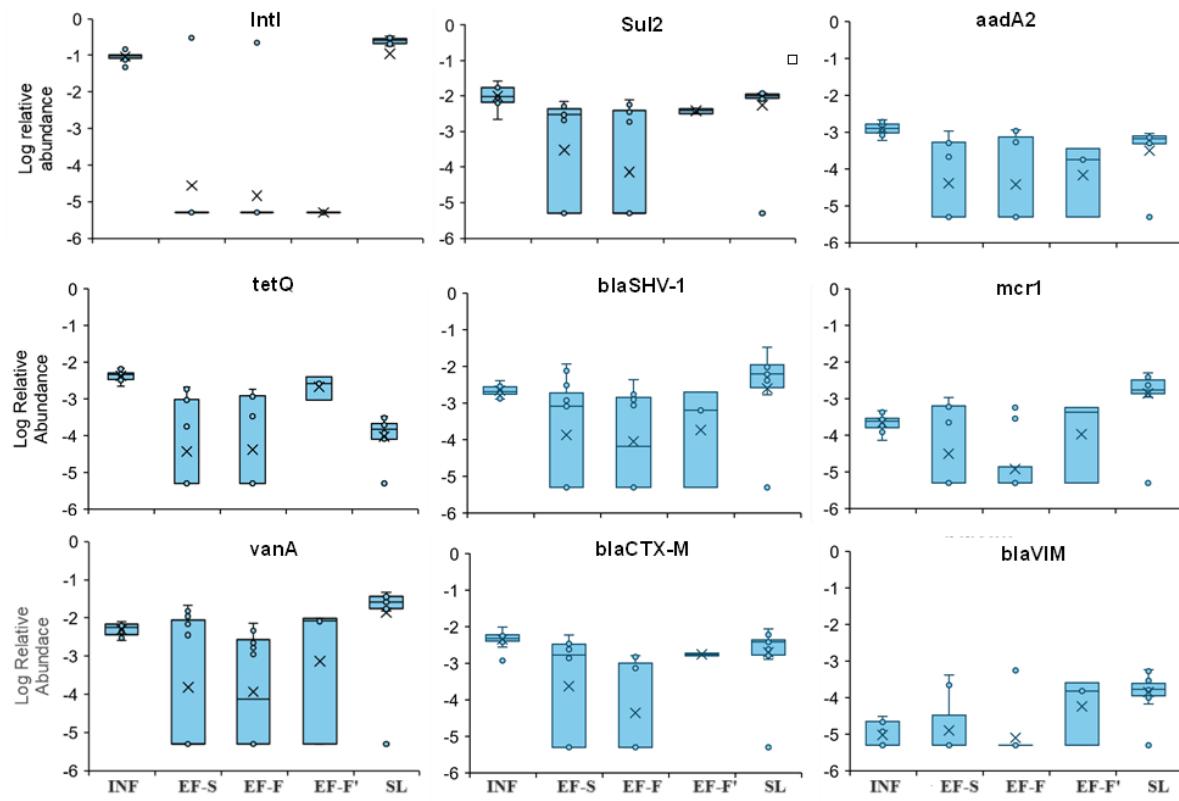


Figure S.3: Distribution of physicochemical parameters primary effluent and final effluent was analyzed using Principal Coordinate Analysis (PCoA).

A**B**

	<i>mcr</i>	<i>blavim</i>	<i>blas hv</i>	<i>vanA</i>	<i>intl</i>	<i>aadA2</i>	<i>tetQ</i>	<i>sul2</i>	<i>blaCTX-M</i>
INF vs EF-S	NS	NS	NS	NS	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
EF-S vs EF-F	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
INF vs SL	0.004	0.004	0.010	0.004	0.004	0.002	0.002	NS	NS

Figure S.4: Relative Abundance for selected ARGs throughout the treatment steps(A) and analysis of significant differences between pairs of sample types (B). INF: Influent; EF-S: secondary influent, after activated sludge treatment; EF-F: final effluent after ozonation