

Occurrence et devenir des polluants émergents (antibiotiques) dans un aquifère alluvial et leur influence sur les bactéries multi-résistantes (Bas-Fluvià, Catalogne)

MAS-PLA J^{1,2}, BOY-ROURA M¹, PETROVIC M^{1,3}, VILLAGRASA M¹, LEKUNBERRI I¹,
BORREGO CM^{1,4}, MENCIO A², BRUSI D², MARCÈ R¹

¹ Institut Català de Recerca de l'Aigua, C/ Emili Grahit 101, 17003 Girona, Espagne.

² Grup de Recerca GAiA – Geocamb; Departament de Ciències Ambientals, Universitat de Girona, 17071 Girona, Espagne.

³ Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Espagne.

⁴ Grup d'Ecologia Microbiana Molecular, Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona, 17071 Girona, Espagne.

RÉSUMÉ. – Les polluants émergents (EOCs, et parmi eux des antibiotiques vétérinaires) par rapport à l'utilisation de fumier dans les activités agricoles sont de grande préoccupation sur la qualité des eaux. Ils sont ainsi responsables des changements dans les communautés microbiologiques existants dans les aquifères qui, à son tour, peuvent supposer un risque pour la santé humaine. Ce travail vise à étudier le comportement des antibiotiques dans les eaux et leur influence sur la capacité des communautés microbiennes à résister à leur présence.

Le site d'étude est localisé dans l'aquifère alluvial du Fluvià à l'Empordà (NE Catalogne, Espagne). Les échantillons correspondent à des eaux souterraines (47), des eaux de surface (7) et des effluents de stations de traitement d'eaux usées (2). Tous les échantillons ont été analysés pour les paramètres hydrochimiques, isotopiques, des EOCs et des gènes de résistance aux antibiotiques.

11 antibiotiques distincts ont été trouvés (concentrations à l'ordre de ng/L) dans des échantillons d'eaux souterraines, correspondant à 4 groupes chimiques : fluoroquinolones (ciprofloxacine, danofloxacine, enrofloxacine, norfloxacine, ofloxacine, orbifloxacine), les macrolides (azithromycine), les quinolones (fluméquine, acide oxolinique, acide pipémidique) et les sulfamides (sulfaméthoxazole). Dans les échantillons d'eaux de surface, 5 antibiotiques différents ont été quantifiés à partir de 2 groupes chimiques : fluoroquinolones (ciprofloxacine, enrofloxacine, norfloxacine, orbifloxacine) et les sulfamides (sulfaméthoxazole). La résistance des communautés microbiennes a également été testée positive. Ce cas d'étude souligne les multiples aspects de la pollution aux antibiotiques qui peut influencer la qualité des eaux souterraines.

Mots-clés : aquifère alluvial, activités agricoles, antibiotiques, bactéries multi-résistantes.

Occurrence and fate of emerging contaminants (antibiotics) in an alluvial aquifer and their effect on multi-resistant bacteria (Baix Fluvià, Catalonia)

ABSTRACT. – The release of Emerging Organic Contaminants (EOCs, and particularly, veterinary antibiotics) into the environment from the use of manure as fertilizers in agriculture is a major concern in water quality. EOCs can also pose a risk to human health due to the appearance of multidrug resistant bacteria. This study aims to improve the knowledge on the occurrence and migration of a selection of EOCs and their influence on multi-resistant bacteria in both surface and groundwater.

The study site is located in the Fluvià alluvial aquifer in the Empordà basin (NE Catalonia, Spain). Samples were collected from 47 wells, 7 samples from surface water and 2 samples from waste water treatment plant effluents. All samples were analyzed for hydrochemical, isotopic, EOCs and antibiotic resistance genes.

Up to 11 antibiotics were found in groundwater (concentrations in the order of ng/L) corresponding to 4 chemical groups: fluoroquinolones (ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, ofloxacin and orbifloxacin), macrolides (azithromycin), quinolones (flumequine, oxolinic acid, pipemidic acid) and sulfonamides (sulfamethoxazole). In surface water samples, 5 different antibiotics were quantified from 2 chemical groups: fluoroquinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin and orbifloxacin) and sulfonamides (sulfamethoxazole). Results also show positive resistance of the microbial communities to antibiotics in polluted sampling points. This field study points out the multifaceted aspects of antibiotic pollution that finally control the impact on groundwater quality.

Keywords: alluvial aquifer, agricultural activities, antibiotics, multi-resistant bacteria.

I. INTRODUCTION

La pollution diffuse par les activités agricoles et la pollution ponctuelle provenant du traitement des eaux usées et des rejets industriels sont les causes principales de contamination des eaux souterraines. Les contaminants les plus couramment associés à l'agriculture correspondent aux nutriments (en particulier, l'azote et le phosphore), mais aussi au lisier et au fumier qui peuvent constituer une source potentielle de contaminants organiques émergents (EOCs, d'après la nomination en anglais Emerging Organic Contaminants) et, en particulier, les antibiotiques vétérinaires. Les antibiotiques sont des composés biologiquement actifs qui sont utilisés en grande quantité pour prévenir ou traiter des maladies infectieuses bactériennes. Suite à leur utilisation en élevage, les antibiotiques peuvent être rejetés dans l'environnement par l'épandage du lisier et du fumier sur les terrains agricoles, et atteignent les eaux souterraines, principalement par lixiviation (Blackwell *et al.*, 2009). Ils peuvent également provenir des effluents des stations de traitement des eaux usées ou bien des eaux de ruissellement s'infiltrant dans les aquifères (Lapworth *et al.*, 2012 ; Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2015). Par conséquent, l'utilisation éparpillée et excessive des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire conduit à un apport constant d'une vaste gamme d'antibiotiques dans les systèmes aquatiques. L'exposition chronique à ces faibles doses d'antibiotiques non seulement perturbe les processus écologiques naturels, mais peuvent également présenter un risque pour la santé humaine en raison du développement de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. En effet, au cours des dernières années, une augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les microbes a été observée (Servais et Passerat, 2009).

Généralement, les eaux de surface contiennent des EOCs à des concentrations plus élevées que les eaux souterraines (Focazio *et al.*, 2008). Par conséquent, elles constituent une source importante et une voie de transfert de la pollution en EOCs des eaux souterraines en raison de l'interaction eau souterraine – eau de surface. L'évolution des EOCs en subsurface dépend des propriétés et des réactions physico-chimiques des composés (la sorption et la dégradation), ainsi que d'autres caractéristiques environnementales (à savoir la vulnérabilité de l'aquifère, le temps de séjour des eaux souterraines et des conditions d'oxydo-réductions). En raison de cette complexité, la présence des EOCs dans les eaux souterraines est encore mal caractérisée.

Bien que les concentrations environnementales d'antibiotiques soient plus faibles que les concentrations thérapeutiques, l'exposition chronique à ces concentrations sub-inhibitrices est susceptible de favoriser le développement de résistance aux antibiotiques et la sélection des bactéries multi-résistantes (Gullberg *et al.*, 2011 ; Chow *et al.*, 2015). À cet égard, quelques études ont montré l'effet nuisible des antibiotiques sur les bactéries autochtones dans les écosystèmes d'eau douce (Marti *et al.*, 2013 ; Proia *et al.*, 2016). Cependant, l'effet des EOCs sur les bactéries des eaux souterraines est encore non-exploré.

Par conséquent, cette étude encadrée dans le projet Water JPI « PERSIST » vise à accroître les connaissances sur la présence et le comportement d'une sélection d'EOCs (en particulier les antibiotiques) et des bactéries multi-résistantes dans les eaux de surface et les eaux souterraines dans une zone agricole. Les études de terrain sont effectuées pour déterminer les processus hydrogéologiques qui influencent l'occurrence et le transport des EOCs dans l'eau et ainsi que les éventuelles réactions qui contrôlent leur devenir dans l'aquifère.

Le site d'étude (80 km²) est localisé dans la zone fluvio-deltaïque formée par un système aquifère multicouches dans le bassin de l'Empordà (NE Catalogne, Espagne), présentant une pollution en nitrates importantes avec des teneurs considérables (entre 8 et 187 mg/L). Le Fluvià, rivière traversant le site d'étude avec un débit moyen de 3,68 m³/s, draine un bassin de 1 125 km² et se jette dans la Mer Méditerranée (ACA, 2015). La région entourant la partie aval du Fluvià, aussi connue comme Bas-Fluvià, constitue une plaine alluviale formée par les sédiments fluviaux déposés durant le Pléistocène et l'Holocène (Montaner *et al.*, 1995). La relation hydrogéologique entre le Fluvià et l'aquifère a lieu à travers la séquence sédimentaire supérieure, qui consiste une épaisse unité de matériaux grossiers (sables et graviers) de 10 à 15 mètres. Cette unité devient plus mince à l'Est où elle est remplacée par des matériaux plus fins constitués par des sables et des limons, qui peuvent encore inclure certains niveaux de graviers. Le substratum de l'aquifère supérieur est constitué par un niveau de limons appartenant à la séquence sédimentaire inférieure, qui peut aussi superposer des couches détritiques grossières à l'Ouest du bassin. Le système hydrogéologique du Bas-Fluvià est largement contrôlé par la recharge de la rivière aux niveaux des sables et graviers très perméables dans la partie la plus occidentale de la plaine alluviale. Cependant, dans les zones centrale et orientale, des variations saisonnières de la relation eaux de surface-eaux souterraines sont observées et sont dues à l'utilisation importante des eaux souterraines pour l'irrigation en période estivale, causant le rabattement et l'infiltration des eaux de surface dans l'aquifère (Mas-Pla *et al.*, 1999). La majorité de l'eau utilisée pour l'irrigation provient des eaux souterraines, à noter que les cultures de maïs et les pommiers sont les plus grands consommateurs d'eau. Cependant, la qualité des eaux souterraines est affectée par les pratiques agricoles qui comprennent l'utilisation d'engrais, principalement le lisier de porc et le fumier, l'élevage de porcs étant la principale activité d'élevage dans la région.

II. MÉTHODOLOGIE

Un total de 56 échantillons d'eau a été prélevé au cours de Mai-Juillet 2015, sur 47 forages (principalement utilisés pour l'agriculture ou l'irrigation), 7 échantillons du Fluvià et 2 échantillons d'effluents de stations de traitement d'eaux usées. Tous les échantillons ont été analysés pour les paramètres hydrochimiques (éléments majeurs, azote total (TN) et carbone organique total (TOC)), isotopiques (non abordés dans cette contribution) et l'analyse des EOCs. Les paramètres physico-chimiques (la conductivité électrique (CE), le pH, le potentiel redox (Eh), l'oxygène dissous (DO) et de la température) ont été mesurés sur le terrain en utilisant une cellule à flux lorsque cela est possible. Les éléments majeurs ont été analysés par chromatographie ionique (Dionex, ICS-5000), le COT et le TN par l'analyseur de carbone organique total (COT-V CSH) et le module azote total TNM-1 de Shimadzu respectivement.

La méthode analytique pour les EOCs inclue la détermination de 53 résidus d'antibiotiques, couvrant divers groupes chimiques et certains de leurs métabolites. La méthode est basée sur une extraction en phase solide (SPE) automatisée hors ligne, suivie par une chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem avec un système de piège à ions quadripolaire linéaire (UHPLC-QqLIT). La quantification des antibiotiques cibles est effectuée en utilisant des standards internes,

correspondant aux à des composés à marquage isotopique pour chaque groupe de produits chimiques, afin de corriger les effets de matrice (Gros *et al.*, 2013).

Les gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs, d'après le nom en anglais Antibiotic Resistance Genes) ont été quantifiés à partir d'extraits d'ADN. La communauté microbienne sera déterminée ultérieurement sur 8 eaux souterraines et 2 eaux de surface. Les échantillons ont été sélectionnés en fonction de leur pollution en antibiotique, leur hydrochimie et leur localisation géographique. L'ADN a été extrait en utilisant une méthode standard au Phénol-chloroforme et la concentration d'ADN a ensuite été quantifiée en utilisant QUBIT (Invitrogen™ Carlsbad, CA, USA). Le nombre de copies des ARGs sélectionnés (Tableau 1) a été quantifié à partir d'extraits d'ADN par PCR quantitative (qPCR) en utilisant des amorces spécifiques et des protocoles optimisés. Le nombre de copies du gène bactérien 16S ARNr a également été quantifié par qPCR pour normaliser les données ARGs entre les échantillons. Tous les dosages de qPCR ont été effectués en utilisant SYBR Green QPCR Master Mix dans un système MX3005P (Agilent Technologies). La concentration de chaque ARG (nombre de copies*ml⁻¹) a été calculée en divisant le nombre de copies résultant par réaction par le volume de la matrice, et ensuite par le volume de l'échantillon.

La composition phylogénétique des communautés microbiennes sera déterminée plus tard dans la fraction d'ADN (pour la communauté et les gènes ribosomiques 16S de l'ARN) pour discriminer les membres de la communauté qui sont principalement affectés par le traitement aux antibiotiques. Les gènes bactériens 16S ARNr seront séquencés en utilisant la technologie Illumina 2 x 250 de MiSeq jumelage-end par une société externe (RTSF, Michigan State University), puis analysées à l'aide de notre propre pipeline bio-informatique.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats hydrochimiques préliminaires montrent que la dynamique du système hydrogéologique est contrôlée par l'interaction eaux de surface – eaux souterraines dans les zones à proximité de la rivière Fluvia. La Figure 1 montre que les concentrations de sulfates et de sodium pour l'eau de la rivière sont similaires aux eaux souterraines prélevées des puits situés sur les deux rives du Fluvia. Ces concentrations de SO₄²⁻ diminuent en s'éloignant de la rivière. Les concentrations de SO₄²⁻ relativement élevées dans les eaux de surface sont dues à la présence de formations d'évaporites (gypse) dans le cours supérieur du Fluvia. D'autre part, les zones de marges ont des caractéristiques hydrochimiques distinctes, et des concentrations de nitrates généralement

plus élevées. Les échantillons avec de faibles concentrations de nitrates se trouvent près de la rivière, ce qui suggère un effet de dilution par l'eau des cours d'eau. La concentration moyenne en nitrates dans les eaux souterraines est de 42,4 mg/L et dans l'eau de surface est de 7,3 mg/L. Certains puits ont un comportement singulier, potentiellement en raison de l'influence du niveau des aquifères profonds. En outre, deux puits ont présenté une influence de l'eau de mer.

En ce qui concerne les contaminants émergents, 11 antibiotiques ont été trouvés dans les eaux souterraines correspondant à 4 groupes différents de produits chimiques (Tableau 2) : fluoroquinolones (ciprofloxacine, danofloxacine, enrofloxacine, la norfloxacine, l'ofloxacine et orbifloxacine), les macrolides (azithromycine), les quinolones (fluméquine, acide oxolinique, l'acide pipémidique) et les sulfamides (sulfaméthoxazole). Le sulfaméthoxazole a été détecté dans 80 % des échantillons d'eau souterraine avec une concentration moyenne de 6,1 ng/L. La ciprofloxacine a été observée dans 45 % des échantillons, avec une concentration moyenne de 77,2 ng/L. Les sulfamides est le groupe le plus fréquemment rapporté des produits pharmaceutiques dans les eaux souterraines en Catalogne (Jurado *et al.*, 2012), et le sulfaméthoxazole a été parmi les contaminants antimicrobiens les plus répandus et détectés dans un bilan sur l'eau souterraine à l'échelle nationale menée par le US Geological Survey (Underwood *et al.*, 2011). La ciprofloxacine a été détectée dans l'eau souterraine uniquement dans certaines études.

Dans les échantillons d'eau de surface, 5 antibiotiques différents ont été quantifiés à partir de 2 groupes chimiques : les fluoroquinolones (ciprofloxacine, enrofloxacine, la norfloxacine et orbifloxacine) et les sulfamides (sulfaméthoxazole). Les composés les plus détectés sont les mêmes que dans les eaux souterraines : le sulfaméthoxazole et la ciprofloxacine (concentration moyenne de 8,5 ng/L et 211,8 ng/L, respectivement). L'enrofloxacine a également été quantifiée dans 2 échantillons avec des concentrations moyennes relativement élevées de 290 ng/L.

Aucune évolution spatiale continue de la concentration d'EOCs a été observée dans l'aquifère (Figure 2). La présence généralisée d'antibiotiques vétérinaires détectés dans l'aquifère du Bas-Fluvia est attribuée à la pollution diffuse de l'agriculture en raison de l'utilisation d'engrais organiques sur les cultures, et à le mélange hydrologique entre l'eau des cours d'eau et des eaux souterraines dans un scénario complexe au cours de la période d'irrigation quand les échantillons étaient prélevés (Mai-Juillet 2015). En plus, aucune relation claire entre la pollution aux nitrates et la présence d'antibiotiques n'a été observée. Des résultats similaires ont été obtenus dans des études antérieures sur la présence de nitrates et sulfamide en Catalogne (Garcia-Galán *et al.*, 2010). D'autre part, les effluents des stations de traitement

Tableau 1 : Liste des gènes cibles pour l'étude des gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs).

Gene	Produit	Impliqué dans
<i>qnr (S/A/B)</i>	Pentapeptide famille de répétition, protège l'ADN gyrase	Résistance aux fluoroquinolones
<i>erm(B)</i>	Adénine ARNr N-6-méthyltransférase	Résistance aux macrolides
<i>Sul-1</i>	Sulfonamide résistant dihydroptéroate synthase	Résistance aux sulfamides
<i>Int1-1</i>	Intégrase de Class I intégron	Proxy de la pollution anthropique
<i>Bla_{TEM}</i>	Gène de bêta-lactamases	Résistance aux bêta-lactamases
<i>tet(W)</i>	Protéine ribosomale de protection	Résistance aux tétracyclines

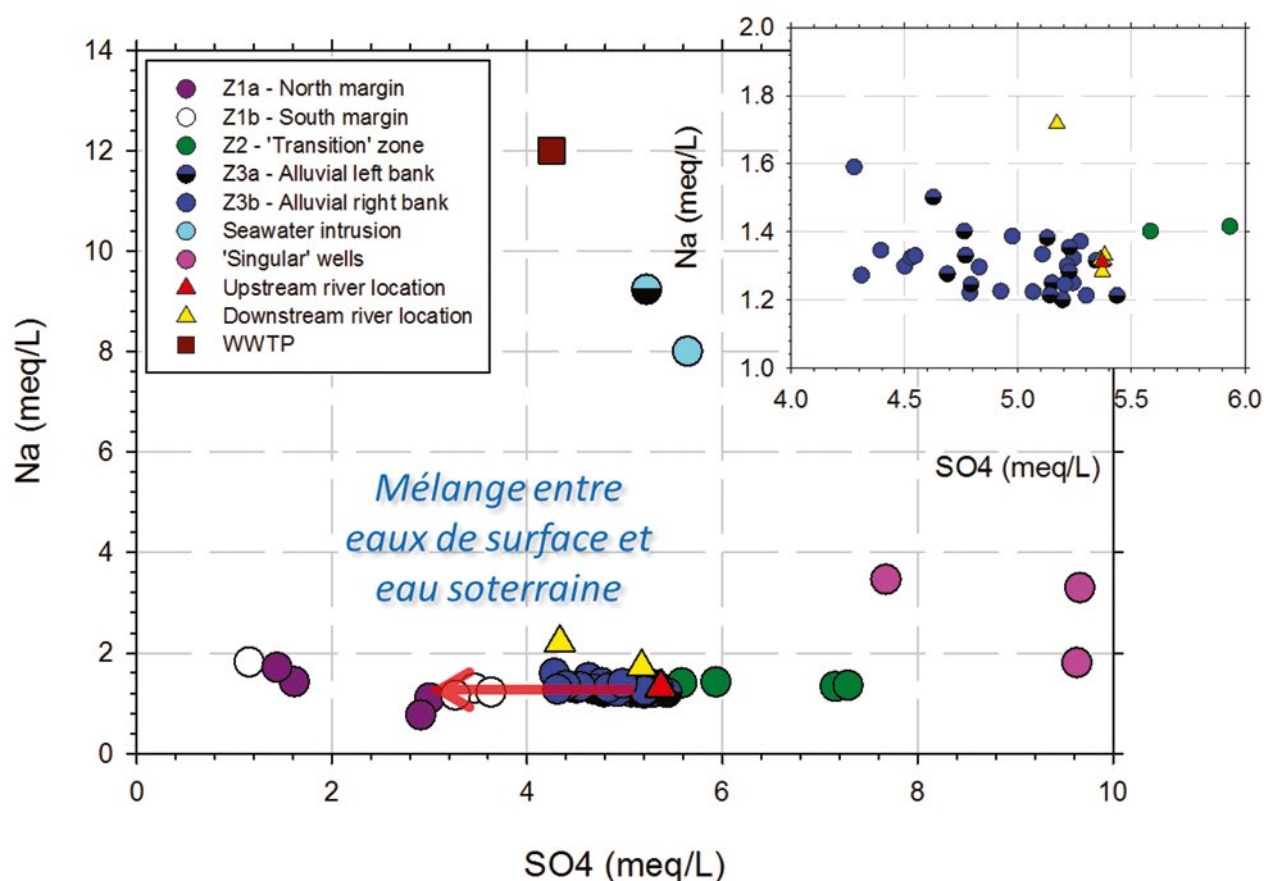


Figure 1 : Sulfate - relation de sodium soulignant l'eau de surface - l'interaction des eaux souterraines. Les triangles rouges et jaunes, représentant les eaux de surface (voir légende), indiquent que la rivière se présente comme un vrai pôle de recharge, et que les eaux souterraines (cercles bleus) sont un mélange entre l'eau des cours d'eau et le débit des eaux souterraines par des marges géologiques.

Tableau 2 : Statistiques pour les antibiotiques les plus trouvés dans les eaux souterraines et les eaux de surface (s.l.d.: sous la limite de détection).

Concentrations (ng/L)	Eau souterraine (n = 47)					Eau de surface (n = 7)				
	n	Moyenne	Erreur	Min.	Max.	n	Moyenne	Erreur	Min.	Max.
Ciprofloxacine	21	77,2	16,9	30,0	298,3	4	211,8	105,9	176,5	287,7
Enrofloxacin	6	60,1	24,5	58,1	63,0	2	290,5	205,4	289,4	291,7
Norfloxacine	7	30,3	11,5	14,0	47,9	1	135,3	135,3	135,3	135,3
Orbifloxacine	11	1,8	0,5	0,7	5,2	1	2,8	2,8	2,8	2,8
Azithromycine	6	7,2	2,9	4,9	13,0	s.l.d.	s.l.d.	s.l.d.	s.l.d.	s.l.d.
Acid Oxolinique	6	1,0	0,4	0,3	2,3	s.l.d.	s.l.d.	s.l.d.	s.l.d.	s.l.d.
Sulfaméthoxazole	38	6,1	1,0	0,7	28,6	6	8,5	3,5	4,9	11,8

des eaux usées peuvent contribuer localement à un apport en antibiotiques dans les eaux souterraines. L'adsorption et la dilution pouvant modifier la composition des EOCs de l'eau souterraine sont encore en cours de recherche.

En ce qui concerne les ARGs, l'analyse qPCR des extraits d'ADN a donné une amplification positive et la quantification des copies du gène 16S ARNr dans tous les échantillons d'eaux de surface et d'eaux souterraines analysées. Presque tous les ARG cibles ont été détectés dans la plupart des puits sauf qnrS, qui était en-dessous de la limite de détection dans l'un des puits. Les résultats indiquent que la plupart des

ARG montre une concentration moyenne similaire à l'exception de Sul-1 (résistance aux sulfamides) et Intl-1 (un gène codant pour une intégrase intégron Class I). Ces deux gènes étaient les plus abondants dans tous les échantillons avec des concentrations moyennes de gènes $1,10 \times 10^5$ copies/ml et $1,63 \times 10^4$ copies du gène/ml, respectivement (Figure 3).

De plus, une corrélation significative entre Intl-1 et Sul-1 a été observée (coefficient de corrélation de Pearson, $R = 0,77$). Les deux gènes sont généralement adjacents à la classe I intégrons conjointement avec des gènes conférant une résistance à des composés d'ammonium quaternaire

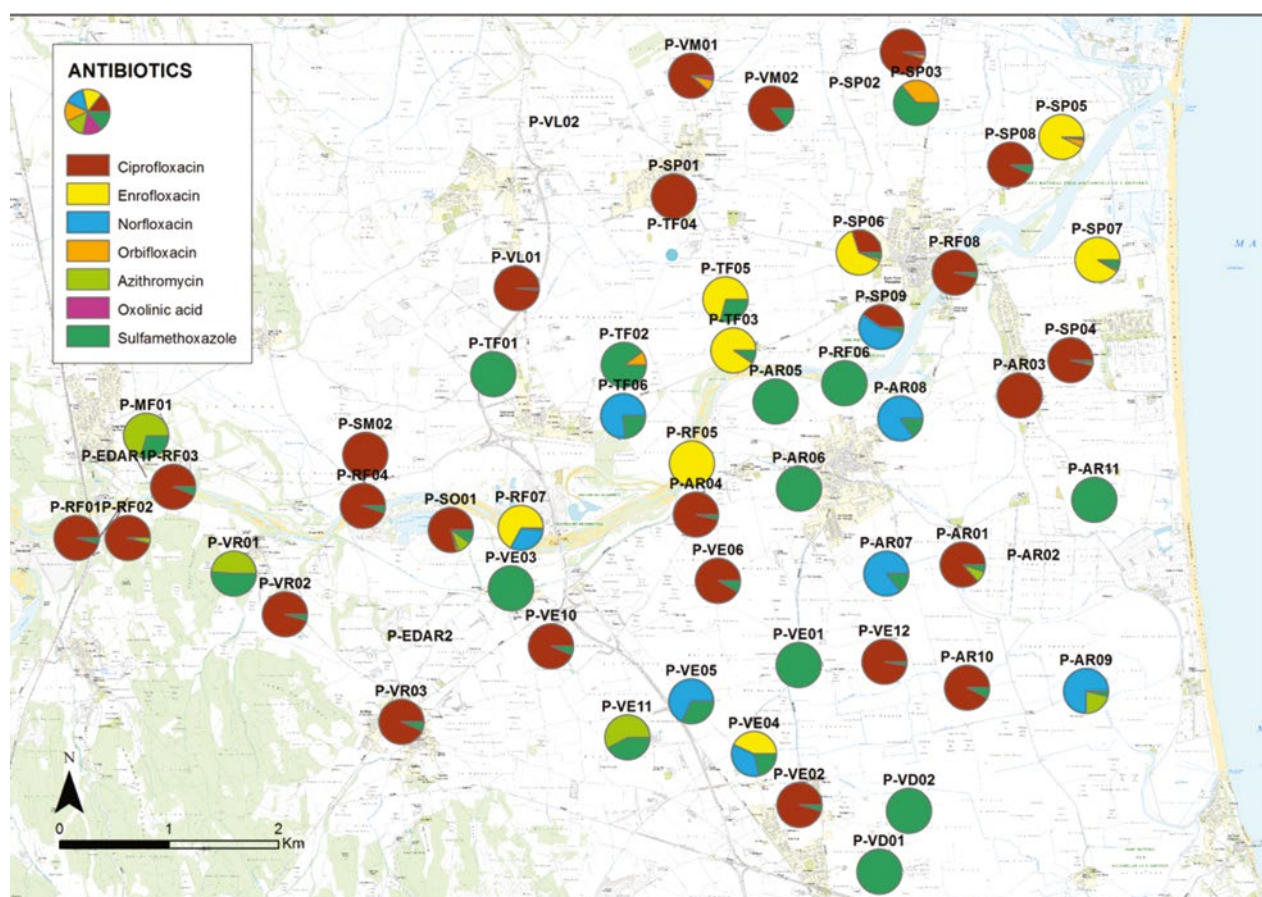


Figure 2 : Localisation et pourcentage des antibiotiques les plus détectés dans les eaux souterraines et les eaux de surface. Des échantillons d'eau des cours d'eau sont codés en tant que P-RF0#.

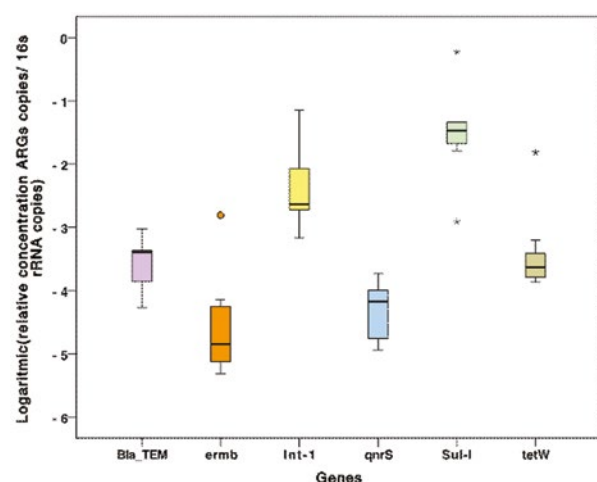


Figure 3 : Concentration relative (nombre de copies normalisé à l'16s bactériennes gène ARNr nombre de copies) d'arguments.

(qcaE) (Gillings *et al.*, 2015 et références citées). En supposant Int-1 comme un proxy pour la pollution anthropique des systèmes aquatiques (Gillings *et al.*, 2015), certains puits semblent plus affectés que d'autres. Les futures campagnes saisonnières dans les puits sélectionnés fourniront plus de données pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus à partir de cette première campagne d'échantillonnage. Les

analyses statistiques seront effectuées pour évaluer la relation entre la présence d'arguments et la survenue de la pollution en antibiotiques.

IV. CONCLUSIONS

Les données hydrogéologiques et hydrochimiques sont utilisées pour améliorer la compréhension des processus qui contrôlent le transport, le devenir et la persistance des EOCs dans les aquifères. La recherche microbiologique a fourni un aperçu complémentaire de l'effet des EOCs sur la qualité des eaux souterraines.

Même si les concentrations dans les eaux souterraines EOCs ne sont pas très élevées (ordre de ng/L), ces résultats préliminaires révèlent que plusieurs composés sont largement détectés dans l'aquifère, spécialement le sulfaméthoxazole et la ciprofloxacin. Leur présence est également élevée dans l'eau de surface. Dans ce scénario, une dynamique hydrogéologique complexe, définie par la relation de recharge entre le fleuve et l'aquifère et par l'altération due aux régimes de retrait des eaux souterraines, contrôle la migration des EOCs introduites par les pratiques de fertilisation. En outre, les processus de sorption sont connus pour affecter la concentration des EOCs, même si elles ne sont pas encore été évaluées dans la zone d'étude.

Certains puits ont montré une forte abondance relative de plusieurs ARGs, soulignant que les bactéries résistantes et les gènes de résistance peuvent entrer dans le cycle de l'eau et être transportés dans les eaux souterraines, ce qui

peut éventuellement représenter un risque pour la santé humaine. Ce cas d'étude souligne les multiples aspects de la pollution aux antibiotiques qui peut influencer la qualité des eaux souterraines.

V. REMERCIEMENTS

Le projet PERSIST est financé par le Water JPI de l'UE (JPI 2013-118) et par le projet CGGL2014-57215-C4-2-R du Gouvernement Espagnol. Cette étude a été aussi bénéficiée de l'aide pour améliorer la productivité scientifique de l'Universitat de Girona (MPCUdG2016/061).

VI. RÉFÉRENCES

- AGÈNCIA CATALANA DE L'AIGUA, ACA ; DEPARTAMENT DE TERRITORI I SOSTENIBILITAT. GENERALITAT DE CATALUNYA (2015).
- BLACKWELL P.A., KAY P., BOXALL A.B.A. (2007) – The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil. *Chemosphere*, **62**, 292–299.
- CHOW C.E.T., WINGET D.M., WHITE R.A., HALLAM S.J. AND SUTTLE C.A. (2015) – Combining genomic sequencing methods to explore viral diversity and reveal potential virus-host interactions. *Frontiers in microbiology*, **6**, 265.
- FOCAZIO M.J., KOLPIN D.W., BARNES K.K., FURLONG E.T., MEYER M.T., ZAUGG S.D., BARBER L.B., THURMAN M.E. (2008) – A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - ii) Untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment*, **402**, 201–216.
- GARCÍA-GALÁN M.J., GARRIDO T., FRAILE J., GINEBRED A., DÍAZ-CRUZ M.S., BARCELÓ D. (2010) – Simultaneous occurrence of nitrates and sulfonamide antibiotics in two ground water bodies of Catalonia (Spain). *Journal of Hydrology*, **383**, 1–2, 93–101.
- GILLINGS M.R., GAZE W.H., PRUDEN A., ET AL. (2015) – Using the class I integron-integrase as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.*, **9**: 1269–1279. Gullberg E., Cao S., Berg O.G., Ilbäck C., Sandegren L., Hughes D. et al., 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog*, **7**, 7: e1002158.
- GROS M., RODRÍGUEZ-MOZAS S., BARCELÓ D. (2013) – Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, **1292**, 173–188.
- GULLBERG E., CAO S., BERG O.G., ILBÄCK C., SANDEGREN L., HUGHES D. ET AL. (2011) – Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog*, **7**: e1002158.
- JURADO A., VÁZQUEZ-SUÑÉ E., CARRERA J., LÓPEZ DE ALDA M., PUJADES E., BARCELÓ D. (2012) – Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of the Total Environment*, **440**, 82–94.
- LAPWORTH D.J., BARAN N., STURAT M.E., WARD R.S. (2012) – Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, **163**, 287–303.
- MARTÍ E., BALCÁZAR J.L. (2013) – Real-time PCR assays for quantification of qnr genes in environmental water samples and chicken feces. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 5: 1743–1745.
- MAS-PLA J., MONTANER J., SOLÀ J. (1999) – Groundwater resources and quality variations due to gravel mining in coastal streams. *Journal of Hydrology*, **216**, 197–213.
- MONTANER J., SOLÀ J., MAS-PLA J., PALLÍ L. (1995) – Aportació al coneixement de l'evolució geològica recent de la plana del Ter. *Pub. Inst. Est. del Baix Empordà*, **14**, 43–53.
- PROIA L., VON SCHILLER D., SÁNCHEZ-MELSIÓ A., SABATER S., BORREGO C.M., RODRÍGUEZ-MOZAS S., BALCÁZAR J.L. (2016) – Occurrence and persistence of antibiotic resistance genes in river biofilms after wastewater inputs in small rivers. *Environmental Pollution*, **210**, 121–128.
- RODRÍGUEZ-MOZAS 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 Resources*, **1**, 69: 234–42.
- SERVAIS P. AND PASSERAT J. (2009) – Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment*, **408**, 2: 365–372.
- UNDERWOOD J.C., HARVEY R.W., METGE D.W., REPERT D.A., BAUMGARTNER L.K., SMITH R.L., ROANE T.M. AND BARBER L.B. (2011) – Effects of the antimicrobial sulfamethoxazole on groundwater bacterial enrichment. *Environmental Science and Technology*, **45**, 7: 3096–3101.