

Titre: Évaluation de l'occurrence de Legionella pneumophila en présence de concentrations élevées de métaux et de particules dans les réseaux de distribution
Title:

Auteur: Amira Abouelmakarim
Author:

Date: 2021

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Abouelmakarim, A. (2021). Évaluation de l'occurrence de Legionella pneumophila en présence de concentrations élevées de métaux et de particules dans les réseaux de distribution [Master's thesis, Polytechnique Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/9916/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/9916/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Michèle Prévost, & Émilie Bédard
Advisors:

Programme: Génie civil
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Évaluation de l'occurrence de *Legionella pneumophila* en présence de
concentrations élevées de métaux et de particules dans les réseaux de
distribution**

AMIRA ABOUELMAKARIM

Département de génie civil, géologique et des mines

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

Génie civil

Décembre 2021

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Évaluation de l'occurrence de *Legionella pneumophila* en présence de concentrations élevées de métaux et de particules dans les réseaux de distribution

Présenté par **Amira ABOUELMAKARIM**

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

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

Benoit BARBEAU, président

Michèle PRÉVOST, membre et directrice de recherche

Émilie BÉDARD, membre et codirectrice de recherche

Laurent LAROCHE, membre

REMERCIEMENT

J'aimerais en premier remercier ma directrice de recherche Michèle Prévost de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet aussi intéressant et enrichissant. Aussi, ce projet n'aurait pas été possible sans ma co-directrice de recherche Émilie Bédard qui m'a accompagnée tout au long de mon parcours et qui m'a énormément appris. Un grand merci du fond du cœur, à toutes les deux, de m'avoir fait confiance et de m'avoir soutenue.

Je remercie l'ensemble du personnel de la Chaire Industrielle CRSNG en eau potable, Yves, Jacinthe, Julie, Mélanie, Tetiana, Hana et Laura d'avoir été accueillants et à l'écoute. Je tiens à remercier en particulier Yves qui a dû déplacer plus de 5 tonnes d'eau afin de rendre ces essais possibles, et Jacinthe et Mélanie de m'avoir appris autant et de m'avoir aidé autant pour mes manipulations. Merci à ma stagiaire Thuy-Lin d'avoir participé à ce projet, j'espère t'avoir transmis une partie de mon amour à la recherche.

Je remercie aussi mes amis de la Chaire, de Polytechnique et mes amis en France de m'avoir soutenue, nos conversations m'ont toujours donnée le sourire, je vous souhaite tout le succès du monde et j'espère être présente pour vous comme vous l'avez été pour moi !

Finalement, je tiens à remercier mes parents, ils ont toujours été fiers de moi et m'ont encouragée tout au long de mon parcours pour réaliser mes rêves. Votre amour, patience et encouragements continuent à me donner la force d'être la meilleure version de moi-même. Je vous aime !

RÉSUMÉ

Legionella pneumophila est la première cause de maladies hydriques aux États-Unis. La présence de la bactérie est dûment documentée dans les réseaux d'eau chaude, en particulier dans les grands bâtiments. Néanmoins, des éclosions ont été causées suite à sa prolifération dans les réseaux de distribution d'eau potable. En 2014, une éclosion à Flint, MI a causé la mort de 12 personnes. La croissance de la bactérie a été liée à un évènement d'eau rouge caractérisé par une augmentation de la concentration en métaux et en particules et une baisse de la concentration de chlore résiduel. L'objectif principal de ce projet de recherche est de quantifier la présence des indicateurs microbiens et de *Legionella pneumophila* dans les réseaux de distribution d'eau potable en présence de concentrations élevées en métaux lors d'évènement d'eau rouge afin de déterminer les conditions favorisant leur prolifération.

Des campagnes d'échantillonnage ont été effectuées en deux temps dans 5 réseaux de distribution d'eau potable du Québec. Dans un premier temps, l'échantillonnage des bornes fontaines dans des secteurs connaissant des évènements d'eau rouge a permis de déterminer la prévalence de *L. pneumophila* dans les extrémités de ces réseaux, en présence de grandes concentrations de particules et de métaux. Dans un second temps, des campagnes d'échantillonnage de grands volumes d'eau en sortie d'usine puis dans des bâtiments ont été réalisées en hiver puis en été. En plus de l'échantillon prélevé en sortie d'usine, trois types d'échantillons étaient prélevés à un robinet des bâtiments ciblés : eau froide au premier jet, eau froide rincée 5 min et eau chaude au premier jet. Les échantillons récoltés ont été concentrés avant d'être analysés. Ces campagnes ont permis de comparer la qualité de l'eau selon le type d'échantillon et les saisons. Le protocole d'échantillonnage des grands volumes a permis de diminuer les limites de détection des méthodes de quantification des bactéries de 1 NPP/100mL à 0,01 NPP/100mL sans inhiber leur croissance dans les milieux de culture.

Les résultats ont mis en évidence la présence de *L. pneumophila* dans 10,7% des échantillons de bornes fontaines et 13,7% des échantillons de grands volumes. Les légionelles ont été détectées dans tous les types d'échantillons en hiver et en été. *L. pneumophila* ont été retrouvées dans des échantillons ayant des concentrations en chlore résiduel allant jusqu'à 0,8 mg Cl₂/L. Le maintien du chlore résiduel dans les réseaux de distribution diminue les concentrations de bactéries viables

mais ne garantit pas l'absence de *L. pneumophila*. Aussi, les coliformes totaux ne peuvent pas être utilisés comme indicateur microbiologique de la présence de *L. pneumophila* vu que la détection des légionelles a été notée même en l'absence de coliformes totaux. Bien qu'il soit recommandé de maintenir la température de l'eau froide sous 20°C, des points positifs en *L. pneumophila* ont été détectés en hiver, alors que la température de l'eau était inférieure à 15°C.

Les échantillons de bornes fontaines positifs à *L. pneumophila* avaient des concentrations moyennes en fer et en manganèse 10 fois plus élevées que celles mesurées aux points où la légionelle n'était pas détectée, alors que les concentrations en fer et en manganèse étaient similaires entre les différents échantillons de grands volumes. Les hautes concentrations en métaux contribuent à l'oxydation plus rapide du désinfectant et augmentent le risque de prolifération des légionelles. Le rinçage unidirectionnel des bornes fontaines aiderait à renouveler l'eau dans les extrémités des réseaux et à diminuer les concentrations de métaux et de particules. Il faut toutefois être prudent, car un rinçage à trop haute vitesse pourrait entraîner une dégradation de la qualité d'eau. Il est essentiel de respecter une vitesse de rinçage de 1,5 m/s tel que recommandé par le Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques pour ne pas perturber la stabilité structurelle du biofilm.

ABSTRACT

Legionella pneumophila is the leading cause of waterborne diseases in the United States. In 2014, an outbreak of Legionnaire's disease in Flint, MI caused the death of 12 people. The proliferation of the bacteria has been linked to the change in the city's water source which caused a red water event, characterized by an increase in the concentration of metals and particles and a decrease in the concentration of residual chlorine. The main objective of this research project was to quantify the presence of microbial indicators and *Legionella pneumophila* in drinking water distribution systems susceptible to red water issues in order to determine the conditions favoring their proliferation.

To achieve the objective, a sampling campaign was designed in two parts, across 5 drinking water distribution systems in Quebec. In the first part, water hydrants were sampled in areas where red water events were frequently reported, in order to determine the prevalence of *L. pneumophila* in dead-ends, in the presence of high concentrations of particles and high metal concentrations. In the second part, sampling was carried out in winter and in summer. Samples were collected at the water treatment plant and in buildings, where three types of samples were collected from a faucet: cold water at first draw, cold water after a 5-min flush and hot water at first draw. The samples were then concentrated using Hemoflow ultra-filtration. The concentration reduced the detection limits of bacteria quantification methods to 0.01 MPN/100ml without inhibiting their growth. These sampling campaigns aimed to compare the water quality according to the sample type, the network and the season.

L. pneumophila was detected in 10.7% of the sampled water hydrants and 13.7% of large-volume samples. *L. pneumophila* was detected in all sample types, in winter and in summer. *L. pneumophila* was detected in samples with residual chlorine concentrations as high as 0.8 mg / L. The absence of *L. pneumophila* is not guaranteed even when maintaining residual chlorine in the water throughout the distribution system. Also, total coliforms cannot be used as microbial indicators of the *Legionella* presence as *L. pneumophila* was detected in absence of total coliforms. Temperatures lower than 20°C did not limit the presence of *L. pneumophila*. Indeed, all the *L. pneumophila* positive samples collected in winter were at temperatures below 15 ° C.

The average iron and manganese concentrations in *L. pneumophila* positive hydrant samples were 10 times higher than in *L. pneumophila* non-detect samples, whereas iron and manganese concentrations were comparable for all large volume samples. High concentrations of metals and particles in the water oxidize the residual disinfectant and contribute to the growth of *Legionella*. The unidirectional flushing of hydrants could help renew the water in the dead-ends and reduce the concentrations of metals and particles, therefore reducing the risk of legionella proliferation. However, care must be taken during flushing to avoid water quality deterioration associated with high-velocity flushing. A velocity of 1.5 m/s is recommended for optimal results.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENT	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVI
LISTE DES ANNEXES.....	XVIII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	3
2.1 <i>Legionella pneumophila</i>	3
2.1.1 Conditions favorables à la prolifération de <i>L. pneumophila</i>	5
2.1.2 Sources d'exposition	7
2.1.3 Méthodes de détection de <i>Legionella</i>	11
2.2 Les eaux rouges.....	16
2.2.1 Flint, MI : eau rouge et <i>L. pneumophila</i>	19
2.2.2 Quincy, Il : baisse de chlore et corrosion	23
2.3 Éléments justifiant le projet.....	25
CHAPITRE 3 DÉMARCHE DU PROJET DE RECHERCHE	26
3.1 Objectifs	26
3.2 Démarche	26
CHAPITRE 4 MATÉRIEL ET MÉTHODES	28

4.1	Protocoles d'échantillonnage	28
4.1.1	Sites d'échantillonnage	28
4.1.2	Calendriers d'échantillonnage.....	28
4.1.3	Préparation du matériel	31
4.1.4	Étapes d'échantillonnage.....	31
4.1.5	Concentration des échantillons.....	34
4.2	Méthodes analytiques.....	36
4.2.1	Analyses physico-chimiques	37
4.2.2	Analyses microbiologiques	38
4.2.3	Vérification du Colilert et du Legiolert sur les échantillons concentrés	41
CHAPITRE 5	RÉSULTATS	43
5.1	Résultats des échantillonnages aux bornes fontaines.....	43
5.1.1	Détection de <i>L. pneumophila</i> en fonction du chlore libre, de la température et de la turbidité	46
5.2	Résultats des échantillonnages avec grands volumes	51
5.2.1	Vérification du Legiolert et du Colilert sur les échantillons concentrés	52
5.2.2	Résultats généraux.....	53
5.2.3	Impact du chlore libre, de la température et de la turbidité sur la positivité en <i>L. pneumophila</i>	59
5.2.4	Positivité, types d'échantillons et physico-chimie	62
CHAPITRE 6	DISCUSSION	66
6.1	Positivité et méthodes de détection	66
6.1.1	Récapitulation des résultats.....	66
6.1.2	Vérification de l'inhibition.....	66

6.1.3	Impact des limites de détection sur la positivité	67
6.2	Impacts de la qualité physico-chimique de l'eau sur la positivité.....	71
6.3	Types d'eau	75
CHAPITRE 7 CONCLUSION		77
RÉFÉRENCES.....		80
ANNEXES		89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Sources d'exposition à <i>Legionella</i>	9
Tableau 2-2 : Avantages et inconvénients des méthodes de détection de <i>Legionella</i> (adapté de National Academies of Sciences (2019))	12
Tableau 3-1 : Récapitulatif des objectifs spécifiques et des hypothèses associées.	26
Tableau 4-1 : Description de la qualité d'eau dans les réseaux échantillonnés	28
Tableau 4-2 : Calendrier d'échantillonnage des BF	29
Tableau 4-3 : Calendrier des échantillonnages pour chaque réseau selon la saison et le type d'échantillon de GV-grand volume, CW- eau froide, HW – eau chaude. Bat signifie bâtiment.	30
Tableau 4-4 : Analyses physico-chimiques et microbiologiques effectuées selon le type d'échantillon.....	36
Tableau 4-5 : Les appareils utilisés et les méthodes suivies pour les analyses physico-chimiques.	37
Tableau 4-6 : Milieux et les conditions de culture pour les mesures bactériennes.	40
Tableau 5-1 : Résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques des échantillons de bornes fontaines.....	45
Tableau 5-2 : Concentrations obtenues d' <i>E. coli</i> (Colilert) et de <i>L. pneumophila</i> (Legiolert) dans des échantillons concentrés 100 fois (échantillon Bat E2 CW-5MF H) et l'eau du robinet filtrée stérile.....	53
Tableau 5-3 : Paramètres physico-chimiques de l'échantillon Bat E2 CW-5MF H non-concentré et concentré.	53
Tableau 5-4 : Résumé des paramètres physico-chimiques et microbiologiques des points positifs en coliformes ou en <i>Legionella</i> des échantillons de grands volumes en hiver puis en été. Bat :	

bâtiment; HW-FD : eau chaude – 1 ^{er} jet (20L) ; CW-FD : eau froide – 1 ^{er} jet (20L) ; CW-5MF : eau froide – 5min de rinçage (100L).	55
Tableau 6-1 : Outil décisionnel lors de la détection de <i>E. coli</i> et <i>L. pneumophila</i> lors d'échantillonnage de grands volumes	69

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1: Évolution de l'étiologie des éclosions des maladies hydriques aux États-Unis selon les années (Benedict et al., 2017)	4
Figure 2-2 : Structure des couches qui composent une conduite en fer corrodée. Tiré de (Burlingame et al., 2006).....	17
Figure 2-3 : Estimation des dates d'apparition des cas de légionellose. A) durant la première éclosion (juin 2014 – mars 2015) ; B) durant la seconde éclosion (mai 2015 – décembre 2015). Tirée de (Michigan Department of Health and Human Services (MDDHS) and Genesee County Health Department, 2016).	20
Figure 2-4 : Paramètres physico chimiques comparés à l'incidence des cas de légionellose avant, pendant et après le changement de la source d'eau. A) les taux de chlorure et de phosphate dans les stations de traitement de Détroit et de Flint; B) les mesures de chlore libre à la sortie d'usine puis dans des points d'échantillonnage en fonction de l'âge de l'eau; C) cas de légionellose reportés dans le comté de Genesee. Tiré de (Rhoads et al., 2017a).....	21
Figure 2-5 : Effet de l'ajout de fer (clou en fer ayant une surface de contact de 1,8 cm ²) sur la concentration en chlore libre. A) Dans l'eau traitée de la rivière de Flint; B) dans l'eau traitée de lac Huron. Tiré de (Rhoads et al., 2017a).....	22
Figure 2-6 : Concentrations de chlore total en sortie de l'usine de traitement (ligne noire) et dans les points de suivi réglementaire (cercles gris) à Quincy, IL en fonction du temps. La chloramine a été utilisée durant la période en vert, et l'ajout de phosphate a été interrompu durant la période en violet. Le trait interrompu rouge signale le début de l'éclosion de légionellose et le trait jaune montre l'augmentation de la concentration de phosphate. Tiré de Rhoads et al. (2020).	24
Figure 4-1 : A) Robinet utilisé lors de l'échantillonnage des BF; B) Échantillon d'eau rouge.	32
Figure 4-2 : A) remplissage d'un bidon de 10 L au robinet ; B) bidons d'eau échantillonnée.	34

- Figure 4-3 : Dispositif de filtration et échantillons. A) schéma du système adapté de Heijnen et al. (2009); B) photo du système de filtration; C) 100 L d'eau échantillonnée dans des bidons de 20L et de 10L; D) Échantillon concentré; 1) Bidon de concentration ; 2) Pompe ; 3) Filtre Hemoflow ; 4) Baromètre ; 5) Conduite d'eau filtrée allant à l'égout ; 6) Conduite d'eau concentrée allant au bidon de concentration.35
- Figure 4-4 : Schémas descriptifs des protocoles de Legiolert.....39
- Figure 5-1 : Distribution des concentrations de BHA, CT et *Lp* en fonction de la concentration de chlore libre mesuré dans les échantillons positifs prélevés aux bornes fontaines (n=25).46
- Figure 5-2 : Distribution de la concentration de chlore libre dans les échantillons de BF (n=25). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*.47
- Figure 5-3 : Distribution de la température des échantillons de BF (n=28). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*.48
- Figure 5-4 : Distribution de la turbidité des échantillons de BF (n=28). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*.49
- Figure 5-5 : Distribution des valeurs de chlore résiduel (n=25), température (n=28) et turbidité (n=28) mesurées selon la positivité en *Lp* dans l'eau des bornes-fontaines. Les boîtes représentent les percentiles 10-90%, les carrés la médiane et les moustaches le min-max des valeurs non-aberrantes.....50
- Figure 5-6 : Concentration en métaux totaux, fer, aluminium, cuivre et manganèse, selon la positivité de *Lp* dans l'eau des bornes fontaines (n=26). Les boîtes représentent les percentiles 10-90%, les carrés la médiane et les moustaches le min-max des valeurs non-aberrantes....51
- Figure 5-7 : Exemple de deux échantillons d'eau concentrée. A) échantillon concentré du point Bat A2 CW-5MF E ; B) Échantillon concentré du point Bat E2 CW-5MF H.52

- Figure 5-8 : Concentrations de bactéries hétérotrophes aérobies (BHA) (n=63), coliformes totaux (n=8) et *L. pneumophila* (n=10) en fonction de la concentration de chlore libre. Les cercles bleus vides représentent les BHA détectables mais non quantifiables. Les mesures des BHA ont été faites sur les échantillons non-concentrés, et celles des CT et de *L. pneumophila* sur des échantillons concentrés.57
- Figure 5-9 : Distribution des bactéries totales et viables mesurées selon les concentrations en chlore libre (n=74). Mesures réalisées sur les échantillons d'eau non-concentrée.59
- Figure 5-11 : Distribution de la concentration de chlore libre des échantillons d'eau froide GV (1^{er} jet et 5min de rinçage) (n=64). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*. Mesures réalisées sur les échantillons non-concentrés.60
- Figure 5-12 : Courbe cumulative de la température des échantillons de GV (n=80). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*. Mesures réalisées sur les échantillons non-concentrés.61
- Figure 5-13 : Courbe cumulative de la turbidité des échantillons de GV (n=80). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*. Mesures réalisées sur les échantillons non-concentrés.62
- Figure 5-14 : Chlore libre (n=79), température (n=80) et turbidité (n=80) mesurés pour les échantillons de GV négatifs, positifs en culture au Legiolert et en q-PCR. Les boîtes représentent les percentiles 10-90%, les carrés la médiane et les moustaches le min-max des valeurs non-aberrantes. HW-FD : eau chaude – 1^{er} jet ; CW-FD : eau froide – 1^{er} jet ; CW-5MF : eau froide – 5min de rinçage ; H : hiver ; E : été. Mesures réalisées sur les échantillons non-concentrés.63
- Figure 5-15 : Concentration des métaux totaux, fer (n=54), aluminium (n=80), cuivre (n=80) et magnésium (n=80), des échantillons GV négatifs, positifs en culture par Legiolert ou q-PCR. Les boîtes représentent les percentiles 10-90%, les carrés la médiane et les moustaches le min-max. HW-FD : eau chaude – 1^{er} jet ; CW-FD : eau froide – 1^{er} jet ; CW-5MF : eau froide – 5min de rinçage. Mesures réalisées sur les échantillons non-concentrés.64

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN Acide désoxyribonucléique

ARNr Acide ribonucléique ribosomal

BCYE Buffered charcoal yeast extract

BF Borne fontaine

BHA Bactérie hétérotrophe aérobie et anaérobie

COD Carbone organique dissous

CT Coliformes totaux

CW-5MF Cold water – 5 min flush

CW-FD Cold water – first draw

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

EPA Environmental protection agency

EWGLI European working group for *Legionella* infections

FISH Fluorescence in situ hybridization

GV Grands volumes

HW-FD Hot water – first draw

ICP-MS Inductively coupled plasma mass spectrometry

Lp Legionella pneumophila

MES matières en suspension

MVES matières volatiles en suspension

MNT Mycobactéries non tuberculeuses

NPP Nombre plus probable

q-PCR Quantitative polymerase chain reaction

PCR Polymerase chain reaction

PMA Propidium monoazide

PP Polypropylène

RQEP Règlement sur la qualité de l'eau potable

SBT Sequence base typing

TAR Tour aéroréfrigérante

UFC Unité formatrice de colonie

UG Unité génomique

UTN Unité de turbidité néphélométrique

UV Ultra-violet

VBNC Viable but non cultivable

LISTE DES ANNEXES

Annexe A Résultats de l'échantillonnage des grands volumes.....	89
---	----

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le contrôle des risques microbiologiques est une des préoccupations majeures afin d'assurer une eau potable de qualité aux consommateurs. Le règlement sur la qualité de l'eau potable du Québec exige des prélèvements sur le réseau et des contrôles de présence de coliformes totaux et de la bactérie *Escherichia coli*. Il est donc nécessaire de faire le suivi de la qualité de l'eau potable de l'usine jusqu'au robinet et ce durant toute l'année. Cependant, bien que la bactérie *E. coli* soit utilisée comme indicateur de qualité microbiologique, d'autres bactéries pathogènes pourraient être présentes dans le réseau d'eau potable même en absence de détection de *E. coli*. L'une des bactéries pathogènes associées à l'eau est *Legionella pneumophila*. Les personnes vulnérables peuvent être infectées en inhalant ou en aspirant des microgouttelettes d'eau contenant la bactérie. *Legionella* peut causer la fièvre de Pontiac et dans les cas plus graves, la maladie du légionnaire (légionellose). *L. pneumophila* est la première cause des maladies hydriques aux États-Unis (National Academies of Sciences, 2019), et a causé de nombreuses éclosions dans le monde.

Étant donné que la température optimale de développement de *L. pneumophila* est entre 25°C et 42°C (Katz and Hammel, 1987), la bactérie est généralement étudiée dans les réseaux d'eau chaude des grands bâtiments ou les tours aéroréfrigérantes (Bollin et al., 1985; Dondero Jr et al., 1980; Wadowsky et al., 1982). Elle est toutefois aussi présente dans les réseaux d'eau froide, entre autres, les réseaux de distribution d'eau potable (Donohue et al., 2014a; Schwake et al., 2012). Entre 2014 et 2015, dans la ville de Flint aux États-Unis, un changement de source d'eau et l'absence de traitement anti-corrosion ont entraîné des conditions propices à la croissance de *Legionella* dans le réseau. L'augmentation des concentrations en métaux causée par la corrosion des conduites, principalement le fer, et les pertes de chlore libre ont permis aux souches présentes dans le réseau de proliférer dans le réseau de distribution et dans les bâtiments. Au total, 91 cas ont été confirmés dont 12 morts (Rhoads et al., 2017b; Schwake et al., 2016; Zahran et al., 2018). Après cette éclosion, l'importance des facteurs favorables à la survie et à la croissance de *L. pneumophila* dans les réseaux de distribution d'eau potable a été mise de l'avant, notamment lors d'événements d'eau rouge durant lesquels la hausse des concentrations en particules et en métaux a été observée. Ces derniers augmentent considérablement la vulnérabilité des réseaux de distribution à la prolifération de *L. pneumophila*, suite à la baisse de la concentration du désinfectant.

Ce mémoire présente les résultats de campagnes d'échantillonnage visant à déterminer les conditions favorisant la présence et la prolifération de *Legionella pneumophila* dans le réseau de distribution d'eau potable et aux extrémités du réseau, en présence d'eaux rouges. Le Chapitre 2 est une revue de littérature qui présente les facteurs qui ont été rapportés comme influençant la présence de *L. pneumophila*, une comparaison des différentes méthodes de détection puis une définition du phénomène des eaux rouges et enfin, une présentation de l'éclosion de Flint, MI. Le Chapitre 3 englobe les objectifs du projet et la démarche de travail suivie, puis le Chapitre 4 détaille le matériel nécessaire et les méthodes d'analyse utilisées pour réaliser ces objectifs. Les résultats obtenus sont présentés puis discutés dans le Chapitre 5. Finalement, le Chapitre 6 résume les conclusions tirées de l'ensemble du travail réalisé, puis les recommandations et les futurs projets qui peuvent en découler.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

La revue de littérature présente un survol des informations concernant *Legionella*, y compris les maladies qu'elle cause, les modes de transmission de la bactérie et les conditions qui encouragent sa prolifération. Ensuite, le terme eaux rouges est défini. Finalement, les principales causes identifiées lors de l'investigation d'éclosions de *Legionella pneumophila* dans deux réseaux d'eau potable sont présentées.

2.1 *Legionella pneumophila*

Legionella est une bactérie intracellulaire présente naturellement dans l'environnement (Fliermans et al., 1981). C'est une bactérie gram négative aérobique stricte. Le genre *Legionella* se compose de 56 espèces comprenant au moins 70 sérogroupes (Mercante and Winchell, 2015). Près de la moitié de ces espèces ont déjà été confirmées comme pathogène humain, mais toutes les espèces sont considérées comme potentiellement pathogènes (Mercante and Winchell, 2015; Muder and Yu, 2002). *Legionella* peut survivre à une température aussi basse que 0°C, et dépassant 70°C (Allegra et al., 2008; Fliermans et al., 1981). Elle se multiplie à des températures entre 25°C et 42°C, la température optimale étant de 37°C (Fliermans et al., 1981; Kusnetsov et al., 1996).

Legionella est la cause de la légionellose, une infection qui se présente sous deux formes : la fièvre de Pontiac ou la maladie du Légionnaire. La fièvre de Pontiac est la forme la moins sévère, qui s'apparente à un rhume. La maladie du légionnaire ressemble à une pneumonie et peut être mortelle, à un taux de mortalité pouvant atteindre 33% (National Academies of Sciences, 2019). De plus, il est impossible de la distinguer d'une pneumonie sans avoir recours à des méthodes de diagnostic microbiologiques ou moléculaires (Cunha, 2006). Il n'y a pas de signe clinique spécifique à la légionellose mais il est rapporté que presque la moitié des cas développent des complications neurologiques (Johnson et al., 1984). Près de 90% des cas de légionellose sont causés par *L. pneumophila* (Fields et al., 2002; Yu et al., 2002). De plus, jusqu'à 84% de ces cas sont dus au séro groupe 1 (Fields et al., 2002; Yu et al., 2002).

Étant donné que les symptômes associés à une infection par la légionelle ressemblent fortement à ceux causés par d'autres maladies, il est supposé que les cas de légionellose rapportés soient

inférieurs à la réalité, sous-estimés jusqu'à 10 fois (National Academies of Sciences, 2019; Prussin et al., 2017). Néanmoins, les cas de légionellose sont en hausse constante dans le monde et plus particulièrement aux États-Unis, où le nombre de cas a augmenté de 5,5 fois entre 2000 et 2017 et où *Legionella pneumophila* est la première cause de maladies hydriques (Figure 2-1) (Benedict et al., 2017; National Academies of Sciences, 2019). Le nombre de cas de légionellose augmente aussi dans les pays de l'union européenne, où on note une croissance de 30% du nombre de cas rapportés de 2016 à 2017 (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019).

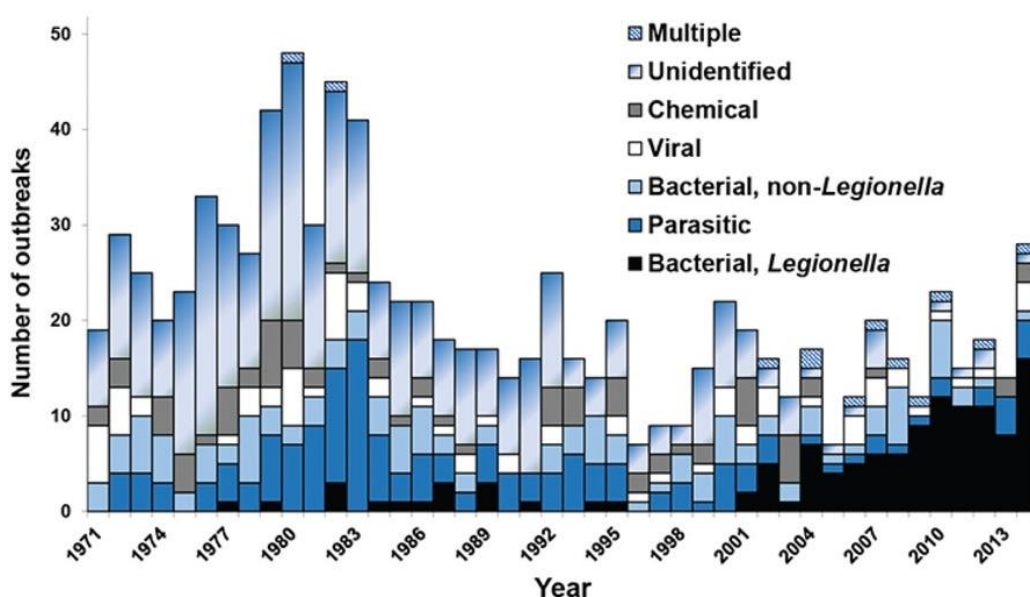


Figure 2-1: Évolution de l'étiologie des éclosions des maladies hydriques aux États-Unis selon les années (Benedict et al., 2017)

L'infection est causée à la suite de l'inhalation ou de l'aspiration de microgouttelettes d'eau contenant la bactérie. Les gouttelettes ayant un diamètre de 10 μm et moins sont les seules capables d'atteindre les voies respiratoires inférieures (Whiley et al., 2014). Il n'y a pas de consensus concernant la dose infectieuse minimale mais Hamilton et al. (2019) estiment que la dose infectieuse par inhalation pourrait être aussi basse que 10 UFC/L. Bencini et al. (2005), quant à eux, estiment que l'infection par aspiration pourrait être possible après l'inhalation de microgouttelettes d'eau contenant *L. pneumophila* à des concentrations inférieures à 5000 UFC/L.

Plusieurs facteurs influencent le risque d'infection d'une personne, notamment son âge. Les personnes ayant plus de 40 ans sont plus susceptibles d'être contaminées (Bartram et al., 2007). Il est aussi à noter que les hommes sont plus touchés par la légionellose que les femmes (Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2019). Le tabagisme, actif et passif, est un facteur qui augmente aussi considérablement le risque d'infection, suite à la perturbation de la fonction pulmonaire et du microbiote des voies respiratoires supérieures et inférieures (National Academies of Sciences, 2019). La présence de certaines maladies, telles que le diabète, les atteintes cardiovasculaires et rénales chroniques ou une baisse de l'immunité accroissent le risque de légionellose. Dans un milieu hospitalier, les personnes suivant un traitement immunosuppresseur à la suite d'une transplantation d'organe, atteintes d'un cancer, ou ayant subi une intervention chirurgicale présentent aussi un risque de maladie accru. Dans ce contexte, le risque de contamination augmente dès l'âge de 25 ans (Bartram et al., 2007; National Academies of Sciences, 2019). Il est donc important de diminuer le risque d'exposition des personnes vulnérables en minimisant la présence de *Legionella* dans les réseaux de distribution d'eau potable.

2.1.1 Conditions favorables à la prolifération de *L. pneumophila*

2.1.1.1 Biofilm et protozoaires

Le biofilm est d'une importance majeure dans la survie des microorganismes et est toujours présent dans les réseaux d'eau. Il est défini comme un ensemble complexe de microorganismes reliés entre eux et à une surface, au moyen d'une matrice de polymères extracellulaires (Lappin-Scott and Costerton, 1989). Le biofilm protège les bactéries de la désinfection et représente un réservoir important et très difficile à éradiquer (Abdel-Nour et al., 2013). Dans les réseaux de distribution d'eau potable, il a été estimé que 95% de la biomasse bactérienne est retrouvée dans les biofilms (Flemming et al., 2011). Les biofilms se forment dans les premières semaines et atteignent la maturité en moins d'un an (Boe-Hansen et al., 2002). Leur composition est évolutive lors de leur formation et dépend des conditions hydrauliques, de la température de l'eau, des nutriments disponibles, du désinfectant résiduel, du matériel sur lequel ils sont fixés et du broutage protozoaire (Flemming et al., 2011). Il est estimé que le nombre de cellules formant le biofilm est de l'ordre de 10^4 à 10^8 cellules/cm² et que le compte des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies (BHA)

cultivables atteint 10^6 UFC/cm². Ainsi, la proportion de bactéries cultivables est faible et se situe généralement entre 0.001% et quelques pourcent du nombre de cellules totales formant le biofilm (Wingender and Flemming, 2011). Le biofilm peut être une source de contamination de l'eau par le biais de relargage ou de détachement des bactéries vers l'eau.

La présence de protozoaires dans le biofilm offre à *L. pneumophila* l'opportunité de se multiplier plus rapidement à travers une croissance intracellulaire (Declerck, 2010). La croissance de *Legionella* est optimale à l'intérieur de certains protozoaires, notamment des amibes, des cillés, des nématodes ou des flagellés. Les hôtes les plus connus de *Legionella* sont *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Vermamoeba* (National Academies of Sciences, 2019).

La bactérie *Legionella* résiste à la phagocytose et lorsqu'elle est internalisée par les protozoaires, elle se retrouve protégée des agressions externes et des conditions environnementales hostiles, notamment les désinfectants (Barker et al., 1992; Bouyer et al., 2007). De plus, lorsque *L. pneumophila* est sous sa forme viable mais non cultivable (VBNC), elle peut être resuscitée en présence d'amibes (Steinert et al., 1997). Par conséquent, les bactéries VBNC majoritairement présentes dans les biofilms peuvent retrouver leur cultivabilité en présence de protozoaires et représenter un risque sanitaire important. Par exemple, *Legionella* est incapable de croître et entre dans un état VBNC lorsqu'elle se trouve dans une eau stérile, suite à l'absence de nutriments, mais elle regagne son état cultivable dès l'introduction d'amibes (Steinert et al., 1997). À la suite de leur passage à l'intérieur des amibes, les bactéries *Legionella* sont plus résistantes aux facteurs de stress et plus virulentes, en particulier en association avec *Acanthamoeba* (National Academies of Sciences, 2019).

Les amibes ont déjà été détectées dans les réseaux d'eau potable (Berk et al., 2006; Cateau et al., 2014; Ovrutsky et al., 2013; Thomas and Ashbolt, 2011). Barbeau and Buhler (2001) ont établi la présence d'amibes dans le réseau d'eau potable de Montréal à une concentration qui a atteint 5.3 cellules/mL en sortie de robinet, et des concentrations 300 fois plus élevées dans l'eau des unités dentaires qui y sont connectées. Les amibes les plus retrouvées étaient *Vanella*, *Vahlkampfia* et *Vermamoeba*, néanmoins *Acanthamoeba* et *Naegleria* ont été détectée dans 40% des échantillons (Barbeau and Buhler, 2001). En parallèle, des amibes ont été isolées des sources d'eau investiguées

suite à des éclosions ou des épidémies de légionellose (Barbaree et al., 1986; Lau and Ashbolt, 2009; Marciano-Cabral et al., 2010).

En plus d'augmenter les concentrations de *Legionella* dans l'environnement, les amibes infectées par *Legionella* présentent un risque de contamination par l'inhalation de vésicules remplies de *Legionella*. Ces vésicules contiennent des concentrations très élevées de bactéries et relargueraient ces grandes quantités de légionelles directement dans les macrophages alvéolaires (Berk et al., 1998; Shaheen and Ashbolt, 2017).

2.1.1.2 *Legionella* et fer

Le fer est un élément essentiel à la croissance de *Legionella*. Dans une étude comparative portant sur l'effet des métaux sur le développement de *Legionella*, l'ajout de suppléments de fer a mené à une stimulation de la croissance de la bactérie même en présence d'inhibiteurs (Reeves et al., 1981). L'étude de van der Lugt et al. (2017) montre quant à elle que la présence de rouille de fonte favorise considérablement la croissance de *Legionella*. En effet, la concentration maximale en *Legionella* mesurée dans l'eau prélevée d'un robinet en acier inoxydable, alimenté par une eau ayant une concentration moyenne de fer de 0,02 mg/L, était de 7 600 UFC/L. Lorsque de la rouille provenant de fonte corrodée était ajoutée à l'eau, pour une concentration moyenne en fer de 0,12 mg/L, les concentrations en légionelles mesurées dans l'eau augmentaient à 24 200 UFC/L (van der Lugt et al., 2017).

La présence de fer influence aussi la virulence de la bactérie. En effet, James et al. (1995) ont observé une baisse significative de la virulence de *Legionella* lorsqu'elle était cultivée dans un environnement où le fer était limité. Inversement, la bactérie retrouvait sa virulence dès que la concentration en fer augmentait (James et al., 1995).

2.1.2 Sources d'exposition

Étant donné que la bactérie se transmet par l'inhalation d'aérosols, la proximité de toute source potentielle d'eau contaminée pouvant être aérosolisée est un facteur de risque, en particulier pour les populations à risque. La présence de *L. pneumophila* a été documentée dans les hôpitaux, les tours de refroidissement, les douches et chauffe-eaux, les spa et jacuzzis et les hôtels. La détection de *Legionella* dans les réseaux d'eau froide est aussi documentée (tableau 2-1). L'étude de la

bactérie reste néanmoins plus fréquente dans les réseaux d'eau chaude et les tours de refroidissement. La revue de Orkis et al. (2018) englobe d'autres sources de contamination moins conventionnelles y compris : le liquide lave-glace des voitures, le terreau, l'air climatisé des voitures et les humidificateurs (tableau 2-1).

Tableau 2-1 : Sources d'exposition à *Legionella*

	Description des échantillons	<i>Legionella/L. pneumophila</i> - Positivité	Concentration	Méthode de détection	Références
Tours aéro-réfrigérantes (TAR)	130 échantillons de 96 TAR	<i>Legionella</i> - 48.9%	10 éch. > 10 ⁵ UFC/L	Culture	(Mouchtouri et al., 2010)
	289 échantillons de 183 TAR	<i>Legionella</i> - 88.5%	-	q-PCR	(Lapierre et al., 2017)
	196 échantillons de différentes TAR aux États-Unis	<i>Legionella</i> - 84%	-	q-PCR	(Llewellyn et al., 2017)
	Échantillons de TAR de 12 villes canadiennes	<i>Legionella</i> - 28.9%	Concentration moyenne de 3.3×10 ⁴ UFC/L	Culture sur BCYE agar	(Tobin et al., 1986)
	Revue de 19 éclosions de légionellose dues aux TAR	<i>Legionella</i>	De 10 ³ à 10 ¹⁰ UFC/L	Culture et PCR	(Walser et al., 2014)
Hôpitaux	676 échantillons de 20 hôpitaux	<i>L. pneumophila</i> - 70%	-	Culture	(Stout et al., 2007)
	432 échantillons prélevés des réservoirs et des points distaux d'un hôpital	<i>L. pneumophila</i> - 58.3%	Supérieures à 10 ⁴ CFU/L	Culture	(Marchesi et al., 2011)
	34 échantillons d'eau chaude	<i>L. pneumophila</i> - 79%	Maximum de 8×10 ⁴ UFC/L	Culture	(Bédard et al., 2016)
	840 échantillons d'eau chaude prélevés dans un hôpital	<i>Legionella</i> - 38.5%	2×10 ² à 4×10 ⁴ UFC/L	Culture	(Napoli et al., 2009)
	Des échantillons de biofilm de robinet de 16 hôpitaux	<i>L. pneumophila</i> - 63%	-	Culture	(Yu et al., 2008)
Bâtiments	Des échantillons d'eau et de biofilm de douches de 15 salles de sport	<i>Legionella</i> - 26.5%	Moyenne de 4×10 ² UFC/L dans l'eau Moyenne de 4×10 ⁴ UFC/L dans le biofilm	Culture	(Bonadonna et al., 2009)
	146 échantillons d'eau chaude (douche ou robinet) de résidences privées	<i>Legionella</i> - 22.66%	Moyenne de 1.17×10 ³ UFC/L	Culture	(Borella et al., 2004)
	119 échantillons d'eau chaude (robinets ou douches) d'hôtels	<i>Legionella</i> - 60.5%	7×10 ² à 4.5×10 ³ UFC/L	Culture	(Borella et al., 2005)
	2822 échantillons d'eau chaude et de biofilm (douche et robinet) de bâtiments divers	<i>Legionella</i> - 13%	5 à 2×10 ⁴ UFC/L	Culture	(Flannery et al., 2006)
	99 échantillons d'eau et biofilm de douche de résidences privées	<i>Legionella</i> - 8.1% (culture) et 38.4% (q-PCR)	40 à 1.3×10 ⁴ UFC/L Et jusqu'à 1.2×10 ⁶ UG/L	Culture et q-PCR	(Collins et al., 2016)
	400 échantillons d'eau chaude résidentielle	<i>Legionella</i> - 12%	Moyenne de 3.9×10 ³ UFC/L	Culture	(Mathys et al., 2008)
Eaux de récréation	72 échantillons d'eau venant de jacuzzis, spas et piscines	<i>Legionella</i> - 27.8% dont 23.6% par culture et 16.7% par PCR	-	Culture et PCR	(Huang et al., 2010)
	Revue de 42 événements de légionellose dus aux eaux de récréation (spas ou jacuzzis)	<i>Legionella</i> -76.2%	-	-	(Leoni et al., 2018)

Tableau 2-1 : Sources d'exposition à *Legionella* (suite)

	Description des échantillons	<i>Legionella/L. pneumophila</i> - Positivité	Concentration	Méthode de détection	Références
Eaux de récréation	Échantillons d'eau de jacuzzi et de biofilm	Détection de <i>Legionella</i> avant interventions de désinfection	8×10^2 à 2.9×10^4 UFC/L	Culture	(Kura et al., 2006)
Eau potable	269 échantillons d'eau froide (robinets de cuisine, salle-de-bain, fontaine d'eau potable)	<i>L. pneumophila</i> - 28.6%	40 à 3.65×10^3 cellules équivalentes/L	q-PCR	(Donohue et al., 2014b)
	108 échantillons d'eau froide prélevés au robinet	<i>L. pneumophila</i> - 38%	Médiane de 472 cellules équivalentes /L	q-PCR	(Donohue et al., 2019a)
	179 échantillons d'eau froide prélevés au robinet	<i>L. pneumophila</i> - 25.7%	Médiane de 341 cellules équivalentes /L	q-PCR	(Donohue et al., 2019b)
	193 échantillons d'eau potable à la sortie de 8 stations de traitement	<i>L. pneumophila</i> - 5 stations (q-PCR)	Maximum de 5.2×10^4 UG/L	Culture et q-PCR	(van der Wielen and van der Kooij, 2012)
	316 échantillons d'eau froide	<i>Legionella</i> - 39%	20% des échantillons positifs ont une concentration entre 10^3 et 10^4 UFC/L	Culture	(Arvand et al., 2011)
	573 échantillons d'eau froide	<i>Legionella</i> - 2.4%	0.9 à 148 MPN/L	Culture	(LeChevallier, 2019)
Machines à glace	Échantillons d'eau et de biofilm le long du réseau de distribution d'eau potable	<i>Legionella</i> - eau et biofilm (q-PCR)	Maximum de 5.7×10^3 cellules/L	Culture et q-PCR	(Wullings et al., 2011)
	Échantillons d'eau du robinet et d'une machine à glace, de glace de la machine à glace et de biofilm de toutes les sources échantillonnées	<i>Legionella</i> - machine à glace (eau, glace et biofilm)	1 à 250 UFC par glaçon	Culture	(Bencini et al., 2005)
Sources multiples	Échantillons d'eau et de glace d'une machine à glace et des robinets avoisinants	<i>Legionella</i> - machine à glace (eau et glace)	4.3×10^2 à 1.5×10^3 UFC/L	Culture	(Graman et al., 1997)
	556 échantillons d'eau prélevés dans les douches, piscines, fontaines, jacuzzis, réservoirs d'eau chaude et froide et TAR de 51 hôtels	<i>Legionella</i> - 28% des échantillons et 75% des hôtels	-	Culture	(Kyritsi et al., 2018)

2.1.3 Méthodes de détection de *Legionella*

La bactérie peut être détectée par la méthode de culture, qui permet le dénombrement des bactéries cultivables et pour laquelle une période d'incubation de 7 jours est requise avant d'obtenir le résultat. Des méthodes moléculaires peuvent aussi être utilisées, donnant des réponses plus rapides (1 à 2 jours). Ces méthodes détectent le matériel génétique présent dans l'échantillon analysé issu des bactéries viables ou mortes. Le tableau 2-2 présente les avantages et inconvénients de certaines méthodes de détection les plus fréquemment utilisées.

Culture

Legionella nécessite un milieu de culture riche en fer et en l-cystéine pour une croissance optimale. Elle est donc généralement cultivée sur milieu BCYE (buffered yeast charcoal extract). L'ajout de suppléments favorise la multiplication de *Legionella* et l'ajout d'antibiotiques inhibe la croissance des autres bactéries présentes dans l'échantillon (Maiwald et al., 1998). L'apparition de colonies est visible après 2 à 5 jours d'incubation à une température entre 35°C et 37°C sur milieu BCYE (Maiwald et al., 1998), mais une incubation allant jusqu'à 14 jours peut être nécessaire pour les souches environnementales (Dutil et al., 2006).

Tableau 2-2 : Avantages et inconvénients des méthodes de détection de *Legionella* (adapté de National Academies of Sciences (2019))

Méthode	Avantages	Inconvénients	Forme de bactérie détectée
ISO CDC AHPA	Méthodes standards	Ne détectent pas les bactéries en VBNC; Nécessitent des analyses plus poussées pour déterminer les sérogroupes 10 à 14 jours pour incubation et confirmation	Cultivables
Legiolert	Simple Spécifique à <i>L. pneumophila</i>	Temps d'incubation de 7 jours	Cultivables
Coculture avec les amibes	Permet de cultiver des souches difficilement cultivables y compris les bactéries VBNC	Augmente la durée d'incubation Non quantitatif	Cultivables et VBNC
Cytométrie en flux	Simple et spécifiques si couplées à des anticorps	Validation limitée, expérimental	Viables et mortes
PCR	Permet de séquencer les isolats	Nécessite d'analyser les produits sur gels	Viables et mortes si présence de matériel génétique résiduel
q-PCR	Rapide; permet de détecter les bactéries en VBNC; permet d'avoir une plus grande spécificité	Détecte aussi les bactéries mortes Difficile d'isoler les souches	Viables et mortes si présence de matériel génétique résiduel
Séquençage de nouvelle génération	Fournit des informations concernant toute la flore bactérienne	Couteux Demande une expertise poussée et de l'équipement spécifique Pourrait ne pas détecter <i>Legionella</i> si elles sont présentes en faible proportion par rapport aux autres bactéries	Viables et mortes si présence de matériel génétique résiduel

La méthode de détection Legiolert est une variante enzymatique de la culture de *L. pneumophila*. Elle offre une alternative simple d'utilisation qui permet d'avoir un résultat après 7 jours d'incubation, sans confirmation requise. C'est une méthode de détection enzymatique permettant de quantifier *L. pneumophila* cultivable dans un échantillon d'eau estimé à partir du principe du nombre le plus probable. La comparaison de cette nouvelle méthode à des méthodes standards de quantification montre que le Legiolert permet une énumération fiable et spécifique de *L. pneumophila* (Rech et al., 2018; Spies et al., 2018). Le rapport de National Academies of Sciences

(2019) résume 4 études comparatives du Legiolert aux méthodes de culture certifiées. Sur un nombre total de 1 229 d'échantillons d'eau potable et de 1 134 d'eau non-potable, le Legiolert présente 3,3% de faux-positifs, une spécificité statistiquement similaire à celle de la méthode de culture et des comptes bactériens plus élevés que ceux dénombrés en culture.

L'un des avantages des méthodes de culture, y compris de la variante enzymatique, est la possibilité d'isoler les souches et de les conserver pour en faire le typage lors d'une situation d'éclosion. Les résultats obtenus par Legiolert peuvent aussi être comparés aux résultats obtenus par la méthode de culture traditionnelle, ce qui permet de mieux interpréter les résultats de différentes études se référant à des méthodes de détection similaires (National Academies of Sciences, 2019). Les méthodes de culture ne permettent pas de détecter les bactéries viables mais non cultivables. Il faut avoir recours à des méthodes de détection basées sur la mesure de marqueurs fluorescents ou des méthodes de détection moléculaires.

La coculture avec les amibes peut aussi être utilisée pour revivifier les *L. pneumophila* à l'état VBNC. La capacité de croissance de *Legionella* dans les amibes a été présentée dans la section 2.1.1.1. L'ajout d'amibes aux échantillons d'eau à analyser permet d'offrir aux bactéries un hôte qu'elles peuvent coloniser et à l'intérieur duquel elles peuvent se multiplier. Cette méthode permet de détecter la présence des bactéries tout en facilitant leur isolation sur gélose par la suite. Néanmoins, ce n'est pas une méthode standardisée, qui nécessite plus de manipulations et de temps d'incubation, et qui ne permet pas de quantifier les bactéries qui étaient présentes au départ dans l'échantillon analysé (National Academies of Sciences, 2019).

Méthodes basées sur la mesure de fluorescence

L'observation d'une fluorescence liée aux bactéries permet leur détection dans un échantillon. La fluorescence peut être spécifique à *Legionella* en la liant à des séquences du matériel génétique ou à des antigènes.

La méthode FISH (fluorescent in situ hybridization) permet d'hybrider une sonde couplée à un fluorochrome et spécifique à une séquence d'ARNr de *Legionella*. Les bactéries traitées sont par la suite comptées au microscope. La quantification par FISH ne permet pas de différencier entre les bactéries viables et mortes, vu que le matériel génétique peut rester intact même après la mort des bactéries et peut ainsi s'hybrider aux sondes. Dutil et al. (2006) proposent une incubation des

échantillons dans une solution de R2A avant l'analyse FISH afin de garantir un meilleur recouvrement des bactéries viables.

La méthode ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) se base sur la liaison de la bactérie à une enzyme et à un antigène spécifique. Les bactéries sont liées à des enzymes qui, après l'attachement avec l'antigène spécifique, causent l'apparition de la couleur. L'intensité de la couleur permet de quantifier les bactéries présentes. C'est une méthode rapide et spécifique. La quantification dépend cependant d'une observation visuelle de la couleur qui peut différer d'un opérateur à un autre. Elle est donc subjective.

La cytométrie en flux permet de quantifier et de caractériser les particules présentes dans un échantillon. Les particules passent devant un faisceau laser et sont séparées en fonction de leurs caractéristiques. La cytométrie permet aussi de détecter les bactéries viables des bactéries mortes en ajoutant des colorants qui pénètrent les cellules mortes et qui émettent une fluorescence captée par le cytomètre (Allegra et al., 2008). Il n'est cependant pas possible de détecter la présence de *Legionella* spécifiquement sans avoir recours à d'autres méthodes de détection en parallèle.

Méthodes moléculaires

Les méthodes de détection moléculaire comme la réaction de polymérase en chaîne quantitative (q-PCR) sont maintenant largement utilisées pour détecter la présence de la légionelle plus rapidement qu'en culture (Touron-Bodilis et al., 2011; Whiley and Taylor, 2014). La détection de *L. pneumophila* se fait en ciblant le gène *mip* qui code une protéine de surface spécifique à l'espèce *pneumophila*. Néanmoins, la limitation principale est que ces méthodes détectent aussi les bactéries mortes ayant conservé leur matériel génétique ciblé intact. Pour ne quantifier que les bactéries viables en q-PCR, il est possible d'ajouter le monoazide de propidium (PMA) qui ne pénètre que les cellules mortes et prévient l'amplification de l'ADN en s'intercalant dans l'ADN (Ditommaso et al., 2015; Kontchou and Nocker, 2019; Yáñez et al., 2011). C'est une méthode prometteuse mais qui nécessite encore des mises au point pour optimiser les doses de PMA nécessaires pour un marquage efficace des bactéries mortes, en particulier en présence d'échantillons de biofilms ou d'échantillons contenant de possibles sources d'inhibitions (Scaturro et al., 2016; Taylor et al., 2014).

En plus de l'utilisation du q-PCR pour la quantification des légionelles dans un échantillon, le PCR peut être utilisé pour typer les souches de bactéries isolées en utilisant des amorces spécifiques. La méthode développée par le European working group for *Legionella* infections (EWGLI) nommée sequence-based typing (SBT) est considérée comme une référence pour le typage de *L. pneumophila* (Gaia et al., 2005).

Les méthodes de séquençage de nouvelle génération peuvent être appliquées sur des produits amplifiés par PCR ou directement sur l'ADN extrait. Elles permettent d'avoir plus d'informations sur les bactéries présentes dans l'échantillon et de les identifier en fonction des amplicons séquencés, en ciblant les gènes ou la diversité de la flore microbienne composant l'échantillon. Ce sont des méthodes de moins en moins coûteuses et qui offrent une grande richesse d'information, cependant la résolution obtenue est souvent limitée au genre, en particulier pour les bactéries ayant une faible présence relative dans l'échantillon.

Concentration des échantillons

La détection de bactéries par culture ou par méthode moléculaire reste limitée au seuil de détection de chaque méthode. Pour améliorer la limite de détection de ces méthodes, il est possible d'avoir recours à des techniques de concentration des échantillons plus poussées, comme la concentration de grands volumes d'eau en utilisant des cartouches à membranes en polysulfone destinées à l'hémodialyse. L'écoulement tangentiel de l'eau à travers les fibres creuses des filtres permet une séparation des particules de l'eau. La méthode développée par Heijnen and Magic-Knezev (2010) utilise les filtres Hemoflow HF 80S. Heijnen and Magic-Knezev (2010) ont étudié les taux de récupération des bactéries en fonction du volume et du type d'eau concentrée, de la vitesse de la pompe et de l'utilisation de solutions et détergents de rinçage du système. Il est possible d'atteindre des moyennes de taux de récupération de *E. coli* de 115% et de 98% après la concentration de moins de 100L et de moins de 1000L d'eau potable, respectivement. Le taux moyen de récupération baisse à 74% dès que le volume concentré dépasse 1000L d'eau potable. Aussi, la vitesse optimale de la pompe a été déterminée à 5 L/min (Heijnen and Magic-Knezev, 2010). Finalement, l'utilisation de solutions de lavage n'augmentent pas l'efficacité de récupération des bactéries (Heijnen and Magic-Knezev, 2010).

2.2 Les eaux rouges

Le phénomène d'eaux rouges est dû à la corrosion des conduites d'eau et au relargage du fer qui donne à l'eau une couleur brune rougeâtre. Ce changement dans la qualité de l'eau est causé par des phénomènes physico-chimiques et microbiologiques.

Les conduites en fer qui sont corrodées sont composées de 3 couches distinctes (Figure 2-2). La couche interne se compose de fer ferreux et contient généralement des bactéries réductrices de sulfate qui causent la production de sulfate de fer et contribuent au processus de corrosion. Le fer ferreux se forme lors de la réaction entre la couche externe et les oxydants présents dans l'eau. Les oxydants à base de chlore produisent des ions chlorures qui pénètrent à l'intérieur des couches, jusqu'à atteindre la conduite et la corrodent en augmentant la vitesse de corrosion. La seconde couche, située entre la couche externe et la couche interne, est plus dense et plus dure. Plus cette couche intermédiaire est épaisse et solide moins la corrosion de la conduite est possible. Elle est composée d'un mélange de fer ferrique et de magnétite. La présence d'oxydants est nécessaire pour former le fer ferrique, en particulier en combinaison avec la magnétite. En l'absence d'oxydants, les réactions redox convertissent le fer ferrique en fer ferreux ce qui rend cette couche plus poreuse et relargue le fer ferreux dans l'eau. La troisième couche est en contact avec l'eau. Elle est plus friable et se détache facilement suite à des changements hydrauliques brusques (Burlingame et al., 2006).

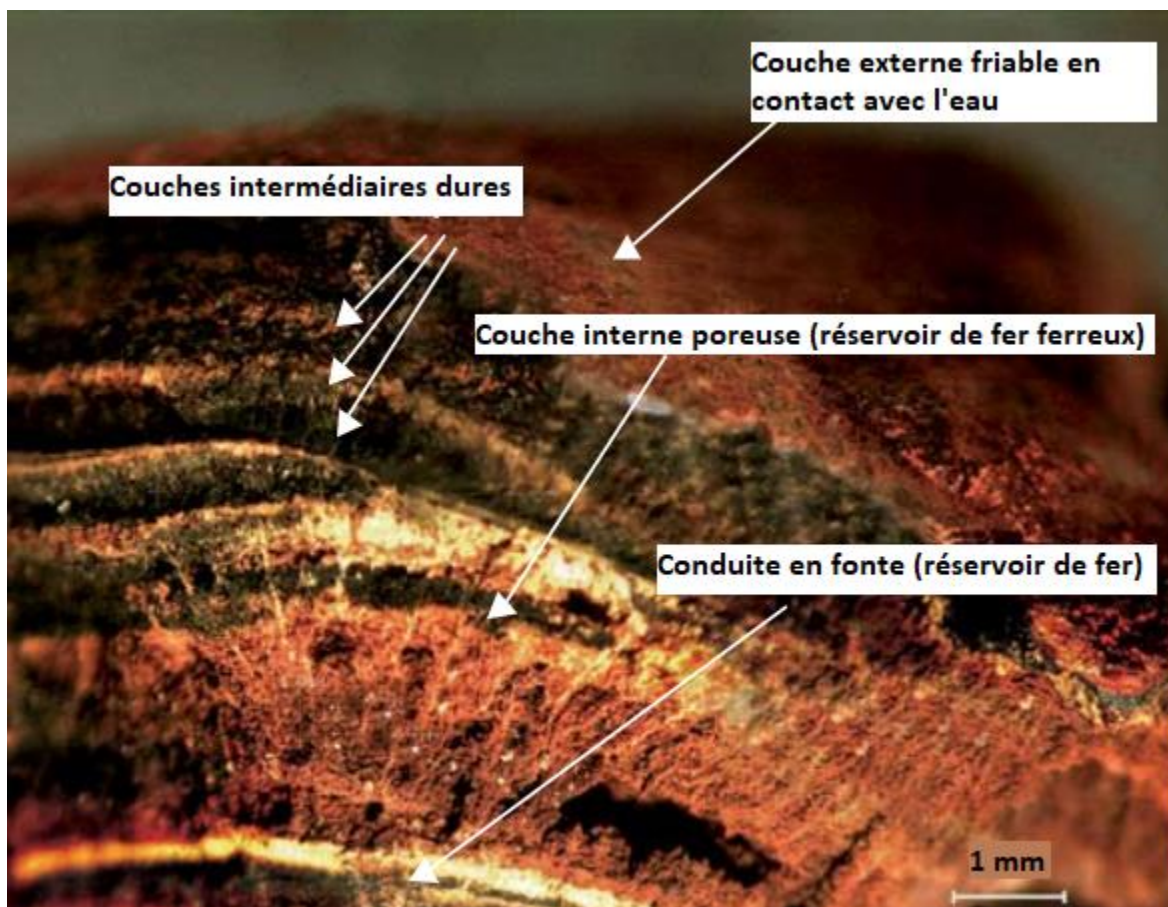


Figure 2-2 : Structure des couches qui composent une conduite en fer corrodée. Tiré de (Burlingame et al., 2006).

Pour faire face aux problèmes de corrosion, il est possible d'ajouter des inhibiteurs chimiques de corrosion à la station de traitement d'eau potable. Les orthophosphates et les polyphosphates permettent de réduire les incidences d'eaux rouges alors que les silicates, ajoutés sous la forme silicate de sodium, aident à contrôler les concentrations en fer et en manganèse (American Water Works Association (AWWA), 2011). Toutefois, l'impact de l'ajout de phosphates sur la croissance de pathogènes dans le biofilm est mal caractérisé (Prévost et al., 2014).

Une autre solution envisageable vise à augmenter l'alcalinité totale et le pH de l'eau en ajoutant de la chaux ou du bicarbonate de calcium. Les eaux caractérisées par une alcalinité élevée ont tendance à précipiter une couche de calcite à la surface des conduites, ce qui limite le contact entre les oxydants et le fer et ainsi la corrosion. Imran et al. (2005) propose une concentration minimale de 80 mg/l de CaCO_3 pour limiter la corrosion des conduites et la coloration de l'eau.

Il est aussi possible de réaliser des rinçages des conduites par le biais des bornes fontaines dans le but d'évacuer l'eau rouge des conduites. Trois types de rinçages sont possibles : le rinçage conventionnel, la purge continue et le rinçage unidirectionnel. Le rinçage conventionnel consiste en l'ouverture des conduites d'eau d'une section du réseau sans nécessairement limiter de façon plus précise la zone de rinçage, par conséquent il est possible que le rinçage n'affecte pas les conduites visées. La purge continue vise à rétablir la concentration en désinfectant résiduel dans les extrémités du réseau. En maintenant un écoulement continu à faible débit, à une vitesse inférieure à 0,3 m/s, l'eau contenue dans les conduites est renouvelée. Cette méthode permet d'obtenir des résultats immédiats mais n'est pas une solution permanente et cause la perte de grandes quantités d'eau. Le rinçage unidirectionnel est une méthode contrôlée qui permet d'évacuer l'eau d'une section de conduite précise à une vitesse d'écoulement suffisamment élevée pour déloger les débris (Antoun et al., 1999), mais pas trop élevées pour ne pas déstabiliser les dépôts de corrosion.

Le Ministère du Développement durable (2017) recommande les pratiques de rinçage unidirectionnel suivantes :

- La mise en place d'un programme annuel de rinçage des conduites dont le diamètre est inférieur à 350 mm ;
- La réalisation de rinçages plus fréquents pour les parties du réseau connaissant plus de problèmes de corrosion ou de détérioration de la qualité de l'eau ;
- Le maintien d'une vitesse de rinçage d'au moins 0,8 m/s, ou idéalement, de 1,5 m/s;
- Le maintien d'une pression d'au moins 140 kPa en tout point du réseau durant les interventions de rinçage.

Il faut toutefois éviter d'atteindre des vitesses de rinçage plus élevées que 1,6 m/s afin de ne pas causer la déstabilisation des dépôts de corrosion, et le relargage du fer, des particules et du biofilm après l'intervention de rinçage (Ministère du Développement durable, 2017).

2.2.1 Flint, MI : eau rouge et *L. pneumophila*

La municipalité de Flint, MI aux États-Unis a traité l'eau de la rivière Flint pour s'alimenter en eau potable jusqu'en 1967. À ce moment, la municipalité a changé sa source d'eau et a commencé à acheter l'eau potable traitée du lac Huron, directement du département de l'eau et des égouts de Détroit. En 2013, dans le but d'économiser au niveau des coûts de l'eau potable, la ville de Flint a décidé de changer à nouveau de source d'eau et de potabiliser l'eau de la rivière de Flint dans sa propre usine. Peu de temps après ce changement, la municipalité a commencé à recevoir des plaintes d'eau colorée de la part des citoyens. Durant l'été 2014, les échantillonnages réglementaires ont décelé des concentrations élevées en coliformes totaux et en *E. coli* ; 3 avis d'ébullition ont été émis durant une période de 22 jours (Masten et al., 2016). En 2015, les doses de plomb dans l'eau ont augmenté considérablement et dépassaient la concentration de 15 µg/L. Hanna-Attisha et al. (2016) ont documenté une hausse du nombre d'enfants ayant des doses de plomb élevées dans le sang, atteignant jusqu'à 10.6% de la population dans certaines zones. En parallèle, les concentrations de fer mesurées allaient de 0,7 à 6,5 mg/L et avaient une concentration moyenne de 2,7 mg/L (Pieper et al., 2017). La municipalité de Flint a décidé de revenir à la source d'eau préalable en octobre 2015 (Masten et al., 2016).

Le changement d'eau de Flint a aussi été lié à deux éclosions de légionellose qui ont causé la mort de 12 personnes. La première éclosion a eu lieu à partir de juin 2014, pour laquelle 45 cas ont été rapportés (Figure 2-3.A) dont 5 morts, pour un pourcentage de décès de 11,1% (State of Michigan, 2016). La seconde éclosion a eu lieu à partir de mai 2015, où 46 cas ont été rapportés (Figure 2-3.B) dont 7 morts, pour un pourcentage de décès de 15.2% (State of Michigan, 2016). L'âge moyen des patients atteints de légionellose était de 65 ans et seulement 4.1% des patients ne souffraient pas de maladies préalables ou ne fumaient pas (Michigan Department of Health and Human Services (MDDHS) and Genesee County Health Department, 2016; State of Michigan, 2016).

Binney et al. (2019) supposent que les décès liés aux deux éclosions de légionellose sont largement sous-estimés. En se basant sur les données épidémiologiques des années précédentes du comté de Genesee, puis en utilisant deux modèles statistiques, il est estimé que les décès devraient en réalité s'élever à 70 par rapport aux 12 officiellement enregistrés.

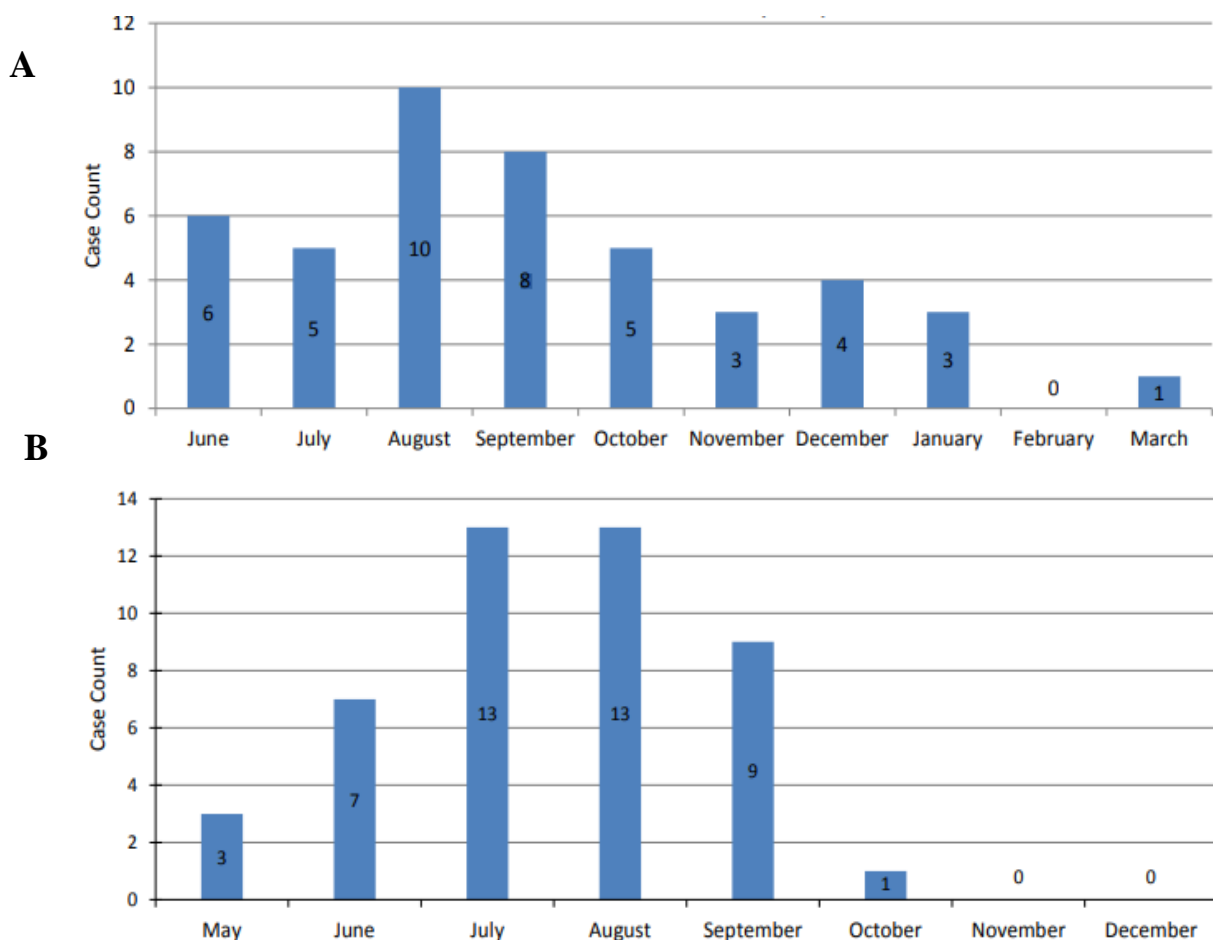


Figure 2-3 : Estimation des dates d'apparition des cas de légionellose. A) durant la première éclosion (juin 2014 – mars 2015) ; B) durant la seconde éclosion (mai 2015 – décembre 2015). Tirée de (Michigan Department of Health and Human Services (MDDHS) and Genesee County Health Department, 2016).

2.2.1.1 Les causes des éclosions

L'eau traitée de la rivière de Flint était particulièrement corrosive. Elle se caractérisait par un ratio de Larson de 2.3 comparativement à l'eau traitée de lac Huron qui avait un ratio de 0.5 (Rhoads et al., 2017a). Cette valeur plus élevée signifie que la corrosion du fer est plus facile et plus probable, ce qui a été remarqué dès les premiers mois du changement de la source d'eau à la rivière de Flint. En effet, suite au changement de source d'eau, General Motors a noté que l'eau corrodait certaines de leurs pièces automobiles et a arrêté d'utiliser l'eau de la ville de Flint (Masten et al., 2016). Malgré tout, aucun traitement contre la corrosion n'a été ajouté à l'eau traitée. La Figure 2-4.A

montre clairement l'absence de phosphates pendant la crise, alors que la source d'eau était l'eau de la rivière Flint. L'eau a entraîné une corrosion accélérée des conduites d'eau, ce qui a mené au relargage de concentrations élevées de fer et de plomb dans le réseau d'eau.

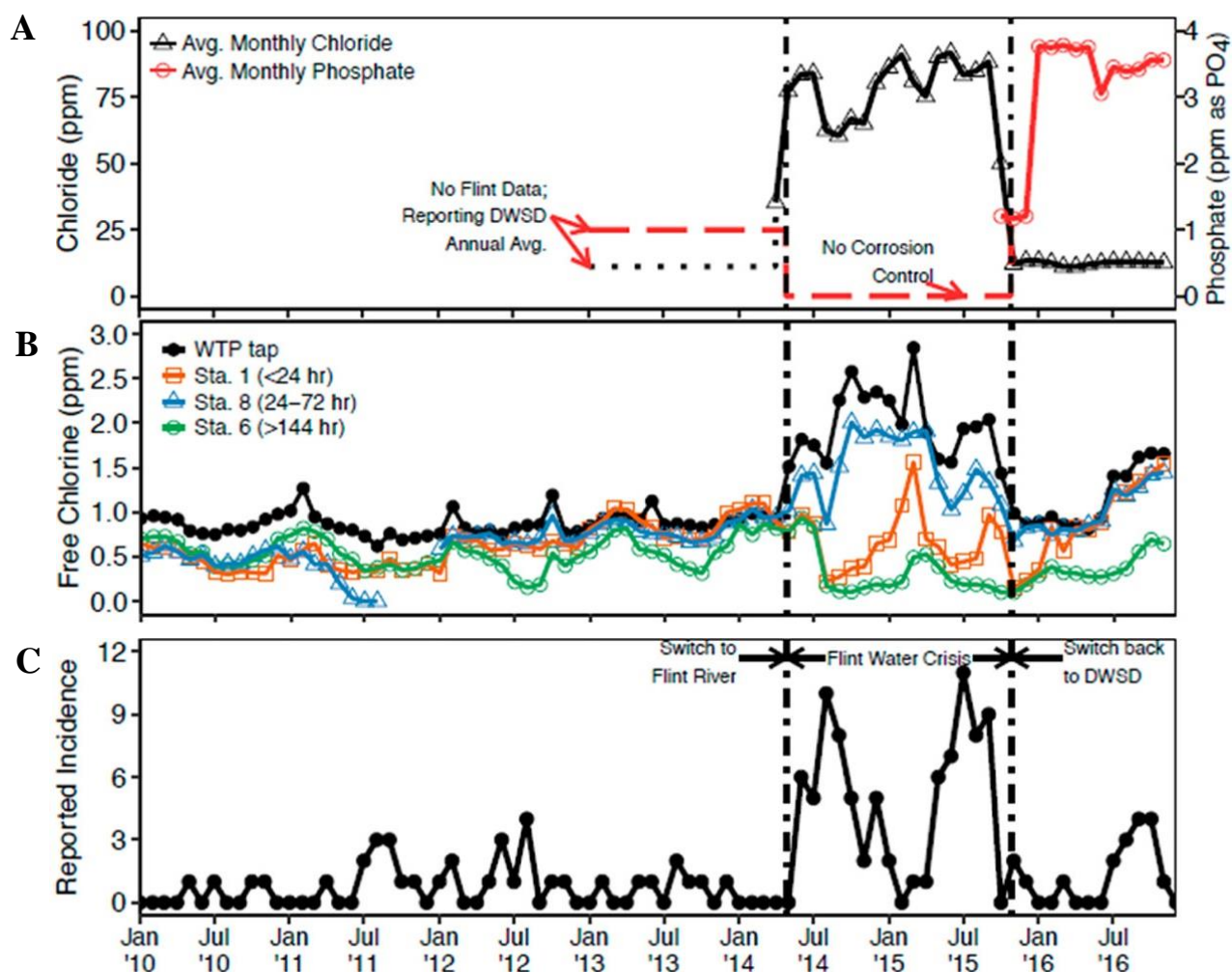


Figure 2-4 : Paramètres physico chimiques comparés à l'incidence des cas de légionellose avant, pendant et après le changement de la source d'eau. A) les taux de chlorure et de phosphate dans les stations de traitement de Détroit et de Flint; B) les mesures de chlore libre à la sortie d'usine puis dans des points d'échantillonnage en fonction de l'âge de l'eau; C) cas de légionellose reportés dans le comté de Genesee. Tiré de (Rhoads et al., 2017a).

La présence de fer dans les conduites cause aussi l'oxydation du chlore libre. Un essai a été réalisé par Rhoads et al. (2017a) pour comparer l'effet de l'eau traitée sur le chlore libre pour l'eau de la rivière de Flint et celle du lac Huron. Un clou en fer a été ajouté à un échantillon d'eau traitée de la rivière de Flint et à un échantillon d'eau traitée du lac Huron, l'eau a été changée chaque jour et les concentrations de chlore ont été ajustées à la concentration du chlore mesurée lors du prélèvement de l'eau. La courbe de décroissance de chlore a été produite pour les échantillons sans fer ajoutés et au jour 1 et jour 6 après l'ajout du fer. Les résultats montrent que la présence de fer dans l'eau traitée de Flint mène à une disparition quasi-immédiate du chlore libre (Figure 2-5), ce qui confirme la réaction entre le fer et le chlore et démontre l'effet indirect sur la présence de légionelles, étant donné la disparition du chlore résiduel associée à la présence de fer.

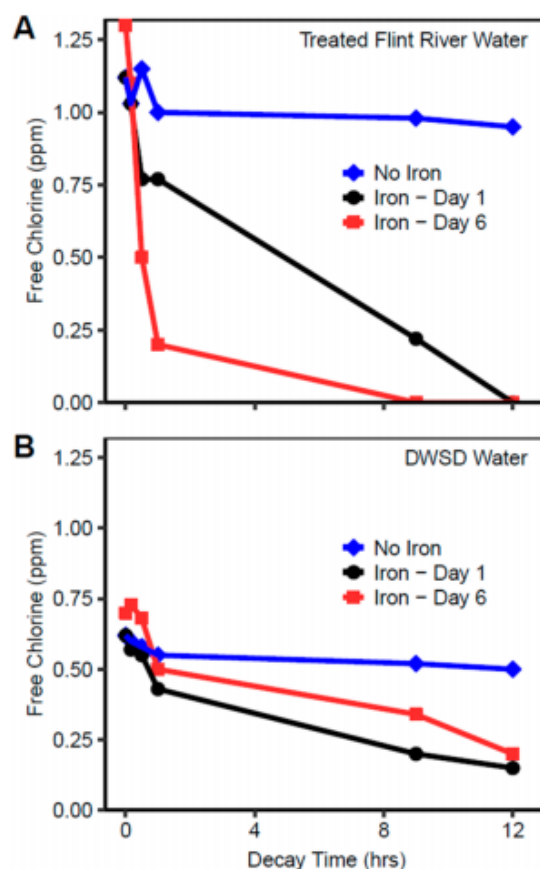


Figure 2-5 : Effet de l'ajout de fer (clou en fer ayant une surface de contact de 1,8 cm²) sur la concentration en chlore libre. A) Dans l'eau traitée de la rivière de Flint; B) dans l'eau traitée de lac Huron. Tiré de (Rhoads et al., 2017a).

Les concentrations en chlore libre mesurées dans le réseau concordent avec les résultats expérimentaux. Les concentrations en chlore libre baissent en fonction de l'âge de l'eau durant la période du changement d'eau (Figure 2-4.B). La baisse de concentration résiduelle de désinfectant a aussi contribué à la prolifération de bactéries dans le réseau, y compris *Legionella*.

La température moyenne de l'eau est un autre facteur qui a changé avec la nouvelle source d'eau. La température moyenne mesurée lorsque la ville de Flint était alimentée par de l'eau traitée de Détroit était de 20,9°C durant l'été 2013. Après le changement d'eau, les températures moyennes ont augmenté à 23,3°C durant l'été 2014 et à 24,0°C pour l'été 2015 (Schwake et al., 2016). Précédemment, les températures ne dépassaient pas un maximum de 24,6°C, alors qu'après le changement, une température maximale de 27,7°C a été rapportée (Rhoads et al., 2017a). Finalement, durant la période de changement d'eau, les journées durant lesquelles la température de l'eau dépassait 20°C étaient devenues plus fréquentes. Le nombre de jours rapporté est de 157 jours sur 2 ans, comparativement à 63 jours sur 6 ans, lors de l'utilisation de l'eau de Détroit (Rhoads et al., 2017a). Étant donné que la plage de températures favorables à la croissance de *Legionella* se situe entre 25 et 42°C, le changement de la source d'eau et la hausse des températures associées a fourni une troisième condition favorisant la croissance de la bactérie.

Même si les éclosions de légionellose semblent liées au changement de la source d'eau de Flint, il a été impossible de confirmer ce lien concrètement en comparant les souches isolées des patients à celles retrouvées dans le réseau de distribution. Étant donné que les éclosions n'ont été rendues publiques qu'en 2016, il n'a pas été possible d'échantillonner les bâtiments durant la période des éclosions. Cependant, Emily et al. (2019) montrent que les souches de *L. pneumophila* sérotype 1 retrouvées dans les réseaux de distribution sont très similaires aux souches cliniques isolées des patients.

2.2.2 Quincy, Il : baisse de chlore et corrosion

Rhoads et al. (2020) présentent les causes possibles d'une éclosion de légionellose rapportée en 2015 à Quincy, Illinois, où 58 cas ont été détectés dont 12 décès. Environ une semaine avant la détection du premier cas de légionellose, une tempête accompagnée de pluie et de vents forts a causé une augmentation de la turbidité de la source d'eau du réseau de distribution de Quincy, ce

qui a contribué à la baisse du chlore libre en entrée du réseau de distribution. En parallèle, la station de traitement d'eau de Quincy avait temporairement changé de désinfectant et était passée du chlore libre à la chloramine. De plus, des travaux de mise à niveau de la station de traitement d'eau potable ont mené à l'interruption des systèmes de contrôle de la corrosion durant 7 mois en 2015 (Figure 2-6). Ces événements ont causé une baisse de concentration de désinfectant dans le réseau de distribution durant toute l'année 2015 jusqu'à atteindre des concentrations de 1,32 mg/L au lieu de 2,65 mg/L enregistrés en 2014.

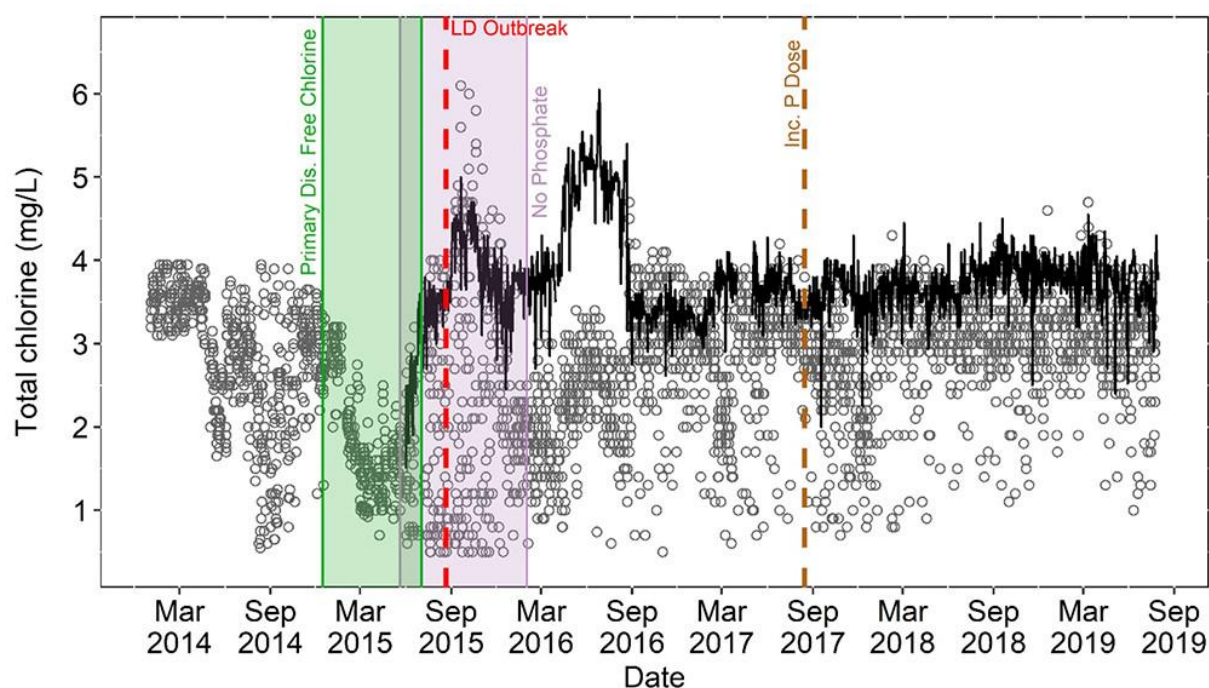


Figure 2-6 : Concentrations de chlore total en sortie de l'usine de traitement (ligne noire) et dans les points de suivi réglementaire (cercles gris) à Quincy, IL en fonction du temps. La chloramine a été utilisée durant la période en vert, et l'ajout de phosphate a été interrompu durant la période en violet. Le trait interrompu rouge signale le début de l'éclosion de légionellose et le trait jaune montre l'augmentation de la concentration de phosphate. Tiré de Rhoads et al. (2020).

Parmi les cas rapportés, 53 ont été détectés au Illinois Veteran's Home (IVHQ). La cause principale a été reliée à un chauffe-eau défectueux qui a été débranché et laissé à température ambiante durant 2 mois, avant d'être réparé. Après la remise en service du chauffe-eau, la température de l'eau n'a pas dépassé 49°C. Si le chauffe-eau présente un environnement idéal pour la prolifération de

Legionella, l'apparition du premier cas de légionellose au IVHQ et en communauté a été cependant détectée 2 semaines avant la remise en service du chauffe-eau.

Les circonstances de l'éclosion de Quincy semblent très similaires à celle de Flint où l'absence du contrôle de la corrosion et la baisse de désinfectant dans l'eau du réseau de distribution sont précurseur à l'apparition de cas de légionellose. De plus, l'utilisation de chauffe-eau ayant une température d'eau idéale pour l'amplification de *Legionella*, augmente le risque de prolifération de la bactérie dans le réseau de distribution d'eau chaude de bâtiments.

2.3 Éléments justifiant le projet

La présence de bactéries potentiellement pathogènes dans les réseaux d'eau potable est déjà établie. *L. pneumophila* représente l'une des bactéries qui suscite le plus d'attention étant donné le risque qu'elle pose à la santé humaine et sa résilience dans les réseaux. Étant donné son développement plus documenté dans les réseaux d'eau chaude, notamment en milieu hospitalier, les études se focalisent majoritairement sur les conditions de présence et les mesures à prendre lors de la détection de la bactérie dans ces réseaux.

Après les éclosions de Flint, un lien entre l'eau rouge et la prolifération de *L. pneumophila* dans les réseaux de distribution municipaux est devenu apparent, et le risque associé à la présence de légionelles a été mis en évidence. De plus, le manque d'informations scientifiques concernant l'importance que jouent les réseaux de distribution dans le développement de *Legionella* dans les réseaux des bâtiments est devenu évident. Ce rôle est important à quantifier pour identifier ce que les municipalités peuvent faire pour limiter le potentiel de recroissance de *Legionella* dans les réseaux de bâtiments qu'elles alimentent.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DU PROJET DE RECHERCHE

Cette section présente les objectifs fixés et la démarche qui a été suivie pour les atteindre.

3.1 Objectifs

L'objectif principal de ce projet de recherche était de quantifier la présence des indicateurs bactériens et de *L. pneumophila* dans les réseaux de distribution d'eau potable afin de déterminer les conditions favorisant leur prolifération. Le Tableau 3-1 résume les objectifs spécifiques du projet et les hypothèses qui y sont liées.

Tableau 3-1 : Récapitulatif des objectifs spécifiques et des hypothèses associées.

Objectif	Hypothèse
Déterminer si la concentration de grands volumes d'échantillons par filtration tangentielle permet de détecter en culture des pathogènes en faible concentration dans les échantillons d'eau potable.	La concentration des échantillons de grands volumes (100L et 20L) permet la détection par culture de coliformes totaux, de <i>E. coli</i> et de <i>L. pneumophila</i> présents dans les réseaux municipaux à concentrations sous la limite de détection des volumes normalement analysés par les méthodes traditionnelles.
Évaluer si le maintien d'une concentration résiduelle de chlore dans l'eau du réseau permet de réduire la prévalence de <i>Legionella pneumophila</i>, d'<i>E. coli</i>, de coliformes totaux et de bactéries cultivables, totales et viables.	Les bactéries <i>Legionella pneumophila</i> , d' <i>E. coli</i> , de coliformes totaux et de bactéries cultivables, totales et viables ont détectées en présence de chlore résiduel.
Identifier si des concentrations élevées en fer dans l'eau (eaux rouges) sont associées à une charge plus élevée en pathogènes et indicateurs.	Des concentrations plus élevées de <i>L. pneumophila</i> , <i>E. coli</i> et les coliformes totaux sont mesurées en présence de fer (dissous et particulaire) dans les échantillons d'eau (réseaux et bornes-fontaines).
Déterminer si le réseau interne des bâtiments contribue à l'amplification de la charge bactérienne.	Les réseaux d'eau chaude et d'eau froide des bâtiments présentent une charge bactérienne plus importante que l'eau des réseaux de distribution.

3.2 Démarche

Pour soutenir les hypothèses de recherche, deux approches d'échantillonnage ont été adoptées :

1 – La première approche était une campagne d'échantillonnage ciblant les bornes fontaines de quatre municipalités. Cette campagne est caractérisée par un échantillonnage initial suivi d'un échantillonnage post intervention, après rinçage.

Cette approche permet d'investiguer la prévalence des pathogènes dans les parties du réseau ayant des concentrations élevées en métaux et en particules et de déterminer l'impact du rinçage sur la qualité de l'eau prélevée aux bornes fontaines.

2 - La seconde approche visait les réseaux de distribution d'eau potable et les bâtiments connectés des mêmes quatre municipalités. L'échantillonnage consistait à prélever de grands volumes d'eau au robinet, sur cinq réseaux de distribution durant l'hiver, puis l'été. Quatre types d'échantillons ont été prélevés : a) eau traitée en sortie d'usine, b) échantillon de 1^{er} jet d'eau froide dans des bâtiments, c) échantillon de 1^{er} jet d'eau chaude dans des bâtiments, et d) échantillon d'eau froide après un rinçage de 5 min. Les échantillons ont été par la suite concentrés avant de procéder aux analyses microbiologiques.

Cette approche vise à comparer la qualité de l'eau selon les types d'eau prélevée le long du réseau. De plus, le recours à l'échantillonnage des grands volumes permet de diminuer le seuil de détection des méthodes de mesures des bactéries, augmentant les chances de détection d'évènements rares.

CHAPITRE 4 MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1 Protocoles d'échantillonnage

4.1.1 Sites d'échantillonnage

Les campagnes d'échantillonnages ont été réalisées sur 5 réseaux de 4 municipalités du Québec. Pour les bornes fontaines, la campagne s'est déroulée durant l'automne 2018 sur les réseaux A, B, C et D. L'échantillonnage des grands volumes a été réalisé sur les 5 réseaux, durant l'hiver et l'été 2019. Le tableau 2-1 présente les caractéristiques des réseaux échantillonnés.

Tableau 4-1 : Description de la qualité d'eau potable dans les réseaux échantillonnés

Réseau	Source	Traitement	Qualité de l'eau potable traitée (valeurs moyennes annuelles)			
			pH	Turbidité (UTN)	Température (°C)	Alcalinité (mg de CaCO ₃ /L)
A	Rivière	Coagulation Décantation Filtration Ozonation Biofiltration Chloration	7,58	0,3	1 – 26,6	35
B	Fleuve	Floculation Décantation Inter chloration Filtration UV Chloration	7,2	0,08	0,3- 24,6	78
C	Fleuve	Floculation Décantation Filtration Chloration Ozonation	7,08	0,12	0,6 – 25,2	93
D	Rivière	Chloration Filtration Ozonation Charbon UV	7,6	0,1	1,3 – 26,6	40
E	Fleuve	Filtration Ozonation Chloration	7,81	0,16	0,4 – 23,2	88

4.1.2 Calendriers d'échantillonnage

L'échantillonnage des bornes fontaines (BF) s'est déroulé en deux étapes. Tout d'abord des BF ayant un historique d'eau rouge et se trouvant à l'extrémité d'un réseau ont été échantillonnées. Pour certaines BF, un rinçage a été effectué dans les jours suivant l'échantillonnage. La seconde étape a consisté en un

échantillonnage de suivi après l'intervention de rinçage. Le calendrier d'échantillonnage des BF est présenté au tableau 4-2.

Tableau 4-2 : Calendrier d'échantillonnage des BF

Réseau	Date d'échantillonnage	Nom de l'échantillon	Type d'échantillon
A	11/09/2018	A1 et A2	Échantillonnage initial
	11/10/2018	De A3 à A8	Échantillonnage initial
B	18/10/2018	De B1 à B6	Échantillonnage initial
C	22/10/2018	De C1 à C6	Échantillonnage initial
D	24/10/2018	De D1 à D5	Échantillonnage initial
Suivis post-rinçage	13/11/2018	A3 F A8 F D3 F	Échantillonnage de suivi après rinçage

Pour les échantillonnages des grands volumes d'eau (GV), les échantillons ont été prélevés au robinet de l'usine de production d'eau potable alimentant ce réseau puis à un point d'échantillonnage servant au contrôle réglementaire en vertu du Règlement de la qualité de l'eau potable (RQEP). Au moins trois bâtiments desservis par la même usine étaient sélectionnés. Afin d'évaluer la qualité d'eau du réseau interne des bâtiments choisis, des échantillons au premier jet d'eau froide et d'eau chaude ont aussi été prélevés. Au total trois types d'échantillons ont été prélevés :

1. Échantillon après 5 min de rinçage 5MF : prélevé à l'usine et au robinet d'eau froide des bâtiments ;
2. Échantillon d'eau froide au 1^{er} jet CW-FD : prélevé sans rinçage au robinet des bâtiments ;
3. Échantillon d'eau chaude au 1^{er} jet HW-FD : prélevé sans rinçage au robinet des bâtiments.

L'échantillonnage des GV a été réalisé sur deux saisons, en hiver et en été. Les échantillons CW-FD et HW-FD ont été prélevés une seule fois alors que les échantillons 5MF ont été prélevés durant les deux saisons. Le tableau 4-3 présente les dates d'échantillonnage selon le type d'échantillon.

Tableau 4-3 : Calendrier des échantillonnages pour chaque réseau selon la saison et le type d'échantillon de GV-grand volume, CW- eau froide, HW – eau chaude. Bat signifie bâtiment.

Réseau	Site d'échantillonnage	Hiver			Été		
		Eau froide 5MF (100L)	Eau froide 1 ^{er} jet CW-FD (20L)	Eau chaude 1 ^{er} jet HW-FD (20L)	Eau froide 5MF (100L)	Eau froide 1 ^{er} jet CW-FD (20L)	Eau chaude 1 ^{er} jet HW-FD (20L)
A	Usine A	02/04/2019			08/07/2019		
	Bat A1				08/07/2019		
	Bat A2				10/07/2019		
	Bat A3						
B	Usine B1	20/02/2019 28/02/2019			16/09/2019		
	Bat B1	20/02/2019		20/02/2019	16/09/2019		
	Bat B2	20/02/2019 26/02/2019			18/09/2019		
	Bat B3	20/02/2019					
	Bat B4	26/02/2019					
	Bat B5						
	Bat B6						
	Bat B7						
	Bat B8	12/03/2019					
	Usine B2						
	Réservoir B						
C	Usine C	08/04/2019			22/07/2019		
	Bat C1				22/07/2019		
	Bat C2				29/07/2019		
	Bat C3						
D	Usine D	25/03/2019			16/07/2019		
	Bat D1				16/07/2019		
	Bat D2				18/07/2019		
	Bat D3						
E	Usine E	07/05/2019			10/09/2019		
	Bat E1	09/05/2019			09/09/2019		
	Bat E2						
	Bat E3						

Les points marqués en gras du réseau B ont été échantillonnés durant l'hiver, à la demande de la municipalité, mais n'ont pas été repris en été.

4.1.3 Préparation du matériel

Tous les bidons et les bouteilles en polypropylène (PP) et en verre ont été lavés au Versa Clean puis rincés trois fois à l'eau déminéralisée puis à l'eau Milli-Q. Les bidons et bouteilles en PP utilisés pour les échantillons microbiologiques ont été préalablement autoclavés. Les bouteilles en verre utilisées pour les mesures de COD ont été conditionnées au four à 500°C pendant 4h au préalable.

4.1.4 Étapes d'échantillonnage

4.1.4.1 Bornes fontaines

L'échantillonnage a été fait dans deux bouteilles d'un litre. Une bouteille stérile avec thiosulfate de sodium (10%) a été utilisée pour le prélèvement de l'échantillon destiné aux analyses microbiologiques. La seconde bouteille a été utilisée pour les analyses physico-chimiques au laboratoire.

L'échantillonnage s'est fait selon les étapes suivantes :

- Avant l'ouverture de la BF, un robinet est branché à l'une des vannes de sorties (Figure 4-1.A)
- La vanne d'eau de la BF et le robinet sont ouverts
- La bouteille stérile est remplie dès que possible (Figure 4-1.B) pour les analyses microbiologiques
- Ensuite, un bêcher en plastique propre de 500 ml est rempli afin de réaliser les analyses physico-chimiques sur site
- La seconde bouteille est remplie pour les analyses physico-chimiques au laboratoire
- La vanne d'eau de la BF est fermée et robinet est débranché
- Les échantillons sont déposés dans une glacière propre et transportés au laboratoire pour la suite des analyses.

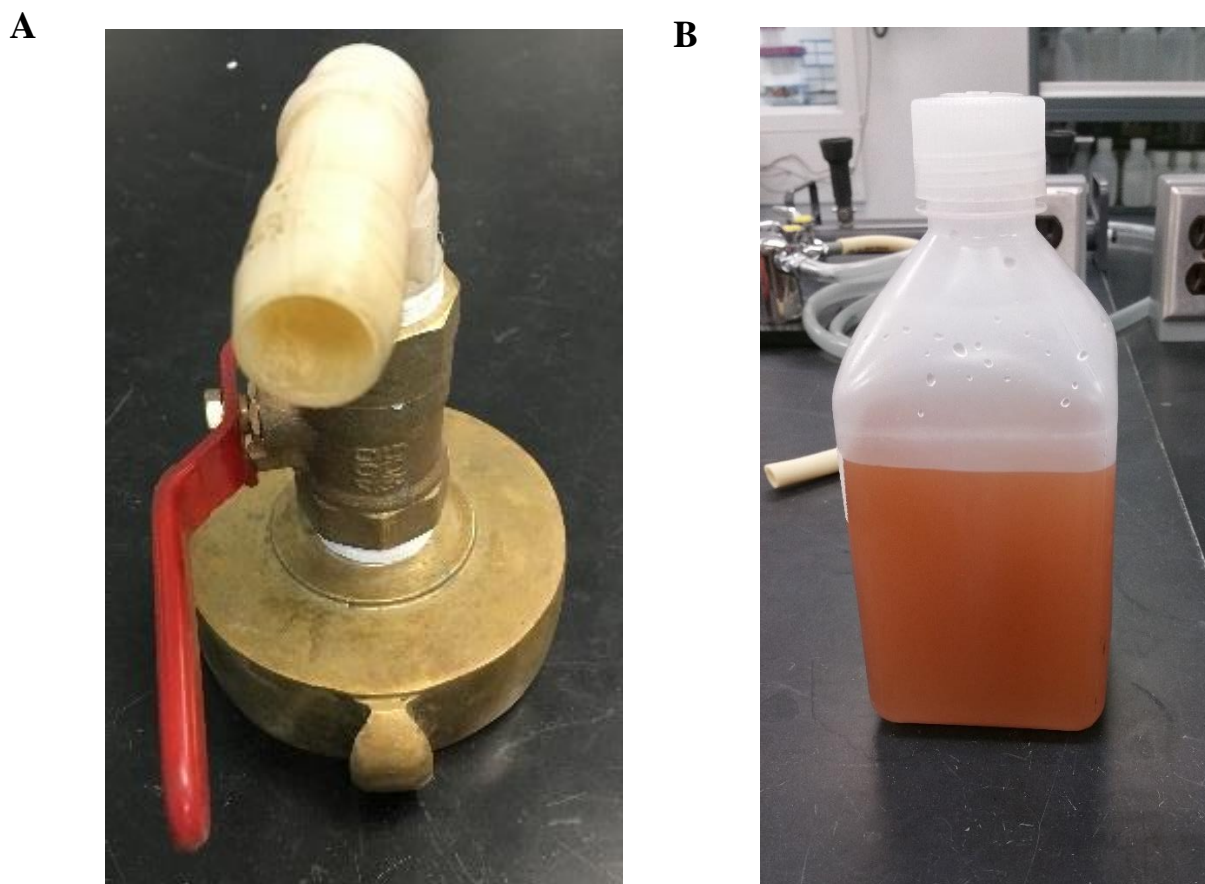


Figure 4-1 : A) Robinet utilisé lors de l'échantillonnage des BF; B) Échantillon d'eau rouge.

Étant donné la grande vitesse d'écoulement de l'eau, il était impossible de fermer le robinet d'eau entre le prélèvement des différents volumes et l'eau s'écoulait en continu pendant la durée de l'échantillonnage.

4.1.4.2 Grands volumes

Pour chaque point d'échantillonnage, il est nécessaire de suivre le bon ordre lors du prélèvement des trois types d'échantillons. Le FD-CW est échantillonné en premier avant de désinfecter le robinet et de procéder à l'échantillonnage du 5MF. Le robinet d'eau froide est par la suite fermé et celui d'eau chaude est ouvert pour collecter l'échantillon FD-HW.

Échantillonnage au premier jet – eau froide (FD-CW) et eau chaude (FD-HW)

L'échantillonnage est réalisé sans désinfecter le robinet et sans enlever l'aérateur. L'eau froide est d'abord recueillie immédiatement après l'ouverture du robinet dans des bidons en polypropylène (PP) stériles de 10 ou 20 L (volume total de 20L). Par la suite, un bêcher propre est rempli pour les analyses physico-

chimiques in situ (température, chlore libre et total, oxygène dissous, pH, conductivité). Trois bouteilles d'un litre en PP propres sont successivement remplies pour les analyses de MES/MVES et alcalinité au laboratoire. Enfin, une bouteille en verre de 125 ml destinée à la mesure du COD et un tube de 50 ml destinée à la mesure des concentrations de métaux (Fe, Al, Ca, Cu, Mn, Mg) sont remplis. Du thiosulfate de sodium stérile était ajouté dans l'échantillon de 20L ($C_f = 10\%$) si du chlore libre était détecté dans l'échantillon prélevé dans le béccher. La même procédure est suivie pour l'échantillonnage de l'eau chaude, qui se fait après avoir complété l'échantillonnage des échantillons de premier jet et après rinçage de l'eau froide. Étant donné l'absence de chlore libre dans l'eau chaude, aucun thiosulfate de sodium n'a été ajouté. Les bidons de 20 L d'eau froide et d'eau chaude sont bien mélangés puis un litre d'eau est transvidé dans une bouteille en PP stérile, destinée aux analyses microbiologiques des échantillons non-concentrés, pour chaque échantillon.

Échantillonnage après 5min de rinçage (5MF)

Avant de procéder à l'échantillonnage, l'aérateur a été enlevé puis le robinet a été désinfecté avec une solution de chlore 10% puis essuyé. Après 5 minutes d'écoulement, 500 ml d'eau ont été prélevés dans un béccher propre pour les analyses physico-chimiques sur site. S'il y avait détection de chlore résiduel, du thiosulfate de sodium stérile a été ajouté dans chaque bidon afin de neutraliser le chlore (concentration finale de 10%). Les bidons de 10 L et de 20 L étaient ensuite remplis jusqu'à atteindre 100 L d'eau (figure 4-2). Dans les éviers difficiles d'accès où il était impossible de remplir directement les bidons, des bouteilles d'un litre stériles ont été remplies au robinet puis transvidées dans les bidons. La suite des prélèvements s'est déroulée selon la procédure décrite pour l'échantillonnage au premier jet.



Figure 4-2 : Bidons d'eau échantillonnée.

4.1.5 Concentration des échantillons

Le système de concentration est construit selon la Figure 4-3. L'eau est pompée en direction du filtre. L'eau filtrée est rejetée à l'égout et l'eau contenant les microorganismes est retournée dans le bidon d'échantillonnage. La vitesse de la pompe est réglée de façon à obtenir un débit de 5 L/min. La pression dans le filtre est ajustée à 0,2 bar et le débit d'eau rejetée est de 0,9 L/min (Heijnen et al., 2009).

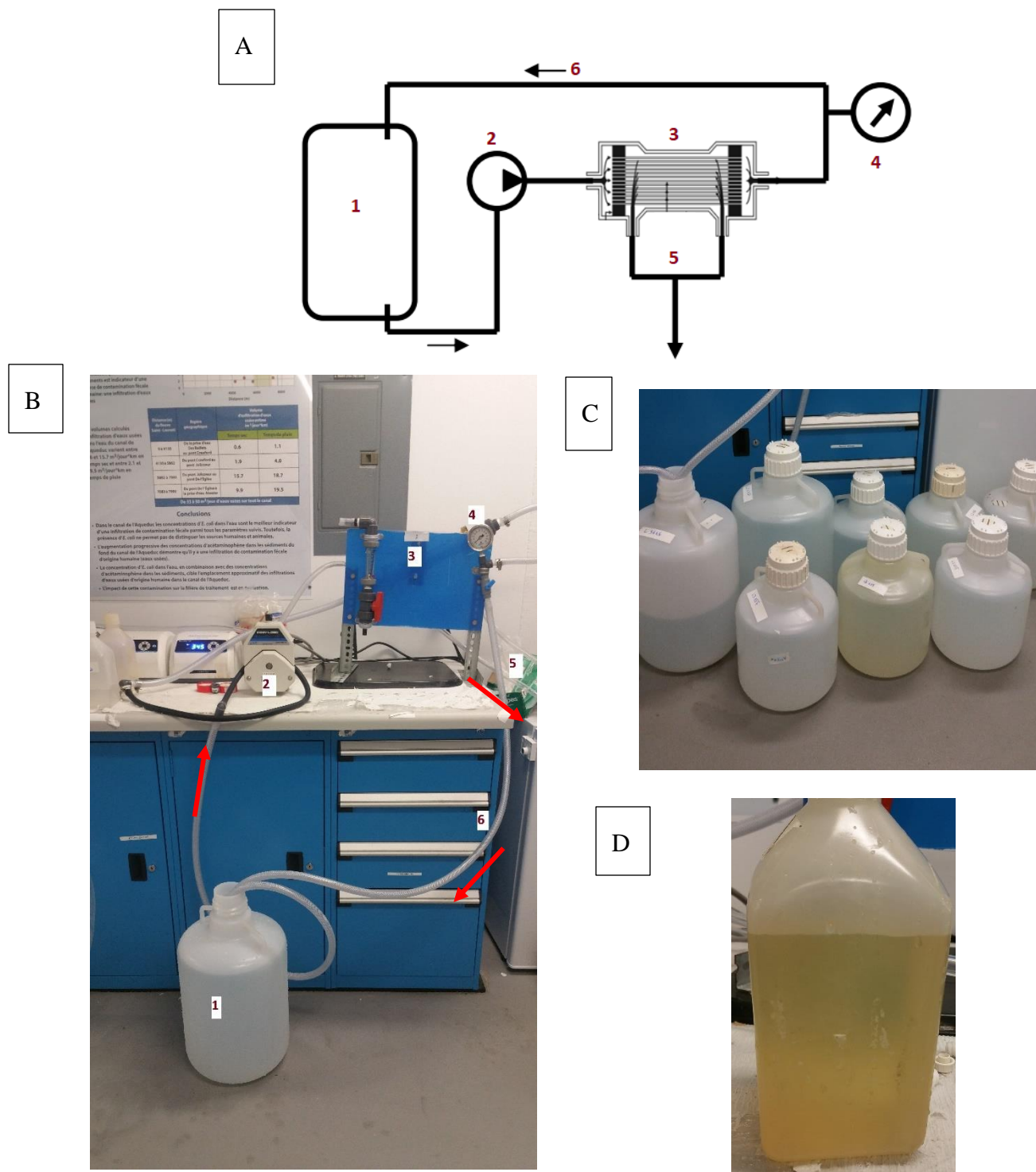


Figure 4-3 : Dispositif de filtration et échantillons. A) schéma du système adapté de Heijnen et al. (2009); B) photo du système de filtration; C) 100 L d'eau échantillonnée dans des bidons de 20L et de 10L; D) Échantillon concentré; 1) Bidon de concentration ; 2) Pompe ; 3) Filtre Hemoflow ; 4) Baromètre ; 5) Conduite d'eau filtrée allant à l'égout ; 6) Conduite d'eau concentrée allant au bidon de concentration.

Avant la concentration de chaque échantillon, les tuyaux du montage sont désinfectés par une solution de chlore à 1% pendant 15 min. Pour ce faire, la cartouche Hemoflow est enlevée et les tuyaux sont connectés afin de permettre la recirculation de l'eau. L'eau chlorée est mélangée dans un bidon propre de 10 L puis pompée en recirculation dans le système. Les tuyaux sont par la suite rincés en recirculation avec de l'eau déminéralisée pendant 5 min. Une nouvelle cartouche est branchée et deux bouteilles en PP d'1 L stériles sont préparées pour chaque échantillon.

4.2 Méthodes analytiques

Les analyses physico-chimiques et microbiologiques ont été réalisées directement sur les échantillons de BF. Étant donné que les échantillons de GV sont moins chargés en bactéries, les analyses ont été réalisées sur les échantillons non-concentrés et sur les échantillons concentrés. Le Tableau 4-4 présente en détail le type d'échantillon utilisé pour chaque analyse.

Tableau 4-4 : Analyses physico-chimiques et microbiologiques effectuées selon le type d'échantillon.

Analyses	BF	GV non - concentré	GV concentré	Commentaire
Température	✓	✓		<i>In situ</i>
Chlore libre et total	✓	✓		<i>In situ</i>
Conductivité	✓	✓		<i>In situ</i>
Oxygène dissous	✓	✓		<i>In situ</i>
pH	✓	✓		<i>In situ</i>
Particules	✓			
Alcalinité		✓	✓	
MES/MVES	✓	✓		
COD		✓		
Métaux	✓	✓	✓	
BHA	✓	✓		
Colilert	✓		✓	
Legiolert	✓		✓	
Enterolert			✓	Été uniquement
Cytométrie en flux		✓		
q-PCR	✓		✓	

4.2.1 Analyses physico-chimiques

Les mesures de température, du chlore libre et total, de la conductivité, de l'oxygène dissous et du pH ont été réalisées sur le terrain, au moment de l'échantillonnage. Les autres analyses physico-chimiques ont été effectuées au laboratoire dans les délais prescrits en fonction des différentes méthodes. Les méthodes utilisées pour chaque analyse sont présentées au Tableau 4-5.

Tableau 4-5 : Les appareils utilisés et les méthodes suivies pour les analyses physico-chimiques.

Paramètre	Appareil	Méthode et référence
Température	Thermomètre analytique	-
Chlore libre et total	Hach Pocket 184 Colorimeter II	Colorimétrie par DPD
Conductivité	Oaklon	-
Oxygène dissous	Hach 186 Multi-Parameter HQ40d, sonde 187 LDO101	-
pH	Hach 186 Multi-Parameter HQ40d, sonde PHC301	-
Turbidité	Hach 2100Q Turbidimeter	-
Particules	Brightwell Micro-Flow Imaging DPA4100 Particule Analysis System	Méthode 2560 (American Public Health Association (APHA), 1998)
MES/MVES	Four à moufles	Méthodes 2540 (American Public Health Association (APHA), 1998)
Alcalinité	Suivi du pH à l'aide du pH-mètre	Méthode 2320-B (American Public Health Association (APHA), 1998)
COD	Sievers M5310C	Méthode 5310 (American Public Health Association (APHA), 1998)
Métaux totaux (Fe, Al, Cu, Mg, Ca, Mn)	Analyse au laboratoire de l'Université de Montréal	ICP-MS, méthode de l'EPA 200.8 (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1994)

Les échantillons destinés aux analyses de métaux ont été acidifiés à 0.5% à l'acide nitrique de grade Trace Metals. L'acidification des échantillons a été réalisée au moins 24h avant l'envoi des échantillons à l'Université de Montréal pour être analysés.

4.2.2 Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques ont été réalisées dès l'arrivée au laboratoire, ou dans un délai ne dépassant pas 24h après l'échantillonnage.

Bactéries hétérotrophes aérobies (BHA). Les échantillons ont été filtrés sur des membranes de 47 mm de diamètre, de porosité 0,45 µm en ester de cellulose mélangé (Millipore, Allemagne). Les analyses ont été réalisées en duplicata pour des dilutions et des volumes différents. Les dilutions ont été choisies en fonction de la concentration estimée en BHA et les résultats des échantillonnages précédents. Pour les échantillons de BF, des dilutions en séries de 10 fois et de 100 fois ont été réalisées dans du tampon phosphate stérile. Les mesures de BHA ont été faites pour 1 mL de chacune des dilutions et de l'échantillon non dilué. Pour les échantillons de GV, les volumes filtrés étaient de 1 mL, 10 mL et 100mL. Les filtres ont ensuite été déposés sur des géloses R2A. Les BHA ont été dénombrées après 7 jours d'incubation à 22°C selon la méthode 9215-D de American Public Health Association (APHA) et al. (2005).

Colilert. Le Colilert (Idexx, Maine, USA) est une méthode de détection enzymatique des coliformes totaux (CT) et de *E. coli*. Une capsule de réactif Colilert a été ajoutée à 100 mL d'échantillon. L'échantillon a été mélangé jusqu'à homogénéisation puis versé dans une plaque Quanti-Tray. La plaque a été scellée puis incubée à 35 +/- 0,5°C pendant 24h. Les puits jaunes étaient considérés positifs aux CT et ceux fluorescents aux UV étaient comptés comme positifs en *E. coli*. La concentration finale obtenue est exprimée en nombre le plus probable (NPP) et est estimée en se basant sur une table de valeur, en fonction du nombre de puits positifs.

Legiolert. Semblable au Colilert, le Legiolert est aussi une méthode enzymatique qui permet de détecter *L. pneumophila*. Deux protocoles peuvent être suivis selon la qualité de l'eau analysée : un protocole pour eau potable et un protocole pour eau non potable. Le protocole pour eau non potable comporte une étape de prétraitement à l'acide qui permet de diminuer la flore interférente. Étant donné que l'eau contenue dans les bornes fontaines est fortement chargée en métaux et en microorganismes et que l'étape de concentration des échantillons de GV concentre toutes les bactéries présentes, les deux protocoles d'analyses ont été suivis pour tous les échantillons (figure 4-4). Les puits turbides ou présentant une coloration brune ont été considérés positifs. La concentration de *L. pneumophila* obtenue est exprimée aussi en NPP.

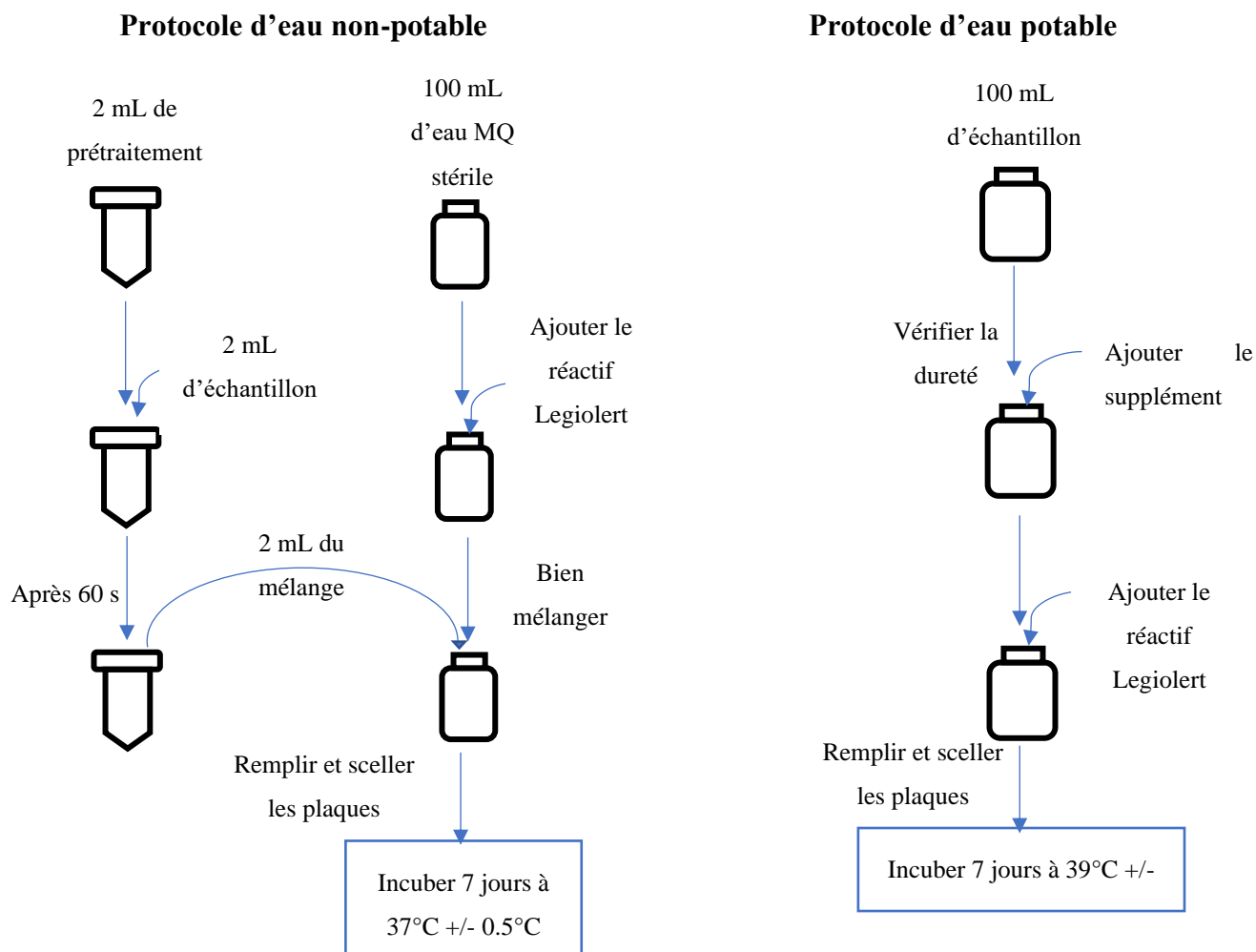


Figure 4-4 : Schémas descriptifs des protocoles de Legiolert.

Enterolert. Cette méthode permet de quantifier les entérocoques présents dans l'échantillon analysé. Le protocole est similaire à celui de Colilert. Il suffit d'ajouter le réactif à 100 mL d'échantillon. Le mélange est incubé 24h à $41^{\circ}\text{C} \pm 0.5$. Les puits présentant une fluorescence bleue aux rayons UV ont été considérés positifs.

La limite de détection des méthodes Colilert, Enterolert et le protocole d'eau potable de Legiolert est de 1 bactérie/100mL, alors que celle du protocole d'eau non-potable de Legiolert est de 1 bactérie/mL.

Conservation des souches (Colilert, Legiolert et Enterolert). Lors de la détection de bactéries cultivables par les méthodes enzymatiques, chaque puits positif a été mis en culture sur des géloses pour

cryoconserver les souches. À l'aide d'une seringue stérile, quelques gouttes du liquide ont été prélevés en piquant délicatement le Quanti-Tray du côté papier préalablement nettoyé à l'aide d'alcool. Les gouttes étaient ensuite étalées sur un pétri en utilisant un bâton de hockey stérile. Après la période d'incubation, les colonies isolées ont été conservées à -80°C dans une solution de glycérol 15%. Les spécificités des conditions de culture pour chaque bactérie sont présentées dans le Tableau 4-6.

Tableau 4-6 : Milieux et les conditions de culture pour les mesures bactériennes.

Bactérie	Milieu de culture	Température d'incubation	Apparence des colonies
Coliformes totaux (CT)	MI agar (+ cefsulodine)	35°C	Fluorescence aux UV
<i>E. coli</i>	MI agar (+ cefsulodine)	35°C	Couleur bleue
Entérocoques	m-Enterococcus agar	35°C	Couleur rouge
<i>L. pneumophila</i>	BCYE	37°C	Colonies lisses de couleur grise

Cytométrie en flux. Les comptes de bactéries totales et viables des échantillons de GV non concentrés ont été réalisés à l'aide du cytomètre BD Accuri C6 Flow Cytometer. Les échantillons ont été colorés avec du SYBR green I et du Propidium Iodide (PI). Brièvement, 500 µL de l'échantillon à analyser est incubé pendant 3 minutes à 37°C auquel 5µL de SYBR green est ajouté, pour détecter les bactéries viables, et 5µL de SYBR green et 5µL de PI sont ajoutés, pour détecter les bactéries totales, le mélange est par la suite vortexé et incubé à l'obscurité pendant 10 minutes. Le SYBR green est capable de pénétrer à l'intérieur de toutes les cellules et de se fixer à l'ADN de la cellule, alors que le PI peut uniquement pénétrer les cellules ayant des membranes endommagées. Ces deux colorants permettent alors de différencier les cellules viables et les cellules mortes. Pour chaque échantillon d'eau, les analyses ont été réalisées en duplicata. La limite de détection de cette méthode est de 1×10^3 cellules/mL.

Filtration et extraction d'ADN. Pour tous les échantillons prélevés, un volume allant de 100 mL à 500 mL a été filtré et conservé à -80°C pour des analyses moléculaires. Les volumes de filtration ont été déterminés par le colmatage des filtres. Les échantillons étaient filtrés sur des membranes de porosité 0,45µm en esters de cellulose (Millipore, Allemagne). Pour l'échantillonnage réalisé en été, des filtres de porosité 0,22µm en polyethersulfone (Pall, USA) ont été utilisés afin que les extraits d'ADN puissent être utilisés pour étudier la diversité microbienne dans le cadre du projet d'une étudiante de doctorat.

L'extraction d'ADN a été réalisée directement à partir du filtre, en utilisant une méthode adaptée de Yu and Mohn (1999), comprenant une étape de bead beating suivie d'une précipitation à l'acétate d'ammonium puis de lavages successifs à l'éthanol. Brièvement, le filtre conservé a été introduit dans un tube stérile contenant une matrice de grenat et de céramique (Lysing Matrix A, MPBio) et de tampon d'extraction (Bédard et al., 2014). L'ADN extrait a été conservé dans de l'eau ultrapure à -25°C.

q-PCR *Legionella pneumophila*. La quantification de *L. pneumophila* a été réalisée à l'aide du kit iQ-Check Quanti *L. pneumophila* de BioRad. Chaque tube analysé contient 5 µL d'ADN, 40 µL de MasterMix et 5 µL de sondes et amorces pour atteindre un volume de réaction final de 50 µL. Le thermocycleur a été réglé selon le programme suivant : dénaturation de 15 min à 95°C ; 50 cycles : 15s de dénaturation à 95°C, 30s d'appariement à 57°C, 30s d'élongation à 72°C ; élongation finale de 15 min à 72°C. Le contrôle interne, le contrôle négatif et les standards d'ADN ont été fournis avec le kit. Toutes les analyses ont été réalisées en duplicata. Le seuil de détection du kit est de 5 Unités Génomiques/5µL d'ADN extrait, alors que le seuil minimal de quantification pour le lot de standards utilisés est de 19UG/5µL.

4.2.3 Vérification du Colilert et du Legiolert sur les échantillons concentrés

Ce test visait à vérifier si la concentration de grands volumes d'eau causait une interférence ou une inhibition de croissance des bactéries dans les milieux de croissance du Colilert ou du Legiolert. L'essai a été réalisé sur l'échantillon concentré CW-5MF du bâtiment E2 prélevé en hiver. Une concentration connue de *E. coli* et de *L. pneumophila* isolées lors de l'échantillonnage des BF et cryoconservées a été remise en culture dans du bouillon tryptone soja à 35°C pendant 18h pour *E. coli*, et dans du milieu YE liquide à 40°C pendant 3 jours pour *L. pneumophila*. La concentration pour chaque culture liquide a été mesurée au NanoDrop en mesurant la densité optique à 600 nm. Les bactéries ont ensuite été centrifugées

et lavées puis conservées une semaine dans l'eau de robinet filtrée sur une membrane 0,22 µm et autoclavée afin de favoriser une adaptation à un environnement plus faible en nutriments. Les tests de Colilert et de Legiolert ont été préparés en utilisant l'échantillon concentré inoculé d'une concentration connue de *E. coli*, pour le Colilert, ou de *L. pneumophila*, pour les deux protocoles de Legiolert. Un contrôle a été préparé en utilisant l'eau de robinet filtrée sur membrane 0,22 µm et autoclavée, dans laquelle les mêmes quantités d'*E. coli* et de *L. pneumophila* ont été inoculées. Les tests ont été effectués en suivant les directives de chacune des méthodes.

CHAPITRE 5 RÉSULTATS

Ce chapitre a pour but de présenter les résultats des campagnes d'échantillonnages et des analyses réalisées dans le cadre du projet. La première section focalise sur les résultats de l'échantillonnage des bornes fontaines, la seconde partie sur les résultats des grands volumes prélevés dans les grands bâtiments.

5.1 Résultats des échantillonnages aux bornes fontaines

L'ensemble des résultats physico-chimiques et microbiologiques des échantillons prélevés aux bornes fontaines est présenté au Tableau 5-1. Les bornes fontaines représentent une niche où l'eau est stagnante et les concentrations de métaux et de particules sont élevées. Les BF ont été échantillonnées en présence d'eau rouge afin d'évaluer la présence de *Lp* dans ces conditions particulières. Les échantillons prélevés aux BF ne sont pas représentatifs du réseau. Cependant, même si le contact entre l'eau présente dans les conduites et l'eau dans la colonne d'eau des bornes fontaines est sujet à discussion, le risque de contamination n'est pas complètement écarté.

Des différences importantes sont observées entre les eaux prélevées aux bornes fontaines des quatre municipalités. La turbidité varie de 1 à 860 UTN et les échantillons ayant des valeurs de turbidité élevées correspondent à des échantillons très colorés. Le rinçage des bornes fontaines a eu des effets variables sur la turbidité. Pour les points A8 et D3, une baisse importante de la turbidité a été mesurée (10 à 20 fois), alors qu'une augmentation a été observée pour le point A3. Un résiduel de chlore a été mesuré dans tous les échantillons sauf pour les échantillons A8, D1 et D3 qui présentaient une couleur rouge prononcée, ce qui a empêché une mesure précise de la concentration de chlore. Par ailleurs, les valeurs de chlore libre ont atteint des concentrations allant jusqu'à 1,49 mg Cl₂/L. Le calcul du ratio des MVES/MES montre la fraction de la matière organique pour chaque échantillon, indiquant que les solides présents sont majoritairement inorganiques. Les échantillons C1 et D1 présentent des ratios de 0,83 malgré des concentrations en BHA très faibles. La détection des moisissures dans ces points pourrait expliquer une portion de la matière organique.

Des coliformes totaux ont été détectés dans quatre échantillons prélevés dans les réseaux A et C, dont un seul était supérieur à la limite de détection, soit 165 NPP/100mL (Tableau 5-1). Les concentrations de BHA mesurées varient de moins de 25 UFC/mL jusqu'à 7000 UFC/mL. Il n'a pas été possible de

dénombrer les BHA dans certains échantillons des réseaux B et C en raison d'une importante présence de moisissures sur les pétris.

L. pneumophila a été détectée à 3 reprises dans les bornes-fontaines des municipalités A et D, à des concentrations qui variaient entre 6 et 160 NPP/100mL. La borne fontaine rincée A3 est la seule où ont été détectés à la fois *L. pneumophila* et des coliformes totaux (CT). Après une analyse q-PCR des échantillons de BF, *Legionella pneumophila* n'a été détectée dans aucun échantillon, y compris les échantillons positifs par culture. Cela peut être dû à la faible concentration en *Legionella* qui est en dessous du seuil de détection par q-PCR ou aux pertes possibles durant le processus d'extraction d'ADN.

Tableau 5-1 : Résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques des échantillons de bornes fontaines.

BF	Cl ₂ résiduel (mg Cl ₂ /L)	pH	Temp (°C)	O ₂ dissous (mg/L)	Conductivité (µS/cm²)	Turbidité (NTU)	MES (mg/L)	MVES (mg/L)	MVES/MES	BHA (UFC/mL)	CT (NPP/100mL)	Lp (NPP/100mL)
A1	0,2	9,2	21,2	11,8	187	149	85,3	11,7	0,1	260	<1	<1
A2	0,34	8,6	21,1	9,8	206	53,9	34,6	3,6	0,1	<25	1	<1
A3	0,69	8,2	15	NA	420	26,3	7,8	1,1	0,1	43	<1	<1
A4	0,3	8,2	16,3	NA	189	54,2	22,4	3,2	0,1	4350	1	<1
A5	1,42	7,9	14,9	NA	174	64,3	25,2	2,8	0,1	<25	<1	<1
A6	1,49	8,1	14,3	NA	172	20,1	13	1	0,1	43	<1	<1
A7	0,1	7,4	15,7	NA	113	44,5	17,2	2	0,1	690	<1	<1
A8	-	7,9	15,2	NA	180	375	315,5	37,5	0,1	585	<1	5,9
B1	0,02	6,7	13,9	9,4	479	47,7	20	2,8	0,1	910	<1	<1
B2	0,41	7,8	11,7	11,1	NA	20,1	20,3	4,6	0,2	-	<1	<1
B3	0,29	8,1	12,2	11,2	NA	8,76	10,8	1,1	0,1	-	<1	<1
B4	0,05	8,1	13,4	10,1	NA	21,1	11,7	1,6	0,1	-	<1	<1
B5	0,24	8,1	12	10,1	NA	22,1	8,3	0,6	0,1	-	<1	<1
B6	0,26	7,9	12,7	10,8	NA	23,4	7,2	0,5	0,1	-	<1	<1
C1	0,46	8,1	10,7	10,8	427	1,08	0,6	0,5	0,8	32	<1	<1
C2	0,55	8,3	10,5	10,9	433	6,7	5	0,2	0,1	43	<1	<1
C3	0,37	8,2	12,7	10,8	426	34,9	19	2,3	0,1	66	<1	<1
C4	0,81	8,3	10,6	11,4	423	25,3	9,5	1	0,1	-	1	<1
C5	0,61	8,5	12,5	10,5	426	7,21	2,7	0,5	0,2	-	<1	<1
C6	0,81	8,4	10,6	10,8	406	48,5	14	1,5	0,1	5550	<1	<1
D1	-	6,7	9,8	12,6	335	525	0,6	0,5	0,8	-	<1	<1
D2	0,35	7,1	10	12,4	311	122	5	0,2	0,1	3850	<1	<1
D3	-	7,5	9,9	4,8	579	860	19	2,3	0,1	4700	<1	<1
D4	0,34	8,1	10,3	11,9	333	201	9,5	1	0,1	6850	<1	159,7
D5	0,11	8,1	12	12,1	323	13,2	2,7	0,5	0,2	-	<1	<1
A3 Rincé	0,26	7,5	9,8	14	152	44,3	8,2	0,6	0,1	7000	166,4	78,8
A8 Rincé	0,03	7,7	9,8	14,7	130	29,8	14,4	1	0,1	325	<1	<1
D3 Rincé	0,34	6,4	7,4	12,7	195	4,91	0,9	0,1	0,1	-	<1	<1

Il est intéressant de noter que la présence de *L. pneumophila* a été détectée dans des échantillons ayant des résiduels de chlore de 0,26 et de 0,34 mg Cl₂/L (Tableau 5-1). La présence des indicateurs bactériens, à savoir les coliformes totaux et les BHA, a été détectée à des concentrations en chlore résiduel jusqu'à 0,8mg Cl₂/L (Figure 5-1). La présence de BHA a aussi été observée dans un échantillon ayant une concentration en chlore résiduel de près de 1,5 mg Cl₂/L, démontrant la persistance de certaines bactéries cultivables malgré les concentrations élevées en chlore résiduel dans le réseau.

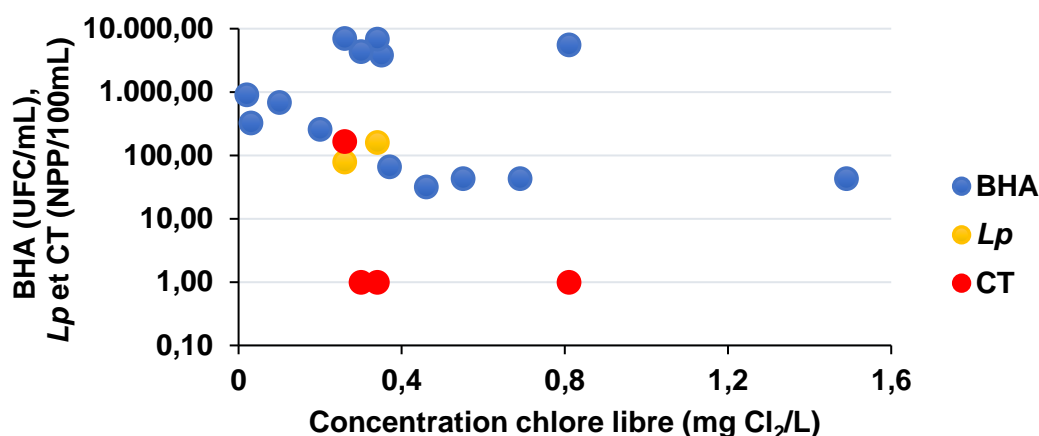


Figure 5-1 : Distribution des concentrations de BHA, CT et *Lp* en fonction de la concentration de chlore libre mesuré dans les échantillons positifs prélevés aux bornes fontaines (n=25).

5.1.1 Détection de *L. pneumophila* en fonction du chlore libre, de la température et de la turbidité

Les échantillons positifs en *Lp* avaient des concentrations en chlore inférieures à 0,34 mg/L. Environ 60% des échantillons prélevés aux bornes fontaines avaient un résiduel de chlore inférieur à cette concentration (Figure 5-2). Étant donné le faible nombre de positifs détectés, et compte tenu de l'absence d'échantillons *Lp* positifs à de faibles concentrations de chlore, il n'est pas possible de conclure sur une possible corrélation entre la concentration en chlore résiduel et détection de *Legionella* dans les échantillons prélevés aux bornes fontaines.

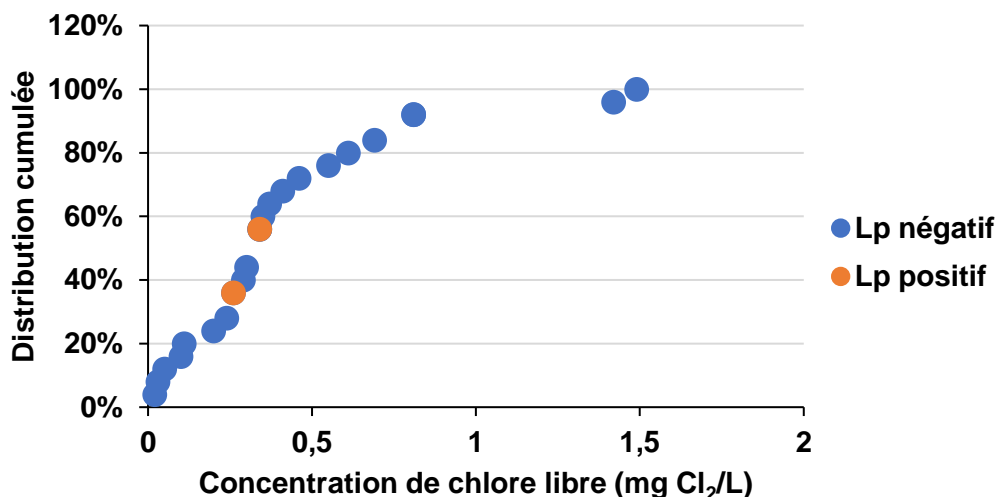


Figure 5-2 : Distribution de la concentration de chlore libre dans les échantillons de BF (n=25). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*.

Les basses températures de l'eau pendant la période hivernale n'ont pas été associées à une positivité moins élevée de *Lp*. En effet, *Lp* a été détectée à des températures aussi basses que 9,8° et 10°C. La quasi-totalité des échantillons prélevés durant cette campagne d'échantillonnage aux BF avait une température supérieure à 9,8°C (Figure 5-3). Comme établi au chapitre 2, *Legionella* croit préférentiellement à des températures supérieures à 25°C. Néanmoins, sa présence à des températures avoisinant 10°C suggère que *Lp* peut survivre dans le biofilm et être détectée dans l'eau même à des températures défavorables à sa prolifération.

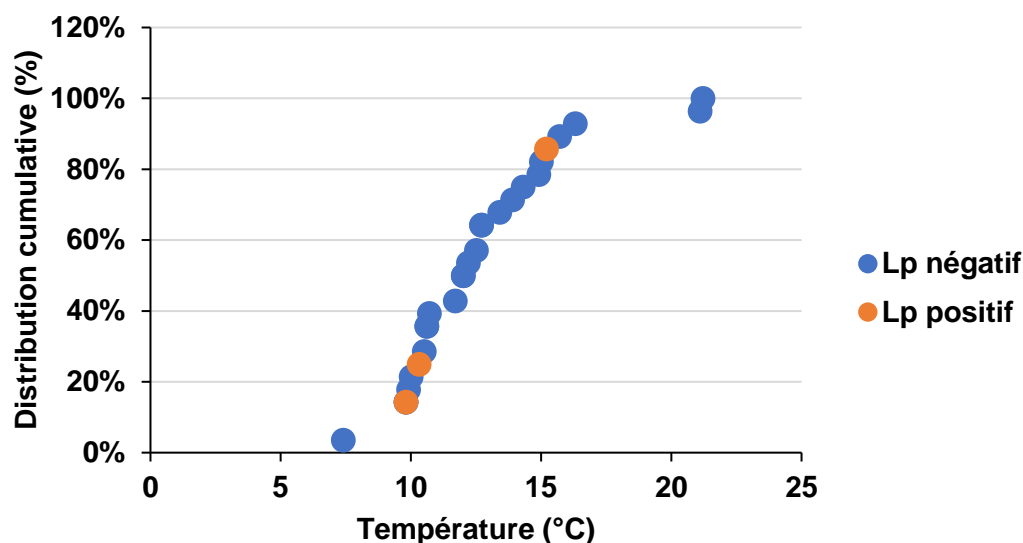


Figure 5-3 : Distribution de la température des échantillons de BF (n=28). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*.

Les valeurs de turbidité des échantillons de BF sont majoritairement inférieures à 100 UTN (Figure 5-4). Le faible nombre d'échantillons positifs en *Lp* et les différentes valeurs de turbidité associées ne permettent pas de conclure sur l'impact de la turbidité sur la positivité. On note toutefois que tous les résultats positifs en légionelle avaient une turbidité supérieure à 40 UTN, une turbidité importante par rapport à la valeur de 5 UTN exigée durant la distribution (Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs (MDDEP), 2010). Des turbidités élevées sont attendues dans les volumes morts de bornes fontaines dont la qualité n'est pas représentative de la qualité de l'eau distribuée.

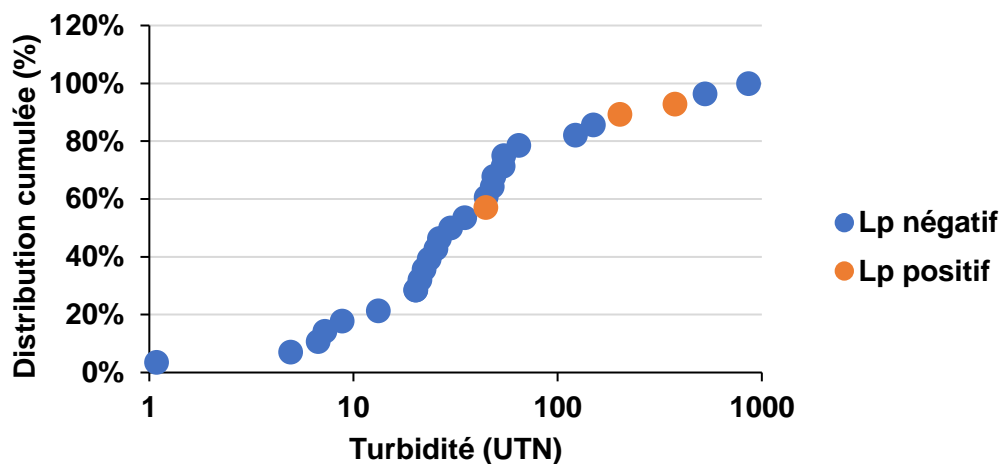


Figure 5-4 : Distribution de la turbidité des échantillons de BF (n=28). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*.

La cultivabilité de *Lp* ne semble pas être limitée par la présence de chlore ou les basses températures. Cependant le nombre de points positifs en culture (n=3) limite la capacité à établir des liens clairs entre ces différents paramètres. Il est encore plus difficile d'étudier l'effet du chlore sur la présence de *Lp* dû à la détection de *Lp* dans un point où la mesure de la concentration de chlore libre n'a pas été possible.

La Figure 5-5 montre la variabilité des paramètres physico-chimiques par rapport à la positivité des échantillons en *Lp*. La température ne semble pas affecter la présence de *Lp* cultivables dans les échantillons. Les échantillons positifs sont présents à des températures similaires à celles des échantillons négatifs. La turbidité des échantillons positifs en culture est plus élevée que celle des échantillons négatifs.

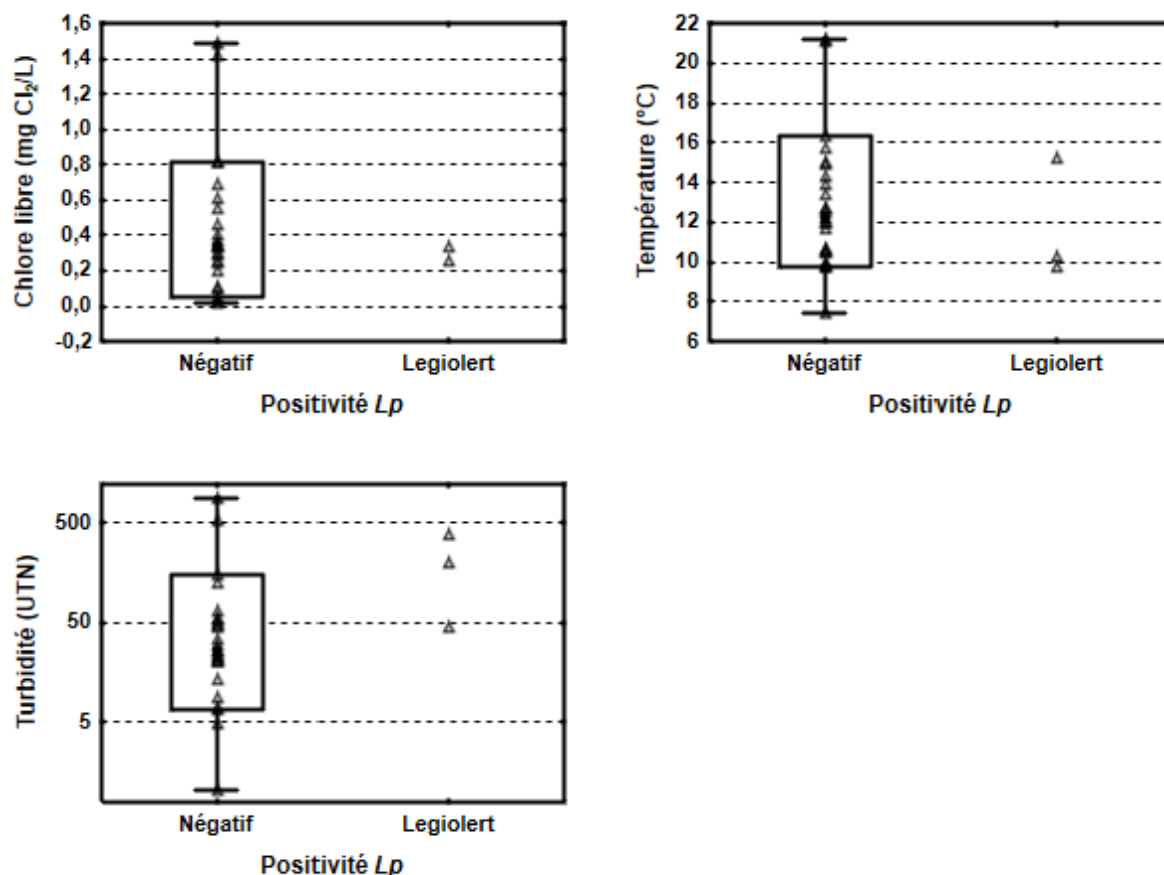


Figure 5-5 : Distribution des valeurs de chlore résiduel (n=25), température (n=28) et turbidité (n=28) mesurées selon la positivité en *Lp* dans l'eau des bornes-fontaines. Les boites représentent les percentiles 10-90%, les carrés la médiane et les moustaches le min-max des valeurs non-aberrantes.

La Figure 5-6 présente les concentrations en fer, aluminium, cuivre et manganèse totaux des échantillons négatifs en *Lp*, en comparaison avec celles des échantillons positifs par culture. Les concentrations en fer total des échantillons positifs sont près de 10 fois supérieures à celles des échantillons négatifs. La présence de concentrations élevées en fer total constitue l'une des principales caractéristiques des eaux rouges et source de turbidité. La présence combinée des échantillons turbides et des concentrations en fer total élevées suggère l'impact des eaux rouges sur le développement de *Lp*.

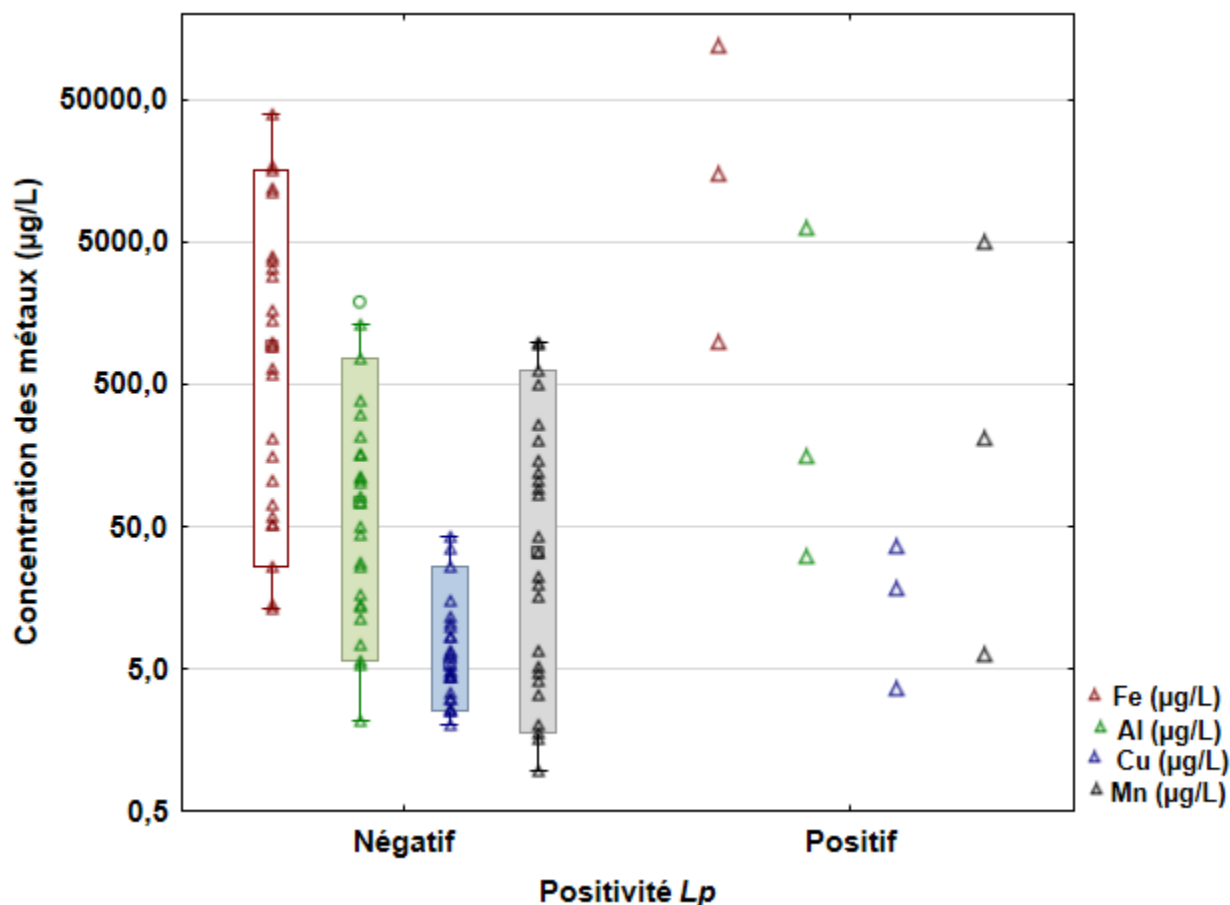


Figure 5-6 : Concentration en métaux totaux, fer, aluminium, cuivre et manganèse, selon la positivité de *Lp* dans l'eau des bornes fontaines (n=26). Les boîtes représentent les percentiles 10-90%, les carrés la médiane et les moustaches le min-max des valeurs non-aberrantes.

5.2 Résultats des échantillonnages avec grands volumes

Les résultats des échantillonnages utilisant une méthode de concentration permettant de concentrer les échantillons sont présentés ci-après. D'abord une vérification de l'impact de la concentration des échantillons sur la détection d'*E. coli* et de *Legionella pneumophila* a été complétée. Ensuite les résultats des suivis dans l'eau en sortie d'usine, en réseau et dans les bâtiments sont présentés.

5.2.1 Vérification du Legiolert et du Colilert sur les échantillons concentrés

Le processus de concentration des échantillons d'eau permet non seulement de concentrer les micro-organismes mais également la matière organique, les métaux et autres contaminants. Cela pourrait inhiber la croissance des bactéries ou causer des problèmes d'interférence lors de l'utilisation d'une méthode enzymatique telle que Legiolert ou Colilert. Le test de vérification réalisé a permis de comparer la croissance d'*E. coli* et de *L. pneumophila* dans l'eau concentrée par rapport à l'eau du robinet filtrée et autoclavée stérile à partir d'une concentration initiale connue. L'échantillon concentré ayant la coloration la plus prononcée a été choisi (Figure 5-7 B). Étant donné le volume de l'échantillon concentré disponible, l'essai n'a pu être réalisé qu'une seule fois sans réplicas.

A**B**

Figure 5-7 : Exemple de deux échantillons d'eau concentrée. A) échantillon concentré du point Bat A2 CW-5MF E ; B) Échantillon concentré du point Bat E2 CW-5MF H.

Les résultats suggèrent que la concentration des échantillons n'affecte pas les méthodes de détection d'*E. coli* ou de *L. pneumophila* utilisées, y compris pour les deux protocoles de Legiolert (Tableau 5-2).

Tableau 5-2 : Concentrations obtenues d'*E. coli* (Colilert) et de *L. pneumophila* (Legiolert) dans des échantillons concentrés 100 fois (échantillon Bat E2 CW-5MF H) et l'eau du robinet filtrée stérile.

Type d'échantillon	Concentration d' <i>E. coli</i> (NPP/100mL)	Concentration de <i>Legionella pneumophila</i> (NPP/100mL)	
		Protocole eau potable	Protocole eau non-potable
Contrôle positif	488	500	500
Concentré	457	477	477

Le Tableau 5-3 présente certains paramètres physico-chimiques de l'échantillon utilisé pour cet essai. La comparaison de l'échantillon non-concentré et de l'échantillon concentré montre une hausse importante des concentrations de fer, d'aluminium, de cuivre et de manganèse rendant l'eau plus turbide. La détection de faibles concentrations de bactéries, par Colilert ou Legiolert, est donc possible en ayant recours à la concentration par ultrafiltration et ne présente pas d'inhibition de la croissance ou d'interférence même sur des échantillons ayant une turbidité et des concentrations en métaux totaux élevés.

Tableau 5-3 : Paramètres physico-chimiques de l'échantillon Bat E2 CW-5MF H non-concentré et concentré.

Paramètres	pH	Alcalinité (mg CaCO ₃ /L)	Turbidité (UTN)	Fer total (µg/L)	Aluminium total (µg/l)	Cuivre total (µg/L)	Manganèse total (µg/L)
Échantillon non-concentré	8,3	72	0,58	30,6	56,4	52,2	1,8
Échantillon concentré	8,2	63,5	11	2471,1	1866,9	523,2	16,3

5.2.2 Résultats généraux

Le Tableau 5-4 regroupe les paramètres physico-chimiques et microbiologiques des points positifs en coliformes ou en *Legionella* prélevés lors des deux campagnes d'échantillonnage avec de grands volumes.

Les analyses microbiologiques réalisées sur les échantillons concentrés ont permis de détecter *L. pneumophila* dans 10 échantillons répartis entre les deux saisons et englobant tous les types d'échantillons. Aussi, 8 échantillons sont positifs aux coliformes totaux, en particulier aux robinets d'eau froide après 5 min de rinçage. Aucun échantillon testé n'a été positif aux entérocoques. Un résiduel de chlore a été détecté dans tous les points d'eau froide à différentes concentrations. L'ensemble des résultats pour tous les points échantillonnés est présenté en annexe A.

L'analyse q-PCR des échantillons de GV a permis la détection de *L. pneumophila* dans trois échantillons à savoir Bat B2 CW-5MF H, Bat E2 CW-5MF H et Bat E2 HW-FD. Parmi ces points seul l'échantillon Bat B2 CW-5MF H n'était pas positif en culture. Il est à noter que certains points, en l'occurrence Bat E1 CW-5MF H et Bat C3 HW-FD, ont présenté une inhibition de l'amplification même après une dilution de 1 :10, il n'a pas été possible d'éliminer la présence d'inhibition lors de la réaction d'amplification.

Tableau 5-4 : Résumé des paramètres physico-chimiques et microbiologiques des points positifs en coliformes ou en *Legionella* des échantillons de grands volumes en hiver puis en été. Bat : bâtiment; HW-FD : eau chaude – 1^{er} jet (20L) ; CW-FD : eau froide – 1^{er} jet (20L) ; CW-5MF : eau froide – 5min de rinçage (100L).

Hiver

Id point	Chlore libre (mg Cl ₂ /L)	pH	Température (°C)	Oxygène dissous (mg/L)	Conductivité (µS/cm ²)	Turbidité (UTN)	Alcalinité (mg CaCO ₃ /L)	CT (NPP/100mL)	BHA (UFC/100mL)	<i>L. pneumophila</i> (NPP/100mL)	Bactéries viables (cellules/mL)	Bactéries totales (cellules/mL)	% bactéries viables
Usine B1-1	0,52	7,2	8,4	11,4	379	0,4	73	<0,01	<1	0,14	190	3,8 10 ⁵	0,05
Bat B1 HW-FD	0,21	6,9	5	11,7	347	1,3	76	<0,01	<25	0,09	480	1,1 10 ³	42,9
Bat B7 CW-5MF	0,69	7,7	4,4	13,4	388	0,6	80	0,02	<1	<0,01	70	3,4 10 ³	2,1
Usine E	0,52	8,4	8,7	11,6	305	0,3	51	0,01	<25	<0,01	610	4,1 10 ³	15,1
Bat E2 CW-FD	0,15	8,5	9,7	11,6	325	0,3	73	<0,01	27	11,11	220	3 10 ³	7,3
Bat E2 HW-FD	0,05	7,6	57,8	-	354	0,4	73	<0,01	<1	3,50	830	3,8 10 ³	21,9
Bat E2 CW-5MF	0,16	8,2	7,5	12,1	305	0,6	72	0,14	<1	0,18	3,3 10 ⁴	1,9 10 ⁵	17,87
Positivité								3/36	5/36				

Tableau 5-4 : Résumé des paramètres physico-chimiques et microbiologiques des points positifs en coliformes ou en *Legionella* des échantillons de grands volumes en hiver puis en été. Bat : bâtiment; HW-FD : eau chaude – 1^{er} jet (20L) ; CW-FD : eau froide – 1^{er} jet (20L) ; CW-5MF : eau froide – 5min de rinçage (100L). (suite)

Été

Id point	Chlore libre (mg Cl ₂ /L)	pH	Température (°C)	Oxygène dissous (mg/L)	Conductivité (µS/cm ²)	Turbidité (UTN)	Alcalinité (mg CaCO ₃ /L)	CT (NPP/100mL)	BHA (UFC/100mL)	<i>L. pneumophila</i> (NPP/100mL)	Bactéries viables (cellules/mL)	Bactéries totales (cellules/mL)	% bactéries viables
Bat A1 CW-5MF	0,84	7,7	20,7	9,3	-	0,3	28	1,45	<25	<0,01	30	7 10 ⁴	15
Bat A3 HW-FD	0,00	8,3	54,3	-	-	0,3	30	0,02	>2500	<0,01	2,1 10 ⁴	2,8 10 ⁵	7,5
Usine B1	0,39	7,2	27,2	8,6	245	0,3	84	<0,01	80	0,03	360	6,5 10 ³	5,5
Bat B1 HW-FD	0,06	7,5	43,3	6,8	261	0,2	82	<1	>2500	0,01	8,1 10 ³	8,3 10 ⁴	9,7
Bat B1 CW-5MF	0,51	7,4	20,7	8,8	262	0,2	81	0,01	51	<0,01	370	2,8 10 ³	13,4
Bat B2 CW-5MF	0,29	7,6	19,1	9,6	270	0,4	83	0,01	39	<0,01	1,4 10 ⁴	8,2 10 ⁴	17,3
Bat C3 CW-FD	0,83	7,1	23,2	8,6	250	0,1	70	<0,01	<25	0,01	ND	30	-
Bat C3 CW-5MF	0,83	7,6	23	8,7	233	0,2	69	<0,01	<25	0,01	30	240	12,5
Bat D2 CW-5MF	0,09	7,9	18,6	9,3	233	0,2	-	0,01	360	<0,01	1,2 10 ⁶	-	-
Bat E2 CW-5MF	0,18	7,1	20,6	8,3	271	0,8	93	<1	<25	0,04	300	5,8 10 ³	5,2
Positivité								5/44	5/44				

La répartition des concentrations des bactéries recherchées selon la concentration en chlore est illustrée à la (Figure 5-8). Les concentrations de chlore libre sont variables de 0,05 à 1,19 mg/L pour les échantillons d'eau froide et sont inférieures à 0,04 mg/L pour les échantillons d'eau chaude. On note 8/80 évènements de positivité pour les coliformes totaux (CT) et 10/80 pour *Legionella pneumophila*, qui sont détectés dans une gamme de concentrations de chlore variant de 0 à 0,84 mg/L.

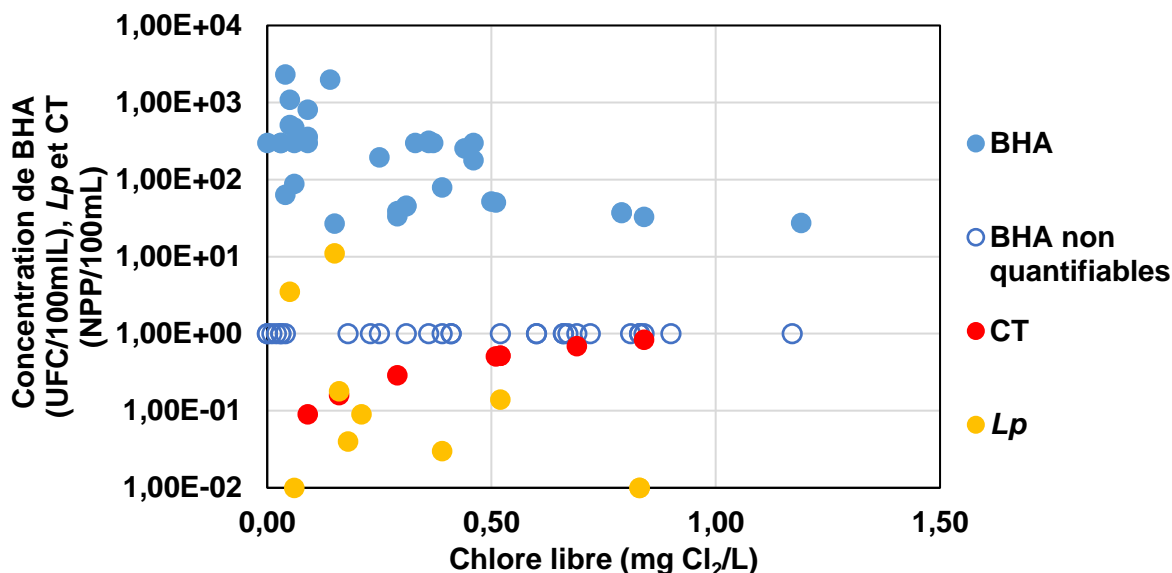


Figure 5-8 : Concentrations de bactéries hétérotrophes aérobies (BHA) (n=63), coliformes totaux (n=8) et *L. pneumophila* (n=10) en fonction de la concentration de chlore libre. Les cercles bleus vides représentent les BHA détectables mais non quantifiables. Les mesures des BHA ont été faites sur les échantillons non-concentrés, et celles des CT et de *L. pneumophila* sur des échantillons concentrés.

Dans le cas des BHA, une diminution est observée en fonction de l'augmentation de la concentration de chlore, quoique des valeurs sous la limite de quantification soient aussi mesurées à des concentrations de chlore de moins de 0,2 mg/L. À partir d'une concentration en chlore libre de 0,5 mg/L, 76% des valeurs en BHA se trouvent à des concentrations inférieures à 100 UFC/100mL et deviennent majoritairement non quantifiables, alors que cette valeur baisse à 43% quand le chlore libre est en dessous de 0,5 mg/L. Ces valeurs sont plus similaires à celles mesurées par LeChevallier (2019), durant une campagne d'échantillonnage de 61 robinets d'eau froide d'un réseau de distribution d'eau potable, qui a retrouvé des concentrations moyennes de BHA de 300 UFC/100mL à des concentrations de chlore libre moyennes de 0,4 mg/L et où 7 points positifs à *Lp* ont été détecté. Les BHA au-dessus de la limite de détection mais au-

dessous de la limite de quantification ont été représentés sur le graphique par un cercle bleu vide et à une concentration de 1 UFC/100mL.

Les coliformes totaux (8/80) ont aussi été détectés dans des échantillons concentrés à des concentrations de 0,01 à 1,45 NPP/100mL. Les CT ont été majoritairement détectés dans les échantillons d'eau froide après 5min de rinçage (6 échantillons), une seule fois en sortie d'usine de traitement et une seule fois dans un échantillon d'eau chaude non-rincé. Similairement, *L. pneumophila* (10/80) a été mesurée à des concentrations de 0,01 à 11,11 NPP/100mL dans des échantillons concentrés. Les points positifs sont répartis sur tous les types d'eau : un point en sortie d'usine de traitement, 3 points d'eau chaude non-rincé, 2 points d'eau froide non-rincé, et 4 points d'eau froide rincé pendant 5min. Sur les 10 points positifs en *Lp*, des BHA ont été détectés dans 3 points. Aussi, la détection simultanée des CT et de *Lp* n'a été observée que pour un échantillon. Ces résultats suggèrent que les BHA et les CT ne sont pas des bons indicateurs microbiologiques de la présence de *L. pneumophila*. Cette absence de corrélation était attendue puisque les coliformes totaux sont des indicateurs généraux de qualité d'eau alors que *L. pneumophila* est un pathogène opportuniste se développant des niches définies. Les faibles détections de pathogènes et d'indicateurs à ces faibles niveaux ont été possibles grâce au recours à la concentration de l'eau collectée.

Il est intéressant d'observer que la viabilité des bactéries diminue avec l'augmentation de la concentration de chlore libre dans l'eau (Figure 5-9). À partir d'une concentration en chlore libre supérieure à 0,5 mg/L, les bactéries viables ont été retrouvées en dessous de la limite de quantification. Ces résultats sont similaires à ceux présentés à la Figure 5-8, où les concentrations des bactéries restent au-dessous de 100UFC/100mL pour les BHA, et 1 NPP/100mL pour les CT et *Lp* lorsque les valeurs de chlore sont plus élevées.

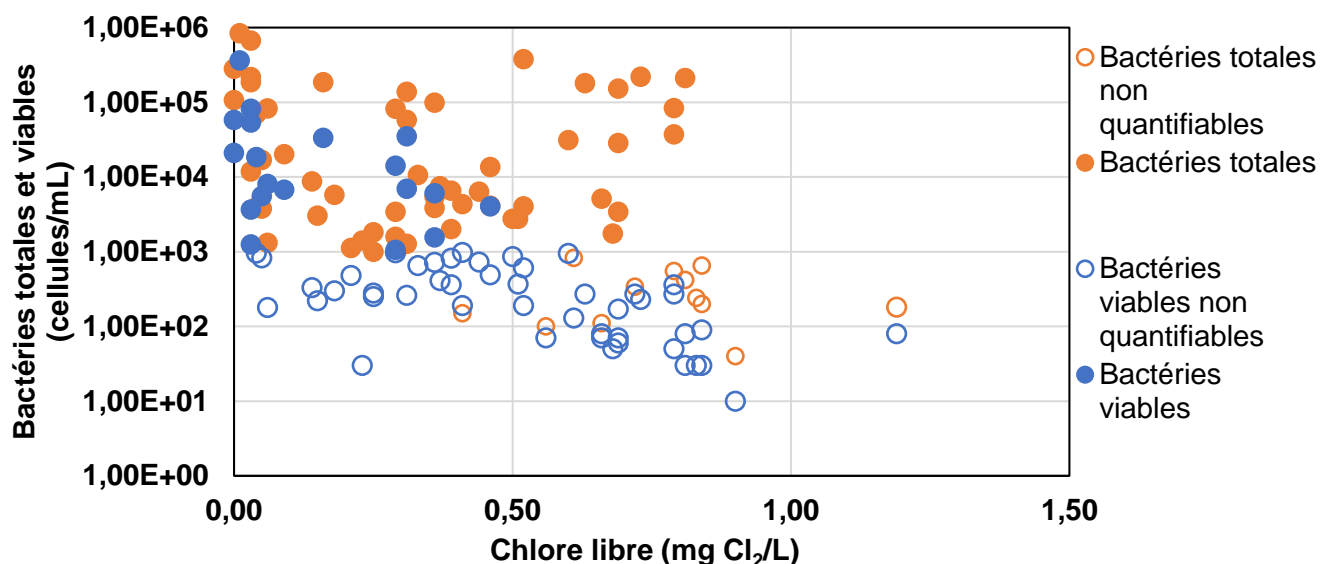


Figure 5-9 : Distribution des bactéries totales et viables mesurées selon les concentrations en chlore libre (n=74). Mesures réalisées sur les échantillons d'eau non-concentrée.

Les comptes de bactéries totales sont légèrement supérieurs à ceux rapportés par Dias (2016) dans un réseau de distribution similaire à ceux étudiés et se rapprochent des valeurs retrouvées dans les culs-de-sac.

Les pourcentages de bactéries viables par rapport aux bactéries totales des échantillons varient en fonction du type d'eau. L'eau prélevée en sortie d'usine se caractérise par des taux de bactéries viables très bas de moins de 1% pour la majorité des points, étant donné que ces comptes bactériens sont en dessous de la limite de quantification. Les taux de viabilité sont plus élevés pour les autres types d'eau, mais se caractérisent aussi par de nombreux points où les comptes de bactéries viables ne sont pas quantifiables.

5.2.3 Impact du chlore libre, de la température et de la turbidité sur la positivité en *L. pneumophila*

La courbe cumulative de la concentration en chlore des échantillons de GV montre la capacité des municipalités à maintenir un bon résiduel de chlore dans le réseau de distribution (Figure 5-11). En effet, près de 70% des points échantillonnés en eau froide ont une concentration en chlore libre supérieure à 0,3mg/L.

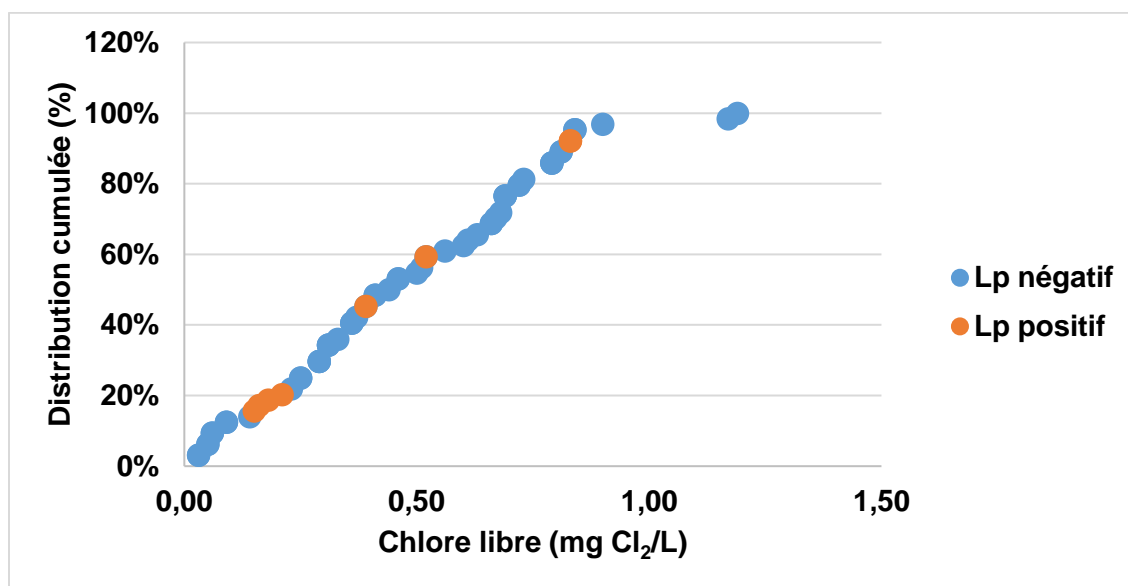


Figure 5-11 : Distribution de la concentration de chlore libre des échantillons d'eau froide GV (1^{er} jet et 5min de rinçage) (n=64). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*. Mesures réalisées sur les échantillons non-concentrés.

De plus, même s'il a été possible de détecter *L. pneumophila* à des concentrations de Cl_2 supérieures à 0,4mg/L, la majorité des points prélevés en eau froide (5/8) sont retrouvés à une concentration de 0,2 mg Cl_2/L et moins. Le maintien d'un résiduel de chlore respectant au minimum les normes établies par le RQEP pourrait contribuer à réduire la prévalence de positifs de *Lp* dans l'eau de ces réseaux, cependant ceci ne signifie pas que ces résiduels pourront être maintenus en bout de réseau ou après des périodes prolongées de stagnation. Cependant, on note aussi la détection de *L. pneumophila* à des concentrations élevées en chlore, jusqu'à 0,83 mg Cl_2/L .

La courbe cumulative de température des échantillons présente trois segments distincts (Figure 5-12). Le premier correspond aux échantillons d'eau froide prélevés durant l'hiver, le second à ceux prélevés durant l'été, et le dernier, aux échantillons d'eau chaude au premier jet.

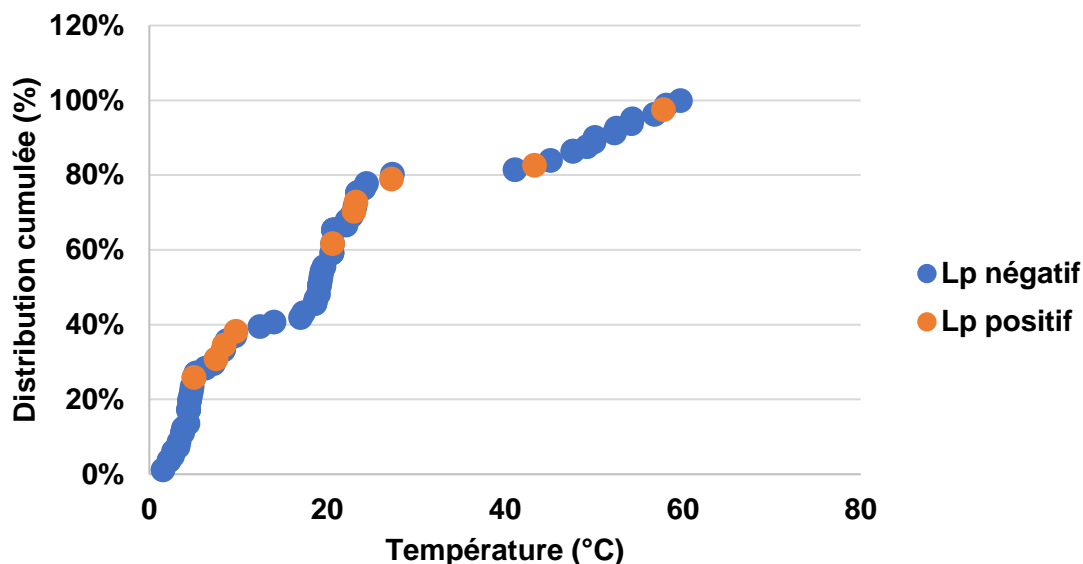


Figure 5-12 : Courbe cumulative de la température des échantillons de GV (n=80). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*. Mesures réalisées sur les échantillons non-concentrés.

La température de l'eau froide varie de 1,5°C en hiver à 27,7°C en été. Des valeurs positives en *L. pneumophila* ont été détectées à différentes températures et au cours des 2 saisons. En hiver, les points positifs ont tous des températures inférieures à 10°C. Dans le réseau d'eau chaude, les températures enregistrées se retrouvent entre 41°C et 60°C. Il est à noter que *Lp* a été détectée aux deux extrémités de cette fourchette de température, à raison de 2 points positifs sur 16 échantillons d'eau chaude, détectés à 43°C et 58°C. Les températures maintenues dans les réseaux d'eau chaude des bâtiments échantillonnés n'étaient pas suffisantes pour offrir un contrôle thermique de *L. pneumophila*.

Les points échantillonnés présentent une faible turbidité comparativement aux valeurs observées dans les bornes fontaines. La Figure 5-13 montre que plus de 80% des échantillons ont une turbidité inférieure à 0,4 UTN. Les points positifs en *L. pneumophila* sont répartis le long de la courbe, avec une détection de *Lp* à une concentration aussi faible que 0,13 UTN. L'absence de turbidité n'est pas indicative de l'absence des pathogènes ciblés.

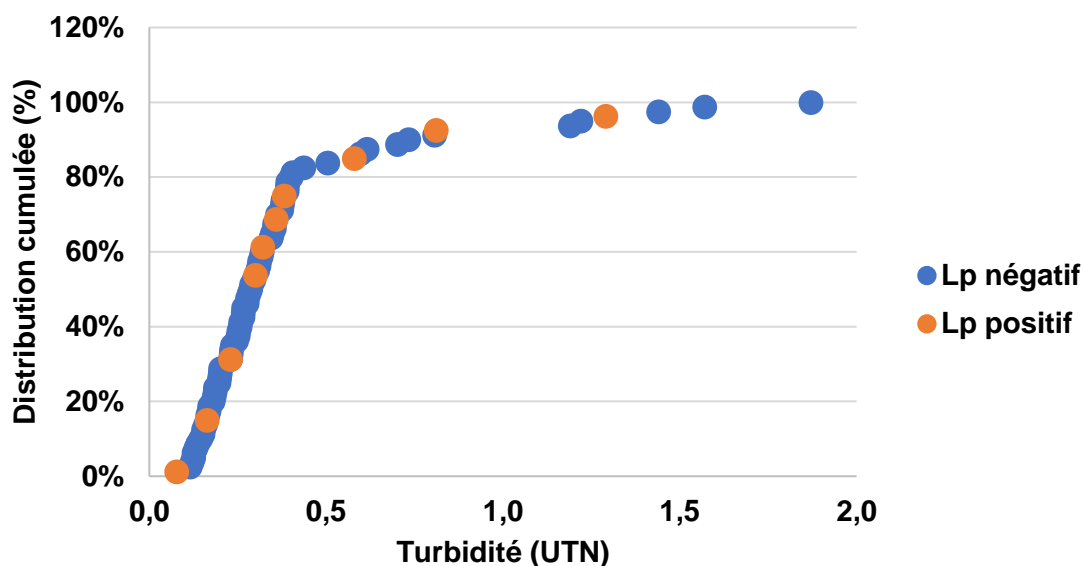


Figure 5-13 : Courbe cumulative de la turbidité des échantillons de GV (n=80). Les cercles bleus représentent les échantillons négatifs et oranges représentent les échantillons positifs pour *Legionella pneumophila*. Mesures réalisées sur les échantillons non-concentrés.

5.2.4 Positivité, types d'échantillons et physico-chimie

La Figure 5-14 présente différents paramètres physico-chimiques en fonction de la positivité en *Lp* et du type d'échantillon. Les échantillons rincés 5 minutes (CW-5MF H) positifs en *Lp* ont des concentrations de chlore libre d'environ 0,2 mg/L, comparativement à une moyenne de 0,47 mg/L pour les échantillons négatifs en *Lp*. Ces mêmes échantillons présentent des valeurs de turbidité supérieures à celles des échantillons négatifs. Cette tendance n'est pas observée pour les échantillons rincés prélevés en été (CW-5MF E).

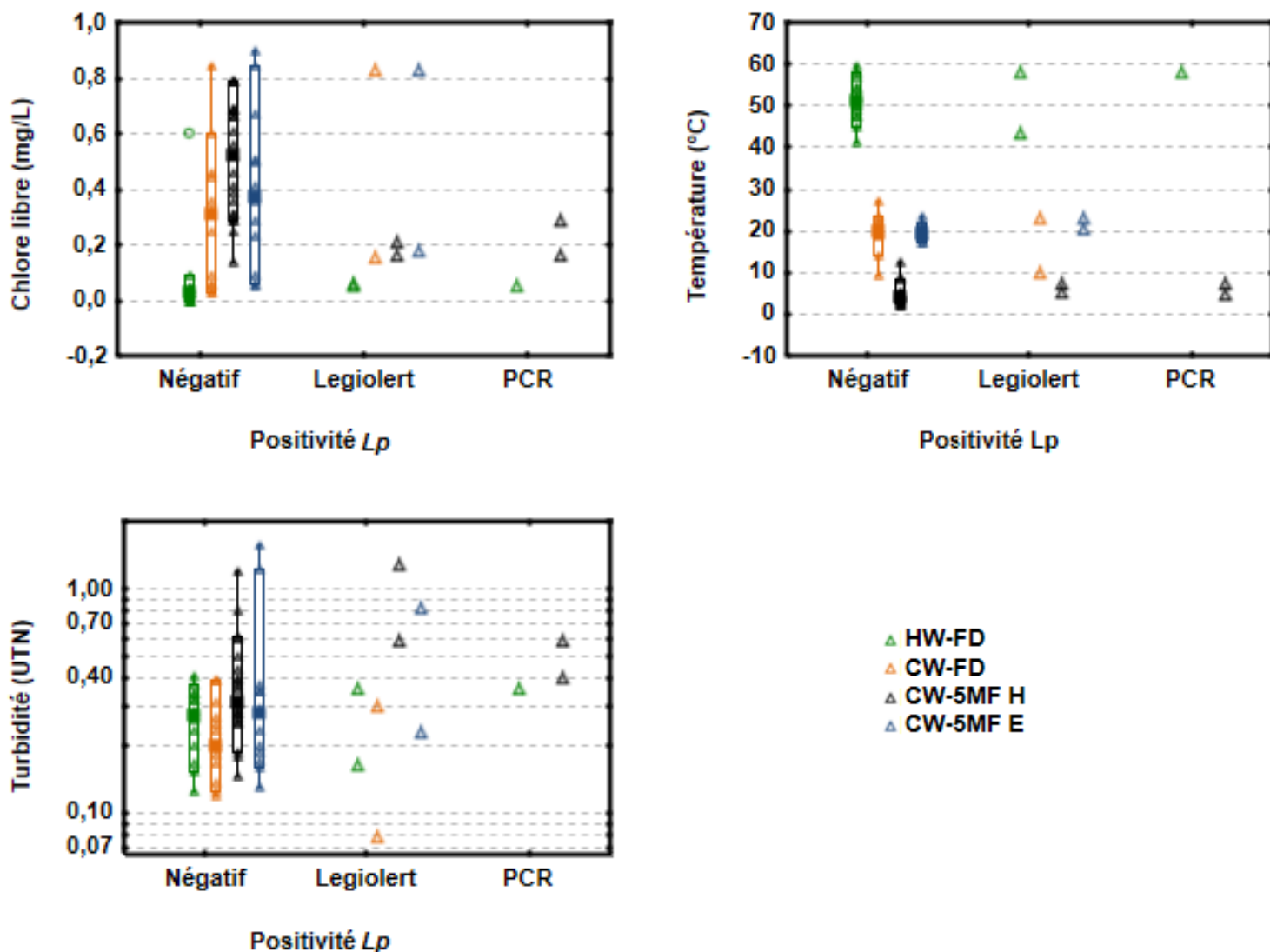


Figure 5-14 : Chlore libre (n=79), température (n=80) et turbidité (n=80) mesurés pour les échantillons de GV négatifs, positifs en culture au Legiolert et en q-PCR. Les boîtes représentent les percentiles 10-90%, les carrés la médiane et les moustaches le min-max des valeurs non-aberrantes. HW-FD : eau chaude – 1^{er} jet ; CW-FD : eau froide – 1^{er} jet ; CW-5MF : eau froide – 5min de rinçage ; H : hiver ; E : été. Mesures réalisées sur les échantillons non-concentrés.

Les échantillons HW-FD positifs à *Lp* montrent des valeurs de chlore libre et de turbidité similaires à celles des échantillons négatifs. Pour tous les types d'échantillons, les valeurs de température ne présentent pas de différence selon la positivité à *Legionella pneumophila*. L'unique point positif par q-PCR en eau

chaude et également positif en culture est retrouvé à une température de 57,8°C qui est supérieure aux températures des points négatifs.

La Figure 5-15 montre les concentrations en métaux totaux en fonction de la positivité en *Lp*. Dû à une erreur d'analyse, les concentrations du fer pour les échantillons d'hiver des municipalités A, B C et D sont erronées et ne sont pas présentées.

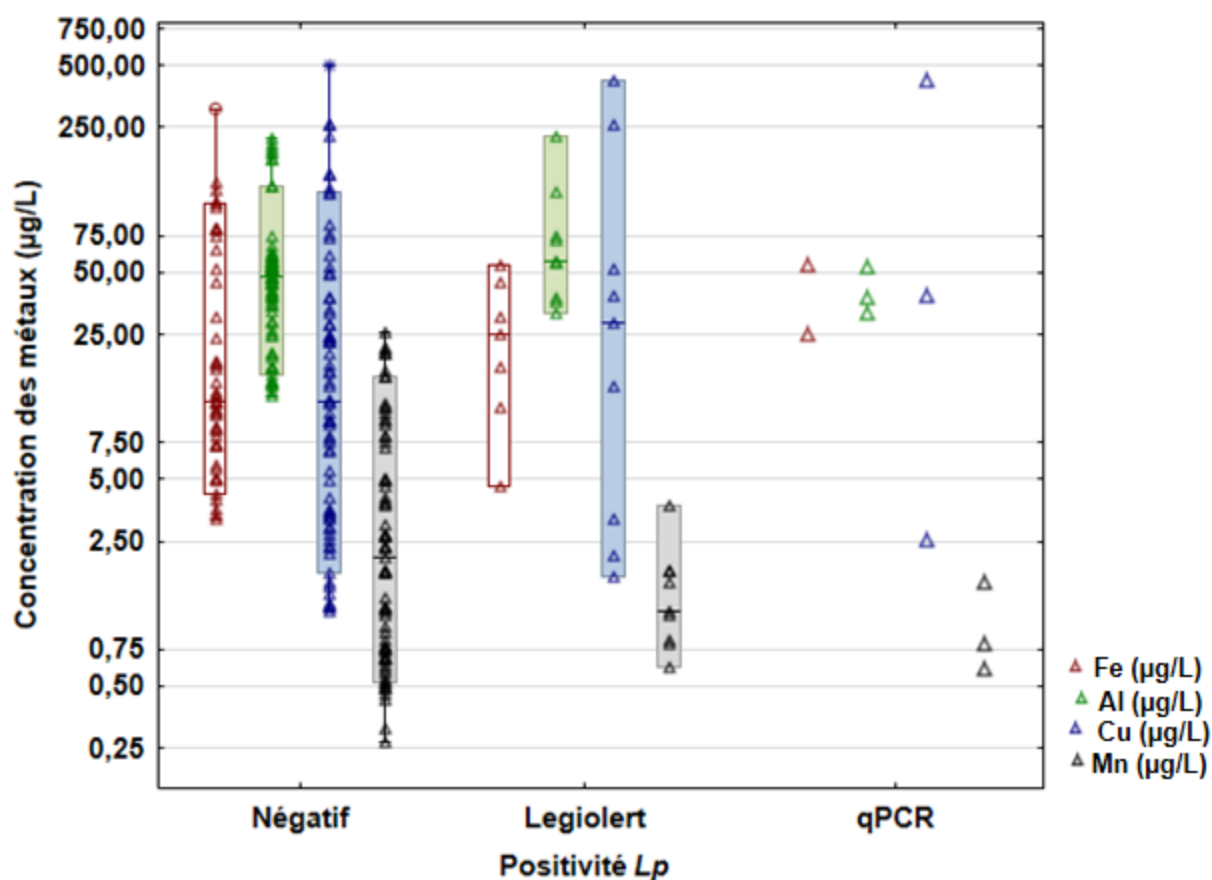


Figure 5-15 : Concentration des métaux totaux, fer (n=54), aluminium (n=80), cuivre (n=80) et magnésium (n=80), des échantillons GV négatifs, positifs en culture par Legiolert ou q-PCR. Les boîtes représentent les percentiles 10-90%, les carrés la médiane et les moustaches le min-max. HW-FD : eau chaude – 1^{er} jet ; CW-FD : eau froide – 1^{er} jet ; CW-5MF : eau froide – 5min de rinçage. Mesures réalisées sur les échantillons non-concentrés.

Les concentrations de fer et d'aluminium totaux des échantillons positifs à *Lp* sont comparables à celles des échantillons négatifs. Les concentrations de manganèse total, en particulier pour les échantillons

positifs par q-PCR, sont inférieures à celles des échantillons négatifs, ce qui est l'inverse de ce qui a été observé avec les résultats d'échantillonnage des bornes fontaines.

Les concentrations en cuivre total pour tous les échantillons ont des valeurs similaires. Les concentrations élevées correspondent aux échantillons d'eau chaude. Pour les échantillons positifs, une valeur maximale de 420 µg/L est mesurée au point de bâtiment Bat E2 HW-FD H.

CHAPITRE 6 DISCUSSION

Les résultats de recherche obtenus montrent la faible prévalence de *Legionella pneumophila* dans les réseaux de distribution d'eau municipaux, mais suggèrent une capacité de survie dans des conditions qui ont précédemment été documentées comme défavorables à la légionelle. L'utilisation d'une méthode de concentration par grand volume a permis la détection de faibles signaux de légionelle et de coliformes qui n'auraient pas été détectés par l'utilisation des méthodes d'échantillonnage et de filtration habituelles. Afin de positionner les résultats obtenus par rapport aux études déjà publiées, la discussion est structurée en fonction des différents paramètres étudiés et de leur importance relative. L'impact des caractéristiques physico-chimiques de l'eau, l'importance du choix de méthodes de suivi et l'influence du type d'eau sur la positivité en légionelles sont présentés dans cette section.

6.1 Positivité et méthodes de détection

6.1.1 Récapitulation des résultats

L'échantillonnage des bornes fontaines puis du réseau en prélevant des grands volumes (20L et 100L) a permis de détecter *L. pneumophila* dans tous les types d'échantillons collectés, à savoir au niveau des bornes fontaines (3/28), en sortie d'usine (2/12), en eau chaude au 1^{er} jet (2/16), en eau froide au 1^{er} jet (2/15) et en eau froide après 5min de rinçage (4/38). Les concentrations de *Lp* mesurées en BF avait atteint 160 NPP/100mL, alors qu'en GV, les concentrations mesurées étaient en bas de 1 NPP/100mL à l'exception de deux échantillons prélevés au 1^{er} jet dont la concentration avait atteint 11 NPP/100mL. La détection de coliformes totaux a aussi été possible dans les échantillons de BF (4/28), et de GV (8/80).

6.1.2 Vérification de l'inhibition

Il est important de vérifier que les analyses microbiologiques réalisées ne sont pas inhibées afin de d'éviter des résultats faussement négatifs. La vérification de l'inhibition a été réalisées pour les analyses de Legiolert et de Colilert réalisées sur les échantillons concentrés de grands volumes et a permis de confirmer que la concentration n'engendre pas l'inhibition des réactions.

Similairement, des tests de recouvrement de micro-organismes dans différents échantillons filtrés ont été réalisés par Heijnen and Magic-Knezev (2010) en comparant les concentrations en microorganismes avant

et après la concentration de l'échantillon. Après la concentration de 100 fois d'échantillons de 40 à 50L, ils ont pu avoir des taux de recouvrement de *E. coli* cultivé sur gélose, dépassant 100%, possiblement dû à la séparation d'agrégats bactériens durant la filtration. En général, les résultats retrouvés par Heijnen and Magic-Knezev (2010) montrent des taux de recouvrement dépassant 80% pour *E. coli*, *Enterococci*, *Clostridia*, *Cryptosporidium* et *Giardia* après la concentration de grands volumes d'eau potable atteignant 1000 L de différentes sources.

Un contrôle de l'inhibition est aussi réalisé lors de l'analyse q-PCR des échantillons. Le kit utilisé iQ-Check Quanti *L. pneumophila* inclus un contrôle interne permettant de détecter les éventuels phénomènes d'inhibition. Pour tous les échantillons analysés, l'inhibition de la réaction q-PCR a été détectée dans deux échantillons de GV : Bat E1 CW-5MF H et Bat C3 HW-FD.

6.1.3 Impact des limites de détection sur la positivité

L'utilisation de la méthode de concentration des grands volumes échantillonnés a permis d'avoir des limites de détection plus basses. Pour les échantillons concentrés de 20 L, chaque 100 mL d'eau concentrée analysée équivaut à 2 L d'échantillon non-concentré alors que pour les échantillons de 100 L, chaque 100mL d'eau concentrée équivaut à 10 L d'eau non-concentrée. Par conséquent, les limites de détection de Colilert, Legiolert et Enterolert, suite à l'analyse de 100 mL d'eau concentrée, sont passées à 1 NPP/10L d'eau non-concentrée, ou 1 NPP/2L d'eau non-concentrée pour les échantillons de GV de 20 L. Cela se traduit aussi lors de la lecture des résultats par des concentrations mesurées très basses, équivalentes à des concentrations de 0,1 NPP/100mL dans de l'eau non-concentrée. Les concentrations de *Lp* et de CT obtenues par cette méthode d'analyse sont majoritairement en bas de la limite de détection des échantillons d'eau non-concentrée; seulement 2 échantillons positifs en *Lp* sur 10 ont une concentration supérieure à 1NPP/100mL d'eau non-concentrée, alors qu'un seul échantillon positif en CT sur 8 à une concentration supérieure à 1 NPP/100mL d'eau non-concentrée. Cela signifie que le recours à la méthode d'échantillonnage aux grands volumes puis l'analyse des échantillons concentrés augmente considérablement le nombre de positifs.

La méthode de concentration de grands volumes est une méthode de recherche et de dépistage de sources de contamination qui n'est pas et ne devrait pas être utilisée pour un suivi réglementaire. La détection réglementaire vise le dénombrement dans un volume prescrit d'indicateurs de contamination ou de qualité

comme les BHA et les CT dans un volume après un rinçage d'au moins 5 minutes. Dans le cas des indicateurs de qualité, on ne vise pas l'absence totale dans un volume de référence mais plutôt une valeur seuil ou d'une positivité relative. Dans le cas d'indicateurs de contamination fécale comme *E. coli* ou les entérocoques, l'absence de positifs dans un volume prescrit est requis. Dans le cas de détection de pathogènes comme *L. pneumophila*, l'absence est souhaitée mais un suivi réglementaire n'est pas exigé. La concentration permet de détecter des concentrations de *L. pneumophila* et d'indicateurs dans le réseau de distribution qui ne seraient pas détectées si des volumes de prélèvements réglementaires étaient utilisés.

L'Annexe 1 du RQEP précise que l'eau potable prélevée à des fins d'analyse microbiologique doit être exempte de micro-organismes pathogènes et de microorganismes indicateurs de contamination fécale comme *E. coli* et les bactéries entérocoques. Implicitement, la prescription des méthodes d'analyse et des volumes considérés balise la détection des indicateurs de qualité et de contamination fécale. Toutefois, l'absence de prescription pour la détection (obligation, protocole d'échantillonnage et méthode d'analyse) pour les pathogènes laisse une détection positive ouverte à l'interprétation.

Compte tenu de ces nuances d'interprétation, il apparaissait nécessaire de fournir un cadre d'interprétation pour les résultats de mesures dans des volumes concentrés. Un outil décisionnel a été développé et proposé conjointement avec la CISSS de la Montérégie et le MELCC pour gérer les points positifs (Tableau 6-1). Cet outil décisionnel précise les actions requises en cas de détection de *E. coli*, entérocoques et *L. pneumophila* par la méthode de concentration de grands volumes (GV).

Un des aspects intéressant de cette démarche consiste en la collecte d'échantillons de type réglementaire en parallèle de la collecte d'échantillons de grands volumes et a été effectuée pour les échantillons d'eau prélevés après 5 minutes de rinçage. Un échantillon réglementaire de 100mL peut être facilement prélevé en parallèle des échantillons grands volumes. L'action requise selon le RQEP est donc définie en fonction des deux résultats obtenus à la fois sur l'échantillon concentré et sur l'échantillon réglementaire non-concentré.

Avec cette approche, le consensus a résulté en l'investigation de la source de contamination est nécessaire dès que la concentration dépasse 0,1 NPP/100mL pour *E. coli*, et un avis d'ébullition est émis à partir de 1 NPP/100mL. Pour *L. pneumophila*, un seuil de 10 NPP/100mL a été établi comme seuil pour nécessiter une investigation de la source de contamination. Toutes les concentrations mesurées après 5 minutes de

rinçage dans le cadre de la campagne d'échantillonnage étaient largement en dessous des seuils nécessitant une intervention.

La méthode d'échantillonnage des grands volumes utilisée est cependant difficilement applicable pour des échantillonnages de suivi réglementaire en raison de la lourdeur des procédures de concentration. Toutefois, le recours à des volumes d'échantillonnages supérieurs à 100 mL augmente la probabilité de détecter des micro-organismes recherchés. Dans une simulation de la contamination d'un réseau de distribution d'eau potable par *E. coli*, Hatam et al. (2020) avancent que la probabilité de détection d'*E. coli* dans l'eau augmente lorsque le volume d'eau analysé est de 1 L comparé au volume réglementaire de 100 mL.

Tableau 6-1 : Outil décisionnel lors de la détection de *E. coli* et *L. pneumophila* lors d'échantillonnage de grands volumes

E. coli

Échantillon concentré (NPP/100mL non concentré)	Échantillon réglementaire (100mL)	
	Non détecté < 1 NPP/100mL	≥ 1 NPP/100mL
Non-détecté (< 0,007 NPP/100mL ¹)	Aucune action	Article 36 RQEP
$0,007 \leq x < 0,1$ NPP/100mL	Aucune action	
$0,1 \leq x < 1$ NPP/100mL	Aviser DRSP et investiguer	
≥ 1 NPP/100mL	Article 36 RQEP	

¹ Un volume de 100 mL d'échantillon concentré est équivalent à 15L non-concentré, donc 1 NPP dans 100 mL concentré = 0,007 NPP dans 100 mL d'échantillon non-concentré

Legionella pneumophila:

Échantillon concentré (NPP/100mL non concentré)	Action
Non-détecté < 0,007 NPP/100mL ¹	Aucune action
$0,007 \leq x < 10$ NPP/100mL ²	Aucune action – faible présence
≥ 10 NPP/100mL ²	Aviser DRSP et investiguer

¹ Un volume de 100 mL d'échantillon concentré est équivalent à 15L non-concentré, donc 1 NPP dans 100 mL concentré = 0,007 NPP dans 100 mL d'échantillon non-concentré

²Équivalent à 100 NPP/L, inférieur au seuil d'intervention dans les réseaux d'eau des établissements de santé en France et en Angleterre

L'utilisation de la PCR quantitative a permis la détection d'un seul point positif additionnel (Bat B2 CW-5MF H) et la confirmation de deux points détectés en culture par Legiolert (Bat E2 CW-5MF H et Bat E2 HW-FD). Hsu et al. (2009) ont détecté *Legionella* dans 5 échantillons sur 34 par culture qui étaient négatifs en q-PCR, et à l'inverse, 5 autres échantillons qui étaient positifs par q-PCR mais négatif par culture. La revue de littérature présentée par Whiley and Taylor (2014) compare 28 études où la détection de *Legionella* est faite par culture et par q-PCR. Sur les 28 études, 25 ont retrouvé des taux de *Legionella* plus élevés par q-PCR que par culture. Whiley and Taylor (2014) rapportent que 50% des échantillons analysés sont positifs en q-PCR et que seulement 34% de ces échantillons sont aussi positifs en culture. Cette différence s'explique notamment par la détection des bactéries viables mais non cultivables par q-PCR, et possiblement la détection d'ADN provenant de bactéries mortes. Donohue (2021) rapporte une détection de *Lp* dans le réseau de distribution 8 fois plus importante par q-PCR (24%) comparé à la culture (3%). Cette différence est due aux limites de détection des méthodes utilisées dans l'étude qui sont de 100 cellules équivalentes/L pour la q-PCR, et 500 UFC/L pour la culture.

La capacité de détection par des méthodes moléculaire dépend de la qualité de l'échantillon et de la quantité d'ADN analysée. Dans le cas de la présente étude, les échantillons proviennent de deux sources différentes : les échantillons BF sont des échantillons d'eau rouge, ayant des concentrations de particules et de métaux élevées et les échantillons de GV qui sont concentrés jusqu'à 100 fois. Dans les deux cas, la présence d'inhibiteurs d'amplification PCR est possible. La présence d'inhibiteurs a d'ailleurs été détectée dans deux échantillons sur les 80 analysés. Une dilution 1:10 a permis de réduire la présence d'inhibiteur, mais la dilution diminue également la concentration d'ADN de *L. pneumophila* dans le volume analysé et réduit les chances de détection. En particulier pour les échantillons de GV, les concentrations de *L. pneumophila* retrouvées étaient très faibles. Étant donné que la limite de détection par q-PCR dépend du volume d'ADN analysé et du volume d'échantillon extrait, en considérant un volume filtré moyen de 200mL d'eau, la limite de détection est alors de 100 UG/L pour les échantillons de BF non-concentrés, 5UG/L pour les échantillons de 20L de GV et 1 UG/L pour les échantillons de 100 L de GV. Les deux points positifs en culture et en q-PCR ont des concentrations en culture au-dessus de la limite de détection. Cependant, lors du processus d'extraction d'ADN, des pertes sont possibles notamment lors de l'extraction mécanique par bead-beating où le filtre pourrait ne pas être complètement défait, en particulier pour les échantillons de BF qui étaient caractérisés par d'importants dépôts de particules sur le filtre.

La détection par q-PCR de l'échantillon Bat B2 CW-5MF H témoigne de la présence d'ADN de *Lp*, qui peut provenir de bactéries mortes (efficacité de la désinfection, mais risque potentiel de croissance dans le futur) ou de bactéries viables mais non-cultivables (VBNC) dans le réseau. La présence des bactéries VBNC dans un réseau peut être préoccupante puisque la présence de conditions plus favorables ou de protozoaires hôtes pourraient entraîner un regain de cultivabilité. L'utilisation combinée de la culture et de la q-PCR permet d'avoir une vue d'ensemble sur la qualité de l'eau des réseaux et de son évolution dans les temps.

6.2 Impacts de la qualité physico-chimique de l'eau sur la positivité

Les différences de distribution des valeurs des paramètres physico-chimiques observées en fonction de la positivité des micro-organismes recherchés ont été analysés en utilisant le test Kruskal-Wallis. La positivité n'était pas expliquée par des différences significatives entre les paramètres physico-chimiques tel que montré par les p-value obtenues au-dessus de 0,05.

Chlore. Les résultats obtenus montrent une détection possible de *L. pneumophila* à différentes concentrations de chlore libre allant jusqu'à 0,83 mg Cl₂/L. La présence de chlore libre contribue cependant à baisser la concentration des bactéries viables dans l'eau (Figure 5-10). Cela montre que la présence d'un résiduel de chlore d'au moins 0,3 mg/L en sortie d'usine de traitement, soit la valeur recommandée par le Ministère du Développement durable (2017) dans son guide de bonnes pratiques, ne garantit pas l'absence de bactéries indicatrices ou pathogènes.

Dans le cadre d'une vaste étude menée par LeChevallier (2019) dans 10 municipalités américaines, 13 des 317 échantillons représentatifs de l'eau dans les réseaux de distribution étaient positifs à *Lp* par Legiolert. La majorité des points positifs ont été retrouvés en présence de concentrations de chlore libre inférieures à 0,3 mg/L. À la lumière des résultats de cette étude, ces auteurs ont suggéré que le maintien d'une concentration de chlore libre de 0,1 mg/L est suffisant pour contrôler la croissance de *Legionella* (LeChevallier (2019)). Or, les résultats présentés dans ce mémoire montrent que tous les échantillons positifs à *Lp* prélevés en eau froide ont été retrouvés à des concentrations de chlore résiduel supérieures à 0,1 mg/L et que la moitié de ces échantillons (4/8) sont retrouvés à des concentrations de chlore libre supérieures à 0,3 mg/L.

L'occurrence de *L. pneumophila* à différentes concentrations de chlore résiduel a aussi été rapportée par Donohue et al. (2019b). Dans cette étude, 70% des échantillons d'eau froide prélevée au robinet et ayant une concentration de chlore libre inférieure à 0,01 mg Cl₂/L étaient positifs pour *Lp* (19/27) par q-PCR alors que 42 % des échantillons ayant une concentration de plus de 1,5 mg Cl₂/L (5/12) étaient positifs à *Lp* par q-PCR. La présence d'un résiduel de chlore diminuerait le risque de contamination mais ne garantit pas l'absence totale de *Legionella*.

Dans une étude visant à déterminer la prévalence de *L. pneumophila* Sg1 dans les réseaux de distribution aux États-Unis, 16% des robinets alimentés par une eau désinfectée au chlore étaient positifs à *L. pneumophila* Sg 1 alors que 8,6% des robinets alimentée par une eau désinfectée aux chloramines étaient positifs (Donohue et al., 2014b). L'utilisation des chloramines comme désinfectant résiduel est plus efficace que le chlore pour diminuer la croissance de *Legionella* mais ce n'est pas une protection absolue, les bactéries pourraient résister à des concentrations élevées de désinfectant. Dans une étude réalisée sur 256 échantillons de réseaux d'eau potable désinfectée aux chloramines, un seul échantillon a été positif à *L. pneumophila* à une concentration de chlore total de 3 mg/L (LeChevallier, 2019). Aussi, les concentrations de mycobactéries pourraient être plus élevées dans les échantillons désinfectés aux chloramines, en particulier dans l'eau froide (Donohue et al., 2019b; Donohue et al., 2014b; Rhoads et al., 2017c). Cependant, une étude réalisée par Lytle et al. (2020) visant à étudier l'effet de la désinfection à la monochloramine du réseau d'eau chaude d'un hôpital sur la croissance des micro-organismes pathogènes, en l'occurrence *Legionella* et les mycobactéries, trouve que l'ajout du désinfectant permet une diminution significative des concentrations de *Legionella* et de *Mycobacterium* détectés. Les chloramines peuvent être utilisées comme désinfectant au lieu du chlore, néanmoins l'eau des réseaux de distribution étudiés est désinfectée au chlore.

Turbidité. Les points positifs à *Lp* dans les BF ont des valeurs de turbidité légèrement supérieures à celles des points négatifs. La turbidité offre une surface supplémentaire aux bactéries pour se fixer et une barrière physique entre les micro-organismes et les désinfectants. De plus, la présence des particules pourrait contribuer à la consommation du désinfectant et par conséquent diminuer la concentration de chlore libre dans les conduites et éliminer un facteur important d'inhibition de la croissance des bactéries. La présence de la turbidité dans les réseaux de distribution peut être liée à plusieurs causes : une filtration inadéquate dans l'usine de traitement, la corrosion des conduites, la croissance bactérienne et la présence

de biofilm, ou suite à des contaminations et des infiltrations externes (Vreeburg and Boxall, 2007). Les bornes fontaines font partie des bouts de réseaux où les durées de stagnation de l'eau fournissent un environnement propice au développement du biofilm et à l'oxydation des conduites, rendant l'eau plus turbide.

Température. Des points positifs à *Lp* ont été détectés entre 5 et 58°C, autant en été, en automne qu'en hiver et dans les réseaux d'eau chaude et froide. Tous les échantillons positifs en automne (BF) et en hiver (GV) étaient à des températures inférieures à 16°C. LeChevallier (2019) recommande de garder les réseaux d'eau à une température inférieure à 15°C pour inhiber la croissance de *Legionella*. Les résultats présentés suggèrent qu'une température froide n'assure pas une non détection de *Lp*. La détection de *Lp* dans l'échantillon E2 en hiver peut aussi être potentiellement due à la présence de *Lp* dans les réseaux internes des bâtiments dont la température est plus propice à la croissance des bactéries. Le biofilm formé sur les parois des conduites des réseaux internes des bâtiments pourrait se détacher lors de l'échantillonnage après 5 minutes de rinçage.

Le maintien de température plus faible que 20°C pourrait toutefois réduire le nombre de positifs et les concentrations détectées (Arvand et al., 2011). Dans leur étude, Arvand et al. (2011) ont montrés que 35% et 28% des échantillons ayant une température inférieure à 20°C et à 15°C respectivement étaient positifs à *Legionella* alors que 60% des échantillons d'eau froide ayant une température supérieure à 20°C étaient positifs.

Métaux totaux

Fer. Dans les échantillons de BF, les points positifs à *Lp* ont des concentrations moyennes en fer total plus élevées (45,4 mg/L) que celles des points négatifs (4,6 mg/L). Le fer étant essentiel à la croissance de *Legionella*, les résultats retrouvés sont en accord avec la littérature (van der Lugt et al., 2017). Dans leur étude, van der Lugt et al. (2017) avaient montré que la présence de fer favorisait la prolifération de *Legionella*. Lors de l'éclosion de Flint, MI, la présence d'eau rouge était un facteur dominant et avait non seulement fourni les nutriments nécessaires à la multiplication de *Legionella* mais avait aussi causé l'oxydation et la disparition de chlore résiduel dans le réseau (Rhoads et al., 2017a). Lors de l'événement d'eau rouge de Flint, MI, les concentrations moyennes de fer dans les échantillons rincés des bâtiments ont atteint 121 µg/l en août 2015 (Rhoads et al., 2017a). Cependant, des concentrations beaucoup plus

élevées ont aussi été rapportées à une moyenne de 3,1 mg/l dans les échantillons rincés et 9 mg/L dans le cas d'un échantillon non rincé (Pieper et al., 2017). Le contrôle du fer dans l'eau est d'autant plus important étant donné son impact non seulement sur la prolifération mais aussi sur la virulence de *L. pneumophila* (Section 2.1.1.2). Les concentrations de fer total mesurées dans les BF sont plus élevées que celles retrouvées à Flint, néanmoins, les BF sont des points aux extrémités du réseau et ne sont représentatifs du système de distribution, mais la présence d'eau rouge permet de donner une idée sur l'occurrence de *L. pneumophila* dans des conditions d'eau rouge. L'éclosion de *Legionella* de Flint se caractérise en plus par un changement soudain de la qualité de l'eau qui a causé un dérèglement de l'équilibre établi à la surface des conduites et le relargage des dépôts.

Le recours au rinçage des conduites permet d'évacuer l'eau colorée et chargée en particules. Le point A3, initialement négatif à *Lp* et aux CT, a été rincé de manière prolongée par la municipalité : plusieurs rinçages d'environ 3 heures, puis des rinçages de 10 à 30 min ou jusqu'à disparition de la couleur. À la suite du rinçage, la présence de coliformes totaux a été mesurée à des concentrations de 166 NPP/100mL et de *Lp* à des concentrations de 78 NPP/100mL. La détection accrue de ces bactéries dans l'eau après le rinçage est probablement due à la remise en suspension des dépôts meubles et d'une partie du biofilm, notamment en raison des forces de cisaillement lors du rinçage qui ont causé le détachement partiel de bactéries fixées à la surface des conduites. Comme discuté à la section 2.2, certains documents recommandent d'éviter des vitesses de rinçage trop élevées et de viser une vitesse de 1,5 m/s pour minimiser le détachement des dépôts de corrosion (Ministère du Développement durable, 2017).

Dans les échantillons de GV, les concentrations en fer total sont similaires entre les points positifs et négatifs à *Lp*. Les concentrations mesurées dans ces échantillons sont aussi beaucoup plus basses, et restent en dessous de la limite esthétique de 0,3 mg/L (Santé Canada, 2020), que les concentrations en fer total des échantillons de BF. Pour les GV, les concentrations maximales sont mesurées autour de 0,1 mg/L alors que celles des BF étaient plus de 1000 fois plus élevées et atteignaient un maximum de plus de 120 mg/L. Cette différence pourrait être attribuée aux longs temps de séjours dans les extrémités des réseaux, en particulier dans les BF où la stagnation contribuerait à diminuer la concentration des oxydants et favoriserait la corrosion des conduites et le relargage du fer. Même si les bâtiments échantillonnés aux GV ont des historiques d'eaux rouges, aucun événement n'a été reporté durant la période de prélèvement. Il serait pertinent d'investiguer ces réseaux en présence d'eau rouge. La présence de fer dans les conduites

reste cependant un élément qui favorise la croissance de *Lp*. Une comparaison de l'effet de plusieurs types de conduites sur la croissance de *Lp* montre que la présence de fer, simulant une conduite en fonte ou des dépôts de corrosion, favorise la croissance de *Lp* dans l'eau (Dai et al., 2018).

Cuivre. Les concentrations de cuivre total mesurées dans les échantillons de GV sont plus élevées que celles des échantillons de BF, particulièrement dans les échantillons d'eau chaude. Ces valeurs plus élevées sont attribuées principalement au cuivre présent dans les conduites du réseau interne du bâtiment ou le laiton des joints et connexions. Il a été possible de détecter *Lp* dans un échantillon d'eau chaude à une concentration de cuivre de 0,4 mg/L. Le cuivre a un effet inhibiteur et même toxique à *Legionella* et à ses hôtes, mais à des niveaux beaucoup plus élevés. La croissance de *Legionella* a été rapportée dans des eaux provenant de conduites en cuivre, ayant des concentrations de 0,8 mg Cu/L (Bargellini et al., 2011; Boppe et al., 2016). *Legionella* peut aussi se multiplier au laboratoire à des concentrations de cuivre qui peuvent atteindre 8 mg/L (Jwanoswki et al., 2017). Le cuivre perd son effet protecteur lorsque sa présence privilégie la croissance des micro-organismes plus résistants y compris *Legionella* et les protozoaires hôtes (Buse et al., 2014; van der Kooij et al., 2005). Dans la présente étude, les concentrations en cuivre mesurées étaient inférieures aux concentrations pouvant affecter la présence de *L. pneumophila*.

Manganèse. Les échantillons positifs à *Lp* provenant des BF avaient une concentration de manganèse total moyenne de 1,7 mg/L, soit 1000 fois plus que celles retrouvées dans les échantillons négatifs (moyenne de 0,17 mg/L), avec une valeur maximum de 5 mg/L. Santé Canada (2019) recommande le respect d'une concentration acceptable maximale de manganèse de 0,12 mg/L dans l'eau potable. Les échantillons de GV positifs à *Lp* ont par contre des concentrations de manganèse légèrement inférieures à la médiane des points négatifs, en particulier pour les points positifs en q-PCR et sont tous retrouvés à des concentrations plus basses que 5 µg/L. Bargellini et al. (2011) rapportent une corrélation entre la présence de *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude et la concentration de manganèse, et estiment que le risque de colonisation augmente de 3,2 fois lorsque la concentration de manganèse dépasse 6 µg/L.

6.3 Types d'eau

L. pneumophila a été détectée dans tous les types d'échantillons analysés, soit dans les BF ou dans les GV, y compris dans certains échantillons prélevés en sortie d'usine (Usine B1). La détection dès la sortie d'usine suggère une inoculation et une présence à très faibles concentration dans le reste du réseau. Par

conséquent, les réseaux internes des bâtiments et les chauffe-eaux alimentés par cette eau courent le risque d'être colonisés. Dans l'ensemble, les concentrations de pathogènes retrouvés dans les 5 réseaux échantillonnés sont très faibles. Même si ce niveau de contamination ne présente pas de danger en soi, ces résultats permettent de dresser un portrait de la situation actuelle et de prendre les mesures nécessaires pour éviter une prolifération dans les réseaux.

La détection de *Lp* dans les échantillons d'eau rincés 5 min n'est pas nécessairement associée à la détection de *Lp* dans le réseau interne des bâtiments (échantillons au premier jet). Les seuls bâtiments où il a été possible de détecter *Lp* au premier jet (FD) et après 5 min de rinçage (5MF) étaient le Bat E2 et le Bat C3. Les concentrations de *Lp* des échantillons FD sont plus élevées que celles de l'échantillon 5MF pour le Bat E2 et similaires pour le Bat C3. Le temps de stagnation est un paramètre important à prendre en considération lors de l'analyse des échantillons FD. Après 24h de stagnation, la concentration des bactéries cultivables pourrait être jusqu'à 100 plus élevée qu'après 1h de stagnation (Bédard et al., 2018). Étant donné que la durée de stagnation des échantillon FD est inconnue, certains points échantillonnés auraient pu avoir un temps de stagnation très faible. De plus, étant donné les différents volumes prélevés, la limite de détection des échantillons FD (1 NPP/2L) est 5 fois plus élevée que celle des échantillons 5MF (1 NPP/10L).

Les résultats obtenus au premier jet sont suite à une stagnation aléatoire, et au maximum d'une durée de quelques heures dans le contexte d'une utilisation régulière. L'impact de la stagnation prolongée suite au confinement sera surtout visible dans les prochains mois et fait l'objet du projet d'une étudiante au doctorat. Étant donné que la qualité de l'eau baisse rapidement avec la stagnation, Rhoads and Hammes (2020) soulèvent le risque que pourrait présenter une stagnation prolongée suite au confinement dû à la pandémie de la COVID-19. Hozalski et al. (2020) ont échantillonné des douches après 2 mois de stagnation puis à la suite d'interventions de rinçage. *L. pneumophila* n'a été détectée dans aucun échantillon, mais *Legionella* spp. et les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) ont été retrouvées dans les échantillons non rincés puis après 7 jours de stagnation suite au rinçage. L'absence de *Lp* est probablement due à l'utilisation de chloramines pour la désinfection du réseau mesurée à des concentrations atteignant 1 mg/L. Néanmoins la présence de *Legionella* spp. et des MNT montre la vulnérabilité du système à la colonisation par d'autres bactéries pathogènes non seulement après une période prolongée de stagnation, mais aussi quelques jours après un rinçage rigoureux.

CHAPITRE 7 CONCLUSION

Ce projet de recherche a permis d'approfondir les connaissances quant à la présence de *Legionella pneumophila* dans les bornes fontaines durant des évènements d'eau rouge et de la station de traitement jusqu'aux réseaux internes des bâtiments. Les principales conclusions de ce mémoire sont les suivantes :

- *L. pneumophila* a été détectée dans 10,7% des échantillons de bornes fontaines, à des concentrations variant entre 5,9 et 159,7 NPP/100mL, et dans 13,7% des échantillons de grands volumes, à des concentrations allant de 0,01 à 11,11 NPP/100mL. La présence de légionelle en sortie d'usine et dans les échantillons rincés suggèrent l'eau municipale comme une possible source faiblement contaminée en *L. pneumophila* qui pourrait par la suite être amplifiée dans le réseau de distribution du bâtiment.
- La méthode de concentration de grands volumes par ultrafiltration a permis de détecter de faibles concentrations de *Lp*, de coliformes totaux et de BHA dans les réseaux d'eau chaude et froide, avant et après rinçage, en hiver et en été y compris en sortie d'usine. Il y a donc présence de ces organismes à faible concentrations dans l'eau potable malgré le respect de la conformité.
- L'utilisation de la méthode de concentration des grands volumes d'eau en utilisant les cartouches d'Hemoflow n'inhibe pas la croissance d'*E. coli* et de *L. pneumophila* par mesure enzymatique et permet de diminuer les limites de détection de ces bactéries à 0,05 NPP/100mL pour les échantillons de 20L et à 0,01 NPP/100mL pour les échantillons de 100L.
- Aucun échantillon de bornes fontaines n'était positif à *Lp* par q-PCR comparativement à 3 positifs par culture, et seulement 3 échantillons de grands volumes étaient positifs en q-PCR, comparativement à 10 positifs en culture. La sensibilité réduite du q-PCR pourrait être expliquée par les faibles concentrations de bactéries dans les échantillons combiné aux pertes éventuelles lors du processus d'extraction d'ADN.
- L'utilisation de CT ou de BHA comme indicateurs microbiologique de la présence de *Lp* est inefficace, la détection de *Lp* n'est pas associée à la présence de CT ou à l'augmentation des BHA.

- La présence de chlore résiduel à une concentration supérieure à 0,3 mg/L permet de réduire le pourcentage d'échantillons positifs mais ne garantit pas l'absence de *L. pneumophila*.
- Les températures de l'eau inférieures à 20°C dans les échantillons prélevés en hiver n'a pas éliminé la prévalence de *L. pneumophila* cultivables. Tous les échantillons positifs à *L. pneumophila* ont été détectés à des températures inférieures à 10°C. De plus, ces échantillons avaient pour la plupart des concentrations en chlore résiduel supérieures à 0,1 mg Cl₂/L.
- Les concentrations élevées en fer et en manganèse étaient associées aux échantillons positifs en *L. pneumophila* des BF. Cependant, des concentrations similaires en fer et en manganèse ont été mesurées dans des échantillons pour lesquels il n'y a pas eu de détection de *L. pneumophila*. Aucune tendance n'a pas été observée pour les échantillons de grands volumes prélevés dans les réseaux, pour lesquels les concentrations élevées en fer et en manganèse étaient en moyenne plus de 1000X inférieures à celles mesurées dans les échantillons des bornes fontaines.

À la lumière des résultats obtenus des recommandations peuvent être émises pour la suite des travaux qui pourraient en découler :

- Les échantillonnages réalisés dans le cadre de ce projet de maîtrise ont permis de collecter des échantillons d'ADN pour lesquels une analyse de la diversité bactérienne (16S) et des organismes hôtes (18S) sera effectuée dans le cadre d'un projet de doctorat. Cette analyse de la diversité sera très utile pour comprendre les conditions propices à la présence d'indicateurs et de *L. pneumophila*.
- Des essais pilotes en présence de différentes concentrations de fer, de magnésium et à différentes températures et concentrations de chlore permettraient de simuler des événements d'eau rouge et de suivre le développement de *L. pneumophila* dans des conditions contrôlées.
- L'échantillonnage de grands volumes dans les bâtiments à proximité des bornes fontaines et en extrémité du réseau, durant des événements d'eau rouges, pourrait fournir des informations supplémentaires concernant l'influence de la qualité de l'eau des bornes fontaines sur celle du réseau et potentiellement les réseaux internes des bâtiments.
- Les échantillonnages de grands volumes ont été réalisés sans connaissance préalable des temps de stagnation des échantillons non-rincés. Un suivi de la qualité de l'eau selon des durées de séjour contrôlées permettrait d'avoir une meilleure évaluation de la présence des légionnelles dans les

réseaux domestiques après différents temps de stagnation. Aussi, le typage des souches retrouvées permettrait de confirmer l'inoculation du réseau domestique par le réseau de distribution.

- La méthode d'échantillonnage des grands volumes puis leur concentration pourrait être appliquée pour détecter d'autres bactéries pathogènes présentes en faibles concentrations dans l'eau notamment les mycobactéries.

RÉFÉRENCES

- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D.E. and Guyard, C. 2013. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. International Journal of Molecular Sciences 14(11), 21660-21675.
- Allegra, S., Berger, F., Berthelot, P., Grattard, F., Pozzetto, B. and Riffard, S. 2008. Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. Appl. Environ. Microbiol. 74(24), 7813-7816.
- American Public Health Association (APHA) (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater (20th Edition), American Water Works Association (AWWA) and the Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF) (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater (21th Edition), Washington, DC, USA.
- American Water Works Association (AWWA) (2011) Internal Corrosion Control in Water Distribution Systems (M58), American Water Works Association, US, Denver.
- Antoun, E.N., Dyksen, J.E. and Hildebrand, D.J. 1999. Unidirectional flushing: A powerful tool. Journal American Water Works Association 91(7), 62-71.
- Arvand, M., Jungkind, K. and Hack, A. 2011. Contamination of the cold water distribution system of health care facilities by *Legionella pneumophila*: do we know the true dimension? Eurosurveillance 16(16), 6.
- Barbaree, J.M., Fields, B.S., Feeley, J.C., Gorman, G.W. and Martin, W.T. 1986. Isolation of protozoa from water associated with a Legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 51(2), 422-424.
- Barbeau, J. and Buhler, T. 2001. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. Research in Microbiology 152(8), 753-760.
- Bargellini, A., Marchesi, I., Righi, E., Ferrari, A., Cencetti, S., Borella, P. and Rovesti, S. 2011. Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: Association with trace elements and heterotrophic plate counts. Water Res. 45(6), 2315-2321.
- Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I. and Gilbert, P. 1992. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. Appl. Environ. Microbiol. 58(8), 2420-2425.
- Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J.V., Pond, K. and Surman-Lee, S. (2007) *Legionella* and the prevention of legionellosis, World Health Organization 2007, Geneva.
- Bédard, E., Charron, D., Lalancette, C., Déziel, E. and Prévost, M. 2014. Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress. FEMS Microbiology Letters 356(2), 226-234.
- Bédard, E., Laferrière, C., Déziel, E. and Prévost, M. 2018. Impact of stagnation and sampling volume on water microbial quality monitoring in large buildings. PlosOne 13(6), e0199429.
- Bédard, E., Lévesque, S., Martin, P., Pinsonneault, L., Paranjape, K., Lalancette, C., Dolcé, C.-É., Villion, M., Valiquette, L., Faucher, S.P. and Prévost, M. 2016. Energy conservation and the promotion of *Legionella pneumophila* growth: The probable role of heat exchangers in a nosocomial outbreak. Infection Control & Hospital Epidemiology 37(12), 1475-1480.
- Bencini, M.A., Yzerman, E.P.F., Koornstra, R.H.T., Nolte, C.C.M., den Boer, J.W. and Bruin, J.P. 2005. A case of legionnaires' disease caused by aspiration of ice water. Archives of Environmental & Occupational Health 60(6), 302-306.

- Benedict, K., Reses, H., Vigar, M., Roth, D.M., Roberts, V.A., Mattioli, M., Cooley, L.A., Hilborn, E.D., Wade, T.J., Fullerton, K., Yoder, J. and Hill, V.R. 2017. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water — United States, 2013–2014. *Weekly* 66(44), 1216-1220.
- Berk, S.G., Gunderson, J.H., Newsome, A.L., Farone, A.L., Hayes, B.J., Redding, K.S., Uddin, N., Williams, E.L., Johnson, R.A., Farsian, M., Reid, A., Skimmyhorn, J. and Farone, M.B. 2006. Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environmental Science and Technology* 40(23), 7440-7444.
- Berk, S.G., Ting, R.S., Turner, G.W. and Ashburn, R.J. 1998. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1), 279-286.
- Binney, Z.O., Nelson, K.N. and Chamberlain, A.T. 2019. Excess *Pneumonia* mortality during a legionnaires' disease outbreak in Flint, Michigan. medRxiv, 19005942.
- Boe-Hansen, R., Albrechtsen, H.-J., Arvin, E. and Jorgensen, C. 2002. Dynamics of biofilm formation in a model drinking water distribution system. *Water Supply: Research and Technology-Aqua* 51(7), 399-406.
- Bollin, G., Plouffe, J., Para, M.F. and Hackman, B. 1985. Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(5), 1128-1131.
- Bonadonna, L., Briancesco, R., Della Libera, S., Lacchetti, I., Paradiso, R. and Semproni, M. 2009. Microbial characterization of water and biofilms in drinking water distribution systems at sport facilities. *Central European journal of public health* 17(2), 99-102.
- Boppe, I., Bédard, E., Taillandier, C., Lecellier, D., Nantel-Gauvin, M.-A., Villion, M., Laferrière, C. and Prévost, M. 2016. Investigative approach to improve hot water system hydraulics through temperature monitoring to reduce building environmental quality hazard associated to *Legionella*. *Build. Environ.* 108, 230-239.
- Borella, P., Montagna, M.T., Romano-Spica, V., Stampi, S., Stancanelli, G., Triassi, M., Neglia, R., Marchesi, I., Fantuzzi, G., Tato, D., Napoli, C., Quaranta, G., Laurenti, P., Leoni, E., De Luca, G., Ossi, C., Moro, M. and Ribera D'Alcala, G. 2004. *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerg Infect Dis* 10(3), 457-464.
- Borella, P., Montagna, M.T., Stampi, S., Stancanelli, G., Romano-Spica, V., Triassi, M., Marchesi, I., Bargellini, A., Tato, D., Napoli, C., Zanetti, F., Leoni, E., Moro, M., Scaltriti, S., Ribera D'Alcala, G., Santarpia, R. and Boccia, S. 2005. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10), 5805-5813.
- Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M.H. and Hechard, Y. 2007. Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ. Microbiol.* 9(5), 1341-1344.
- Burlingame, G.A., Lytle, D.A. and Snoeyink, V.L. 2006. Why Red Water? Understanding iron release in distribution systems. *Opflow* 32(12), 12-16.
- Buse, H.Y., Lu, J., Struewing, I.T. and Ashbolt, N.J. 2014. Preferential colonization and release of *Legionella pneumophila* from mature drinking water biofilms grown on copper versus unplasticized polyvinylchloride coupons *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217(2-3), 219–225.
- Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y. and Rodier, M.H. 2014. Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *The Journal of Hospital Infection* 87(3), 131-140.

- Center for Disease Control and Prevention (CDC) 2019 Legionnaires' disease surveillance summary report, United States, p. 48.
- Collins, S., Stevenson, D., Bennett, A. and Walker, J. 2016. Occurrence of *Legionella* in UK household showers. *Int. J. Hyg. Environ. Health*.
- Cunha, B.A. 2006. The atypical pneumonias: Clinical diagnosis and importance. *Clinical Microbiology and Infection* 12, 12-24.
- Dai, D., Proctor, C.R., Williams, K., Edwards, M.A. and Pruden, A. 2018. Mediation of effects of biofiltration on bacterial regrowth, *Legionella pneumophila*, and the microbial community structure under hot water plumbing conditions. *Environmental Science: Water Research & Technology* 4(2), 183-194.
- Declerck, P. 2010. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* 12(3), 557-566.
- Dias, V.C. (2016) Impact of district metered areas implementation on water quality in a full-scale drinking water distribution system. Ph.D., Polytechnique Montréal, Montreal, QC, Canada.
- Ditommaso, S., Ricciardi, E., Giacomuzzi, M., Arauco Rivera, S.R. and Zotti, C.M. 2015. *Legionella* in water samples: How can you interpret the results obtained by quantitative PCR? *Molecular and Cellular Probes* 29(1), 7-12.
- Dondero Jr, T.J., Rendtorff, R.C., Mallison, G.F., Weeks, R.M., Levy, J.S., Wong, E.W. and Schaffner, W. 1980. An outbreak of Legionnaires' disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower. *New England Journal of Medicine* 302(7), 365-370.
- Donohue, M.J. 2021. Quantification of *Legionella pneumophila* by qPCR and culture in tap water with different concentrations of residual disinfectants and heterotrophic bacteria. *Sci Total Environ* 774, 145142.
- Donohue, M.J., King, D., Pfaller, S. and Mistry, J.H. 2019a. The sporadic nature of *Legionella pneumophila*, *Legionella pneumophila* Sg1 and *Mycobacterium avium* occurrence within residences and office buildings across 36 states in the United States. *J. Appl. Microbiol.* 126(5), 1568-1579.
- Donohue, M.J., O'Connell, K., Vesper, S.J., Mistry, J.H., King, D., Kostich, M. and Pfaller, S. 2014a. Widespread molecular detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in cold water taps across the United States. *Environmental science & technology* 48(6), 3145-3152.
- Donohue, M.J., Vesper, S., Mistry, J. and Donohue, J.M. 2019b. Impact of chlorine and chloramine on the detection and quantification of *Legionella pneumophila* and *Mycobacterium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 85(24), e01942-01919.
- Donohue, M.J., Vesper, S.J., Mistry, J., King, D., Kostich, M., Pfaller, S. and O'Connell, K. 2014b. Widespread molecular detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in cold water taps across the United States. *Environ. Sci. Technol.*
- Dutil, S., Tessier, S., Veillette, M., Laflamme, C., Mériaux, A., Leduc, A., Barbeau, J. and Duchaine, C. 2006. Detection of *Legionella* spp. by fluorescent in situ hybridization in dental unit waterlines. *J. Appl. Microbiol.* 100(5), 955-963.
- Emily, G., Connor, L.B., David Otto, S., William, J.R., Gustavo, A.-A., Liqing, Z., Guillaume, J., David, A.C., Jonathan, A.E., Marc, A.E. and Amy, P. 2019. Comparison of whole-genome sequences of *Legionella pneumophila* in tap water and in clinical strains, Flint, Michigan, USA, 2016 *Emerging Infectious Disease journal* 25(11), 2013.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2019 Legionnaires' disease. Annual epidemiological report for 2017, p. 6, ECDC, Stockholm, Sweden.

- Fields, B.S., Benson, R.F. and Besser, R.E. 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews* 15(3), 506-526.
- Flannery, B., Gelling, L.B., Vugia, D.J., Weintraub, J.M., Salerno, J.J., Conroy, M.J., Stevens, V.A., Rose, C.E., Moore, M.R., Fields, B.S. and Besser, R.E. 2006. Reducing *Legionella* colonization of water systems with monochloramine. *Emerging Infectious Diseases* 12(4), 588-596.
- Flemming, H.-C., Wingender, J. and Szewzyk, U. (2011) *Biofilm highlights*, Springer, Heidelberg; New York.
- Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L. and Pope, D.H. 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied Environmental Microbiology* 41(1), 9-16.
- Gaia, V., Fry, N.K., Afshar, B., Luck, P.C., Meugnier, H., Etienne, J., Peduzzi, R. and Harrison, T.G. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal Clinical Microbiology* 43(5), 2047-2052.
- Graman, P.S., Quinlan, G.A. and Rank, J.A. 1997. Nosocomial legionellosis traced to a contaminated ice machine. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 18(9), 637-640.
- Hamilton, K.A., Hamilton, M.T., Johnson, W., Jjemba, P., Bukhari, Z., LeChevallier, M., Haas, C.N. and Gurian, P.L. 2019. Risk-based critical concentrations of *Legionella pneumophila* for indoor residential water uses. *Environmental Science and Technology*.
- Hanna-Attisha, M., LaChance, J., Sadler, R.C. and Champney Schnepf, A. 2016. Elevated blood lead levels in children associated with the flint drinking water crisis: A spatial analysis of risk and public health response. *Am. J. Public Health* 106(2), 283-290.
- Hatam, F., Besner, M.-C., Ebacher, G. and Prévost, M. 2020. Limitations of *E. coli* monitoring for confirmation of contamination in distribution systems due to intrusion under low pressure conditions in the presence of disinfectants. *J. Water Resour. Plann. Manage.* 146(8), 04020056.
- Heijnen, L., Brouwer, A. and Veenendaal, H. 2009. Concentration method using Hemoflow ultrafiltration (The protocol), p. 14, Techneau.
- Heijnen, L. and Magic-Knezev, A. 2010. The Hemoflow method: Implementation and performance characteristics, p. 33, Techneau.
- Hozalski, R.M., LaPara, T.M., Zhao, X., Kim, T., Waak, M.B., Burch, T. and McCarty, M. 2020. Flushing of stagnant premise water systems after the COVID-19 shutdown can reduce infection risk by *Legionella* and *Mycobacterium* spp (in press). medRxiv, 2020.2009.2014.20194407.
- Hsu, B.M., Lin, C.L. and Shih, F.C. 2009. Survey of pathogenic free-living amoebae and *Legionella* spp. in mud spring recreation area. *Water Res.* 43(11), 2817-2828.
- Huang, S.W., Hsu, B.M., Wu, S.F., Fan, C.W., Shih, F.C., Lin, Y.C. and Ji, D.D. 2010. Water quality parameters associated with prevalence of *Legionella* in hot spring facility water bodies. *Water Res.* 44(16), 4805-4811.
- Imran, S.A., Dietz, J.D., Mutoti, G., Taylor, J.S., Randall, A.A. and Cooper, C.D. 2005. Red water release in drinking water distribution systems. *Journal American Water Works Association* 97(9), 93-100.
- James, B.W., Mauchline, W.S., Fitzgeorge, R.B., Dennis, P.J. and Keevil, C.W. 1995. Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity* 63(11), 4224-4230.
- Johnson, J.D., Raff, M.J. and Van Arsdall, J.A. 1984. Neurologic manifestations of legionnaires' disease. *Medicine* 63(5).

- Jwanoswki, K., Wells, C., Bruce, T., Rutt, J., Banks, T. and McNealy, T.L. 2017. The *Legionella pneumophila* GIG operon responds to gold and copper in planktonic and biofilm cultures. PLoS One 12(5), e0174245.
- Katz, S.M. and Hammel, J.M. 1987. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. Annals of Clinical & Laboratory Science 17(3), 150-156.
- Kontchou, J.A. and Nocker, A. 2019. Optimization of viability qPCR for selective detection of membrane-intact *Legionella pneumophila*. Journal of Microbiological Methods 156, 68-76.
- Kura, F., Amemura-Maekawa, J., Yagita, K., Endo, T., Ikeno, M., Tsuji, H., Taguchi, M., Kobayashi, K., Ishii, E. and Watanabe, H. 2006. Outbreak of Legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. Epidemiology and Infection 134(2), 385-391.
- Kusnetsov, J.M., Ottoila, E. and Martikainen, P.J. 1996. Growth, respiration and survival of *Legionella pneumophila* at high temperatures. Journal of Applied Bacteriology 81(4), 341-347.
- Kyritsi, M.A., Mouchtouri, V.A., Katsioulis, A., Kostara, E., Nakoulas, V., Hatzinikou, M. and Hadjichristodoulou, C. 2018. *Legionella* colonization of hotel water systems in touristic places of Greece: Association with system characteristics and physicochemical parameters. Int. J. Environ. Res. Public Health 15(12).
- Lapierre, P., Nazarian, E., Zhu, Y., Wroblewski, D., Saylor, A., Passaretti, T., Hughes, S., Tran, A., Lin, Y., Kornblum, J., Morrison, S.S., Mercante, J.W., Fitzhenry, R., Weiss, D., Raphael, B.H., Varma, J.K., Zucker, H.A., Rakeman, J.L. and Musser, K.A. 2017. Legionnaires' disease outbreak caused by endemic strain of *Legionella pneumophila*, New York, New York, USA, 2015. Emerging Infectious Disease journal 23(11), 1784.
- Lappin-Scott, H.M. and Costerton, J.W. 1989. Bacterial biofilms and surface fouling. Biofouling 1(4), 323-342.
- Lau, H.Y. and Ashbolt, N.J. 2009. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. J. Appl. Microbiol. 107(2), 368-378.
- LeChevallier, M.W. 2019. Occurrence of culturable *Legionella pneumophila* in drinking water distribution systems. AWWA Water Science 1(3), e1139.
- Leoni, E., Catalani, F., Marini, S. and Dallolio, L. 2018. Legionellosis associated with recreational waters: A systematic review of cases and outbreaks in swimming pools, spa pools, and similar environments. Int. J. Environ. Res. Public Health 15(8).
- Llewellyn, A.C., Lucas, C.E., Roberts, S.E., Brown, E.W., Nayak, B.S., Raphael, B.H. and Winchell, J.M. 2017. Distribution of *Legionella* and bacterial community composition among regionally diverse US cooling towers. PLoS One 12(12), e0189937.
- Lytle, D.A., Pfaller, S., Muhlen, C., Struewing, I., Triantafyllidou, S., White, C., Hayes, S., King, D. and Lu, J. 2020. A comprehensive evaluation of monochloramine disinfection on water quality, *Legionella* and other important microorganisms in a Hospital. Water Res. 189, 116656.
- Maiwald, M., Helbig, J.H. and Lück, P.C. 1998. Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. Journal of Microbiological Methods 33(1), 59-79.
- Marchesi, I., Marchegiano, P., Bargellini, A., Cencetti, S., Frezza, G., Miselli, M. and Borella, P. 2011. Effectiveness of different methods to control legionella in the water supply: ten-year experience in an Italian university hospital. Journal of Hospital Infection 77(1), 47-51.
- Marciano-Cabral, F., Jamerson, M. and Kaneshiro, E.S. 2010. Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. Journal of Water and Health 8(1), 71-82.

- Masten, S.J., Davies, S.H. and McElmurry, S.P. 2016. Flint water crisis: What happened and why? *Journal - AWWA* 108(12), 22-34.
- Mathys, W., Stanke, J., Harmuth, M. and Junge-Mathys, E. 2008. Occurrence of *Legionella* in hot water systems of single-family residences in suburbs of two German cities with special reference to solar and district heating. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211(1–2), 179-185.
- Mercante, J.W. and Winchell, J.M. 2015. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clinical Microbiology Reviews* 28(1), 95.
- Michigan Department of Health and Human Services (MDHHS) and Genesee County Health Department 2016 Legionellosis outbreak-Genesee County, p. 20.
- Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC) 2017 Guide de bonnes pratiques d'exploitation des installations de distribution d'eau potable, p. 98, Gouvernement du Québec, Ville de Québec, QC, Canada.
- Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs (MDDEP) 2010 Loi sur la qualité de l'environnement, Qualité de l'eau potable, pp. 4645-4662, Gouvernement du Québec.
- Mouchtouri, V.A., Goutziana, G., Kremastinou, J. and Hadjichristodoulou, C. 2010. *Legionella* species colonization in cooling towers: Risk factors and assessment of control measures. *American Journal of Infection Control* 38(1), 50-55.
- Muder, R.R. and Yu, V.L. 2002. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clinical Infectious Diseases* 35(8), 990-998.
- Napoli, C., Iatta, R., Fasano, F., Marsico, T. and Montagna, M.T. 2009. Variable bacterial load of *Legionella* spp. in a hospital water system. *Sci. Total Environ.* 408(2), 242-244.
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (NASEM) (2019) Management of *Legionella* in water systems, The National Academies Press, Washington, DC, USA.
- Orkis, L.T., Harrison, L.H., Mertz, K.J., Brooks, M.M., Bibby, K.J. and Stout, J.E. 2018. Environmental sources of community-acquired legionnaires' disease: A review. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 221(5), 764-774.
- Ovrutsky, A.R., Chan, E.D., Kartalija, M., Bai, X., Jackson, M., Gibbs, S., Falkinham, J.O., Iseman, M.D., Reynolds, P.R., McDonnell, G. and Thomas, V. 2013. Cooccurrence of free-living *amoebae* and nontuberculous mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of mycobacterium avium in *acanthamoeba lenticulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(10), 3185-3192.
- Pieper, K.J., Tang, M. and Edwards, M.A. 2017. Flint water crisis caused by interrupted corrosion control: investigating "ground zero" home. *Environ Sci Technol.*
- Prévost, M., Besner, M.-C., Laurent, P. and Servais, P. (2014) Microbial growth in drinking water distribution systems. Problems, causes, prevention and research needs. van der Kooij, D. and van der Wielen, P.W. (eds), pp. 261-290, IWA Publishing, London, UK.
- Prussin, A.J., Schwake, D.O. and Marr, L.C. 2017. Ten questions concerning the aerosolization and transmission of *Legionella* in the built environment. *Build. Environ.* 123, 684-695.
- Rech, M.M., Swalla, B.M. and Dobranic, J.K. 2018. Evaluation of Legiolert for quantification of *Legionella pneumophila* from non-potable water. *Current Microbiology* 75(10), 1282-1289.
- Reeves, M.W., Pine, L., Hutner, S.H., George, J.R. and Harrell, W.K. 1981. Metal requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 13(4), 688.
- Rhoads, W.J., Garner, E., Ji, P., Zhu, N., Parks, J., Schwake, D.O., Pruden, A. and Edwards, M.A. 2017a. Distribution system operational deficiencies coincide with reported legionnaires' disease clusters in Flint, Michigan. *Environmental Science & Technology* 51(20), 11986-11995.

- Rhoads, W.J., Garner, E., Ji, P., Zhu, N., Parks, J., Schwake, D.O., Pruden, A. and Edwards, M.A. 2017b. Distribution system operational deficiencies coincide with reported legionnaires' disease clusters in flint, michigan. *Environmental science & technology* 51(20), 11986-11995.
- Rhoads, W.J. and Hammes, F. 2020. Growth of *Legionella* during COVID-19 lockdown stagnation. *Environmental Science: Water Research & Technology*.
- Rhoads, W.J., Keane, T., Spencer, M.S., Pruden, A. and Edwards, M.A. 2020. Did municipal water distribution system deficiencies contribute to a legionnaires' disease outbreak in Quincy, IL? *Environmental Science & Technology Letters* 7(12), 896-902.
- Rhoads, W.J., Pruden, A. and Edwards, M.A. 2017c. Interactive effects of corrosion, copper, and chloramines on legionella and mycobacteria in hot water plumbing. *Environmental & Science Technology* 51(12), 7065-7075.
- Santé Canada 2019 Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique – le manganèse, p. 132, Gouvernement du Canada.
- Santé Canada 2020 Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada. Tableau sommaire, p. 32, Gouvernement du Canada.
- Scaturro, M., Fontana, S., Dell'eva, I., Helfer, F., Marchio, M., Stefanetti, M.V., Cavallaro, M., Miglietta, M., Montagna, M.T., De Giglio, O., Cuna, T., Chetti, L., Sabattini, M.A.B., Carlotti, M., Viggiani, M., Stenico, A., Romanin, E., Bonanni, E., Ottaviano, C., Franzin, L., Avanzini, C., Demarie, V., Corbella, M., Cambieri, P., Marone, P., Rota, M.C., Bella, A. and Ricci, M.L. 2016. A multicenter study of viable PCR using propidium monoazide to detect *Legionella* in water samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 85(3), 283-288.
- Schwake, D.O., Garner, E., Strom, O.R., Pruden, A. and Edwards, M.A. 2016. Legionella DNA markers in tap water coincident with a spike in Legionnaires' disease in Flint, MI. *Environmental Science & Technology Letters* 3(9), 311-315.
- Schwake, O., Alum, A., Dunkin, N., Kraft, K. and Abbaszadegan, M. 2012 Presence and survival of Legionella in drinking water distribution systems, American Water Works Association, Toronto, ON, Canada.
- Shaheen, M. and Ashbolt, N.J. 2017. Free-living *Amoebae* supporting intracellular growth may produce vesicle-bound respirable doses of legionella within drinking water systems. *Exposure and Health*.
- Spies, K., Pleischl, S., Lange, B., Langer, B., Hübner, I., Jurzik, L., Luden, K. and Exner, M. 2018. Comparison of the Legiolert™/Quanti-Tray® MPN test for the enumeration of *Legionella pneumophila* from potable water samples with the German regulatory requirements methods ISO 11731-2 and ISO 11731. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 221(7), 1047-1053.
- State of Michigan 2016 Flint water advisory task force, p. 116, Lansing, MI, USA.
- Steinert, M., Emody, L., Amann, R. and Hacker, J. 1997. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(5), 2047-2053.
- Stout, J.E., Muder, R.R., Mietzner, S., Wagener, M.M., Perri, M.B., DeRoos, K., Goodrich, D., Arnold, W., Williamson, T., Ruark, O., Treadway, C., Eckstein, E.C., Marshall, D., Rafferty, M.E., Sarro, K., Page, J., Jenkins, R., Oda, G., Shimoda, K.J., Zervos, M.J., Bittner, M., Camhi, S.L., Panwalker, A.P., Donskey, C.J., Nguyen, M.H., Holodniy, M., Yu, V.L. and Group, L.S. 2007. Role of environmental surveillance in determining the risk of hospital-acquired legionellosis: a national surveillance study with clinical correlations. *Infection control and hospital epidemiology* 28(7), 818-824.

- Taylor, M.J., Bentham, R.H. and Ross, K.E. 2014. Limitations of using propidium monoazide with qPCR to discriminate between live and dead legionella in biofilm samples. *Microbiol Insights* 7, 15-24.
- Thomas, J.M. and Ashbolt, N.J. 2011. Do free-living *Amoebae* in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environ. Sci. Technol.* 45(3), 860-869.
- Tobin, R.S., Ewan, P., Walsh, K. and Dutka, B. 1986. A survey of *Legionella Pneumophila* in water in 12 Canadian cities. *Water Res.* 20(4), 495-501.
- Touron-Bodilis, A., Pougard, C., Frenkiel-Lebosse, H. and Hallier-Soulier, S. 2011. Usefulness of real-time PCR as a complementary tool to the monitoring of *Legionella spp.* and *Legionella pneumophila* by culture in industrial cooling systems. *J. Appl. Microbiol.* 111(2), 499-510.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) 1994 Method 200.8 - Determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma - mass spectrometry (Revision 5.4 - EMMC Version), p. 57, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio, USA.
- van der Kooij, D., Veenendaal, H.R. and Scheffer, W.J.H. 2005. Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res.* 39(13), 2789-2798.
- van der Lugt, W., Euser, S.M., Bruin, J.P., Den Boer, J.W., Walker, J.T. and Crespi, S. 2017. Growth of *Legionella anisa* in a model drinking water system to evaluate different shower outlets and the impact of cast iron rust. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 220(8), 1295-1308.
- van der Wielen, P.W. and van der Kooij, D. 2012. Nontuberculous mycobacteria, fungi and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Vreeburg, J.H.G. and Boxall, J.B. 2007. Discolouration in potable water distribution systems: a review. *Water Res.* 41(3), 519-529.
- Wadowsky, R., Yee, R., Mezmar, L., Wing, E. and Dowling, J. 1982. Hot water systems as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and nonhospital plumbing fixtures. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(5), 1104-1110.
- Walser, S.M., Gerstner, D.G., Brenner, B., Höller, C., Liebl, B. and Herr, C.E.W. 2014. Assessing the environmental health relevance of cooling towers – A systematic review of legionellosis outbreaks *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217(2-3).
- Whiley, H., Keegan, A., Fallowfield, H. and Ross, K. 2014. Uncertainties associated with assessing the public health risk from *Legionella*. *Front Microbiol* 5, 501.
- Whiley, H. and Taylor, M. 2014. *Legionella* detection by culture and qPCR: Comparing apples and oranges. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-10.
- Wingender, J. and Flemming, H.C. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214(6), 417-423.
- Wullings, B.A., Bakker, G. and van der Kooij, D. 2011. Concentration and diversity of uncultured *Legionella spp.* in two unchlorinated drinking water supplies with different concentrations of natural organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(2), 634-641.
- Yáñez, M.A., Nocker, A., Soria-Soria, E., Múrtula, R., Martínez, L. and Catalán, V. 2011. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 85(2), 124-130.
- Yu, P.-Y., Lin, Y.E., Lin, W.-R., Shih, H.-Y., Chuang, Y.-C., Ben, R.-J., Huang, W.-K., Chen, Y.-S., Liu, Y.-C., Chang, F.-Y., Yen, M.-Y., Liu, C.-C., Ko, W.-C., Lin, H.-H. and Shi, Z.-Y. 2008. The high prevalence of *Legionella pneumophila* contamination in hospital potable water systems

- in Taiwan: implications for hospital infection control in Asia. *International Journal of Infectious Diseases* 12(4), 416-420.
- Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C.M., Paterson, D.L. and Cheresky, A. 2002. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *The Journal of Infectious Diseases* 186(1), 127-128.
- Yu, Z. and Mohn, W.W. 1999. Killing two birds with one stone: simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass. *Canadian Journal of Microbiology* 45(3), 269-272.
- Zahran, S., McElmurry, S.P., Kilgore, P.E., Mushinski, D., Press, J., Love, N.G., Sadler, R.C. and Swanson, M.S. 2018. Assessment of the Legionnaires' disease outbreak in Flint, Michigan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(8), E1730-E1739.

ANNEXE A RÉSULTATS DE L'ÉCHANTILLONNAGE DES GRANDS VOLUMES

Saison	Id point	Chlore libre (mg Cl ₂ /L)	pH	Température (°C)	Oxygène dissous (mg/L)	Conductivité (μS/cm ²)	Turbidité (UTN)	Alcalinité (mg CaCO ₃ /L)	CT (NPP/100mL)	BHA (UFC/100mL)	<i>L. pneumophila</i> (NPP/100mL)	Bactéries viables (événements/ml)
Hiver	Usine A	0,68	7,9	4,7	16,3	331	1,4	34	<0,01	<25	<0,01	50
	Bat A1 CW-5MF	0,61	8,2	2,2	15,8	281	0,3	39	<0,01	<1	<0,01	130
	Bat A2 CW-5MF	0,46	8,1	4,4	19,2	283	0,3	34	<0,01	179	<0,01	4 030
	Bat A3 CW-5MF	0,25	8,2	4,5	17,6	263	0,2	37	<0,01	195	<0,01	250
	Usine B1- 1	0,52	7,2	8,4	11,4	379	0,4	73	<0,01	<1	0,14	190
	Usine B1- 2	0,73	7,6	8,3	12,8	400	0,7	81	<0,01	<1	<0,01	230
	Bat B1 HW-FD	0,00	7,1	41,1	8,7	437	0,3	75	<0,01	<1	<0,01	58 200
	Bat B1 CW-5MF	0,21	6,9	5	11,7	347	1,3	76	<0,01	<25	0,09	480
	Bat B2-1 CW-5MF	0,29	7,2	4,6	12,8	351	0,4	76	<0,01	<1	<0,01	970
	Bat B2-2 CW-5MF	0,39	7,3	4,5	13,1	372	0,4	82	<0,01	<25	<0,01	820
	Bat B3 CW-5MF	0,56	7,5	5	12,9	361	0,3	82	<0,01	<1	<0,01	70
	Bat B4 CW-5MF	0,66	7,3	2,2	13,8	362	0,8	82	<0,01	<25	<0,01	70
	Bat B5 CW-5MF	0,69	7,6	3,3	13,9	376	0,4	81	<0,01	<1	<0,01	170
	Bat B6 CW-5MF	0,69	7,8	2,6	13,4	406	0,6	88	<0,01	<25	<0,01	60

Saison	Id point	Chlore libre (mg Cl ₂ /L)	pH	Température (°C)	Oxygène dissous (mg/L)	Conductivité (µS/cm ²)	Turbidité (UTN)	Alcalinité (mg CaCO ₃ /L)	CT (NPP/100mL)	BHA (UFC/100mL)	<i>L. pneumophila</i> (NPP/100mL)	Bactéries viables (événements/ml)
	Bat B7 CW-5MF	0,66	7,7	3,2	13,5	416	0,4	80	<0,01	<1	<0,01	60
	Bat B8 CW-5MF	0,69	7,8	4,4	13,5	388	0,6	80	0,02	<25	<0,01	70
	Usine B2	0,41	8,1	5,2	13,3	393	0,3	77	<0,01	<25	<0,01	0
	Réservoir B	0,72	8,2	1,5	13,9	384	0,1	73	<0,01	<1	<0,01	0
	Usine C	0,81	7,8	3,7	13,2	277	0,7	37	<0,01	<1	<0,01	80
	Bat C1 CW-5MF	0,36	8,1	3,8	12,9	271	1,2	36	<0,01	320	<0,01	720
	Bat C2 CW-5MF	0,79	8,1	2,7	13,4	254	0,3	38	<0,01	37	<0,01	50
	Bat C3 CW-5MF	0,79	8	3,7	13,2	277	0,5	38	<0,01	<1	<0,01	270
	Usine D	-	8,2	7,2	15,5	464	0,2	26	<0,01	30	<0,01	40
	Bat D1 CW-5MF	0,79	8,5	4,3	14,8	430	0,2	48	<0,01	38	<0,01	360
	Bat D2 CW-5MF	0,29	8,2	4,8	14,3	417	0,3	47	<0,01	34	<0,01	1 060
	Bat D3 CW-5MF	0,31	8,4	4,4	14,5	359	0,1	41	<0,01	<25	<0,01	260
	Usine E	0,52	8,4	8,7	11,7	305	0,2	51	0,01	<25	<0,01	610
	Bat E1 CW-FD	0,25	8,7	9,6	11,4	314	0,2	67	<0,01	<25	<0,01	280
	Bat E1 HW-FD	0,03	7,7	58,1	-	374	0,1	76	<0,01	<1	<0,01	3 650
	Bat E1 CW-5MF	0,31	8,4	8,3	11,9	294	0,3	72	<0,01	45	<0,01	35 150

Saison	Id point	Chlore libre (mg Cl ₂ /L)	pH	Température (°C)	Oxygène dissous (mg/L)	Conductivité (µS/cm ²)	Turbidité (UTN)	Alcalinité (mg CaCO ₃ /L)	CT (NPP/100mL)	BHA (UFC/100mL)	<i>L. pneumophila</i> (NPP/100mL)	Bactéries viables (événements/ml)
	Bat E2 CW-FD	0,15	8,6	9,7	11,6	325	0,3	73	<0,01	27	11,11	220
	Bat E2 HW-FD	0,05	7,6	57,8	-	354	0,4	73	<0,01	<1	3,50	830
	Bat E2 CW-5MF	0,16	8,2	7,5	12,1	305	0,6	72	0,14	<1	0,18	33 350
	Bat E3 CW-FD	0,06	8,5	14	11,2	357	0,2	71	<0,01	88	<0,01	180
	Bat E3 HW-FD	0,00	7,9	49,2	7,7	292	0,2	72	<0,01	<25	<0,01	-
	Bat E3 CW-5MF	0,14	8,4	12,4	11,5	308	0,3	71	<0,01	2 000	<0,01	330
Eté	Usine A	1,19	8,1	23,1	9,2	131	0,4	22	<0,01	28	<0,01	80
	Bat A1 CW-FD	0,84	8,1	20,7	9,3	-	0,2	26	<0,01	33	<0,01	90
	Bat A1 HW-FD	0,04	8,1	54,2	-	123	0,3	26	<0,01	<25	<0,01	18 560
	Bat A1 CW-5MF	0,84	7,8	20,7	9,3	-	0,3	28	1,45	<25	<0,01	30
	Bat A2 CW-FD	0,03	7,9	27,3	9,7	131	0,2	-	<0,01	>2500	<0,01	53 600
	Bat A2 HW-FD	0,03	8,9	59,7	-	152	0,3	32	<0,01	<25	<0,01	1 250
	Bat A2 CW-5MF	0,36	8,7	19	10,3	106	0,2	28	<0,01	>2500	<0,01	6 070
	Bat A3 CW-FD	0,33	7,8	23,4	9,6	113	0,1	26	<0,01	>2500	<0,01	650
	Bat A3 HW-FD	0,00	8,4	54,3	-	-	0,3	30	0,02	>2500	<0,01	21 100
	Bat A3 CW-5MF	0,37	8,3	17	10,8	109	0,3	30	<0,01	>2500	<0,01	410
	Usine B1	0,39	7,2	27,2	8,7	245	0,3	84	<0,01	80	0,03	360

Saison	Id point	Chlore libre (mg Cl ₂ /L)	pH	Température (°C)	Oxygène dissous (mg/L)	Conductivité (µS/cm ²)	Turbidité (UTN)	Alcalinité (mg CaCO ₃ /L)	CT (NPP/100mL)	BHA (UFC/100mL)	<i>L. pneumophila</i> (NPP/100mL)	Bactéries viables (événements/ml)
	Bat B1 CW-FD	0,46	7,1	20,5	8,9	264	0,1	81	<0,01	>2500	<0,01	490
	Bat B1 HW-FD	0,06	7,5	43,3	6,8	261	0,2	82	<1	>2500	0,01	8 080
	Bat B1 CW-5MF	0,51	7,4	20,7	8,8	262	0,2	81	0,01	51	<0,01	370
	Bat B2 CW-FD	0,31	7,4	19,2	9,6	283	0,4	80	<0,01	46	<0,01	6 970
	Bat B2 HW-FD	0,60	7,5	47,6	6,2	286	0,3	84	<0,01	<25	<0,01	950
	Bat B2 CW-5MF	0,29	7,6	19,1	9,7	270	0,4	83	0,01	39	<0,01	14 130
	Bat B3 CW-FD	0,36	7,2	19,6	9,8	246	0,4	86	<0,01	<25	<0,01	1 560
	Bat B3 HW-FD	0,04	7,6	50,1	6,5	278	0,2	78	<0,01	2 330	<0,01	960
	Bat B3 CW-5MF	0,41	7,5	19,1	9,8	261	0,3	82	<0,01	<25	<0,01	980
	Usine C	1,17	7,1	24,4	8,7	239	0,1	58	<0,01	<25	<0,01	-
	Bat C1 CW-FD	0,09	6,9	18,7	7,2	275	0,3	67	<0,01	810	<0,01	6 740
	Bat C1 HW-FD	0,01	7,7	50	4,9	273	0,4	71	<0,01	<25	<0,01	361 910
	Bat C1 CW-5MF	0,05	7,5	17,3	7,5	239	0,3	67	<0,01	1 090	<0,01	5 540
	Bat C2 CW-FD	0,60	6,8	22,7	8,6	381	0,1	66	<0,01	<25	<0,01	-
	Bat C2 HW-FD	0,00	7,4	56,8	-	275	0,1	62	<0,01	<25	<0,01	-
	Bat C2 CW-5MF	0,67	7,4	23,4	8,6	233	0,1	64	<0,01	<25	<0,01	-

Saison	Id point	Chlore libre (mg Cl ₂ /L)	pH	Température (°C)	Oxygène dissous (mg/L)	Conductivité (µS/cm ²)	Turbidité (UTN)	Alcalinité (mg CaCO ₃ /L)	CT (NPP/100mL)	BHA (UFC/100mL)	<i>L. pneumophila</i> (NPP/100mL)	Bactéries viables (événements/ml)
	Bat C3 CW-FD	0,83	7,1	23,2	8,6	250	0,1	70	<0,01	<25	0,01	0
	Bat C3 HW-FD	0,02	7,5	52,5	-	275	0,3	69	<0,01	<25	<0,01	448 240
	Bat C3 CW-5MF	0,83	7,6	23	8,7	239233	0,2	69	<0,01	<25	0,01	30
	Usine D	0,72	8	24,1	9,5	266	0,2	-	<1	<25	<0,01	270
	Bat D1 CW-FD	0,44	7,9	22,2	9,9	272	0,2	46	<1	255	<0,01	730
	Bat D1 HW-FD	0,03	8,9	52,3	-	217	0,3	40	<1	<25	<0,01	81 700
	Bat D1 CW-5MF	0,50	8	22,1	9,8	262	0,2	50	<1	52	<0,01	860
	Bat D2 CW-FD	0,05	7,5	19,3	9,2	244	0,2	36	<1	510	<0,01	1 452 000
	Bat D2 HW-FD	0,09	8,5	47,6	7,3	235	0,4	32	<1	>2500	<0,01	1 680 200
	Bat D2 CW-5MF	0,09	7,9	18,6	9,3	233	0,2	-	0,01	360	<0,01	1 239 800
	Bat D3 CW-FD	0,03	7,2	19,4	9,6	264	0,3	42	<1	>2500	<0,01	2 296 400
	Bat D3 HW-FD	0,04	8,1	45,1	7,5	303	0,2	48	<1	64	<0,01	2 039 800
	Bat D3 CW-5MF	0,06	7,9	18,6	9,8	265	0,2	46	<1	475	<0,01	1 962 800
	Usine E	0,81	7,6	20,6	8,9	254	1,9	85	<1	<25	<0,01	30
	Bat E1 CW-5MF	0,23	7,2	20,5	8,5	255	1,2	88	<1	<25	<0,01	30
	Bat E2 CW-5MF	0,18	7,1	20,6	8,4	271	0,8	93	<1	<25	0,04	300

Saison												
	Id point	Chlore libre (mg Cl ₂ /L)	pH	Température (°C)	Oxygène dissous (mg/L)	Conductivité (μS/cm ²)	Turbidité (UTN)	Alcalinité (mg CaCO ₃ /L)	CT (NPP/100mL)	BHA (UFC/100mL)	<i>L. pneumophila</i> (NPP/100mL)	Bactéries viables (événements/ml)
	Bat E3 CW-5MF	0,90	7,2	20,5	8,5	262	1,6	90	<1	<25	<0,01	10