



**HAL**  
open science

# Étude des communautés bactériennes d'un réseau d'eau potable. Influence des paramètres environnementaux

Yoann Perrin

► **To cite this version:**

Yoann Perrin. Étude des communautés bactériennes d'un réseau d'eau potable. Influence des paramètres environnementaux. Sciences agricoles. Université de Poitiers; Eau de Paris, 2018. Français. NNT: 2018POIT2289 . tel-02536403

**HAL Id: tel-02536403**

**<https://theses.hal.science/tel-02536403>**

Submitted on 8 Apr 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE

Pour l'obtention du Grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)  
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale : Sciences pour l'environnement Gay Lussac  
Secteur de Recherche : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Présentée par :

**Yoann PERRIN**

---

# Étude des communautés bactériennes d'un réseau d'eau potable Influence des paramètres environnementaux

---

### Directeurs de Thèse

Yann Héchard, Professeur, Université de Poitiers  
Didier Bouchon, Professeur, Université de Poitiers  
Laurent Moulin, Docteur, Responsable R&D, Eau de Paris

Soutenue le 19 octobre 2018, devant la commission d'examen :

## JURY

Rapporteurs : Laurence Mathieu, Maître de Conférences, Ecole Pratiques des Hautes Etudes  
Benoit Cournoyer, Directeur de Recherche, CNRS

Examineurs : Françoise Lucas, Professeur, Université Paris-Est Créteil  
Hélène Agogué, Chargée de Recherche, Université de La Rochelle  
Yann Héchard, Professeur, Université de Poitiers  
Didier Bouchon, Professeur, Université de Poitiers  
Laurent Moulin, Docteur, Responsable R&D, Eau de Paris



# THESE

Pour l'obtention du Grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)  
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale : Sciences pour l'environnement Gay Lussac  
Secteur de Recherche : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Présentée par :

**Yoann PERRIN**

---

# Étude des communautés bactériennes d'un réseau d'eau potable Influence des paramètres environnementaux

---

### Directeurs de Thèse

Yann Héchard, Professeur, Université de Poitiers  
Didier Bouchon, Professeur, Université de Poitiers  
Laurent Moulin, Docteur, Responsable R&D, Eau de Paris

Soutenue le 19 octobre 2018, devant la commission d'examen :

## JURY

Rapporteurs : Laurence Mathieu, Maître de Conférences, Université de Lorraine  
Benoit Cournoyer, Professeur, Université Claude Bernard, Lyon 1

Examineurs : Françoise Lucas, Professeur, Université Paris-Est Créteil  
Hélène Agogué, Chargée de Recherche, Université de La Rochelle  
Yann Héchard, Professeur, Université de Poitiers  
Didier Bouchon, Professeur, Université de Poitiers  
Laurent Moulin, Docteur, Responsable R&D, Eau de Paris

# Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein de la Direction de la Recherche, du Développement et de la Qualité de l'Eau d'Eau de Paris dirigée par **Michel Joyeux**, et de l'UMR CNRS 7267 Écologie et Biologie des Interactions dirigée par **Didier Bouchon**. Merci à eux de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de leurs laboratoires. Merci également à **Laurent Moulin**, responsable de la R&D, et **Jean-Marc Berjeaud**, responsable de l'équipe Microbiologie de l'Eau, qui m'ont accueilli au sein de leur équipe.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame **Laurence Mathieu**, Maître de Conférences à l'Université de Lorraine, ainsi qu'à Monsieur **Benoit Cournoyer**, Directeur de Recherche CNRS à l'Université Claude Bernard Lyon 1, d'avoir accepté de rapporter ce travail.

Je remercie également Madame **Françoise Lucas**, Professeur à l'Université Paris-Est Créteil, et Madame **Hélène Agogué**, Chargée de Recherche à l'Université de La Rochelle, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement mes directeurs de thèse. Merci à **Yann Héchard** et **Laurent Moulin**. Merci de m'avoir fait confiance pour ce travail de thèse. Je ne saurais trop vous remercier de votre disponibilité, de vos conseils et de votre implication dans ce projet. Merci d'avoir toujours été optimiste dans les moments de doute. J'ai réellement eu de la chance d'avoir des encadrants d'une telle qualité. Merci enfin à **Didier Bouchon** pour avoir co-encadré cette thèse. Malgré un emploi du temps qui semblait ne plus en finir, tu as toujours su trouver le temps pour m'aider et me transmettre tes compétences. Je pense que sans toi, je serais encore perdu dans les méandres de la bioinformatique et des statistiques. Pour cela, je ne te remercierai jamais assez.

Je remercie particulièrement **Vincent D.** pour m'avoir mis le pied à l'étrier à mon arrivée à Poitiers et d'avoir toujours été disponible quand j'en avais besoin. Cette thèse n'aurait pas été la même sans ton implication, tes conseils et ton aide. Je pense qu'il y a un directeur de thèse officieux dans chaque thèse, et pour moi tu as ce titre sans aucun doute. Encore merci à toi !

Je remercie chaleureusement les membres de la R&D Biologie d'Eau de Paris, **Sophie**, **Marion**, **Héberte** et **Sébastien**, avec qui j'ai passé de bons moments. Merci d'avoir pris le temps de répondre à mes questions et désolé d'avoir mis autant le futoir partout. Sébastien, promis à moi, tu ne m'as pas fait peur ! Je n'oublie pas les voisins de la R&D Matériaux, **Jean**,

**Guillaume, Xavier et Jacques** pour leur bonne humeur et les moments conviviaux passés ensemble, merci à vous. Merci aussi à **Carole** pour son aide précieuse. Je tiens aussi à remercier le **département prélèvement** d'Eau de Paris sans qui cette thèse n'aurait pas pu aboutir, et même commencer d'ailleurs...

Un grand merci à mes compagnons d'aventure sans qui cette thèse n'aurait pas eu la même saveur. Merci à toi **Clément** pour tous ces bons moments, on a commencé et on finit nos thèses ensemble, et c'est pour ça que t'es mon préféré. Je tacherai de venir te rendre visite quand tu élèveras tes chèvres en Mongolie à la recherche de la tombe de Gengis Khan. Merci pour tout **Steven**, bien que tu sois la personne la plus insupportable que je connaisse et le chouchou de tout le monde (on en parle du stylo eppendorf ?). Merci aussi à **Meg**, j'aurais aimé te faire des remerciements audio pour que tu VOIYES à quel point je parle bien la France. Merci **Marie-Hélène C.** et **Florine** pour votre gentillesse et vos conseils au cours de toutes les discussions que nous avons pu avoir. Merci aussi à **Jeannette** et **Prunelle**, les collègues doctorantes d'Eau de Paris.

Merci à ceux qui, malgré qu'ils ne soient pas (ou plus) doctorants, ont partagé de très nombreux moments avec nous. Merci à **Vincent R., Marie-Laure, Luce, Camille et Marion R.** pour leur bonne humeur et les soirées passées tous ensemble. Merci pour leur soutien, leur aide et leur conseil tout au long de cette thèse.

Merci aux chasseurs de coquilles **Florine, Léna et Vincent R.** pour leur précieuse aide. Vous en avez trouvé des belles...

Merci à **Jean-Marc**, j'espère que ce manuscrit sera la preuve que j'ai fait un minimum de chose planqué derrière mon ordinateur ! Merci aux autres membres du laboratoire pour les discussions et les moments partagés, notamment aux pauses café. Merci aussi à **Ascel**, même si tu le nie, je suis sûr que tu as adoré ton séjour dans ce beau pays qu'est la Lorraine. Merci à **Christine, Julien, Willy, Stéphanie, Alexandre, Marie-Hélène R., Marion G., Christophe, Elodie, Estelle.** Merci aussi à **Laurence et Sylvie** pour leur aide précieuse. Merci à **Isabelle**, de l'équipe EES, pour m'avoir aidé à réaliser l'un des derniers runs de pyroséquençage de l'histoire des Sciences. Merci aussi à l'ensemble des stagiaires que j'ai pu cotoyer. Je pense notamment à **Anaïde** que j'ai eu le plaisir d'encadrer, mais aussi **Marine, Aurélien** (oui, parce qu'à l'heure où j'écris ces lignes, tu n'es pas encore un grand !), **Manon** et **Thibault**. Merci pour votre sympathie.

Merci à mes amis sur qui je pourrais toujours compter malgré la distance. Merci à **Yannis** sans qui, au final, je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci aussi à **Maximilien** pour ces moments passés à Paris. Désolé de te décevoir, mais une licence, deux Master et UNE thèse, c'est bien suffisant...

Je tiens à remercier **mon père** et **ma sœur**. Malgré la distance et le peu de nouvelles que je donne, je sais que dans le besoin ou les moments difficiles, j'aurais pu trouver en eux un soutien indéfectible.

Enfin, un immense merci à toi **Léna** pour avoir toujours été là dans les bons, comme les mauvais moments. Merci de m'avoir soutenu et supporté durant cette thèse, et d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Merci pour tout l'amour que tu me portes au quotidien. Je t'aime.





# Sommaire

Liste des abréviations	1
Table des figures	3
Table des tableaux	5
<b>Étude bibliographique</b>	<b>6</b>
I. L'eau potable	7
I.1. Définition	7
I.2. L'eau potable dans le monde	8
I.3. Le réseau d'eau potable de Paris	10
I.3.1. Les sources d'approvisionnement	11
I.3.2. Gestion des eaux souterraines	12
I.3.3. Gestion des eaux de surface	14
I.4. Distribution de l'eau potable	16
II. Impacts négatifs de la présence de bactéries dans un réseau d'eau potable.	17
II.1. Pathogènes de l'eau et risques sanitaires	18
II.1.1. Pathogènes bactériens d'origine entérique	18
II.1.1.1 <i>Vibrio cholerae</i>	19
II.1.1.2 Le genre <i>Salmonella</i>	20
II.1.1.3 <i>Campylobacter jejuni</i>	20
II.1.1.4 Le genre <i>Shigella</i>	20
II.1.1.5 <i>Escherichia coli</i>	20
II.1.2. Pathogènes bactériens d'origine hydrique	21
II.1.2.1 <i>Legionella pneumophila</i>	21
II.1.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
II.1.2.3 <i>Mycobacterium spp.</i>	25
II.1.3. Autres pathogènes microbiens	26
II.1.3.1 Les virus	27
II.1.3.2 Les protozoaires	27

II.2. Dégradation de la qualité de l'eau et des infrastructures par les bactéries	29
II.2.1. Dommages sur les infrastructures	29
II.2.2. Propriétés organoleptiques	31
II.2.3. La nitrification	32
III. Diversité bactérienne au sein d'un réseau d'eau potable	33
III.1. Facteurs influençant la colonisation bactérienne	33
III.1.1. Mode de vie bactérien	33
III.1.1.1 Population planctonique	33
III.1.1.2 Les biofilms	33
III.1.1.3 Les particules et sédiments	35
III.1.1.4 Interactions des trois compartiments	36
III.1.2. Caractéristiques propres au réseau	36
III.1.3. Disponibilité des nutriments	38
III.2. Méthodes d'analyses des communautés bactériennes	39
III.3. Diversité bactérienne dans les eaux brutes	42
III.4. Impact des traitements sur la diversité bactérienne	43
III.4.1. Filtration biologique	43
III.4.2. Chloration	44
III.4.3. Autres traitements d'oxydation	47
III.5. Réseau de distribution	47
III.5.1. Impact de la ressource en eau	48
III.5.2. Influence des paramètres spatio-temporels	48
III.5.2.1 Variations temporelles des communautés bactériennes	48
III.5.2.2 Effet de la configuration des réseaux sur les communautés bactériennes	50
III.5.2.3 Interaction des dynamiques spatiales et temporelles	51
<b>Problématiques et objectifs de l'étude</b>	<b>53</b>
<b>Matériels &amp; Méthodes</b>	<b>56</b>

I.	Campagne d'échantillonnage du réseau d'eau potable de Paris	57
I.6.	Échantillonnage	57
I.7.	Traitement des échantillons	57
II.	Culture et identification des microorganismes	58
II.1.	Culture bactérienne	58
II.1.1.	Culture d'Escherichia coli	58
II.1.2.	Isolement de la flore hétérotrophe totale	59
II.2.	Identification des bactéries par spectrométrie de masse MALDI-TOF	59
III.	Méthodes de biologie moléculaire	59
III.1.	Extraction d'ADN totale et plasmidique	60
III.2.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	60
III.3.	La PCR quantitative	61
III.3.1.	Réalisation de la gamme étalon	61
III.3.2.	Amplification	61
III.4.	Purification des produits PCR	62
III.5.	Clonage dans Escherichia coli	63
III.5.1.	Construction plasmidique	63
III.5.2.	Clonage	64
III.6.	Séquençage par la méthode de Sanger	64
III.7.	Technologie de séquençage Illumina	65
IV.	Analyses bioinformatiques	67
IV.1.	Notion d'écologie microbienne	67
IV.1.1.	L'unité taxonomique opérationnelle	67
IV.1.2.	L'alpha diversité	67
IV.1.3.	La bêta diversité	68
IV.2.	Analyse des résultats de séquençage	69
IV.2.1.	Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)	69
IV.2.2.	Analyses statistiques	70

<b>Résultats</b>	<b>71</b>
I. Étude de la diversité bactérienne au sein d'un réseau d'eau potable	72
I.1. Publication 1: Microbiome of a drinking water distribution system: a full scale spatio-temporal study to monitor water quality	73
I.2. Résultats complémentaires	97
I.2.1. Échantillons blancs	97
I.2.2. Taux de couverture des amorces	99
II. Analyse de la flore hétérotrophe totale d'un réseau d'eau potable	100
II.1. Identification des isolats bactériens	101
II.2. Identification des spectres protéiques inconnus	103
II.3. Variation spatiale de la flore hétérotrophe totale	105
II.4. Influence de la temporalité dans la répartition spatiale de la flore hétérotrophe totale	108
II.5. Discussion	110
III. Détection et quantification spécifique de trois pathogènes opportunistes	112
III.1. Publication 2: Spatio-temporal survey of <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Legionella pneumophila</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in the Paris drinking water distribution system.	113
<b>Discussion générale</b>	<b>134</b>
I. Limites et avantages des méthodologies utilisées	135
I.1. Le séquençage haut débit	135
I.2. La culture de la flore hétérotrophe totale	137
I.3. Détection et quantification par PCR quantitative	138
II. Avantage de l'utilisation combinée de différentes méthodologies	139
II.1. Les Rhizobiales, taxon vraiment majoritaire ?	140
II.2. Écologie des mycobactéries dans le réseau d'eau	141
II.3. Influence des paramètres environnementaux	141
III. L'étude individuelle des réseaux d'eau potable	143
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>145</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>149</b>

**Annexes** \_\_\_\_\_ **170**

Annexe A : Métagénomique ciblée de la diversité microbienne au sein d'amibes et d'échantillons d'eau. \_\_\_\_\_ 171

Annexe B : Bulletin de situation hydrologique des départements de l'Eure et de la Seine-Maritime au cours du mois de mai 2016 \_\_\_\_\_ 182

Annexe C : Bulletin de situation hydrologique des départements de l'Eure et de la Seine-Maritime au cours du mois de juin 2016. \_\_\_\_\_ 189

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AOA	<i>Ammonia oxidizing archaea</i>
AOB	<i>Ammonia oxidizing bacteria</i>
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATP	Adénosine triphosphate
COD	Carbone organique dissous
CODB	Carbone organique dissous biodégradable
COT	Carbone organique total
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	Désoxycytidine triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
ddATP	Didésoxyadénosine triphosphate
ddCTP	Didésoxycytidine triphosphate
ddGTP	Didésoxyguanosine triphosphate
ddNTP	Didésoxyribonucléotide triphosphate
ddTTP	Didésoxythymidine triphosphate
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
EPS	<i>Extracellular polymeric substance</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HPC	<i>Heterotrophic plate count</i>
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionisation – time of flight</i>
MNT	Mycobactéries non tuberculeuses
NOB	<i>Nitrate oxidizing bacteria</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTU(s)	<i>Operational taxonomic unit(s)</i>
pb	Paire de base
PCoA	<i>Principal coordinate analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

PCRq	PCR quantitative
PERMANOVA	<i>Permutational analysis of variance</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
PMA	Propidium monoazide
ppm	Partie par million
QIIME	<i>Quantitative insights into microbial ecology</i>
R2A	<i>Reasoner's 2A agar</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
UDI	Unité de distribution
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra-violet
spp.	Species pluralis

## Table des figures

Figure 1 : Carte de la proportion de la population mondiale utilisant des systèmes permettant l'approvisionnement d'une eau potable en 2015. _____	9
Figure 2 : Les différentes sources d'eau alimentant le réseau d'eau potable de Paris. ____	11
Figure 3 : Principe de fonctionnement des filières de potabilisation des eaux souterraines. 13	
Figure 4 : Principe de fonctionnement des filières de potabilisation des eaux de surface. _	15
Figure 5 : Carte des unités de distribution (UDI) de l'eau potable à Paris. _____	17
Figure 6 : Infection de l'amibe <i>Acanthamoeba castellanii</i> par une souche de <i>L. pneumophila</i> exprimant la protéine fluorescente GFP. _____	23
Figure 7 : Coloration de Zhiel-Neelsen révélant une interaction entre mycobactéries (en violet) et différents isolats amibiens d'un réseau d'eau potable (en bleu). _____	26
Figure 8 : Différents niveaux de colonisation par des biofilms (A à D) sur des canalisations en fonte d'un réseau d'eau potable. _____	30
Figure 9 : Biocorrosion d'un coupon d'acier au carbone observée par microscopie électronique à balayage. _____	31
Figure 10 : Exemple d'eau brune provenant d'un robinet d'eau domestique. _____	32
Figure 11 : Morphologie des biofilms sur les parois internes des tuyaux avant l'échantillonnage et la morphologie des parois des tuyaux après échantillonnage. _____	37
Figure 12 : Aperçu des interactions biotiques et abiotiques influant dans la dynamique des communautés bactériennes d'un réseau de distribution d'eau potable. _____	39
Figure 13 : Liste de différentes méthodes disponibles pour dénombrer, identifier ou caractériser les communautés microbiennes dans un réseau de distribution d'eau potable. 41	
Figure 14 : Abondance relative moyenne (A) et occurrence (B) des phylums et classes bactériens en fonction du traitement résiduel chloré appliqué. _____	46
Figure 15 : Variabilité temporelle de la structure de la communauté bactérienne construite en utilisant l'indice de distance de Bray-Curtis. _____	49



Figure 16 : Photographie de l'installation mimant un réseau de distribution d'eau potable de l'Université de Sheffield, Angleterre. _____	51
Figure 17 : Répartition géographique des sites de prélèvements des réservoirs et des réseaux de distributions du réseau d'eau potable de Paris. _____	58
Figure 18 : Carte du vecteur pGEM-T Easy et des sites de restriction présents. _____	63
Figure 19 : Principe de la technique de séquençage par synthèse. _____	66
Figure 20 : Nombre d'isolats bactériens obtenus par la méthode HPC sur la totalité de la campagne, en fonction des sites d'échantillonnage de chaque UDI. _____	102
Figure 21 : Nombre d'isolats bactériens obtenus par la méthode HPC en fonction de leur identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF. _____	103
Figure 22 : Arbre phylogénétique sur la base d'une portion du gène codant l'ARNr 16S des isolats bactériens non identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. _____	104
Figure 23 : Identification des colonies bactériennes isolées en fonction de leur UDI d'appartenance. _____	106
Figure 24 : Classification hiérarchique des sites d'échantillonnage en fonction des abondances relatives des genres bactériens identifiés dans chacun d'eux. _____	107
Figure 25 : Nombre d'isolats bactériens obtenus par la méthode HPC, en fonction des unités de distribution et des saisons. _____	108
Figure 26 : Nombre d'isolats bactériens obtenus par la méthode HPC, en fonction de chaque lieu de prélèvement et des saisons. _____	109

## Table des tableaux

Tableau 1 : Principales maladies d'origine entérique transmises par l'eau, et les bactéries pathogènes associées. _____	19
Tableau 2 : Pathologies provoquées par des pathogènes opportunistes présents dans des systèmes artificiels d'eau. _____	22
Tableau 3 : Diversité des amibes libres environnementales naturellement infectées par des bactéries pathogènes résistantes aux amibes isolées à partir de systèmes d'eau potable. _____	29
Tableau 4 : Amorces utilisées au cours de cette étude pour les expériences de PCR en point final. _____	60
Tableau 5 : Amorces et sondes nucléotidiques utilisées au cours de cette étude pour les expériences de PCRq. _____	62
Tableau 6 : Plasmides élaborés au cours de cette étude et utilisés comme gamme étalon pour les expériences de PCRq. _____	64
Tableau 7 : Comparaison des abondances relatives des taxons majoritaires (>1% de l'abondance relative totale) entre les unités de distribution et les échantillons blancs. _____	98
Tableau 8 : Taux de couverture de couples d'amorces vis-à-vis des genres <i>Hyphomicrobium</i> et <i>Phreatobacter</i> . _____	100

# **Étude bibliographique**

# I. L'eau potable

## I.1. Définition

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une eau potable est définie comme une eau douce chimiquement et biologiquement saine, utilisable à des fins alimentaires et qui ne représente aucun risque pour la santé quel que soit l'âge du consommateur (Organisation Mondiale de la Santé 2017a).

Outre les directives minimales fixées par l'OMS, la notion de potabilité est encadrée et définie par des normes propres à chaque pays. Les paramètres réglementés restent cependant similaires (Rodier *et al.* 2016) :

- Les caractéristiques organoleptiques (odeur, saveur, couleur) sont surtout contrôlées pour rassurer le consommateur. Ce sont des critères dits de confort. Néanmoins, dans certains cas rares, elles peuvent indiquer une eau impropre à la consommation.
- Les paramètres physico-chimiques (température, pH, conductivité, ...) représentent les caractéristiques de l'eau liées à son origine (eau souterraine ou eau de surface). Ils ne remettent pas en cause la potabilité de l'eau mais vont influencer sur ses propriétés désaltérantes, son niveau de minéralisation, et donc son goût et éventuellement son odeur. De plus, les mesures de ces paramètres permettent d'avoir une idée de l'équilibre calco-carbonique, témoin de la dureté de l'eau, mais aussi du vieillissement des installations au travers du potentiel corrosif de l'eau.
- La présence de certaines substances dites indésirables, tels que les composés azotés ou certains ions métalliques, est tolérée dans les eaux potables. Certaines de ces substances peuvent être bénéfiques pour l'Homme d'un point de vue biologique (Bost *et al.* 2016). Il est cependant nécessaire d'éviter une trop grande accumulation de ces substances qui peuvent s'avérer toxiques à de fortes concentrations. Dans d'autres cas, comme pour certains composés azotés tels que l'ammoniac, elles peuvent être une source de dégradation de la qualité de l'eau sans pour autant impacter sa potabilité.
- La présence de substances toxiques (métaux lourds, hydrocarbures polycycliques, pesticides et leurs dérivés, ...) est plus finement contrôlée que celle des substances indésirables. En effet, même à de très faibles concentrations, leurs impacts sur la santé

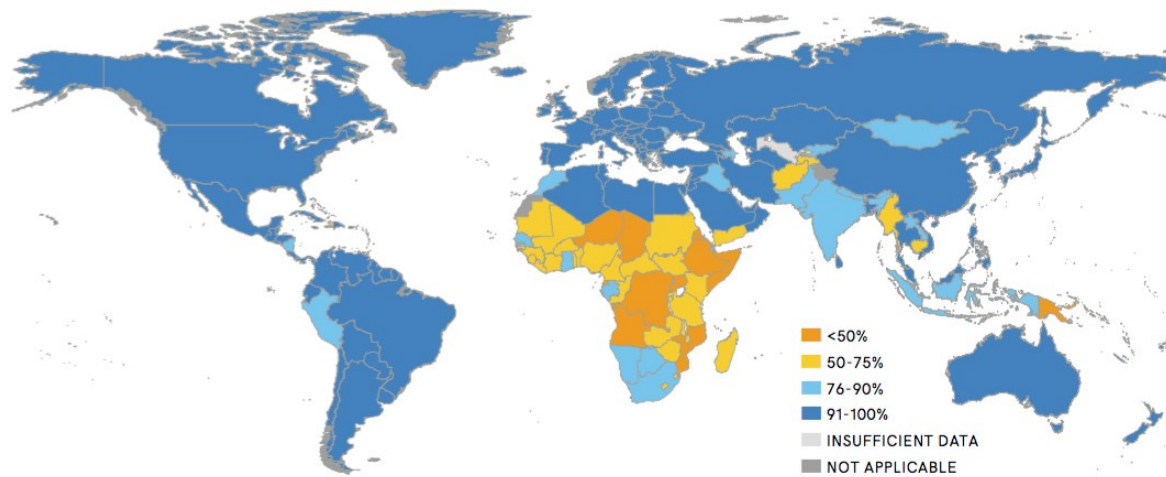
peuvent être dramatiques. Par exemple, une exposition au plomb, même à des concentrations très faibles, entraîne une dégradation de la santé (Payne 2008).

- Les paramètres microbiologiques se concentrent sur la numération de la flore hétérotrophe totale et sur la recherche d'indicateurs fécaux. La flore hétérotrophe totale correspond aux germes non pathogènes capables de se développer en culture sur milieu gélosé. Elle représente la teneur moyenne en bactéries d'une eau et elle ne doit pas fluctuer de plus d'un s par rapport à la moyenne ,au cours du temps. Les indicateurs fécaux sont des bactéries qui, lorsqu'elles sont présentes, indiquent une contamination fécale ou une inefficacité du traitement. Leur détection est considérée comme le signe de la présence de pathogènes. La détection de ces derniers se fait donc de façon indirecte. Les indicateurs fécaux doivent être totalement absents lors de leur recherche via des méthodes de culture.

## **I.2. L'eau potable dans le monde**

Aujourd'hui, l'eau potable est considérée comme essentielle à une bonne qualité de vie notamment dans les pays développés d'Europe et d'Amérique du Nord. Les traitements modernes utilisés permettent de produire une eau potable de qualité, en continu, de façon fiable et efficace, à partir de sources d'eau variables. L'eau distribuée est ainsi sans danger d'un point de vue biologique par l'élimination des pathogènes fécaux, mais aussi chimique puisque les potentielles substances chimiques présentes sont à l'état de traces et leur concentration inférieure aux concentrations maximales autorisées.

Cependant, dans les pays en développement, l'accès à une eau potable est souvent réservé à une élite. En 2015, 29% de la population globale (2,1 milliards de personnes) n'avait pas accès à de l'eau potable à domicile (Figure 1); et seulement 49% des pays reconnus par l'Organisation des Nations Unis (35% de la population globale) sont capables de fournir une eau potable à l'ensemble de leurs habitants (Organisation Mondiale de la Santé 2017a). L'absence de systèmes d'assainissement, principalement en Afrique, entraîne le maintien, et/ou le développement, de potentiels pathogènes dans l'eau et expose les populations à des risques sanitaires importants et souvent mortels. Selon les estimations de l'OMS, les maladies diarrhéiques représentent la principale cause de mortalité mettant en cause l'insalubrité de l'eau. Elles entraînent chaque année 1,5 millions de décès, soit 3,6% de la mortalité mondiale.



**Figure 1 : Carte de la proportion de la population mondiale utilisant des systèmes permettant l’approvisionnement d’une eau potable en 2015. La majorité des pays ayant une faible couverture de leur territoire en système d’approvisionnement se situe en Afrique. Selon l’Organisation Mondiale de la Santé.**

Dans les pays développés, les traitements appliqués se veulent garants d’une grande qualité de l’eau potable en sortie d’usine. Cependant, ils ne peuvent garantir une salubrité totale de l’eau comme le montre les exemples suivants. Il a pu ainsi être répertorié aux États-Unis d’Amérique, de 1971 à 2002, 764 épidémies provoquées par des eaux de consommation microbiologiquement contaminées, correspondant à 575 457 cas de maladie et 79 cas de décès (Reynolds *et al.* 2008). Cependant, leur réel impact est très certainement sous-estimé. En effet, des études basées sur la qualité de l’eau à la source, les traitements appliqués, la consommation et les statistiques sur les maladies transmises par l’eau (incidence, dose infectieuse), ont estimé entre 12 millions et 19,5 millions par an le nombre de cas de maladies transmises par l’eau potable (Colford *et al.* 2006 ; Messner *et al.* 2006 ; Reynolds *et al.* 2008).

Des évènements tels que des travaux, un défaut de maintenance, ou une défaillance des infrastructures représentent des risques potentiels d’intrusion de bactéries pathogènes ou opportunistes. Il est possible de prendre comme exemple la plus importante épidémie liée à un défaut de traitement des eaux en Europe. En novembre 2010, environ 27 0000 habitants de la ville d’Östersund en Suède (soit 45% de la population) ont été affectés par une épidémie de cryptosporidiose. La source de la contamination a été localisée en amont de l’usine de traitement mais n’a jamais pu être identifiée. L’inadéquation des traitements appliqués pour

l'inactivation totale des oocystes de *Cryptosporidium* a été considérée comme la cause de l'épidémie.

### **I.3. Le réseau d'eau potable de Paris**

Au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle, un exode rural massif engendre une forte urbanisation des grandes villes. De ce fait, la gestion des eaux destinées à la consommation et des eaux usées représente un véritable défi pour les autorités publiques. La ville de Paris a été l'une des premières villes à avoir tenté de répondre à ces besoins grandissants.

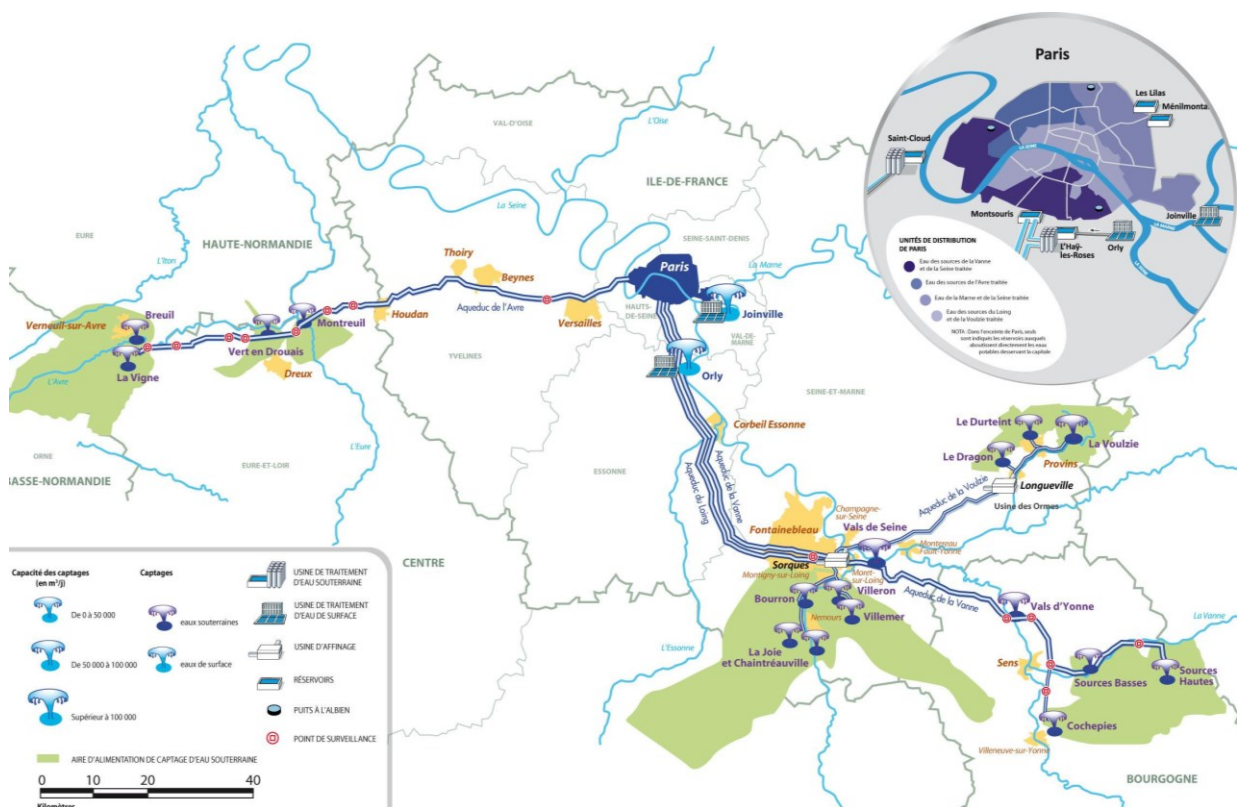
Vers les années 1830, les ressources en eau de la ville de Paris provenaient principalement du canal de l'Ourcq et de prélèvements dans la Seine. Mais l'explosion démographique et l'utilisation de la Seine comme déversoir des eaux usées provoquèrent trois épidémies de choléra en l'espace de quinze ans.

C'est dans ces circonstances que le réseau d'eau potable de la ville de Paris fût construit entre 1854 et 1860 lorsque Georges Eugène Haussmann, préfet de la Seine, mit en place un programme d'alimentation en eau potable pour la ville de Paris, et également d'évacuation des eaux usées. Le projet fût confié à l'ingénieur Eugène Belgrand qui entreprit la construction concomitante des réseaux d'eau potable et d'assainissement de Paris. Ainsi, 90% des canalisations du réseau d'eau potable de Paris se situent en galeries souterraines et sont visitables, contrairement aux réseaux d'eau classiques enterrés. Cette particularité permet un accès facile à l'ensemble du réseau et une intervention rapide en cas d'incident. De ce fait, le réseau d'eau potable de Paris bénéficie d'un rendement de 91,4% (taux représentant le volume d'eau arrivé au consommateur par rapport au volume d'eau injecté dans le réseau) parmi les meilleurs au monde.

Aujourd'hui, le réseau d'eau potable de Paris permet de répondre aux besoins de l'ensemble de la population parisienne en distribuant chaque jour entre 450 000 et 600 000 m<sup>3</sup> d'eau potable. Ce dernier représente actuellement 1900 km de canalisations et 470 km d'aqueducs. Il dispose de six usines de traitements, ainsi que de cinq réservoirs de stockages situés à proximité de Paris.

### 1.3.1. Les sources d’approvisionnement

Le réseau d’eau potable de Paris est alimenté par de multiples sources d’eau dont l’origine est également répartie entre des eaux de surface, ou des eaux souterraines (Figure 2). Les eaux de surfaces sont puisées dans la Seine et dans la Marne, en amont de Paris, avant d’être traitées, respectivement, au sein des usines de potabilisation d’Orly et de Joinville. Les eaux souterraines sont, quant à elles, récoltées via 102 points de captages pouvant se trouver à plus de 100 km de Paris. L’ensemble de ces eaux est acheminé aux usines de l’Hay-les-Roses, Saint-Cloud, Sorques et Longueville par les aqueducs de la Voulzie, du Loing, de la Vanne et de l’Avre.



**Figure 2 : Les différentes sources d'eau alimentant le réseau d'eau potable de Paris. Les eaux souterraines proviennent des sources de Verneuil-sur-Avre, Dreux, Nemours, Sens, Longueville et Provins. Elles sont acheminées aux usines de potabilisation de Saint-Cloud, l'Hay-les-Roses, Sorques et Longueville. Les eaux de surfaces sont issues de la Marne et de la Seine et sont traitées aux usines d'Orly et Joinville. Source : communication interne.**



Les traitements visant à rendre une eau potable sont adaptés en fonction de son origine. En effet, les eaux de surface et les eaux souterraines vont présenter des propriétés physico-chimiques et des paramètres microbiologiques différents (Prest *et al.* 2016). De manière générale, les eaux souterraines présentent des concentrations en sels minéraux et en molécules polluantes plus élevées, dû aux apports anthropiques de l'agriculture, ainsi qu'une concentration de cellules bactériennes relativement faible. D'un autre côté, le lessivage des sols provoque une plus forte charge en microorganismes et une forte concentration en carbone organique total (COT) dans les eaux de surface. Il est donc nécessaire que les différentes usines de potabilisation emploient des filières adaptées au type d'eau les approvisionnant.

### ***1.3.2. Gestion des eaux souterraines***

Les eaux souterraines sont, par définition, des eaux se trouvant sous la surface du sol, dans des espaces poreux et des fractures rocheuses, où elles vont s'accumuler et former une nappe phréatique lorsque la porosité du sol est entièrement saturée d'eau. Cette porosité entre les différents constituants du sol (sable, limon et argile) va agir comme un filtre naturel. Les particules colloïdales et les microorganismes de l'eau vont ainsi être retenus par des mécanismes d'adsorption ou d'obstruction. Cependant, ce processus naturel peut engendrer la solubilisation des molécules chimiques utilisées en agriculture telle que des nitrates, des pesticides ou des sous-produits de dégradation (Katagi, 2013 ; Rivett *et al.*, 2008).

Afin d'éliminer ces polluants, les eaux souterraines sont acheminées par aqueducs depuis les sites de captage jusqu'à des bassins de stockage avant d'être filtrées sur charbon actif en grain sur lequel de nombreuses molécules organiques vont pouvoir s'adsorber. Ce processus va donc permettre d'éliminer d'éventuels produits phytosanitaires ou pharmaceutiques. L'eau est ensuite mise sous pression afin de subir une ultrafiltration à travers un réseau de fibres de 10 à 100 nm en moyenne qui retient théoriquement les organismes eucaryotes et procaryotes éventuellement présents. Un traitement résiduel chloré est appliqué et l'eau est finalement stockée dans des réservoirs d'eau potable, situés à Montsouris, Saint-Cloud et l'Hay-Les-Roses (Figure 3).

Le chlore est un désinfectant rémanent qui permet d'éviter la reprise de croissance bactérienne au sein du réseau de distribution d'eau potable lors de l'acheminement de l'eau jusqu'au robinet du consommateur. Après avoir été dissous dans l'eau, le chlore forme de l'acide hypochloreux (HOCl), le chlore dit actif, et de l'acide chlorhydrique (HCl) dont les concentrations dépendent du pH. Ces composés sont rassemblés sous la dénomination chlore libre. Le pH est un paramètre physico-chimique important dans l'étape de chloration. Un pH

trop élevé entraîne une dismutation de HOCl vers l'anion hypochlorite ClO<sup>-</sup>, moins efficace pour la désinfection. Cependant, un pH trop bas engendre une consommation des désinfectants résiduels chlorés par les produits de corrosion, phénomène accru à pH acide. Bien que cette étape de chloration ait fait ses preuves dans la majorité des usines de traitement de l'eau potable, certains pays européens (l'Allemagne, l'Autriche, les Pays-Bas et la Suisse) ont choisi de mettre en place des filières de traitement et de production d'eau potable exempt de chloration (Hammes *et al.* 2010). En France, les villes n'utilisant pas de traitement résiduel chloré font cas d'exception. On retrouve notamment la ville de Grenoble et son agglomération.

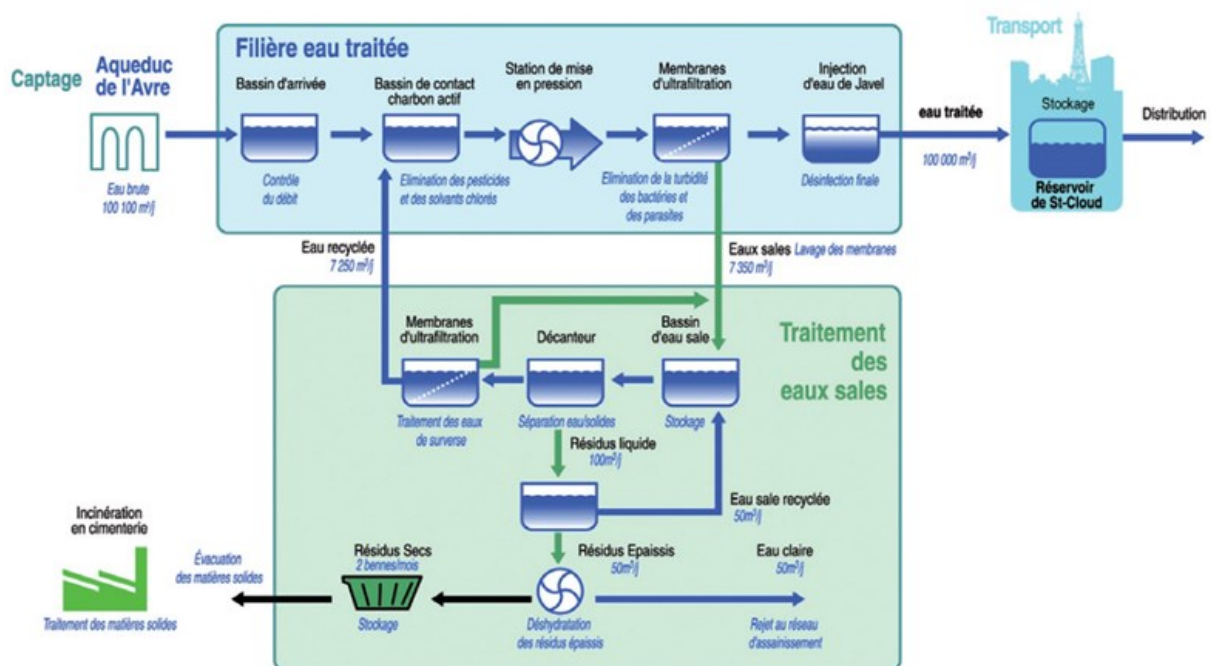


Figure 3 : Principe de fonctionnement des filières de potabilisation des eaux souterraines. Du fait d'une première filtration naturelle, elles sont uniquement traitées avec du charbon actif suivi d'une étape d'ultrafiltration afin de clarifier l'eau et filtrer les microorganismes. Source : communication interne.

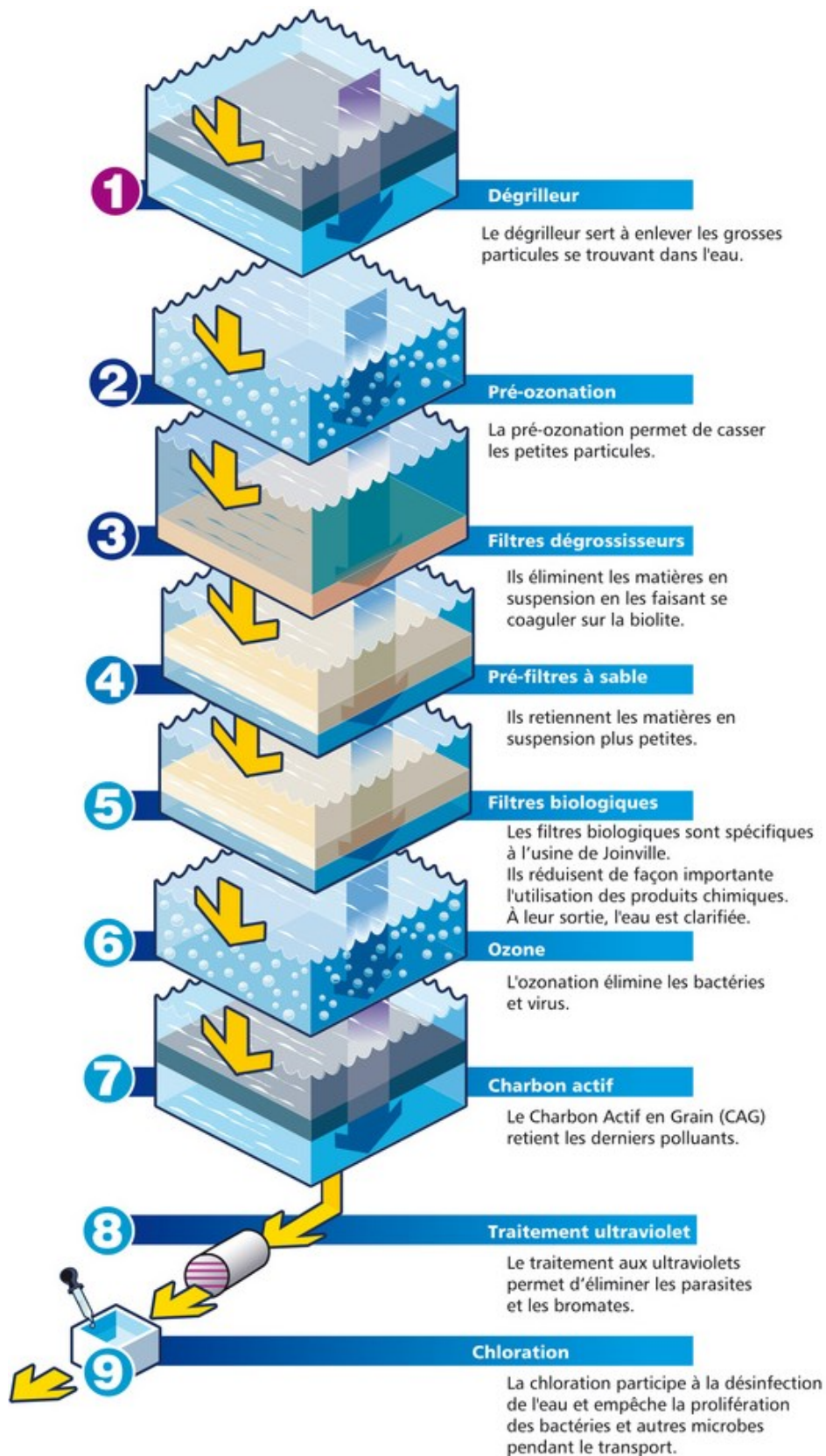
### ***1.3.3. Gestion des eaux de surface***

Contrairement aux eaux souterraines, les eaux de surface présentent une charge en particules et en microorganismes plus élevée. Elles présentent aussi une concentration importante en COT. La portion dissoute et biodégradable (CODB) du COT est un paramètre important dont l'élimination évite des reprises de croissance bactérienne. De ce fait, ces eaux subissent un plus grand nombre de traitements (Figure 4).

À la suite du pompage de l'eau, un dégrillage est effectué **(1)** afin de filtrer l'eau de façon grossière et d'éliminer les éléments flottants potentiellement présents (branchages, feuilles, ...). Par la suite, un traitement d'ozonation à faible concentration **(2)** permet d'oxyder les substances organiques. L'eau subit ensuite une étape de coagulation-filtration sur des filtres dégrossisseurs **(3)**. La coagulation permet de lier les particules colloïdales à des sels métalliques pour supprimer les répulsions inter-colloïdales. La suppression de ces charges permet la coagulation des colloïdes via l'ajout d'un polymère et leur agglomération en un floc (Matilainen *et al.* 2010).

L'élimination de ces agglomérats diverge entre les deux usines de potabilisation des eaux de Paris. Au sein de l'usine d'Orly, les floccs vont être décantés et accumulés au fond de bassins de décantation. Leur accumulation forme des boues qui pourront être récupérées par la suite. Dans le cas de l'usine de Joinville, de l'air est injecté dans les bassins afin de former des bulles au sein des floccs. Ces derniers vont alors remonter à la surface des bassins et être récupérés par flottation. Cette différence de méthodologie est directement liée à la source d'eau. En effet, la présence de microorganismes tels que les cyanobactéries peut interférer fortement avec le processus de décantation.

Afin de clarifier l'eau, une étape de filtration sur sable est réalisée **(5)**. Au sein de l'usine d'Orly, cette étape est dite "sur filtre à sable" et l'eau met environ 8 h pour traverser le lit de sable. Au sein de l'usine de Joinville, elle est dite "biologique" et l'eau met 24 h pour traverser le lit de sable. Cette étape permet dans un premier temps de retenir les particules n'ayant pas été piégées lors des étapes précédentes. Dans un deuxième temps, cette filtration lente va favoriser l'activité biologique des microorganismes, étape clé dans l'élimination des composés organiques présents dans l'eau. Afin d'inactiver cette flore microbienne, un traitement d'ozonation est effectué à la sortie des bassins de filtration **(6)**. L'ozone représente aussi la



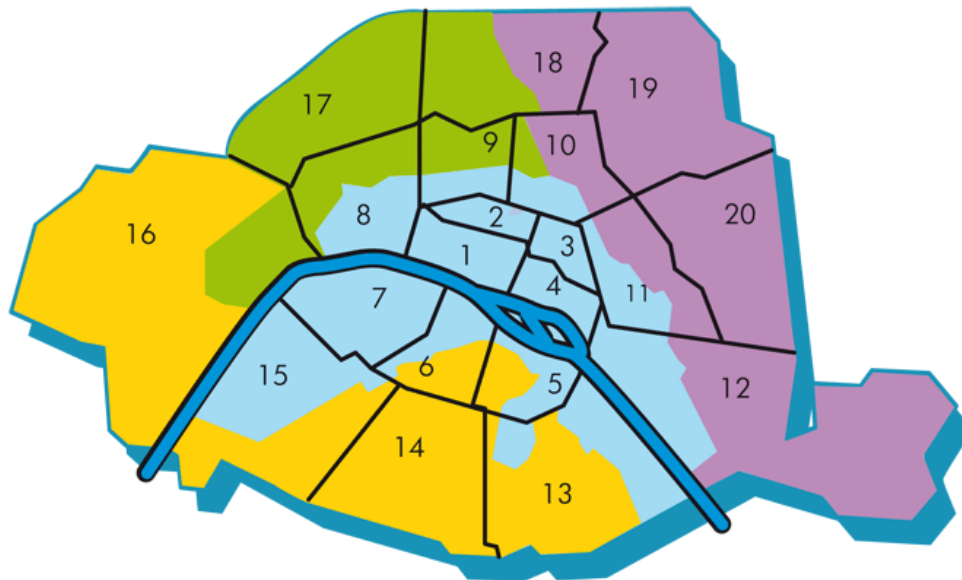
**Figure 4 : Principe de fonctionnement des filières de potabilisation des eaux de surface.** Les principales étapes de la potabilisation des eaux de surfaces consistent en des étapes de filtrations (étapes 1, 3, 4, 5) et des étapes de traitements (étapes 2, 6, 7, 8, 9). Source : [www.eaudeparis.fr/les-metiers/produire/#traiter\\_eaux\\_rivieres](http://www.eaudeparis.fr/les-metiers/produire/#traiter_eaux_rivieres).

première étape de désinfection de l'eau, et présente un pouvoir bactéricide. Le dosage de l'ozone doit être maîtrisé afin d'éviter la formation de bromates dont la concentration dans l'eau potable ne doit pas excéder 10 µg/L selon la réglementation en vigueur (Tao Lin *et al.* 2014).

L'eau est ensuite filtrée sur charbon actif afin d'éliminer les derniers polluants organiques (7). Finalement, l'eau est exposée à un rayonnement ultraviolet de 40 mJ/cm<sup>2</sup> (8) (Hijnen *et al.* 2006), puis une désinfection avec un effet rémanent est appliquée. Pour cela, l'eau est chlorée à 0,3 ppm (partie par million) de chlore actif (9) qui complète l'étape d'ozonation dans l'élimination des microorganismes. L'eau est ensuite envoyée dans les réservoirs d'eau potable localisés à Belleville, Ménilmontant et les Lilas avant sa mise en circulation dans le circuit de distribution.

#### **I.4. Distribution de l'eau potable**

Les réservoirs de stockages, situés aux portes de Paris, peuvent contenir 1 087 000 m<sup>3</sup> d'eau potable, soit l'équivalent de deux jours de consommation pour la ville de Paris. Ces derniers alimentent continuellement le réseau de distribution de Paris en eau potable. Ce réseau représente 1 900 km de canalisations dont 70 % sur la rive droite de la Seine et 30 % sur la rive gauche. Compte tenu de la topographie de Paris, le réseau de distribution est découpé en zone d'altitude. Chacune de ces zones est alimentée par les différents réservoirs selon des unités de distribution (UDI). Celles-ci ne sont pas alimentées par des eaux de la même origine (figure 5). L'UDI Centre est alimentée par les eaux souterraines traitées dans les usines de Sorques et Longueville. L'UDI Est est la seule alimentée par de l'eau de surface traitée dans les usines de Joinville et d'Orly. L'UDI Nord-Ouest est alimentée par les eaux souterraines traitées dans l'usine de Saint-Cloud. L'UDI Sud-Ouest est alimentée par un mélange des deux types d'eau, l'eau souterraine venant de l'usine de l'Haÿ-les-Roses et l'eau de surface venant de l'usine d'Orly



**Figure 5 : Carte des unités de distribution (UDI) de l'eau potable à Paris.** ■ UDI centre alimentée par des eaux souterraines. ■ UDI Est alimentée par des eaux de surface. ■ UDI Nord-Ouest alimentée par des eaux souterraines. ■ UDI Sud-Ouest alimentée par des eaux souterraines et de surface. Source : [www.eaudeparis.fr/la-qualite-de-leau-a-paris](http://www.eaudeparis.fr/la-qualite-de-leau-a-paris).

## **II. Impacts négatifs de la présence de bactéries dans un réseau d'eau potable.**

La présence de bactéries dans un réseau d'eau potable n'est pas forcément associée à un problème d'ordre sanitaire et n'est pas non plus un signe de la détérioration des infrastructures du réseau. Elles sont, en effet, retrouvées de façon ubiquitaire dans l'eau potable et sont considérées comme un composant inévitable de cet écosystème. Leur présence est notamment due au fait que les bactéries sont un élément essentiel au cours du traitement, lors du passage des eaux de surfaces sur les filtres biologiques. Des travaux ont en effet montré une augmentation de la biomasse bactérienne planctonique à la suite de ces étapes (Lautenschlager *et al.*, 2014). Les traitements appliqués en aval diminuent considérablement la charge bactérienne, et limitent d'éventuelles reprise de croissance dans le réseau de distribution et ce, jusqu'au robinet du consommateur. Mais ils ne peuvent pas éliminer totalement ces microorganismes.

Le but du producteur d'eau potable est donc de réussir à contrôler ces populations bactériennes, aussi bien au niveau de leur diversité que du nombre de cellules métaboliquement actives. Ainsi, les normes précisent que la flore hétérotrophe totale ne doit pas fluctuer plus de dix fois par rapport à la moyenne habituelle, et que l'eau doit être exempte d'indicateurs fécaux. Une mauvaise gestion, un incident, ou des travaux peuvent conduire à une détérioration des infrastructures, voire une contamination de l'eau par des bactéries pathogènes.

## **II.1. Pathogènes de l'eau et risques sanitaires**

### ***II.1.1. Pathogènes bactériens d'origine entérique***

Les bactéries pathogènes transmises par l'eau ont principalement une origine fécale et sont ainsi nommées bactéries pathogènes entériques (Fewtrell et Bartram 2001). Leur prévalence dans les réseaux de distribution a diminué en même temps que les traitements se sont améliorés. L'efficacité de ces traitements à éliminer des bactéries pathogènes entériques est aujourd'hui estimée par la recherche d'indicateurs fécaux via des méthodes de culture. Ainsi, les indicateurs fécaux étant éliminés par les traitements appliqués à l'eau, il est considéré que les bactéries entériques pathogènes le sont aussi. Cependant, les pathogènes ne possèdent pas les mêmes caractéristiques que ces indicateurs que ce soit vis-à-vis des traitements résiduels chlorés ou de leur persistance dans l'environnement. Il est de ce fait possible que les maladies consécutives à une infection par ces pathogènes présentent une très faible prévalence dans les pays développés.

Les principales maladies entériques transmises par l'eau, et les bactéries pathogènes auxquelles elles sont associées, sont présentées dans le tableau 1. Les caractéristiques de ces maladies vont varier selon la dose infectieuse, soit le nombre minimal d'organismes à ingérer avant de développer l'infection, (de  $10^1$  à  $10^6$  selon la maladie) et selon la sévérité des symptômes (Schroeder et Wuertz 2003). Cependant, elles sont similaires d'un point de vue symptomatique puisqu'elles provoquent toutes une diarrhée importante conduisant à une déshydratation.

**Tableau 1 : Principales maladies d'origine entérique transmises par l'eau, et les bactéries pathogènes associées. Tableau adapté de Schroeder et Wuertz 2003.**

Maladie	Bactérie	Dose infectieuse	Caractéristiques
Cholera	<i>Vibrio cholerae</i>		Diarrhée grave, déshydratation
Salmonellose	<i>Salmonella</i> spp.	10 <sup>6</sup>	Diarrhée aqueuse souvent accompagnée de crampes abdominales, de nausées, de vomissements, de fièvre et de frissons.
Fièvre typhoïde	<i>Salmonella typhi</i>	<1000	Fatigue, maux de tête, douleurs abdominales, température élevée, taux de mortalité d'environ 4%.
Gastro-entérite ou campylobactériose	<i>Campylobacter jejuni</i>	<500	Diarrhée aqueuse souvent accompagnée de crampes abdominales, de nausées, de vomissements, de fièvre et de frissons.
Dysenterie ou shigellose	<i>Shigella</i> spp.	10	Diarrhée sanglante, crampes abdominales, douleurs rectales. La plupart des espèces virulentes, <i>S. dysenteria</i> , produisent des toxines causant le syndrome hémourémique.
Colite hémorragique et syndrome hémolytique urémique	<i>Escherichia coli</i>	Inconnue	Affection grave et systémique qui survient principalement chez les enfants de moins de 10 ans.

#### II.1.1.1 *Vibrio cholerae*

D'un point de vue historique, les premières épidémies identifiées comme étant d'origine entérique datent du XIX<sup>ème</sup> siècle avec les six grandes épidémies cholériques qui frappèrent l'Afrique, l'Asie et l'Europe à partir de 1817 (Lippi *et al.* 2016). Il fallut attendre 1854 et les travaux de John Snow pour que l'eau de boisson soit identifiée comme agent responsable de la maladie (Snow 1855). Cette même année, Filippo Pacini décrit l'agent responsable du choléra qui sera nommé par la suite *Vibrio cholerae* (Pacini *et al.* 1854). Depuis les cent dernières années, les cas de choléra sont très rares dans les pays développés et concernent uniquement des personnes voyageant dans des pays à risque. Elle reste cependant la maladie endémique la plus fréquente dans certains pays en développement (Ashbolt 2004).



#### II.1.1.2 Le genre *Salmonella*

Actuellement, l'OMS considère que l'ensemble des espèces du genre *Salmonella* peuvent présenter un risque pour la santé humaine, et sont donc toutes classées comme des pathogènes humains (Organisation Mondiale de la Santé 2017b). Cependant, si on ne considère que les maladies à salmonelles transmises par l'eau, seules les bactéries *Salmonella enterica subsp. typhi* et *S. enterica subsp. paratyphi* ont une très forte occurrence, même dans les pays développés (Ashbolt 2004, 2015b). Ces dernières provoquent respectivement la fièvre typhoïde et la fièvre paratyphoïde qui représentent, derrière le choléra, les deux maladies d'origine hydrique avec la plus forte incidence dans le monde, avec plus de 11 millions de cas chaque année (Obaro *et al.* 2017).

#### II.1.1.3 *Campylobacter jejuni*

La bactérie *Campylobacter jejuni* est considérée comme l'une des bactéries pathogènes transmises par l'eau les plus problématiques dans les pays développés (Ashbolt 2015b). Aux États-Unis d'Amérique par exemple, il est estimé que 2 millions de cas de campylobacteriose apparaissent chaque année dont 500 cas mortels (Schroeder et Wuertz 2003). La présence de *C. jejuni* dans l'eau de consommation peut être due à un dysfonctionnement dans la filière de traitement de l'eau. La majorité des épidémies est cependant liée à des travaux et à l'absence de dispositions pour garantir la potabilité des infrastructures par désinfections (Pitkänen 2013). Dans les pays développés, la maladie est principalement retrouvée chez les enfants de moins de 5 ans et les jeunes adultes.

#### II.1.1.4 Le genre *Shigella*

Les bactéries du genre *Shigella* sont les principales causes de diarrhées sanglantes chez les personnes infectées, notamment chez les enfants, et ce avec une forte mortalité. Chaque année environ 2 millions d'infections sont répertoriées conduisant à 600 000 décès (Organisation Mondiale de la Santé 2017a). Quatre espèces sont communément retrouvées dans les cas d'infections, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* et *S. sonnei*. (Schroeder et Wuertz 2003). Dans les pays développés, il est constaté une large prévalence de *S. sonnei* dans les cas de shigellose sans raison apparente (Kim *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2017; Tóth *et al.*, 2014)(Thompson *et al.* 2015). De plus, il est étonnant d'observer une émergence de cette espèce au cours de l'évolution économique croissante des pays en développement (Feil 2012).

#### II.1.1.5 *Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* est un microorganisme naturellement présent dans le tractus digestif humain. Cependant, un certain nombre de souches sont pathogènes pour l'homme et causent des symptômes diarrhéiques plus ou moins importants selon leur virulence. Sur la base de ces symptômes, les souches pathogènes d'*E. coli* sont classées en 6 groupes : les *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC), les *E. coli* entéroinvasives (EIEC), les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), les *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et les *E. coli* adhérant de manière diffuse (DAEC). Ces souches entraînent des maladies diarrhéiques potentiellement sanguinolentes et des infections urinaires (Kaper *et al.* 2004).

### **II.1.2. Pathogènes bactériens d'origine hydrique**

Les maladies entériques sont provoquées par des pathogènes stricts. Certaines pathologies infectieuses humaines sont, quant à elles, provoquées par des microorganismes dit pathogènes opportunistes. Ces derniers sont des colonisateurs classiques des réseaux d'eau potable pouvant causer des infections à des individus sensibles tels que des personnes ayant un âge avancé (supérieur à 70 ans) ou des personnes déjà atteintes d'une pathologie ou d'une immunodéficience (Falkinham *et al.* 2015). Ils infectent leur hôte via des événements fortuits de contact direct (blessures, par exemple) ou d'ingestion (Kuris *et al.* 2014). Ainsi, les taux de transmission à l'Homme sont proportionnels à la probabilité de contact entre le microorganisme et l'hôte. Actuellement, les principaux problèmes sanitaires liés à l'eau potable sont provoqués par le contact ou l'ingestion de mycobactéries non tuberculeuses, de *L. pneumophila* ou de *P. aeruginosa* (Ashbolt 2015a). Cependant, d'autres pathogènes opportunistes peuvent être présents dans les réseaux d'eau potable (Tableau 2).

#### **II.1.2.1 *Legionella pneumophila***

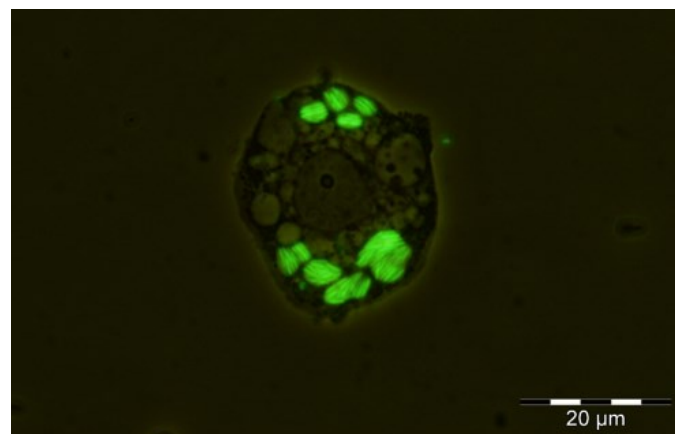
*Legionella pneumophila* est une bactérie retrouvée de façon ubiquitaire dans les environnements aquatiques naturels ou artificiels et qui est responsable d'une infection pulmonaire, nommée la légionellose ou maladie dite "du légionnaire", au cours de laquelle les légionelles atteignent les alvéoles pulmonaires et infectent les macrophages (Fields *et al.* 2002). Il est à noter que la prévalence de la maladie semble augmenter au fil des années. Sur la période 2011 à 2015, le nombre de cas est passé de 0.97 à 1.30 pour 100 000 en

**Tableau 2 : Pathologies provoquées par des pathogènes opportunistes présents dans des systèmes artificiels d'eau. Tableau adapté de Ashbolt, 2015a.**

<b>Pathogènes opportunistes</b>	<b>Niche problématique</b>	<b>Pathologies liées</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Libre dans des biofilms d'établissements de santé	Infections nosocomiales causées par des biofilms de l'eau potable, des conduits respiratoires et des cathéters urinaires ; souches résistantes aux antimicrobiens.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ubiquitaire des environnements aquatiques, colonise les systèmes d'eau artificiels	Peu préoccupant en sanitaire (y compris les souches entériques), mais peut causer des infections au niveau de plaies
<i>Neochlamydia</i> spp., <i>Parachlamydia</i> spp., <i>Simkania negevensis</i> , <i>Waddlia chondrophila</i>	Symbiote obligatoire d'amibes environnementales	Pneumonie Cas rares d'avortement
<i>Legionella longbeacheae</i> <i>L. micdadei</i> <i>L. pneumophila</i>	Libre dans les biofilms, microbiote d'amibes et autres protozoaires	Légionellose (de la fièvre bénigne de Pontiac à la maladie du légionnaires) Pneumonie
<i>Mycobacterium abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. avium</i> <i>M. ulcerans</i>	Libre dans les biofilms, facultatif dans le microbiote d'amibe et d'autre protozoaire	Pneumonie Lymphadénopathie Infection de la peau et des tissus mous
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ubiquitaire des environnements aquatiques, colonise les systèmes d'eau artificiels	Folliculite via les piscines Maladies nosocomiales variées via les biofilms
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Ubiquitaire des environnements aquatiques, colonise les systèmes d'eau artificiels	Infections nosocomiales causé par des biofilms de l'eau potable, des conduits respiratoires et des cathéters urinaires ; souches résistantes aux antimicrobiens.

moyenne sur 29 pays européens (Beauté et The European Legionnaires' Disease Surveillance Network 2017).

Bien que des cellules libres de *L. pneumophila* soient capables de persister dans un biofilm pendant plusieurs jours, leur résistance aux conditions environnementales et leur multiplication sont néanmoins fortement réduites (Declerck *et al.* 2009). Dans le but de persister et de croître dans son environnement, *L. pneumophila* a développé une interaction parasitaire avec les amibes (Figure 6). Ces dernières sont des protozoaires communément retrouvées dans les réseaux de distribution d'eau potable (Delafont *et al.* 2013, 2016). Pour cela, *L. pneumophila* parasite et se multiplie à l'intérieur des amibes en détournant leur mécanisme de nutrition phagocytaire (Fields *et al.* 2002 ; Lau et Ashbolt 2009). Ainsi, la présence de ce pathogène dans l'eau potable serait fortement liée à sa prolifération dans les amibes. Ce mode de vie parasitaire leur permet notamment d'améliorer leur survie face aux traitements résiduels chlorés et autres biocides du fait de la protection physique attribuée par la paroi amibienne (Lau et Ashbolt 2009). De plus, ce développement intra-amibien conduirait à l'acquisition de caractéristiques phénotypiques améliorant leur résistance à des stress environnementaux. (Barker *et al.* 1995 ; Greub et Raoult 2004). Elles sont aussi plus virulentes avec une capacité d'infection des amibes et des macrophages plus importantes, accroissant ainsi le risque sanitaire vis-à-vis de l'Homme (Cirillo *et al.* 1994).



**Figure 6 : Infection de l'amibe *Acanthamoeba castellanii* par une souche de *L. pneumophila* exprimant la protéine fluorescente GFP. Les entités fluorescentes représentent des vésicules contenant des bactéries. Photographie de Luce Mengue (non publiée).**

#### II.1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie ubiquitaire dans les environnements telluriques et aquatiques (Falkinham, Hilborn, *et al.* 2015). Cette omniprésence est le résultat d'un large panel de propriétés lui permettant de s'adapter à un environnement oligotrophe tel que l'eau potable.

La colonisation d'environnements très divers par *P. aeruginosa* peut notamment être expliquée par sa capacité à exploiter différentes sources de nutriments et à croître sur une large variété de composés organiques (Klockgether *et al.* 2011). Ceci peut être mis en corrélation avec sa forte polyvalence métabolique, puisque son génome présente un grand nombre de gènes impliqués dans le catabolisme et le transport de composés organiques (Stover *et al.* 2000). Ce large panel de compétences pourrait aussi lui permettre de croître dans divers environnements aquatiques pauvres en nutriments (Mena et Gerba 2009). Il a notamment été montré que *P. aeruginosa* pouvait croître dans un réservoir d'eau distillée issue d'un hôpital (Favero *et al.* 1971).

Cette bactérie posséderait aussi une résistance suffisante au chlore pour avoir la possibilité de croître dans un réseau de distribution d'eau potable après application d'un traitement résiduel chloré (Mao *et al.* 2018 ; Shrivastava *et al.* 2004). En effet, il a été montré que certaines souches de *P. aeruginosa* isolées d'échantillons d'eau potable étaient capables de résister à des concentrations allant jusqu'à 0,5 mg/L de chlore en conditions de laboratoire. Or, cette valeur est supérieure à la concentration utilisée comme traitement résiduel dans certains réseaux d'eau potable (Stanish *et al.* 2016). En comparaison à *E. coli*, sa résistance au chlore serait 40 fois supérieure (Grobe *et al.* 2001). Vis-à-vis d'autres traitements tel que l'ozonation ou l'application d'ultra-violet, *P. aeruginosa* possède une résistance similaire à celle d'autres pathogènes (Mena et Gerba 2009). Outre la possible tolérance au chlore, une forte abondance de *P. aeruginosa* dans un réseau d'eau potable atteste d'un dysfonctionnement ou d'un manque de maintenance des infrastructures.

L'intérêt du grand nombre de voies métaboliques chez *P. aeruginosa* ne s'arrête pas seulement à un rôle nutritionnel. En effet, la pathogénicité de cette bactérie est attribuée à l'ensemble des facteurs de virulence qui lui permettent de coloniser divers types d'hôtes. Une infection par *P. aeruginosa* engendre diverses pathologies suivant le lieu de l'infection (Falkinham *et al.* 2015). Ce pathogène peut ainsi provoquer, entre autre, des infections au niveau de plaies et de brûlures, ainsi que des infections respiratoires aiguës et chroniques, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose (Ratjen et Döring 2003). Ces infections sont contractées, dans la majorité des cas, en milieu hospitalier et sont principalement

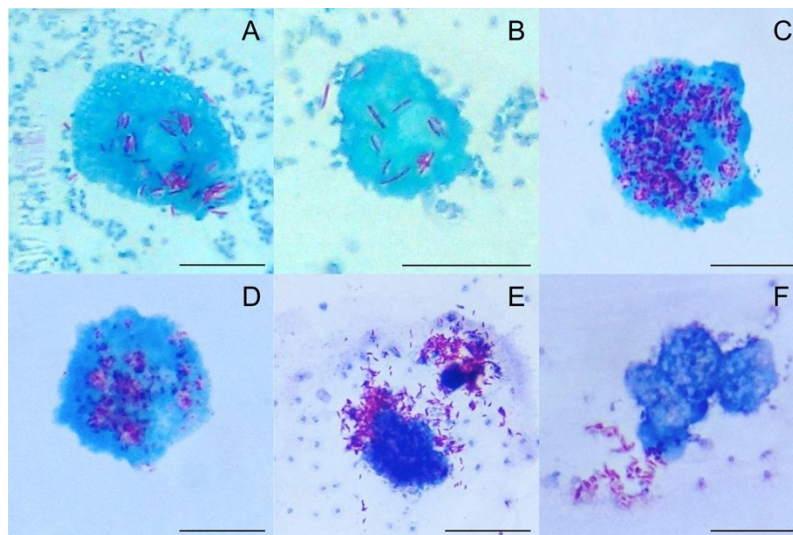
retrouvées chez des patients immunodéprimés ou atteints de mucoviscidose. Dans certains cas plus rares, Il est aussi possible de contracter une pneumonie lors de l'utilisation d'eau potable provenant d'équipements récréatifs ayant une faille dans leur fonctionnement ou maintenance (bain public, jacuzzi) (Hlavsa *et al.* 2015). *P. aeruginosa* est aussi très répandu dans les infections nosocomiales. Une étude, basée sur un génotypage par PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), a montré que les souches de *P. aeruginosa* isolées chez des patients infectés par la bactérie était les mêmes que celles présentes dans des échantillons d'eau potable issus de l'hôpital où les individus étaient soignés (Crivaro *et al.* 2009).

### II.1.2.3 *Mycobacterium spp.*

Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) sont l'un des groupes majeurs de ces pathogènes opportunistes et se distinguent des mycobactéries tuberculeuses et lépreuses qui, elles, sont des pathogènes stricts (Primm *et al.* 2004). Les MNT sont décrites comme colonisatrices, très certainement ubiquitaires, des réseaux de distribution d'eau potable puisqu'elles sont retrouvées dans des réseaux de distribution très variables dans leur conception (matériaux, longueur des canalisations, stockage) et dans les traitements qui leur sont appliqués (fonction de la source d'eau et de la taille de l'agglomération) (Delafont 2015 ; Falkinham 2016). Cette ubiquité serait due à leur capacité à croître dans des environnements aux paramètres physico-chimiques très divers, notamment dans des larges gammes de pH, de température, de salinité et de disponibilité en oxygène (Falkinham 1996).

Leur forte occurrence dans les réseaux d'eau potable pourrait aussi être liée à leur paroi atypique dont les différents composants (petidoglycane, acide mucolique et arabinogalactane) seraient fortement impliqués dans divers phénomènes de résistance (Hett et Rubin 2008).. Les espèces *M. aurum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, et *M. gordonae* font partie des mycobactéries majoritaires dans les réseaux d'eau potable. Cette quasi-omniprésence serait le résultat d'une plus forte résistance aux traitements résiduels chlorés, qui est 100 à 330 fois plus élevée que celle d'*Escherichia coli* (Le Dantec *et al.* 2002a). L'utilisation d'un autre traitement résiduel, comme les monochloramines qui sont répandues notamment en Amérique du Nord, ne s'avère pas être plus efficace puisqu'il est observé une reprise de croissance de certaines MNT en aval de l'usine de traitement et après un traitement par ces molécules (Falkinham *et al.* 2001). Les espèces *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. lentiflavum* et *M. fortuitum* possèderaient aussi une résistance aux rayonnements ultra-violet (UV) 2 à 10 fois plus importantes que celle d'*E. coli* (Lee *et al.* 2010).

Les interactions amibes-mycobactéries sont reconnues depuis de nombreuses années (Prasad et Gupta 1978). Cependant, leur interaction au sein d'un réseau d'eau potable n'a été mise en évidence que récemment (Figure 7) (Delafont *et al.* 2014). Dans cette étude 87,6% des amibes libres isolées étaient positives à la détection de *Mycobacterium* spp. par PCR quantitative (PCRq). L'abondance des mycobactéries dans un réseau d'eau potable semblerait être aussi corrélé à celle des amibes (Gebert *et al.* 2018). Tout comme *L. pneumophila*, une croissance intra-amibienne promeut une plus forte résistance à divers stress environnementaux ainsi qu'une virulence plus importante chez *M. avium* (Cirillo *et al.* 1997 ; Miltner et Bermudez 2000).



**Figure 7 : Coloration de Zhiel-Neelsen révélant une interaction entre mycobactéries (en violet) et différents isolats amibiens d'un réseau d'eau potable (en bleu). La barre d'échelle représente 10 μm. Figure issue de Delafont *et al.* 2014.**

Parmi l'ensemble des MNT, seules quelques espèces sont responsables de la majorité des infections à MNT qui touchent principalement des patients immunodéprimés ou atteints de mucoviscidose (Falkinham 1996). Les atteintes sont principalement pulmonaires puisqu'elles correspondent à 90% des cas d'infections à MNT (Kasperbauer et Huitt 2013). Cependant, elles peuvent aussi toucher les tissus mous et engendrer des infections cutanées (Ashbolt 2015a).

### **II.1.3. Autres pathogènes microbiens**

### II.1.3.1 Les virus

Les virus pathogènes transmis par l'eau sont classés comme ayant une importance sanitaire modérée à élevée par l'OMS. Ces virus comprennent les adénovirus, les astrovirus, les virus de l'hépatite A et E, les rotavirus, les calicivirus (dont les norovirus) et les entérovirus, y compris les coxsackievirus et les poliovirus. Ils peuvent persister longtemps dans les environnements hydriques. Des entérovirus ont aussi été retrouvés dans des aquifères, environnement considéré comme exempt de contamination microbienne (Borchardt *et al.* 2007).

L'ensemble de ces virus présentent un mécanisme d'infection similaire qu'ils soient des virus à ADN ou à ARN. Après avoir infecté un entérocyte, la machinerie cellulaire de l'hôte est détournée afin de produire un nombre important de particules virales. Cette multiplication conduit à la lyse des cellules intestinales, à la dissémination des virus dans le lumen et à l'infection d'autres entérocytes. La lyse multiple d'entérocytes perturbe ainsi l'absorption de l'eau et provoque des symptômes diarrhéiques.

### II.1.3.2 Les protozoaires

Les réseaux d'eau potable peuvent aussi abriter des organismes eucaryotes capables de résister aux traitements de désinfection et de proliférer au sein du réseau de distribution d'eau potable (Bichai *et al.* 2008 ; Hoffmann et Michel 2001). Les protozoaires sont des organismes unicellulaires se nourrissant par phagocytose et présentant une grande diversité morphologique et physiologique. La majorité des épidémies d'origine hydrique et parasitaire est due à la présence de *Cryptosporidium* spp. et *Giardia* spp.. En effet, une étude récente a révélé que sur les 381 épidémies à protozoaires parasitaires d'origine hydrique qui ont été signalées dans le monde entier et qui sont apparues dans les bases de données en ligne, 63% était causées par *Cryptosporidium* spp. et 37% par *Giardia* spp. (Efstratiou *et al.* 2017). Aucun autre protozoaire n'a été signalé comme agent causal d'une épidémie à protozoaire parasitaire d'origine hydrique entre 2011 et 2016 (Efstratiou *et al.* 2017).

Les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sont connus pour leur résistance aux traitements conventionnels de traitement de l'eau, tel que la coagulation, la sédimentation, la filtration et la désinfection au chlore (Betancourt et Rose 2004). L'utilisation de traitements supplémentaires tels que l'ozone et les rayonnements UV permettent d'améliorer l'abattement en log du nombre d'oocystes (Betancourt et Rose 2004). De ce fait, l'utilisation de la détection de *Cryptosporidium* spp. dans les normes actuelles de qualité de l'eau potable permet de valider le bon fonctionnement de la filière de traitement de l'eau. *Giardia* spp. est aussi



recherché lors des analyses d'eau potable du fait de sa forte prévalence dans les épidémies à protozoaires parasites.

Des épidémies à autres parasites protozoaires existent mais sont plus rares. On retrouve notamment des épidémies à *Cyclospora*, *Blastocystis*, *Entamoeba* et *Toxoplasma* et à des genres du phylum des Microspora (Ashbolt 2015b ; Bridle 2013).

Outre leur implication dans diverses pathologies humaines (Ashbolt 2004, 2015b, 2015a), les protozoaires, et principalement les amibes, sont qualifiés de "Cheval de Troie du monde microbien" (Barker et Brown 1994). En effet, les amibes sont connues pour transporter un microbiome très diversifié et pouvant inclure certains genres bactériens pathogènes (Delafont *et al.* 2017 ; Greub et Raoult 2004 ; Hoffmann et Michel 2001 ; Taylor *et al.* 2012). Comme présenté précédemment, les pathogènes opportunistes *L. pneumophila*, *P. aeruginosa* et ceux appartenant au genre *Mycobacterium* sont capables de persister, voire de se multiplier, au sein d'amibes. Il existe un nombre conséquent d'autres pathogènes opportunistes qui ont été directement détectés dans des isolats d'amibes provenant d'usines de traitement d'eau ou de réseaux de distribution d'eau potable (Tableau 3) (Thomas et Ashbolt 2011). Ces interactions mettent en évidence l'importance que peuvent avoir les amibes dans la propagation de certains vecteurs de pathologies humaines. Ces dernières pourraient donc être acquises non pas par l'ingestion directe de l'agent pathogène mais par l'inhalation d'une amibe en interaction avec l'agent infectieux (Barker et Brown 1994 ; Greub et Raoult 2004).

**Tableau 3 : Diversité des amibes libres environnementales, naturellement infectées par des bactéries pathogènes et résistantes aux amibes, isolées à partir de systèmes d'eau potable. <sup>a</sup> Seuls les interactions naturelles sont reportées dans ce tableau. <sup>b</sup> Amibes libres non identifiées dans la référence. Tableau adapté de Thomas et Ashbolt 2011.**

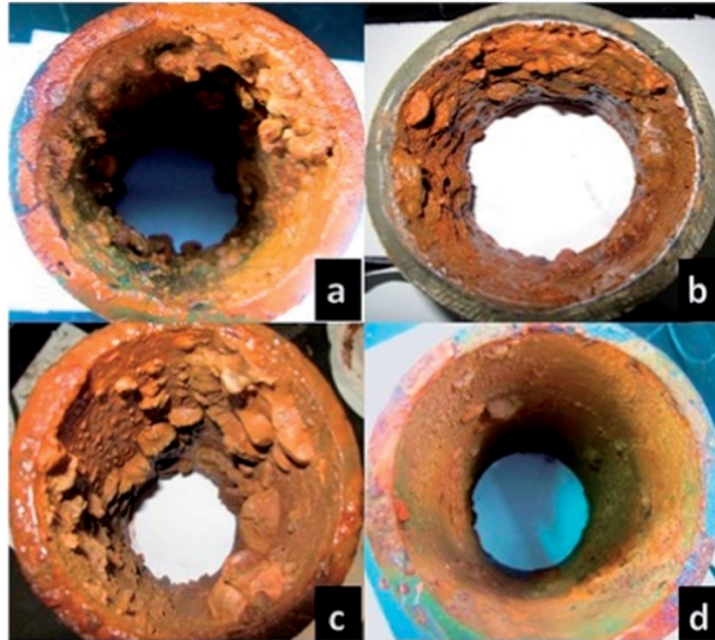
Genre		ARB <sup>a</sup>	Emplacement	Ref
Amibes libres environnementales <sup>b</sup>		<i>Flavobacterium indologines</i>	Usine de traitement Réseau de distribution	Hoffmann et Michel 2001
		<i>Pseudomonas stutzeri</i>		
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		
<i>Acanthamoeba</i>	sp. Genotype T4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Robinet d'eau Réseau de distribution	Michel <i>et al.</i> 1995
		<i>Legionella sp.</i>	Sédiment de réservoir	Corsaro <i>et al.</i> 2010
		<i>Neochlamydia sp.</i>		Corsaro <i>et al.</i> 2009
<i>Echinamoeba</i>	<i>E. exundans</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	Usine de traitement	Thomas <i>et al.</i> 2008
		<i>Legionella londiniensis</i>		
<i>Hartmannella</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>Neochlamydia sp.</i>	Usine de traitement	Thomas <i>et al.</i> , 2008
		<i>Legionella pneumophila</i>	Robinet d'eau	Thomas <i>et al.</i> 2006
Naegleria	<i>N. andersoni</i>	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	Usine de traitement	Thomas <i>et al.</i> , 2008
		<i>Legionella micdadei</i>		

## II.2. Dégradation de la qualité de l'eau et des infrastructures par les bactéries

### II.2.1. Dommages sur les infrastructures

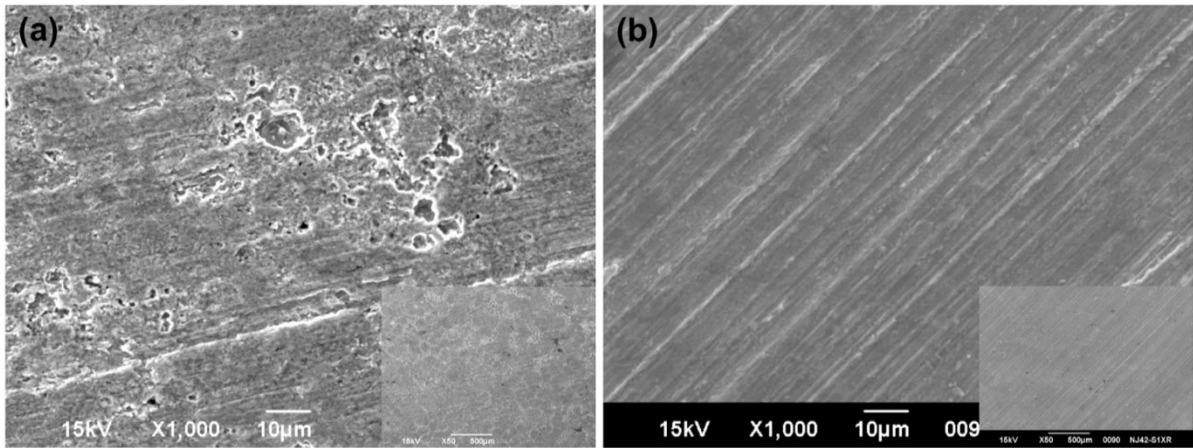
Outre leur impact sur la santé, un développement bactérien important peut engendrer une dégradation des qualités organoleptiques de l'eau distribuée, des infrastructures du réseau de distribution d'eau potable, et de ce fait des coûts financiers importants pour la réparation des dommages (Dietrich *et al.* 2004). Ces dommages sont notamment dus à la présence de biofilm en contact direct avec les canalisations.

Il est possible, dans certains cas, que les conditions hydrauliques soient modifiées (perte de débit) lors de l'obstruction des conduites à cause de la présence de biofilm soumis à une croissance bactérienne importante (Allion *et al.* 2011) (Figure 8).



**Figure 8 : Différents niveaux de colonisation par des biofilms (A à D) sur des canalisations en fonte d'un réseau d'eau potable. Figure tirée de Sun *et al.* 2014.**

Outre des problèmes d'ordre physique, des phénomènes chimiques, liés à l'activité métabolique bactérienne, peuvent avoir lieu à l'interface biofilm/matériau (le plus souvent métallique), on parle alors de biocorrosion. Cependant, si ce phénomène est toujours associé à la présence d'un biofilm, ce mode de vie n'induit pas toujours une corrosion des canalisations (Feugeas *et al.* 1997). Dans la plupart des cas, c'est l'activité métabolique de bactéries anaérobies qui est la cause directe de cette dégradation (Xu *et al.* 2016). Les bactéries sulfato-réductrices, dénitrifiantes ou produisant des acides sont connues pour être impliquées dans ce mécanisme de corrosion (Sun *et al.* 2014 ; Xu *et al.* 2013, 2016). Par exemple, la figure 9 montre l'activité corrosive de la bactérie dénitrifiante *Bacillus licheniformis* sur un coupon d'acier après 7 jours de contact.



**Figure 9 : Biocorrosion d'un coupon d'acier au carbone observée par microscopie électronique à balayage. Le coupon d'acier a été incubé 7 jours à 37 degrés en présence (A) ou absence (B) de la bactérie *Bacillus licheniformis*. Figure tirée de Xu et al. 2013.**

### ***II.2.2. Propriétés organoleptiques***

Les propriétés organoleptiques d'une eau sont caractérisées par sa couleur, son odeur et son goût qui sont les premiers critères de jugement d'un consommateur vis-à-vis de sa qualité. Ces caractéristiques de l'eau potable sont, dans des cas normaux, largement influencées par des concentrations variables des minéraux naturels présents dans l'eau et éventuellement par le chlore dû à la désinfection résiduelle à la sortie de l'usine de traitement.

Ces propriétés peuvent être fortement dégradées par une activité biologique provenant d'une croissance bactérienne excessive engendrée par la stagnation de l'eau dans les réseaux d'eau des habitations (Ling et al. 2018). Cette stagnation engendre une accumulation de matières organiques particulières. Ce dépôt s'avère être un lieu idéal de croissance pour les bactéries puisque 1 à 12% de ces particules correspond à de la biomasse bactérienne (Gauthier et al. 1999). Une fois remises en circulation, ces particules peuvent causer une coloration de l'eau (Figure 10) (Vreeburg et Boxall 2007). La corrosion, biologique ou non, peut aussi engendrer le relargage de particules métalliques et provoquer par exemple, une coloration rougeâtre dans le cas de canalisations en fer.



**Figure 10 : Exemple d'eau brune provenant d'un robinet d'eau domestique. Photographie tirée de Vreeburg et Boxall 2007.**

Dans la majorité des cas, une odeur et un goût inhabituels sont dus à la production de composés organiques volatils par des bactéries ou d'autres organismes (Watson 2004). L'exemple typique est la geosmine (trans-8,10-diméthyl-trans-9-decalol) produite par les actinomycètes *Streptomyces* et *Micromonospora*, ainsi que les cyanobactéries *Oscillatoria* et *Anabaena*, et qui est responsable d'un goût terreux (Lin 1977 ; Ortenberg et Telsch 2003 ; Watson *et al.* 2016). Il est aussi possible de retrouver des odeurs soufrées liées à la production de sulfure d'hydrogène par des bactéries sulfato-réductrices (Scott et Pepper 2010).

### ***II.2.3. La nitrification***

Le métabolisme azoté est sûrement le métabolisme le plus étudié et documenté dans le contexte des réseaux de distribution d'eau potable, et principalement pour l'eau d'origine souterraine. En effet, la présence d'ammonium est indésirable dans un réseau d'eau potable étant donné son impact sur les propriétés organoleptiques de l'eau et sa toxicité, notamment lorsqu'il conduit à la formation de nitrite (Zhang *et al.* 2009). L'ammonium est éliminé par la nitrification, processus biologique en deux étapes par lequel l'ammonium est d'abord oxydé en nitrite par des AOB ou AOA, (*Ammonia oxidizing bacteria*, ou *archaea*), puis oxydé en nitrate par des NOB (*Nitrate oxidizing bacteria*) (Zhang *et al.* 2009). La nitrification peut être source de croissance bactérienne au sein d'un réseau de distribution d'eau potable. Dans une part importante des réseaux d'eau d'Amérique du Nord, le composé utilisé comme traitement résiduel est la chloramine, composé chimique caractérisé par un groupement azote-chlore. Cette molécule est préférée au chlore libre car elle ne forme pas, ou peu, de sous-produits et

est plus persistante et plus efficace vis-à-vis des HPC (Neden *et al.* 1992 ; Zhang et Edwards 2009). De plus, elle permet un meilleur contrôle des biofilms (LeChevallier *et al.* 1990). Cependant, la chloramine peut conduire à la formation d'ammonium en réagissant avec divers composés (matières organiques, nitrites, produits de corrosion) ou en étant directement métabolisée par des AOB ou AOA (Zhang *et al.* 2009 ; Zhang et Edwards 2009). Une diminution de la chloramine n'entraîne pas forcément un risque sanitaire pour le consommateur. Mais, il est possible qu'une croissance bactérienne ou une modification des populations bactériennes ait lieu en aval de ces réactions chimiques.

### **III. Diversité bactérienne au sein d'un réseau d'eau potable**

#### **III.1. Facteurs influençant la colonisation bactérienne**

##### ***III.1.1. Mode de vie bactérien***

Dans un réseau d'eau potable, les bactéries peuvent être retrouvées selon des modes de vies distincts : sous forme planctonique, particulaire (sédiments) ou sous forme de biofilms (Proctor et Hammes 2015). Du fait de leurs caractéristiques très particulières, ces derniers sont considérés comme des microenvironnements capables d'influencer considérablement les capacités de croissance et donc la composition des communautés bactériennes (Liu *et al.* 2013, 2014).

##### ***III.1.1.1 Population planctonique***

Le compartiment planctonique représente l'ensemble des bactéries en suspension. Dans l'eau potable, il ne représente que 2 à 5% de la biomasse bactérienne (Flemming *et al.* 2002 ; Liu *et al.* 2014 ; Servais *et al.* 2004), avec une concentration cellulaire comprise entre  $10^3$  et  $10^5$  cellules/mL d'eau potable (Lautenschlager *et al.* 2013 ; Nescerecka *et al.* 2014, 2016). Les bactéries étant en suspension dans l'eau, elles vont être soumises à la fois à un stress nutritionnel dû au caractère oligotrophique du milieu, mais aussi à un stress oxydant dû à la présence de désinfectants résiduels chlorés. Malgré leur faible proportion, ces bactéries n'en restent pas moins métaboliquement actives, puisqu'en condition de laboratoire, elles présenteraient des taux de croissance plus importants que des bactéries en biofilm (Boe-Hansen *et al.* 2002).

##### ***III.1.1.2 Les biofilms***

Les biofilms peuvent être définis comme des agrégats de microorganismes qui adhèrent les uns aux autres et/ou à une surface (Flemming *et al.* 2016). Ces cellules microbiennes sont incluses dans une matrice composée de substances polymériques extracellulaires auto-produites (EPS pour *Extracellular Polymeric Substances*), ainsi que de particules minérales ou organiques provenant de l'environnement. Lorsqu'un matériau va être en contact avec une eau non stérile comme par exemple de l'eau potable, il va se recouvrir de biofilm. De part ces nouvelles propriétés, le biofilm est un microenvironnement unique apportant des avantages conséquents aux organismes le constituant.

La matrice de polymères constitue la base physique du biofilm et est responsable de son architecture et de sa stabilité. Celle-ci présente une structure spongieuse, idéale pour la capture, par des phénomènes d'adsorption, de composés organiques et inorganiques essentiels pour la nutrition des bactéries. (Kurniawan *et al.* 2015). Par ces mêmes phénomènes, des enzymes digestives extracellulaires sont retenues et vont permettre la dégradation de macromolécules adsorbées sur la matrice, mais aussi la dégradation de la matrice elle-même. Ainsi, les EPS présentent un rôle à la fois de filtre et de réserve nutritionnelle (Wingender et Neu 1999). Outre ce rôle, la matrice va apporter une protection vis-à-vis de la dessiccation (Esbelin *et al.* 2018), des antibiotiques (Olsen 2015) ou encore des métaux lourds (Grumbein *et al.* 2014).

Dans le cadre d'un réseau de distribution d'eau potable, ce mode de vie permet une meilleure tolérance à différents stress environnementaux. Les désinfectants résiduels chlorés s'avèrent être moins efficaces sur les microorganismes sessiles, en biofilm, que sur les bactéries planctoniques (Grobe *et al.* 2001 ; Oriani *et al.* 2018). Le biofilm semble être aussi une protection physique adéquate vis-à-vis de la prédation par des organismes dit "brouteurs" tels que les amibes et d'éventuels nématodes (Flemming et Wingender 2010 ; Matz et Kjelleberg 2005). Dans les réseaux de distribution, les biofilms sont soumis à des pressions environnementales, tels que des phénomènes hydrodynamiques, qui vont modifier leur structure et leur cohésion. Ainsi, durant des périodes de stagnation de l'eau, Lautenschlager et collaborateurs ont montré que la flore hétérotrophe totale mesurée par la méthode HPC (HPC pour *heterotrophic plate count*) pouvait être 580 fois plus abondante en comparaison à celle d'un robinet couramment utilisé (Lautenschlager *et al.* 2010). Soumis à un flux similaire de façon permanente, le détachement de biofilm serait lui aussi constant. Lors d'évènements augmentant rapidement les contraintes hydrodynamiques, comme l'utilisation d'un robinet, il a

été montré que le nombre de "grappes" du biofilm (*cluster* en anglais) diminuait, entraînant ainsi une perte de 56% de sa biomasse bactérienne (Mathieu *et al.* 2014).

Outre les avantages nutritionnels et protecteurs du biofilm, ce dernier est aussi un lieu de transferts horizontaux de gènes du fait d'une forte densité cellulaire et d'une proximité cellule à cellule importante (Flemming *et al.* 2016). Le transfert horizontal est un mécanisme clé de l'évolution bactérienne. Il s'agit d'un processus par lequel une bactérie intègre un fragment d'ADN provenant d'une autre bactérie qui n'est pas son ascendant et qui en est plus ou moins éloignée phylogénétiquement. Les éléments génétiques ainsi transférés peuvent coder des fonctions qui apportent un avantage sélectif à l'hôte telles que la virulence (Blanc-Potard et Lafay 2003), de nouvelles interactions écologiques (Sullivan *et al.* 2002), des capacités métaboliques (Gaillard *et al.* 2006), la résistance à des antibiotiques (Guédon *et al.* 2017) ou toutes autres fonctions susceptibles d'augmenter la survie et la compétitivité de son hôte dans un milieu donné.

### *III.1.1.3 Les particules et sédiments*

Il a longtemps été proposé que les bactéries se trouvaient soit sous forme planctonique, soit sous forme de biofilm (LeChevallier *et al.* 1987), correspondant respectivement à 5% et 95% en moyenne de la biomasse bactérienne présente dans les canalisations d'un réseau d'eau potable (Flemming *et al.* 2002). Cependant, les sédiments offrent un environnement favorable à la croissance bactérienne avec une surface de contact importante avec l'eau et une grande richesse en composés organiques et inorganiques (Gauthier *et al.* 1999). Le mode de vie particulière concerne les bactéries se développant à la surface de particules pouvant être transportées et accumulées au sein d'un réseau de distribution d'eau potable. Récemment, Liu et collaborateurs ont montré que les populations bactériennes associées aux particules, ainsi que celles présentes dans les biofilms correspondaient à 98% de la population bactérienne d'un réseau d'eau potable non chloré (Liu *et al.* 2016).

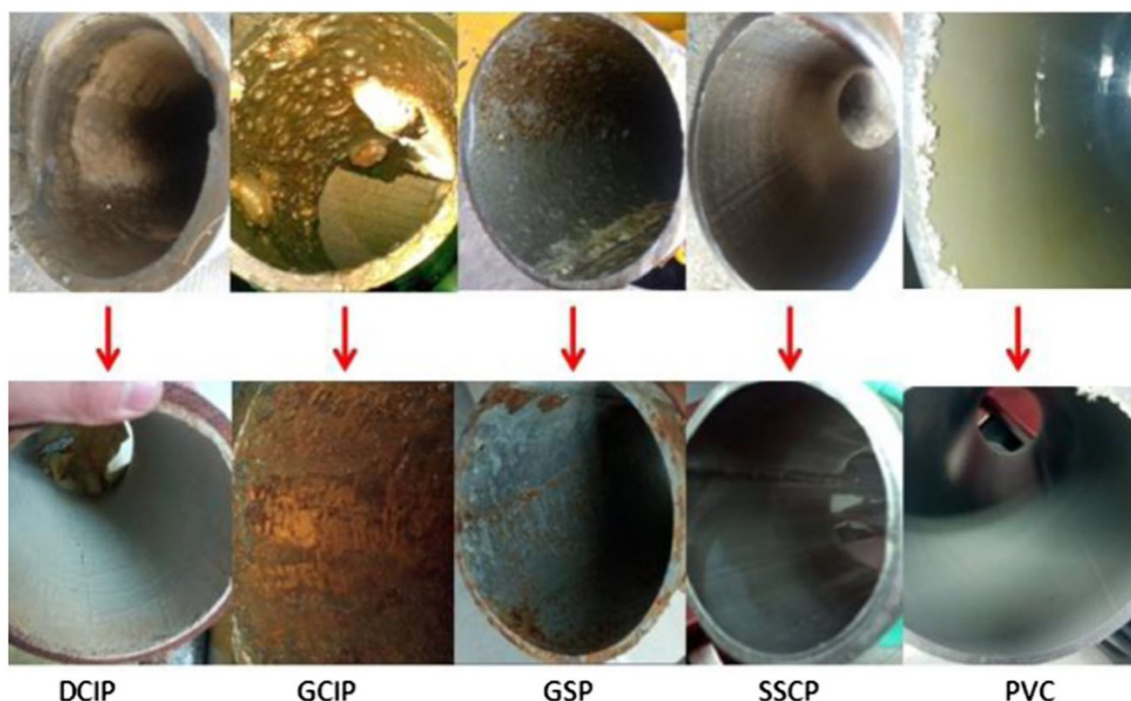


#### *III.1.1.4 Interactions des trois compartiments*

Même si ces trois compartiments sont considérés comme des microenvironnements distincts présentant des communautés microbiennes propres (Henne *et al.* 2012 ; Cuiping Li *et al.* 2017 ; Liu *et al.* 2014), ils n'en restent pas moins dépendants l'un de l'autre. Un morcellement du biofilm ou une remise en suspension de sédiments vont contribuer à l'augmentation de la concentration cellulaire et à la composition de la communauté bactérienne planctonique. Inversement, l'adhésion d'une cellule planctonique à une surface peut correspondre aux prémices d'un nouveau biofilm. Cependant, ces interactions restent théoriques puisque leur étude dans le contexte d'un réseau d'eau potable est complexe.

#### **III.1.2. Caractéristiques propres au réseau**

Aujourd'hui, les réseaux de distribution se composent d'un ensemble de différents matériaux, principalement de l'acier, de la fonte ductile, des polymères synthétiques (plastiques tels que du polyvinyle de chlorure et du polyéthylène) et du ciment (Camper 2014). Les infrastructures plus anciennes comprenaient principalement du fer, ce qui est aujourd'hui fortement décrié. La concentration de biofilms est notamment plus élevée sur ce matériau (Figure 11) (Niquette *et al.* 2000 ; Ren *et al.* 2015). Ren et collaborateurs ont montré que l'accumulation de biomasse pouvait être jusqu'à 71 fois plus importante sur une canalisation en fonte grise (jusqu'à 140,79 mg/cm<sup>2</sup>) que sur une canalisation en PVC (au moins 1,96 mg/cm<sup>2</sup>) (Ren *et al.* 2015). Cette différence serait due à une adsorption accrue des nutriments sur une surface corrodée ainsi qu'à une inactivation des désinfectants résiduels chlorés (Camper 2014). De ce fait, une sorte de boucle de rétroaction positive se met en place. L'activité métabolique bactérienne à la surface des canalisations, favorisant la diminution des désinfectants et l'adsorption de nutriment, engendre un développement bactérien important et donc une expansion des biofilms.



**Figure 11 : Morphologie des biofilms sur les parois internes des tuyaux avant l'échantillonnage et la morphologie des parois des tuyaux après échantillonnage. DCIP : Ductile cast iron pipe ; GCIP : Gray cast iron pipe ; GSP : galvanized steel pipe; SSCP : stainless steel clad pipe ; PVC : polyvinyl chloride. Photographie issue de Ren *et al.* 2015.**

Les réseaux de distribution d'eau potable sont gérés par l'entreprise productrice d'eau de la sortie de l'usine jusqu'au compteur d'eau des immeubles et habitations. L'entreprise n'est donc pas responsable des infrastructures en aval de ce point. Or, les installations entre ces deux types de réseau, public et privé, peuvent présenter des différences importantes.

L'eau qui circule dans le réseau privé présente une température plus élevée pouvant excéder une température de 20°C (Flemming *et al.* 2014). Ce phénomène est visible durant les périodes chaudes de l'année, lorsque les canalisations présentent une mauvaise isolation ou sont à proximité de celles de l'eau chaude. Il peut aussi être accentué lors de périodes de stagnation de l'eau potable, comme les périodes de vacances. En effet, des événements de stagnation conduisent à une diminution de la teneur en désinfectant résiduel chloré, et donc au développement de la biomasse bactérienne (Ji *et al.* 2015 ; Ling *et al.* 2018). Le ratio surface de contact sur le volume d'eau est plus important dans un réseau privé du fait de l'utilisation de canalisation au diamètre plus petit, offrant ainsi des conditions plus favorables au développement des biofilms (Ji *et al.* 2015 ; Ling *et al.* 2018). Les matériaux utilisés dans

les installations d'eau potable privées sont parfois différents de ceux des réseaux publics. Dans le cas d'un réseau vétuste ou ayant une mauvaise gestion, les matériaux utilisés (comme le plomb) peuvent ne pas être approuvés pour l'utilisation dans le domaine de l'eau potable (Flemming *et al.* 2014).

### **III.1.3. Disponibilité des nutriments**

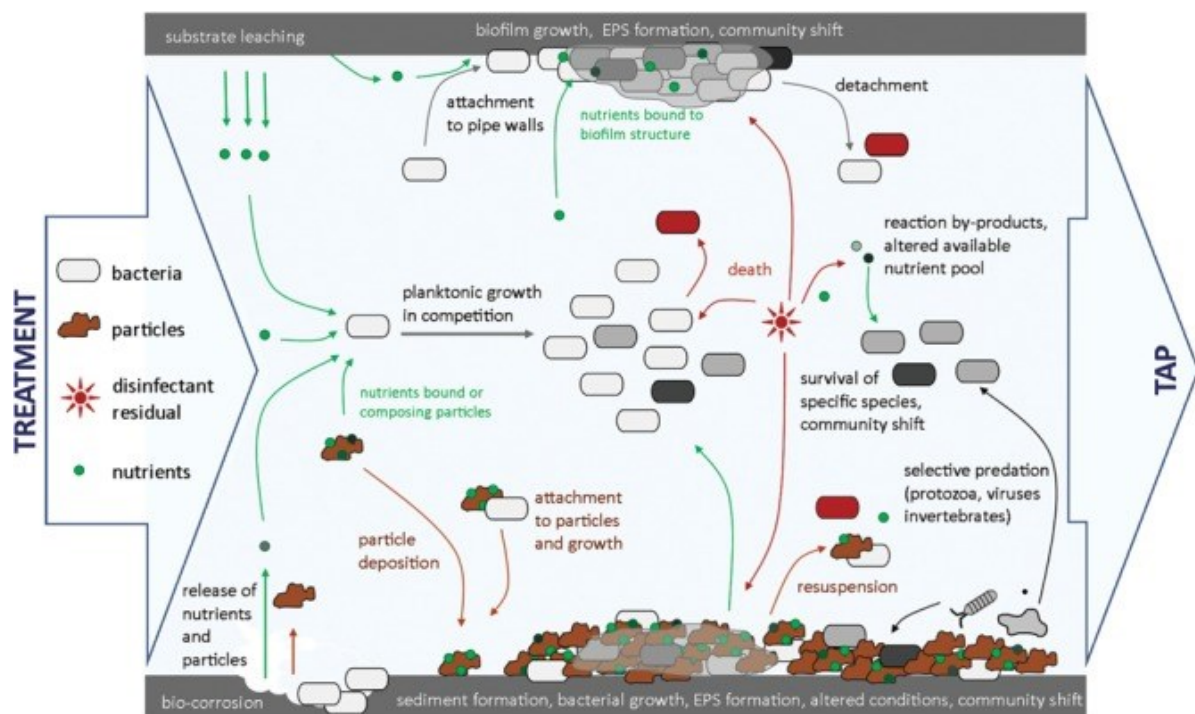
L'eau potable est un milieu oligotrophe qui, par définition, est un milieu pauvre en élément nutritif. En effet, l'utilisation de filtre biologique et de charbon actif lors du traitement des eaux permet l'élimination d'une grande partie du COT et donc du CODB. Cependant, la complexité et la diversité des communautés bactériennes dans le réseau de distribution peuvent être plus importantes que celles en amont de l'usine de traitement (Wenfang Lin *et al.* 2014 ; Pinto *et al.* 2012). Prest et collaborateurs émettent l'hypothèse que cette diversité est due à la forte compétition entre bactéries pour les substrats nutritionnels, certes diversifiés mais en faibles quantités (Prest *et al.* 2016). Ainsi, la composition et la concentration des nutriments vont façonner la composition et la structure des communautés bactériennes en sélectionnant les organismes ayant les voies métaboliques adaptées aux substrats présents et encore disponibles. Cette sélection a pour conséquence une meilleure adaptation à la survie et à la prolifération dans un environnement oligotrophique (Prest *et al.* 2016). Cette hypothèse n'est totalement vraie qu'en l'absence de biofilms, puisque ces derniers permettent l'établissement de différents métabolismes mais aussi d'interactions de coopération conduisant à l'échange de métabolite potentiellement nutritionnels (Flemming *et al.* 2016).

Au sein des communautés bactériennes d'un réseau de distribution d'eau potable, les organismes hétérotrophes, qui obtiennent leur énergie via la dégradation des composés organiques carbonés, constituent la majorité des bactéries (Camper 2014). Du fait des traitements appliqués à l'eau, le carbone organique dissous (COD) est en faible concentration dans le réseau de distribution et se retrouve être le facteur limitant pour la croissance des microorganismes (Van Nevel *et al.* 2013). De plus, du fait d'une forte proportion d'acides humiques réfractaires à la biodégradation, seulement 1 à 30% du COD, correspondant au CODB est disponible à l'assimilation ou à la dégradation par les bactéries (Van der Kooij et van der Wielen 2014). Cependant, des évènements atypiques, tels que des fortes pluies ou des inondations, peuvent augmenter la concentration du COT de la ressource en eau. Ainsi, une variabilité qualitative et quantitative de ces substrats au cours du temps peut entraîner une prolifération bactérienne dans l'eau potable. Il est donc essentiel pour un gestionnaire de réseau de distribution d'eau potable d'être capable de réguler la teneur en COD dans le produit

final. Il a notamment été montré qu'une faible concentration de CODB à 1 µg/L pouvait maintenir et promouvoir la croissance de bactéries (Van der Kooij et van der Wielen 2014).

### III.2. Méthodes d'analyses des communautés bactériennes

Comme présenté précédemment, des changements dans la structure et la composition des communautés microbiennes présentes dans un réseau d'eau potable peuvent avoir des effets délétères sur la qualité (odeur, goût, couleur) et la sûreté (pathogènes stricts ou opportunistes) de l'eau potable pour le consommateur et sur les infrastructures du réseau (biocorrosion). Ces changements sont le résultat d'interactions complexes entre les communautés bactériennes, les paramètres environnementaux propres aux réseaux et les autres microorganismes présents (Figure 12).



**Figure 12 : Aperçu des interactions biotiques et abiotiques influant dans la dynamique des communautés bactériennes d'un réseau de distribution d'eau potable. Figure tirée de Prest *et al.*, 2016.**

Au fil des décennies, différentes méthodologies ont été utilisées pour étudier les communautés bactériennes d'un réseau d'eau potable qu'ils s'agissent de méthodes de culture ou des approches moléculaires. La méthode normée pour évaluer la qualité de l'eau potable est une mesure de la flore hétérotrophe totale (HPC pour *heterotrophic plate count*) qui permet le

dénombrement des bactéries hétérotrophes capables de former une colonie sur un milieu solide. Elle permet donc d'avoir une estimation de la charge bactérienne dans un échantillon d'eau sans avoir d'informations sur la diversité bactérienne. De plus, les méthodes basées sur la culture des microorganismes ne permettent d'apprécier qu'une infime fraction des communautés présentes puisqu'il est estimé qu'à peine 1% des bactéries connues sont cultivables (Douterelo *et al.* 2014).

L'avènement des technologies de séquençage à haut débit a permis de dépasser cette barrière méthodologique et d'appréhender la complexité de la diversité bactérienne quel que soit l'environnement étudié (Goodwin *et al.* 2016). Le terme séquençage haut débit, ou séquençage nouvelle génération, regroupe un ensemble de technologies aux chimies différentes apparues à partir de 2005. Elles se caractérisent par une approche de séquençage parallèle massif de l'ADN ou de l'ARN, permettant de séquencer jusqu'à plusieurs millions de fragments simultanément. Suivant l'analyse souhaitée, un unique gène peut être séquencé, le séquençage est donc ciblé, on parle de metabarcoding ou de métagénomique ciblée. Cette méthode permet, par exemple, d'appréhender la diversité microbienne dans un échantillon quel qu'il soit, notamment au travers du séquençage d'un gène universel tels que le gène codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S. A l'inverse, le séquençage peut ne pas être discriminant, on parle alors de métagénomique totale. Dans ce cas, les informations recueillies permettent d'apprécier à la fois la diversité microbienne, mais aussi le potentiel métabolique de la population bactérienne présente. Au cours de cette partie s'intéressant à la diversité bactérienne présente dans l'eau de la source jusqu'au robinet du consommateur, les études citées se baseront pour la grande majorité sur des méthodes de séquençage haut débit.

En plus de la composition et de la structure de la communauté bactérienne, avoir des notions de viabilité et de concentrations cellulaires de la population microbienne étudiée est tout aussi essentielle pour la détermination de la qualité de l'eau potable. On parle alors de stabilité biologique de l'eau potable. La notion de stabilité biologique implique que la communauté bactérienne de l'eau potable ne subit pas de changement dans sa concentration cellulaire, sa viabilité et sa composition durant la distribution ou qu'elle subisse des changements à un niveau qui ne permette pas d'engendrer des effets négatifs pour le consommateur ou sur les infrastructures (Lautenschlager *et al.* 2013 ; Prest *et al.* 2016). Ainsi, des approches de viabilité, de concentration cellulaire et d'activité métabolique seront aussi abordées au cours de cette partie (Prest *et al.* 2016).

Ainsi, différentes méthodologies peuvent être employées dans le but de détecter, quantifier ou de caractériser les communautés microbiennes présentes dans des échantillons d'eau potable (Figure 13). Leur utilisation dépendra des questionnements posés lors de l'étude, Qui est présent ? ; En quelle abondance ? ; Quelle est leur activité métabolique ? ; Comment l'environnement influe sur ces communautés ? ; mais aussi des avantages et désavantages de chacune de ces méthodes.

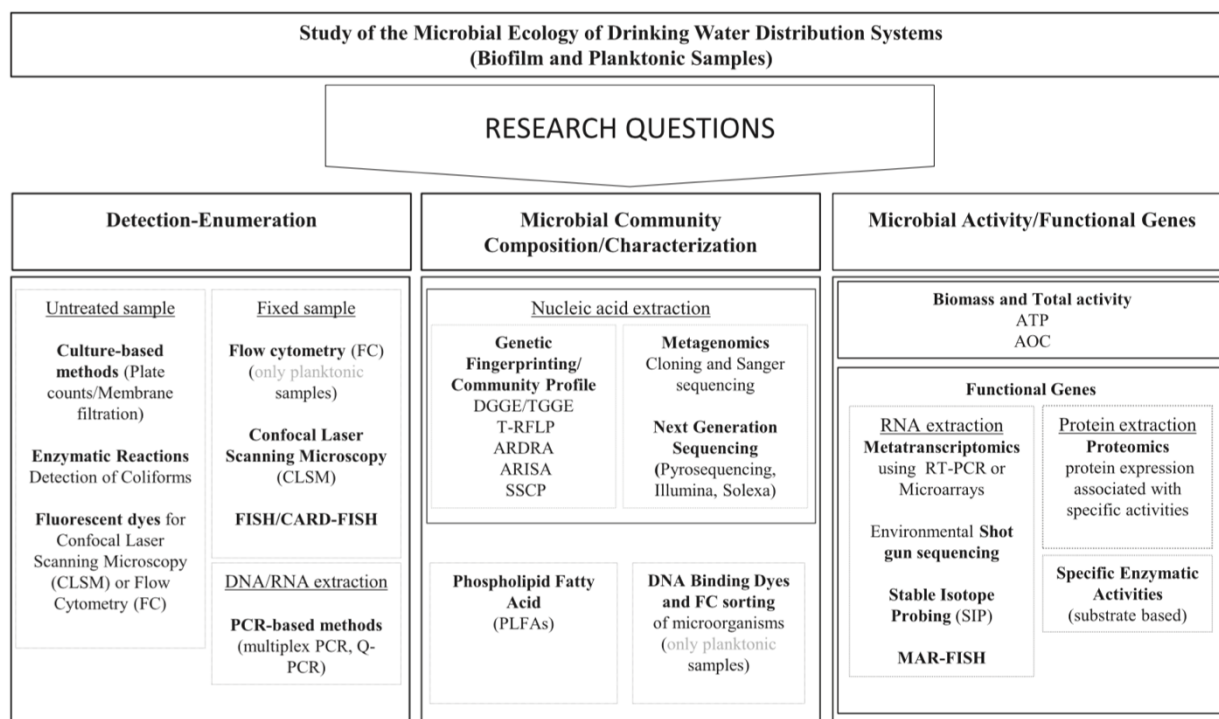


Figure 13 : Liste de différentes méthodes disponibles pour dénombrer, identifier ou caractériser les communautés microbiennes dans un réseau de distribution d'eau potable. D'après Douterelo *et al.*, 2014.

### III.3. Diversité bactérienne dans les eaux brutes

Les eaux captées acheminées vers une usine produisant de l'eau potable, sont qualifiées comme des eaux brutes. En France métropolitaine, ces eaux ont une origine souterraine, ou de surface. Du fait de leurs caractéristiques distinctes, ces eaux brutes présentent des communautés bactériennes diverses. Les eaux souterraines présentent des charges bactériennes de l'ordre de  $10^3$ – $10^4$  cellules/mL alors que les eaux de surfaces contiennent un nombre de cellules plus important ( $10^5$ – $10^6$  cellules/mL) (Prest *et al.* 2016).

La définition de modèles dans les environnements fluviaux reste encore très compliquée étant donné la forte dynamique de composition et de structure des communautés bactériennes en réponse aux multiples mécanismes environnementaux susceptibles d'impacter les populations bactériennes (Comte et Giorgio 2010). Cette complexité est notamment alimentée par l'impact des activités anthropiques sur cet environnement. La régulation des cours d'eau, via l'utilisation de barrages notamment, engendre des perturbations hydrauliques à l'échelle spatiale et donc une modification des communautés entre l'amont et l'aval de ces constructions (Dumestre *et al.* 2002 ; Ruiz-González *et al.* 2013 ; Winter *et al.* 2007). Le ruissellement d'eau provenant de terres agricoles ou urbanisées et le rejet de station d'épuration dégradent aussi la qualité physico-chimique et biologique de l'eau, entraînant des variations dans la composition des communautés bactériennes de rivière (Ibekwe *et al.* 2012). Ainsi, les activités humaines sur les terres aux abords des cours d'eau sont des facteurs importants dans la détermination de la structure bactérienne de ces environnements (Peifang Wang *et al.* 2017).

Malgré une certaine complexité d'analyse, des comportements similaires sont observés dans plusieurs travaux. Du fait des fortes variations, il est difficile d'identifier les organismes à un rang taxonomique inférieur à la classe (Ruiz-González *et al.* 2013). Il est tout de même noté que les Bacteroidetes, les Cyanobacteria, les Betaprobacteria et les Actinobacteria, sont les classes dominantes dans les écosystèmes fluviaux (Jackson *et al.* 2014 ; Payne *et al.* 2017 ; Sekiguchi *et al.* 2002). D'un point de vue spatial, les populations bactériennes semblent se diversifier sur la longueur d'un cours d'eau (Jackson *et al.* 2014 ; Payne *et al.* 2017 ; Winter *et al.* 2007). Cependant, l'impact spatial a un poids beaucoup plus faible dans l'explication de la variabilité des communautés que celui du facteur temporel. Les variations dues à la temporalité sont d'autant plus fortes lorsque les changements climatiques au cours de l'année sont importants (Portillo *et al.* 2012 ; Sun *et al.* 2017). De plus, des événements de fortes précipitations ou de sécheresse pourraient influencer de façon plus importantes la diversité au sein de ces communautés (Sun *et al.* 2017).

### **III.4. Impact des traitements sur la diversité bactérienne**

D'un point de vue microbiologique, les usines de traitement des eaux ont pour but de diminuer de manière drastique la population bactérienne et de limiter la reprise de croissance bactérienne à l'aide du traitement résiduel chloré. Les filtres sont conçus pour éliminer les substrats présents dans l'eau, et donc pour limiter la croissance bactérienne, alors que les étapes de désinfections sont utilisées pour rendre les bactéries métaboliquement inactives, voire les tuer. Cependant, l'influence réelle de ces étapes est peu documentée et il est difficile d'identifier quel traitement détermine et façonne le plus la communauté bactérienne finale.

D'un point de vue général, la composition des communautés bactériennes va fluctuer au cours des différents traitements en fonction de la sensibilité des bactéries à ces derniers. En effet, l'abondance des Alphaproteobacteria a tendance à augmenter jusqu'à être un taxon bactérien majoritaire dans l'eau potable, alors que l'abondance des Firmicutes et des Actinomycetales, par exemple, décroîtrait au fil des traitements successifs (Chao *et al.* 2013 ; Wenfang Lin *et al.* 2014 ; Sala-Comorera *et al.* 2017 ; Feng Wang *et al.* 2017). Outre la composition, la diversité bactérienne est aussi impactée puisqu'elle diminue de façon importante au cours de la filière (Wenfang Lin *et al.* 2014). Au fil des traitements, il est aussi observé une stabilisation de la composition et de la structure des communautés. Cette stabilité est d'autant plus visible lorsque les communautés bactériennes sont observées d'un point de vue temporel. En effet, les communautés bactériennes de l'eau brute sont fluctuantes d'une saison à l'autre au niveau de leur composition et de leur structure alors qu'à partir de l'étape de filtration sur sable, les communautés sont plus stables (Pinto *et al.* 2012).

#### **III.4.1. Filtration biologique**

Dans l'ensemble des processus de traitement, l'étape de filtration biologique semble être l'étape clé dans la modification et la structuration de la communauté bactérienne. Il s'opère à ce moment un véritable changement dans la composition et la structure des communautés entre l'amont et l'aval de ces filtres (Wenfang Lin *et al.* 2014 ; Pinto *et al.* 2012). Les procédés de filtration biologique sont d'ailleurs considérés comme une étape essentielle pour la production d'eau biologiquement stable notamment dans les réseaux d'eau potable dépourvus de traitement chloré (Smeets *et al.* 2009).

Le processus de filtration peut se faire sur différents supports comme le sable (filtration lente ou rapide), l'antracite ou des granules de charbon actif. Les différents types de filtres sont dans la majorité des cas utilisés en série afin d'optimiser leur efficacité. Malgré ces différents



matériaux, la structure des communautés bactériennes ne semble pas différer au niveau de l'embranchement (Lautenschlager *et al.* 2014). Cependant, des analyses taxonomiques à une échelle plus fine ont montré des différences de composition et de structures des communautés bactériennes pour chacun de ces filtres (Oh *et al.* 2018). De ce fait, les activités métaboliques associées diffèrent elles aussi.

Les communautés bactériennes des filtres biologiques sont très abondantes ( $10^9$  cellules actives par  $\text{cm}^3$ ) et sont majoritairement présentes sous forme de biofilms, extrêmement diversifiées aussi bien métaboliquement que phylogénétiquement (Haig *et al.* 2015). Cette complexité bactérienne est liée au fait que les bactéries vont développer des compétences collectives de dégradation des différents composés chimiques et des nutriments qui entrent dans le système (Haig *et al.* 2011). Ainsi, la composition et l'activité des communautés bactériennes dépendent des caractéristiques nutritives de l'eau qui traverse le filtre (Prest *et al.* 2016). Dans le cas des filtrations lentes sur sable, un épais biofilm se développe à la surface de l'installation. Le terme allemand "Schmutzdecke" est employé pour qualifier cette communauté active et peut être littéralement traduit en "couche d'encrassement". La moitié de l'activité biologique des filtres à sable lents serait présente dans le Schmutzdecke (Lautenschlager *et al.* 2014). De plus, il semblerait que les eucaryotes soient une part non négligeable des communautés microbiennes composant ce biofilm (Oh *et al.* 2018).

Outre l'importance d'un large spectre d'activités métaboliques, il a été observé une corrélation entre les performances d'un filtre à sable et l'uniformité des communautés bactériennes au travers de l'indice de Pielou (Haig *et al.* 2015). Une population uniforme dans les filtres à sable montre d'ailleurs de meilleures performances lors d'évènements climatiques, qui peuvent fortement impacter la composition des communautés bactériennes dans l'eau en entrée du système (Wittebolle *et al.* 2009). L'uniformité de cette communauté est donc en corrélation avec son efficacité fonctionnelle. Ainsi, Yachi et Loreau proposent que ces deux paramètres, le spectre d'activité et l'uniformité de la population, soient essentiels pour avoir un écosystème fonctionnellement robuste dans les filtres à sable (Yachi et Loreau 1999). Étant donné que cette communauté apparaît via des mécanismes physiques (adsorption), l'âge et la maturation du filtre sont aussi des enjeux essentiels pour le développement d'un biofilm opérationnel (Huisman et Wood 1974).

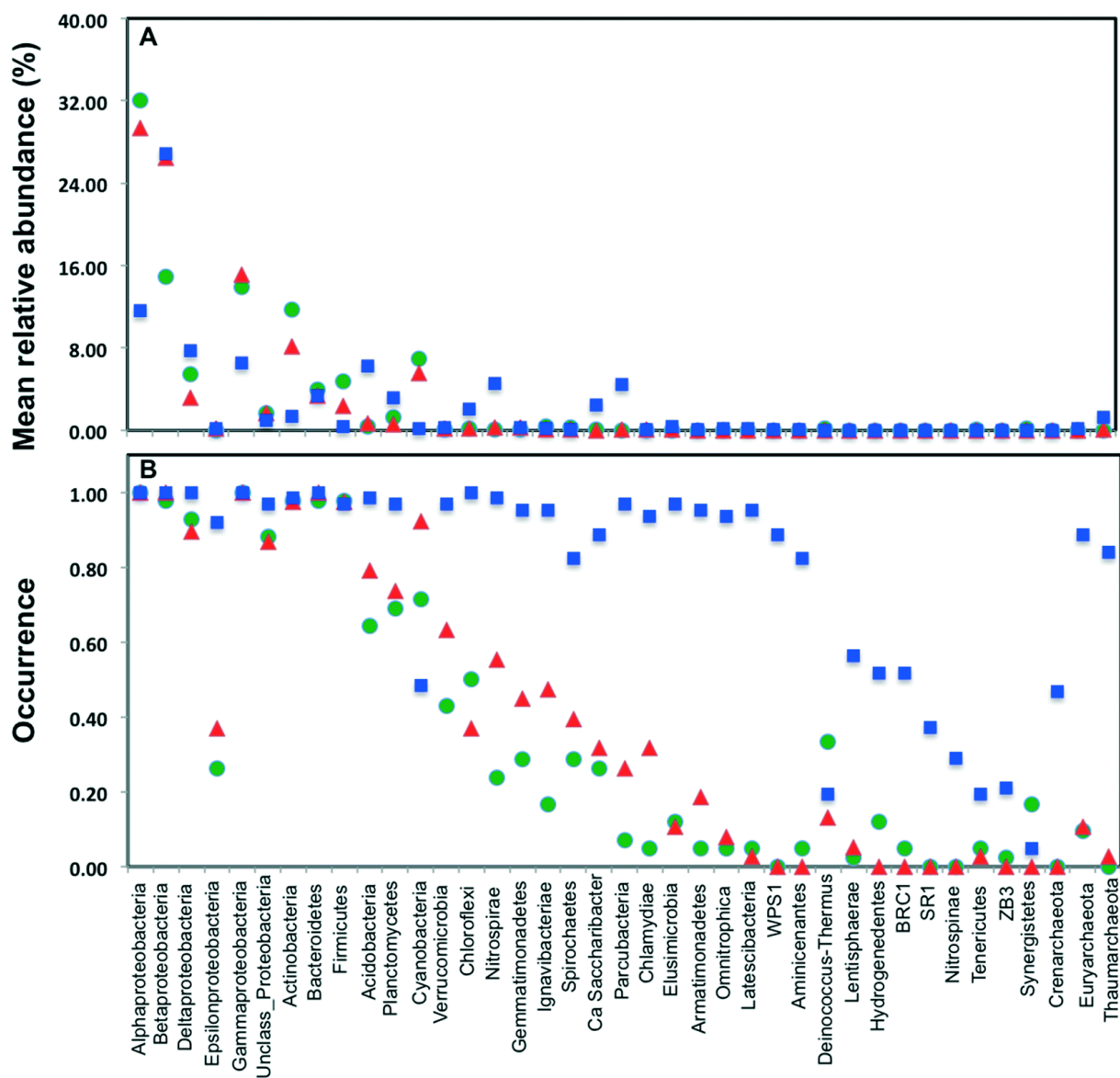
### **III.4.2. Chloration**

Dans le but de minimiser d'éventuelles reprises de croissance bactériennes dans le réseau de distribution, un traitement résiduel de chlore, ou de chloramine en Amérique du Nord, est

appliqué à la fin de la majorité des filières de traitement. Certaines usines, notamment aux Pays-Bas, en Allemagne, en Suisse et en Autriche, ont aussi fait le choix, suivant les caractéristiques de leur réseau, de ne pas appliquer ce traitement. Ainsi, la présence de traitement, ou non, et la chimie utilisée pour ce dernier vont influencer les communautés bactériennes présentes dans l'eau potable et leur activité métabolique.

Une étude de plusieurs jeux de données de séquençage a pu mettre en évidence que le traitement résiduel chloré pouvait impacter les communautés bactériennes de l'eau potable (Santos *et al.* 2016). Bien qu'aucune différence significative n'ait pu être établie entre les deux traitements résiduels, soit le chlore soit la chloramine, l'absence de traitement entraîne une augmentation de la diversité bactérienne dans l'eau potable (Figure 14). De plus, il a été observé une augmentation de la biomasse bactérienne, de par le nombre de cellules, lorsqu'un traitement résiduel chloré n'était pas appliqué (Nescerecka *et al.* 2014, 2018 ; Niquette *et al.* 2001). A l'opposé, certaines études ayant analysé des réseaux de distribution d'eau potable ne subissant pas de traitement résiduel chloré ont montré une grande stabilité de leur biomasse bactérienne, malgré une quantité assez importante de cellules intactes (de l'ordre de  $1 \times 10^5$  cellules/mL) (Lautenschlager *et al.* 2013 ; Vital *et al.* 2012). Cette différence entre échantillons avec et sans traitement résiduel serait liée à la pression de sélection exercée par la désinfection sur les communautés bactériennes de l'eau potable.

Du point de vue de la composition, les Proteobacteria représentent la plus grande portion des populations bactériennes identifiées avec et sans traitement résiduel (Santos *et al.* 2016). Parmi ces Proteobacteria, les Alphaproteobacteria, citées précédemment pour leur augmentation au cours de la filière de traitement, devraient leur dominance à leur tolérance au chlore et à la pression sélective exercée par ce dernier (Chao *et al.* 2013 ; Pinto *et al.* 2012). Cette tolérance n'est pas réservée aux Alphaprotéobacteria puisque les genres *Mycobacterium*, une Actinobacteria, et *Coxiella*, une Gammaproteobacteria, entre autres, verraient leur abondance relative augmenter lors d'un traitement à base de chloramine (Chiao *et al.* 2014).



**Figure 14 : Abondance relative moyenne (A) et occurrence (B) des phylums et classes bactériens en fonction du traitement résiduel chloré appliqué. (traitement chloré, vert ; traitement chloraminé, rouge ; désinfectant résiduel absent, bleu). Figure tirée de Santos *et al.*, 2016.**

Outre l'espèce chimique utilisée comme traitement résiduel chloré, la concentration de ce dernier a un rôle majeur sur les communautés bactériennes. Bien que ces travaux soient basés sur la diversité bactérienne d'un biofilm, les travaux de Mathieu et collaborateurs ont montré que les classes des bêtaprotéobactéries et des gammaprotéobactéries étaient favorisées par des concentrations élevées de chlore résiduel libre (0,4 mg de chlore libre par litre) alors que la population d'alphaprotéobactéries était sensible à cette concentration (Mathieu *et al.* 2009). Ces changements de population bactérienne sont réversibles lors d'une chloration discontinue

(diminution de la concentration notamment) au profit des alphaprotéobactéries. Des analyses par cytométrie en flux ont aussi révélé qu'une concentration trop faible en chlore induisait une augmentation du nombre de cellules intactes dans le réseau d'eau potable d'un minimum de  $1.84 \times 10^5$  cellules/mL en sortie d'usine (dont 2 à 5% de cellules intactes) à un maximum de  $1.07 \times 10^6$  cellules/mL à l'extrémité du réseau (avec jusqu'à 59% de cellules intactes) (Nescerecka *et al.* 2014).. De plus, l'activité métabolique des communautés bactériennes, représentée par un dosage d'ATP intracellulaire, s'avérait être corrélée avec la biomasse bactérienne, montrant ainsi une reprise de croissance au sein du réseau de distribution (Nescerecka *et al.* 2014).

Des analyses fonctionnelles de communautés bactériennes suggèrent que cette tolérance au chlore et à ses dérivés pourrait être due à la présence de gènes offrant une protection contre un tel stress. Il a notamment été mis en évidence que des gènes liés au métabolisme du glutathion étaient plus abondants en sortie d'usine de traitement qu'en amont (Chao *et al.* 2013 ; Zhang *et al.* 2017). Le glutathion est connu pour induire une résistance directe au chlore (Chesney *et al.* 1996), mais aussi pour être impliqué dans la régulation de systèmes de résistance au stress oxydant tel que les systèmes OxyR, SOS et SoxR (Saby *et al.* 1999). Sa synthèse se retrouve aussi être induite en cas de carence nutritionnelle comme c'est le cas dans des environnements oligotrophes tels que l'eau potable (Saby *et al.* 1999).

### **III.4.3. Autres traitements d'oxydation**

Outre la chloration, des processus d'oxydation, tels que l'ozonation ou l'application d'UV, sont de plus en plus utilisés comme stratégie de désinfection dans les usines de traitement. L'ozone est particulièrement efficace pour l'élimination des bactéries au cours du processus de traitement puisqu'il a pu être observé des diminutions de la charge bactérienne pouvant aller jusqu'à 3 logs (Hammes *et al.* 2008 ; Hoefel *et al.* 2005), ainsi qu'un appauvrissement de la diversité bactérienne (Feng Wang *et al.* 2017). Alors que les UV sont plus souvent appliqués en fin de traitement, un prétraitement à l'ozone en début de processus permet de créer de nouvelles niches biologiques pour des organismes qui seront capables de coloniser par la suite les filtres biologiques et d'éliminer les éléments nutritifs présents dans l'eau (Prest *et al.* 2016 ; Fen Wang *et al.* 2017). De plus, ces prétraitements facilitent la dégradation biologique du pool de nutriments présents dans l'eau puisqu'ils simplifient la structure des composés organiques et augmentent de ce fait la concentration du CODB (Hammes *et al.* 2006 ; Vital *et al.* 2012).

## **III.5. Réseau de distribution**

### **III.5.1. Impact de la ressource en eau**

Il existe peu de publications sur l'influence de l'origine de l'eau sur les communautés bactériennes de l'eau potable. L'explication la plus probable est que chaque origine d'eau présente des caractéristiques physico-chimiques et biologiques différentes. Ainsi, les traitements appliqués sont adaptés à chacune de ces origines et ce sont eux qui vont le plus façonner les communautés bactériennes.

Certains travaux ont essayé de se pencher sur la question en essayant d'établir le poids que représente l'origine de l'eau brute sur la constitution des populations bactériennes en fin de réseau. Gomez-Alvarez et collaborateurs ont notamment montré que les deux types d'eau, souterraine et de surface, avaient des communautés bactériennes très distinctes puisque seulement 8% des Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs pour *Operational Taxonomic Units*) étaient partagées par les deux types d'eau (Gomez-Alvarez *et al.* 2015). De plus, l'eau de surface présentait une diversité plus importante, ce qui est en adéquation avec la plus forte charge bactérienne dans l'eau brute. Cependant, ces résultats ne sont pas en accord avec d'autres travaux qui estiment que l'origine de l'eau n'a que très peu d'impact sur la communauté bactérienne finale (Liu *et al.* 2018).

### **III.5.2. Influence des paramètres spatio-temporels**

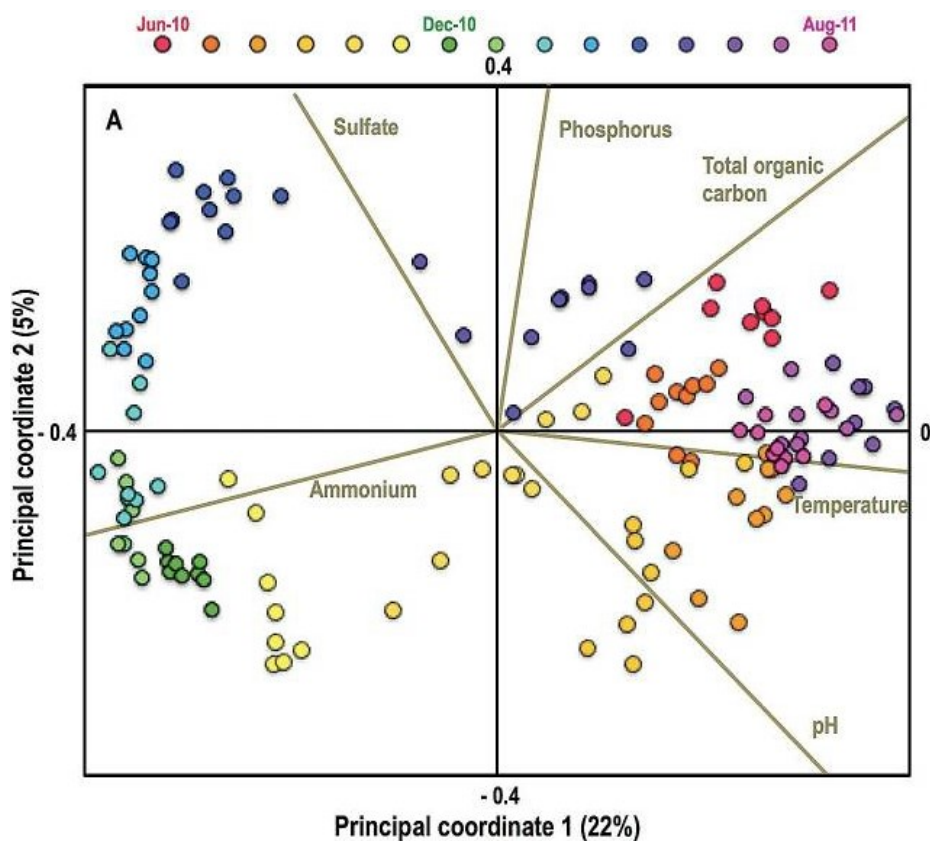
Bien que les réseaux de distribution d'eau potable soient des environnements artificiels et fortement régulés, ces derniers sont tout de même influencés par les paramètres spatio-temporels propres à chaque réseau.

#### **III.5.2.1 Variations temporelles des communautés bactériennes**

D'un point de vue temporel, les communautés bactériennes agiraient selon un modèle cyclique. Des analyses de la composition de ces communautés montrent en effet une augmentation de la diversité, en nombre de taxons observés, au cours des saisons été et automne et une baisse lors des saisons hiver et printemps (McCoy et VanBriesen 2014 ; Pinto *et al.* 2014). Ce modèle cyclique est évident lorsque la structure de la communauté bactérienne est observée via une analyse des coordonnées principales basée sur l'indice de distance de Bray-Curtis (Figure 15). La température de l'eau potable est certainement liée à ces observations, puisque celle-ci peut varier de plusieurs degrés entre l'hiver et l'été au sein d'un même réseau de distribution d'eau potable (Niquette *et al.* 2001). D'autres travaux ont cependant montré des résultats contradictoires. L'analyse de 32 réseaux de distribution d'eau potable au Pays-Bas a révélé que la temporalité n'expliquait pas, ou peu, les variabilités au sein des communautés bactériennes et que celles-ci étaient stables dans le temps (Roeselers

*et al.* 2015). Au contraire, différents réseaux de distribution présentent des communautés avec une diversité fortement impactée par la temporalité, notamment avec une augmentation des taxons observés durant l'hiver et une diminution au cours de l'été (Hwang *et al.* 2012 ; McCoy et Van Briesen 2012 ; Potgieter *et al.* 2018). Il est supposé que cette diversité plus importante au cours de l'hiver pourrait être due à une diminution de l'abondance relative de certains taxons majoritaires, ce qui permettrait donc une détection de taxons plus rares (Potgieter *et al.* 2018).

Au regard du nombre de cellules viables et de l'activité métabolique, les mêmes observations contradictoires ont pu être effectuées. Alors que le nombre de bactéries est positivement corrélé à la température de l'eau dans certaines études (Francisque *et al.* 2009 ; Niquette *et al.* 2001), une diminution de l'ATP et de la mesure HPC est observée lorsque la température de l'eau diminue dans les travaux de Zlatanović et collaborateurs (Zlatanović *et al.* 2017).



**Figure 15 : Variabilité temporelle de la structure de la communauté bactérienne construite en utilisant l'indice de distance de Bray-Curtis. Les échantillons sont colorés en fonction des mois. Les paramètres environnementaux ayant une corrélation de**

**Pearson significative ( $P < 10^{-6}$ ) avec l'un ou l'autre des deux axes sont représentés. Figure tirée de Pinto *et al.*, 2014.**

### III.5.2.2 Effet de la configuration des réseaux sur les communautés bactériennes

Tout comme le paramètre temporel, l'influence du paramètre spatial est sujet à débat dans la littérature scientifique puisqu'elle est dépendante des réseaux de distribution d'eau potable étudiés. L'étude des communautés bactériennes de 32 réseaux de distribution aux Pays-Bas a montré qu'il y avait une structure similaire entre les communautés de l'eau potable en sortie d'usine et de l'eau du robinet, chez le consommateur, en sortie de réseau (Roeselers *et al.* 2015). Ce résultat est surprenant étant donné que ces réseaux ne subissent aucun traitement résiduel chloré, facteur pouvant induire une croissance bactérienne dans le réseau (Srinivasan *et al.* 2008). Inversement, Potgieter et collaborateurs montrent une forte hétérogénéité des communautés bactériennes au sein de leur réseau de distribution d'étude. Ainsi, seulement 1% des OTUs détectés est partagé par l'ensemble des échantillons. De plus, l'effet de la distance de séparation entre deux points de prélèvement a été évalué. Les indices de dissimilarité de Bray Curtis ont été calculés deux à deux et ces derniers augmentent quand la distance entre les deux points de prélèvement comparés augmente. Cette observation a aussi été faite dans le réseau de distribution de la ville d'Ann Arbor dans le Michigan (Pinto *et al.* 2014). Cependant, comme le soulèvent les auteurs, leur objet d'étude présente une forte hétérogénéité dans les caractéristiques de leur infrastructure qu'il s'agisse du diamètre des canalisations (du cm au m), du matériau utilisé, de leur longueur (du km à plusieurs dizaines) ou de leur âge (du mois à près d'un siècle). Or, l'ensemble de ces paramètres est connu pour introduire une variabilité dans la manière dont le réseau de distribution va influencer les communautés bactériennes présentes entre la sortie de l'usine et le robinet du consommateur (Wang *et al.* 2014).

Du fait de l'existence de ces paramètres, il peut être difficile, voire impossible, d'identifier individuellement les mécanismes responsables des changements dans la structure des communautés bactériennes d'un véritable réseau de distribution d'eau potable. Leur impact a cependant pu être évalué dans des conditions de laboratoire à l'aide de réseaux de distribution d'eau potable artificiels (Figure 16). Ce type d'installation permet de limiter le nombre de paramètres fluctuant apportant donc des variabilités indésirables au cours de l'étude. A l'aide de réseaux artificiels, il a notamment pu être montré que des matériaux rugueux, tels que le ciment, qui ont donc une surface de contact plus importante avec l'eau, induisaient une

augmentation du nombre de copie du gène codant l'ARNr 16S (indicateur du nombre total de bactéries) et des différences dans la structure des communautés bactériennes (Jang *et al.* 2011 ; Wang *et al.* 2014). Le temps de résidence de l'eau potable dans le réseau de distribution, et par conséquent la longueur des canalisations, semble être en relation directe avec l'épuisement du traitement résiduel chloré, l'augmentation du COT et de l'oxygène dissous (Wang *et al.* 2014). Une quantification par PCRq d'organismes potentiellement pathogènes (*Mycobacterium*, *P. aeruginosa*) ou de vecteurs de pathogènes (*Hartmannella vermiformis*, *Acanthamoeba*) a mis en évidence une corrélation positive entre leur abondance et le temps de résidence de l'eau dans le réseau de distribution (Wang *et al.* 2012).



**Figure 16 : Photographie de l'installation mimant un réseau de distribution d'eau potable de l'Université de Sheffield, Angleterre. La régulation de la température, de la concentration en chlore, de la pression et du flux d'eau permet de limiter des variations indésirables. Photographie issue de (Douterelo *et al.* 2018).**

### III.5.2.3 Interaction des dynamiques spatiales et temporelles

Il est nécessaire de combiner les paramètres spatiaux et temporels pour une meilleure compréhension de la dynamique des communautés bactériennes dans un réseau de distribution d'eau potable. Ainsi, des tests d'analyses de variance par permutation (PERMANOVA pour *Permutational ANalysis Of VAriance*) ont montré que le paramètre spatial pouvait expliquer une part plus importante des variations dans les communautés bactériennes



(Potgieter *et al.* 2018). D'autre part, il a été montré que les variations temporelles que subissaient les populations d'un site d'échantillonnage augmentaient de façon plus importante lorsque ce dernier était éloigné de l'usine de traitement (El-Chakhtoura *et al.* 2015 ; Potgieter *et al.* 2018). Ces fluctuations pourraient être dues à une reprise de croissance bactérienne, notamment dans les réseaux non chlorés où l'eau est transportée sur de longues distances. En effet, l'eau potable du consommateur en sortie de réseau, présenterait un plus grand nombre de cellules (Hammes *et al.* 2008), d'indicateurs fécaux (Wielen *et al.* 2016) et une plus forte turbidité (Liu *et al.* 2016), que l'eau en sortie d'usine de traitement. Il est donc supposé que ces variations spatio-temporelles des communautés pourraient être dues à des processus et des évènements constants dans le réseau de distribution d'eau potable tels que l'ensemble des facteurs influençant la croissance microbienne présenté dans la section III.1 (page 33), notamment le mode de vie, la disponibilité des nutriments et les caractéristiques des infrastructures.

## **Problématiques et objectifs de l'étude**

Les bactéries sont des microorganismes présents de façon ubiquitaire et naturelle au sein des réseaux de distribution d'eau potable. Leur présence n'est pas forcément reliée à une dégradation de la qualité de l'eau potable. En effet, l'activité métabolique de ces bactéries est essentielle dans certaines étapes du traitement de l'eau, notamment dans l'élimination des composés organiques.

Les traitements appliqués à l'eau potable permettent dans un premier temps d'éliminer les organismes pathogènes présents dans l'eau brute et, dans un deuxième temps, de limiter la biomasse bactérienne et sa croissance au sein du réseau de distribution. Cependant, entre la sortie de l'usine de traitement et le robinet du consommateur, les propriétés du réseau, des incidents, le manque d'entretien, ou l'équilibre écologique qui s'est développé au sein des infrastructures, peuvent offrir une opportunité de croissance aux bactéries ayant persisté aux traitements. Outre une dégradation des paramètres organoleptiques qui peuvent gêner le consommateur lors de l'utilisation de l'eau potable, leur développement peut présenter un risque de dégradation des installations (corrosion, obstruction) ou un risque d'ordre sanitaire (développement de pathogènes stricts ou opportunistes). Pour un producteur d'eau potable, il est ainsi primordial d'identifier les membres de ces communautés bactériennes, d'évaluer leur dynamique au sein du réseau d'un point de vue spatial et temporel, mais aussi d'identifier les paramètres environnementaux pouvant influencer ces variations. Des variations dans la structure et la composition de la flore bactérienne résidente pourraient aussi refléter des mécanismes indépendants de la présence de bactéries dans le réseau. Par exemple, de telles variations pourraient indiquer un temps de séjour plus long ou une stagnation de l'eau dus à une baisse de consommation. Elles pourraient permettre de mettre en évidence un défaut de fonctionnement des postes de chloration, ou une dégradation rapide de ces traitements sur une certaine partie du réseau.

C'est dans ce contexte que l'équipe Microbiologie de l'Eau (MDE) de l'UMR CNRS 7267 Écologie et Biologie des Interactions et le département recherche et développement en biologie d'Eau de Paris ont défini les objectifs constituant le présent travail de thèse.

L'objectif principal de cette thèse a été de caractériser les communautés microbiennes du réseau de distribution d'eau potable de la ville de Paris. L'utilité des méthodes de séquençage haut débit dans le suivi microbiologique d'un réseau de distribution d'eau potable a notamment pu être évaluée par ce biais. Dans ce but, une campagne de prélèvement d'une durée d'un an a été effectuée sur l'ensemble du réseau d'eau potable de Paris. Au vu des études déjà existantes sur les communautés bactériennes des réseaux d'eau potable, notre campagne

d'échantillonnage est la première avec un effort d'échantillonnage suffisant qui permet d'apprécier la diversité bactérienne au sein d'un réseau d'eau potable dans sa globalité. A partir de l'ADN présent dans ces échantillons, un séquençage haut débit ciblant le gène codant l'ARNr 16S a pu être effectué via la technologie Illumina. L'influence de l'environnement a pu être appréciée en confrontant la diversité des communautés bactériennes avec les paramètres physico-chimiques des échantillons récoltés.

Chaque technique d'étude de la diversité bactérienne d'un réseau d'eau potable ayant ses avantages et ses inconvénients, les résultats de séquençage ont été comparés à d'autres méthodes d'évaluation de la diversité bactérienne. La flore cultivable de chaque échantillon a été décrite par une analyse au MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight). Les pathogènes opportunistes *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, et le genre *Mycobacterium* ont aussi été quantifiés par PCRq via l'amplification de gènes spécifiques à leur détection.

## **Matériels & Méthodes**

# I. Campagne d'échantillonnage du réseau d'eau potable de Paris

## I.6. Échantillonnage

La campagne d'échantillonnage a été mise en place sur le réseau d'eau potable de la ville de Paris entre mars 2016 et février 2017 inclus (Figure 17). Les prélèvements d'eau ont été effectués sur 31 sites différents répartis en deux catégories :

- Les prélèvements à la sortie des réservoirs où est stockée l'eau potable avant d'alimenter le réseau de distribution. Ces derniers, au nombre de quatre, étaient prélevés de façon hebdomadaire puis les échantillons d'un même mois étaient poolés en un seul après traitement.
- Les prélèvements sur le réseau public de distribution de l'eau potable, constituant le dernier lieu de transit où Eau de Paris a la possibilité d'intervenir avant le réseau privé des habitations. Ces 27 échantillons étaient prélevés à un rythme mensuel.

En tout ce sont 368 échantillons d'eau potables qui ont été collectés au cours de la campagne d'échantillonnage sur l'ensemble des sites de prélèvement. Les procédures de prélèvements et de mesures des caractéristiques physico-chimiques ont été réalisées par les équipes de prélèvement et les laboratoires d'analyse d'Eau de Paris, selon les normes en vigueur.

## I.7. Traitement des échantillons

Les échantillons d'eau ont été conditionnés en flacons d'un litre contenant 20 mg de thiosulfate de sodium afin de neutraliser le chlore résiduel présent dans l'eau potable. Des mesures de température, concentrations en chlore libre et total (norme NF-EN-ISO 7393-2), pH (norme NF T90-008) et conductivité (norme NF-EN 27888) ont été effectuées lors du prélèvement, avant le flaconnage. Les flacons ont ensuite été conservés à 4°C, puis acheminés au laboratoire pour analyses dans un délai de 6 heures. Avant filtration, 5 mL de l'échantillon ont été conservés à 4°C. Le reste de l'échantillon a été entièrement filtré sur une rampe surmontée d'une membrane filtrante en acétate de cellulose d'une porosité de 0,2 µm. Ce travail a contribué à la rédaction d'un chapitre méthodologique visant à être publié dans une nouvelle édition du livre *Legionella : Methods and Protocols* (Annexe A).

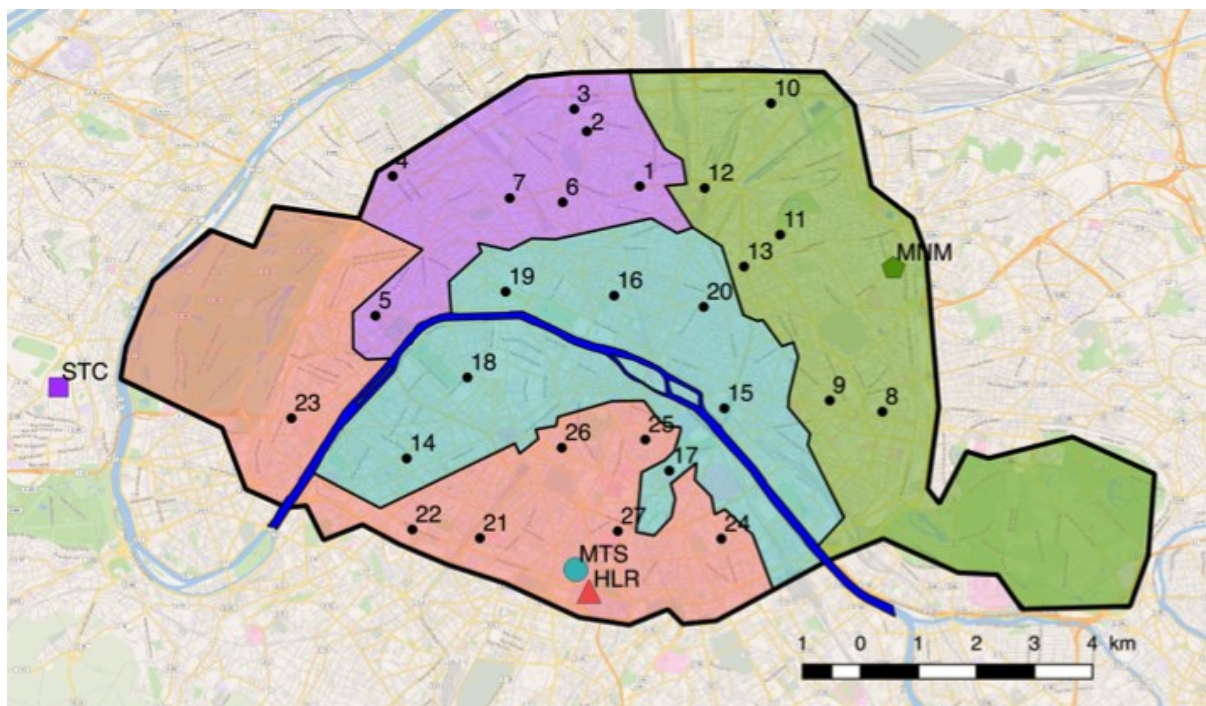


Figure 17 : Répartition géographique des sites de prélèvements des réservoirs et des réseaux de distributions du réseau d'eau potable de Paris. Les points HLR (L'Haÿ-les-Roses), MNM (Ménilmontant), MTS (Montsouris), et STC (Saint-Cloud) correspondent aux sites d'échantillonnage des réservoirs. Les points 1 à 27 correspondent aux sites d'échantillonnage présents sur les réseaux de distribution. Légende : UDI L'Haÿ-les-Roses ■, Ménilmontant ■, Montsouris ■, Saint-Cloud ■.

## II. Culture et identification des microorganismes

### II.1. Culture bactérienne

#### II.1.1. Culture d'*Escherichia coli*

La souche de *E. coli* TOP10 F' a été cultivée en milieu Lysogeny broth (LB) gélosé ou liquide (NaCl 10 g/L, tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, et, si nécessaire, agar 15 g/L) supplémenté en ampicilline à 100 µg/mL. Les cultures d'*E. coli* ont été incubées pendant 24 h à 37°C, sous agitation à 180 rpm.

Les souches de *E. coli* TOP10 F' transformées sont conservées à -80°C dans un milieu LB présentant une concentration de glycérol final de 20%.

### **II.1.2. Isolement de la flore hétérotrophe totale**

L'isolement de la flore hétérotrophe totale du réseau d'eau a été fait à partir des 5 mL d'eau prélevés sur chaque échantillon. La numération a été faite selon les normes en vigueur (norme EN ISO 6222). Pour chaque échantillon, un dépôt de 1mL d'eau a été effectué sur le milieu de culture R2A (protéose peptone 0,5 g/L, Acides casamino 0,5 g/L, extrait de levure 0,5 g/L, dextrose 0,5 g/l, amidon soluble 0,5 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>- 0,3 g/l, MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0,05 g/l, pyruvate de sodium 0,3 g/l, agar : 15 g/L). L'adsorption des microorganismes a été effectuée par séchage complet du dépôt sous hotte microbiologique avant leur incubation à 22°C pendant 72h ou 37°C pendant 48h. Le dénombrement et les identifications bactériennes par spectrométrie de masse MALDI-TOF ont été réalisés à la suite de l'incubation.

## **II.2. Identification des bactéries par spectrométrie de masse MALDI-TOF**

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight) est une nouvelle technologie apparue ces dernières années en microbiologie. Elle est basée sur l'obtention d'un spectre de fragments protéiques propre à chaque microorganisme. Ce spectre est comparé au sein d'une banque de données permettant d'obtenir une taxonomie plus ou moins pertinente selon le score de confiance affilié (Seng et al 2009).

Pour l'identification de chaque isolat, ce dernier est d'abord repiqué sur milieu R2A afin d'obtenir une plus grande quantité de matériel biologique. Ce dernier est ensuite transféré sur la cible en acier inoxydable du spectromètre et 1 µL d'acide formique à 70% est ajouté à chaque dépôt pour faciliter l'extraction protéique. Une fois le dépôt sec, ce dernier est recouvert de 1 µL de matrice HCCA (Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique dans une solution à 50% d'acetonitrile et 2.5% d'acide trifluoro-acétique). Les échantillons ont été analysés à l'aide du spectromètre MALDI-TOF MicroFlex LT (Bruker Daltonics), couplé au logiciel BioTyper et la banque de spectres protéiques associée. Le système est calibré en utilisant un dépôt dit BTS (pour Bacterial Test Standard). Le BTS est une extraction protéique d'*E. coli* enrichie de deux protéines de haut poids moléculaire. La validation de ce dernier est nécessaire pour toute identification.

## **III.Méthodes de biologie moléculaire**



### III.1. Extraction d'ADN totale et plasmidique

Les extractions d'ADN à partir des membranes filtrantes 0,2 µm, sur lesquelles les échantillons d'eau potable ont été filtrés, ont été effectuées à l'aide du kit PowerWater DNA Isolation (Mobio), en suivant les recommandations du fournisseur. Ce kit est adapté pour les extractions directement à partir de filtre et a été élaboré pour éliminer les éventuels inhibiteurs de PCR présents dans les échantillons environnementaux. Les ADN ainsi extraits ont été élués dans un volume final de 100 µL d'eau de qualité biologie moléculaire puis stockés à -20°C.

Les extractions plasmidiques à partir des souches bactériennes transformées ont été effectuées à partir du kit NucleoBond® Xtra Midi (Macherey Nagel), en suivant les recommandations du fournisseur. Les plasmides ainsi extraits ont été élués dans 500 µL de tampon TE.

### III.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est une technique de biologie moléculaire qui permet d'amplifier spécifiquement, et *in vitro*, une région d'ADN d'intérêt. Elle permet ainsi d'obtenir une grande quantité de ce fragment à partir d'un échantillon faiblement concentré. Le principe de cette technique est une succession de paliers de températures différentes afin de jouer sur la dénaturation de l'ADN et l'activité de l'ADN polymérase. La durée et la température exacte de chaque palier dépend notamment des recommandations du fournisseur de l'ADN polymérase, de la séquence des amorces et de la taille du fragment à amplifier.

La première étape consiste en une dénaturation initiale de l'ADN double brin en ADN simple brin à une température située entre 95°C et 98°C et d'une durée variable. Suite à cette étape plusieurs cycles comprenant trois étapes vont se succéder (environ 35 cycles). Ces cycles sont composés d'une étape de dénaturation de l'ADN, une d'hybridation des amorces dont la température est variable en fonction des caractéristiques de celles-ci (Tableau 4), et une étape d'élongation permettant la synthèse d'un brin complémentaire de l'ADN matrice par l'ADN polymérase. La PCR se termine par une élongation finale à 72°C pendant quelques minutes.

**Tableau 4 : Amorces utilisées au cours de cette étude pour les expériences de PCR en point final.**

Amorces	Séquences (5'-3')	Source	Cible
U341F	CCTACGGGGRSGGCAGCAGCAGCAGCAG		

U926R	CCGTCAATTCMTTTRAGT	Baker <i>et al.</i> 2003	Gène codant l'ARNr 16S
mip1-A	GCATTGGTGCCGATTTGG	Joly <i>et al.</i> 2006	Gène <i>mip</i> de <i>Legionella</i> <i>pneumophila</i>
mip2-A	GYTTTGCCATCAAATCTTTCTGAA		
AtpeF	CGGYGCCGGTATCGGYGA	Radomski <i>et al.</i> 2013	Gène <i>atpE</i> de <i>Mycobacterium</i> spp.
AtpeR	CGAAGACGAACARSGCCAT		
Paer-F	TGCTGGTGGCACAGGACAT	Shannon <i>et al.</i> 2007	Gène <i>regA</i> de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>
Paer-R	TTGTTGGTGCAGTTCCTCATTG		

### III.3. La PCR quantitative

La PCRq est basée sur le même principe que la PCR, mais apporte une notion de quantité, en nombre de copies, de l'ADN matrice dans l'échantillon initial grâce à une mesure de fluorescence. Durant ces travaux, nous avons utilisés la chimie TaqMan.

La chimie TaqMan est une chimie spécifique à la région d'intérêt puisqu'elle utilise une sonde nucléotidique complémentaire à une région flanquée par les amorces utilisées. Cette sonde possède un fluorochrome émetteur (Reporter) en 5' et un fluorochrome suppresseur (Quencher) en 3'. Lorsque la sonde est intègre, la fluorescence émise par le reporter est absorbée par le quencher. Lorsque l'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN matrice, son activité exonucléase 5' à 3' hydrolyse la sonde, séparant ainsi le reporter du quencher qui va pouvoir émettre une fluorescence.

#### III.3.1. Réalisation de la gamme étalon

Afin de quantifier le nombre de copie des gènes d'intérêts dans les extractions d'ADN de chaque échantillon d'eau potable, des gammes étalons ont été réalisées pour chaque gène d'intérêt à partir d'un plasmide pGEM-T Easy présentant l'amplicon d'intérêt comme insert.

Les gammes étalons ont été préparées en réalisant des dilutions en série. Celles-ci ont été établies à l'aide de la quantification de la concentration en plasmide par spectrophotométrie et de la taille connue des plasmides.

#### III.3.2. Amplification

Les PCRq ont été réalisées avec un thermocycleur Vii7 (Life Technologies). Les réactions ont été effectuées en utilisant le kit TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix, selon les recommandations du fournisseur et suivant les couples d'amorces utilisés (Tableau 5). Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 10 µL.

**Tableau 5 : Amorces et sondes nucléotidiques utilisées au cours de cette étude pour les expériences de PCRq.**

<b>Amorces</b>	<b>Séquences (5'-3')</b>	<b>Source</b>	<b>Cible</b>
mip1-A	GCATTGGTGCCGATTTGG	(Joly <i>et al.</i> 2006)	Gène <i>mip</i> de <i>Legionella pneumophila</i>
mip2-A	GYTTTGCCATCAAATCTTTCTGAA		
mip1-S	CCACTCATAGCGTCTTGCATGCCTTA		
AtpE-F	CGGYGCCGGTATCGGYGA	(Radomski <i>et al.</i> 2013)	Gène <i>atpE</i> de <i>Mycobacterium</i> spp.
AtpE-R	CGAAGACGAACARSGCCAT		
AtpE-P	ACSGTGATGAAGAACGGBGTRAA		
Paer-F	TGCTGGTGGCACAGGACAT	(Shannon <i>et al.</i> 2007)	Gène <i>regA</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Paer-R	TTGTTGGTGCAGTTCCTCATTG		
Paer-PR	CAGATGCTTTGCCTCAA		

### **III.4. Purification des produits PCR**

Les amplicons obtenus à l'issu des réactions de PCR en point final ont été purifiés avant d'être utilisés dans divers applications de biologie moléculaire. Les amplicons ayant servi pour les constructions plasmidiques ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel), selon les recommandations du fournisseur. Les amplicons utilisés pour un séquençage Sanger ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSEQ® Sequencing Reaction Clean-up (Macherey Nagel).

## III.5. Clonage dans *Escherichia coli*

### III.5.1. Construction plasmidique

Les constructions plasmidiques ont été effectuées à l'aide du kit pGEM®-T Easy Vector (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Le vecteur pGEM-T Easy est un plasmide linéarisé de 3015 pb présentant des extrémités 3' cohésives avec une thymine débordante pouvant donc recevoir des inserts d'ADN avec une extrémité 5' cohésive possédant une adénine débordante (Figure 18).

Le plasmide contient également une résistance à l'ampicilline et le gène *lacZ* codant pour la sous-unité  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase sur lesquels reposent le principe de sélection des mutants. Le promoteur de *lacZ* et la partie à transcrire du gène sont séparés à cause de la forme linéaire du plasmide. Le gène ne peut donc être exprimé que s'il y a ligature et si la ligature du plasmide se fait sans insert. Le peptide synthétisé va permettre d'obtenir une  $\beta$ -galactosidase fonctionnelle grâce à l'expression de la sous-unité  $\gamma$  par l'organisme transformé. La supplémentation du milieu LB par de l'X-gal et de l'ampicilline va permettre de sélectionner les colonies. Les colonies blanches auront intégré le plasmide présentant un insert, alors que les colonies bleues, dues au clivage du X-gal, auront intégré un plasmide n'ayant pas d'insert et ayant reconstitué la  $\beta$ -galactosidase.

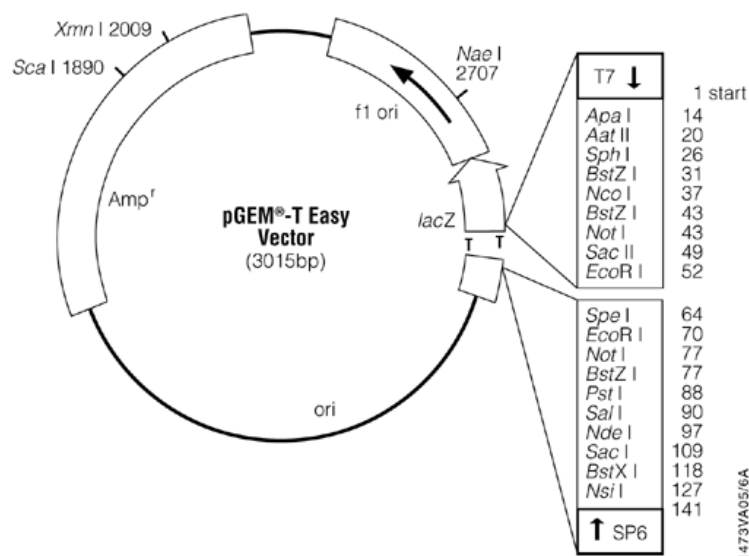


Figure 18 : Carte du vecteur pGEM-T Easy et des sites de restriction présents.

Ainsi, trois plasmides différents ont été élaborés. Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau 6.

**Tableau 6 : Plasmides élaborés au cours de cette étude et utilisés comme gamme étalon pour les expériences de PCRq.**

Plasmide	Tailles (en pb)	Insert	Antibiotiques
pGEM-T-mip	3201	Fragment du gène <i>mip</i> de <i>L. pneumophila</i>	
pGEM-T-atpE	3080	Fragment du gène <i>atpE</i> de <i>Mycobacterium</i> spp.	Ampicilline
pGEM-T-regA	3197	Fragment du gène <i>regA</i> de <i>P. aeruginosa</i>	

### III.5.2. Clonage

Le clonage a été effectué sur la souche *E. coli* TOP10F' chimiquement compétente (ThermoFisher Scientific) et selon les recommandations du kit pGEM®-T Easy Vector (Promega). Brièvement, la réaction de ligature a été ajoutée aux cellules compétentes qui sont maintenues à 4°C. La transformation se fait par choc thermique à 42°C. Afin d'obtenir une efficacité de transformation maximale, les cellules sont incubées dans du milieu SOC (tryptone 2 %, extrait de levure 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucose 20 mM) suite au choc thermique. Différents volumes de cette culture sont enfin étalés sur des boîtes de Petri LB supplémentées en ampicilline 100µg/mL, en IPTG et en X-gal, régénérées à partir du kit imMedia Growth Medium, agar, ampicillin, X-gal/IPTG (ThermoFisher Scientific).

### III.6. Séquençage par la méthode de Sanger

Le séquençage par la méthode de Sanger consiste à réaliser quatre amplifications correspondant aux quatre nucléotides composant l'ADN. Pour cela, le mélange réactionnel est composé notamment des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ainsi qu'une faible concentration des quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) marqués par une fluorescence spécifique. L'insertion aléatoire des ddNTP va permettre d'arrêter la polymérisation à chaque position de nucléotide et d'obtenir une banque d'amplicons présentant des tailles différentes. Une électrophorèse capillaire sépare les produits de réaction selon leur taille. La fluorescence spécifique de chaque ddNTP permettra alors de reconstituer la séquence nucléotidique du brin matrice.

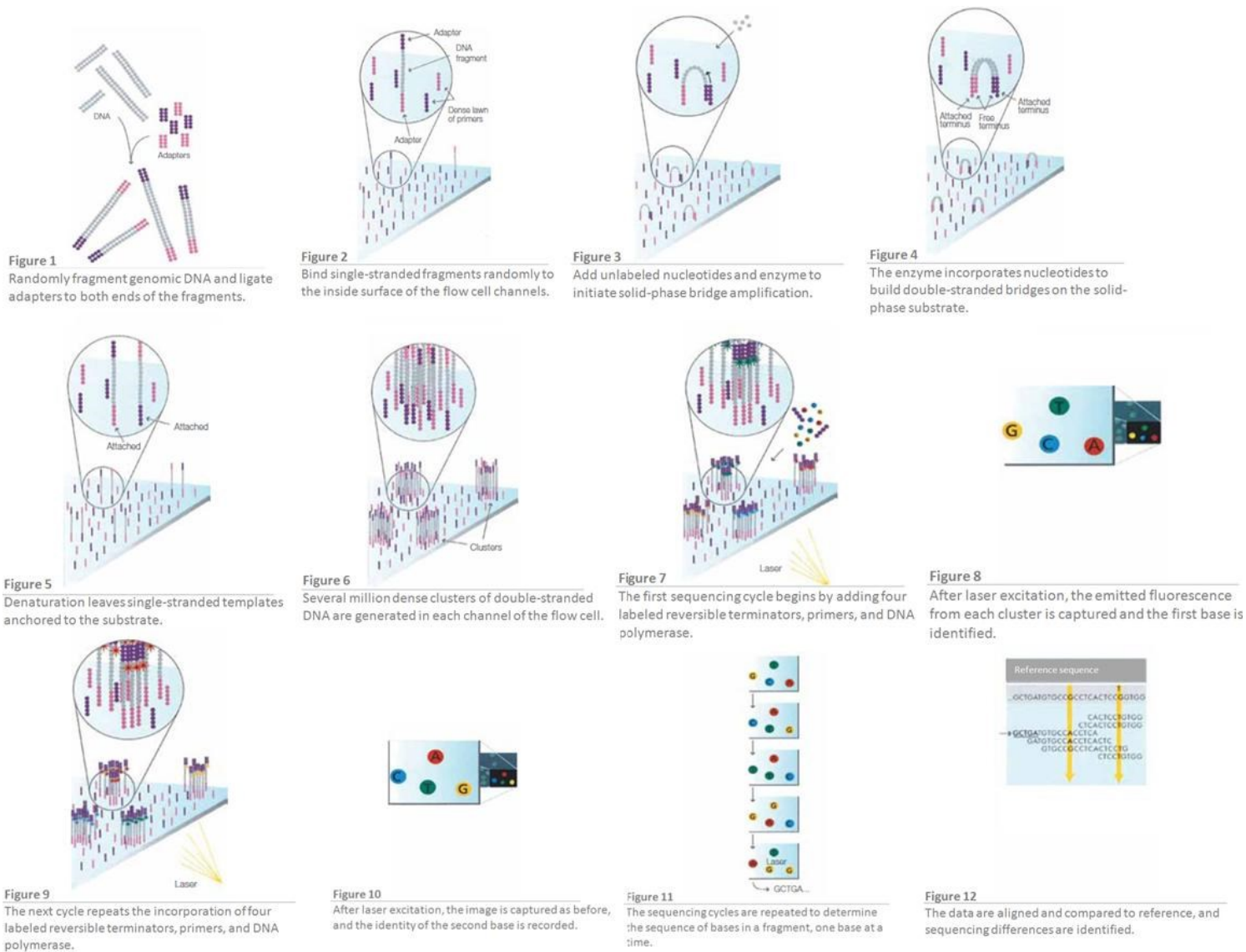
Les réactions de séquençage par la méthode de Sanger ont été effectuées avec les mêmes amorces ayant permis de générer les amplicons d'intérêt (Tableau 4). Elles ont été réalisées avec le kit BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems ®) selon les recommandations du fournisseur. Une réaction a été effectuée pour chaque amorce, sens et anti-sens, afin d'obtenir deux séquences chevauchantes, améliorant ainsi la qualité de la séquence finale par l'analyse de la séquence consensus. Les produits de séquençage ont été purifiés comme indiqué dans la section précédente, et conservés à -20°C jusqu'au séquençage. Les séquences ont été déterminées en utilisant le séquenceur ABI Prism 3130xl (Life Technologies). Les séquences brutes ont été ensuite récupérées pour analyses.

### **III.7. Technologie de séquençage Illumina**

Le séquençage par synthèse, utilisé par la société Illumina, est une technique de séquençage à haut débit permettant de séquencer en parallèle plusieurs millions de fragments d'ADN. Cette technique peut s'appliquer dans différents contextes tels que l'étude de la diversité microbienne d'un écosystème, le séquençage du génome d'un organisme donné mais aussi pour le diagnostic génétique ou thérapeutique.

Dans un premier temps, une librairie d'ADN est effectuée. Pour cela, l'ADN est fractionné en fragments de tailles homogènes dans le cas d'un séquençage de génome (Figure 19.1). Dans le cas d'un séquençage d'amplicons, comme dans cette étude, l'étape de fractionnement n'a pas lieu. A leurs extrémités, des adaptateurs distincts sont intégrés à leur séquence via une amplification par PCR. Ces adaptateurs vont permettre d'ancrer les brins d'ADN sur une lame en verre comportant des oligonucléotides complémentaires aux adaptateurs (Figure 19.2). Une nouvelle réaction PCR permet ensuite l'amplification clonale de chaque fragment d'ADN fixé, formant ainsi un 'cluster' de plusieurs centaines de copies de ce brin. Les brins anti-sens de chaque cluster sont ensuite clivés pour ne procéder qu'au séquençage du brin sens (Figure 19.3 à 19.6).

Le principe du séquençage par synthèse repose sur une amplification de l'ADN cible en utilisant des nucléotides marqués. Ces derniers possèdent un fluorophore spécifique à



**Figure 19 : Principe de la technique de séquençage par synthèse. Figure issue de [www.illumina.com](http://www.illumina.com).**

chacun d'entre eux, et qui fixé au niveau du groupement 3'OH du 2'-désoxyribose, bloquant ainsi la synthèse du brin. Ainsi, au cours de chaque cycle, un unique dNTP est inséré au brin complémentaire de l'ADN d'intérêt. Après lavage, chaque cluster est excité par une source lumineuse et un signal fluorescent est émis. Ces signaux étant propres à chacun des quatre nucléotides, un programme informatique est utilisé afin de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice. Le fluorophore est ensuite clivé et le groupement 3'OH est régénéré afin de pouvoir entamer un nouveau cycle de séquençage par synthèse (Figure 19.7 à 19.11).

## IV. Analyses bioinformatiques

### IV.1. Notion d'écologie microbienne

#### IV.1.1. L'unité taxonomique opérationnelle

En microbiologie, la notion d'espèce est assez problématique du fait de l'absence de reproduction sexuée, mais aussi de la présence de transfert de gène. De ce fait, le terme "unité taxonomique opérationnelle" (OTU pour *Operational Taxonomic Unit*) est préféré en écologie microbienne. Cette notion est une standardisation internationale et est l'unité de mesure la plus communément utilisée pour quantifier la biodiversité microbienne. Cependant, elle n'a pas forcément de signification biologique. Dans le cas d'un séquençage haut débit du gène codant l'ARNr 16S, une OTU regroupe un ensemble des séquences présentant une similitude d'au moins 97%.

#### IV.1.2. L'alpha diversité

L'alpha diversité est définie comme la diversité de la communauté bactérienne présente dans un échantillon donné. Il existe différents outils de mesure permettant de pondérer cette diversité (Whittaker 1972). La richesse spécifique est la mesure la plus simple de l'alpha diversité. Elle correspond simplement au nombre d'entités différentes observées. Dans le cadre de cette étude, il s'agira du nombre d'OTUs. Les autres outils de mesures (indice de Chao1, de Simpson, de Shannon) vont prendre en compte, tout ou partie, l'abondance relative de chaque entité. Dans cette étude, seul l'indice de Shannon a été utilisé. Ce dernier est le plus utilisé dans la littérature et est défini comme tel :

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i$$



Où  $i$  est une espèce du milieu d'étude et  $p_i$  la proportion de l'espèce  $i$  par rapport au nombre total d'espèces ( $S$ ). Ainsi, l'indice de Shannon prend en compte le nombre d'espèces et leur régularité au sein de la population. Il est donc sensible aux espèces rares. L'indice sera égal ou proche de 0 si tous les individus de la communauté appartiennent à la même assignation taxonomique ou si la population est largement dominée par un seul individu. La diversité de la communauté est considérée maximale, indice égal à 1, lorsque l'ensemble des individus ont des abondances relatives similaires au sein de la communauté.

L'indice de Shannon est souvent accompagné de l'indice d'équitabilité de Pielou défini comme tel :

$$E = \frac{H'}{H_{max}}$$

Où  $H'$  est l'indice de Shannon et  $H_{max}$  est l'indice de Shannon maximal, soit  $H_{max}=\log(S)$  où  $S$  est le nombre total d'espèces. L'indice de Pielou représente l'uniformité de chaque espèce au sein de la population. L'indice sera proche de 0 lorsque la population comprendra une ou plusieurs espèces dominantes, et proche de 1 lorsque la répartition des espèces dans la communauté sera uniforme.

#### ***IV.1.3. La bêta diversité***

La beta diversité correspond à la variation de composition et/ou de structure en espèces entre les sites (échantillons) d'un environnement donné. La quantification des différences entre communautés le long de gradients environnementaux permet de mieux comprendre, par exemple, la dynamique spatio-temporelle des communautés ou l'influence des facteurs écologiques sur la biodiversité (Whittaker 1972).

La mesure de la bêta-diversité peut se faire selon différentes approches : les mesures qualitatives qui ne prennent en compte que le caractère présence/absence des espèces composant la communauté ou les mesures quantitatives qui tiennent également compte de l'abondance relative de chaque espèce. Traditionnellement, la variation des communautés a été évaluée en considérant des indices comme celui de Jaccard (mesure qualitative) ou de Bray-Curtis (mesure quantitative). Des méthodes plus récentes permettent de tenir compte de la distance phylogénétique entre les espèces d'un environnement, elles sont appelées méthodes UniFrac. Ces méthodes peuvent être aussi qualitative (UniFrac non pondéré) ou quantitative (UniFrac pondéré). Il est intéressant de prendre en compte ces différentes mesures

dans l'analyse de communautés bactériennes afin d'avoir une vision plus large de leur variation le long du gradient étudié (Lozupone *et al.* 2007).

L'interprétation de la beta diversité peut se faire de différentes façons. Dans nos études, nous avons choisis d'utiliser une méthode graphique, la PCoA (pour *Principal COordinate Analysis*), ainsi qu'un test statistique, le test PERMANOVA (pour *PERmutational Multivariate ANalysis Of VAriance*), pour juger les variations entre les différentes communautés bactériennes. La PCoA permet de générer une matrice de distance entre échantillons et attribue à chacun d'eux des coordonnées dans l'espace. L'observation graphique de la dispersion des échantillons permet d'avoir une idée de la similarité/dissimilarité de ces derniers. C'est la première étape pour évaluer la dynamique des communautés étudiées et est considérée comme une analyse exploratoire. Le test PERMANOVA est une analyse statistique de la matrice des distances générée par la PCoA. Il permet de comparer des groupes d'échantillons en testant l'hypothèse que les centroïdes de dispersion dans l'espace sont identiques pour l'ensemble des groupes étudiés. Si le test n'est pas significatif, il est considéré qu'au moins un des groupes testés présente une dispersion différente des autres. De ce fait, les communautés bactériennes de ces groupes sont différentes.

## **IV.2. Analyse des résultats de séquençage**

### ***IV.2.1. Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)***

En sortie de séquençage, chaque échantillon présente deux fichiers *.fastq* (un pour chaque amorce) correspondant à toutes les séquences nucléotidiques, suivie pour chacune de la qualité à chaque position nucléotidique. Le traitement des séquences obtenues par séquençage a été effectué à l'aide du logiciel QIIME v1.9.0 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso, Kuczynski, *et al.* 2010). Les séquences sens et anti-sens ont d'abord été reliées pour obtenir la séquence entière de la région amplifiée du gène codant l'ARNr 16S. Le contrôle qualité des séquences a été fait comme suit : les séquences ayant une qualité moyenne inférieure à 30 et/ou plus de trois bases nucléotidiques ambiguës ont été écartées. Le criblage et l'élimination des séquences chimériques ont été effectués à l'aide du logiciel USEARCH 6.1 (Edgar 2010). Une fois les différentes étapes de contrôle qualité effectuées, les séquences ont été groupées en OTUs ayant un seuil de similarité de 97% à l'aide d'UCLUST. Les OTUs, dit singletons, qui sont représentées par une seule séquence, n'ont pas été considérées dans les analyses ultérieures. Les séquences majoritaires de chaque OTU ont été sélectionnées et alignées avec Pynast v1.2.2 (Caporaso, Bittinger, *et al.* 2010). La

taxonomie de chaque séquence a été assignée au niveau du genre bactérien en les confrontant à la banque de données de séquences ribosomales SILVA version 128(Quast *et al.* 2013). Les informations d'abondance, de taxonomie de chaque OTUs et les métadonnées associées (site et mois de prélèvement) ont été compilées au sein d'un fichier *.biom*, pour les analyses suivantes.

#### ***IV.2.2. Analyses statistiques***

Le fichier *.biom* généré par QIIME a été importé dans R version 3.3.3 (R Core Team 2017). Du fait d'une profondeur de séquençage différente entre chaque échantillon, les données du fichier *.biom* ont été normalisées à l'aide du package *Metagenomeseq* qui normalise la somme des comptes de chaque échantillons sur une même valeur (Paulson *et al.* 2013).

La diversité des communautés bactériennes a ainsi pu être explorée à l'aide du package *Phyloseq* (McMurdie et Holmes 2013). Les comparaisons de deux conditions ont été effectuées à l'aide du test de Student. Les comparaisons de plus de deux conditions ont été effectuées par ANOVA avec le test post-hoc de Tukey du package *Agricolae*.

Les mesures d'alpha diversité ont été effectuées via le calcul de l'indice de Shannon avec le package *Phyloseq*. Des comparaisons de la diversité microbienne ont été effectuées en utilisant des tests PERMANOVA (Anderson 2001), avec 999 permutations, en utilisant le package *Vegan* (Oksanen *et al.* 2017). Les analyses exploratoires via PCoA ont été réalisées avec le package *Phyloseq* en utilisant des dissimilarités quantitatives (Bray-Curtis et UniFrac pondérées) ou qualitatives (Jaccard et UniFrac non pondérée). Les indices d'équitabilité de Pielou ont été calculés à l'aide du package *Microbiome* (Lahti *et al.* 2017).

Les corrélations entre les observations biologiques et les paramètres physico-chimiques ont été investiguées, dans un premier temps, sous R avec le package *Vegan*, via des analyses en composantes principales (ACP) (Oksanen *et al.* 2017). La significativité statistique des ACP a été évaluée en effectuant des tests de permutations (1000 répétitions). Elles ont ensuite été évaluées à l'aide de corrélation linéaire de Pearson.

## **Résultats**

# I. Étude de la diversité bactérienne au sein d'un réseau d'eau potable

La production et le transport d'eau potable dans un réseau de distribution est indissociable de la présence de communautés bactériennes. Ce fait est notamment dû à leur présence dans les eaux brutes avant traitement, mais aussi à leur utilisation au cours du processus de traitements des eaux de surface. Leur croissance est encouragée pour leur capacité métabolique à réduire les nitrates (Aslan et Cakici 2007), les matières organiques biodégradables (Prevost *et al.* 1998) ainsi que les contaminants chimiques (produits phytosanitaires et pharmaceutiques) et leur dérivés (Oh *et al.* 2018). De plus, les traitements appliqués à l'eau ne permettent pas d'éliminer l'entièreté des communautés bactériennes présentes dans l'eau potable. Leur but est d'éliminer les bactéries potentiellement pathogènes et de limiter le nombre de bactéries composant la flore hétérotrophe, tout en empêchant une éventuelle croissance de ces dernières. De ce fait, les bactéries sont une composante inévitable de cet écosystème et leur contrôle est un paramètre essentiel dans la distribution d'une eau potable de qualité.

Le suivi de ces communautés bactériennes est essentiellement basé sur l'analyse de la flore hétérotrophe totale, afin d'évaluer l'efficacité des traitements, et sur la présence des indicateurs fécaux, signe d'une contamination fécale et de la potentielle présence de pathogènes. Ces techniques présentent cependant des biais importants. Dans le cas de la flore totale, les milieux de culture utilisés permettent la croissance d'une faible proportion des bactéries viables présentes dans l'eau potable. De plus, aucune information qualitative ne permet d'apprécier la diversité bactérienne des communautés présentes dans l'eau potable. Dans le cas des indicateurs fécaux, leur mesure ne correspond qu'à une évaluation indirecte de la présence/absence de potentiels pathogènes puisque ces derniers ne sont pas directement détectés.

Depuis l'avènement des technologies de séquençage, l'identification du microbiome de divers réseaux de distribution d'eau potable a été facilitée et a permis de caractériser un nombre important de ces derniers (Santos *et al.* 2016). Ces études ont aussi pu mettre en avant l'impact de différents paramètres sur les changements des communautés, tels que les sources d'eau (Gomez-Alvarez *et al.* 2015), les traitements (Hwang *et al.* 2012 ; Wenfang Lin *et al.* 2014) et les facteurs spatio-temporels (Pinto *et al.* 2014 ; Stanish *et al.* 2016), mais aussi une quasi-omniprésence de genre bactériens potentiellement pathogènes tels que

*Mycobacterium*, *Legionella* et *Pseudomonas* (Ji *et al.* 2015 ; Lu, Struewing, Yelton, *et al.* 2015). Il s'est avéré qu'il n'existait pas de réciprocity entre les communautés bactériennes des réseaux de distribution (Proctor et Hammes 2015) et qu'une variation spatiale de la diversité bactérienne au sein d'un même réseau était des plus fréquente.

C'est dans ce contexte que la société Eau de Paris s'est intéressée à la diversité bactérienne présente dans le réseau de distribution d'eau potable de la ville et à l'intérêt que pouvait représenter les technologies de séquençage haut débit dans le suivi microbiologique d'un réseau d'eau potable. L'objectif de ces travaux était de caractériser et de suivre les populations bactériennes du réseau. Des variations dans leur structure et leur composition pourraient aussi refléter des mécanismes indépendants de la présence de bactéries dans le réseau, tels que des dysfonctionnements des infrastructures ou des évènements trop longs de stagnation. Pour cela, une campagne d'échantillonnage a été mise en place sur le réseau d'eau potable de Paris de mars 2016 à février 2017 sur 31 sites de prélèvements différents. Plusieurs caractéristiques physico-chimiques, ainsi que les paramètres spatio-temporels, des échantillons d'eau ont été implémentées dans les analyses, dans le but d'identifier les facteurs environnementaux influençant les communautés bactériennes et de permettre d'améliorer la compréhension de l'écologie des bactéries dans cet environnement spécifique.

### **I.1. Publication 1: Microbiome of a drinking water distribution system: a full scale spatio-temporal study to monitor water quality**

Les résultats de cet axe de travail ont fait l'objet d'un article scientifique, accepté par la revue Water Research le 25 Octobre 2018. Cet article est présenté ci-dessous.



## Microbiome of drinking water: A full-scale spatio-temporal study to monitor water quality in the Paris distribution system

Yoann Perrin<sup>a, b</sup>, Didier Bouchon<sup>a</sup>, Vincent Delafont<sup>a</sup>, Laurent Moulin<sup>b, \*, 1</sup>, Yann Héchard<sup>a, \*\*, 1</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Equipes Microbiologie de l'Eau, et., Ecologie, Evolution, Symbiose, Université de Poitiers, UMR CNRS 7267, F-86073, Poitiers, France

<sup>b</sup> Eau de Paris, Direction de la Recherche et du Développement pour la Qualité de l'Eau, R&D Biologie, 33, Avenue Jean Jaurès, F-94200, Ivry sur Seine, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 June 2018

Received in revised form

25 October 2018

Accepted 5 November 2018

Available online 12 November 2018

#### Keywords:

Microbiome

Drinking water

Bacteria

Ecology

16S

### ABSTRACT

The microbiological water quality of drinking water distribution system (DWDS) is of primary importance for human health. High-throughput sequencing has gained more and more attention in the last decade to describe this microbial diversity in water networks. However, there are few studies describing this approach on large drinking water distribution systems and for extended periods of time. To fill this gap and observe the potential subtle variation in microbiota of a water network through time and space, we aimed to apply high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene approach to characterize bacterial communities of the Paris' DWDS over a one-year period. In this study, the Paris network, composed of four different DWDSs, was sampled at 31 sites, each month for one year. The sampling campaign was one of the largest described so far ( $n = 368$ ) and the importance of key spatio-temporal and physico-chemical parameters was investigated. Overall, 1321 taxa were identified within the Paris network, although only fifteen of them were found in high relative abundance ( $>1\%$ ) in all samples. Two genera, *Phreatobacter* and *Hyphomicrobium* were dominant. The whole bacterial diversity was not significantly affected between the four DWDSs (spatial parameter) and by physico-chemical parameters. However, the bacterial diversity was slightly modified over the one-year period (temporal parameter) as we were able to observe DWDS microbiome perturbations, presumably linked to a preceding flood event. Comparison of high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene amplicons vs. cultivation-based techniques showed that only 1.8% of bacterial diversity was recovered through cultivation. High throughput sequencing has made it possible to monitor DWDS more accurately than conventional methods by describing the whole diversity and detecting slight fluctuations in bacterial communities. This method would be further used to supervise drinking water networks, to follow any perturbations due to internal events (such as treatments) or external events (such as flooding).

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Water quality is crucial for human health, therefore drinking water is carefully protected, monitored and managed (Proctor and Hammes, 2015). The quality of water in drinking water distribution

systems (DWDS) depends on different parameters, including microbial indicators. Chemical composition is also monitored by several parameters following the WHO recommendation and state regulation (World Health Organization, 2017).

For over a century, microbial quality of drinking water has been assessed mainly by measuring of cultivable bacteria, i.e. heterotrophic plate count (HPC) (Frankland and Frankland, 1894) and detection of faecal indicators (Anderson et al., 2005). However, these estimators do not represent a reliable proxy for assessing the microbial diversity dwelling in drinking water: i) HPC are indicators of the water degradation through the water network but only a slight fraction of bacteria found in water is measurable by HPC (Staley and Konopka, 1985) and ii) faecal indicators, *Escherichia coli*

\* Corresponding author. DRDQE, 33 Avenue Jean Jaurès 94200, Ivry sur Seine, France.

\*\* Corresponding author. PBS – Bât B36/B37, 1 rue Georges Bonnet, TSA51106, 86073, POITIERS Cedex 9, France.

E-mail addresses: [laurent.moulin@eaudeparis.fr](mailto:laurent.moulin@eaudeparis.fr) (L. Moulin), [yann.hechard@univ-poitiers.fr](mailto:yann.hechard@univ-poitiers.fr) (Y. Héchard).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

and *Enterococcus*, are monitored for the efficacy of the water treatment, and detection of faecal pathogens (Saxena et al., 2015). By definition, they are not related to other pathogens like opportunistic premise plumbing pathogens (OPPP) (Ashbolt, 2015a). Issues that can be encountered at a drinking water treatment plant, or during water distribution, can lead to proliferation of opportunistic pathogens such as *Mycobacterium* spp. *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* (Ashbolt, 2015b; Lu et al., 2015) among others. Concerning drinking water utilities, bacterial overgrowth can lead to technical complications during distribution, such as pipe fouling or biocorrosion due to biofilm development or degradation of water quality (Allion et al., 2011; Nawrocki et al., 2010). Drinking water with a low variation of bacterial communities between the point of production and the tap can be considered as biologically stable (Prest et al., 2016a). Therefore, the abundance and composition of microbial communities, along the drinking water network, are key parameters to allow a fine monitoring of drinking water's microbiological composition across time and space. To date, such analyses are not routinely done but new tools might be developed to allow this approach in the future (Liu et al., 2018).

Currently, the microbiome, depicting the whole microbial diversity, can be characterized by the use of high-throughput sequencing (HTS), which allows culture-independent analysis of this diversity (Caporaso et al., 2011; Goodrich et al., 2014). There are several studies describing the microbiome of drinking water (Ji et al., 2015; Pinto et al., 2014, 2012; Roeselers et al., 2015; Shaw et al., 2015; Zhang et al., 2017). A review has recently pointed out the usefulness of HTS in assessing of microbial water quality (Tan et al., 2015), for example by enabling the detection of any genome of faecal indicator bacteria, pathogens, tracking antibiotic resistance genes and anticipating the biodegradation of pollutants. These investigations showed that bacterial diversity might be influenced by raw water origin (Gomez-Alvarez et al., 2015; Ji et al., 2015), various treatment steps (Lin et al., 2014; Pinto et al., 2012), chlorination type (if any) (Hwang et al., 2012; Stanish et al., 2016), pipeline material (Ji et al., 2015; Ren et al., 2015), stagnation within the building plumbing which promotes biofilm development (Ji et al., 2015; Ling et al., 2018), or seasonal changes (Hwang et al., 2012; Pinto et al., 2014; Potgieter et al., 2018; Prest et al., 2016b; Roeselers et al., 2015). While these studies have greatly helped to define and understand the drinking water microbiome, most were conducted on limited space (e.g. building) or time scales (e.g. one-month sampling), using simulated pipe systems in laboratory conditions for some. Knowledge about the spatial and temporal microbial diversity consequently remains scarce, especially in the context of large cities (Pinto et al., 2014; Potgieter et al., 2018; Roeselers et al., 2015).

To fill this gap, we performed in our study a large-scale sampling campaign over one year in the four different DWDSs supplying the city of Paris, France. High throughput sequencing of 16S rRNA genes was used to characterize and monitor bacterial communities in these samples. Our objective was to understand which factors could influence the microbiome, such as the origin of water (groundwater or surface water), temporality and the selected physico-chemical parameters, and also to compare microbial variation with the required data provided by HPC.

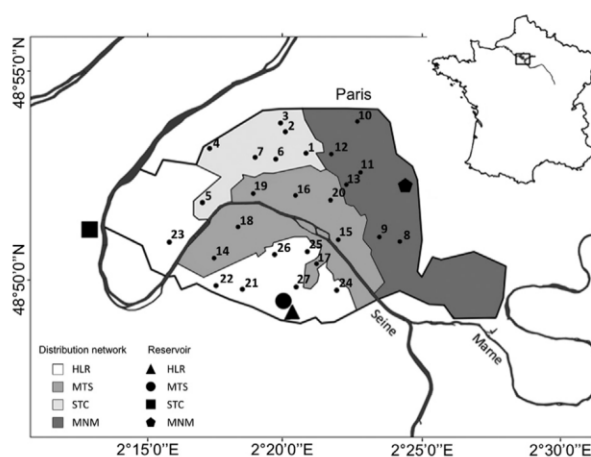
## 2. Materials and methods

### 2.1. Network features and sample collection

The city of Paris is supplied in drinking water with four separated DWDSs. Each of them is composed of one reservoir storing treated drinking water, for short periods of time, and of one

distribution network supplied by the affiliated reservoir (Fig. 1). Paris distribution networks are complex, a factor which greatly hampers the estimation of water time of residency, and pipe length from the reservoir. The total size of the network is estimated at 1800 km of cast iron pipes. An estimation of the direct distances between the sampling points and the reservoirs is presented in Table A1, they are between 1 and 16 km. On average, the residence time of drinking water in the pipes is roughly estimated at 24 h. Saint-Cloud and Montsouris DWDSs are supplied with groundwater from multiple sources around Paris, Ménilmontant DWDS is supplied with surface water from the Marne river and l'Haÿ-les-Roses DWDS is supplied with a mix of groundwater and surface water from the Seine river. Groundwater is treated with a filtration on activated charcoal and an ultrafiltration. Surface water is treated with a succession of physical or biological filtrations (pre-ozonation, decantation, pre-filtration and sand filtration), and ozonation stages, before undergoing filtration on granulated activated charcoal and ultraviolet disinfection prior to chlorination and distribution.

For each of the four DWDSs we collected the reservoir and the distribution network at different sites monthly. One sample corresponding to the reservoir was collected monthly in each DWDS. Seven sites for Montsouris, l'Haÿ-les-Roses and Saint-Cloud DWDSs and six sites for Ménilmontant DWDS were sampled monthly on the pipes of the distribution network (Fig. 1; Table A.1). Due to technical problems, sampling on the seventh point of Ménilmontant DWDS was stopped after two months. It is therefore not included in the analysis. In order to minimize the influence of stagnation in private networks (Pepper et al., 2004), the samples were not collected at household taps but rather directly on the final point of the distribution network. From month to month, sampling from a sampling site could vary by one or two days. In total, from March 2016 to February 2017, 368 water samples of 1 L were collected and transported to the laboratory at 4 °C. They were processed within 24 h and monitored according to the European regulation, and physico-chemical parameters were documented (temperature, pH, total chlorine, conductivity, nitrate and phosphate concentrations). These parameters were measured *in situ* using standardized procedures, by the Eau de Paris accredited laboratory (NF T90-008 for pH, NF-EN-ISO 7393-2 and NF-EN 27888 for chlorine concentration and conductivity respectively). All the information of each sample is available in Appendix B.



**Fig. 1.** Map representing the four DWDSs of Paris city and all sampling points. L'Haÿ-les-Roses (□), Ménilmontant (■), Montsouris (▨) and Saint-Cloud (▩) distribution network are supplied by l'Haÿ-les-Roses ▲, Ménilmontant ●, Montsouris ● and Saint-Cloud ■ reservoir, respectively. The distribution network and the associated reservoir form a DWDS.



## 2.2. DNA purification and amplicon sequencing

One-liter water samples were filtered through a 0.2 µm cellulose acetate membrane. Total DNA was extracted from membrane using the PowerWater DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA), as described by the manufacturer. From total DNA, a 464-bp-fragment corresponding to the variable regions V3-V4 of the bacterial 16S rRNA gene was amplified with the primers U341F (5'-CCTACGGGSGCAGCAG-3') (Baker et al., 2003) and Bakt\_805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Herlemann et al., 2011). These primers were selected for their high coverage on 16S rRNA gene sequences available in SILVA database release 128 (Quast et al., 2013). The U341F-Bakt\_805R primer pair detected without any mismatch 84.0% and 49.3% of bacterial and archaeal sequences, respectively. PCR and sequencing were subcontracted by the genotyping and sequencing platform of the Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (Paris, France; <https://icm-institute.org/fr/>). Briefly, amplicons were amplified (35 cycles) using Faststart™ PCR Master kit (Roche Life Science) with a 20 bp adaptor at each end. Index and processing (P5 and P7) sequence were added in a second PCR step, using FastStart™ High Fidelity PCR System kit (Roche Life Science). The amplicon libraries were sequenced (2 x 250 bp paired end) using an Illumina MiSeq platform using a 2 x 250 bp paired end. The process of demultiplexing was carried out automatically at the end of sequencing.

## 2.3. Sequence data processing

Sequences were analysed using the QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) pipeline version 1.9.0 (<http://qiime.org/>) (Caporaso et al., 2010b). The 20bp of each adaptor were removed on each side before sequence data processing. Sequences harbouring an overall quality score below 30 and more than 3 ambiguous bases were discarded. Chimeras were identified and discarded using USEARCH 6.1 (Edgar, 2010). Remaining reads were clustered into operational taxonomic units (OTUs) at a 97% similarity threshold using UCLUST (Edgar, 2010). Singletons, *i.e.* OTUs represented by less than 2 sequences, were not considered in subsequent analyses. A representative sequence for each OTU corresponding to the most abundant sequence was picked. Sequences were aligned using Pynast v1.2.2. (Caporaso et al., 2010a). Taxonomy was assigned up to the genus level, using UCLUST consensus taxonomy assigner coupled with the SILVA database, release 128 (Quast et al., 2013). Illumina MiSeq amplicon sequencing enabled us to obtain 47 277 387 V3-V4 16S rRNA gene sequences. After quality filtering and removal of chimeric sequences and singletons, 22 837 823 high-quality reads were obtained and clustered in 141 701 OTUs at a 97% similarity cut-off.

## 2.4. Blank samples

Seven blank samples, corresponding to the extraction and sequencing of seven cellulose acetate membrane, which had no contact with water, were performed. Comparison of blanks vs. samples was performed using principal coordinates analyses (PCoA), based on their weighted UniFrac distances, as detailed below (Fig. 3). Additionally, the Decontam R package was used to identify and eliminate contaminating OTUs by comparing prevalence of each OTUs in blanks and samples after sequence data processing (Davis et al., 2017). Thus, 5315 OTUs corresponding to 381 107 sequences were removed, the final dataset was consequently composed of 136 386 OTUs. An average of  $59\,725 \pm 2155$  (mean  $\pm$  se) sequences was obtained for each sample.

## 2.5. Statistical analyses of samples

The final BIOM file generated by QIIME was imported in R version 3.3.3 (R Core Team, 2017). Large sequence number variations across samples can affect relative abundance estimates and subsequent ordination analyses (Goodrich et al., 2014; Weiss et al., 2017). To prevent such bias, the final OTU table was normalized with the package MetagenomeSeq (Paulson et al., 2013) using a method where counts of each sample were scaled by the sample sum. Afterwards, microbial communities were explored using the Phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013). Comparisons of microbial diversity across DWDS, location or temporality were performed using Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) (Anderson, 2001), with 999 permutations and beta dispersivity analyses (Betadisper function) using the Vegan package (Oksanen et al., 2017). PCoA were performed with the Phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013) using quantitative (Bray-Curtis and weighted UniFrac) or qualitative compositional dissimilarities (Jaccard and unweighted UniFrac) (Table A.2). Pairwise Pearson's correlations were performed to assess the relationships between physico-chemical parameters and the most abundant taxa or bacterial diversity. Pielou's evenness was calculated with the Microbiome package (Lahti et al., 2017).

## 2.6. Heterotrophic plate count

For each sample, heterotrophic cultivable bacteria were cultured according to NF EN ISO 6222. Briefly, 1 ml of drinking water was grown on R2A agar plates which are commonly used to monitor cultivable bacteria from water samples, for 3 days at 22 °C or 2 days at 36 °C. Identification of bacterial colonies was performed by Matrix Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Bacterial colonies were transferred onto stainless-steel target and 1 µl of 70% formic acid was added to each spot of the target to facilitate protein extraction. Finally, each spot was covered with 1 µl of HCCA matrix (*o*-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile/2.5% trifluoro-acetic acid). Spectra acquisitions were performed using the MicroFlex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) combined with Bio-Typer software and associated database. The system was calibrated using the Bacterial Test Standard (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

## 2.7. Quantitative PCR of 16S rDNA gene

Quantitative PCR assays of the bacterial 16S rRNA gene were carried out using a SYBR Green detection system in a Vii7 instrument (Life Technologies). The 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGTAA-3') (Caporaso et al., 2011) and Bakt-805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Herlemann et al., 2011) primers set was used to amplify bacterial 16S rRNA gene. The 10 µL reaction mixture contained 0.5 µM of the 515F and Bakt-805R primers, 1X SYBR® Green PCR Master mix (Life Technologies), 2 µL of H<sub>2</sub>O, and 2 µL of DNA template. Thermal cycling conditions were as follows: an initial activation cycle at 95 °C for 10 min and 40 cycles at 95 °C for 10s; 56 °C for 10s; 72 °C for 45s. An additional 65–95 °C step (0.5 °C/s) was added to obtain a denaturation curve.

## 3. Results

### 3.1. Bacterial diversity and composition are similar between the four DWDS

To assess the bacterial diversity and modification of a large drinking water network, a one-year sampling campaign was

performed in the four DWDSs of Paris. Overall, 368 drinking water samples were collected, their total DNA was purified, amplified using 16S rRNA primers and sequenced.

All OTUs were assigned to 1321 different taxa, among which 544 were shared by the four networks (Fig. 2a; Table A.3). We identified 331 taxa present in only one of the four DWDSs, although with very low relative abundances (<0.01%). Focusing on the most abundant taxa (>1% relative abundance) shared by the four DWDS, bacterial communities exhibited low variations, as they were dominated by only 15 different taxa, representing 64.4%–72.7% of the relative abundance. Alphaproteobacteria was the most dominant class in all samples with a high proportion of two orders, namely Rhizobiales and Sphingomonadales. Rhizobiales were mostly represented by *Phreatobacter* and *Hyphomicrobium* genera (Fig. 2b). *Hyphomicrobium* was highly dominant (representing up to 34.1% of relative abundance in Montsouris DWDS) in the four networks without significant difference (Tukey HSD; adjusted  $P_{value} > 0.05$ ). *Phreatobacter* was significantly more abundant in Ménilmontant DWDS, accounting for 23.7% of the sequences, in contrast with Montsouris, Saint-Cloud and l'Haÿ-les-Roses DWDS accounting for 4.5%, 10.3% and 4.5%, respectively (Tukey HSD; adjusted  $P_{value} < 0.05$ ). The Sphingomonadales order also presented high relative abundance in Montsouris, Saint-Cloud and l'Haÿ-les-Roses DWDSs (16.2%, 17.1% and 19.2% respectively) with a high proportion of *Sphingorhabdus*, *Sphingomonas* and *Sphingopyxis* whereas this order represented

only 9.6% in Ménilmontant DWDS (Tukey HSD; adjusted  $P_{value} < 0.05$ ).

According to sample location (i.e. reservoirs or distribution networks) (Fig. 1), the relative abundance of microbial communities differed in each DWDS (Fig. 2c). Most of the abundant taxa (>1% relative abundance) showed DWDS-specific colonization patterns. For example, no difference in relative abundance of *Acidovorax* genus and undefined Comamonadaceae were observed between reservoir and the distribution network of Montsouris and l'Haÿ-les-Roses DWDS, unlike Ménilmontant and Saint-Cloud DWDS where their relative abundance varied (Student's test;  $P_{value} < 0.05$ ). Therefore, no general pattern of bacterial diversity with respect to sample location could be established with the exception of Rhizobiales, whose abundance increased significantly from the reservoirs to the final distribution points (Student's test;  $P_{value} < 0.05$ ).

Bacterial alpha-diversity was assessed for each sample, through calculation of Shannon H indexes (Figure A1). No significant differences were observed between the bacterial alpha-diversity of the four DWDSs (Tukey HSD; adjusted  $P_{value} > 0.05$ ; Figure A1a). Focusing on microbial diversity according to sample location, no differences were observed between the reservoir and its associated distribution network in Montsouris, Ménilmontant and l'Haÿ-les-Roses DWDSs (Shannon H index; Student test;  $P_{value} > 0.05$ ) (Figure A1b). On the contrary, Saint-Cloud DWDS showed significantly higher alpha-diversity in distribution network in

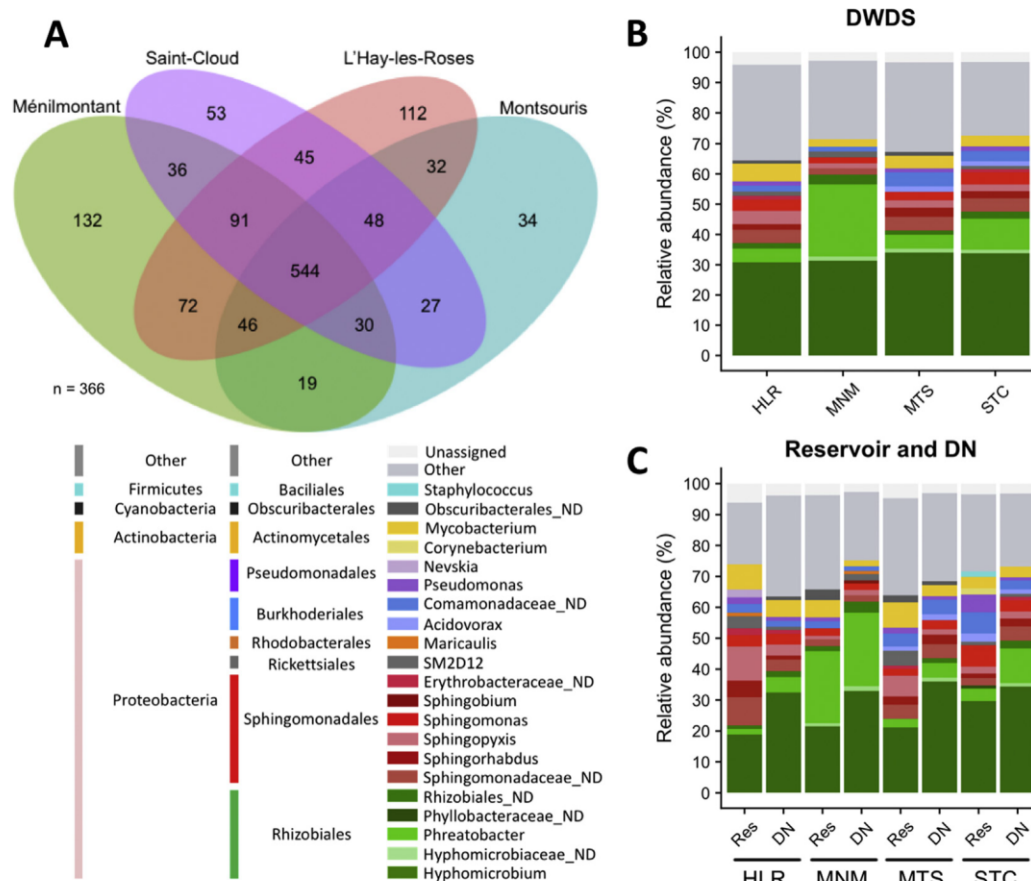
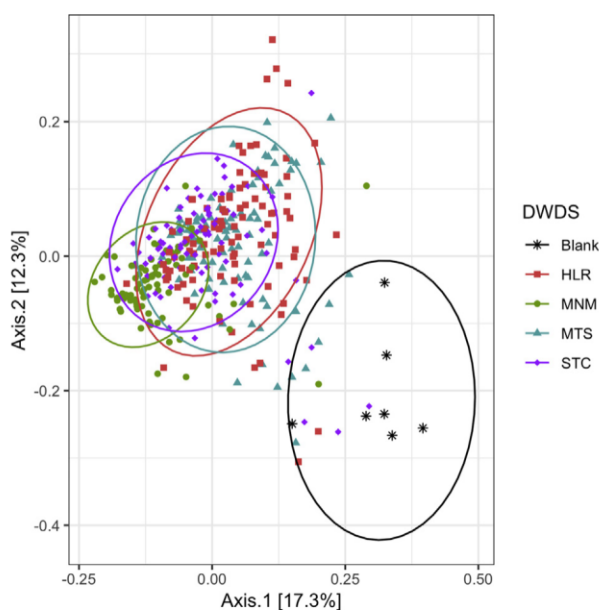


Fig. 2. Bacterial diversity based on normalized whole dataset according to spatial scale.

(a) Venn diagram of detected taxa among each DWDS. Taxonomic profiles of the most abundant taxa (>1%) within (b) DWDS and (c) location of samples according to DWDS. The number above each bar of the histograms corresponds to the number of samples used to calculate the average relative abundance. Remaining genera were combined in category 'Other'; category 'Unassigned' corresponds to unidentified OTUs; ND: Not defined; HLR: l'Haÿ-les-Roses; MNM: Ménéilmontant; MTS: Montsouris; STC: Saint-Cloud; res: reservoir; DN: distribution network. The number of samples was 96, 83, 94, 93 for HLR, MNM, MTS, STC DWDSs respectively, including 12 samples corresponding to the reservoir.



**Fig. 3.** Comparisons of bacterial communities in drinking water samples. Principal coordinates analysis (PCoA) plot showing the weighted UniFrac distances of water and blank samples according to their origin. Ellipses represent the 95% confidence interval for each grouping.

comparison with the reservoir (Student's test;  $P_{value} < 0.05$ ). Calculation of Pielou's evenness indexes indicated that all analysed samples, regardless of the DWDS, were above 0.94 (Figure A2). Such high evenness indexes underline a strong equitability of microbial communities across spatial gradient.

Considering beta-diversity, PCoA using weighted UniFrac distance between bacterial communities did not highlight any marked difference between DWDSs (Fig. 3). Thus, DWDS origin did not appear as a strong driver of phylogenetic dissimilarity. Although the PERMANOVA test supported a significant impact of this parameter, the variation explained by DWDS origin was very low ( $R^2 = 0.12$ ;  $P_{value} = 0.001$ ; Table A.2). The impact of sample locations was also investigated considering the whole microbial community with PERMANOVA tests, followed by beta dispersivity analyses. The location of samples explained only 4.9% of the variation between communities ( $R^2 = 0.05$ ;  $P_{value} < 0.001$ ; Table A.2). Beta dispersivity analysis showed divergent results depending on the networks and metrics used. The same analyses were performed on each DWDS separately, and comparable results were obtained.

### 3.2. Bacterial diversity is influenced by temporality

The sampling scheme presented in this study permitted the assessment changes of bacterial diversity in DWDSs over a full year (Fig. 4). The following highly abundant taxa showed significant variations along the year. Relative abundance of *Phreatobacter*, *Maricaulis* and *Mycobacterium* genera was significantly higher during warm period (June 2016 to October 2016; corresponding to a water temperature  $> 15^\circ\text{C}$ ) than during cold period (March 2016 to May 2016 and November 2016 to February 2017; water temperature  $< 15^\circ\text{C}$ ), in the four DWDSs (Student's test;  $P_{value} < 0.05$ ). Conversely, *Hyphomicrobium* and *Pseudomonas* abundances were significantly higher during cold period than in warm period (Student's test;  $P_{value} < 0.05$ ). The genera of Sphingomonadaceae family were not affected by these periods (Student's test;  $P_{value} > 0.05$ ), except for the *Sphingomonas* and *Sphingopyxis* genera, whose

relative abundance was higher in cold period (Student's test;  $P_{value} < 0.05$ ).

As regards the Shannon H index, L'Haÿ-les-Roses and Montsouris DWDSs showed a significant decrease in bacterial diversity during cold period as compared to warm period (Fig. 5; Student's test;  $P_{value} < 0.05$ ). Furthermore, some temporal changes, i.e. a monthly scale, were observed. Bacterial diversity was significantly lower in March and April 2016 in Montsouris DWDS and between December 2016 to February 2017 in L'Haÿ-les-Roses, Ménilmontant and Montsouris DWDSs, compared to July to October 2016 (Fig. 5; Tukey HSD; adjusted  $P_{value} < 0.05$ ). Because of this, bacterial diversity seems to evolve on a parabolic pattern. These observations constitute trends in Saint-Cloud DWDS. In addition, a significant decrease in microbial diversity was observed during the month of June (Fig. 5; Tukey HSD; adjusted  $P_{value} < 0.05$ ). Although this difference did not modify the composition of the most abundant taxa (Fig. 4), the relative abundance of *Legionella* and *Escherichia* genera increased drastically. During the year, *Legionella* and *Escherichia* showed a relative abundance of 0.10% and 0.14% in average respectively. Over the June-July period, their relative abundance reached 0.65% and 1.35% respectively. This increase may be correlated with the exceptional rise of the Seine river level in June 2016 (Fig. 6). Other bacterial genera known to contain OPPPs, such as *Mycobacterium* and *Pseudomonas*, or faecal indicators, such as *Enterococcus*, did not present significant variations in relative abundance.

Impact of temporality and temperature periods parameters on bacterial community were analysed with PERMANOVA test (Table A.2). The variability of microbial communities was poorly explained by these two parameters ( $R^2 = 0.13$ ,  $P_{value} < 0.01$ ;  $R^2 = 0.05$ ,  $P_{value} < 0.01$ ; respectively), and showed a heterogeneity of dispersion. However, temporality seems to have a moderate impact on the bacterial community of each DWDS considered independently of one another, since 21–23% of the variability is explained by this parameter.

### 3.3. Bacterial community composition is poorly explained by the physico-chemical parameters

Several physico-chemical parameters (total chlorine, electrical conductivity, pH, temperature, phosphate and nitrate concentrations) were measured for each water sample and compared using Pearson's correlation and PCA (Figure A3). Nitrate concentration and conductivity are linked (Pearson's  $R = 0.61$ ,  $P_{value} = 0.001$ ) and inversely correlated with pH (Pearson's  $R = -0.42$ ,  $P_{value} = 0.001$ ). Analyses of average and range of the different parameters suggest that nitrate concentration and conductivity depend on water origin (Table A.4). Respectively, they are on average 27.9 mg/L and 523  $\mu\text{S}/\text{cm}$  in L'Haÿ-les-Roses DWDS, 22.2 mg/L and 535.7  $\mu\text{S}/\text{cm}$  in Ménilmontant DWDS, 36.7 mg/L and 585.9  $\mu\text{S}/\text{cm}$  in Montsouris DWDS and 33.7 mg/L and 537.8  $\mu\text{S}/\text{cm}$  in Saint-Cloud DWDS. Chlorine and phosphate concentration varied slightly between the 4 DWDSs, from 0.11 to 0.13 mg/L and 1.02 mg/L to 1.09 mg/L respectively. pH varied to 7.5 to 7.8. On average, the temperature is  $13.8^\circ\text{C}$  in L'Haÿ-les-Roses DWDS,  $12.5^\circ\text{C}$  in Ménilmontant DWDS,  $14.1^\circ\text{C}$  in Montsouris DWDS and  $13.4^\circ\text{C}$  in Saint-Cloud DWDS.

Then, we assessed the possible correlation between physico-chemical parameters and bacterial diversity. A correlation between alpha-diversity, based on Shannon H index, and water temperature was observed in Ménilmontant (Pearson's  $R = 0.39$ ,  $P_{value} = 2.42e^{-4}$ ), Montsouris (Pearson's  $R = 0.60$ ,  $P_{value} = 1.63e^{-10}$ ), L'Haÿ-les-Roses (Pearson's  $R = 0.47$ ,  $P_{value} = 1.78e^{-6}$ ) and Saint-Cloud (Pearson's  $R = 0.24$ ,  $P_{value} = 0.02$ ) DWDSs. Conversely, a negative correlation between bacterial diversity and nitrate concentration was observed in Ménilmontant (Pearson's  $R = -0.27$ ,  $P_{value} = 0.013$ ), L'Haÿ-les-

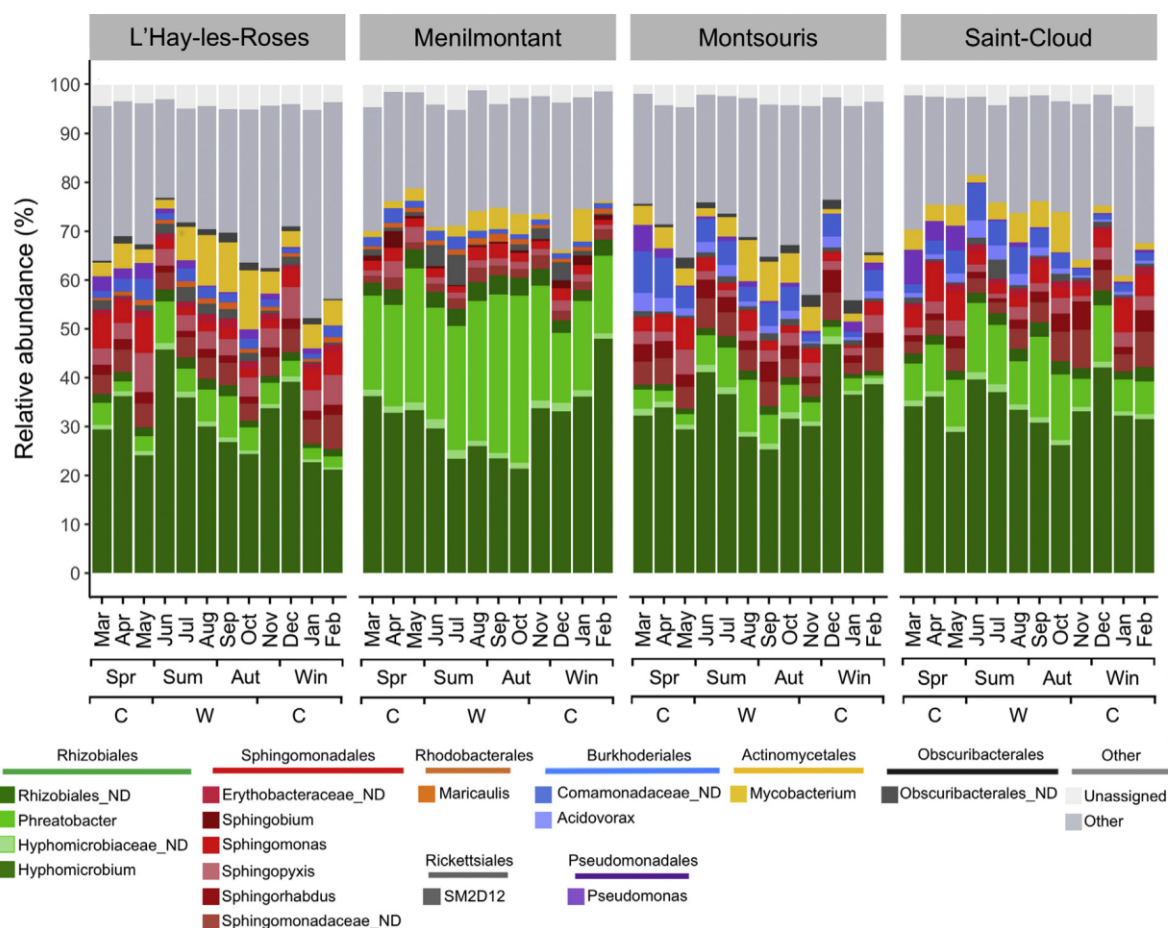


Fig. 4. Relative abundance of the most abundant taxa according to temporal parameters for each DWDS.

Remaining genera were combined in category 'Other'; category 'Unassigned' correspond to unidentified OTUs; ND: Not defined; HLR: L'Hay-les-Roses; MNM: M enilmontant; MTS: Montsouris; STC: Saint-Cloud. The seasons are indicated with Spr: Spring; Sum: Summer; Aut: Autumn; Win: Winter. Warm and cold period are indicated with W and C, respectively. (n = 6 to 8).

Roses (Pearson's  $R = -0.33$ ,  $P_{value} = 0.001$ ) and Saint-Cloud (Pearson's  $R = -0.22$ ,  $P_{value} = 0.037$ ) DWDSs.

Impact of physico-chemical parameters on beta-diversity was investigated using canonical correspondence analyses (CCA) based on weighted UniFrac distances. However, the constrained inertia values were low, representing 1.9% of the total inertia, considering either the relative abundance of all taxa (11.6% of the total inertia) or the most abundant taxa only (8.02% of the total inertia) (data not shown). Therefore, as minor taxa showed negligible impact on total inertia, we further focused our analyses on the most abundant taxa with linear trends through pairwise Pearson's correlation coefficients (Fig. 7). Nitrate concentration, temperature, conductivity and pH were the most influential parameters. In contrast, total chlorine and phosphate concentration had no significant impact on the most abundant taxa. These results are not surprising, since these two parameters are tightly monitored and controlled throughout the DWDS, to reach the same desired concentrations. Nitrate concentration appeared to have a positive impact on the relative abundance of the most represented taxa, except for the undefined Rhizobiales, undefined Hyphomicrobiales, SM2D12 taxa and *Phreatobacter* genera. Conversely, higher pH led to a decrease in relative abundance of all major taxa except for the undefined Rhizobiales and *Phreatobacter* genera, which are positively correlated with this parameter.

#### 3.4. Bacterial abundance via heterotrophic plate count, qPCR and high-throughput sequencing

Concomitantly with the HTS-based monitoring of microbial communities, we identified cultivable aerobic flora present in drinking water according to the European regulations through HPC. HPC measured by accredited analytical laboratories showed a stability of cultivable aerobic flora in the four DWDSs with a mean count between 2 and 4 colony forming units (CFU)/mL. Moreover, we estimated the total bacterial cells by qPCR targeting the 16S rRNA genes. The measured copy number of 16S rRNA genes was on average  $1.2 \cdot 10^7 \pm 9.0 \cdot 10^6$  copy/L in L'Hay-les-Roses DWDS,  $1.8 \cdot 10^6 \pm 7.8 \cdot 10^5$  copy/L in M enilmontant DWDS,  $1.2 \cdot 10^6 \pm 4.7 \cdot 10^5$  copy/L in Montsouris DWDS and  $9.9 \cdot 10^6 \pm 5.1 \cdot 10^6$  copy/L in Saint-Cloud DWDS. These results did not reveal any significant difference in a DWDS during the campaign and between the DWDSs, underlying the stability in bacterial abundance (Kruskal-Wallis & Dunn's test;  $P_{value} > 0.05$ ). To identify the bacteria, we isolated 1550 clones corresponding to 668, 339, 159 and 384 different colony forming units in L'Hay-les-Roses, M enilmontant, Montsouris and Saint-Cloud DWDSs respectively (Table A.5). The number of identified taxa based on the culture and high throughput sequencing is presented in Table 1. In total, 24 different taxa were identified using the culture-based method,

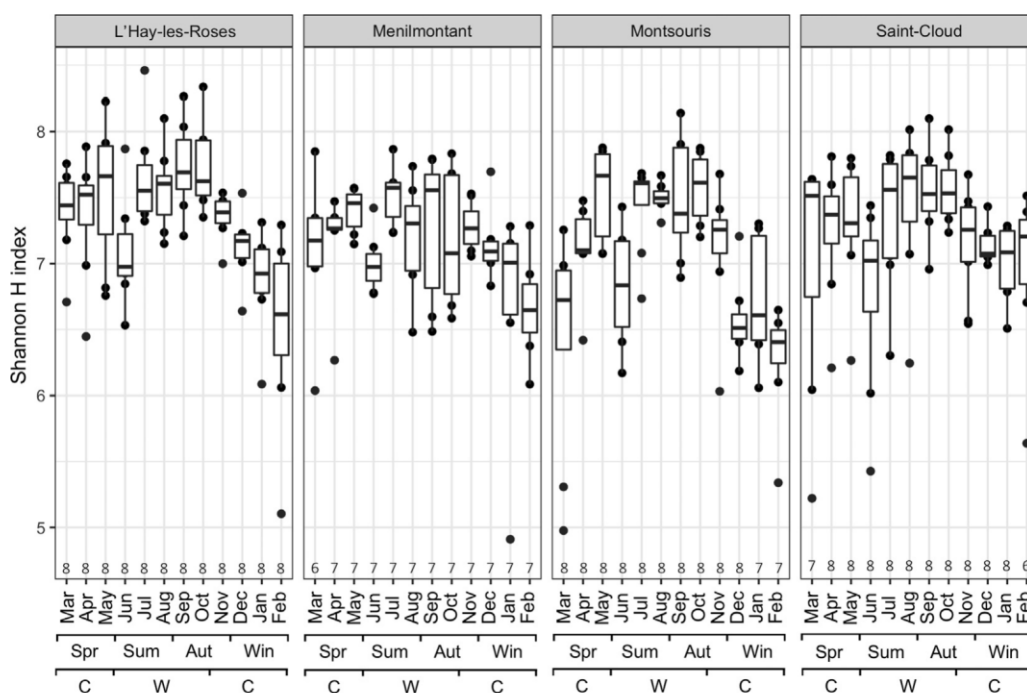


Fig. 5. Alpha-diversity (Shannon H index) of bacterial communities according to temporal parameters for each DWDS.

The length of the "whiskers" is 1.5 times the interquartile range. The seasons are indicated with Spr: Spring; Sum: Summer; Aut: Autumn; Win: Winter. Warm and cold period are indicated with W and C, respectively. (n = 6 to 8).

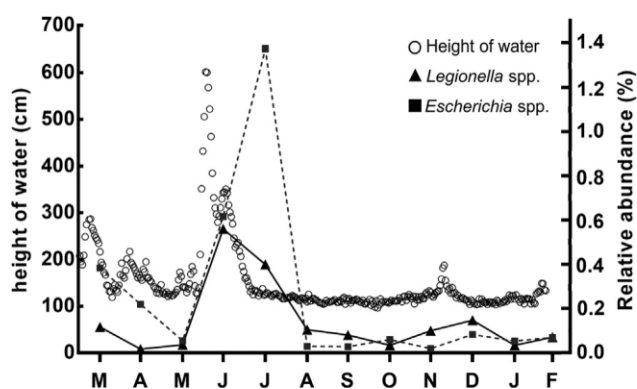


Fig. 6. Correlation between water level of Seine river and the relative abundance of *Escherichia* and *Legionella* genera in all DWDSs.

Water level of Seine river was collected at variable time intervals (with higher frequency during climate event) by Directions Régionales de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL) and were freely available (<http://www.hydro.eaufrance.fr/indexd.php>). N = 366.

while 1321 different taxa were identified using sequencing. Considering DWDSs separately, 1.3–1.8% of all detected taxa were covered by the culture-based method. From these identifying cultivable aerobic flora data, rarefaction curves of colonies were produced and showed that our sampling effort was sufficient to capture the major part of the cultivable bacterial diversity present in the four DWDSs (Figure A4). The cultivable flora was highly dominated by *Mycobacteria* and bacteria from the Sphingomonadaceae group which were also among the most abundant taxa detected by HTS of the 16S rRNA gene. Despite their high proportion in sequencing data, no bacteria from the Rhizobiales order was found in cultivable flora.

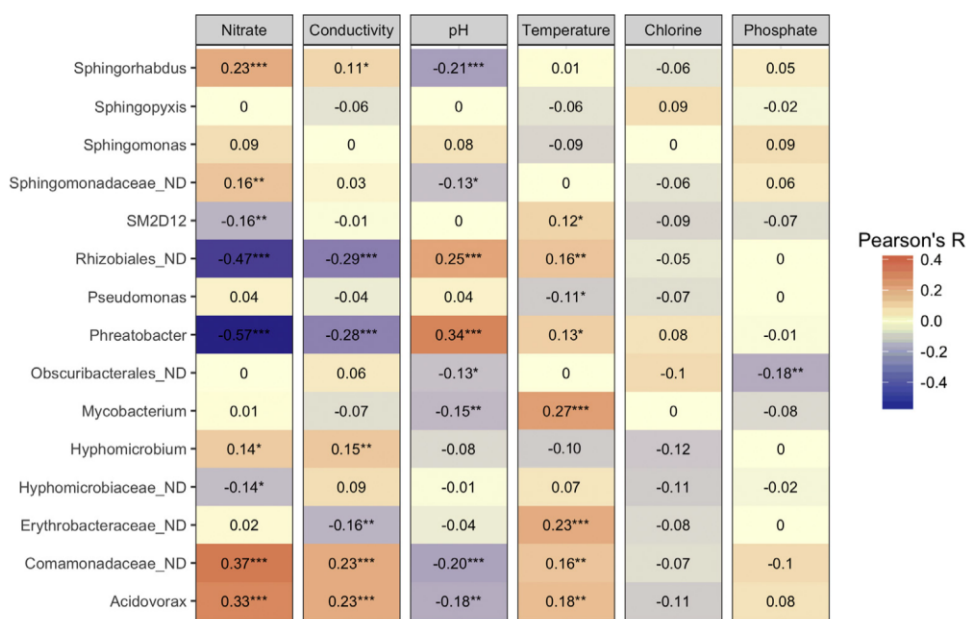
#### 4. Discussion

In the present work, we studied the four different DWDSs of the Paris through a large campaign, and aimed to analyse their microbial communities, their changes and the impact of physico-chemical parameters.

In total, 1321 taxa were identified in the four DWDSs, although bacterial communities were dominated by 15 different taxa (Fig. 2). Interestingly, 1071 out of the 1321 identified taxa were detected with a relative abundance lower than 0.01%. Such low abundances might question whether these identifications reflect live bacteria, or simply relic DNA (Carini et al., 2016; Li et al., 2017).

##### 4.1. Bacterial population is dominated by Rhizobiales

Within the DWDSs, there was a clear domination of the Rhizobiales order (Alphaproteobacteria), with the two genera *Hyphomicrobium* and *Phreatobacter*. *Hyphomicrobium* was found as a predominant member of the drinking water of a DWDS (Stanish et al., 2016). It has been reported that the *Hyphomicrobium* genus was particularly abundant in the biofilm of iron cast pipe, which is the same material as that used in the four DWDSs of Paris (Ren et al., 2015). We hypothesize that the high abundance of *Hyphomicrobium* in our planktonic microbial population could result from biofilm. Indeed, the balance between biofilm and plankton is very dynamic (Liu et al., 2013). As a result, biofilm detachments with a high abundance of *Hyphomicrobium* bacteria could contribute to these observations. The second predominant genus, *Phreatobacter*, is scarcely documented. The first description of this genus is originating from an ultrapure water purification system (Tóth et al., 2014). To our knowledge, only one study has highlighted the presence of this genus, referred to as group F0723 sp., in the drinking water microbial community (Stanish et al., 2016). According to these authors, *Hyphomicrobium* and *Phreatobacter*



**Fig. 7.** Pairwise Pearson's correlations computed between the most abundant taxa and the physico-chemical parameters of samples. Whole water samples were considered. The values and directions of the correlation coefficients are displayed according to the colour key. Positive correlations as red gradient from 0 to 1 and inverse correlations as blue gradient from 0 to -1. Term 'ND' correspond to 'undefined'. Significance codes of P-value "\*\*\*\*", "\*\*\*", "\*\*" and "\*" indicate respectively  $P_{value} < 0.001$ ,  $0.01$ ,  $0.05$  and  $P_{value} > 0.05$  respectively.  $N = 366$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

**Table 1**

Comparison of counts of detected taxa culture-based and detected taxa sequencing-based among each DWDS.

DWDS	Number of detected taxa		Covering (%)
	Culture-based	Sequencing-based	
L'Haÿ-les-Roses	13	990	1.3
Ménilmontant	14	780	1.8
Montsouris	13	970	1.3
Saint-Cloud	15	874	1.7
Total	24	1321	1.8

tended to be more abundant in waters with low chlorine concentration (Stanish et al., 2016). In the Paris network, chlorine concentrations did not exceed  $0.22 \text{ mg.L}^{-1}$ , corresponding to the upper threshold of the Eau de Paris chlorination system. Therefore, we could speculate that this low concentration could allow the *Hyphomicrobium* and *Phreatobacter* growth in microbial populations of the Paris DWDS.

#### 4.2. Bacterial community composition is similar between the four DWDSs

The characterization of microbial communities through PCoA and PERMANOVA tests did not allow to differentiate specific populations according to spatial parameters. A significant effect was nevertheless observed in community diversity, though only in the Saint-Cloud DWDS, which showed a lower diversity in the reservoir compared to the others. This might have been observed only in the Saint-Cloud DWDS due to the spatial proximity between the reservoir and the drinking water treatment plant. The poor differentiation of microbial communities between DWDSs might be surprising as it is well described that the origin of water (ground or surface water), the treatment strategies applied (biological filtration, ozonation, ultrafiltration and/or chlorination) and the DWDS

characteristics (pipe materials, hydraulic parameters, residence time) can impact bacterial populations composition and structure (Gomez-Alvarez et al., 2015; Ji et al., 2015; Pinto et al., 2012; Prest et al., 2016a; Santos et al., 2016; Stanish et al., 2016). Recent works have highlighted that, after water treatment, bacterial communities of waters with different origins were similar (Liu et al., 2018), and that these communities were stable until the end-point tap (Roeseleers et al., 2015). Besides, other publications show differences in microbial communities from a spatial point of view (Gomez-Alvarez et al., 2015; Stanish et al., 2016). In the present study, Saint-Cloud and Montsouris DWDSs are supplied by groundwater, while Ménilmontant DWDS is supplied by surface water and L'Haÿ-les-Roses DWDS contains a mix of groundwater and surface water. From a technical point of view, treatment represents the major difference as surface water receives additional biological filtration and ozonation steps. Despite these differences, all four DWDSs harboured similar microbial communities. The only observed variations, especially in terms of diversity, involved bacterial taxa present in trace amounts ( $<0.01\%$ ). Due to their low abundances, these variations had minute impacts on the bacterial communities.

While the Paris drinking water network is composed of four independent DWDSs, it must be noted that in case of maintenance or closing of one of the reservoir a DWDS is fed by one of the other resources. The rest of the time, few interconnexions could occur between DWDSs, but the transferred volume is considered as negligible. In any case, origin of water could be traced through physico-chemical indicators, such as nitrate concentration or conductivity. The poor differentiation of the bacterial diversity between the four DWDSs might be explained by the long history of the Paris network and the interconnexions that might have happened. We could hypothesize that the biofilm is similar along the four networks and that it might impact on the diversity of planktonic bacteria.

#### 4.3. Bacterial community composition is stable overtime

Regarding temporal parameters, our results showed a moderate impact with an increase of bacterial diversity during summer and autumn, but without changes in the community structure. Pinto et al. have observed the same variation in diversity but with communities' structures varying over time (Pinto et al., 2014). Other studies have shown an increase of diversity during winter (Potgieter et al., 2018) or a stability of bacterial communities over time (Roeselers et al., 2015). These different trends can be due to the specific characteristics of each DWDS, both in terms of the origin of the raw water used and therefore its physico-chemical parameters, the treatment systems and the size of the distribution network. As each study look at different DWDSs with specific features, it is difficult to compare the results between each study and to define a common pattern for the bacterial communities' variations in DWDS.

#### 4.4. Flooding could influence bacterial community composition

The relative abundance of *Escherichia* and *Legionella* genera rose in June as well as in July. Such variability may be explained by different events, like sudden climatic change and bacterial or predator increase/invasion (Smeets et al., 2009). Interestingly, high rainfall during late May 2016 caused a substantial rise of water and a rapid flow rate, resulting in a flooding of the Seine river in June 2016. River flooding typically leads to soil erosion, which entails a high loading of suspended matter and organic compounds, and therefore a significant increase of bacteria concentration in raw waters (Murshed et al., 2014). This type of qualitative change in raw water input can affect the efficiency of a drinking water treatment plant and might subsequently be observed in the treated water. Consequently, we hypothesize that differences in communities' diversity and composition in June may be explained by the flooding event, resulting in the rise of undesirable bacteria in treated water. Moreover, *Escherichia* and *Legionella* genera were not detected by the culture-based method implemented in the monitoring and control of DWDS of Paris by the Eau de Paris accredited laboratory, thereby indicating that water distributed during this period complied with safety criteria for consumption. This conclusion underlines the power of HTS-based monitoring of DWDS, which enabled the detection of DWDS microbiome perturbations, including taxa potentially containing pathogens, at thresholds that are below the ones used in standards to ensure the microbiological safety of water (Tan et al., 2015).

#### 4.5. Physico-chemical parameters poorly correlate with the bacterial community composition

The observed variabilities of microbial communities were weakly explained by the impact of physico-chemical parameters of water through CCA. It should be noted that we followed only some of a part of influential physico-chemical parameters. It has been demonstrated that variations in quantity and diversity of organic carbon compounds impact bacterial community structure and composition (Prest et al., 2016a); sulfate and oxygen concentrations can promote growth of sulfate-reducing bacteria (Gomez-Smith et al., 2015); and deficiency in trace elements (e.g. metallic elements) can result in bacterial growth limitation (Finney and O'Halloran, 2003). Comparisons based on pairwise Pearson's coefficients highlighted correlations between abundances of the most abundant taxa and several of the monitored abiotic parameters (Fig. 7). These taxa were, for the most part, positively influenced by nitrate concentration, conductivity and temperature. Impact of nitrate concentration and conductivity are similar owing to their

close correlation (Figure A3). Conversely, an increase of pH led to a decrease in the relative abundance of most abundant taxa. The impact of chlorine and phosphate on most abundant taxa could not be adequately determined since their concentration is controlled. Chlorine is used as a residual treatment with order value of  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  of water; and phosphate is used to precipitate soluble lead due to potential old pipe material in private household connected to the DWDS. Due to the size and design of Paris DWDSs, hydraulic parameters measurement could not reliably be implemented on the selected sampling sites. Changes in flow rates and shear stress were described to influence bacterial communities, (Ji et al., 2015; Lautenschlager et al., 2010) (Mathieu et al., 2014), and further implementation of such variables may improve our understanding of bacterial community dynamics in such environments. Also, the total organic carbon was always below  $2 \text{ mg/L}$ .

#### 4.6. HTS vs culture to assess DWDSs bacterial diversity

We compared the culture-dependent method with the HTS-based characterization described in this study. To evaluate the bacterial diversity captured by the culture-dependent standard, all isolated colonies were identified using MALDI-TOF MS. Based on the identification of 1550 colonies, 24 taxa were identified. The Proteobacteria phylum was clearly dominant, encompassing 14 of the 24 identified bacterial genera, as in most studies dealing with bacterial communities in drinking water (Pinto et al., 2014; Proctor and Hammes, 2015). While the isolation effort was sufficient to capture most of the cultivable diversity, this approach covered only 1.3%–1.8% of the bacterial diversity determined by HTS. To our knowledge, our study is the first one to compare HTS and culture at such a large scale. Moreover, neither *Phreatobacter*, nor *Hyphomicrobium* could be identified in the colonies, indicating that they are most likely not cultivable in the conditions stipulated by European standards. As with this current work, another study showed the presence of *Phreatobacter* and *Hyphomicrobium* in high abundance in drinking water by HTS without confirming its presence by culture method (Greenspan, 2011). This comparison showed that only a minor fraction of bacterial diversity is accessible through classical monitoring techniques such as HPC. Indeed, while HPC represents a useful and affordable way to monitor bacterial communities, especially in a continuous manner, the low cultivability fraction clearly highlights its poor sensitivity.

Overall, the present study provides arguments highlighting the power of using HTS for describing and following the drinking water microbiome. Such implementation has now become inexpensive, and is providing a level of detail that is likely to ensure improved water quality and security. Similar to the human microbiome, drinking water microbiome can be viewed as a complex microbial community whose equilibrium is fragile. Changes induced by specific events, e.g. flooding, treatments, or modification of process can result in perturbations (dysbiosis) of this microbiome. Current monitoring approaches are not sensitive enough to detect such modifications. Implementing HTS in a routine monitoring of drinking water microbiome allow to i) identify the "healthy" and steady state of the microbiome, and ii) detect perturbations events linked to external (e.g. climate change) and internal (e.g. treatment) changes. In this way, HTS-based monitoring provides a suited tool to help managing appropriate water treatments and network maintenances, in response to various changes.

## 5. Conclusion

- We designed a sampling campaign with large spatial and temporal scales to characterize the bacterial communities in Paris DWDSs.

- Spatial distribution showed a clear homogeneity of communities between and within DWDSs.
- Significant, but moderate, shifts in bacterial community composition were observed according to temporality.
- Variation in relative abundance of opportunistic pathogen and faecal indicators followed climatic event.
- The use of unchanged processing in drinking water treatment plants, and identical distribution systems for years, permitted a quasi-stabilization of bacterial populations between the four DWDSs.
- Microbial monitoring using HTS appeared as a pertinent and useful tool, detecting fluctuations of bacterial populations and specific taxa with high sensitivity.

#### Declarations of interest

None.

#### Funding

YP is funded by Eau de Paris. This work was funded by Eau de Paris, the 2015–2020 State-Region Planning Contracts (CPER), European Regional Development Fund (FEDER), and intramural funds from the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Poitiers.

#### Availability of data and materials

The sequence data sets generated from the drinking water samples were deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) under the project of PRJEB24989.

#### Conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

#### Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

#### CRediT authorship contribution statement

**Yoann Perrin:** Writing – original draft. **Didier Bouchon:** Formal analysis. **Vincent Delafont:** Formal analysis. **Laurent Moulin:** Formal analysis. **Yann Hécharde:** Formal analysis.

#### Acknowledgments

We acknowledge the sampling management department of Eau de Paris for their help in the providing all the water samples.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.013>.

#### References

- Allion, A., Lassiab, S., Peguet, L., Boillot, P., Jacques, S., Peultier, J., Bonnet, M.-C., 2011. A long term study on biofilm development in drinking water distribution system: comparison of stainless steel grades with commonly used materials. *Rev. Metall.* 108, 259–268. <https://doi.org/10.1051/metal/2011063>.
- Anderson, K.L., Whitlock, J.E., Harwood, V.J., 2005. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3041–3048. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3041-3048.2005>.
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070>.
- Ashbolt, N.J., 2015a. Environmental (saprozoic) pathogens of engineered water systems: understanding their ecology for risk assessment and management. *Pathog. Basel Switz.* 4, 390–405. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020390>.
- Ashbolt, N.J., 2015b. Microbial contamination of drinking water and human health from community water systems. *Curr. Environ. Health Rep.* 2, 95–106. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0037-5>.
- Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55, 541–555.
- Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Knight, R., 2010a. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 266–267. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp636>.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.L., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010b. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (Suppl. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>.
- Carini, P., Marsden, P.J., Leff, J.W., Morgan, E.E., Strickland, M.S., Fierer, N., 2016. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nat. Microbiol.* 2, 16242. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.242>.
- Davis, N., Proctor, D., Holmes, S., Relman, D., Callahan, B., 2017. Simple Statistical Identification and Removal of Contaminant Sequences in Marker-gene and Metagenomics Data.
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>.
- Finney, L.A., O'Halloran, T.V., 2003. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 300, 931–936. <https://doi.org/10.1126/science.1085049>.
- Frankland, P., Frankland, G.C.T., 1894. *Micro-organisms in water: their significance, identification and removal, together with an account of the bacteriological methods employed in their investigation, specially designed for the use of those connected with the sanitary aspects of water-supply.* London: Longmans, Green 1858-.
- Gomez-Alvarez, V., Humrighouse, B.W., Revetta, R.P., Santo Domingo, J.W., 2015. Bacterial composition in a metropolitan drinking water distribution system utilizing different source waters. *J. Water Health* 13, 140–151. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.057>.
- Gomez-Smith, C.K., LaPara, T.M., Hozalski, R.M., 2015. Sulfate reducing bacteria and mycobacteria dominate the biofilm communities in a chloraminated drinking water distribution system. *Environ. Sci. Technol.* 49, 8432–8440. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00555>.
- Goodrich, J.K., Di Rienzi, S.C., Poole, A.C., Koren, O., Walters, W.A., Caporaso, J.G., Knight, R., Ley, R.E., 2014. Conducting a microbiome study. *Cell* 158, 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.037>.
- Greenspan, A., 2011. Evaluation of the Heterotrophic Plate Count Test for Drinking Water Safety: Comparing Culture-based Vs. Molecular Methods for Identifying Bacteria.
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F., 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5, 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>.
- Hwang, C., Ling, F., Andersen, G.L., LeChevallier, M.W., Liu, W.-T., 2012. Microbial community dynamics of an urban drinking water distribution system subjected to phases of chloramination and chlorination treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7856–7865. <https://doi.org/10.1128/AEM.01892-12>.
- Ji, P., Parks, J., Edwards, M.A., Pruden, A., 2015. Impact of water chemistry, pipe material and stagnation on the building plumbing microbiome. *PLoS One* 10, e0141087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141087>.
- Lahti, L., Shetty, S., Blake, T., Salojärvi, J., 2017. Microbiome R package. *Tools Microbiome Anal. R.* <http://microbiome.github.io>.
- Lautenschlager, K., Boon, N., Wang, Y., Egli, T., Hammes, F., 2010. Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. *Water Res.* 44, 4868–4877. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.032>.
- Li, R., Tun, H.M., Jahan, M., Zhang, Z., Kumar, A., Fernando, D., Farenhorst, A.,

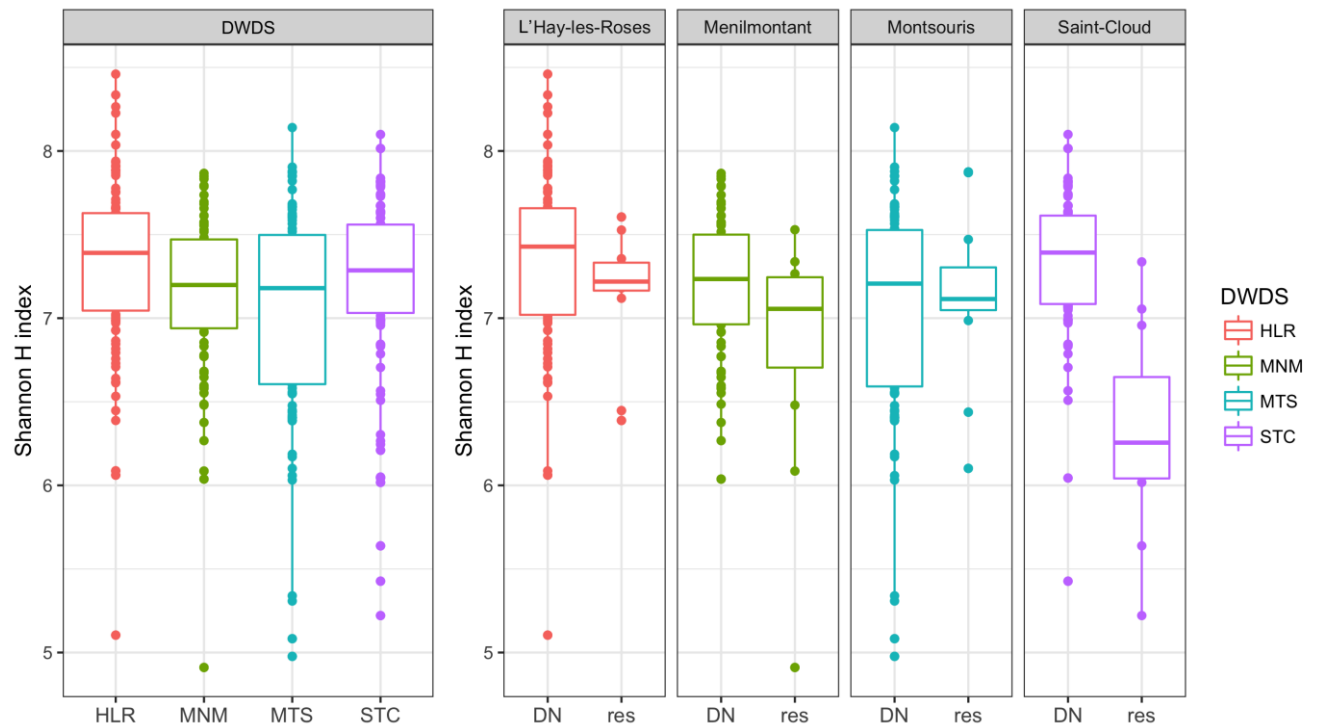


- Khafipour, E., 2017. Comparison of DNA-, PMA-, and RNA-based 16S rRNA Illumina sequencing for detection of live bacteria in water. *Sci. Rep.* 7, 5752. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02516-3>.
- Lin, W., Yu, Z., Zhang, H., Thompson, I.P., 2014. Diversity and dynamics of microbial communities at each step of treatment plant for potable water generation. *Water Res.* 52, 218–230. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.071>.
- Ling, F., Whitaker, R., LeChevallier, M.W., Liu, W.-T., 2018. Drinking water microbiome assembly induced by water stagnation. *ISME J.* 12, 1520–1531. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0101-5>.
- Liu, G., Verberk, J.Q.J.C., Van Dijk, J.C., 2013. Bacteriology of drinking water distribution systems: an integral and multidimensional review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9265–9276. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5217-y>.
- Liu, G., Zhang, Y., van der Mark, E., Magic-Knezev, A., Pinto, A., van den Bogert, B., Liu, W., van der Meer, W., Medema, G., 2018. Assessing the origin of bacteria in tap water and distribution system in an unchlorinated drinking water system by SourceTracker using microbial community fingerprints. *Water Res.* 138, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.043>.
- Lu, J., Struewing, L., Yelton, S., Ashbolt, N., 2015. Molecular survey of occurrence and quantity of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in municipal drinking water storage tank sediments. *J. Appl. Microbiol.* 119, 278–288. <https://doi.org/10.1111/jam.12831>.
- Mathieu, L., Bertrand, I., Abe, Y., Angel, E., Block, J.C., Skali-Lami, S., Francius, G., 2014. Drinking water biofilm cohesiveness changes under chlorination or hydrodynamic stress. *Water Res.* 55, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.054>.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- Murshed, M.F., Aslam, Z., Lewis, R., Chow, C., Wang, D., Drikas, M., van Leeuwen, J., 2014. Changes in the quality of river water before, during and after a major flood event associated with a La Niña cycle and treatment for drinking purposes. *J. Environ. Sci.* 26, 1985–1993. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.08.001>.
- Nawrocki, J., Raczek-Stanislawiak, U., Swietlik, J., Olejnik, A., Sroka, M.J., 2010. Corrosion in a distribution system: steady water and its composition. *Water Res.* 44, 1863–1872. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.020>.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., 2017. *Vegan: Community Ecology Package*.
- Paulson, J.N., Stine, O.C., Bravo, H.C., Pop, M., 2013. Robust methods for differential abundance analysis in marker gene surveys. *Nat. Methods* 10, 1200–1202. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2658>.
- Pepper, I.L., Rusin, P., Quintanar, D.R., Haney, C., Josephson, K.L., Gerba, C.P., 2004. Tracking the concentration of heterotrophic plate count bacteria from the source to the consumer's tap. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.021>.
- Pinto, Schroeder, J., Lunn, M., Sloan, W., Raskin, L., 2014. Spatial-temporal survey and occupancy-abundance modeling to predict bacterial community dynamics in the drinking water microbiome. *mBio* 5, e01135-01114. <https://doi.org/10.1128/mBio.01135-14>.
- Pinto, Xi, C., Raskin, L., 2012. Bacterial community structure in the drinking water microbiome is governed by filtration processes. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8851–8859. <https://doi.org/10.1021/es302042t>.
- Potgieter, S., Pinto, A., Sigudu, M., du Preez, H., Ncube, E., Venter, S., 2018. Long-term spatial and temporal microbial community dynamics in a large-scale drinking water distribution system with multiple disinfectant regimes. *Water Res.* 139, 406–419. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.077>.
- Prest, E.L., Hammes, F., van Loosdrecht, M.C.M., Vrouwenvelder, J.S., 2016a. Biological stability of drinking water: controlling factors, methods, and challenges. *Front. Microbiol.* 7, 45. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00045>.
- Prest, E.L., Weissbrodt, D.G., Hammes, F., van Loosdrecht, M.C.M., Vrouwenvelder, J.S., 2016b. Long-term bacterial dynamics in a full-scale drinking water distribution system. *PLoS One* 11, e0164445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164445>.
- Proctor, C.R., Hammes, F., 2015. Drinking water microbiology—from measurement to management. *Curr. Opin. Biotechnol., Environ. Biotechnol. Energy Biotechnol.* 33, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.014>.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- R Core Team, 2017. *R: a Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Ren, H., Wang, W., Liu, Y., Liu, S., Lou, L., Cheng, D., He, X., Zhou, X., Qiu, S., Fu, L., Liu, J., Hu, B., 2015. Pyrosequencing analysis of bacterial communities in biofilms from different pipe materials in a city drinking water distribution system of East China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10713–10724. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6885-6>.
- Roeselers, G., Coolen, J., van der Wielen, P.W.J.J., Jaspers, M.C., Atsma, A., de Graaf, B., Schuren, F., 2015. Microbial biogeography of drinking water: patterns in phylogenetic diversity across space and time. *Environ. Microbiol.* 17, 2505–2514. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12739>.
- Santos, Q.M.B. los, Schroeder, J.L., Sevillano-Rivera, M.C., Sungthong, R., Ijaz, U.Z., Sloan, W.T., Pinto, A.J., 2016. Emerging investigators series: microbial communities in full-scale drinking water distribution systems – a meta-analysis. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2, 631–644. <https://doi.org/10.1039/C6EW00030D>.
- Saxena, G., Bharagava, R.N., Kaithwas, G., Raj, A., 2015. Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. *J. Water Health* 13, 319–339. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.275>.
- Shaw, J.L.A., Monis, P., Weyrich, L.S., Sawade, E., Drikas, M., Cooper, A.J., 2015. Using amplicon sequencing to characterize and monitor bacterial diversity in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6463–6473. <https://doi.org/10.1128/AEM.01297-15>.
- Smeets, P.W.M.H., Medema, G.J., Dijk, J.C. van, 2009. The Dutch secret: how to provide safe drinking water without chlorine in The Netherlands. *Drink. Water Eng. Sci.* 2, 1–14. <https://doi.org/10.5194/dwes-2-1-2009>.
- Staley, J.T., Konopka, A., 1985. Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 321–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.39.100185.001541>.
- Stanish, L.F., Hull, N.M., Robertson, C.E., Harris, J.K., Stevens, M.J., Spear, J.R., Pace, N.R., 2016. Factors influencing bacterial diversity and community composition in municipal drinking waters in the Ohio River basin, USA. *PLoS One* 11, e0157966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157966>.
- Tan, B., Ng, C., Nshimiyimana, J.P., Loh, L.L., Gin, K.Y.-H., Thompson, J.R., 2015. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Front. Microbiol.* 6, 1027. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01027>.
- Tóth, E.M., Vengring, A., Homonnay, Z.G., Kéki, Z., Spröer, C., Borsodi, A.K., Márialiget, K., Schumann, P., 2014. *Phreatobacter oligotrophus* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from ultrapure water of the water purification system of a power plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 839–845. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.053843-0>.
- Weiss, S., Xu, Z.Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Lozupone, C., Zaneveld, J.R., Vázquez-Baeza, Y., Birmingham, A., Hyde, E.R., Knight, R., 2017. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* 5, 27. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>.
- World Health Organization, 2017. *Guidelines for Drinking-water Quality*. World Health Organization.
- Zhang, Y., Oh, S., Liu, W.-T., 2017. Impact of drinking water treatment and distribution on the microbiome continuum: an ecological disturbance's perspective. *Environ. Microbiol.* 19, 3163–3174. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13800>.

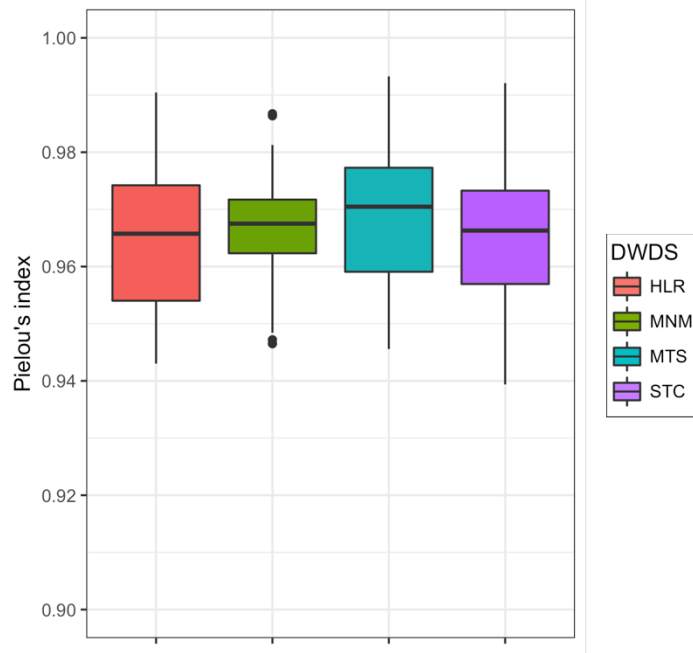


## Appendix A

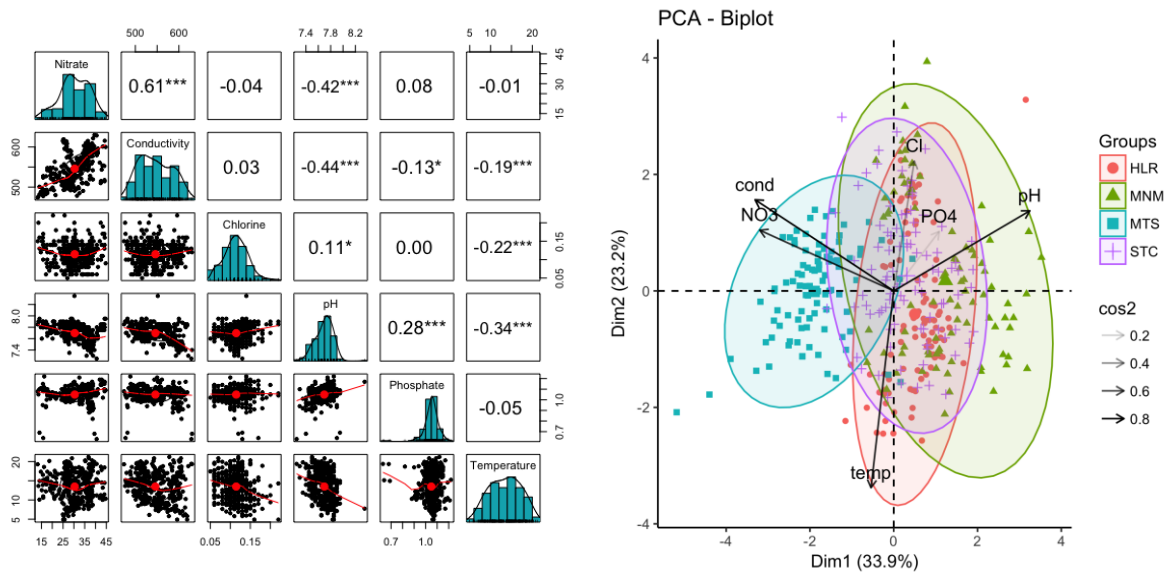
### Supplementary figures and tables



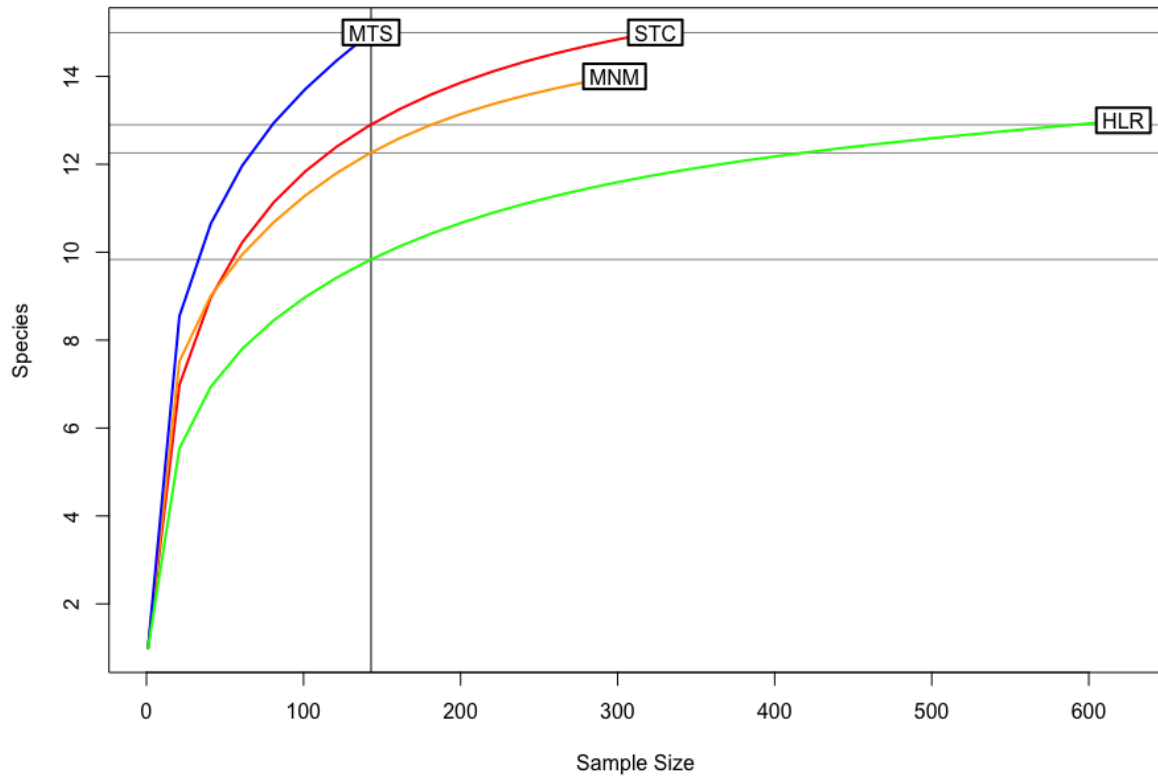
**Figure 1:** Alpha-diversity of microbial communities according to the spatial scale. Diversity is based on Shannon H index of the microbial communities according to (a) the origin of water (b) and their location in the studied DWDS.



**Figure A2:** Boxplot of Pielou's evenness index for the four DWDS.



**Figure A3:** Correlation between the physicochemical parameters of water samples. Comparisons were observed through (a) a scatter plot matrices based on pairwise Pearson's correlations coefficients and (b) a Principal Component Analyse. temp. temperature; cond. electrical conductivity; Cl. total chlorine concentration; PO4. Phosphate; NO3. nitrate. Significance codes of P-value "\*\*\*", "\*\*", "\*" and " " indicates respectively  $P < 0.001$ ,  $0.01$ ,  $0.05$  and  $P > 0.05$  respectively.



**Figure A4:** Rarefaction curves of isolated and identified colonies on heterotrophic plate count. Colonies were isolated from the four DWDS L'Haÿ-les-Roses (HLR), Ménilmontant (MNM), Montsouris (MTS), Saint-Cloud (STC).

**Table A1:** Information from each sampling point with their membership DWDS, the point type, their GPS coordinates in decimal degrees and the number of monthly withdrawals made on each point.

Sample	DWDS	Point type	Latitude	Longitude	Samples number
21	L'Haÿ-les-Roses	Drinking network	48.829251	2.308606	12
22			48.830585	2.292726	12
23			48.847795	2.264335	12
24			48.829144	2.365419	12
25			48.844498	2.347546	12
26			48.843237	2.327842	12
27			48.830336	2.340993	12
HLR		Reservoir	48.821042	2.334227	12
8	Menilmontant	Drinking network	48.848797	2.403232	12
9			48.850537	2.390884	11
10			48.896428	2.377085	12
11			48.87614	2.379216	12
12			48.883357	2.361507	12
13			48.871227	2.370742	12
MNM		Reservoir	48.871014	2.405817	12
14	Montsouris	Drinking network	48.841582	2.291391	11
15			48.849328	2.366120	12
16			48.866748	2.340124	12
17			48.839679	2.353181	12
18			48.854098	2.305649	12
19			48.867347	2.314646	12
20			48.865005	2.361264	12
MTS		Reservoir	48.824381	2.331132	12
1	Saint-Cloud	Drinking network	48.883636	2.34626	12
2			48.892115	2.333706	12
3			48.895549	2.330764	11
4			48.885218	2.288117	12
5			48.863644	2.284071	12
6			48.881174	2.328056	12
7			48.881814	2.315600	11
STC		Reservoir	48.852581	2.209565	12

**Table A2:** Summary of PERMANOVA tests results. The explanation of variability is indicated according to DWDS, seasonality, temperature and location parameters for quantitative (Bray-Curtis and weighted UniFrac) or qualitative (Jaccard and unweighted UniFrac) compositional dissimilarities metrics. All P values were equal to 0.001.

		Quantitative distance metrics		Qualitative distance metrics	
		Weighted UniFrac R <sup>2</sup>	Bray-Curtis R <sup>2</sup>	Unweighted UniFrac R <sup>2</sup>	Jaccard R <sup>2</sup>
<b>Temporality</b>	All DWDS	0.13	0.08	0.07	0.06
	HLR	0.21	0.17	0.16	0.14
	MNM	0.22	0.21	0.19	0.17
	MTS	0.22	0.18	0.16	0.15
	STC	0.23	0.18	0.17	0.15
<b>Temperature</b>	All DWDS	0.05	0.03	0.02	0.02
	HLR	0.06	0.04	0.03	0.02
	MNM	0.05	0.04	0.03	0.02
	MTS	0.04	0.03	0.02	0.02
	STC	0.06	0.04	0.03	0.02
<b>Location</b>	All DWDS	0.05	0.03	0.02	0.02
	HLR	0.08	0.06	0.04	0.03
	MNM	0.06	0.04	0.03	0.02
	MTS	0.08	0.04	0.03	0.02
	STC	0.05	0.05	0.03	0.03
<b>DWDS</b>		0.12	0.09	0.05	0.04



**Table A3:** Relative abundances of the bacterial genera identified present in the four DWDS. Relative abundances are expressed in % of total sequence count for each DWDS. Taxa representing less than 0.01% are grouped as “Other”. Values less than 0.01% for representing taxa are not showed. I.S. : Incertae Sedis. Unk. : Unknown.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	HLR	MN M	MTS	STC
Acidobacteria	Blastocatellia	Blastocatellales	Blastocatellaceae	11-24	0.01		0.03	
		Blastocatellales	Blastocatellaceae	Blastocatella	0.02	0.02	0.02	0.01
		Blastocatellales	Blastocatellaceae	Elev-16S-573	0.03		0.02	
		Blastocatellales	Blastocatellaceae	unk. Genus	0.04		0.01	
	Blastocatellales	Blastocatellaceae	uncultured	0.06		0.02		
	Solibacteres	Solibacterales	Solibacteraceae	Bryobacter	0.02	0.01	0.01	
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	0.02	0.02	0.03	0.01
		Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	0.06	0.02	0.07	0.04
		Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	unk. Genus	0.03	0.01	0.04	0.02
		Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	0.03	0.02	0.08	0.05
		Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium 1	0.37	0.23	0.42	0.64
		Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Lawsonella	0.11	0.04	0.13	0.07
		Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	unk. Genus			0.01	0.02
		Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	5.84	2.46	4.16	3.54
		Corynebacteriales	Nocardiaceae	Gordonia	0.07	0.02	0.07	0.02
		Corynebacteriales	Nocardiaceae	Nocardia	0.21	0.04	0.13	0.13
		Corynebacteriales	Nocardiaceae	Rhodococcus	0.50	0.07	0.50	0.24
		Corynebacteriales	Nocardiaceae	Williamsia	0.05	0.01	0.07	0.07
		Micrococcales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	0.10	0.05	0.15	0.05
		Micrococcales	Dermabacteraceae	Brachybacterium			0.01	0.03
		Micrococcales	Intrasporangiaceae	unk. Genus	0.01		0.03	
		Micrococcales	Microbacteriaceae	unk. Genus	0.02	0.01	0.04	0.01
		Micrococcales	Micrococcaceae	Enteractinococcus	0.04			
		Micrococcales	Micrococcaceae	Kocuria	0.08	0.08	0.11	0.15
		Micrococcales	Micrococcaceae	Micrococcus	0.04	0.02	0.04	0.04
		Micrococcales	Micrococcaceae	unk. Genus	0.05	0.05	0.02	0.03
		Micrococcales	Micrococcaceae	Rothia	0.04	0.01	0.06	0.06
		Micrococcales	unk. Family	unk. Family	0.02		0.01	
		Propionibacteriales	Nocardioidaceae	Nocardioides	0.02	0.02	0.02	0.02
Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium	0.09	0.05	0.13	0.09		
Streptomycetales	Streptomycetaceae	E1B-B3-114	0.04			0.01		
	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	Atopobium	0.14	0.04	0.14	0.09
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas	0.02		0.05	
		Bacteroidales	Prevotellaceae	Alloprevotella	0.03	0.01	0.02	
	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	uncultured	0.03	0.04	0.02	
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	0.04	0.05	0.02	0.03
		Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Empedobacter	0.06	0.03	0.05	0.07
		Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	0.02	0.01	0.14	0.04
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	unk. Genus	0.07	0.01		0.01
Sphingobacteriales		Chitinophagaceae	Sediminibacterium	0.13	0.03		0.02	
		Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	uncultured	0.05			
Chloroflexi	KD4-96	uncultured	uncultured	uncultured	0.06			
Cyanobacteria	Chloroplast	Ambiguous_taxa	Ambiguous_taxa	Ambiguous_taxa	0.01	0.02	0.08	0.02
		unk. Order	unk. Order	unk. Order	0.07	0.10	0.10	0.08
		Pseudotsuga menziesii	Pseudotsuga menziesii	Pseudotsuga		0.02	0.02	0.01
		Solanum melongena	Solanum melongena	Solanum	0.03	0.01	0.03	0.02
	Melainabacteria	uncultured	uncultured	uncultured	0.01	0.09	0.03	0.01
		Obscuribacteriales	Ambiguous_taxa	Ambiguous_taxa	0.05	0.03	0.09	0.02
		Obscuribacteriales	unk. Family	unk. Family	0.03	0.04	0.09	0.01
		Obscuribacteriales	uncultured	uncultured	1.03	0.84	1.31	0.37
	Vampirovibrionales	uncultured	uncultured	0.01		0.03		
Deinococcus-Thermus	Deinococci	Deinococcales	Deinococcaceae	Deinococcus			0.02	0.01
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Alicyclobacillaceae	Effusibacillus		0.17		0.02
		Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0.04	0.02	0.11	0.02
		Bacillales	Bacillaceae	Fictibacillus	0.03	0.03	0.04	0.01
		Bacillales	Bacillaceae	unk. Genus	0.02	0.02	0.05	0.01
		Bacillales	Family XI	Gemella	0.06	0.02	0.05	0.03
		Bacillales	unk. Family	unk. Family	0.02	0.03	0.05	0.01
		Bacillales	Paenibacillaceae	Brevibacillus	0.04	0.05	0.03	0.01
		Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus		0.01	0.02	
		Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	0.48	0.32	0.61	0.56
		Lactobacillales	Aerococcaceae	Aerococcus	0.05	0.03	0.02	0.02

		Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Dolosigranulum	0.01		0.02	0.02
		Lactobacillales	Carnobacteriaceae	unk. Genus	0.01	0.01	0.03	0.01
		Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus		0.02	0.02	0.01
		Lactobacillales	unk. Family	unk. Family	0.02	0.02	0.05	0.02
		Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	0.20	0.09	0.18	0.11
		unk. Order	unk. Order	unk. Order	0.03	0.01	0.03	
		Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium		0.11		
		Clostridiales	Family XI	Anaerococcus	0.41	0.15	0.54	0.46
		Clostridiales	Family XI	Ezakiella	0.10	0.06	0.15	0.08
		Clostridiales	Family XI	Finegoldia	0.18	0.17	0.28	0.22
		Clostridiales	Family XI	Peptoniphilus	0.20	0.10	0.58	0.16
		Clostridiales	Family XVIII	Caldinitratiruptor		0.04		
		Clostridiales	Heliobacteriaceae	Hydrogenispora		0.03	0.06	0.01
		Clostridiales	Lachnospiraceae	eubacterium	0.01	0.01		0.02
		Clostridiales	Lachnospiraceae	Anaerostipes	0.03	0.04	0.01	
		Clostridiales	Lachnospiraceae	Blautia		0.01	0.02	0.05
		Clostridiales	Lachnospiraceae	Catonella			0.02	0.02
		Clostridiales	Lachnospiraceae	Fusicatenibacter	0.03			0.02
		Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnoanaerobaculum	0.05			
		Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnoclostridium	0.03		0.02	0.09
		Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospira	0.02	0.03		
		Clostridiales	Lachnospiraceae	unk. Genus	0.09	0.09	0.07	0.19
		Clostridiales	Lachnospiraceae	Roseburia		0.06	0.02	0.03
		Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptoclostridium	0.01		0.02	0.01
		Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus	0.04	0.01	0.06	0.02
		Clostridiales	Ruminococcaceae	Faecalibacterium	0.02	0.01	0.03	0.01
		Halanaerobiales	ODP1230B8.23	uncultured	0.03	0.01	0.02	0.03
	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	Dialister	0.01	0.01	0.01	
		Selenomonadales	Veillonellaceae	Veillonella	0.07	0.03	0.03	0.02
Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	0.17	0.03	0.12	0.06
		Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	Leptotrichia	0.08		0.02	0.03
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	uncultured	0.03		0.01	
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	0.06		0.02	0.01
		4-Org1-14	Ambiguous_taxa	Ambiguous_taxa	0.05	0.03	0.13	0.06
		Alphaproteobacteria I.S.	uncultured	uncultured	0.05			0.03
		Alphaproteobacteria I.S.	Unknown Family	uncultured	0.03		0.01	0.01
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	0.42	0.33	0.34	0.30
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	Caulobacter	0.11	0.05	0.09	0.06
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	unk. Genus	0.06	0.04	0.05	0.03
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	Phenyllobacterium	0.08	0.05	0.05	0.02
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	uncultured	0.03	0.03	0.05	0.03
		Caulobacterales	Hyphomonadaceae	unk. Genus	0.43	0.45	0.23	0.37
		Caulobacterales	Hyphomonadaceae	uncultured	0.91	0.99	0.64	0.71
		Caulobacterales	Hyphomonadaceae	Woodsholea	0.20	0.27	0.09	0.17
		Caulobacterales	unk. Family	unk. Family	0.05	0.10	0.01	0.05
		E6aD10	unk. Family	unk. Family	0.03	0.01	0.03	0.05
		unk. Order	unk. Order	unk. Order	1.14	1.17	0.96	1.24
		Parvularculales	Parvularculaceae	Amphiplicatus	0.22	0.10	0.33	0.14
		Rhizobiales	alphan cluster	uncultured	0.02			0.02
		Rhizobiales	Beijerinckiaceae	unk. Genus	0.03	0.04	0.02	0.03
		Rhizobiales	Beijerinckiaceae	uncultured	0.01	0.03	0.01	0.02
		Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Afipia	0.28	0.27	0.20	0.18
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Bradyrhizobiaceae	Ambiguous_taxa	0.02	0.01		0.01
		Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bosea	0.35	0.11	0.38	0.32
		Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	0.40	0.40	0.39	0.30
		Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Nitrobacter	0.07	0.05	0.04	0.03
		Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	unk. Genus	0.17	0.18	0.10	0.12
		Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	uncultured	0.06	0.03	0.04	0.03
		Rhizobiales	Brucellaceae	Ochrobactrum	0.06	0.04	0.02	0.05
		Rhizobiales	FukuN57	uncultured	0.01	0.09	0.01	0.04
		Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Blastochloris	0.18	0.54	0.08	0.23
		Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Devosia	0.04	0.07	0.06	0.05
		Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Filomicrobium	0.22	0.49	0.30	0.37
		Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium	30.73	31.30	34.10	33.78
		Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	unk. Genus	0.95	1.42	1.21	1.14
		Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Pedomicrobium	0.10	0.11	0.18	0.11
		Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	uncultured	0.07	0.07	0.05	0.06
		Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacterium	0.44	0.56	0.68	0.72
		Rhizobiales	Methylocystaceae	Ambiguous_taxa	0.04		0.02	
		Rhizobiales	Methylocystaceae	Hartmannibacter		0.08		0.03
		Rhizobiales	Methylocystaceae	unk. Genus	0.01		0.02	0.01
		Rhizobiales	MING7	unk. Genus	0.05	0.05	0.06	0.06

	Rhizobiales	MNG7	uncultured	0.53	0.85	0.38	0.56
	Rhizobiales	unk. Family	unk. Family	1.81	3.28	1.42	2.37
	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	Mesorhizobium	0.14	0.03	0.10	0.08
	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	unk. Genus	0.25	0.12	0.12	0.17
	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	uncultured	0.71	0.06	0.62	0.49
	Rhizobiales	Rhizobiaceae	unk. Genus	0.05	0.07	0.02	0.04
	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	0.50	0.51	0.25	0.34
	Rhizobiales	Rhizobiales I.S.	Agaricola	0.01	0.03		0.01
	Rhizobiales	Rhizobiales I.S.	Nordella	0.04	0.04	0.03	0.02
	Rhizobiales	Rhizobiales I.S.	unk. Genus	0.02	0.11	0.02	0.05
	Rhizobiales	Rhizobiales I.S.	Phreatobacter	4.56	23.71	4.54	10.32
	Rhizobiales	Rhodobiaceae	unk. Genus	0.05	0.03	0.04	0.03
	Rhizobiales	Rhodobiaceae	uncultured	0.30	0.10	0.24	0.25
	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Variibacter	0.05	0.01	0.04	0.03
Rhodobacterales	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Amaricoccus	0.03		0.01	
Rhodobacterales	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Ambiguous_taxa	0.02		0.02	
Rhodobacterales	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Falsirhodobacter	0.07	0.01	0.08	0.04
Rhodobacterales	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	unk. Genus	0.46	0.41	0.44	0.38
Rhodobacterales	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Pannonibacter	0.01	0.05	0.03	0.05
Rhodobacterales	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	0.47	0.18	0.50	0.57
Rhodobacterales	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Rhodobacter	0.20	0.08	0.20	0.08
Rhodobacterales	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Rhodovulum	0.01	0.01	0.02	
Rhodobacterales	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Rubellimicrobium	0.04		0.01	0.02
Rhodobacterales	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	uncultured	0.21	0.10	0.14	0.18
Rhodospirillales	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Roseomonas	0.05	0.02	0.04	0.03
Rhodospirillales	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	uncultured	0.02			0.01
Rhodospirillales	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Thalassobaculum	0.02	0.01		0.01
Rhodospirillales	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	uncultured	0.21	0.05	0.11	0.07
Rhodospirillales	Rhodospirillales I.S.		Reyranella	0.48	0.29	0.20	0.14
Rickettsiales	Rickettsiales	unk. Family	unk. Family	0.02	0.02		
Rickettsiales	Rickettsiales	uncultured	uncultured	0.04	0.07		0.01
Rickettsiales	Rickettsiales	Holosporaceae	uncultured	0.05	0.08	0.06	0.03
Rickettsiales	Rickettsiales	LWSR-14	uncultured	0.01	0.15		0.03
Rickettsiales	Rickettsiales	Mitochondria	Ambiguous_taxa		0.04	0.01	
Rickettsiales	Rickettsiales	Mitochondria	unk. Genus		0.05		
Rickettsiales	Rickettsiales	Rickettsiaceae	unk. Genus	0.02		0.01	
Rickettsiales	Rickettsiales	Rickettsiaceae	Rickettsia	0.02		0.03	
Rickettsiales	Rickettsiales	Rickettsiaceae	uncultured	0.04	0.02	0.01	
Rickettsiales	Rickettsiales I.S.		Odysella	0.03	0.02		0.01
Rickettsiales	Rickettsiales I.S.		uncultured			0.05	
Rickettsiales	Rickettsiales	SM2D12	unk. Genus	0.09	0.11	0.04	0.06
Rickettsiales	Rickettsiales	SM2D12	uncultured	1.42	1.84	0.97	1.08
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Ambiguous_taxa	Ambiguous_taxa	0.03		0.01	0.02
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Ambiguous_taxa	unk. Genus	0.01		0.01	
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Altererythrobacter	0.64	0.31	0.33	0.48
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Erythrobacter	0.25	0.07	0.29	0.25
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	unk. Genus	1.30	0.45	0.73	1.07
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Porphyrobacter	0.43	0.16	0.19	0.40
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	uncultured	0.02		0.02	0.01
Sphingomonadales	Sphingomonadales	unk. Family	unk. Family	0.68	0.34	0.48	0.72
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Ambiguous_taxa	0.04	0.01	0.02	0.03
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Blastomonas	0.19	0.08	0.10	0.14
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium	0.63	0.19	0.33	0.34
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	unk. Genus	4.52	2.07	4.55	4.33
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Rhizorhapis	0.09	0.03	0.13	0.10
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium	0.82	0.97	0.49	0.45
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	3.56	2.00	2.80	4.00
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingopyxis	4.41	1.73	2.46	2.21
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingorhabdus	1.82	0.68	3.00	2.39
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingosinicella	0.01		0.02	
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	uncultured	0.18	0.04	0.10	0.08
Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Zymomonas	0.02		0.03	0.03
	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Achromobacter	0.08	0.03	0.06	0.08
	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Chitinimonas	0.07			
	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Lautropia	0.02	0.01	0.02	0.02
	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Ralstonia	0.08	0.06	0.11	0.06
	Burkholderiales	Comamonadaceae	Acidovorax	0.68	0.77	1.82	1.46
Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Ambiguous_taxa	0.10	0.13	0.20	0.15
	Burkholderiales	Comamonadaceae	Aquabacterium	0.02		0.03	0.01
	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonas	0.01	0.02	0.02	0.02
	Burkholderiales	Comamonadaceae	Delftia	0.04	0.02	0.03	0.01
	Burkholderiales	Comamonadaceae	unk. Genus	2.03	1.58	4.64	3.43
	Burkholderiales	Comamonadaceae	Polaromonas	0.03	0.03	0.09	0.09
	Burkholderiales	Comamonadaceae	uncultured	0.12	0.09	0.34	0.22

	Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax	0.11	0.12	0.12	0.09
	Burkholderiales	unk. Family	unk. Family	0.20	0.11	0.31	0.18
	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia	0.12	0.10	0.34	0.11
	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	unk. Genus	0.02	0.03	0.05	0.02
	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Undibacterium	0.42	0.12	0.39	0.23
	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	unk. Genus	0.05	0.02	0.02	0.01
	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Sulfuricella	0.12	0.04	0.04	0.03
	Methylophilales	Methylophilaceae	Methylotenera	0.15	0.18	0.03	0.08
	Methylophilales	Methylophilaceae	unk. Genus	0.03	0.05	0.01	0.02
	Methylophilales	Methylophilaceae	uncultured	0.03			
	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	0.09	0.06	0.13	0.08
	Neisseriales	Neisseriaceae	uncultured	0.05	0.04	0.06	0.04
	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Nitrotoga	0.02		0.02	
	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Gallionella	0.12	0.05	0.09	0.08
	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	unk. Genus	0.33	0.10	0.29	0.16
	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Sideroxydans	0.09	0.02	0.03	0.04
	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	uncultured	0.05	0.01	0.02	0.03
	unk. Order	unk. Order	unk. Order	0.13	0.10	0.14	0.11
	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Azoarcus	0.02	0.01	0.02	0.03
	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	unk. Genus	0.02	0.02	0.03	0.01
	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Thauera			0.01	0.02
	TRA3-20	unk. Family	unk. Family	0.07	0.02		0.02
	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	Bdellovibrio	0.08	0.01	0.13	0.07
Deltaproteobacteria	Myxococcales	Haliangiaceae	Haliangium			0.06	
	Oligoflexales	0319-6G20	uncultured	0.03			0.01
	Campylobacteriales	Campylobacteraceae	Campylobacter	0.03	0.03	0.04	0.04
Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Helicobacteraceae	Sulfuricurvum		0.04		
	Acidithiobacillales	KCM-B-112	unk. Genus	0.24	0.22	0.25	0.13
	Acidithiobacillales	KCM-B-112	uncultured	0.01	0.01	0.01	
	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas	0.05	0.01	0.05	0.01
	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas			0.04	0.04
	Cellvibrionales	Cellvibrionaceae	Cellvibrio	0.02			
	Chromatiales	Chromatiaceae	Rheinheimera	0.03	0.01	0.04	0.01
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Ambiguous_taxa			0.02	
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia-Shigella	0.16	0.38	0.47	0.35
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella	0.01		0.02	
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	unk. Genus	0.03	0.03	0.06	0.03
	Legionellales	Coxiellaceae	Coxiella	0.03		0.03	0.03
	Legionellales	Coxiellaceae	uncultured		0.06		
	Legionellales	Legionellaceae	Legionella	0.11	0.44	0.07	0.15
	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	0.04			
	unk. Order	unk. Order	unk. Order	0.11	0.10	0.10	0.08
Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Haemophilus	0.15	0.08	0.11	0.05
	Pasteurellales	Pasteurellaceae	unk. Genus	0.02		0.01	
	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	0.58	0.39	0.69	0.31
	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Alkanindiges	0.04	0.06	0.02	0.01
	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Enhydrobacter	0.21	0.15	0.33	0.18
	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Moraxella	0.03	0.02	0.04	0.03
	Pseudomonadales	Moraxellaceae	unk. Genus	0.05	0.02	0.01	
	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	0.36	0.21	0.22	0.08
	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	1.36	0.66	1.28	1.57
	PYR10d3	unk. Family	unk. Family	0.03		0.02	
	Thiotrichales	Thiotrichaceae	uncultured	0.12	0.03	0.06	0.07
	Xanthomonadales	Nevskiaceae	Nevskia	0.54	0.44	0.16	0.46
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Lysobacter	0.05	0.03		0.01
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	unk. Genus	0.02	0.02	0.02	
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Pseudoxanthomonas	0.04	0.02	0.03	0.01
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	0.05	0.04	0.27	0.03
	unk. Class	unk. Class	unk. Class	0.08	0.06	0.08	0.08
	Proteobacteria I.S.	Unknown Order	Unknown Family	0.04		0.03	0.03
	unk. Class	unk. Class	unk. Class	0.02		0.03	0.01
Saccharibacteria	uncultured	uncultured	uncultured	0.04		0.12	0.03
			Unassigned sequence	4.19	2.86	3.38	3.29
			Other (less than 0.01% of sequence count)	2.07	1.93	2.18	1.68

**Table A4:** Counts of colony-forming units on R2A medium according to their identifications. Colonies without identification are grouped as “ND”.

Genus	DWDS			
	HLR	MNM	MTS	STC
ND	46	41	16	60
<i>Acidovorax</i>		41	5	11
<i>Arthrobacter</i>			1	
<i>Acinetobacter</i>	1	3		
<i>Bacillus</i>		1		
<i>Blastomonas</i>	13		3	39
<i>Brevundimonas</i>		19	1	6
<i>Chryseobacterium</i>				4
<i>Enterococcus</i>	1			
<i>Escherichia</i>				1
<i>Flavobacterium</i>	4		23	10
<i>Massilia</i>			14	
<i>Micrococcus</i>		4	1	
<i>Moraxela</i>		1	1	1
<i>Methylobacterium</i>	3			
<i>Mycobacterium</i>	334	38	29	117
<i>Nocardia</i>	6			
<i>Novosphingobium</i>	39	3		2
<i>Sphingobium</i>	8	17		3
<i>Sphingomonas</i>	37	44	21	19
<i>Sphingopyxis</i>	112	73	15	74
<i>Staphylococcus</i>	3	2	5	5
<i>Pseudomonas</i>	61	4	4	30
<i>Rhodococcus</i>			2	
<i>Variovorax</i>		48	18	2
<b>Total</b>	<b>668</b>	<b>339</b>	<b>159</b>	<b>384</b>

## I.2. Résultats complémentaires

### I.2.1. Échantillons blancs

L'étude présentée ci-dessus s'est intéressée à la diversité bactérienne dans l'ensemble du réseau d'eau potable de la ville de Paris. Les technologies de séquençage sont des techniques indépendantes de la culture qui ont permis de révolutionner notre compréhension des communautés bactériennes, aussi bien dans leur diversité que dans leur dynamique au sein de divers environnements. Bien qu'elles permettent de surpasser les limites de la culture bactérienne, elles comportent tout de même des limites techniques, notamment la présence d'ADN bactérien contaminant lors de l'extraction, la préparation et le séquençage des échantillons (Salter *et al.* 2014). La présence de ces contaminants est un problème qui s'accroît lors de la préparation d'échantillons provenant d'environnement caractérisé par leur faible biomasse bactérienne, tel que l'eau potable. Dans ces cas, l'amplification et le séquençage d'ADN contaminants peut recouvrir les résultats de l'ADN souhaité.

Dans le but d'estimer cette contamination et de valider nos résultats, des échantillons blancs ont été effectués. Ces derniers correspondent à une membrane filtrante (même référence que celles utilisées pour les échantillons) qui n'a pas été mise en contact avec de l'eau, et sur laquelle ont été réalisés les protocoles d'extraction, de préparation et de séquençage de l'ADN. Les données de séquençage ont été traitées comme tout échantillon. Cependant, l'observation des données se fait ici avant l'utilisation du package Decontam qui élimine l'ensemble des OTUs considérées comme contaminants.

Les échantillons blancs présentent 18 taxons majoritaires, correspondant aux taxons ayant une abondance relative supérieure à 1% de l'abondance totale (Tableau 7). Seuls deux taxons sont communs entre les échantillons blancs et les échantillons du réseau d'eau potable, *Sphingomonas* et *Mycobacterium*, et ces derniers présentent des abondances relatives similaires (Test de Student;  $P_{\text{value}} > 0.05$ ). Ces résultats, ainsi que la figure 3 de la publication présentée ci-dessus, permettent de conforter la robustesse de nos analyses de diversité et de dynamiques des communautés bactériennes du réseau d'eau potable. Les OTUs provenant d'ADN contaminants ont donc été éliminées avec le package R Decontam pour éviter tout biais dans nos analyses.

**Tableau 7 : Comparaison des abondances relatives des taxons majoritaires (>1% de l'abondance relative totale) entre les unités de distribution et les échantillons blancs.**

<b>Taxons majoritaires</b>	<b>HLR</b>	<b>MNM</b>	<b>MTS</b>	<b>STC</b>	<b>Blanc</b>
Unassigned	4.14	2.82	3.33	3.26	5.96
Other	31.47	25.76	29.39	24.05	20.27
Obscuribacterales_ND	1.03	0	1.31	0.00	0
<i>Mycobacterium</i>	5.84	2.46	4.16	3.54	4.34
<i>Pseudomonas</i>	1.36	0	1.28	1.57	0
Comamonadaceae_ND	2.03	1.58	4.64	3.43	0
Acidovorax	0	0	1.82	1.46	0
SM2D12	1.42	1.84	0	1.08	0
Erythrobacteraceae_ND	1.30	0	0	1.07	0
Sphingomonas	3.56	2.00	2.80	4.00	1.15
Sphingopyxis	4.41	1.73	2.46	2.21	0
Sphingorhabdus	1.82	0	3.00	2.39	0
Sphingomonadaceae_ND	4.52	2.07	4.55	4.33	0
Rhizobiales_ND	1.81	3.28	1.42	2.37	0
Phreatobacter	4.56	23.71	4.54	10.32	0
Hyphomicrobiaceae_ND	0	1	1.21	1.14	0
Hyphomicrobium	30.73	31.34	34.10	33.78	0
Corynebacterium	0	0	0	0	1.34
Corynebacterium 1	0	0	0	0	20.48
Lawsonella	0	0	0	0	5.34
Brevibacterium	0	0	0	0	4.07
Micrococcus	0	0	0	0	1.29
Rothia	0	0	0	0	2.64
Propionibacterium	0	0	0	0	8.89
Staphylococcus	0	0	0	0	2.29
Anaerococcus	0	0	0	0	1.59
Ezakiella	0	0	0	0	1.88
Peptoniphilus	0	0	0	0	3.77
Methylobacterium	0	0	0	0	3.96
Rhizobium	0	0	0	0	2.16
Paracoccus	0	0	0	0	4.45
Rubellimicrobium	0	0	0	0	2.39
Enhydrobacter	0	0	0	0	1.74

### ***1.2.2. Taux de couverture des amorces***

L'analyse du microbiome de l'eau potable a révélé une forte prédominance de l'ordre des Rhizobiales dans le réseau de distribution notamment des genres *Hyphomicrobium* et *Phreatobacter*. En effet, ces deux genres bactériens représentent une part importante de l'abondance relative des populations bactériennes, avec 35,3 % de l'abondance relative dans l'unité de distribution Saint-Cloud et jusqu'à 55% dans l'unité de distribution Ménilmontant. Du fait de ces résultats surprenants, nous nous sommes intéressés au couple d'amorce utilisé (U341F/Bakt\_805R) afin de voir s'il présentait un biais de couverture de la région cible du gène codant pour l'ARN 16S (régions variables 3 et 4), ce qui induirait une amplification préférentielle de ces deux genres bactériens. Il n'a pas été possible de comparer nos résultats à une autre étude utilisant le même couple d'amorce puisque celles-ci sont issues de deux publications différentes.

Dans le but d'écartier l'éventualité d'un biais d'amplification, les taux de couverture du couple d'amorce de l'étude vis-à-vis des genres *Hyphomicrobium* et *Phreatobacter* ont été examinés en les confrontant à la base de données SILVA. Pour l'estimation des taux de couverture, il a été pris en compte un nombre de mésappariement possible compris entre 0 et 2, ainsi qu'une longueur de mésappariement à l'extrémité 3' des amorces pouvant varier de 0 à 2 nucléotides. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8.

Ainsi, le couple d'amorce U341F/Bakt\_805R présente des taux de couverture oscillant entre 94,1 et 96,5% pour le genre *Hyphomicrobium* et de 92 à 98.9% pour le genre *Phreatobacter*. Ces analyses ont aussi été réalisées sur les couples d'amorces Bact-563F/Bact-909R, 515F/806R et 515F/909R utilisés dans des études similaires d'autres réseaux de distribution d'eau potable, mais présentant une faible abondance relative d'*Hyphomicrobium* et de *Phreatobacter* (Tableau 8). Les taux de couverture obtenus sont similaires, oscillant entre 90,8% et 99,1% pour le genre *Hyphomicrobium* et 90,9% et 98,9% pour le genre *Phreatobacter*. Nous n'avons donc pas observé de biais de couverture du couple d'amorce utilisé lors de notre étude. De ce fait, au regard des analyses *in silico*, nous pouvons rejeter l'hypothèse d'un biais d'amplification préférentielle pour ces deux genres bactériens au cours de notre étude.



**Tableau 8 : Taux de couverture de couples d'amorces vis-à-vis des genres *Hyphomicrobium* et *Phreatobacter*. Les séquences références des deux genres bactériens sont issues de la base de données SILVA, version 128. L'analyse a été effectuée via l'outil TestPrime 1.0 de SILVA.**

Couple d'amorce	Nombre de mésappariement	<i>Hyphomicrobium</i>			<i>Phreatobacter</i>		
		Longueur de mésappariement à l'extrémité 3'					
		0	1	2	0	1	2
U341F - Bakt-805R	0	94.1	-	-	92	-	-
	1	95.4	95.4	-	97.7	96.6	-
	2	96.5	95.8	95.6	98.9	97.7	97.7
Bact-563F - Bact-909R	0	95.6	-	-	94.3	-	-
	1	97.6	97.4	-	96.6	96.6	-
	2	98.7	98	98	98.9	98.9	98.9
515F - 806R	0	90.8	-	-	90.9	-	-
	1	97.2	96.1	-	96.6	96.6	-
	2	97.4	96.3	93.2	97.7	97.7	97.7
515F - 909R	0	92.3	-	-	92	-	-
	1	98.7	98.2	-	95.5	95.5	-
	2	99.1	98.7	98.2	97.7	97.7	97.7

## II. Analyse de la flore hétérotrophe totale d'un réseau d'eau potable

Les traitements appliqués à l'eau dans le but de la rendre potable ne sont pas destinés à produire de l'eau exempte de microorganismes. Leur principale vocation est d'éliminer les microorganismes pouvant constituer une menace potentielle pour la santé humaine et de limiter une reprise de croissance en aval de ces traitements.

Comme indiqué dans l'introduction bibliographique, la reprise de croissance de bactéries dans un réseau d'eau potable ne concerne en général que des organismes hétérotrophes et dépend en grande partie de la disponibilité des nutriments et de l'efficacité du traitement résiduel chloré. L'évolution de la flore hétérotrophe totale de l'eau est continuellement suivie à l'aide de la méthode de culture *Heterotrophic Plate Count* (HPC) permettant d'apprécier le nombre de bactéries hétérotrophes capables de former des colonies sur un milieu solide. De ce fait, il

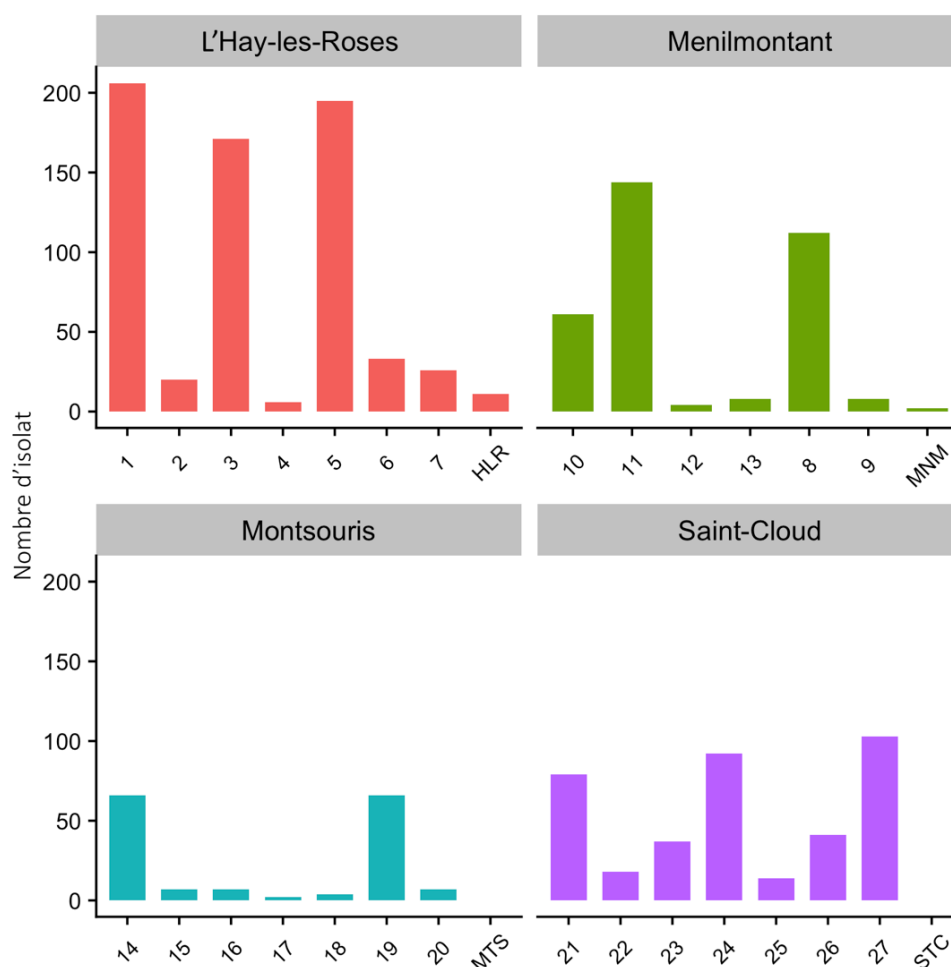
est possible de détecter d'éventuelles reprises de croissance bactérienne dans l'eau potable. Selon les normes en vigueur, les variations de cette flore bactérienne ne doivent pas excéder un facteur 10 en nombre d'unité formant colonie (UFC) en comparaison des valeurs habituelles. La simplicité d'application et le faible coût de ces méthodes font qu'elles sont utilisées encore aujourd'hui dans les analyses de l'eau potable. Cependant, elles restent limitées puisqu'elles ne permettent d'avoir qu'une notion quantitative de la flore bactérienne de l'eau potable, aucune identification bactérienne de cette flore hétérotrophe totale n'étant réalisée en laboratoire d'analyse.

L'identification des flores hétérotrophes totales des réseaux d'eau potable intéresse de plus en plus les gérants de ces derniers, notamment la société Eau de Paris. La connaissance et le suivi de la dynamique des différentes bactéries composant cette flore pourraient permettre d'améliorer la gestion du réseau et de limiter d'éventuels problèmes d'ordre biologique. Nous nous proposons donc ici d'étudier la diversité bactérienne de la flore hétérotrophe totale obtenue par la méthode de culture HPC. Pour cela, nous avons utilisé une méthode d'identification basée sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'identification des isolats ne se fait pas via un séquençage de l'ADN mais selon un profil protéique spécifique à chaque isolat. Cette analyse a été effectuée sur les échantillons de la campagne de prélèvement réalisée pour l'étude précédente.

## **II.1. Identification des isolats bactériens**

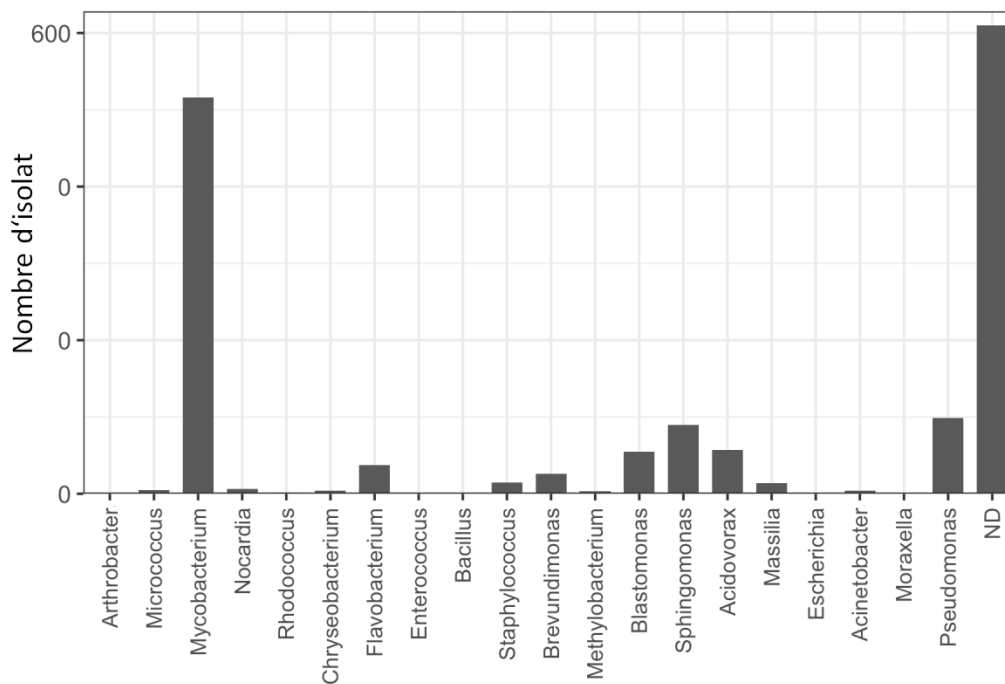
Lors de la campagne de prélèvements effectuée sur le réseau d'eau potable de la ville de Paris, la flore hétérotrophe totale de chaque échantillon a été mise en évidence par la méthode de culture HPC aux températures de 22°C et 36°C selon les normes en vigueur. Le milieu de culture R2A utilisé est adapté aux besoins de la flore hétérotrophe issue des milieux hydriques. Les souches bactériennes ainsi isolées ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF, méthode efficace et rapide pour l'identification bactérienne. Contrairement aux techniques conventionnelles, l'identification se base sur le profil protéique du microorganisme étudié (Seng *et al.* 2009). Le protocole a été adapté afin de palier à l'éventuelle résistance des bactéries à l'extraction protéique, notamment via l'ajout d'une extraction rapide à l'acide formique. Cette étape supplémentaire est conseillée par le fournisseur pour les souches récalcitrantes à l'extraction protéique classique. Il est important de noter que l'ensemble des UFCs n'a pu être isolé pour des raisons techniques. Un maximum de 30 isolats bactériens a été effectué sur les flores hétérotrophes contenant un plus grand nombre d'UFCs.

Sur les 368 échantillons d'eau potable analysés pour leur flore hétérotrophe totale, 1550 isolats bactériens ont pu être effectués. Les quatre UDI présentait une disparité importante du nombre d'isolats bactériens puisque 668 isolats ont été réalisés dans l'UDI L'Hay-les-Roses, 339 isolats dans l'UDI Ménilmontant, 159 isolats dans l'UDI Montsouris et 384 isolats dans l'UDI Saint-Cloud. Le même déséquilibre de répartition du nombre d'isolats bactériens est observé au regard des sites d'échantillonnage (Figure 20).



**Figure 20 : Nombre d'isolats bactériens obtenus par la méthode HPC sur la totalité de la campagne, en fonction des sites d'échantillonnage de chaque UDI.**

L'analyse de la flore hétérotrophe totale par spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis de mettre en évidence la présence d'au moins 20 genres bactériens différents au sein du réseau d'eau potable (Figure 21). La flore hétérotrophe totale présente une forte population bactérienne identifiée comme appartenant au genre *Mycobacterium* (33,3% des isolats), ainsi qu'une quantité non négligeable d'isolats bactériens non identifiés (39,5% des isolats).

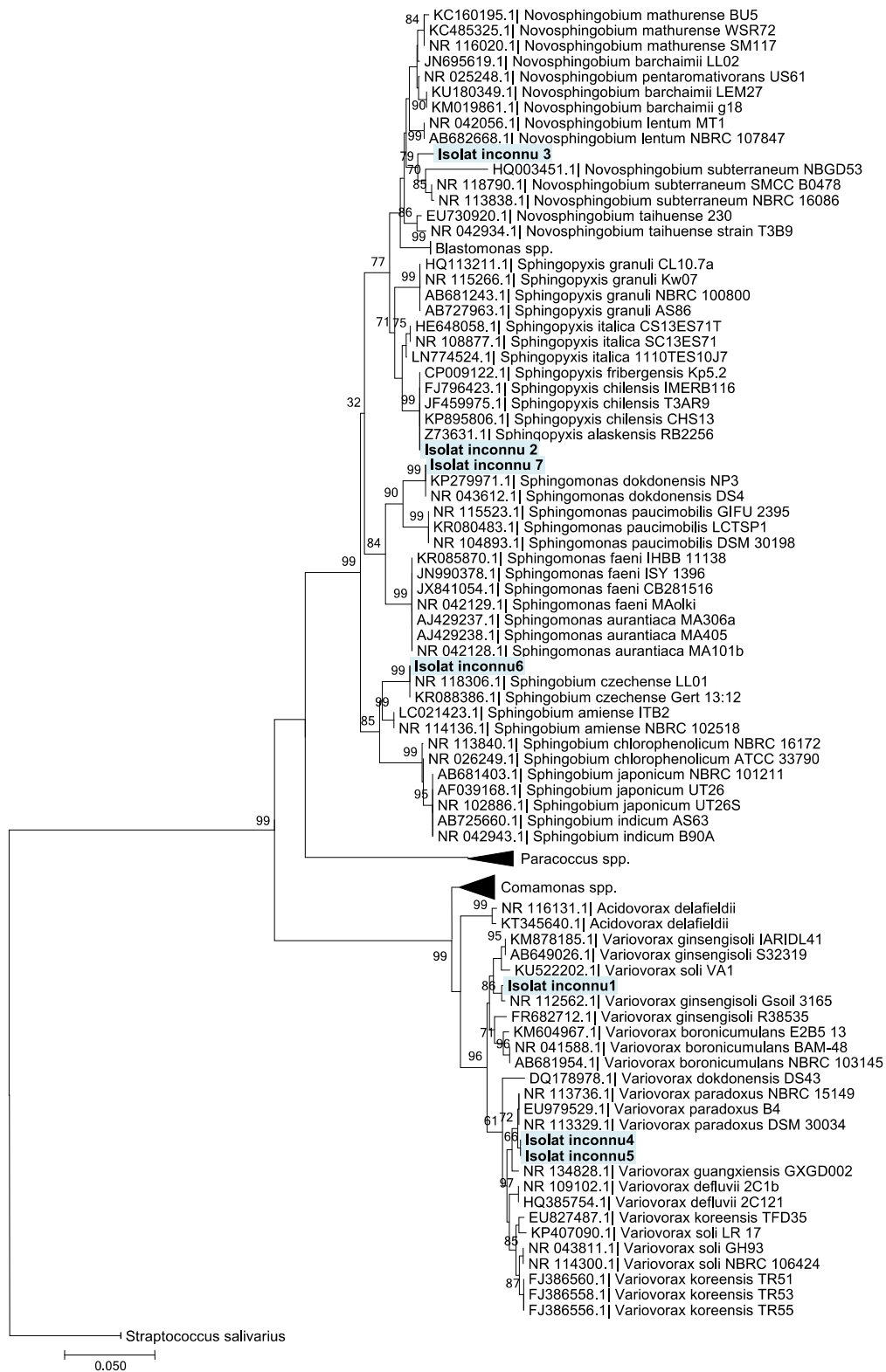


**Figure 21 : Nombre d'isolats bactériens obtenus par la méthode HPC en fonction de leur identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.**

## II.2. Identification des spectres protéiques inconnus

La méthode d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF est limitée par l'obligation d'utiliser une banque de spectres protéiques basée principalement sur des microorganismes issus du domaine hospitalier. Les spectres protéiques de souches environnementales ont donc moins de chances d'être identifiés par cette méthode.

Du fait de cette limitation, l'identification de 610 souches bactériennes (39,5% des isolats), provenant des échantillons d'eau potable, s'est révélée impossible par spectrométrie de masse MALDI-TOF, malgré l'obtention d'un spectre protéique de bonne qualité. De cette façon, sept profils récurrents dans les résultats de spectrométrie de masse, et sans assignation taxonomique, ont pu être détectés. Dans le but de les identifier, un séquençage partiel du gène codant l'ARNr 16S d'une souche a été réalisé pour chaque profil protéique obtenu à partir des amorces U341F et U926R. La phylogénie de chacune a été reconstruite à partir d'un arbre phylogénétique (Figure 22). Les spectres protéiques ont ensuite été



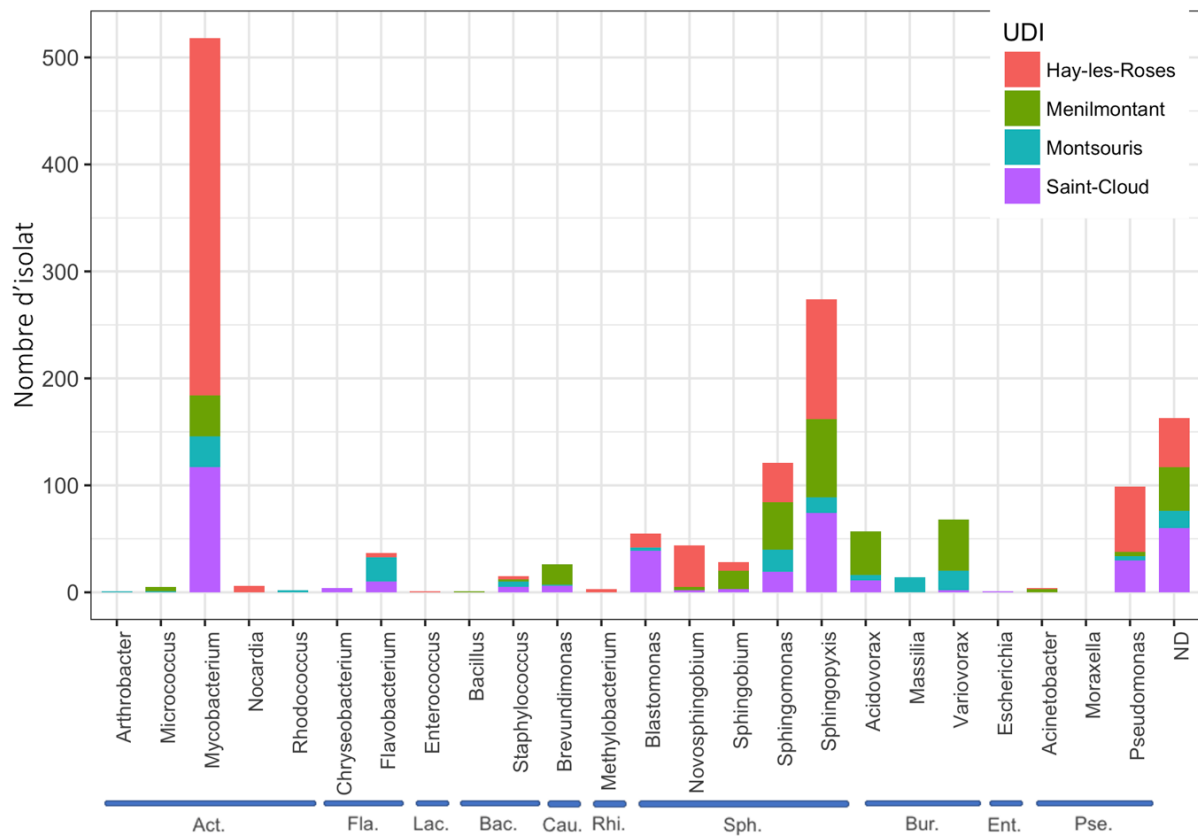
**Figure 22 : Arbre phylogénétique sur la base d'une portion du gène codant l'ARNr 16S des isolats bactériens non identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'arbre a été construit par la méthode de distance Neighbor-Joining et corrigé avec le paramètre Kimura 2. La robustesse des branches a été statistiquement éprouvée par 1000 répliques de bootstrap. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 70 % sont indiquées. 116 séquences présentant 422 positions ont été utilisées pour générer l'arbre.**

insérés dans la base de données avec la phylogénie de l'isolat. Du fait d'un séquençage partiel du gène codant l'ARNr 16S, seule la phylogénie au niveau du genre bactérien est conservée.

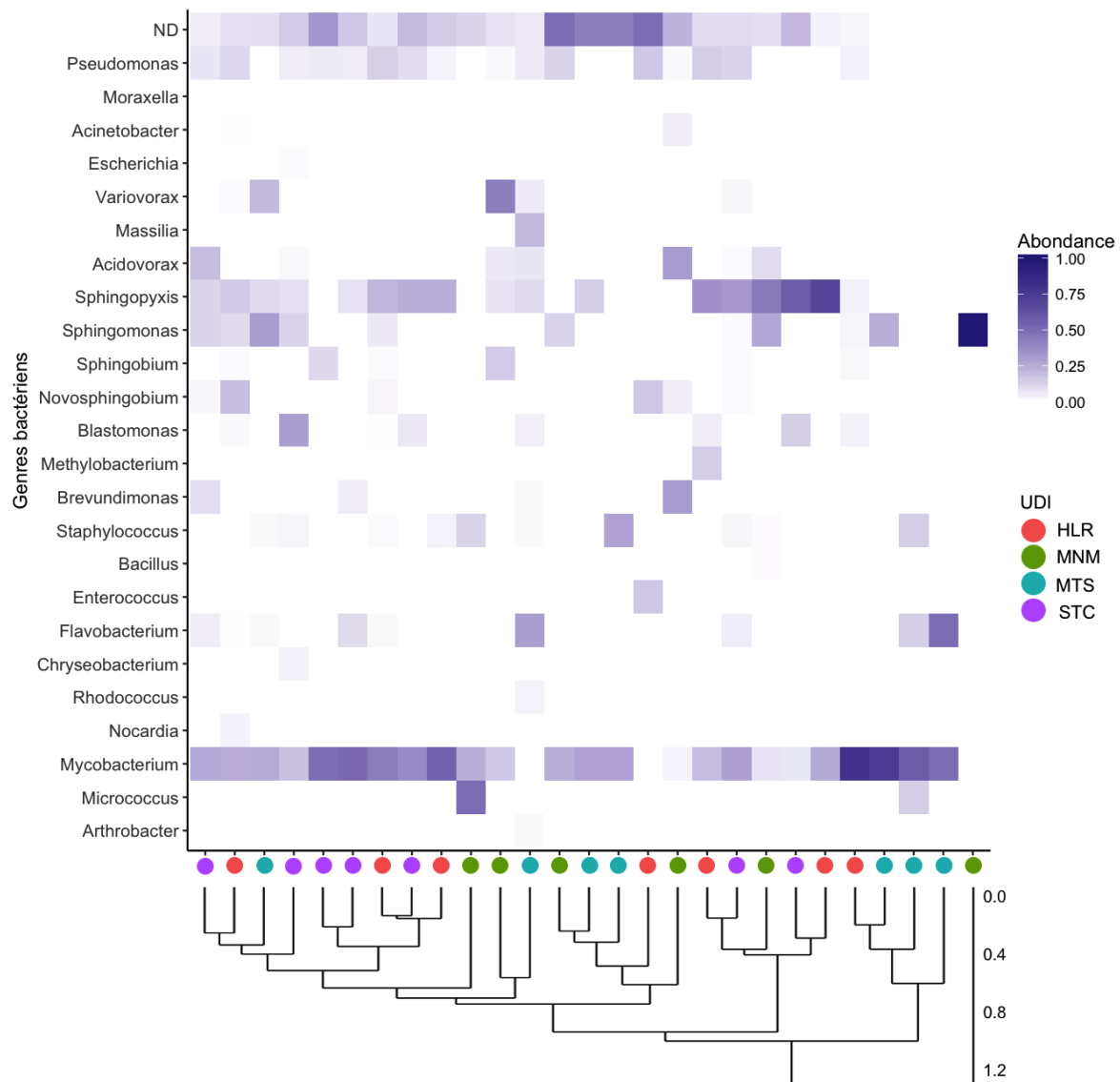
L'utilisation de la méthode de séquençage Sanger sur une portion du gène codant l'ARNr 16S a permis de compléter les résultats obtenus via l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Sur 610 isolats bactériens qui n'ont pas pu être identifiés selon leur profil protéique, la phylogénie de 447 isolats a pu être déterminée par la méthode de séquençage Sanger. Quatre genres bactériens ont été mis en évidence uniquement par la méthode de séquençage : *Novosphingobium*, *Sphingobium*, *Sphingopyxis* et *Variovorax*. Le genre *Sphingomonas* a été en partie identifié à l'aide du séquençage. Le nombre d'isolats dont la taxonomie reste non identifiée a ainsi été réduit de 610 à 163, soit 10,5% de la flore hétérotrophe totale.

### **II.3. Variation spatiale de la flore hétérotrophe totale**

L'analyse de la diversité de la flore hétérotrophe totale du réseau d'eau potable de Paris, par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par séquençage Sanger, a permis de mettre en évidence la présence d'au moins 24 genres différents sur les 1550 isolats bactériens caractérisés (Figure 23). La population totale est dominée par les ordres Sphingomonadales et Actinomycetales puisqu'ils représentent respectivement 33,7% et 34,3% des identifications. Les Actinomycetales sont principalement représentés par le genre *Mycobacterium*, et les Sphingomonadales par les genres *Sphingomonas* et *Sphingopyxis*. En termes d'abondance relative, seul l'ordre des Sphingomonadales est réparti de façon homogène entre les quatre UDI. Chaque unité de distribution est ensuite caractérisée par des flores hétérotrophes totales différentes. L'UDI de L'Haÿ-les-Roses est fortement dominée par les Actinomycétales. Les UDI de Ménilmontant et de Montsouris sont caractérisées par la présence de Burkholderiales puisqu'ils représentent la deuxième population la plus importantes de ces UDI, après les Sphingomonadales. La classe des Flavobacteriales semble, quant à elle, spécifique des UDI Montsouris et Saint-Cloud. Le regroupement des sites d'échantillonnage par classification hiérarchique en fonction de l'abondance relative de chaque genre bactérien identifié ne permet pas de mettre en évidence une influence des origines d'eaux et/ou des traitements qui leur sont appliqués (Figure 24).



**Figure 23 : Identification des colonies bactériennes isolées en fonction de leur UDI d'appartenance. Le terme 'ND' regroupe l'ensemble des colonies n'ayant pas été identifiées. Act. : Actinomycetales ; Fla. : Flavobacteriales ; Lac. : Lactobacilliales ; Bac. : Bacilliales ; Cau. : Caulobacterales ; Rhi. : Rhizobiales ; Sph. : Sphingomonadales ; Bur. : Burkholderales ; Ent. : Enterobacterales ; Pse. Pseudomonadales.**



**Figure 24 : Classification hiérarchique des sites d'échantillonnage en fonction des abondances relatives des genres bactériens identifiés dans chacun d'eux.**

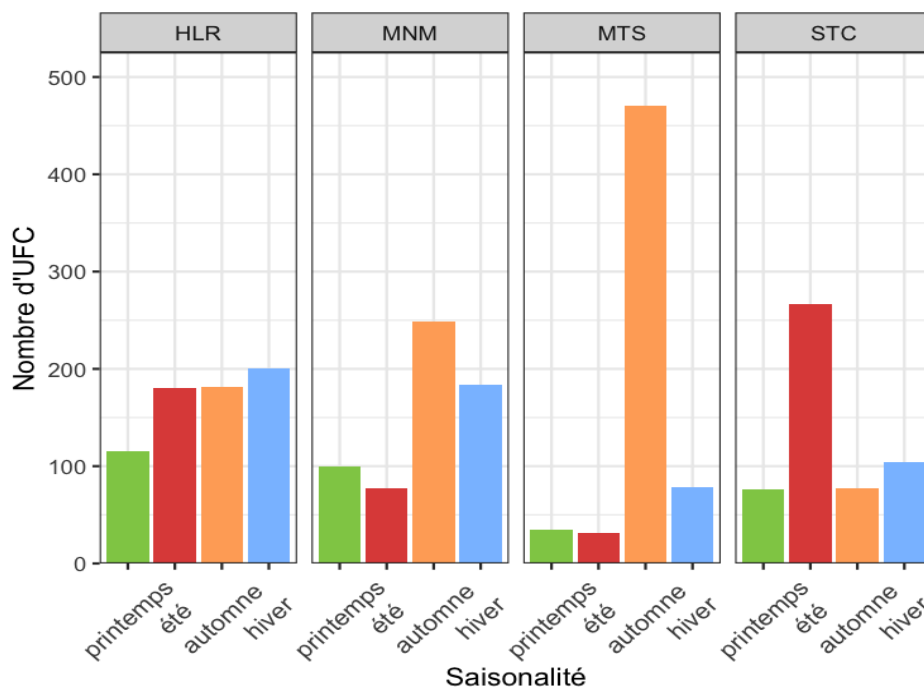
Au cours de cette campagne d'échantillonnage, deux types d'échantillons ont été prélevés : les échantillons dits "réservoir", prélevés à la sortie des réservoirs majoritaires de chaque unité de distribution, et les échantillons dits "réseau", prélevés au niveau de canalisations et représentant l'extrémité du réseau de distribution. La comparaison de ces deux types d'échantillons permet d'apprécier la variation des populations bactériennes entre la sortie du réservoir, et l'entrée dans le réseau privé, à l'intérieur des habitations. Sur l'ensemble des isolats bactériens obtenus, seulement treize ont été isolés dans les échantillons réservoirs. Douze isolats ont été identifiés comme appartenant au genre *Mycobacterium* et une au genre *Sphingomonas*. Si l'on se réfère à un ratio nombre d'isolats bactériens par échantillon d'eau,



il est de 4.13 isolats bactériens par échantillon réseau et seulement de 0.03 isolats bactériens par échantillon réservoir.

## II.4. Influence de la temporalité dans la répartition spatiale de la flore hétérotrophe totale

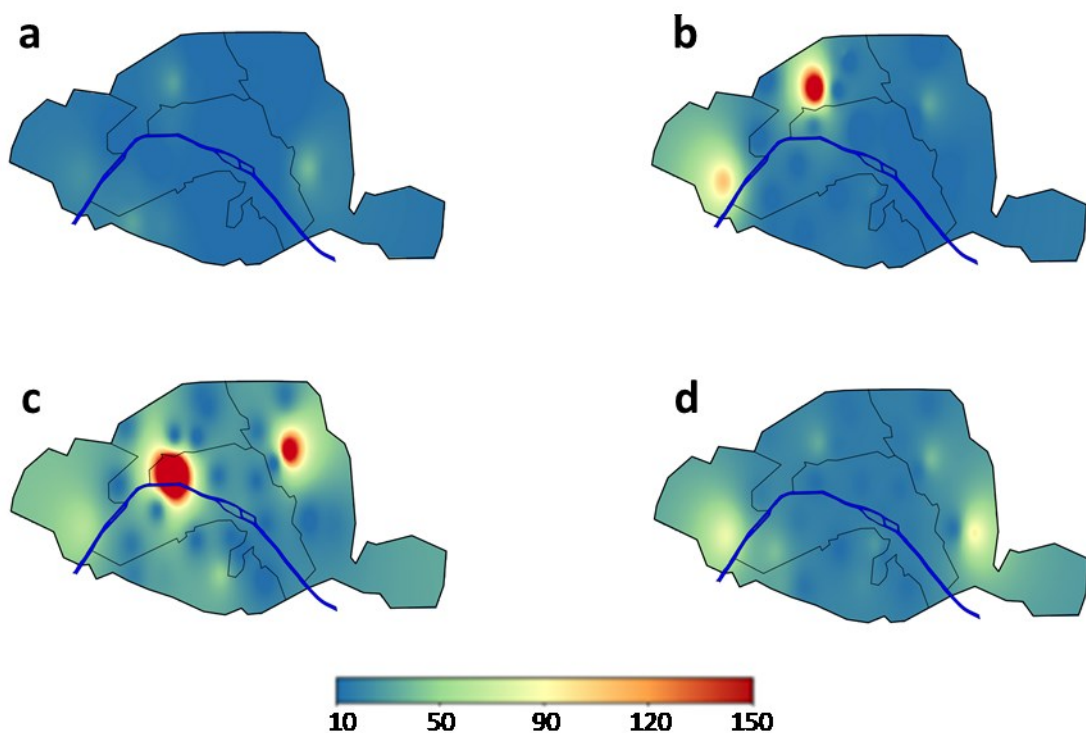
Afin de définir une eau potable comme biologiquement stable, il est nécessaire qu'elle ne promeuve pas la croissance de sa flore bactérienne et que le nombre de cellule ne fluctue pas de façon significative au cours du temps. Selon les normes européennes de potabilité de l'eau, la flore hétérotrophe totale ne doit pas varier de plus de 10 fois la valeur moyenne habituelle. De ce fait, le nombre d'UFC a été visualisé d'un point de vue temporel à partir des données recueillies par les laboratoires d'analyse d'Eau de Paris, sur l'ensemble des sites d'échantillonnage du réseau et en fonction des UDIs (Figure 25). L'analyse a été effectuée sur ces données puisque la campagne d'échantillonnage effectuée n'a pas permis d'isoler l'ensemble des UFCs obtenus.



**Figure 25 : Nombre d'UFC obtenues par la méthode HPC en fonction des unités de distribution et des saisons.**

Il est possible d'observer une influence du facteur temporel plus ou moins marquée pour chacune des quatre unités de distribution. En effet, au regard du nombre d'isolats bactériens isolés, L'UDI L'Haÿ-les-Roses présentent une flore hétérotrophe totale homogène au cours du temps. La flore hétérotrophe totale de l'UDI Saint-Cloud augmente au cours de l'été. Quant aux flores des UDIs Ménilmontant et Montsouris, elles présentent une forte variabilité avec une augmentation importante du nombre d'UFC au cours de l'automne.

Afin de caractériser plus finement cette augmentation de la flore hétérotrophe totale, les données ont été observées d'un point de vue spatio-temporel. Pour cela, des cartes d'extrapolation de données ont été générées à l'aide du logiciel QGIS afin d'observer la répartition des UFC en fonction du site et de la saison de prélèvement ( Figure 26). Ainsi, il a pu être observé que les augmentations du nombre d'UFC n'étaient pas communes à l'ensemble des sites d'échantillonnage d'un UDI, mais propre à chacun de ces sites. En effet, la hausse importante des UFC observée au sein des UDIs Ménilmontant, Montsouris et Saint-Cloud, n'est observée qu'au niveau d'un point d'échantillonnage sur sept.



**Figure 26 : Nombre d'isolats bactériens obtenus par la méthode HPC, en fonction de chaque lieu de prélèvement et des saisons. La couleur rouge correspond au nombre d'UFC le plus élevé, la couleur bleu correspond au nombre d'UFC le plus faible. Le dégradé de couleur a comme intermédiaire le jaune. a: Printemps ; b :Eté ; c : Automne ; d : Hiver**

## II.5. Discussion

Au cours de cette étude, nous avons collecté la flore hétérotrophe totale provenant de la campagne d'échantillonnage effectuée entre mars 2016 et février 2017. Cette flore a été dénombrée, puis chaque isolat bactérien a été identifié à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Contrairement aux analyses purement quantitatives effectuées habituellement, cette étude a permis d'apprécier la diversité et les variations spatio-temporelles de la flore hétérotrophe totale au sein du réseau d'eau potable de la ville de Paris. A notre connaissance, c'est la première étude s'intéressant à la diversité de la flore hétérotrophe totale d'un réseau d'eau potable dans sa globalité.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technologie à la fois rapide et simple pour l'identification d'isolats bactériens. Cette méthode est cependant limitée par l'obligation de passer par une banque de spectres protéiques basée principalement sur des microorganismes issus du domaine hospitalier. Les spectres protéiques de souches environnementales ont donc moins de chances d'être identifiés par cette méthode. De ce fait, 39,4% des isolats bactériens effectués n'ont pas pu être identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le séquençage par la méthode Sanger, du gène codant pour l'ARNr 16S d'isolats bactériens dont les spectres protéiques étaient récurrents, s'est révélé être un complément efficace dans notre analyse. En effet, une assignation taxonomique a pu être effectuée pour 447 isolats bactériens permettant de réduire le nombre d'inconnus à 163 isolats, soit 10,5% de la flore hétérotrophe totale. Quatre genres bactériens ont été entièrement identifiés par séquençage Sanger ainsi qu'un cinquième partiellement. Il est à noter que ces quatre genres bactériens présentent des entrées dans la base de profils protéiques utilisée. L'absence d'identification peut correspondre à un défaut d'extraction protéique ou à la détection d'une espèce bactérienne inconnue de la base de données. En comparaison, des travaux récents sur l'identification de la flore hétérotrophe totale d'échantillon d'eau potable, utilisant uniquement la spectrométrie de masse MALDI-TOF, ont obtenu des taux d'isolats bactériens non identifiés allant jusqu'à 62% (Sala-Comorera *et al.* 2017). La complémentarité de ces deux méthodes semble être idéale dans l'identification de la flore hétérotrophe totale en l'absence d'une banque de spectres protéiques issus de bactéries environnementales.

Au regard de la diversité bactérienne, le phylum Proteobacteria est clairement dominant puisqu'il regroupe 14 des 24 genres bactériens identifiés. Cette observation est en accord avec les analyses que nous avons effectuées précédemment par séquençage haut débit ainsi qu'avec la majorité des études traitant des communautés bactériennes des réseaux de

distribution d'eau potable (Pinto *et al.* 2012, 2014 ; Poitelon *et al.* 2009 ; Proctor et Hammes 2015 ; Santos *et al.* 2016). Le phylum Proteobacteria est aussi dominant au regard du nombre d'isolats bactériens puisqu'il correspond à 44,3% des isolats de la flore hétérotrophe totale. Cependant, le résultat le plus surprenant provient du genre *Mycobacterium* puisqu'il regroupe à lui seul 518 isolats bactériens, soit 33,4 % du total. Ces derniers appartiendraient principalement aux genres *M. chelonae* et *M. llatzerense*, selon une étude s'intéressant à la diversité des mycobactéries au sein du réseau d'eau potable de Paris (Dubrou *et al.* 2013). Les mycobactéries sont reconnues comme étant des colonisateurs fréquents, voir ubiquitaires, des réseaux de distribution d'eau potable (Falkinham 2015). D'autres études ont ainsi mis en évidence les fortes prévalences et abondances que pouvait avoir le genre *Mycobacterium* au sein de réseaux de distribution d'eau potable ayant des caractéristiques différentes (Holinger *et al.* 2014 ; Le Dantec *et al.* 2002a ; Stanish *et al.* 2016 ; Torvinen *et al.* 2004). Cette facilité de colonisation des réseaux peut notamment être expliquée par leur capacité à former des biofilms (Falkinham *et al.* 2001) ou encore leur résistance naturelle aux traitements appliqués à l'eau (Lee *et al.* 2010).

L'origine de l'eau et/ou les traitements appliqués ne semblent pas responsables de la structure et de la composition des flores hétérotrophes totales des quatre UDI. En effet, aucun regroupement des sites d'échantillonnage d'un même UDI n'a été constaté lors de la réalisation de la classification hiérarchique (Figure 23). Ces observations sont complémentaires à l'étude précédente réalisée sur la même campagne d'échantillonnage à l'aide de méthode de séquençage haut débit. L'analyse des flores hétérotrophes totales en fonction du lieu de prélèvement a aussi mis en évidence la pauvreté de la flore présente dans les réservoirs. En effet, sur 1550 isolats bactériens, seulement treize ont été isolés dans un réservoir. Cette différence conséquente entre les deux populations peut être expliquée par la présence et le développement plus importants de biofilms, et donc de bactéries le long du système de distribution. En effet, ces phénomènes sont accentués au niveau des canalisations où le rapport surface/volume est plus élevé, ce qui augmente le contact de l'eau avec les matériaux des tuyaux, et de ce fait le contact des nutriments de l'eau et des biofilms.

Le dénombrement de la flore hétérotrophe totale a permis de mettre en évidence une disparité importante entre chaque site d'échantillonnage (Figure 20). De plus, la charge bactérienne d'un site d'échantillonnage n'est pas constante dans le temps ( Figure 26). Étant donné que ces variations ne sont pas communes à l'ensemble de l'UDI, il est probable que ces augmentations du nombre d'UFC soient la conséquence d'évènements très localisés de

désagrégation de biofilms au sein du réseau de distribution, résultant d'un changement de débit d'eau, de dommages aux infrastructures ou d'un fait purement aléatoire (Douterelo *et al.*, 2016 ; Lehtola *et al.*, 2006).

### **III. Détection et quantification spécifique de trois pathogènes opportunistes**

Les traitements appliqués à l'eau dans le but de la rendre potable se sont toujours basés sur la même logique depuis leur création. Étant donné que les pathogènes d'origine fécale ne se développent pas en dehors de leur hôte, l'exposition à une succession de traitements de nature diverse conduit à leur élimination dans le produit fini. Cependant, certains microorganismes d'origine hydrique, connus pour être des colonisateurs classiques des réseaux de distribution d'eau potable, peuvent causer des pathologies chez des individus prédisposés tels que des personnes âgées, des enfants en bas âge ou encore des personnes ayant une immunodéficience. Ces organismes sont ainsi qualifiés de pathogènes opportunistes.

Les pathogènes opportunistes présents dans les réseaux d'eau potable les plus étudiés sont *Mycobacterium* spp., *L. pneumophila* et *P. aeruginosa*. Ces derniers se sont adaptés aux conditions environnementales que l'on retrouve dans les réseaux de distribution d'eau potable. Ces pathogènes opportunistes sont notamment retrouvés dans des réseaux d'eau potable hospitaliers, qui sont pourtant soumis à des traitements supplémentaires, et présentent donc un risque de développement d'infections nosocomiales (Billinger *et al.* 2009 ; Crivaro *et al.* 2009 ; Wellinghausen *et al.* 2001). A l'heure actuelle, il s'avère impossible d'éliminer totalement ces bactéries d'un réseau de distribution d'eau potable.

Comme le montre les résultats sur la diversité bactérienne, le réseau de distribution d'eau potable de Paris n'est pas exempt de la colonisation par ces pathogènes opportunistes. Des bactéries affiliées aux genres *Mycobacterium*, *Legionella* et *Pseudomonas* sont en effet retrouvés au sein des communautés bactériennes du réseau d'eau potable. Les genres *Mycobacterium* et *Pseudomonas* ont aussi été caractérisés dans la flore hétérotrophe totale de l'eau potable. Dans le cas des genres *Legionella* et *Pseudomonas*, leur détection n'induit cependant pas la présence des pathogènes opportunistes *L. pneumophila* et *P. aeruginosa*, puisque le degré de précision de ces méthodes ne permet pas d'être spécifique à l'espèce.

Outre l'absence de spécificité, ces analyses ne permettent pas d'avoir une quantification absolue de chacun des pathogènes opportunistes cités.

C'est dans ce contexte que la société Eau de Paris a voulu caractériser les populations des trois pathogènes opportunistes *Mycobacterium* spp., *L. pneumophila* et *P. aeruginosa* ainsi que leur variation suivant les paramètres environnementaux étudiés. Pour cela, nous avons utilisé des méthodes de PCRq qui permettent de détecter et de quantifier de façon spécifique et absolue une espèce bactérienne. Pour cela, les mêmes échantillons que les études précédentes ont été utilisés. Plusieurs caractéristiques physico-chimiques des échantillons d'eau ainsi que les paramètres spatio-temporels ont également été implémentés dans les analyses dans le but d'identifier les facteurs environnementaux influençant ces trois populations.

### **III.1. Publication 2: Spatio-temporal survey of *Mycobacterium* spp., *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa* in the Paris drinking water distribution system.**

Les résultats de cet axe de travail ont fait l'objet d'un article scientifique qui sera prochainement soumis à la revue International Journal of Hygiène and Environmental Health. Cet article est présenté ci-dessous.

**Spatio-temporal survey of *Mycobacterium* spp., *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa* in the Paris drinking water distribution system.**

Yoann Perrin<sup>1,2</sup>, Didier Bouchon<sup>1</sup>, Yann Héchard<sup>1\*</sup> & Laurent Moulin<sup>2\*</sup>

\* These authors contributed equally to this work.

- a Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Equipes Microbiologie de l'Eau et Ecologie, Evolution, Symbiose, Université de Poitiers, UMR CNRS 7267, F-86073 Poitiers, France.
- b Eau de Paris, Direction de la Recherche et du Développement pour la Qualité de l'Eau, R&D Biologie, 33, Avenue Jean Jaurès, F-94200 Ivry sur Seine, France.

Yann Héchard

PBS – Bât B36/B37, 1 rue Georges Bonnet, TSA51106, 86073 POITIERS Cedex 9, France

Tel: +33 (0)5 49 45 40 07

Email: [yann.hechard@univ-poitiers.fr](mailto:yann.hechard@univ-poitiers.fr)

Laurent Moulin

Eau de Paris, Direction de la Recherche et du Développement pour la Qualité de l'Eau, R&D Biologie, 33, Avenue Jean Jaurès, F-94200 Ivry sur Seine, France.

Tel : +33 (0)1 45 15 42 21

Email : [laurent.moulin@eaudeparis.fr](mailto:laurent.moulin@eaudeparis.fr)

The authors declare no conflict of interest.

## Abstract

Opportunistic premise plumbing pathogens present in drinking water might be responsible for a significant number of infections for health compromised patients. However, these organisms are not monitored in current water potability standards and have been poorly studied in a full-scale network. In this study, we quantified, by qPCR, three opportunistic pathogens, *Mycobacterium* spp., *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* within the entire Paris drinking water network and over one-year sampling campaign. While *Mycobacteria* spp. seemed ubiquitous whatever the distribution system and the time of the year, the occurrence of *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* showed variations according to the season. Unlike *L. pneumophila* and *P. aeruginosa*, the quantification of *Mycobacterium* spp. varies from one sampling site to another. These variations are poorly explained by the monitored environmental physico-chemical parameters. Other parameters such as biofilm disaggregation events or bacterial competition could be responsible for the dispersion of concentrations for the same sampling point. In conclusion, *Mycobacterium* sp. are common inhabitants of the Paris network while *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* presence fluctuate over space and time. Such qPCR approach, to study full-scale networks, would help to better understand the behaviour of the opportunistic premise plumbing pathogens.



## Introduction

Water treatments are essential to limit the presence of pathogens and substances that may be harmful to human health in drinking water (Ashbolt et al., 2001). Notwithstanding those disinfection treatments (UV, ozonation, chlorination...), drinking water present a noticeable bacterial flora. These bacteria come from the treated water, but also from the network itself where they could be found within biofilms. The important diversity of bacteria within the network could be qualified as the water network microbiota. To avoid pathogen of gastrointestinal origin the focus of water potability standards is to detect faecal contamination, through the detection of enterococci and *Escherichia coli* by culture methods, and therefore problems in the water network (rupture of pipe, disinfectant defect,...) leading to the potential presence of pathogenic bacteria in the network microbiota.

Apart from classical human pathogens, it is possible to find environmental organisms but presenting a sanitary risk called opportunistic premise plumbing pathogens (OPPPs). OPPPs are ubiquitous bacteria in soil and water environments, but are also "regular" inhabitants of drinking water distribution systems (DWDSs) (Ashbolt, 2015a). Three of the most frequently monitored OPPPs are *Mycobacterium* spp., *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa* (Falkinham et al., 2015b). Non-tuberculous mycobacteria (NTMs) are described as colonizers, most certainly ubiquitous, of drinking water distribution systems since they are found in distribution networks that vary greatly in their design and the treatments applied to them (Falkinham, 2016). Among all NTMs, only a few species are responsible for the majority of human infections, which mainly affect immunocompromised or cystic fibrosis patients (Falkinham, 1996). The diseases are mainly pulmonary since they correspond to 90% of cases of NTMs (Kasperbauer and Huitt, 2013) but can also be observed in skin infections (Aubry et al., 2017; Yu et al., 2013). *L. pneumophila* is responsible for legionellosis or "legionnaire's disease", in which bacteria reach the pulmonary alveoli and infect macrophages (Fields et al., 2002). The prevalence of the disease seems to increase year over year. Between 2011 and 2015, the number of cases rose from 0.97 to 1.30 per 100,000 on average in 29 European countries (Beauté and The European Legionnaires' Disease Surveillance Network, 2017). *P. aeruginosa* causes various pathologies depending on the location of the infection (Falkinham et al., 2015). It can thus cause, infections in wounds and burns, as well as acute and chronic respiratory infections, particularly in patients with cystic fibrosis (Ratjen and Döring, 2003). In some rare cases, pneumonia can also be contracted in treated recreational water (Hlavsa et al., 2015).

Currently, monitoring of *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* is regulated by standardised methods (NF EN ISO 11731-2 and NF EN ISO 16266, respectively) but NTMs detection is not standardised even if some publications tried to compare available methods (Radomski et al., 2013, 2010). Intensive utilisation of culture methods for OPPPs survey in water network is limited by several parameters. Despite their low cost and simplicity, they are time-consuming and can only detect a limited part of bacterial communities present in drinking water. In addition, viable OPPPs in drinking water may be not cultivable, which makes it difficult to detect and count (Bédard et al., 2014; Bej et al., 1991). In contrast to the conventional microbiological methods, the use of quantitative PCR-based methods would allow to detect and to quantify these OPPPs in a specific and sensitive way (Mao et al., 2018; Qin et al., 2017; Räsänen et al., 2013; Whiley et al., 2014). Although these molecular tools do not differentiate between viable cells and free or dead cell DNA, thus overestimating the quantity of OPPPs, they provide estimates on the occurrence and quantity of OPPPs and thus allow the microbial quality of drinking water to be assessed.

Previous studies carried out on the detection of OPPPs in the DWDSs of Paris have reported the occurrence of mycobacteria in various compartments of the network (Dubrou et al., 2013). However, no information on temporal evolution of NTM concentration was available. Also *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* have not been routinely monitored and thus no information was available on their spatial distribution in the drinking water network of the city of Paris. Moreover, in the context of microbiological monitoring of a DWDS, detecting and quantifying these three OPPPs on a large-scale sampling campaign would make it possible to estimate the potential risk caused by the presence of these bacteria.

The objective of this study is to examine occurrence and concentration of three OPPPs, *Mycobacterium* spp., *L. pneumophila* and *P. aeruginosa*, in a large scale water network and over a year. Temporal monitoring of OPPPs would help to gain a better knowledge of the dynamic these bacteria. Also, the potential impact of physico-chemical parameters was assessed to understand their relationship with OPPPs. Understanding the ecology of these OPPPs could help to mitigate the associated risks in drinking water.

## **Materials & methods**

### **Site locations and sampling procedure**

The city of Paris is supplied in drinking water by four separated DWDSs (Figure 1). Ménilmontant DWDS is supplied with treated surface water from the Marne river, Montsouris and Saint-Cloud DWDSs are supplied with treated groundwater from multiple sources around Paris and L'Haÿ-les-Roses DWDS is supplied with a mix of treated groundwater and surface water from the Seine river. Groundwater is treated with a filtration on granulated activated charcoal followed by an ultrafiltration. Surface water is treated by decantation, pre-filtration, sand filtration (slow or regular, depending of the plant), followed by ozonation and filtration on granulated activated charcoal, ultraviolet disinfection prior to chlorination. After treatment, the drinking water from each DWDS is transported to a specific reservoir.

For each DWDS, one sample from the reservoir, containing the treated drinking water before entering within the distribution network, was collected monthly. Seven sites for Montsouris, l'Haÿ-les-Roses and Saint-cloud DWDSs and six sites for Ménilmontant DWDSs were collected monthly on the pipes of the distribution network (Figure 1). A total of 368 drinking water samples of one liter were collected from the four DWDSs and their respective reservoir from March 2016 to February 2017. Each water sample was transported to the laboratory at 4°C and processed within 24 hours. For each drinking water sample, physico-chemical parameters (temperature, pH, total chlorine, conductivity, and orthophosphate and nitrate concentration) were measured according to the European regulation on separated aliquots.

### **DNA extraction**

One-liter water samples were filtered through a 0.2 µm cellulose acetate membrane. Total DNA was then extracted from the membrane using the PowerWater DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA), as described by the manufacturer. After extraction, DNA was stored at -20°C.

### **Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)**

In order to detect and quantify *Mycobacterium* spp., *L. pneumophila* and *P. aeruginosa*, a gene specific to each of the bacteria were targeted by qPCR. Primers and probe were designed according to three studies that optimized qPCR for *Mycobacterium* spp. with *atpE* gene (Radomski et al., 2013), *L. pneumophila* with *mip* gene (Joly et al., 2006) and for *P. aeruginosa* with *regA* gene (Shannon et al., 2007). Quantitative PCR were carried out using a TaqMan probe as indicated in the reference publications and with a Viia7 real-time PCR system (Life

Technologies). The 10  $\mu\text{L}$  reaction mixture contained 0.5 mM of specific primers, 0.25 mM of TaqMan probe, 1X TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix and, 4.25  $\mu\text{L}$  of H<sub>2</sub>O, 2  $\mu\text{L}$  of DNA template. Thermal cycling conditions were established as described by the manufacturer of TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific) without the reverse transcription step. Negative controls (template DNA replaced by nuclease-free water) and 10-fold serial dilution of standard plasmid (from 10<sup>1</sup> to 10<sup>5</sup> copies/ $\mu\text{L}$ ) were included in triplicate in each qPCR run. The limit of quantification was established according to the method proposed by Forootan et al. 2017. The most diluted point of the standard curve must have a coefficient of variation less than 35% (Forootan et al., 2017). Thus, samples with a quantification of less than 20 copies per reaction (10 copies/ $\mu\text{L}$  of DNA template) were considered as negative. In order to quantify the specific genes of each OPPP, standard curves were obtained with serial dilutions of plasmids with the amplicon of interest as an insert.

### **Plasmids construction**

Amplicons of the fragments of interest were obtained by PCR using the enzyme Hot Diamond Taq (Eurogentec), as described by the manufacturer. PCR products have been purified using the Nucleospin Gel and PCR Clean up (Macherey Nagel) kit, according to the supplier's recommendations. The plasmids were constructed with the pGEM-T Easy Vector Systems kit (Promega), as described by the manufacturer, and cloned in a chemically competent strain of *Escherichia coli* TOP10 F' (ThermoFisher Scientific). Plasmid extractions were performed using the NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey Nagel), according to the supplier's recommendations.

### **Statistical analysis**

All statistical tests were performed with R software 3.3.3 (R Core Team, 2017). The normality of data sets was assessed using the Shapiro-Wilk tests. The occurrence of the targeted bacteria were analyzed with Pearson's Chi<sup>2</sup> tests. Two by two comparisons of bacterial quantification were performed using Mann-Whitney tests. Multiple comparisons were made using a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc tests. To evaluate the impact of temporality on variations of OPPPs, multiple comparisons with repeated measures were made using a Friedman test followed by Dunn's post hoc tests. Canonical Correspondence Analysis (CCA) was performed using Vegan package (Oksanen et al., 2017). Significance of all statistical tests was set at a Pvalue  $\leq 0.05$ .

## Results and Discussion

### Occurrence of OPPPs were homogeneous in the four DWDSs

In order to better understand the dynamic of OPPPs in a large scale water network, *Mycobacterium* spp., *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* were quantified within the four different DWDSs of Paris, through a spatio-temporal sampling campaign (Figure 1). To our knowledge, this sampling campaign (n=368) is one of the most important described so far for such a study. The objective was to determine the spatial dispersion and the temporal evolution of these OPPPs within the network and to detect potential variation in the microbiological quality of drinking water. To this aim, we chose to quantify the three OPPPs by targeting specific genes by qPCR. All sampling sites were positive at least once for these three OPPPs. Moreover, each targeted bacteria is frequently detected in drinking water samples across the four DWDSs (Table 1). The highest occurrence was obtained for *Mycobacterium* spp. that was found in 95% of the samples, showing the quasi-omnipresence of this bacterial genus in the network. *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* also showed an elevated occurrence rates of 50% and 52% in the water samples, respectively. The detection rates of *Mycobacterium* spp., *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* were similar between the four DWDSs (Pearson's  $\chi^2$ ;  $P_{\text{value}}=0.19, 0.72$  and  $0.46$ , respectively).

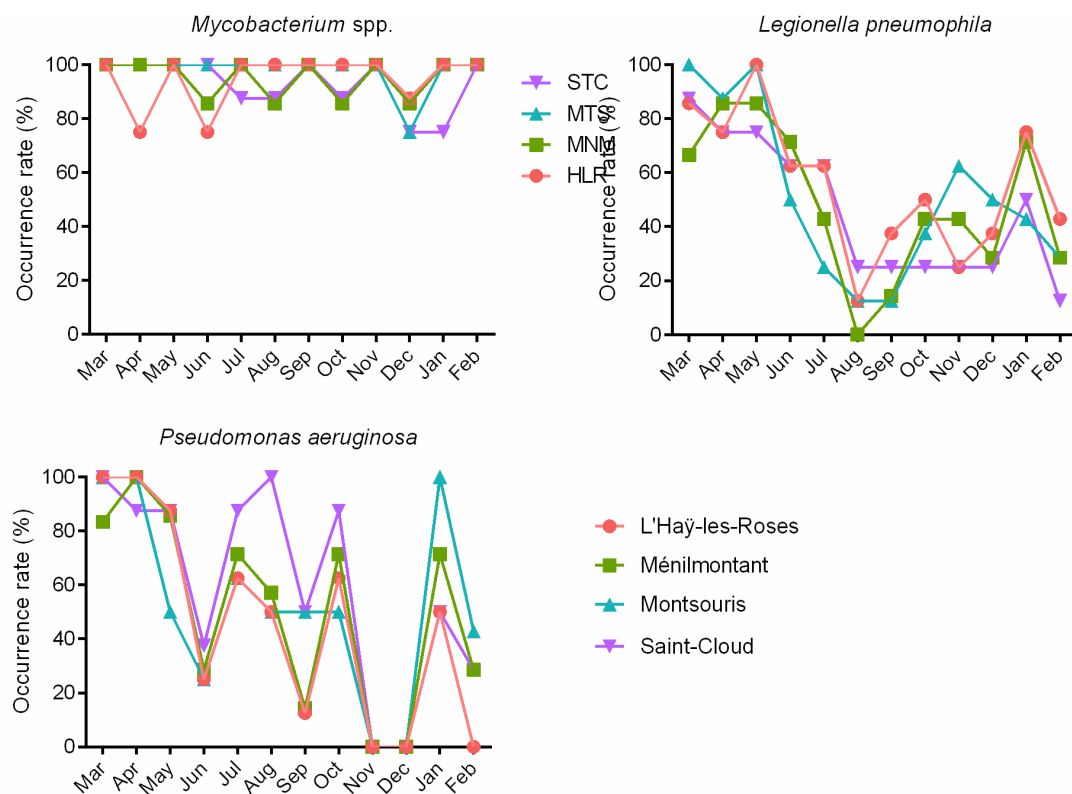
**Table 1 : Occurrence rate (%) of OPPs *Mycobacterium* spp., *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* in drinking water samples of the four DWDSs. HLR : L'Haÿ-les-Roses; MNM : Ménilmontant; MTS : Montsouris; STC : Saint-Cloud.**

Targeted organisms	Samples (n=368)				Mean
	HLR (n=96)	MNM (n=83)	MTS (n=95)	STC (n=87)	
<i>Mycobacterium</i> spp.	88	79	93	87	95.11%
<i>L. pneumophila</i>	44	40	49	52	50.14%
<i>P. aeruginosa</i>	44	42	50	56	52.17%

From a temporal point of view, the presence of *Mycobacterium* spp. was consistently high over the year with values between 75 and 100% of samples (Figure 2). These high occurrences

were expected since it is assumed that the genus *Mycobacterium* would be ubiquitous in DWDSs (Falkinham, 2016). In addition, our results show that *Mycobacterium* presence was rather stable over the sampling period but it should be underlined that this genus gathers several species that could partly explain both the high occurrence and its stability. On the other hand, the monthly occurrence of *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* was highly variable, ranging from 0 to 100% of samples. These two OPPPs also present a similar pattern since their occurrence was very high and rather stable during the same period from March 2016 to May 2016 and then decrease and fluctuate over the rest of the sampling campaign (Figure 2). These values are in the high range of those reported in similar studies since *L. pneumophila* was detected in 4% to 37% of the samples (Ghanizadeh et al., 2016; King et al., 2016; Rakic et al., 2013; Wang et al., 2012) and *P. aeruginosa* in 1% to 46% of samples (Lu et al., 2015b, 2015a; Wang et al., 2012). These results demonstrate the ability of the three OPPPs to persist in DWDSs and show different patterns over the sampling period.

**Figure 2: Occurrence of *Mycobacterium* spp., *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* in the four DWDSs from March 2016 to February 2017 for each DWDS (n=6 to 8).**

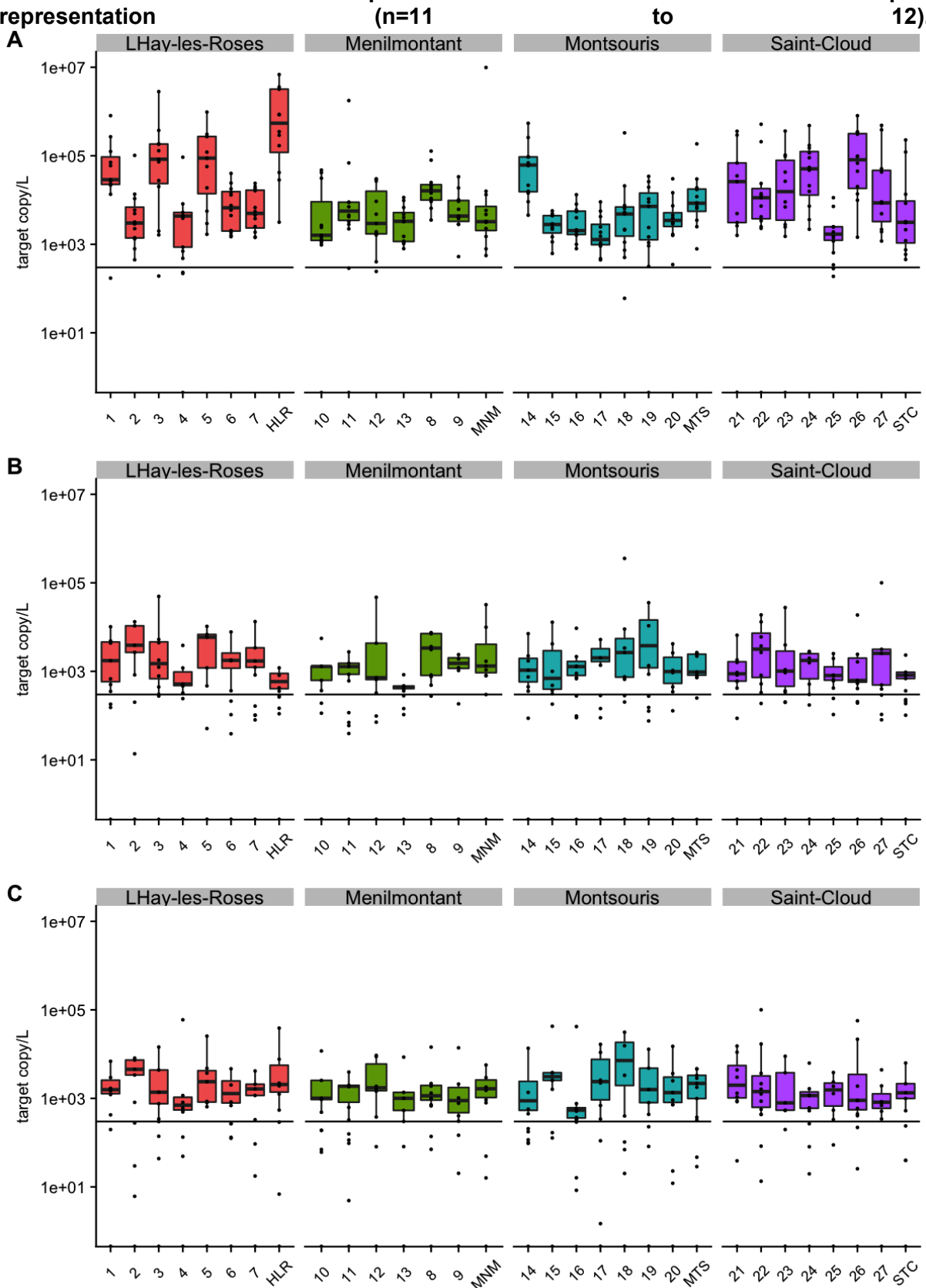


**Mycobacterium spp. concentration was fluctuating in and between the four DWDSs, contrary to other OPPPs**

We assessed the concentration of these OPPPs at different sampling sites of the four DWDSs. For all drinking water samples, the number of copies of each targeted gene was presented in Figure 3. This spatial assessment show that *Mycobacterium* spp. was quite abundant in all sampling sites with a mean copy number ( $\pm$  standard error) of the *atpE* gene of  $1.3 \times 10^5 \pm 3.7 \times 10^4$  copies/L (Figure 3A). The observed concentration is similar with other publications results, where quantifications by molecular technics of *Mycobacterium* spp. have values between  $10^3$  and  $10^5$  gene copies per liter, (Lu et al. 2015; Wang et al. 2012) and in accordance with NGS methods indicating the importance of mycobacteria in water network colonization (Liu et al., 2016; Perrin et al., 2018).

Like our results, the standard errors are very high, thus showing the high variability in the quantification of *Mycobacterium* spp. in DWDS. L'Haÿ-les-Roses DWDS showed significantly higher concentrations of *Mycobacterium* spp. regarding to Ménilmontant and Montsouris DWDSs but not Saint-Cloud DWDS (figure 3A). More specifically, quantifications of *Mycobacterium* spp. were variable within each DWDS. Indeed, within the L'Haÿ-les-Roses DWDS, each sampling site showed different quantifications of *Mycobacterium* spp. than at least one other sampling site (Friedman's test,  $P_{\text{value}} < 0.05$ ). On the other hand, *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* were shown to be present at a lowest concentration than *Mycobacterium*, with an average copy number of  $3.0 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$  and  $2.5 \times 10^3 \pm 4.3 \times 10^2$  copies/L respectively (Figure 3B and 3C). Also, *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* concentrations were rather stable on all DWDS (Friedman's test,  $P_{\text{value}} > 0.05$ ), and no significant difference could be highlighted between the four DWDSs for *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* (Kruskal-Wallis; Pvalue = 0.82 and 0.66, respectively).

**Figure 3: Spatial study of the concentration of OPPPs (A) *Mycobacterium* spp., (B) *L. pneumophila* and (C) *P. aeruginosa* in the four DWDSs according to the sample's location. Numbers from 1 to 27 represent distribution network sites. HLR, MNM, MTS and STC represent the reservoirs. The line corresponds to the limit of quantification. The values below the limit of quantification are not considered for the boxplot representation**





If utilization of qPCR allows a good reliability of results, it also induces detection of viable cells as well as dead cells or free DNA, leading to an overestimation of viable bacteria (Carini et al., 2016; Inkinen et al., 2016). Moreover to represent the exposition of users our measurements were made only on planktonic circulating bacterial communities while biofilm could contain important quantity of bacteria. Nevertheless our results showed that the three targeted OPPPs might be present at high concentrations in the drinking distribution system despite the water treatments.

The concentration of the three OPPPs was also examined according to the location of the samples (reservoir or drinking network) (Figure 3). L'Haÿ-les-Roses DWDS had a significantly higher quantity of *Mycobacterium* spp. within its reservoir compared to its distribution network (Mann-Whitney;  $P_{\text{value}} = 8.2 \cdot 10^{-5}$ ). The other three DWDSs did not show significant difference between reservoirs and distribution networks for *L. pneumophila* and *Mycobacterium* spp. (Mann-Whitney;  $P_{\text{value}} > 0.05$ ). To better evaluate the variations in OPPPs between the reservoir and its distribution network, we correlated the quantifications of each OPPPs with the mean distance between each sampling point and the reservoir that supplies it. Only variations of *Mycobacterium* spp. within L'Haÿ-les-Roses DWDS showed a weak positive correlation with distance (Pearson's  $R = 0.29$ ,  $P_{\text{value}} = 0.008$ ).

Decrease of *Mycobacterium* spp., in one DWDS compared to reservoir (L'Haÿ les Roses) or even the absence of variation between the reservoir and the distribution network for other OPPPs was surprising since in general, the bacterial communities growth in the distribution network (Falkinham et al., 2001; Ling et al., 2018; Torvinen et al., 2004). Dubrou et al. have suggested that competition or exclusion niches existing between mycobacterial species might explain variations of occurrence between production, storage, and distribution locations (Dubrou et al., 2013).

### **The quantification of OPPPs were slightly variable over the year.**

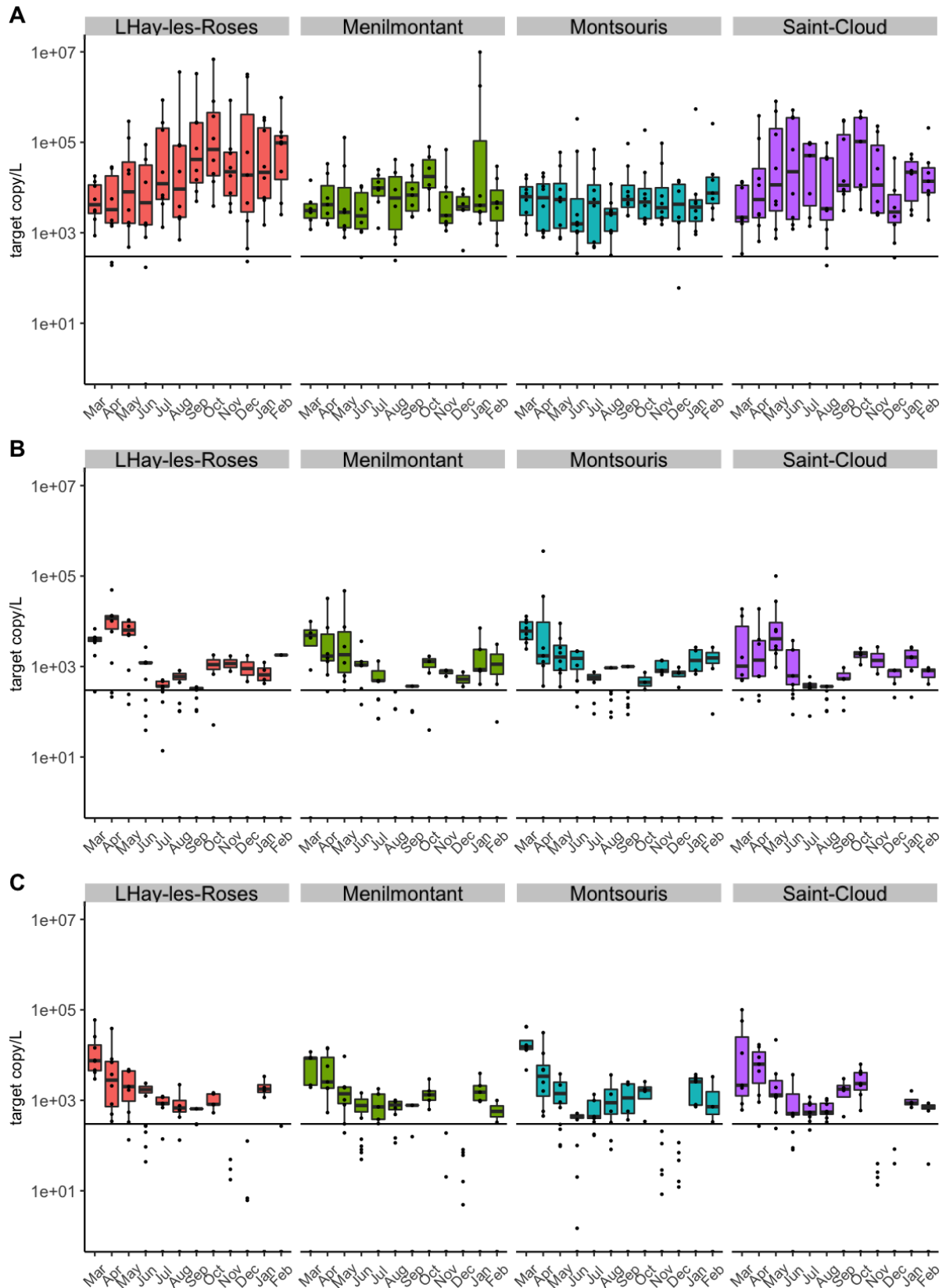
To assess the temporal dynamics, the concentrations of *Mycobacterium* spp., *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* were quantified over one year (Figure 4). The concentration of *Mycobacterium* spp. showed no significant modification throughout the year in Ménilmontant, Montsouris and Saint-Cloud DWDSs (Friedman's test,  $P_{\text{value}} = 0.31$  and  $0.32$ , respectively. In Saint-Cloud DWDS, Significant higher quantities of *Mycobacterium* spp. were recorded in October 2016 regarding to December 2016 (Friedman's test,  $P_{\text{value}} = 0.01$ ). In L'Haÿ-les-Roses DWDS, significant lower quantities of *Mycobacterium* spp. were recorded in April and June

2016 regarding to September and October 2016 (Friedman's test,  $P_{\text{value}} = 2.10^{-4} < 0.05$ ). On the other hand, *L. pneumophila* appeared to show a similar pattern in all four DWDSs with an increase of concentration during spring months (March to May 2016) and a stabilization from June 2016 to February 2017. However only the values during the month of March 2016 were higher than the other months for Montsouris DWDS and over the month of May 2016 for the Saint-Cloud DWDS (Friedman's test;  $P_{\text{value}} < 1.10^{-4}$  and  $P_{\text{value}} = 6.10^{-4}$ , respectively). The quantification of *P. aeruginosa* showed a pattern similar to *L. pneumophila*. For this OPP, the quantities were significantly higher in March and April 2016 for the four DWDSs (Friedman's test,  $P_{\text{value}} < 1.10^{-4}$ ). These results on concentration correlate with the above-mentioned results on occurrence, showing that *Mycobacterium* population was rather stable over the year while *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* population were higher from March to April 2016.

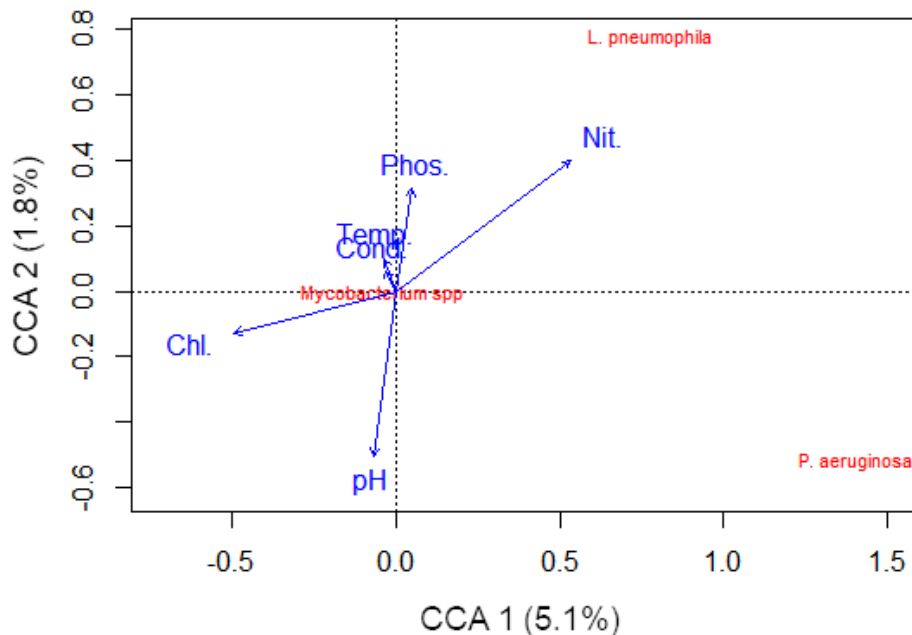
### **Physico-chemical parameters poorly explained the evolution of OPPPs concentrations.**

Quantifications of the three OPPPs were analyzed regarding several physico-chemical parameters (total chlorine, electrical conductivity, pH, temperature, phosphate and nitrate concentrations) that were measured for each drinking water sample. Impact of physico-chemical parameters on the quantity of the three OPPPs was first investigated using CCA. However, the constrained inertia values were very low, representing 6.9 % of the total inertia (Figure 5). These results were unexpected especially for the temperature since OPPPs are usually described as temperature dependent (Inkinen et al 2016). Only variations of *P. aeruginosa* within Montsouris DWDS showed a negative correlation with temperature parameters (Pearson's  $R = -0.37$ ,  $P_{\text{value}} = 1.8.10^{-4}$ ). All the other correlations were not significant ( $P_{\text{value}} > 0.05$ ). Thus, it seems that the physico-chemical parameters of drinking water had very little impact on the concentration of the three OPPPs studied.

**Figure 4: Temporal study of the concentration of OPPPs (A) *Mycobacterium* spp., (B) *L. pneumophila* and (C) *P. aeruginosa* in the four DWDSs from March 2016 to February 2017 for each DWDS. The line corresponds to the limit of quantification per liter. The values below the limit of quantification are not considered for the boxplot representation (n=6 to 8).**



**Figure 5: Influence of physico-chemical parameters on the concentration of the three OPPPs *Mycobacterium* spp., *L. pneumophila* and *P. aeruginosa*, as represented by canonical correspondence analyses (CCA). Chl.= Chlorine concentration, Cond. = Conductivity, Nit. = Nitrate concentration, Phos. = Phosphate concentration, Temp. = Temperature**



Physico-chemical parameters did not provide a response to variations of OPPPs leading us to suppose that the large variation of results on the same point, in particular for *Mycobacterium* spp., could represent a strong noise for statistical analyses. Additionally, the low variation observed for some parameter such as free chlorine and phosphate could also explain the difficulty to observe bacterial fluctuation in relation with water physico-chemical parameter change. It would be likely that these variations are only occasional and are the consequence, for example, of a local detachment of biofilm within the distribution network, resulting from a change in water flow, damage to infrastructure, or a random event (Douterelo et al., 2016; Lehtola et al., 2006). The ability of OPPPs to form or persist in biofilms (Wingender and Flemming, 2011), to interact with amoebae (Bouyer et al., 2006; Delafont et al., 2013; Gebert et al., 2018) could facilitate their persistence in DWDSs. Moreover, numerous publications have shown that *Mycobacterium* spp. Gomez-Alvarez et al., 2012; Lee et al., 2010), *L. pneumophila* (Alleron et al., 2008; Williams and Braun-Howland, 2003), several species of mycobacteria and *P. aeruginosa* (Behnke et al., 2011; Grobe et al., 2001) are tolerant to

residual chlorinated treatments applied in some DWDS and, their tolerance can be exacerbated when developed as biofilm (Steed and Falkinham, 2006).

## Conclusion

This report is the first study focusing on the occurrence and quantification of OPPPs such as *Mycobacterium* spp., *L. pneumophila*, *P. aeruginosa* in a large DWDS through a large-scale (both spatial and temporal) sampling campaign. The results showed that *Mycobacterium* spp. occurrence was very high and stable, underlying that this bacterium is a common inhabitant of this drinking network. Also, the concentration of *Mycobacterium* spp. was rather stable over the year while some variations were reported between the sampling sites. *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* occurrence and concentration were lower than those of *Mycobacterium* spp.. Interestingly, they presented a similar pattern since their occurrence and concentration was higher from March to May 2016.

We demonstrate that this kind of study is a valuable tool to evaluate the presence of OPPPs and follow water quality from a bacterial point of view. Finally, it would be interesting to implement viable qPCR to get a better estimation of the possible impact of these OPPPs on public health.

## Reference

- Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C., Frère, J., 2008. Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr. Microbiol.* 57, 497–502. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9275-9>
- Ashbolt, N.J., 2015. Environmental (saprozoic) pathogens of engineered water systems: understanding their ecology for risk assessment and management. *Pathog. Basel Switz.* 4, 390–405. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020390>
- Ashbolt, N.J., Grabow, W.O.K., Snozzi, M., 2001. Indicators of microbial water quality, in: *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. Lorna Fewtrell and Jamie Bartram, pp. 289–316.
- Aubry, A., Mougari, F., Reibel, F., Cambau, E., 2017. *Mycobacterium marinum*. *Microbiol. Spectr.* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0038-2016>
- Beauté, J., The European Legionnaires' Disease Surveillance Network, 2017. Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 22. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.27.30566>
- Bédard, E., Charron, D., Lalancette, C., Déziel, E., Prévost, M., 2014. Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 356, 226–234. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12494>
- Behnke, S., Parker, A.E., Woodall, D., Camper, A.K., 2011. Comparing the chlorine disinfection of detached biofilm clusters with those of sessile biofilms and planktonic cells in single- and dual-species cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7176–7184. <https://doi.org/10.1128/AEM.05514-11>
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Atlas, R.M., 1991. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 597–600.
- Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M.-H., Héchard, Y., 2006. Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ. Microbiol.* 9, 1341–1344. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01229.x>
- Carini, P., Marsden, P.J., Leff, J.W., Morgan, E.E., Strickland, M.S., Fierer, N., 2016. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nat. Microbiol.* 2, 16242. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.242>
- Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L., Héchard, Y., 2013. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res.* 47, 6958–6965. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.047>
- Douterelo, I., Husband, S., Loza, V., Boxall, J., 2016. Dynamics of biofilm regrowth in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4155–4168. <https://doi.org/10.1128/AEM.00109-16>
- Dubrou, S., Konjek, J., Macheras, E., Welté, B., Guidicelli, L., Chignon, E., Joyeux, M., Gaillard, J.L., Heym, B., Tully, T., Sapriel, G., 2013. Diversity, community composition, and dynamics of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria in an urban tap water production and distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5498–5508. <https://doi.org/10.1128/AEM.00900-13>
- Falkinham, J.O., 2016. Current epidemiologic trends of the nontuberculous mycobacteria (NTM). *Curr. Environ. Health Rep.* 3, 161–167. <https://doi.org/10.1007/s40572-016-0086-z>
- Falkinham, J.O., 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 177–215.

- Falkinham, J.O., Norton, C.D., LeChevallier, M.W., 2001. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1225–1231. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1225-1231.2001>
- Falkinham, J.O., Pruden, A., Edwards, M., 2015. Opportunistic premise plumbing pathogens: increasingly important pathogens in drinking water. *Pathog. Basel Switz.* 4, 373–386. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020373>
- Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E., 2002. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 506–526.
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., Kubista, M., 2017. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.* 12, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>
- Gebert, M., Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A., Webster, T., Nichols, L., Honda, J., Chan, E., Adjemian, J., Dunn, R., Fierer, N., 2018. Ecological analyses of mycobacteria in showerhead biofilms and their relevance to human health. *bioRxiv* 366088. <https://doi.org/10.1101/366088>
- Ghanizadeh, G., Mirmohamadlou, A., Esmaeli, D., 2016. Predictive parameters of *Legionella pneumophila* occurrence in hospital water: HPCs and plumbing system installation age. *Environ. Monit. Assess.* 188, 536. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5554-2>
- Grobe, S., Wingender, J., Flemming, H.C., 2001. Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204, 139–142. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00085>
- Hlavsa, M.C., Roberts, V.A., Kahler, A.M., Hilborn, E.D., Mecher, T.R., Beach, M.J., Wade, T.J., Yoder, J.S., Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2015. Outbreaks of illness associated with recreational water--United States, 2011-2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 64, 668–672.
- Inkinen, J., Jayaprakash, B., Santo Domingo, J.W., Keinänen-Toivola, M.M., Ryu, H., Pitkänen, T., 2016. Diversity of ribosomal 16S DNA- and RNA-based bacterial community in an office building drinking water system. *J. Appl. Microbiol.* 120, 1723–1738. <https://doi.org/10.1111/jam.13144>
- Joly, P., Falconnet, P.-A., André, J., Weill, N., Reyrolle, M., Vandenesch, F., Maurin, M., Etienne, J., Jarraud, S., 2006. Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: data interpretation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2801–2808. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2801-2808.2006>
- Kasperbauer, S., Huitt, G., 2013. Management of extrapulmonary nontuberculous mycobacterial infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 34, 143–150. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1333576>
- King, D.N., Donohue, M.J., Vesper, S.J., Villegas, E.N., Ware, M.W., Vogel, M.E., Furlong, E.F., Kolpin, D.W., Glassmeyer, S.T., Pfaller, S., 2016. Microbial pathogens in source and treated waters from drinking water treatment plants in the United States and implications for human health. *Sci. Total Environ.* 562, 987–995. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.214>
- Lehtola, M.J., Laxander, M., Miettinen, I.T., Hirvonen, A., Vartiainen, T., Martikainen, P.J., 2006. The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes. *Water Res.* 40, 2151–2160. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.010>
- Ling, F., Whitaker, R., LeChevallier, M.W., Liu, W.-T., 2018. Drinking water microbiome assembly induced by water stagnation. *ISME J.* <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0101-5>
- Liu, T., Kong, W., Chen, N., Zhu, J., Wang, J., He, X., Jin, Y., 2016. Bacterial characterization of Beijing drinking water by flow cytometry and MiSeq sequencing of the 16S rRNA gene. *Ecol. Evol.* 6, 923–934. <https://doi.org/10.1002/ece3.1955>



- Lu, J., Struewing, I., Vereen, E., Kirby, A.E., Levy, K., Moe, C., Ashbolt, N., 2015a. Molecular Detection of *Legionella* spp. and their associations with Mycobacterium spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in a drinking water distribution system. *J. Appl. Microbiol.* 120, 509–521. <https://doi.org/10.1111/jam.12996>
- Lu, J., Struewing, I., Yelton, S., Ashbolt, N., 2015b. Molecular survey of occurrence and quantity of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in municipal drinking water storage tank sediments. *J. Appl. Microbiol.* 119, 278–288. <https://doi.org/10.1111/jam.12831>
- Mao, G., Song, Y., Bartlam, M., Wang, Y., 2018. Long-term effects of residual chlorine on *Pseudomonas aeruginosa* in simulated drinking water fed with low AOC Medium. *Front. Microbiol.* 9, 879. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00879>
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., 2017. vegan: Community Ecology Package.
- Perrin, Y., Bouchon, D., Delafont, V., Moulin, L., Héchard, Y., 2018. Microbiome of drinking water: A full-scale spatio-temporal study to monitor water quality in the Paris distribution system. *Water Res.* 149, 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.013>
- Qin, K., Struewing, I., Domingo, J.S., Lytle, D., Lu, J., 2017. Opportunistic pathogens and microbial communities and their associations with sediment physical parameters in drinking water storage tank sediments. *Pathog. Basel Switz.* 6. <https://doi.org/10.3390/pathogens6040054>
- Radomski, N., Lucas, F.S., Moilleron, R., Cambau, E., Haenn, S., Moulin, L., 2010. Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of Mycobacterium spp. in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7348–7351. <https://doi.org/10.1128/AEM.00942-10>
- Radomski, N., Roguet, A., Lucas, F.S., Veyrier, F.J., Cambau, E., Accrombessi, H., Moilleron, R., Behr, M.A., Moulin, L., 2013. *atpE* gene as a new useful specific molecular target to quantify Mycobacterium in environmental samples. *BMC Microbiol.* 13, 277. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-277>
- Rakic, A., Štambuk-Giljanović, N., Lucija, F., 2013. Monitoring *Legionella pneumophila* in drinking water distribution systems in southern Croatia. *Fresenius Environ. Bull.* 22, 8.
- Räsänen, N.H.J., Rintala, H., Miettinen, I.T., Torvinen, E., 2013. Comparison of culture and qPCR methods in detection of mycobacteria from drinking waters. *Can. J. Microbiol.* 59, 280–286. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0695>
- Ratjen, F., Döring, G., 2003. Cystic fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* 361, 681–689. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12567-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12567-6)
- Shannon, K.E., Lee, D.-Y., Trevors, J.T., Beaudette, L.A., 2007. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 382, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.039>
- Steed, K.A., Falkinham, J.O., 2006. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4007–4011. <https://doi.org/10.1128/AEM.02573-05>
- Torvinen, E., Suomalainen, S., Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Zacheus, O., Paulin, L., Katila, M.-L., Martikainen, P.J., 2004. Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1973–1981.
- Wang, H., Masters, S., Hong, Y., Stallings, J., Falkinham, J.O., Edwards, M.A., Pruden, A., 2012. Effect of disinfectant, water age, and pipe material on occurrence and persistence of *Legionella*,

- Mycobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa*, and two amoebas. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11566–11574. <https://doi.org/10.1021/es303212a>
- Whiley, H., Keegan, A., Fallowfield, H., Bentham, R., 2014. Detection of *Legionella*, *L. pneumophila* and *Mycobacterium avium* complex (MAC) along potable water distribution pipelines. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 7393–7405. <https://doi.org/10.3390/ijerph110707393>
- Williams, M.M., Braun-Howland, E.B., 2003. Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5463–5471. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5463-5471.2003>
- Wingender, J., Flemming, H.-C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>
- Yu, J.R., Heo, S.T., Lee, K.H., Kim, J., Sung, J.K., Kim, Y.R., Kim, J.W., 2013. Skin and soft tissue infection due to rapidly growing mycobacteria: case series and literature review. *Infect. Chemother.* 45, 85–93. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.1.85>

## **Discussion générale**

# I. Limites et avantages des méthodologies utilisées

## I.1. Le séquençage haut débit

Au cours de ces dernières années, les technologies de séquençage haut débit ont grandement amélioré notre vision de la diversité des communautés bactériennes provenant d'une grande variété d'environnement, dont l'océan (Sogin *et al.* 2006), le sol (Foulon *et al.* 2016), ou le corps humain (Cameron *et al.* 2015). Jusqu'alors, les approches écologiques étaient effectuées par des méthodes de biologie moléculaire fastidieuses et très coûteuses. Elles se faisaient notamment par l'utilisation de méthodologies telles l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) ou le clonage bactérien (Dumestre *et al.* 2002 ; Revetta *et al.* 2016). Les méthodologies de séquençage haut débit ont notamment la capacité de produire plusieurs centaines de milliers, voire millions, de séquences en une seule expérience. De ce fait, la grande profondeur de séquençage qui en résulte permet de détecter des genres bactériens largement sous représentés dans une population et qui n'étaient, jusqu'alors, pas identifiés.

Au cours de notre étude, nous avons choisi d'utiliser la métagénomique ciblée qui, en séquençant un gène spécifique, a permis de caractériser la diversité des communautés bactériennes du réseau de distribution d'eau potable de la ville de Paris. Cependant, les méthodes de séquençage haut débit, dans le cadre de l'écologie microbienne, ne sont pas limitées qu'à ce genre d'approche. Par exemple, un métagénome total consiste au séquençage de l'ensemble de l'ADN disponible et donne accès à des informations telles que la diversité bactérienne, mais aussi d'apprécier la diversité génétique et fonctionnelle de la communauté étudiée. Cette méthodologie a notamment été utilisée sur des communautés bactériennes provenant de l'eau potable en mettant en évidence, par exemple, la forte présence des gènes de résistance au stress oxydant dans un tel environnement (Chao *et al.* 2013, 2015). Un dérivé de la métagénomique ciblée, consistant à séquencer l'ADN complémentaire obtenu à partir de l'ARN de l'échantillon, a aussi été utilisé dans le cadre d'un réseau d'eau potable (Inkinen *et al.* 2016 ; Li *et al.* 2017). Par cette approche, les données obtenues ne concernent que la fraction bactérienne active qui peut différer de façon non négligeable de la communauté obtenue par séquençage d'une extraction d'ADN (Li *et al.* 2017).

Malgré les possibilités et les avantages qu'octroient les technologies de séquençage à haut débit, il est important de garder à l'esprit que ces méthodes présentent plusieurs limites. D'un point de vue méthodologique, chaque étape de la prise en charge et du traitement d'un échantillon peut apporter un biais dans les résultats finaux. En effet, le volume prélevé, la méthode de conservation jusqu'au traitement, ainsi que la porosité et la matière des filtres utilisés pour leur concentration peuvent influencer les résultats finaux (Hinlo *et al.* 2017 ; Majaneva *et al.* 2018 ; Padilla *et al.* 2015).

Outre l'impact de la méthodologie employée pour la préparation des échantillons, les biais inhérents à la biologie moléculaire semblent être les plus cruciaux dans l'étude de la diversité bactérienne d'un environnement. Le gène codant l'ARNr 16S est le marqueur génétique le plus utilisé dans ce domaine. Ce dernier présente neuf régions variables porteuses d'une quantité d'information génétique différente les unes par rapport aux autres, du fait d'une évolution indépendante. Les résultats de séquençage haut-débit en fonction des régions variables montrent donc des résultats différents (Fouhy *et al.* 2016 ; Schloss 2010). Ceci peut notamment être expliqué par la complémentarité plus ou moins bonne d'amorces avec le gène codant l'ARNr 16S de certains groupes bactériens. De ce fait, le caractère universel des amorces n'est que théorique et l'utilisation de paires d'amorces non optimales peut conduire à une sous-représentation (Baker *et al.* 2003) ou une amplification préférentielle de certains taxons bactériens (Klindworth *et al.* 2013 ; Mao *et al.* 2012).

L'introduction accidentelle d'ADN bactérien contaminant lors de la préparation des échantillons est un biais décrit dans l'utilisation de méthode de biologie moléculaire. Étonnamment, l'eau de qualité biologie moléculaire, les réactifs et les kits d'extraction d'ADN et de PCR peuvent être de potentielles sources de contamination (Bohus *et al.* 2010 ; Glassing *et al.* 2016 ; Salter *et al.* 2014). La présence d'ADN contaminant est problématique lorsque l'environnement étudié présente une faible biomasse bactérienne, tel que l'eau potable. Dans ces cas, les contaminants peuvent être prépondérants vis-à-vis de l'ADN endogène (Salter *et al.* 2014).

Au cours de notre étude, le prélèvement des échantillons étaient soumis aux normes en vigueur. De plus, leur traitement est resté identique tout au long de la campagne d'échantillonnage assurant un minimum de différences méthodologiques entre les échantillons. De plus, en ajoutant des contrôles négatifs à nos analyses, c'est à dire des membranes filtrantes traitées de la même façon que nos échantillons, nous avons pu identifier et éliminer les OTUs considérés comme contaminants, validant de ce fait nos observations. Au regard de la bibliographie scientifique s'intéressant aux communautés bactériennes de

l'eau potable, trop peu de travaux introduisent des échantillons blancs dans leur analyses. Par exemple, sur l'ensemble des travaux utilisés par Santos et collaborateurs pour réaliser une méta-analyse, seulement 2 des 21 études possèdent des échantillons blancs afin d'éliminer les OTUs contaminants (Santos *et al.* 2016).

## **I.2. La culture de la flore hétérotrophe totale**

Les méthodes basées sur la culture microbiennes sont d'une grande simplicité et elles restent les seules exigences réglementaires permettant de juger de la qualité microbiologique et donc de la potabilité d'une eau de consommation. Elles permettent le dénombrement de la flore hétérotrophe totale, qui correspond aux bactéries actives capables de croître sur un milieu solide, pour un coût et une rapidité d'exécution faible. Ainsi, d'éventuelles reprises de croissance au sein du réseau de distribution d'eau potable pourront être détectées, la norme étant que cette flore hétérotrophe totale ne doit pas fluctuer de plus d'un facteur 10 par rapport à la moyenne. Ces analyses n'ayant qu'une vision quantitative de cette flore, nous avons choisi de compléter la méthode par des identifications taxonomiques via la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette méthode permet une identification facile et rapide des isolats bactériens mais est limitée par les banques de profils protéiques disponibles. Ainsi, le cas échéant, l'identification taxonomique a été complétée à l'aide d'un séquençage par la méthode Sanger du gène codant l'ARNr 16S des isolats bactériens.

L'utilisation des méthodologies de culture est, cependant, fortement limitée notamment dans la caractérisation d'une communauté bactérienne quel que soit son environnement d'origine. En effet, les espèces bactériennes ne possèdent pas le même métabolisme et présentent donc des exigences nutritionnelles différentes pour leur croissance. La constitution du milieu de croissance et les conditions de culture utilisées vont de ce fait sélectionner certains membres de la communauté bactérienne. Cette limitation peut être en partie contourner en utilisant des conditions de culture très diversifiées, qu'ils s'agissent des paramètres physico-chimiques (température, pH, ...), ou des nutriments disponibles (Lagier *et al.* 2012). De plus, il est important de prendre en compte l'état physiologique des bactéries. Ces dernières proviennent de l'eau potable, un environnement très pauvre en nutriment et traité par un désinfectant résiduel chloré. De ce fait, les bactéries peuvent être soit mortes, soit vivantes, ou bien toujours métaboliquement active, mais dans l'incapacité de se multiplier. Cet état physiologique est dit "viable mais non cultivable" et est récurrent notamment après différents stress environnementaux. Ces bactéries ne pourront donc pas être observées par des méthodes de culture, tel que l'HPC.

### I.3. Détection et quantification par PCR quantitative

L'utilisation de la PCRq n'a pas pour objectif d'apprécier la diversité d'une communauté bactérienne donnée. Par ces propriétés, cette méthodologie permet de détecter et de quantifier de manière absolue (contrairement aux autres méthodes de biologie moléculaire) un organisme spécifique ou l'expression d'un gène fonctionnel. Le principal avantage est sa grande sensibilité permettant de détecter un nombre de copies de gène très faible. Ainsi, dans le contexte d'un réseau d'eau potable, elle est couramment utilisée pour la détection de pathogènes fécaux ou opportunistes dans l'eau potable (Lu *et al.* 2015 ; Räsänen *et al.* 2013 ; Shannon *et al.* 2007 ; Whiley *et al.* 2014 ; Wilson *et al.* 2003). Dans le cadre des virus, elle est la seule méthodologie permettant de détecter la présence de particules virales dans l'eau (Prevost *et al.* 2016).

Tout comme les méthodologies de séquençage haut débit, la PCRq ne permet pas d'exclure l'ADN libre provenant de cellules mortes (Carini *et al.* 2016). L'application d'un traitement au propidium monoazide (PMA) permet de prévenir la détection par PCRq de ces reliquats de cellules. Les résultats doivent toutefois être interprétés avec précaution puisqu'il a été montré qu'une part importante de l'ADN libre serait potentiellement toujours quantifiable malgré l'application d'un traitement au PMA (Løvvdal *et al.* 2011). De plus, la grande sensibilité de cette méthodologie peut s'avérer être un inconvénient. En effet, les résultats de PCRq peuvent présenter des échantillons dits faux-positifs, parce qu'exempt d'ADN mais présentant un signal positif. Il est donc important d'avoir des contrôles négatifs pour détecter tout événement de contamination dû à des amplifications non-spécifiques, mais aussi de définir la limite de quantification de la méthode afin d'éliminer ces valeurs parasites (Bustin *et al.* 2009 ; Forootan *et al.* 2017).

## II. Avantage de l'utilisation combinée de différentes méthodologies

La section précédente traite des avantages, mais aussi des inconvénients, des méthodologies que nous avons pu utiliser au cours de ces travaux. De ce fait, il peut être intéressant d'étudier une communauté bactérienne d'intérêt à l'aide de différentes méthodologies. Sur les échantillons utilisés au cours de notre analyse par séquençage haut débit, nous avons caractérisé la flore hétérotrophe totale de l'eau potable à l'aide de la méthode de culture. Nous avons aussi étudié la dynamique de trois pathogènes opportunistes (*Mycobacterium* spp., *L. pneumophila* et *P. aeruginosa*), connus comme étant des colonisateurs communs des réseaux de distribution d'eau potable (Falkinham, Pruden, *et al.* 2015), à l'aide de la PCRq. L'utilisation conjointe de ces méthodologies permettrait de passer outre les limites de chacune des méthodes et d'accumuler une quantité d'informations sur les communautés bactériennes qu'il n'aurait pas été possible d'avoir avec une seule méthode.

L'utilisation conjointe de plusieurs méthodes a déjà fait ses preuves dans l'étude des communautés bactériennes de réseaux de distribution d'eau potable. Il est ainsi commun de retrouver des méthodes de quantifications de l'ATP associées à des mesures de la biomasse bactérienne par cytométrie en flux pour l'étude de la stabilité biologique de l'eau potable (Lautenschlager *et al.* 2013 ; Liu *et al.* 2014 ; Nescerecka *et al.* 2014). Les premières études de la diversité de communautés bactériennes réalisées à partir de méthodes de biologie moléculaire faisaient intervenir des techniques telles que la DGGE. Cette technique permettait de visualiser un profil propre à chaque communauté bactérienne au travers des espèces les plus abondantes de la communauté étudiée sans en connaître la taxonomie. Ainsi, cette méthodologie était souvent couplée à un séquençage Sanger pour une identification taxonomique des amplicons d'intérêt (Dumestre *et al.* 2002 ; Jang *et al.* 2011 ; de Vet *et al.* 2009). Au cours de notre étude, par exemple, l'utilisation du séquençage Sanger en complément des résultats obtenus par spectrométrie de masse MALDI-TOF s'est révélée essentielle pour une meilleure caractérisation de la flore hétérotrophe totale.



## II.1. Les Rhizobiales, taxon vraiment majoritaire ?

Une importante population de Rhizobiales a été mise en évidence dans les communautés bactériennes, du réseau d'eau potable de Paris, par séquençage haut débit. Cette dernière est dominée par les genres *Hyphomicrobium* et *Phreatobacter*.

Le genre *Hyphomicrobium* a été décrit dans plusieurs réseaux d'eau potable et dans les biofilms associés (Chao *et al.* 2013, 2015 : 201 ; Stanish *et al.* 2016). Il serait particulièrement abondant dans des réseaux dont les canalisations sont en fonte, matériau similaire à celui utilisé dans les quatre UDI de la ville de Paris (Ren *et al.* 2015). Le genre *Hyphomicrobium* serait prédominant dans d'autres communautés bactériennes de réseaux de distribution d'eau potable (Chao *et al.* 2013, 2015 ; Stanish *et al.* 2016).

Le genre *Phreatobacter* est très peu documenté dans la littérature puisque seulement trois espèces ont été décrites à l'heure actuelle (Kim *et al.* 2018 ; Lee *et al.* 2017 ; Tóth *et al.* 2014). Ce genre bactérien a été décrit comme l'un des membres majoritaires de communautés bactériennes de certains réseaux de distribution d'eau potable sous une ancienne dénomination, la famille *F0723* (Greenspan 2011 ; Stanish *et al.* 2016). Nous n'avons que peu d'informations sur ce genre bactérien. Toutefois, il serait extrêmement bien adapté au milieu oligotrophique puisqu'il a été isolé pour la première fois dans un système de purification d'eau produisant de l'eau ultra pure (Tóth *et al.* 2014).

Ces deux genres bactériens n'ont cependant pas été décrits lors de l'étude de la flore hétérotrophe totale du fait, très certainement, de conditions de croissance limitantes. La croissance d'individus du genre *Hyphomicrobium* nécessite un milieu spécifique contenant notamment du méthanol en source de carbone (selon les recommandations d'ATCC). La croissance de *Phreatobacter* peut, quant à elle, s'effectuer sur milieu R2A. Cependant, les températures d'incubation utilisées (22°C et 37°C) sont sub-optimales pour sa croissance (température optimale de 28°C). Tout comme ces présents travaux, une autre étude a mis en évidence la présence de *Phreatobacter* et d'*Hyphomicrobium* en forte abondance dans l'eau potable par séquençage haut débit sans en confirmer l'activité ou la réelle présence par culture (Greenspan 2011).

## II.2. Écologie des mycobactéries dans le réseau d'eau

Les MNT sont considérées comme des colonisatrices ubiquitaires des réseaux de distribution d'eau potable (Falkinham 2015). En effet, elles ont été décrites comme un taxon majoritaire, voir même comme taxon dominant, dans de nombreux réseaux de distribution d'eau potable divergeant de par leurs eaux d'approvisionnement et donc les traitements appliqués à ces eaux (Gomez-Smith *et al.* 2015 ; Holinger *et al.* 2014 ; Stanish *et al.* 2016). Le réseau de distribution d'eau potable de la ville de Paris ne fait pas exception. Des études précédentes ont mis en évidence la grande diversité des mycobactéries et l'importance des amibes dans l'écologie des mycobactéries au sein de ce réseau (Delafont *et al.* 2014 ; Dubrou *et al.* 2013 ; Le Dantec *et al.* 2002a, 2002b).

Au cours de cette thèse, nous avons pu confirmer que *Mycobacterium* spp. était l'un des acteurs majeurs des communautés bactériennes du réseau de distribution d'eau potable de Paris. En effet, ce genre bactérien est l'un des principaux taxons retrouvés par la méthode de séquençage haut débit (4% d'abondance relative sur l'ensemble du réseau). De plus, le genre *Mycobacterium* représente une part importante de la flore hétérotrophe totale puisque 33,4% des isolats bactériens sont taxonomiquement affiliés à ce dernier. La PCRq a, quant à elle, mis en évidence que les échantillons d'eau potable présentaient une population de mycobactéries de l'ordre de  $10^5$  unités génomiques par litre d'eau. Cet ordre de grandeur est relativement important puisque des concentrations de cellules totales variant entre  $10^6$  et  $10^8$  cellules par litre d'eau potable sont communément retrouvées (Proctor et Hammes 2015). Outre sa prédominance, le genre *Mycobacterium* influe en grande partie sur les variations de la flore hétérotrophe totale qui ont été observées au cours de la campagne d'échantillonnage.

## II.3. Influence des paramètres environnementaux

Au cours de cette étude, des paramètres physico-chimiques ainsi que des paramètres spatio-temporels ont été implémentés aux analyses afin de suivre la dynamique des communautés bactériennes au sein du réseau de distribution d'eau potable de Paris. D'un point de vue général, les trois méthodologies appliquées mettent en évidence un faible impact des paramètres physico-chimiques et spatio-temporels sur la diversité des communautés bactérienne ainsi que sur l'abondance des trois pathogènes opportunistes étudiés. Cependant, il est possible d'observer des événements distincts suivant la méthodologie employée.

Alors que le séquençage haut débit et l'analyse de la flore hétérotrophe totale ne permettent pas d'observer un impact spatial sur la diversité des communautés bactériennes, les résultats de PCRq suggèrent que l'impact se ferait sur les différents taxons indépendamment les uns des autres. En effet, il a pu être observé par PCRq que le genre *Mycobacterium* était significativement plus abondant dans l'UDI L'Haÿ-les-Roses, alors que la méthode de séquençage haut débit ne suggérait qu'il n'y avait aucune modification, autant pour *Mycobacterium* spp. que pour les autres communautés bactériennes. Cette différence est probablement due au fait que le séquençage haut débit ne permet qu'une quantification relative des différents taxons, contrairement à celle de la PCRq qui, elle, est absolue. Toujours d'un point de vue spatial, l'analyse conjointe de la flore hétérotrophe totale et des données de séquençage haut débit permet de supposer que la composition et la structure des communautés bactériennes ne fluctueraient pas dans l'espace, mais que la biomasse bactérienne subirait d'importants changements d'un point de prélèvement à l'autre.

D'autre part, les trois méthodologies semblent suggérer une influence modérée de la temporalité avec toutefois des spécificités propres à chacune. Le séquençage haut débit suggère une augmentation de la diversité bactérienne au cours de la période chaude de l'année mais ne nous renseigne pas sur de potentielles variations de la quantité de bactéries. Les analyses de la flore hétérotrophe totale et de la quantification par PCRq nous permettent d'outrepasser cette limite. Ainsi, selon les résultats de PCRq, les concentrations de *Mycobacterium* spp. seraient significativement plus faibles au cours des mois de printemps comparés au reste de l'année, et celles de *L. pneumophila* et *P. aeruginosa* seraient significativement plus élevées sur la même période. L'analyse de la flore hétérotrophe totale a, quant à elle, mis en évidence une augmentation significative de la biomasse bactérienne au cours des mois d'hiver, et plus spécifiquement pour *Mycobacterium* spp.. L'intégration de la notion de spatialité aux analyses de la flore hétérotrophe totale suggère que ces augmentations sont site-spécifiques et éphémères dans le temps. Ces méthodologies ont donc permis de mettre en évidence des événements non-visibles par séquençage haut débit et qui pourraient potentiellement être des résultantes de désagréments de biofilm très localisées au sein du réseau de distribution (Douterelo *et al.*, 2016 ; Lehtola *et al.*, 2006).

Contrairement aux autres méthodologies, le séquençage haut débit a permis d'observer une variation importante de l'abondance relative des taxons bactériens *Escherichia* et *Legionella* sur la période de juin et juillet 2016. Nous avons supposé que ces modifications puissent être liées aux événements climatiques ayant eu lieu fin mai et début juin 2016. Suite à ces

événements, de fortes crues ont pu être répertoriées sur la Seine et la Marne, sources d’approvisionnement en eau de surface du réseau. Sur le plan écologique, différentes études ont montré que des événements de crues pouvaient considérablement modifier les communautés bactériennes de l’eau brute, avec notamment une augmentation du nombre de bactéries affiliées à des genres connus pour leur pathogénicité vis-à-vis de l’Homme (de Man *et al.* 2014 ; Phanuwan *et al.* 2006 ; Yard *et al.* 2014). Les sources d’eau souterraine, et notamment dans un système karstique tel que le bassin parisien, sont aussi vulnérables aux contaminations via le transfert rapide de l’eau de surface aux nappes par l’intermédiaire de fractures. Par exemple, des bulletins de situations hydrologiques sur les mois de mai et juin 2016 (Annexe B et C, respectivement) montrent que les événements climatiques ont conduit à une recharge rapide des nappes phréatiques. De ce fait, cette recharge a pu conduire à une dégradation de la qualité des eaux souterraines alimentant l’usine de traitement de Saint-Cloud. Ces observations mettent en évidence l’intérêt des technologies de séquençage haut débit dans le suivi microbiologique d’un réseau d’eau potable et la détection fine d’évènements non visibles par les méthodes classiques.

### **III.L’étude individuelle des réseaux d’eau potable**

Au cours de cette étude, les différents jeux de données ont été comparés aux paramètres spatio-temporels et physico-chimiques. Nos résultats ont suggéré une augmentation modérée de la diversité bactérienne au cours de l’été et de l’automne, sans changement de la structure des communautés bactériennes. Au regard de la dispersion spatiale, l’origine de l’eau et/ou les traitements n’ont que peu d’impact sur les communautés bactérienne, les données PCRq suggérant que ce paramètre influe sur les différents taxons indépendamment les uns des autres.

Les observations que nous avons effectuées s’opposent à celles de publications s’intéressant à d’autres réseaux de distribution d’eau potable. Pinto et collaborateurs ont observé que la composition, mais aussi la structure des communautés bactériennes étaient influencées par le paramètre temporel (Pinto *et al.* 2014). D’autres études ont montré une augmentation de la diversité en hiver (Potgieter *et al.* 2018), ou encore une stabilité des communautés bactériennes dans le temps (Roeselers *et al.* 2015). D’un point de vue spatial, des observations contradictoires sont aussi observées. Alors que certains travaux montrent un impact de l’origine de l’eau et/ou des traitements (Gomez-Alvarez *et al.* 2012, 2015 ; Stanish

*et al.* 2016), Liu et collaborateurs suggèrent, tout comme nous, que l'origine de l'eau n'a aucune incidence sur les communautés bactériennes de l'eau potable (Liu *et al.* 2018).

Il est possible que ces observations ne soient vraies qu'à un temps donné. En effet, la répétition de ces travaux à l'identique durant une nouvelle campagne annuelle pourrait mettre en évidence des variations des communautés bactériennes ou des influences de paramètres environnementaux qui ne sont actuellement pas visibles. Il est aussi important de prendre en compte que certaines études, contrairement à nous, se basent sur un très faible échantillonnage qui ne révèle donc pas forcément la dynamique des communautés bactériennes dans l'ensemble du réseau. D'autre part, chaque réseau présente des spécificités différentes, aussi bien au niveau de l'eau d'approvisionnement, des traitements appliqués et des infrastructures du réseau de distribution en lui-même. Les communautés bactériennes présentes vont, de ce fait, être spécifiques à leur réseau de provenance. Comme démontré précédemment, un même paramètre pourra donc influencer de manière différente les communautés bactériennes de deux réseaux distincts. La définition d'un modèle commun de dynamique des communautés bactériennes n'est possible que sur un même réseau, sous réserve que la gestion de ce dernier reste inchangée.

## **Conclusion et perspectives**

Les objectifs de cette étude étaient de caractériser les communautés bactériennes d'un réseau d'eau potable d'un point de vue spatio-temporel, selon différentes méthodologies, ainsi que d'étudier l'influence de paramètres environnementaux sur ces communautés. Les résultats de séquençage étaient particulièrement attendus afin d'évaluer l'intérêt de cette méthodologie dans le suivi microbiologique d'un réseau de distribution d'eau potable.

La première partie des travaux de thèse a été consacrée à la caractérisation des communautés bactériennes par séquençage haut débit. Bien que diversifiée avec 1321 taxons différents identifiés, une grande majorité peut être considérée comme à l'état de traces. Les communautés sont finalement dominées par seulement 15 taxons bactériens ayant une abondance relative supérieure à 1%. Parmi eux, il a pu être noté une présence majoritaire de Rhizobiales, représentés par les genres *Hyphomicrobium* et *Phreatobacter*, de Sphingomonadales, dont *Sphingomonas*, *Sphingopyxis* et *Sphingorhabdus*, et du genre *Mycobacterium*. Étonnamment, l'impact de la spatio-temporalité et des facteurs physico-chimiques s'est avéré limité, révélant de ce fait une certaine stabilité des communautés bactériennes. En effet, aucune différence significative dans la structure et la composition des communautés n'est observée entre les quatre UDI mais aussi entre le réservoir et le réseau de distribution de chaque UDI. D'un point de vue temporel, une augmentation de l'alpha-diversité est observée au cours de la période estivale, mais cela n'impacte pas les populations majoritaires. Cette analyse permet de supposer que l'histoire du réseau de distribution d'eau potable contribuerait majoritairement à la structure et la composition des communautés bactériennes actuellement présentes. Ces communautés semblent cependant sensibles à d'importants changements environnementaux. Il a notamment pu être observé une augmentation de l'abondance d'*Escherichia* et *Legionella* probablement suite aux importants événements climatiques de juin 2016 ayant conduit à un débordement des cours d'eau et une recharge rapide des nappes phréatiques.

La deuxième partie des travaux de thèse visait à apporter un complément d'informations à la première partie par l'utilisation d'autres méthodologies que sont la culture et la PCRq. La comparaison des paramètres spatiaux avec les données de PCRq a permis de mettre en évidence la présence d'une population plus importante de mycobactéries dans l'UDI de L'Hay-les-Roses. Alors que cette observation n'a pas été faite par séquençage haut débit, l'analyse de la flore hétérotrophe totale permet d'aller dans ce sens et de conforter les observations de PCRq. Il a aussi pu être mis en évidence une occurrence élevée de *L. pneumophila* et *P. aeruginosa* au sein du réseau de distribution d'eau potable. L'étude du paramètre temporel

montre des divergences entre les trois méthodologies utilisées. Alors que l'analyse du séquençage haut débit ne met en évidence aucune modification significative de la structure des taxons majoritaires, des variations significatives de la concentration des trois pathogènes opportunistes étudiées par PCRq (*Mycobacterium* spp., *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*) sont observées en début de campagne d'échantillonnage. D'autre part, il a été observé une augmentation de la quantité de bactéries dans les UDI L'Haÿ-les-Roses et Ménilmontant par la méthode de culture HPC. Alors que cette augmentation est due à une élévation du nombre d'UFC de plusieurs genres bactériens dans l'UDI Ménilmontant, le genre *Mycobacterium* est la cause majeure de ces variations au sein de l'UDI L'Haÿ-les-Roses. L'identification des isolats bactériens et la PCRq spécifique au genre *Mycobacterium* soulignent donc l'importance des mycobactéries en tant qu'acteur majeur de l'écologie microbienne du réseau de distribution d'eau potable de la ville de Paris. Le recoupement des données spatiales et temporelles a permis de mettre en évidence que ces variations temporelles étaient localisées uniquement à certains sites d'échantillonnage et non à l'ensemble de l'UDI, suggérant une implication relativement importante des biofilms dans la dynamique des communautés bactériennes de l'eau potable. Aucune variation pouvant être corrélée aux événements climatiques de juin 2016 n'a pu être observé via ces deux méthodologies.

L'ensemble de ces travaux a permis d'évaluer la diversité des communautés bactériennes, ainsi que leur dynamique, dans l'eau potable à l'échelle d'un réseau de distribution grâce à un effort d'échantillonnage conséquent sur une durée d'un an (368 échantillons d'eau potable prélevés). L'étude a montré une certaine stabilité des communautés bactériennes au sein du réseau. Elle a aussi permis de mettre en évidence l'intérêt des méthodes de séquençage haut débit dans la détection de variations fines, invisibles par les méthodes classiques, et potentiellement dues à des événements climatiques. L'utilisation en parallèle de méthodes basées sur la culture et la PCRq a permis de justifier certaines observations faites précédemment mais aussi d'apporter de nouvelles informations sur les communautés bactériennes du réseau d'eau potable. Leur utilisation suggère notamment une forte implication des mycobactéries et potentiellement des biofilms dans la dynamique des communautés bactériennes du réseau d'eau potable de la ville de Paris.

Ces travaux soulèvent cependant plusieurs questions. Les genres *Hyphomicrobium* et *Phreatobacter* dominent les communautés bactériennes du réseau de distribution d'eau potable. Cependant, aucun représentant de ces taxons n'a pu être isolé par la méthode de culture, certainement à cause des conditions d'incubation utilisées. Il serait ainsi intéressant



d'utiliser des protocoles de culture adaptés à chacun de ces genres bactériens afin de confirmer leur présence au sein du réseau d'eau potable. Un métagénome totale pourrait être aussi envisagé afin d'expliquer leur forte abondance par d'éventuelles caractéristiques fonctionnelles particulières. Il a aussi été supposé que les biofilms jouaient un rôle important dans la dynamique des communautés bactériennes, notamment au travers des résultats de l'analyse de la flore hétérotrophe totale. Or, nous n'avons aucune information sur la quantité de biofilms et les communautés bactériennes qui les composent dans le réseau d'eau potable de Paris. Des prélèvements *in situ*, suivis d'un séquençage haut débit, permettraient de compléter ces lacunes. Le genre *Mycobacterium* étant un acteur important des communautés bactériennes, il serait intéressant d'étudier leur diversité par des approches de séquençage, ainsi que leur implication dans les communautés bactériennes des biofilms. Les communautés bactériennes du réseau semblent stables selon les données de séquençage haut débit excepté durant un important évènement climatique. Il serait intéressant de poursuivre ce suivi afin de confirmer les observations que nous avons faites. Dans l'éventualité d'un incident sur le réseau, il pourrait aussi être intéressant de comparer les résultats des méthodes d'analyses classiques à ceux de séquençage haut débit. Ceci permettrait de valider l'utilisation de cette méthodologie dans le suivi de la qualité microbiologique d'un réseau de distribution d'eau potable.

## **Références bibliographiques**

- Allion, A., Lassiaz, S., Peguet, L., Boillot, P., Jacques, S., Peultier, J., et Bonnet, M.-C. (2011). A long term study on biofilm development in drinking water distribution system: Comparison of stainless steel grades with commonly used materials. *Rev. Métallurgie* 108, 259–268.
- Anderson, M.J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46.
- Ashbolt, N.J. (2004). Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* 198, 229–238.
- Ashbolt, N.J. (2015a). Microbial contamination of drinking water and human health from community water systems. *Curr. Environ. Health Rep.* 2, 95–106.
- Ashbolt, N.J. (2015b). Environmental (saprozoic) pathogens of engineered water systems: understanding their ecology for risk assessment and management. *Pathog. Basel Switz.* 4, 390–405.
- Aslan, S., et Cakici, H. (2007). Biological denitrification of drinking water in a slow sand filter. *J. Hazard. Mater.* 148, 253–258.
- Baker, G.C., Smith, J.J., et Cowan, D.A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55, 541–555.
- Barker, J., et Brown, M.R.W. (1994). Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140, 1253–1259.
- Barker, J., Scaife, H., Brown, M.R. (1995). Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2684–2688.
- Beauté, J., et The European Legionnaires' Disease Surveillance Network (2017). Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 22.
- Betancourt, W.Q., et Rose, J.B. (2004). Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.* 126, 219–234.
- Bichai, F., Payment, P., et Barbeau, B. (2008). Protection of waterborne pathogens by higher organisms in drinking water: a review. *Can. J. Microbiol.* 54, 509–524.
- Billinger, M.E., Olivier, K.N., Viboud, C., de Oca, R.M., Steiner, C., Holland, S.M., et Prevots, D.R. (2009). Nontuberculous mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998–2005. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1562–1569.
- Blanc-Potard, A.-B., et Lafay, B. (2003). MgtC as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. *J. Mol. Evol.* 57, 479–486.

- Boe-Hansen, R., Albrechtsen, H.-J., Arvin, E., et Jørgensen, C. (2002). Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions. *Water Res.* 36, 4477–4486.
- Bohus, V., Tóth, E.M., Székely, A.J., Makk, J., Baranyi, K., Patek, G., Schunk, J., et Márialigeti, K. (2010). Microbiological investigation of an industrial ultra-pure supply water plant using cultivation-based and cultivation-independent methods. *Water Res.* 44, 6124–6132.
- Borchardt, M.A., Bradbury, K.R., Gotkowitz, M.B., Cherry, J.A., et Parker, B.L. (2007). Human enteric viruses in groundwater from a confined bedrock aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6606–6612.
- Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J.-F., et Margaritis, I. (2016). Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem. GMS* 35, 107–115.
- Bridle, H. (2013). *Waterborne pathogens: detection methods and applications*. Elsevier
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Cameron, S.J.S., Huws, S.A., Hegarty, M.J., Smith, D.P.M., et Mur, L.A.J. (2015). The human salivary microbiome exhibits temporal stability in bacterial diversity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, fiv091.
- Camper, A.K. (2014). Organic matter, pipe materials, disinfectants and biofilms in distribution systems. In *microbial growth in drinking-water supplies : problems, causes, control and research needs*, D. Van der Kooij, et P.W.J.J. van der Wielen, eds. pp. 73–94.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., et al. (2010a). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., et Knight, R. (2010b). PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 266–267.
- Carini, P., Marsden, P.J., Leff, J.W., Morgan, E.E., Strickland, M.S., et Fierer, N. (2016). Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nat. Microbiol.* 2, 16242.
- Chao, Y., Ma, L., Yang, Y., Ju, F., Zhang, X.-X., Wu, W.-M., et Zhang, T. (2013). Metagenomic analysis reveals significant changes of microbial compositions and protective functions during drinking water treatment. *Sci. Rep.* 3, 3550.

- Chao, Y., Mao, Y., Wang, Z., et Zhang, T. (2015). Diversity and functions of bacterial community in drinking water biofilms revealed by high-throughput sequencing. *Sci. Rep.* 5, 10044.
- Chesney, J.A., Eaton, J.W., et Mahoney, J.R. (1996). Bacterial glutathione: a sacrificial defense against chlorine compounds. *J. Bacteriol.* 178, 2131–2135.
- Chiao, T.-H., Clancy, T.M., Pinto, A., Xi, C., et Raskin, L. (2014). Differential resistance of drinking water bacterial populations to monochloramine disinfection. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4038–4047.
- Cirillo, J.D., Falkow, S., et Tompkins, L.S. (1994). Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.* 62, 3254–3261.
- Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., et Bermudez, L.E. (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* 65, 3759–3767.
- Colford, J.M., Roy, S., Beach, M.J., Hightower, A., Shaw, S.E., et Wade, T.J. (2006). A review of household drinking water intervention trials and an approach to the estimation of endemic waterborne gastroenteritis in the United States. *J. Water Health* 4 Suppl 2, 71–88.
- Comte, J., et Giorgio, P.A. del (2010). Linking the patterns of change in composition and function in bacterioplankton successions along environmental gradients. *Ecology* 91, 1466–1476.
- Crivaro, V., Di Popolo, A., Caprio, A., Lambiase, A., Di Resta, M., Borriello, T., Scarcella, A., Triassi, M., et Zarrilli, R. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures. *BMC Infect. Dis.* 9, 70.
- Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B., et Ollevier, F. (2009). Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol. Res.* 164, 593–603.
- Delafont, V. (2015). Diversité et implication des amibes libres dans la survie et la persistance des mycobactéries non tuberculeuses au sein d'un réseau d'eau potable. Université de Poitiers.
- Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L., et Héchard, Y. (2013). Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res.* 47, 6958–6965.
- Delafont, V., Mougari, F., Cambau, E., Joyeux, M., Bouchon, D., Héchard, Y., et Moulin, L. (2014). First evidence of amoebae-mycobacteria association in drinking water network. *Environ. Sci. Technol.* 48, 11872–11882.

- Delafont, V., Bouchon, D., Héchard, Y., et Moulin, L. (2016). Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network. *Water Res.* 100, 382–392.
- Delafont, V., Samba-Louaka, A., Cambau, E., Bouchon, D., Moulin, L., et Héchard, Y. (2017). *Mycobacterium llatzerense*, a waterborne *Mycobacterium*, that resists phagocytosis by *Acanthamoeba castellanii*. *Sci. Rep.* 7, 46270.
- Dietrich, A.M., Glindemann, D., Pizarro, F., Gidi, V., Olivares, M., Araya, M., Camper, A., Duncan, S., Dwyer, S., Whelton, A.J., *et al.* (2004). Health and aesthetic impacts of copper corrosion on drinking water. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 49, 55–62.
- Douterelo, I., Sharpe, R., et Boxall, J. (2014). Bacterial community dynamics during the early stages of biofilm formation in a chlorinated experimental drinking water distribution system: implications for drinking water discolouration. *J. Appl. Microbiol.* 117, 286–301.
- Douterelo, I., Fish, K.E., et Boxall, J.B. (2018). Succession of bacterial and fungal communities within biofilms of a chlorinated drinking water distribution system. *Water Res.* 141, 74–85.
- Dubrou, S., Konjek, J., Macheras, E., Welté, B., Guidicelli, L., Chignon, E., Joyeux, M., Gaillard, J.L., Heym, B., Tully, T., *et al.* (2013). Diversity, community composition, and dynamics of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria in an urban tap water production and distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5498–5508.
- Dumestre, J.-F., Casamayor, E.O., Massana, R., et Pedrós-Alió, C. (2002). Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 209–221.
- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 2460–2461.
- Efstratiou, A., Ongerth, J.E., et Karanis, P. (2017). Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. *Water Res.* 114, 14–22.
- EI-Chakhtoura, J., Prest, E., Saikaly, P., van Loosdrecht, M., Hammes, F., et Vrouwenvelder, H. (2015). Dynamics of bacterial communities before and after distribution in a full-scale drinking water network. *Water Res.* 74, 180–190.
- Eselin, J., Santos, T., et Hébraud, M. (2018). Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face. *Food Microbiol.* 69, 82–88.
- Falkinham, J.O. (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 177–215.

- Falkinham, J.O. (2015). Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clin. Chest Med.* 36, 35–41.
- Falkinham, J.O. (2016). Current epidemiologic trends of the nontuberculous mycobacteria (NTM). *Curr. Environ. Health Rep.* 3, 161–167.
- Falkinham, J.O., Norton, C.D., et LeChevallier, M.W. (2001). Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1225–1231.
- Falkinham, J.O., Pruden, A., et Edwards, M. (2015a). Opportunistic premise plumbing pathogens: increasingly important pathogens in drinking water. *Pathog. Basel Switz.* 4, 373–386.
- Falkinham, J.O., Hilborn, E.D., Arduino, M.J., Pruden, A., et Edwards, M.A. (2015b). Epidemiology and ecology of opportunistic premise plumbing pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Health Perspect.* 123, 749–758.
- Favero, M.S., Carson, L.A., Bond, W.W., et Petersen, N.J. (1971). *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science* 173, 836–838.
- Feil, E.J. (2012). The emergence and spread of dysentery. *Nat. Genet.* 44, 964–965.
- Feugeas, F., Magnin, J.P., Cornet, A., et Rameau, J.J. (1997). Corrosion influencée par les micro-organismes : influence du biofilm sur la corrosion des aciers, techniques et résultats récents. *J. Phys. III* 7, 631–663.
- Fewtrell, L., et Bartram, J. (2001). Water quality: guidelines, standards, and health: assessment of risk and risk management for water-related infectious disease (World Health Organization).
- Fields, B.S., Benson, R.F., et Besser, R.E. (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 506–526.
- Flemming, H.-C., et Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633.
- Flemming, H.-C., Percival, S.L., et Walker, J.T. (2002). Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Sci. Technol. Water Supply* 2, 271–280.
- Flemming, H.-C., Bendinger, B., Exner, M., Gebel, J., Kistemann, T., Schaule, G., Szewzyk, U., et Wingender, J. (2014). The last meters before the tap: where drinking water quality is at risk. In *Microbial growth in drinking-water supplies : problems, causes, control and research needs*, D. Van der Kooij, et P.W.J.J. van der Wielen, eds. pp. 207–238.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., et Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575.

- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., et Kubista, M. (2017). Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.* 12, 1–6.
- Fouhy, F., Clooney, A.G., Stanton, C., Claesson, M.J., et Cotter, P.D. (2016). 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol.* 16.
- Foulon, J., Zappellini, C., Durand, A., Valot, B., Girardclos, O., Blaudez, D., et Chalot, M. (2016). Environmental metabarcoding reveals contrasting microbial communities at two poplar phytomanagement sites. *Sci. Total Environ.* 571, 1230–1240.
- Francisque, A., Rodriguez, M.J., Miranda-Moreno, L.F., Sadiq, R., et Proulx, F. (2009). Modeling of heterotrophic bacteria counts in a water distribution system. *Water Res.* 43, 1075–1087.
- Gaillard, M., Vallaes, T., Vorhölter, F.J., Minoia, M., Werlen, C., Sentchilo, V., Pühler, A., et van der Meer, J.R. (2006). The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. *J. Bacteriol.* 188, 1999–2013.
- Gauthier, V., Gérard, B., Portal, J.-M., Block, J.-C., et Gatel, D. (1999). Organic matter as loose deposits in a drinking water distribution system. *Water Res.* 33, 1014–1026.
- Gebert, M., Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A., Webster, T., Nichols, L., Honda, J., Chan, E., Adjemian, J., Dunn, R., et Fierer, N. (2018). Ecological analyses of mycobacteria in showerhead biofilms and their relevance to human health. *BioRxiv* 366088.
- Glassing, A., Dowd, S.E., Galandiuk, S., Davis, B., et Chiodini, R.J. (2016). Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathog.* 8.
- Gomez-Alvarez, V., Revetta, R.P., et Santo Domingo, J.W. (2012). Metagenomic analyses of drinking water receiving different disinfection treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6095–6102.
- Gomez-Alvarez, V., Humrighouse, B.W., Revetta, R.P., et Santo Domingo, J.W. (2015). Bacterial composition in a metropolitan drinking water distribution system utilizing different source waters. *J. Water Health* 13, 140–151.
- Gomez-Smith, C.K., LaPara, T.M., et Hozalski, R.M. (2015). Sulfate reducing bacteria and mycobacteria dominate the biofilm communities in a chloraminated drinking water distribution system. *Environ. Sci. Technol.* 49, 8432–8440.
- Goodwin, S., McPherson, J.D., et McCombie, W.R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* 17, 333–351.



- Greenspan, A. (2011). Evaluation of the heterotrophic plate count test for drinking water safety: comparing culture-based vs. molecular methods for identifying bacteria. 27.
- Greub, G., et Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin. Microbiol. Rev. 17, 413–433.
- Grobe, S., Wingender, J., et Flemming, H.C. (2001). Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. Int. J. Hyg. Environ. Health 204, 139–142.
- Grumbein, S., Opitz, M., et Lieleg, O. (2014). Selected metal ions protect *Bacillus subtilis* biofilms from erosion. Metallomics 6, 1441–1450.
- Guédon, G., Libante, V., Coluzzi, C., Payot, S., et Leblond-Bourget, N. (2017). The obscure world of integrative and mobilizable elements, highly widespread elements that pirate bacterial conjugative systems. Genes 8.
- Haig, S.J., Collins, G., Davies, R.L., Dorea, C.C., et Quince, C. (2011). Biological aspects of slow sand filtration: past, present and future. Water Sci. Technol. Water Supply 11, 468–472.
- Haig, S.-J., Quince, C., Davies, R.L., Dorea, C.C., et Collins, G. (2015). The relationship between microbial community evenness and function in slow sand filters. MBio 6, e00729-00715.
- Hammes, F., Salhi, E., Köster, O., Kaiser, H.-P., Egli, T., et von Gunten, U. (2006). Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during the ozonation of drinking water. Water Res. 40, 2275–2286.
- Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Köster, O., et Egli, T. (2008). Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. Water Res. 42, 269–277.
- Hammes, F., Berger, C., Köster, O., et Egli, T. (2010). Assessing biological stability of drinking water without disinfectant residuals in a full-scale water supply system. J. Water Supply Res. Technol. AQUA 59, 31–40.
- Henne, K., Kahlisch, L., Brettar, I., et Höfle, M.G. (2012). Analysis of structure and composition of bacterial core communities in mature drinking water biofilms and bulk water of a citywide network in Germany. Appl. Environ. Microbiol. 78, 3530–3538.
- Hett, E.C., et Rubin, E.J. (2008). Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 72, 126–156.
- Hijnen, W. a. M., Beerendonk, E.F., et Medema, G.J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. Water Res. 40, 3–22.
- Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., et Furlan, E. (2017). Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. PLOS ONE 12, e0179251.

- Hlavsa, M.C., Roberts, V.A., Kahler, A.M., Hilborn, E.D., Mecher, T.R., Beach, M.J., Wade, T.J., Yoder, J.S., et Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2015). Outbreaks of illness associated with recreational water--United States, 2011-2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 64, 668–672.
- Hoefel, D., Monis, P.T., Grooby, W.L., Andrews, S., et Saint, C.P. (2005). Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. *J. Appl. Microbiol.* 99, 175–186.
- Hoffmann, R., et Michel, R. (2001). Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 215–219.
- Holinger, E.P., Ross, K.A., Robertson, C.E., Stevens, M.J., Harris, J.K., et Pace, N.R. (2014). Molecular analysis of point-of-use municipal drinking water microbiology. *Water Res.* 49, 225–235.
- Huisman, L., et Wood, W.E. (1974). Slow sand filtration. *La filtration lente sur sable.*
- Hwang, C., Ling, F., Andersen, G.L., LeChevallier, M.W., et Liu, W.-T. (2012). Microbial community dynamics of an urban drinking water distribution system subjected to phases of chloramination and chlorination treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7856–7865.
- Ibekwe, A.M., Leddy, M.B., Bold, R.M., et Graves, A.K. (2012). Bacterial community composition in low-flowing river water with different sources of pollutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 155–166.
- Inkinen, J., Jayaprakash, B., Santo Domingo, J.W., Keinänen-Toivola, M.M., Ryu, H., et Pitkänen, T. (2016). Diversity of ribosomal 16S DNA- and RNA-based bacterial community in an office building drinking water system. *J. Appl. Microbiol.* 120, 1723–1738.
- Jackson, C.R., Millar, J.J., Payne, J.T., et Ochs, C.A. (2014). Free-living and particle-associated bacterioplankton in large rivers of the Mississippi River basin demonstrate biogeographic patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7186–7195.
- Jang, H.-J., Choi, Y.-J., et Ka, J.-O. (2011). Effects of diverse water pipe materials on bacterial communities and water quality in the annular reactor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 115–123.
- Ji, P., Parks, J., Edwards, M.A., et Pruden, A. (2015). Impact of water chemistry, pipe material and stagnation on the building plumbing microbiome. *PloS One* 10, e0141087.
- Joly, P., Falconnet, P.-A., André, J., Weill, N., Reyrolle, M., Vandenesch, F., Maurin, M., Etienne, J., et Jarraud, S. (2006). Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2801–2808.

- Kaper, J.B., Nataro, J.P., et Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
- Kasperbauer, S., et Huitt, G. (2013). Management of extrapulmonary nontuberculous mycobacterial infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 34, 143–150.
- Katagi, T. (2013). Soil column leaching of pesticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 221, 1–105.
- Kim, S.-J., Ahn, J.-H., Heo, J., Cho, H., Weon, H.-Y., Hong, S.-B., Kim, J.-S., et Kwon, S.-W. (2018). *Phreatobacter cathodiphilus* sp. nov., isolated from a cathode of a microbial fuel cell. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, e1.
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C.F., et Tümmler, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front. Microbiol.* 2, 150.
- Kuris, A.M., Lafferty, K.D., et Sokolow, S.H. (2014). Saprozonosis: a distinctive type of infectious agent. *Trends Parasitol.* 30, 386–393.
- Kurniawan, A., Guntur, Hiraki, A., Fukuda, Y., et Yamamoto, T. (2015). Nutrient ions during biofilm forming process. *Procedia Environ. Sci.* 28, 252–257.
- Lagier, J.-C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Bittar, F., Fournous, G., Gimenez, G., Maraninchi, M., et al. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 1185–1193.
- Lahti, L., Shetty, S., Blake, T., et Salojarvi, J. (2017). Microbiome R package.
- Lau, H.Y., et Ashbolt, N.J. (2009). The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 107, 368–378.
- Lautenschlager, K., Boon, N., Wang, Y., Egli, T., et Hammes, F. (2010). Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. *Water Res.* 44, 4868–4877.
- Lautenschlager, K., Hwang, C., Liu, W.-T., Boon, N., Köster, O., Vrouwenvelder, H., Egli, T., et Hammes, F. (2013). A microbiology-based multi-parametric approach towards assessing biological stability in drinking water distribution networks. *Water Res.* 47, 3015–3025.
- Lautenschlager, K., Hwang, C., Ling, F., Liu, W.-T., Boon, N., Köster, O., Egli, T., et Hammes, F. (2014). Abundance and composition of indigenous bacterial communities in a multi-step biofiltration-based drinking water treatment plant. *Water Res.* 62, 40–52.

- Le Dantec, C., Duguet, J.-P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., et Vincent, V. (2002a). Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1025–1032.
- Le Dantec, C., Duguet, J.-P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., and Vincent, V. (2002b). Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5318–5325.
- LeChevallier, M.W., Babcock, T.M., et Lee, R.G. (1987). Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2714–2724.
- LeChevallier, M.W., Lowry, C.D., et Lee, R.G. (1990). Disinfecting biofilms in a model distribution system. *J. Am. Water Works Assoc.* 82, 87–99.
- Lee, E.-S., Yoon, T.-H., Lee, M.-Y., Han, S.-H., et Ka, J.-O. (2010). Inactivation of environmental mycobacteria by free chlorine and UV. *Water Res.* 44, 1329–1334.
- Lee, S.D., Joung, Y., et Cho, J.-C. (2017). *Phreatobacter stygius* sp. nov., isolated from pieces of wood in a lava cave and emended description of the genus *Phreatobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 3296–3300.
- Li, C., Ling, F., Zhang, M., Liu, W.-T., Li, Y., et Liu, W. (2017a). Characterization of bacterial community dynamics in a full-scale drinking water treatment plant. *J. Environ. Sci. China* 51, 21–30.
- Li, R., Tun, H.M., Jahan, M., Zhang, Z., Kumar, A., Fernando, D., Farenhorst, A., et Khafipour, E. (2017b). Comparison of DNA-, PMA-, and RNA-based 16S rRNA Illumina sequencing for detection of live bacteria in water. *Sci. Rep.* 7, 5752.
- Lin, S.D. (1977). Tastes and odors in water supplies: a review (Illinois State Water Survey).
- Lin, T., Wu, S., et Chen, W. (2014a). Formation potentials of bromate and brominated disinfection by-products in bromide-containing water by ozonation. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 13987–14003.
- Lin, W., Yu, Z., Zhang, H., et Thompson, I.P. (2014b). Diversity and dynamics of microbial communities at each step of treatment plant for potable water generation. *Water Res.* 52, 218–230.
- Ling, F., Whitaker, R., LeChevallier, M.W., et Liu, W.-T. (2018). Drinking water microbiome assembly induced by water stagnation. *ISME J.*
- Lippi, D., Gotuzzo, E., et Caini, S. (2016). Cholera. *Microbiol. Spectr.* 4.
- Liu, G., Verberk, J.Q.J.C., et Van Dijk, J.C. (2013). Bacteriology of drinking water distribution systems: an integral and multidimensional review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9265–9276.
- Liu, G., Bakker, G.L., Li, S., Vreeburg, J.H.G., Verberk, J.Q.J.C., Medema, G.J., Liu, W.T., et Van Dijk, J.C. (2014). Pyrosequencing reveals bacterial communities in unchlorinated

- drinking water distribution system: an integral study of bulk water, suspended solids, loose deposits, and pipe wall biofilm. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5467–5476.
- Liu, G., Ling, F.Q., Mark, E.J. van der, Zhang, X.D., Knezev, A., Verberk, J.Q.J.C., Meer, W.G.J. van der, Medema, G.J., Liu, W.T., et Dijk, J.C. van (2016). Comparison of particle-associated bacteria from a drinking water treatment plant and distribution reservoirs with different water sources. *Sci. Rep.* 6, 20367.
- Liu, G., Zhang, Y., van der Mark, E., Magic-Knezev, A., Pinto, A., van den Bogert, B., Liu, W., van der Meer, W., et Medema, G. (2018). Assessing the origin of bacteria in tap water and distribution system in an unchlorinated drinking water system by SourceTracker using microbial community fingerprints. *Water Res.* 138, 86–96.
- Løvdaal, T., Hovda, M.B., Björkblom, B., et Møller, S.G. (2011). Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. *J. Microbiol. Methods* 85, 164–169.
- Lozupone, C.A., Hamady, M., Kelley, S.T., et Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1576–1585.
- Lu, J., Struewing, I., Yelton, S., et Ashbolt, N. (2015a). Molecular survey of occurrence and quantity of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in municipal drinking water storage tank sediments. *J. Appl. Microbiol.* 119, 278–288.
- Lu, J., Struewing, I., Vereen, E., Kirby, A.E., Levy, K., Moe, C., et Ashbolt, N. (2015b). Molecular Detection of *Legionella* spp. and their associations with *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in a drinking water distribution system. *J. Appl. Microbiol.* 120, 509–521.
- Majaneva, M., Diserud, O.H., Eagle, S.H.C., Boström, E., Hajibabaei, M., et Ekrem, T. (2018). Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Sci. Rep.* 8, 4682.
- de Man, H., van den Berg, H.H.J.L., Leenen, E.J.T.M., Schijven, J.F., Schets, F.M., van der Vliet, J.C., van Knippen, F., et de Roda Husman, A.M. (2014). Quantitative assessment of infection risk from exposure to waterborne pathogens in urban floodwater. *Water Res.* 48, 90–99.
- Mao, D.-P., Zhou, Q., Chen, C.-Y., et Quan, Z.-X. (2012). Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC Microbiol.* 12, 66.
- Mao, G., Song, Y., Bartlam, M., et Wang, Y. (2018). Long-term effects of residual chlorine on *Pseudomonas aeruginosa* in simulated drinking water fed with low AOC medium. *Front. Microbiol.* 9, 879.

- Mathieu, L., Bouteleux, C., Fass, S., Angel, E., et Block, J.C. (2009). Reversible shift in the alpha-, beta- and gamma-proteobacteria populations of drinking water biofilms during discontinuous chlorination. *Water Res.* 43, 3375–3386.
- Mathieu, L., Bertrand, I., Abe, Y., Angel, E., Block, J.C., Skali-Lami, S., et Francius, G. (2014). Drinking water biofilm cohesiveness changes under chlorination or hydrodynamic stress. *Water Res.* 55, 175–184.
- Matilainen, A., Vepsäläinen, M., et Sillanpää, M. (2010). Natural organic matter removal by coagulation during drinking water treatment: a review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 159, 189–197.
- Matz, C., et Kjelleberg, S. (2005). Off the hook – how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* 13, 302–307.
- McCoy, S., et Van Briesen, J. (2012). Temporal variability of bacterial diversity in a chlorinated drinking water distribution system. *J. Environ. Eng.* 138, 786–795.
- McCoy, S.T., et VanBriesen, J.M. (2014). Comparing spatial and temporal diversity of bacteria in a chlorinated drinking water distribution system. *Environ. Eng. Sci.* 31, 32–41.
- McMurdie, P.J., et Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE* 8, e61217.
- Mena, K.D., et Gerba, C.P. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 201, 71–115.
- Messner, M., Shaw, S., Regli, S., Rotert, K., Blank, V., et Soller, J. (2006). An approach for developing a national estimate of waterborne disease due to drinking water and a national estimate model application. *J. Water Health* 4 Suppl 2, 201–240.
- Miltner, E.C., et Bermudez, L.E. (2000). *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1990–1994.
- Neden, D.G., Jones, R.J., Smith, J.R., Kirmeyer, G.J., et Foust, G.W. (1992). Comparing chlorination and chloramination for controlling bacterial regrowth. *J. Am. Water Works Assoc.* 84, 80–88.
- Nescerecka, A., Rubulis, J., Vital, M., Juhna, T., et Hammes, F. (2014). Biological instability in a chlorinated drinking water distribution network. *PLoS One* 9, e96354.
- Nescerecka, A., Hammes, F., et Juhna, T. (2016). A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining. *J. Microbiol. Methods* 131, 172–180.
- Nescerecka, A., Juhna, T., et Hammes, F. (2018). Identifying the underlying causes of biological instability in a full-scale drinking water supply system. *Water Res.* 135, 11–21.

- Niquette, P., Servais, P., et Savoir, R. (2000). Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Water Res.* 34, 1952–1956.
- Niquette, P., Servais, P., et Savoir, R. (2001). Bacterial dynamics in the drinking water distribution system of Brussels. *Water Res.* 35, 675–682.
- Obaro, S.K., Tam, P.-Y.I., et Mintz, E.D. (2017). The unrecognized burden of typhoid fever. *Expert Rev. Vaccines* 16, 249–260.
- Oh, S., Hammes, F., et Liu, W.-T. (2018). Metagenomic characterization of biofilter microbial communities in a full-scale drinking water treatment plant. *Water Res.* 128, 278–285.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., *et al.* (2017). Vegan: community ecology package.
- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 34, 877–886.
- Organisation Mondiale de la Santé (2017a). Guidelines for drinking-water quality.
- Organisation Mondiale de la Santé (2017b). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.
- Oriani, A.S., Sierra, F., et Baldini, M.D. (2018). Effect of chlorine on *Mycobacterium gordonae* and *Mycobacterium chubuense* in planktonic and biofilm state. *Int. J. Mycobacteriology* 7, 122–127.
- Ortenberg, E., et Telsch, B. (2003). Taste and odour problems in potable water. In *The handbook of water and wastewater microbiology*, D. Mara, et N. Horan, eds. (Université de Leeds, UK), pp. 777–779.
- Pacini, F., Società Medico-Fisica di Firenze, et University of Glasgow. Library (1854). Osservazioni microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera Asiatico [electronic resource] (Firenze : Tipografia di Federigo Bencini).
- Padilla, C.C., Ganesh, S., Gantt, S., Huhman, A., Parris, D.J., Sarode, N., et Stewart, F.J. (2015). Standard filtration practices may significantly distort planktonic microbial diversity estimates. *Front. Microbiol.* 6.
- Paulson, J.N., Stine, O.C., Bravo, H.C., et Pop, M. (2013). Robust methods for differential abundance analysis in marker gene surveys. *Nat. Methods* 10, 1200–1202.
- Payne, M. (2008). Lead in drinking water. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* 179, 253–254.
- Payne, J.T., Millar, J.J., Jackson, C.R., et Ochs, C.A. (2017). Patterns of variation in diversity of the Mississippi river microbiome over 1,300 kilometers. *PLoS One* 12, e0174890.

- Phanuwan, C., Takizawa, S., Oguma, K., Katayama, H., Yunika, A., et Ohgaki, S. (2006). Monitoring of human enteric viruses and coliform bacteria in waters after urban flood in Jakarta, Indonesia. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 54, 203–210.
- Pinto, Xi, C., et Raskin, L. (2012). Bacterial community structure in the drinking water microbiome is governed by filtration processes. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8851–8859.
- Pinto, Schroeder, J., Lunn, M., Sloan, W., et Raskin, L. (2014). Spatial-temporal survey and occupancy-abundance modeling to predict bacterial community dynamics in the drinking water microbiome. *MBio* 5, e01135-01114.
- Pitkänen, T. (2013). Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. *J. Microbiol. Methods* 95, 39–47.
- Poitelon, J.-B., Joyeux, M., Welté, B., Duguet, J.-P., Prestel, E., Lespinet, O., et DuBow, M.S. (2009). Assessment of phylogenetic diversity of bacterial microflora in drinking water using serial analysis of ribosomal sequence tags. *Water Res.* 43, 4197–4206.
- Portillo, M.C., Anderson, S.P., et Fierer, N. (2012). Temporal variability in the diversity and composition of stream bacterioplankton communities. *Environ. Microbiol.* 14, 2417–2428.
- Potgieter, S., Pinto, A., Sigudu, M., du Preez, H., Ncube, E., et Venter, S. (2018). Long-term spatial and temporal microbial community dynamics in a large-scale drinking water distribution system with multiple disinfectant regimes. *Water Res.*
- Prasad, B.N.K., et Gupta, S.K. (1978). Preliminary report on the engulement and retention of mycobacteria by trophozoites of exenically grown *Acanthamoeba castellanii* douglas, 1930. *Curr. Sci.* 47, 245–247.
- Prest, E.I., Hammes, F., van Loosdrecht, M.C.M., et Vrouwenvelder, J.S. (2016). Biological stability of drinking water: controlling factors, methods, and challenges. *Front. Microbiol.* 7, 45.
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F.S., Joyeux, M., Moulin, L., et Wurtzer, S. (2016). Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Res.* 91, 68–76.
- Prevost, M., Rompre, A., Coallier, J., Servais, P., Laurent, P., Clement, B., et Lafrance, P. (1998). Suspended bacterial biomass and activity in full-scale drinking water distribution systems: impact of water treatment. *Water Res.*
- Primm, T.P., Lucero, C.A., et Falkinham, J.O. (2004). Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 98–106.
- Proctor, C.R., et Hammes, F. (2015). Drinking water microbiology—from measurement to management. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 87–94.



- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., et Glöckner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Radomski, N., Roguet, A., Lucas, F.S., Veyrier, F.J., Cambau, E., Accrombessi, H., Moilleron, R., Behr, M.A., et Moulin, L. (2013). *atpE* gene as a new useful specific molecular target to quantify *Mycobacterium* in environmental samples. *BMC Microbiol.* 13, 277.
- Räsänen, N.H.J., Rintala, H., Miettinen, I.T., et Torvinen, E. (2013). Comparison of culture and qPCR methods in detection of mycobacteria from drinking waters. *Can. J. Microbiol.* 59, 280–286.
- Ratjen, F., et Döring, G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* 361, 681–689.
- Ren, H., Wang, W., Liu, Y., Liu, S., Lou, L., Cheng, D., He, X., Zhou, X., Qiu, S., Fu, L., et al. (2015). Pyrosequencing analysis of bacterial communities in biofilms from different pipe materials in a city drinking water distribution system of East China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10713–10724.
- Revetta, R.P., Gomez-Alvarez, V., Gerke, T.L., Santo Domingo, J.W., et Ashbolt, N.J. (2016). Changes in bacterial composition of biofilm in a metropolitan drinking water distribution system. *J. Appl. Microbiol.* 121, 294–305.
- Reynolds, K.A., Mena, K.D., et Gerba, C.P. (2008). Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192, 117–158.
- Rivett, M.O., Buss, S.R., Morgan, P., Smith, J.W.N., et Bemment, C.D. (2008). Nitrate attenuation in groundwater: a review of biogeochemical controlling processes. *Water Res.* 42, 4215–4232.
- Roeselers, G., Coolen, J., van der Wielen, P.W.J.J., Jaspers, M.C., Atsma, A., de Graaf, B., et Schuren, F. (2015). Microbial biogeography of drinking water: patterns in phylogenetic diversity across space and time. *Environ. Microbiol.* 17, 2505–2514.
- Ruiz-González, C., Proia, L., Ferrera, I., Gasol, J.M., et Sabater, S. (2013). Effects of large river dam regulation on bacterioplankton community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84, 316–331.
- Saby, S., Leroy, P., et Block, J.C. (1999). *Escherichia coli* resistance to chlorine and glutathione synthesis in response to oxygenation and starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5600–5603.
- Sala-Comorera, L., Blanch, A.R., Vilaró, C., Galofré, B., et García-Aljaro, C. (2017). Heterotrophic monitoring at a drinking water treatment plant by matrix-assisted laser

- desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry after different drinking water treatments. *J. Water Health* 15, 885–897.
- Salter, S.J., Cox, M.J., Turek, E.M., Calus, S.T., Cookson, W.O., Moffatt, M.F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N.J., et Walker, A.W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 12, 87.
- Santos, Q.M.B. los, Schroeder, J.L., Sevillano-Rivera, M.C., Sungthong, R., Ijaz, U.Z., Sloan, W.T., et Pinto, A.J. (2016). Emerging investigators series: microbial communities in full-scale drinking water distribution systems – a meta-analysis. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2, 631–644.
- Schloss, P.D. (2010). The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. *PLoS Comput. Biol.* 6, e1000844.
- Schroeder, E., et Wuertz, S. (2003). Bacteria. In *The handbook of water and wastewater microbiology*, (Université de Leeds, UK), pp. 57–68.
- Scott, B.A., et Pepper, I.L. (2010). Water distribution systems as living ecosystems: impact on taste and odor. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 45, 890–900.
- Sekiguchi, H., Watanabe, M., Nakahara, T., Xu, B., et Uchiyama, H. (2002). Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5142–5150.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J.M., et Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49, 543–551.
- Servais, P., Anzil, A., Gatel, D., et Cavard, J. (2004). Biofilm in the Parisian suburbs drinking water distribution system. *J. Water Supply Res. Technol. AQUA* 53, 313–324.
- Shannon, K.E., Lee, D.-Y., Trevors, J.T., et Beaudette, L.A. (2007). Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 382, 121–129.
- Shrivastava, R., Upreti, R.K., Jain, S.R., Prasad, K.N., Seth, P.K., et Chaturvedi, U.C. (2004). Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 277–283.
- Smeets, P.W.M.H., Medema, G.J., et Dijk, J.C. van (2009). The Dutch secret: how to provide safe drinking water without chlorine in the Netherlands. *Drink. Water Eng. Sci.* 2, 1–14.
- Snow, J. (1855). *On the Mode of Communication of Cholera* (John Churchill).

- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., et Herndl, G.J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12115–12120.
- Srinivasan, S., Harrington, G.W., Xagorarakis, I., et Goel, R. (2008). Factors affecting bulk to total bacteria ratio in drinking water distribution systems. *Water Res.* 42, 3393–3404.
- Stanish, L.F., Hull, N.M., Robertson, C.E., Harris, J.K., Stevens, M.J., Spear, J.R., et Pace, N.R. (2016). Factors influencing bacterial diversity and community composition in municipal drinking waters in the Ohio River basin, USA. *PLoS One* 11, e0157966.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.
- Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M., Fleetwood, D.J., McCallum, N.G., Rossbach, U., Stuart, G.S., et al. (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J. Bacteriol.* 184, 3086–3095.
- Sun, H., Shi, B., Lytle, D.A., Bai, Y., et Wang, D. (2014). Formation and release behavior of iron corrosion products under the influence of bacterial communities in a simulated water distribution system. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16, 576–585.
- Sun, W., Xia, C., Xu, M., Guo, J., et Sun, G. (2017). Seasonality affects the diversity and composition of bacterioplankton communities in Dongjiang River, a drinking water source of Hong Kong. *Front. Microbiol.* 8, 1644.
- Taylor, M., Mediannikov, O., Raoult, D., et Greub, G. (2012). Endosymbiotic bacteria associated with nematodes, ticks and amoebae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 64, 21–31.
- Thomas, J.M., et Ashbolt, N.J. (2011). Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environ. Sci. Technol.* 45, 860–869.
- Thomas, V., Loret, J.-F., Jousset, M., et Greub, G. (2008). Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ. Microbiol.* 10, 2728–2745.
- Thompson, C.N., Duy, P.T., et Baker, S. (2015). The rising dominance of *Shigella sonnei*: An intercontinental shift in the etiology of bacillary dysentery. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003708.
- Torvinen, E., Suomalainen, S., Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Zacheus, O., Paulin, L., Katila, M.-L., et Martikainen, P.J. (2004). Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1973–1981.

- Tóth, E.M., Vengring, A., Homonnay, Z.G., Kéki, Z., Spröer, C., Borsodi, A.K., Márialigeti, K., et Schumann, P. (2014). *Phreatobacter oligotrophus* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from ultrapure water of the water purification system of a power plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 839–845.
- Van der Kooij, D., et van der Wielen, P.W.J.J. (2014). General introduction. In microbial growth in drinking-water supplies : problems, causes, control and research needs, D. Van der Kooij, et P.W.J.J. van der Wielen, eds. pp. 1–32.
- Van Nevel, S., De Roy, K., et Boon, N. (2013). Bacterial invasion potential in water is determined by nutrient availability and the indigenous community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 593–603.
- de Vet, W.W.J.M., Dinkla, I.J.T., Muyzer, G., Rietveld, L.C., et van Loosdrecht, M.C.M. (2009). Molecular characterization of microbial populations in groundwater sources and sand filters for drinking water production. *Water Res.* 43, 182–194.
- Vital, M., Dignum, M., Magic-Knezev, A., Ross, P., Rietveld, L., et Hammes, F. (2012). Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. *Water Res.* 46, 4665–4676.
- Vreeburg, J.H.G., et Boxall, J.B. (2007). Discolouration in potable water distribution systems: a review. *Water Res.* 41, 519–529.
- Wang, F., Li, W., Zhang, J., Qi, W., Zhou, Y., Xiang, Y., et Shi, N. (2017a). Characterization of suspended bacteria from processing units in an advanced drinking water treatment plant of China. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 12176–12184.
- Wang, H., Masters, S., Hong, Y., Stallings, J., Falkinham, J.O., Edwards, M.A., et Pruden, A. (2012). Effect of disinfectant, water age, and pipe material on occurrence and persistence of *Legionella*, mycobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, and two amoebas. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11566–11574.
- Wang, H., Masters, S., Edwards, M.A., Falkinham, J.O., et Pruden, A. (2014). Effect of disinfectant, water age, and pipe materials on bacterial and eukaryotic community structure in drinking water biofilm. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1426–1435.
- Wang, P., Wang, X., Wang, C., Miao, L., Hou, J., et Yuan, Q. (2017b). Shift in bacterioplankton diversity and structure: Influence of anthropogenic disturbances along the Yarlung Tsangpo River on the Tibetan Plateau, China. *Sci. Rep.* 7, 12529.
- Watson, S. (2004). Aquatic taste and odor: a primary signal of drinking-water integrity. *J. Toxicol. Environ. Health A* 67, 1779–1795.
- Watson, S.B., Monis, P., Baker, P., et Giglio, S. (2016). Biochemistry and genetics of taste- and odor-producing cyanobacteria. *Harmful Algae* 54, 112–127.

- Wellinghausen, N., Frost, C., et Marre, R. (2001). Detection of legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3985–3993.
- Whiley, H., Keegan, A., Fallowfield, H., et Bentham, R. (2014). Detection of *Legionella*, *L. pneumophila* and *Mycobacterium avium* complex (MAC) along potable water distribution pipelines. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 11, 7393–7405.
- Whittaker, R.H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21, 213–251.
- Wielen, P.W.J.J. van der, Bakker, G., Atsma, A., Lut, M., Roeselers, G., et Graaf, B. de (2016). A survey of indicator parameters to monitor regrowth in unchlorinated drinking water. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2, 683–692.
- Wilson, D.A., Yen-Lieberman, B., Reischl, U., Gordon, S.M., et Procop, G.W. (2003). Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the mip gene. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3327–3330.
- Wingender, J., et Neu, T.R. (1999). *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function* (Springer Science & Business Media).
- Winter, C., Hein, T., Kavka, G., Mach, R.L., et Farnleitner, A.H. (2007). Longitudinal changes in the bacterial community composition of the Danube River: a whole-river approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 421–431.
- Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., Vos, P.D., Verstraete, W., et Boon, N. (2009). Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* 458, 623–626.
- Xu, D., Li, Y., Song, F., et Gu, T. (2013). Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing bacterium *Bacillus licheniformis*. *Corros. Sci.* 77, 385–390.
- Xu, D., Li, Y., et Gu, T. (2016). Mechanistic modeling of biocorrosion caused by biofilms of sulfate reducing bacteria and acid producing bacteria. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 110, 52–58.
- Yachi, S., et Loreau, M. (1999). Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1463–1468.
- Yard, E.E., Murphy, M.W., Schneeberger, C., Narayanan, J., Hoo, E., Freiman, A., Lewis, L.S., et Hill, V.R. (2014). Microbial and chemical contamination during and after flooding in the Ohio River—Kentucky, 2011. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 49, 1236–1243.
- Zhang, Y., et Edwards, M. (2009). Accelerated chloramine decay and microbial growth by nitrification in premise plumbing. *J. - Am. Water Works Assoc.* 101, 51–62.

- Zhang, Y., Love, N., et Edwards, M. (2009). Nitrification in drinking water systems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 39, 153–208.
- Zhang, Y., Oh, S., et Liu, W.-T. (2017). Impact of drinking water treatment and distribution on the microbiome continuum: an ecological disturbance's perspective. *Environ. Microbiol.* 19, 3163–3174.
- Zlatanović, L., van der Hoek, J.P., et Vreeburg, J.H.G. (2017). An experimental study on the influence of water stagnation and temperature change on water quality in a full-scale domestic drinking water system. *Water Res.* 123, 761–772.

## **Annexes**


## **Annexe A : Métagénomique ciblée de la diversité microbienne au sein d'amibes et d'échantillons d'eau.**

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai contribué à la rédaction d'un article méthodologique intitulé "Targeted metagenomics of microbial diversity in free-living amoebae and water samples" visant à être publié dans une nouvelle édition du livre *Legionella : Methods and Protocols*. Ma contribution à ce chapitre de livre, présenté ci-dessous, a consisté à la rédaction des sections expliquant la méthodologie à appliquer pour isoler l'ADN d'échantillons d'eau et pour la sélection du couple d'amorces utilisé pendant le séquençage.



# Targeted metagenomics of microbial diversity in free-living amoebae and water samples

Vincent Delafont<sup>1</sup>, Yoann Perrin<sup>1,2</sup>, Didier Bouchon<sup>1</sup>, Laurent Moulin<sup>2</sup>, Yann Héchard<sup>1</sup>.

**1** Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Equipes Microbiologie de l'Eau et Ecologie, Evolution, Symbiose, Université de Poitiers, UMR CNRS 7267, F-86073 Poitiers, France. 

**2** Eau de Paris, Direction de la Recherche et du Développement pour la Qualité de l'Eau, R&D Biologie, 33, Avenue Jean Jaurès, F-94200 Ivry sur Seine, France.

## Abstract

The presence of *Legionella spp.* in natural and man-made water systems is a great public health concern, and heavily depends on the presence of free-living amoebae. Taking advantage of the development and affordability of next generation sequencing technology, we present here a method to characterize the whole bacterial community directly from water samples, as well as from isolated free-living amoebae.

**Keywords:** targeted metagenomics, High throughput sequencing, 16S rRNA, Bacteria, Free-living Amoeba

## Introduction

The microbiome of any environment can be characterized by the use of next-generation sequencing (NGS), allowing culture-independent analysis of the microbial diversity [1–3]. In this aim, targeted metagenomics is performed by amplifying a 16S rRNA gene fragment from total DNA and sequencing them. There is only few studies describing the “microbiome” of free-living amoebae [4,5] but several studies described in great details the microbiome of drinking water [6–11] and a recent review has pointed out the importance of NGS for assessment of microbial water quality [12]. We used this approach to characterise both the diversity of amoebae-associated bacteria found in water samples, as well as the microbiome of the water samples themselves. In this aim, water samples were filtered to either cultivate amoebae or extract directly the total DNA. DNA was amplified with bacterial universal primers and the amplicons sequenced to identify the bacteria.

## **Materials**

Prepare all solutions using distilled water. Follow all waste disposal regulations when disposing waste material. All microorganisms handled in this protocol are classified into biosafety level 1. However, we strongly encourage the use of laminar flows when handling those microorganisms, and environmental samples, as these could contain biosafety level 2 microorganisms.

### **Water sampling and filtration**

1. Sterile bottles for sampling (1 L capacity; see note 1).
2. Stainless-steel filtration funnel (Sartorius, reference 16828). Store after sterilization either by autoclaving at 121°C for 20 minutes, or by thorough flame sterilization of each funnel.
3. Vacuum pump (Millipore EZ-Stream™; see note 2)
4. Silicon tubing of an appropriate diameter for the pump and funnels.
5. Sterile cellulose acetate membrane of 0.22 µm porosity (e.g. available from Sartorius and Millipore).
6. Sterile nitrocellulose membrane of 3 µm porosity (e.g. available from Sartorius and Millipore).
7. Stainless steel forceps.
8. Razor blades or scalpels.

## **1.1. Enrichment of environmental free-living amoebae**

1. Page Amoeba Saline: 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM Sodium citrate. Prepare extemporaneously stock solutions of 0.4M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (9.86 g/100 ml), 0.25M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (4.45 g/100 ml), 0.25M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3.4 g/100 ml), 0.05M CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.735 g/100 ml). Filter sterilize each solution through a 0.22 µm sterile filter. For preparing 1 L of Page Amoeba Saline (PAS) buffer, use the stock solutions previously prepared, and add 10 mL of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25 M and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25M, respectively, 8 mL of CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05 M, as well as 1 g of sodium citrate. Complete to 1 L with distilled water, and autoclave at 121°C for 20 minutes. Allow the medium to cool down before use (see note 3).
2. Non-nutrient Agar with PAS (NNA-PAS): Prepare one liter of PAS buffer as described above, and supplement it with 15 g/L of agar. Sterilize by autoclaving at 121°C for 20 minutes. Pour into Petri dishes in sterile condition.
3. *Saccharomyces cerevisiae* strain L40 (ATCC MYA 3332)
4. Sabouraud agar medium. Add into a 1 L glass bottle 10 g peptone, 20 g glucose, 15 g agar, and 500 mL of distilled water. Adjust the pH at 6, and add water for up to 1 L. Sterilize by autoclaving at 121°C for 20 minutes.
5. *Saccharomyces cerevisiae* strain L40 (ATCC MYA 3332) is used as a non-bacterial food source for enriching samples in free-living amoebae. Strike a suspension of *S. cerevisiae* on an agar plate, and incubate for 5 days at 30°C. Resuspend one isolated colony into 500 µL of PAS buffer, and spread evenly onto a Sabouraud agar plate. Collect and resuspend a whole fully-grown *S. cerevisiae* culture by adding 3 mL of PAS buffer onto one Petri dish, using a bacterial cell spreader, and collect the suspension into a clean 15 mL plastic tube. Determine the cell concentration of a 1:100 dilution in PAS of the suspension, by measuring the optical density at 600 nm (one unit of optical density correspond to approximately 1x10<sup>7</sup> yeasts / mL). Adjust the suspension to obtain 5x10<sup>8</sup> yeasts / mL, and store at 4°C for up to two weeks before use.
6. Inverted microscope with 10x and 20x phase contrast magnification.

## **DNA extractions and preparation**

1. Lysis tubes: add 500 mg of Glass beads, 212-300 µm diameter (Sigma-Aldrich; reference G1277), to non-skirted empty FastPrep® 2 mL tubes (MP Biomedicals; reference 115076). Seal tubes using clear caps for FastPrep® tubes (MP Biomedicals; reference 115068). Autoclave at 121°C for 20 minutes.
2. FastPrep® 24 Classic instrument (MP Biomedical; reference 116004500).
3. Proteinase K 20 mg / mL, > 600 mAU / mL (QIAGEN; reference 19131).
4. DNeasy PowerWater kit (QIAGEN; reference 14900-50-NF).

## **Methods**

### **1.1. Water sampling and filtration**

1. Sample water at desired sites and transfer 1 L in a sterile bottle.
2. Mount the filtration unit by assembling the filtration funnels with the pump. Place the outlet tubing either in a sink, or connected to a bottle of a sufficient capacity for containing the whole filtration volume (Figure 1).
3. Dislodge the funnel from the filtration ramp. Using sterile forceps, take one appropriate filter (3 µm porosity nitrocellulose filter when screening for amoebae, or 0.22 µm cellulose acetate filter when screening for total bacteria) and place it onto the frit filter support. Put the funnel back and secure it with the closure clamp.
4. Switch on the vacuum pump and filter water samples by gently pouring the water into the filter-containing funnels.
5. Switch off the vacuum pump once whole samples have been filtered and no remaining water is observed in the funnel.

### **Cultivation and isolation of free-living amoebae**

1. Spread 500 µL of *S. cerevisiae* suspension (prepared as described above) onto one NNA-PAS Petri dish, using a bacterial cell spreader, in sterile condition. Let the plate air dry for approximately 15 minutes.
2. Dislodge the funnel from the filtration ramp. Cut the filter in two halves using sterile razor blade or scalpel, directly onto the frit filter support.
3. Using sterile forceps, transfer the pieces of filter upside down onto NNA-PAS seeded with *S. cerevisiae*.
4. Close the Petri dish and seal it using Parafilm®. Incubate at 30°C for up to one month (note 4).

5. Every two to three days, check the cultures for the presence of amoebae around the filters, by phase contrast microscopy, using 10x and/or 20x magnification. (note 5).

### **DNA isolation from amoeba cultures**

1. Dispose Petri dishes under a laminar flow, prior to opening, in order to work in aseptic conditions.
2. Scrap the surface of the agar plate using a sterile inoculation loop, from cultures showing signs of amoebal development (*i.e.* formation of migration fronts; note 6).
3. Resuspend the collected microorganisms in 200  $\mu$ L of PAS buffer (note 7).
4. Add proteinase K to the samples, to a final concentration of 2 mg / mL. Incubate the sample at 40°C for 30 minutes.
5. Transfer the suspension into a sterile lysis tubes. Using a FastPrep® apparatus, perform a mechanical lysis for 20 seconds at speed 4 (note 8).
6. Transfer the suspension into a sterile microtube, and proceed to DNA extraction, using commercially available kits (note 9).
7. Store DNA extractions at -20°C until further use, or -80°C for long term storage.

### **DNA isolation from water samples**

1. Filter 1 L of water sample on a cellulose acetate filter (0.22  $\mu$ m) as described above, to collect bacterial biomass.
2. Using sterile forceps, transfer one filter into beads tube provided in the DNeasy PowerWater kit, designed for the isolation of genomic DNA from filtered water, being careful that the upper side of the filter is facing inwards the tube (note 10).
3. Proceed to the DNA extraction according to manufacturer recommendations, eluting DNA in a final volume of 100  $\mu$ L.
4. Add 5 $\mu$ L of 3 M sodium acetate, and 200  $\mu$ L of ice-cold molecular biology grade ethanol. Mix thoroughly and incubate for 2 hours to overnight at -20°C.

5. Centrifuge at 10000 g for 15 minutes at 4°C, and discard the supernatant. Let air dry, and resuspend the pellet in 20 µL of elution buffer provided in the DNeasy PowerWater kit.
6. Store DNA extractions at -20°C until further use, or -80°C for long term storage.

### **Targeted sequencing of bacterial communities**

1. The obtained DNA extractions can be used as a matrix for amplicon sequencing of a selected region of the bacterial 16S rRNA gene sequence. Primer choice is crucial for ensuring minimal biases in the subsequent diversity analyses. Bacterial diversity (e.g. total and amoeba-associated bacterial diversity) has been successfully characterized with primer pair U341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') and U926R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3'), using pyrosequencing chemistry. If Illumina-based technology is planned to be used, a shorter fragment must be targeted, obtained for example with primer pair U341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') and Bakt\_805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3').
2. To check the universality of primer pairs, the latter can be confronted to sequence databases such as SILVA, using TestPrime (<https://www.arb-silva.de/search/testprime/>) or the Ribosomal Database Project, using Probe Match (<https://rdp.cme.msu.edu/probematch/>).
3. Getting in touch with sequencing facilities and/or referents will help determine adapted samples requirements for subsequent processing.

### **Notes**

1. If chlorinated water is sampled, sodium thiosulfate can be added in bottle, at a concentration of 20 mg for 1 L of sampled water. This will allow to neutralize the residual chlorine concentration.
2. Alternatively, classical vacuum pumps can be used. However, do place a container connected with a 2 ports connector cap (Duran group, reference 29 310 28 07), between the filtration funnels and the pump.
3. PAS buffer tends to be cloudy when still hot from autoclaving.

4. Environmental screening can be performed at various incubation temperatures, quite often comprised between 20 and 30°C. If one wants to enrich for potentially pathogenic and/or thermotolerant amoebae, incubation temperature of 37°C or higher can be used. If possible, the use of 2 contrasted temperature, either by putting a half filter onto each Petri dish, or by duplicating the initial sample filtration, will allow for a wider recovery of amoeba diversity.
5. Amoebal development is very heterogeneous, and highly dependent of the nature of the sample, as well as the initial amoeba concentration in the filtered sample. Therefore, visualization of amoebal development can occur in two to three days, as well as several weeks after inoculation. After one month, NNA-PAS tends to acidify and dry despite proper sealing. Therefore, prolonging the incubation time above one month will not result in higher chances of amoeba isolation.
6. Careful observation using an inverted phase contrast microscope is required at this step. Different FLA will migrate at different speed, forming thus potentially several migration fronts at distinct places of the Petri dish. Therefore, to ensure the recovery of all grown amoebae, microscopic observation will help to spot the different migration fronts to scrap
7. An optional thermal shock lysis can be applied after resuspension of the microorganisms. This step ensures the full lysis of encysted FLA, although cysts are rarely observed on migration fronts. For an efficient lysis of cysts, plunge freeze the sample for 30 seconds in liquid nitrogen. Then, thaw the samples on a dry bath at 95°C for one minute and a half. Repeat the freeze-thaw cycle five times.
8. After the mechanical lysis step, samples can be foamy, especially to the buffer added with the proteinase K. To get rid of the foam, a quick spin in a microcentrifuge (full speed for 10 to 20 seconds) can be applied.
9. Satisfactory results have been obtained using Kits from Roche® (High Pure PCR Template Preparation Kit, MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit 1), Macherey-Nagel (NucleoSpin® Tissue, NucleoSpin® Microbial DNA), Qiagen (DNeasy Blood and Tissue kit, DNeasy PowerWater kit). If the DNA extraction kit includes an additional treatment step using Proteinase K, it can be omitted, due to the application of a similar step in 4.3.4.
10. The beads tubes containing the filter can be directly frozen down at -20°C for DNA extraction at a later date.

## **Acknowledgement**

This work was supported by the 2015-2020 State-Region Planning Contracts (CPER), European Regional Development Fund (FEDER), intramural funds from the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Poitiers, and Eau de Paris.

## **References**

1. Goodrich, J. K.; Di Rienzi, S. C.; Poole, A. C.; Koren, O.; Walters, W. A.; Caporaso, J. G.; Knight, R.; Ley, R. E. Conducting a Microbiome Study. *Cell* 2014, 158, 250–262, doi:10.1016/j.cell.2014.06.037.
2. Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Walters, W. A.; Gonzalez, A.; Caporaso, J. G.; Knight, R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from Microbial Communities. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 2011, CHAPTER, Unit10.7, doi:10.1002/0471250953.bi1007s36.
3. White, R. A.; Callister, S. J.; Moore, R. J.; Baker, E. S.; Jansson, J. K. The past, present and future of microbiome analyses. *Nat. Protoc.* 2016, 11, 2049–2053, doi:10.1038/nprot.2016.148.
4. Delafont, V.; Brouke, A.; Bouchon, D.; Moulin, L.; Héchard, Y. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res.* 2013, 47, 6958–6965, doi:10.1016/j.watres.2013.07.047.
5. Delafont, V.; Bouchon, D.; Héchard, Y.; Moulin, L. Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network. *Water Res.* 2016, 100, 382–392, doi:10.1016/j.watres.2016.05.044.
6. Pinto, A. J.; Schroeder, J.; Lunn, M.; Sloan, W.; Raskin, L. Spatial-temporal survey and occupancy-abundance modeling to predict bacterial community dynamics in the drinking water microbiome. *MBio* 2014, 5, e01135-14, doi:10.1128/mBio.01135-14.
7. Zhang, Y.; Oh, S.; Liu, W.-T. Impact of drinking water treatment and distribution on the microbiome continuum: an ecological disturbance's perspective. *Environ. Microbiol.* 2017, 19, 3163–3174, doi:10.1111/1462-2920.13800.
8. Pinto, A. J.; Xi, C.; Raskin, L. Bacterial Community Structure in the Drinking Water Microbiome Is Governed by Filtration Processes. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46, 8851–8859,



- doi:10.1021/es302042t.
9. Roeselers, G.; Coolen, J.; van der Wielen, P. W. J. J.; Jaspers, M. C.; Atsma, A.; de Graaf, B.; Schuren, F. Microbial biogeography of drinking water: patterns in phylogenetic diversity across space and time. *Environ. Microbiol.* 2015, 17, 2505–2514, doi:10.1111/1462-2920.12739.
  10. Ji, P.; Parks, J.; Edwards, M. A.; Pruden, A. Impact of Water Chemistry, Pipe Material and Stagnation on the Building Plumbing Microbiome. *PLoS One* 2015, 10, e0141087, doi:10.1371/journal.pone.0141087.
  11. Shaw, J. L. A.; Monis, P.; Weyrich, L. S.; Sawade, E.; Drikas, M.; Cooper, A. J. Using Amplicon Sequencing To Characterize and Monitor Bacterial Diversity in Drinking Water Distribution Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 6463–73, doi:10.1128/AEM.01297-15.
  12. Tan, B.; Ng, C.; Nshimyimana, J. P.; Loh, L. L.; Gin, K. Y.-H.; Thompson, J. R. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 1027, doi:10.3389/fmicb.2015.01027.

## Figures Captions

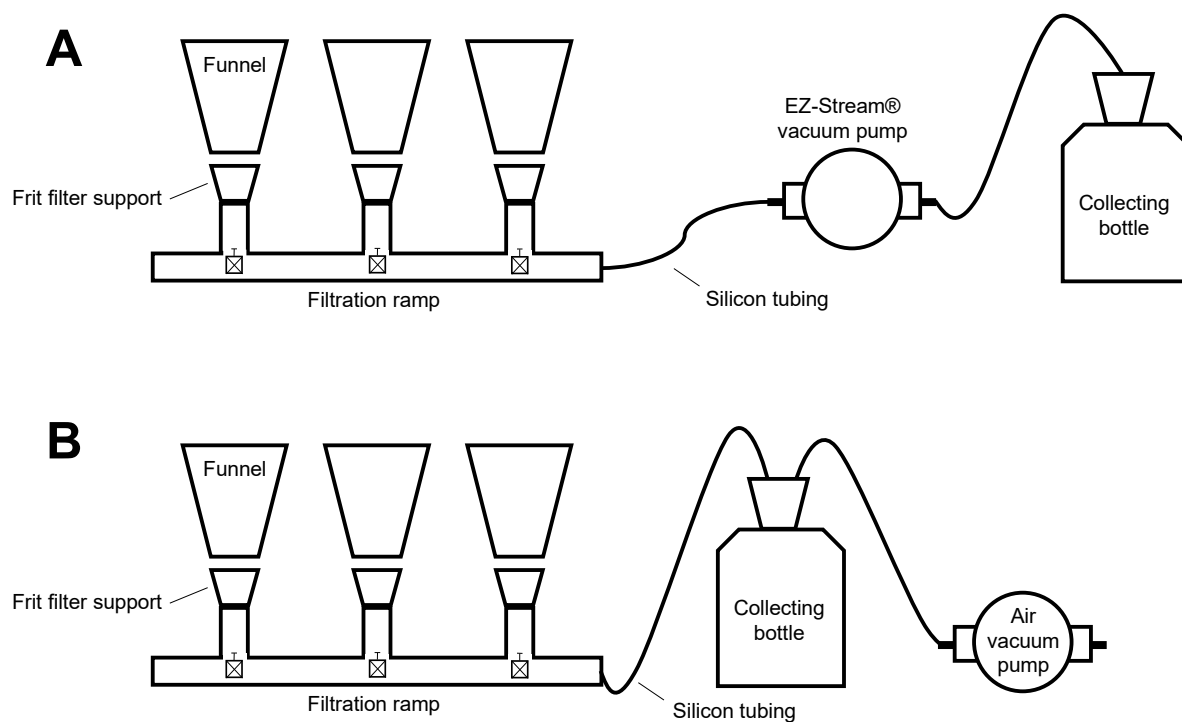


Figure 1: Assembly of the filtration unit, using a filtration ramp connected to a vacuum pump. Panel A illustrates the assembly using a flow-through vacuum pump, such as the EZ-Stream® system (Millipore), while panel B illustrates the assembly using an air vacuum pump.

**Annexe B : Bulletin de situation hydrologique des  
départements de l'Eure et de la Seine-Maritime au  
cours du mois de mai 2016**

# Bulletin de situation hydrologique Eure et Seine-Maritime

Mai

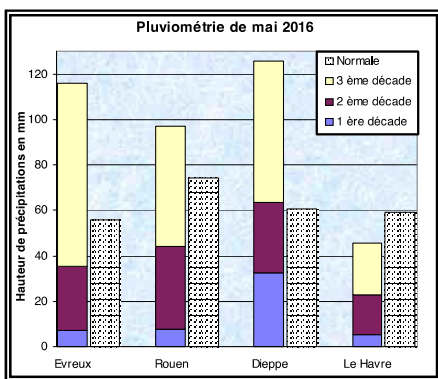
## Résumé du mois :

Au cours du mois de mai, les précipitations, notamment lors de la dernière décade, ont été très importantes et de gros cumuls journaliers ont été enregistrés.

Concernant les eaux souterraines, la recharge hivernale se poursuit en Seine-Maritime mais toujours pas de manière généralisée. Globalement les valeurs sont proches de la médiane. À noter que les ouvrages affichant des valeurs inférieures à la normale se situent dans le sud de la Seine-Maritime.

Pour les eaux superficielles, et par rapport au mois précédent, les débits moyens mensuels et les débits de base sont relativement stables sur la majorité des cours d'eau des deux départements. Ce mois-ci, les valeurs sont supérieures aux normales. Toutefois, sur le Cailly et le Commerce, les valeurs de débits sont toujours faibles pour la saison.

## Pluviométrie de mai « Une pluviométrie très abondante sur l'est »



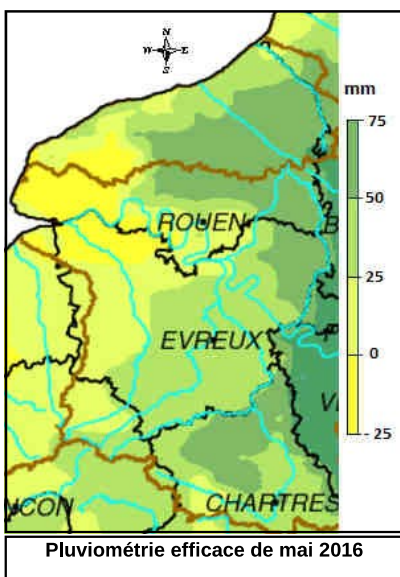
En mai, le cumul pluviométrique est compris entre 50 mm et 150 mm. Les précipitations ont été très denses lors de la troisième décade notamment sur la moitié est des deux départements. De nombreux cumuls journaliers sont à mettre en évidence au cours de ce mois notamment à Evreux avec 29.7 mm le 22 mai et 29.3 mm le 30 mai, à Rouen avec 21.3 mm le 18 mai et à Dieppe avec 31.1 mm le 10 mai, 21.7 mm le 18 mai et 22 mm le 30 mai.

Au cours de ce mois, il a été enregistré :

- 116.1 mm à Evreux (deuxième mois le plus pluvieux depuis 1968) ;
- 97.1 mm à Rouen ;
- 125.8 mm à Dieppe (troisième mois le plus pluvieux depuis 1950) ;
- 45.4mm au Havre.

Par rapport aux normales mensuelles, le cumul des précipitations est largement supérieur aux normales sur la quasi-totalité des deux départements. Seules la pointe de Caux et l'estuaire de Seine affichent des valeurs proches de la normale voire même légèrement inférieures. On relève notamment : +109 % à Evreux, + 31 % à Rouen, + 108 % à Dieppe et - 23 % au Havre.

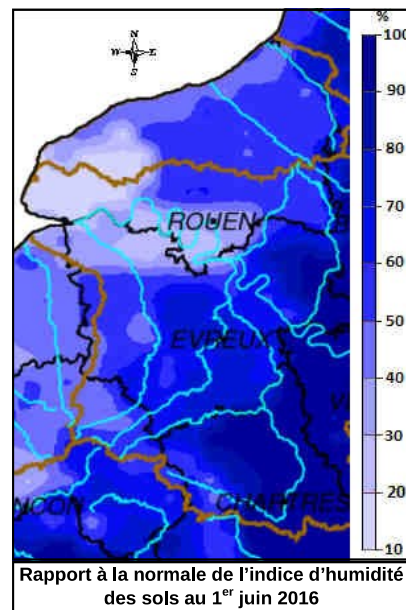
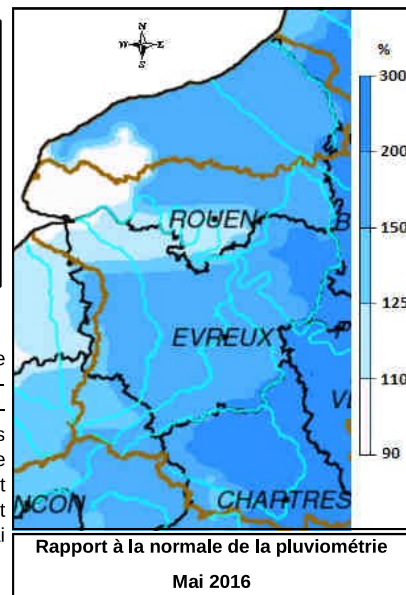
## Pluies efficaces et humidité des sols « Des pluies à nouveau efficaces »



En mai, le cumul de précipitations efficaces (précipitations - évapotranspiration) à la recharge des nappes redevient positif sur une bonne moitié est des deux départements. En effet, malgré une évapotranspiration plus élevée, les précipitations importantes de ce mois permettent d'obtenir des cumuls positifs (compris entre +25 mm et + 75 mm). Seules la pointe de Caux et la vallée de Seine accusent encore un déficit.

Au 1er juin, l'indice d'humidité affiche des valeurs comprises entre 0.65 et 1 (1 étant un sol saturé en eau).

Cette situation révèle une humidité des sols bien plus importante que la normale. Les valeurs sont comprises entre +10 % et + 100 % par rapport à la normale.



Source:



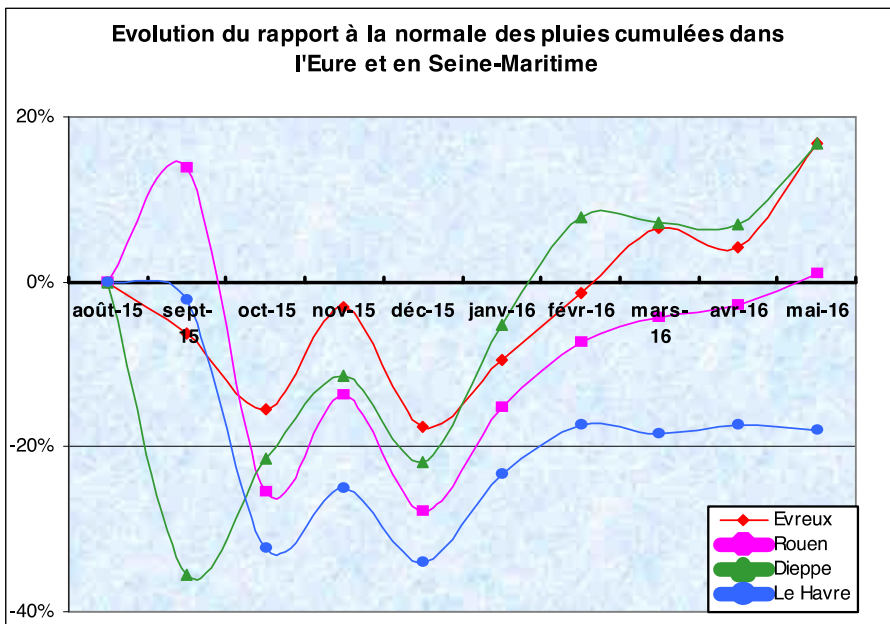
*Nota :* des différences peuvent exister entre les cartes issues de modèles développés par Météo-France et le cumul de précipitations effectivement enregistré par les pluviomètres.



Direction régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement  
NORMANDIE



Pluviométrie sur l'année hydrologique « Les valeurs deviennent excédentaires à l'est »

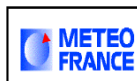


Depuis septembre 2015, début de l'année hydrologique, le cumul de précipitations est proche des normales sur une grande partie des deux départements. En effet, les déficits enregistrés jusqu'en décembre ont été comblés par les mois de janvier à mars.

Grâce aux précipitations de ce dernier mois, le cumul devient excédentaire sur une bonne moitié est des deux départements (entre + 10 % et + 25 %). On relève notamment + 17 % à Evreux, + 1 % à Rouen, + 17 % à Dieppe et - 18 % au Havre.

Concernant les pluies efficaces à la recharge des nappes, le cumul enregistré depuis septembre reste positif que ce soit dans l'Eure ou la Seine-Maritime (compris entre 200 mm et 750 mm) et reste supérieur à celui observé l'année passée (compris entre 0 mm et 400 mm).

Source:



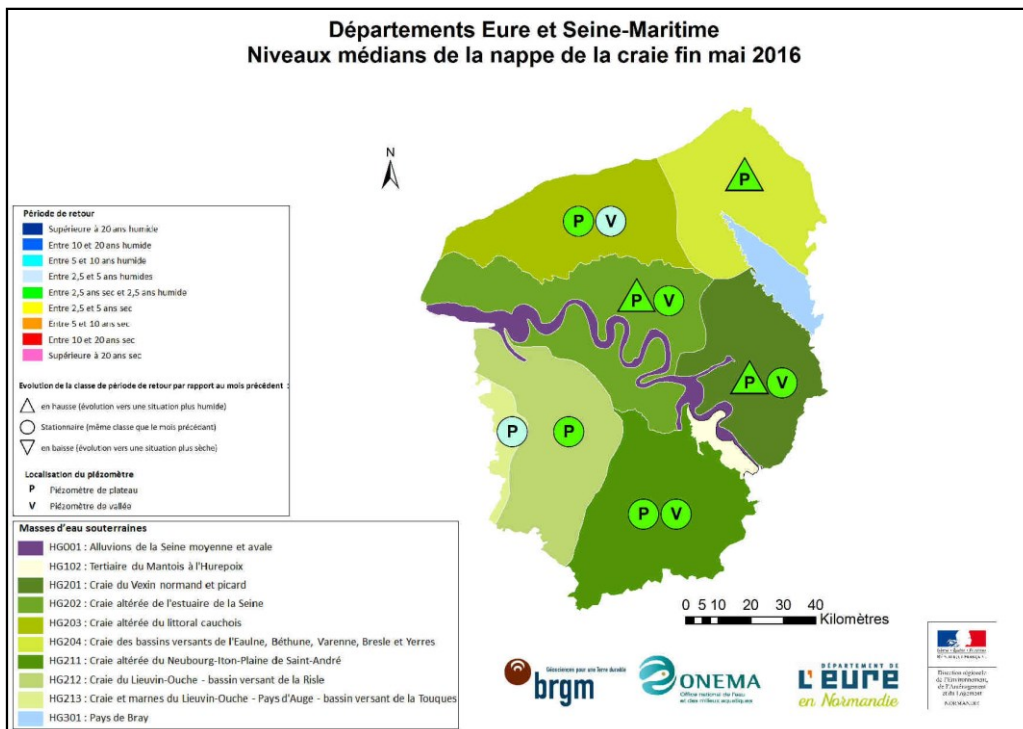
Etat des nappes « Retour à la normale »

La carte ci-contre représente la situation hydrogéologique médiane pour chaque type de piézomètre (situés en plateaux (P) ou en vallées (V)) et pour chaque grande masse d'eau. Elle indique également l'évolution de la fréquence de retour par rapport au mois précédent.

À l'échelle des deux départements, les eaux souterraines enregistrent des fréquences de retour souvent stables par rapport au mois précédent.

On notera tout de même que les ouvrages situés en plateaux de Seine Maritime affichent une amélioration de leur fréquence de retour et sont dorénavant compris entre 2.5 ans sec et 2.5 ans humide.

Les valeurs des fréquences de retour des piézomètres sur les deux départements sont donc très majoritairement proches des normales (valeurs comprises entre 2.5 ans sec et 2.5 ans humide).



Source:





## Piézométrie en Seine-Maritime : « La recharge se poursuit »

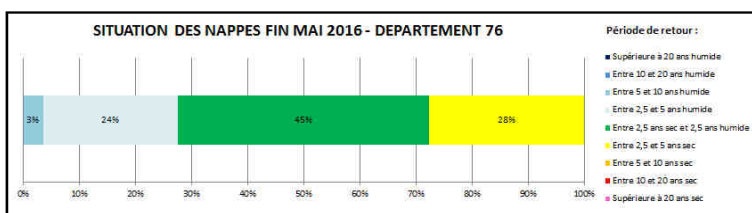
### Par rapport au mois dernier :

Sous les plateaux comme en vallées, la recharge a concerné la moitié des ouvrages (52 %). **La recharge se poursuit donc mais n'est pas généralisée.** Les valeurs sont comprises entre - 1,31 m et + 1,03 m sous les plateaux et entre - 0,03 m et + 0,04 m en vallées. En moyenne, les niveaux sont en augmentation sous les plateaux (+ 0,12 m) et stables en vallées.

### Évolution annuelle :

Sous les plateaux comme en vallées, **la très grande majorité des piézomètres (74%) indiquent des niveaux piézométriques en baisse.** En moyenne, les niveaux sont inférieurs à ceux de mai 2015 de 1,10 m sous les plateaux et semblables (-0,04 m) au droit des vallées.

Ce mois-ci, **la situation est assez hétérogène** à l'échelle du département. **45 % des ouvrages mesurés sont dans une situation proche de la médiane** (entre 2,5 ans sec et 2,5 ans humide). A noter que les piézomètres indiquant des valeurs inférieures à 2,5 ans sec se situent tous dans la moitié sud du département.



## Piézométrie dans l'Eure : « Des valeurs proches des normales »

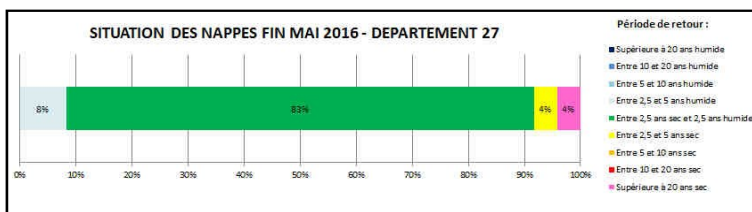
### Par rapport au mois dernier :

Sous les plateaux, la recharge a concerné moins de la moitié des ouvrages (43 %). En vallées la très grande majorité des ouvrages affichent une baisse. La recharge hivernale, arrivée déjà tardivement, semble donc encore faiblir. Les valeurs sont comprises entre - 1,29 m et + 0,76 m sous les plateaux et entre - 1,33 m et + 0,15 m en vallées. En moyenne, les niveaux sont stables sous les plateaux (+ 0,02 m) et en baisse en vallées (- 0,34 m).

### Évolution annuelle :

Sous les plateaux comme en vallées, **la majorité des piézomètres (79 %) indiquent des niveaux piézométriques en baisse.** En moyenne, les niveaux sont inférieurs à ceux de mai 2015 de 0,96 m sous les plateaux et de 0,65 m au droit des vallées.

Ce mois-ci, **la très grande majorité des ouvrages mesurés (83 %) sont dans une situation proche de la médiane** (entre 2,5 ans sec et 2,5 ans humide). Seuls les piézomètres de Chaignes et de Lieurey enregistrent des valeurs inférieures aux normales.



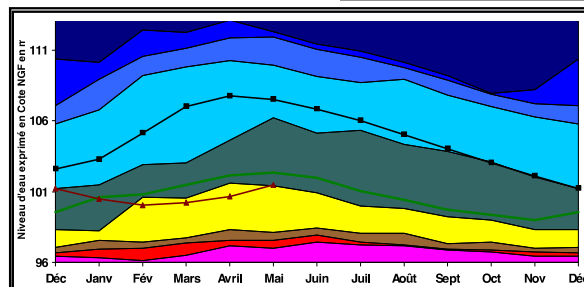
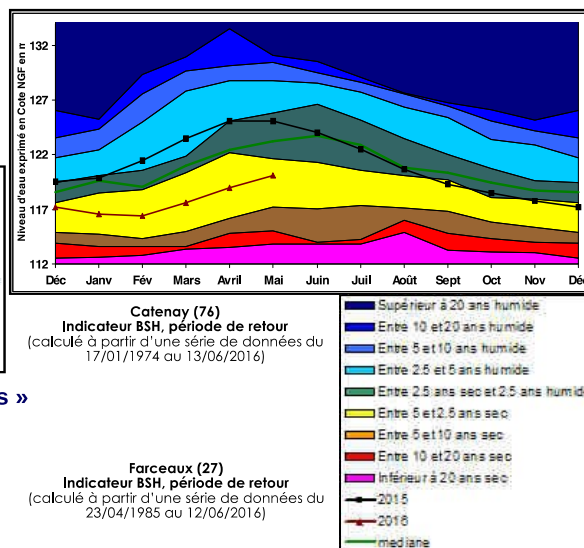
## Résumé :

Au cours du mois de mai 2016, la recharge hivernale arrivée déjà tardivement, semble continuer de s'affaiblir dans l'Eure et se maintient en Seine-Maritime mais n'est pas généralisée.

Plus des 3/4 des piézomètres observés présentent un niveau piézométrique inférieur à celui de mai 2015.

Par rapports aux valeurs interannuelles du mois de mai, on constate que la majorité des ouvrages suivis (83%) sont en situation proche de la médiane (période de retour entre 2,5 ans sec et 2,5 ans humide) dans le département de l'Eure contre seulement 45 % en Seine-Maritime.

À Catenay, la recharge hivernale s'est poursuivie au mois de mai. Les niveaux piézométriques sont nettement inférieurs à ceux de mai 2015 mais l'écart diminue par rapport aux mois précédents. Le piézomètre suivi présente une situation sèche de période de retour entre 2,5 et 5 ans sec (proche de 2,5 ans humide en mai 2015).



A Farceaux la recharge hivernale s'est poursuivie en mai 2016. Le retard de démarrage de la recharge hivernale induit des niveaux piézométriques nettement inférieurs à ceux de mai 2015. La situation est proche d'une situation sèche de période de retour de 2,5 ans sec (elle était entre 2,5 et 5 ans humide en avril 2015).



Débits de base des cours d'eau : « Des valeurs élevées dans l'Eure »



Au cours de ce mois, les débits de base sont très souvent atteints lors de la première quinzaine. Ils sont soit stables (52 % des stations) soit en baisse sur tous les cours d'eau suivis.

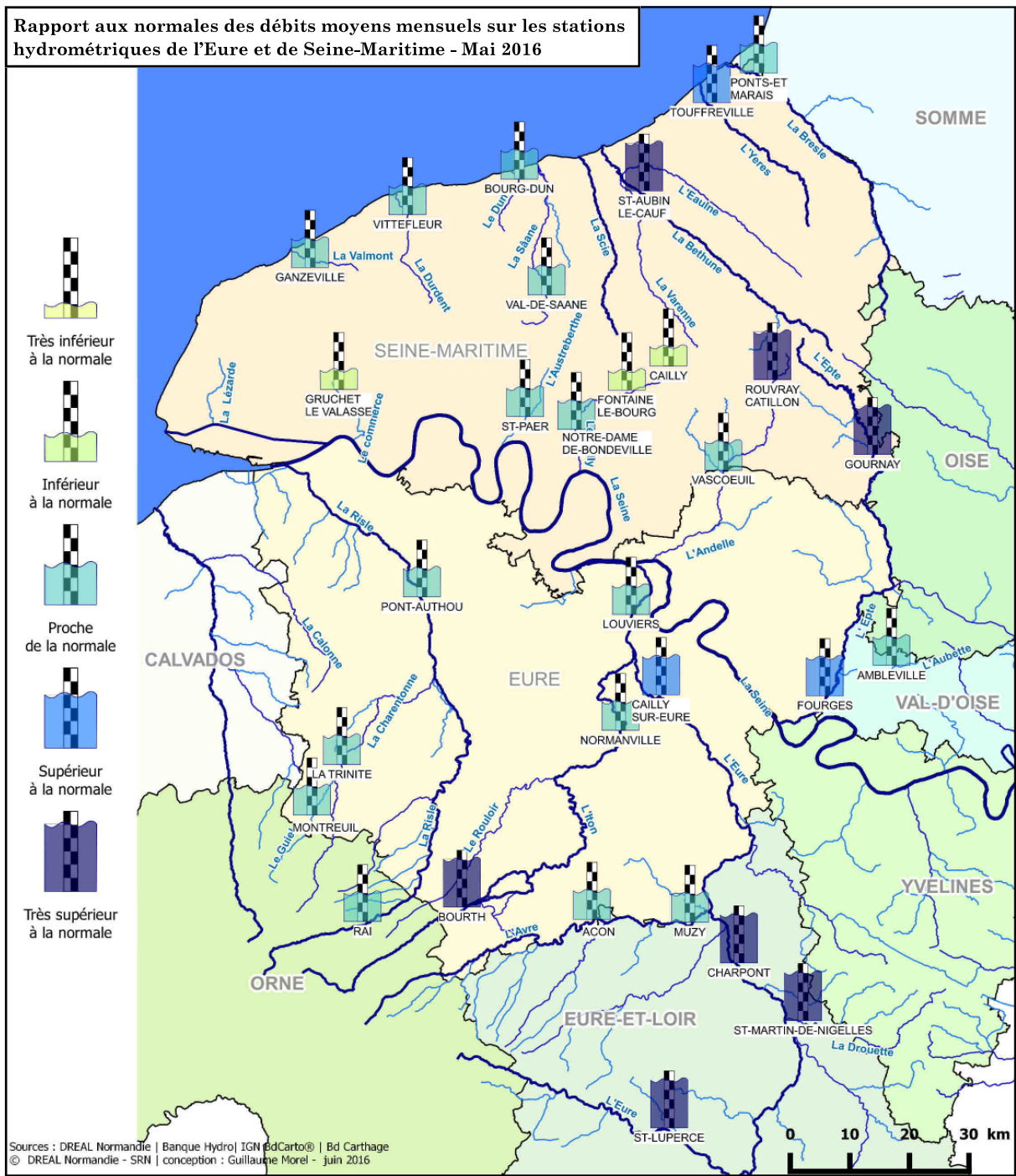
Les fréquences de retour associées sont stables par rapport au mois précédent.

On notera que les stations situées sur l'est des deux départements enregistrent des valeurs supérieures aux normales saisonnières. Elles sont comprises entre la triennale humide sur la Bresle à Ponts-et-Marais et la décennale humide sur l'Epte à Saumont-la-Poterie.

À noter que des stations affichent toujours des valeurs largement inférieures aux normales de saison : le Cailly à Fontaine-le-Bourg (triennale sèche) et le Commerce à Gruchet-le-Valasse (décennale sèche).

Sur le reste des sites suivis, les débits affichent souvent des valeurs conformes aux normales de saison.

Débits moyens mensuels des cours d'eau : « Des débits relativement stables »

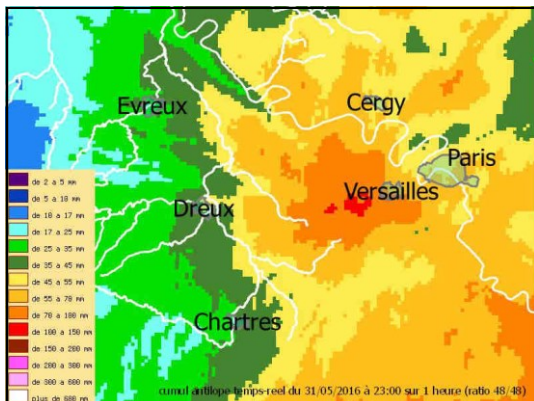


La situation évolue peu par rapport au mois dernier. En effet, sur la majorité des stations (56 %), les débits moyens mensuels sont stables. Par rapport aux normales, la très grande majorité des cours d'eau affichent des valeurs de débit soit proches des normales soit supérieures à la moyenne mensuelle. En moyenne, les débits sont supérieurs de 30 % par rapport à la normale. On notera que sur certains cours d'eau, des crues très importantes ont eu lieu avec parfois des fréquences de retour très élevées. Sur certains cours d'eau les volumes écoulés ont été également très importants et ont fortement influencé les valeurs d'hydraulicité. C'est notamment le cas sur la Béthune à St-Aubin-le-Cauf (+50 % par rapport à la normale), l'Iton à Bourth et l'Eure amont à St-Lupercé et Charpont (+ 60 % par rapport à la normale), l'Andelle amont à Rouvray-Catillon (+100 % par rapport à la normale), l'Epte amont à Gournay (+110 % par rapport à la normale), la Drouette à St-Martin-de-Nigelles (+180 % par rapport à la normale). À contrario, les stations du Commerce à Gruchet-le-Valasse et du Cailly à Fontaine-le-Bourg affichent un déficit respectif de 30 % et 20 %.





## Retour sur les crues de fin mai - début juin 2016



Répartition spatiale du cumul pluviométrique enregistré sur 48 heures le 30 et 31 mai 2016. Source : Météo-France

Du 30 mai au 1er juin, plusieurs cours d'eau de la région ont connu une crue relativement importante. Ce phénomène a touché essentiellement, dans un premier temps, les têtes de bassin situées dans les Yvelines (78). Celui-ci est la résultante d'un cumul pluviométrique compris entre 55 mm et 100 mm sur 48 heures. Sur la carte ci-contre, on notera qu'une zone relativement restreinte (au sud-ouest de Versailles) a enregistré un cumul supérieur à 100 mm sur cette période.

Ce cumul très important fait suite à une première onde de précipitations, datée du 21 mai 2016, ayant apporté environ 50 mm sur le bassin de la Drouette et ayant déjà largement contribué à la saturation des sols.

Par ailleurs, il est à noter que le 29 mai 2016, sur l'amont du bassin versant de l'Iton, un cumul pluviométrique important (33 mm en 7 heures) mais beaucoup plus localisé a également été enregistré, cumulé à l'origine d'une crue de l'Iton et d'inondations. On a notamment relevé 36 mm en 3h sur le pluviomètre de Saint-Hilaire-le-Châtel.

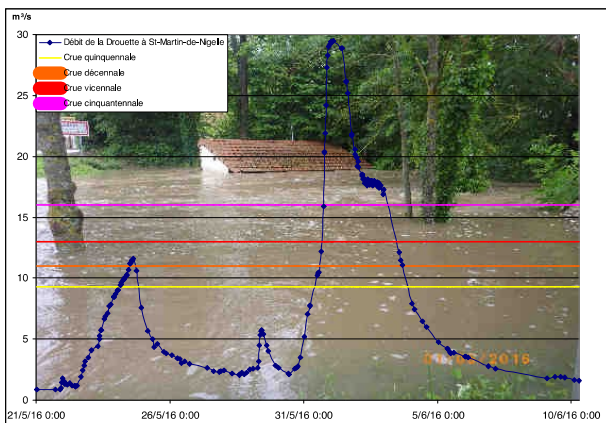
Sur les principales crues relevées sur les deux départements, les fréquences de retour associées à ces événements sont souvent comprises entre la quadriennale humide et la décennale humide :

- Sur le Dun au Bourg-Dun, le débit passe d'environ 0.22 m<sup>3</sup>/s à plus de 4 m<sup>3</sup>/s. Il s'agit d'une crue de fréquence de retour classée en quadriennale humide ;
- Sur l'Yères à Touffreville-sur-Eu et sur la Béthune à St-Aubin-le-Cauf, c'est une crue de fréquence de retour quinquennale humide avec des débits atteignant respectivement 8 m<sup>3</sup>/s et 23.2 m<sup>3</sup>/s ;
- Sur l'Eure à Charpont, la crue a atteint la décennale humide avec un débit passant de 8.7 m<sup>3</sup> à 56 m<sup>3</sup>/s. Il s'agit de la quatrième plus grosse crue enregistrée sur cette station depuis 1987 ;
- Sur l'Iton à Bourth, la crue enregistrée le 30 mai est classée en vicennale humide. Les débits sont passés de 1.3 m<sup>3</sup>/s à plus de 24 m<sup>3</sup>/s. Il s'agit de la deuxième plus grosse crue enregistrée sur cette station depuis 2001.



Crue de l'Iton aux Aspres le 29/05/2016  
Source : Ouest-France

### Zoom sur la Drouette



Hydrogramme de la crue du 1<sup>er</sup> juin sur la Drouette à St-Martin de Nigelle  
Source : DREAL Normandie/SRN/B2HPC

Sur la Drouette, cette crue a été très importante. En effet, une semaine avant cet événement, la Drouette avait déjà enregistré le 24 mai une crue relativement importante (débit supérieur à la décennale humide). Les sols étaient donc déjà très humides avant l'arrivée des cumuls pluviométrique des 30 et 31 mai. Sur l'amont de ce bassin, le cumul pluviométrique enregistré est compris entre 50 mm et 100 mm en 48 heures.

Lors de cet événement, à la station de Saint-Martin-de-Nigelle, la hauteur d'eau est passée de 490 mm (représentant un débit de 2.35 m<sup>3</sup>/s) le 30/05/2016 à 16h15 à 2440 mm le 01/06/2016 à 2h35. Cela représente un débit de pointe de 29.5 m<sup>3</sup>/s au plus fort de l'événement. Pour mémoire, le débit cinquantennal est estimé actuellement à 16 m<sup>3</sup>/s au droit de cette station.

Au total, au cours de cette crue, plus de 6 000 000 de m<sup>3</sup> d'eau se sont écoulés au droit de la station de Saint-Martin-de-Nigelle.

### Suivi de l'événement

Cet événement a fait l'objet d'un suivi particulier par les agents de la DREAL Normandie, en assurant notamment la prévision des crues et l'information des préfetures et des populations lors de cet événement. En effet, les premiers tronçons sont placés en vigilance jaune dès le 29 mai à 10h. Cette vigilance ne sera levée que le 10 juin à 10h. Trente bulletins de situation ont donc été produits au cours de ces treize jours et diffusés via le site internet VIGICRUES (<http://www.vigicrues.gouv.fr/>).

Par ailleurs, sur le terrain, dix-sept jaugeages ont été réalisés au cours des journées avec notamment 29.3 m<sup>3</sup>/s à Saint-Martin-de-Nigelle sur la Drouette, 43.5 m<sup>3</sup>/s et 50.3 m<sup>3</sup>/s à Charpont et Saint-Georges-Motel sur l'Eure, 9.2 m<sup>3</sup>/s sur la Vesgre à Rouvres, et 3.8 m<sup>3</sup>/s à Rouvray-Catillon sur l'Andelle.

Au final, de nombreux débordements ont été constatés sur le linéaire des cours d'eau suivis et des petits affluents de l'Eure.



Débordement de la Drouette à Villiers-le-Morhier le 01/06/2016  
Source : DREAL Normandie/SRN/B2HPC

Ce bulletin est réalisé par l'Unité hydrométrie du Service Ressources de la DREAL Normandie.  
Contacts : Claude GIRARD / Stéphane HELOUIN : b2hpc.srn.dreal-normandie@developpement-durable.gouv.fr

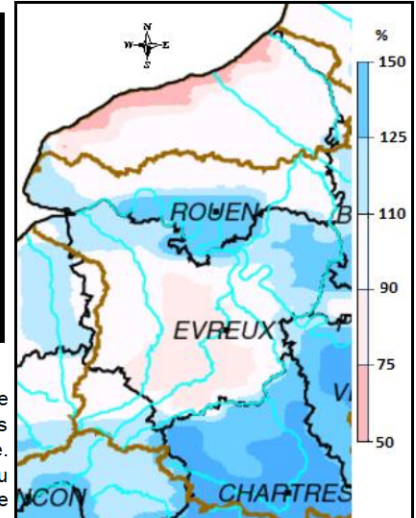
**Annexe C : Bulletin de situation hydrologique des départements de l'Eure et de la Seine-Maritime au cours du mois de juin 2016.**

## Résumé du mois :

Au cours du mois de juin, les précipitations ont été moins importantes que le mois précédent mais restent relativement proches des normales.

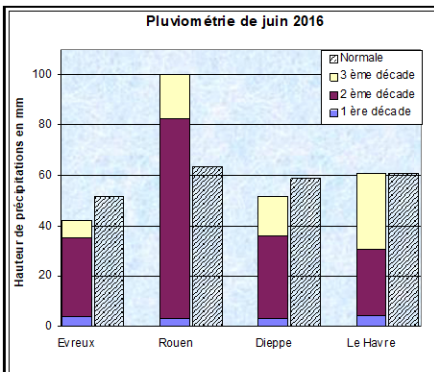
Concernant les eaux souterraines, des recharges tardives ont été enregistrées sur la majorité des ouvrages. Par rapport aux valeurs interannuelles, la moitié des ouvrages suivis présentent des niveaux proches de la médiane. À noter qu'en Seine-Maritime, près d'un tiers des piézomètres, situés dans le sud du département, sont dans une situation sèche de période de retour de 2,5 à 5 ans.

Pour les eaux superficielles, les débits de base et les débits moyens mensuels affichent des valeurs soit stables soit en hausse pour la quasi-totalité des cours d'eau des deux départements. Sur de nombreuses stations les valeurs atteintes sont largement supérieures aux normales de saison. Des records de hautes eaux ont d'ailleurs été dépassés sur de nombreuses rivières. Paradoxalement, en Seine-Maritime, sur le Cailly amont et le Commerce, des déficits importants sont toujours à signaler.



Rapport à la normale de la pluviométrie  
Juin 2016

## Pluviométrie de juin « Une pluviométrie très abondante sur l'est »



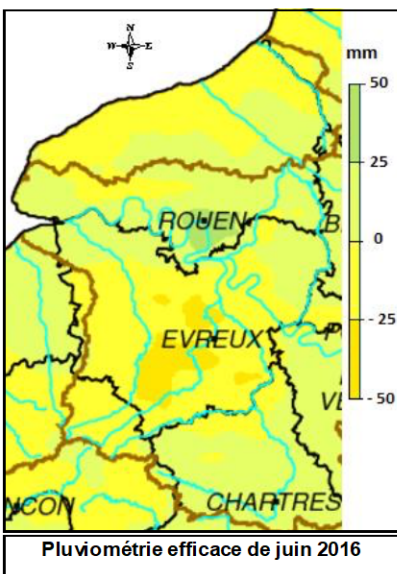
En juin, le cumul pluviométrique est compris entre 30 mm et 100 mm. Les précipitations ont été observées essentiellement sur la deuxième et troisième décade. Un seul cumul journalier est à mettre en évidence au cours de ce mois notamment à Rouen avec 22.5 mm le 20 juin dernier.

Au cours de ce mois, il a été enregistré 41.9 mm à Evreux, 100.1 mm à Rouen, 51.7 mm à Dieppe et 61.1 mm au Havre.

Par rapport aux normales mensuelles, le constat est assez hétérogène à l'échelle des deux départements. En effet, la vallée de Seine enregistre un excédent compris entre + 10% et + 50%. Le reste du territoire est soit proche soit inférieur aux normales. On relève notamment : - 19 % à Evreux, + 57 % à Rouen, - 12 % à Dieppe et + 1 % au Havre.

On notera aussi une pluviométrie abondante sur les départements des Yvelines et de l'Eure-et-Loir déterminante pour les débits de l'Eure.

## Pluies efficaces et humidité des sols « Retour des valeurs négatives »

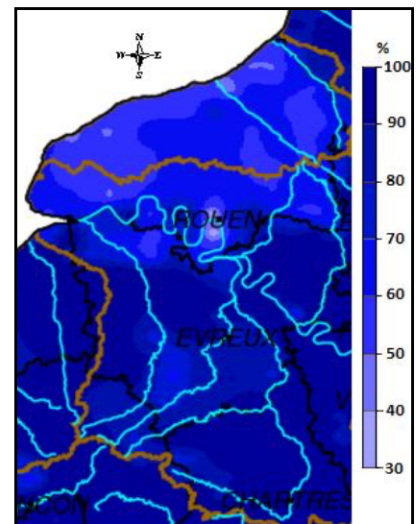


En juin, le cumul de précipitations efficaces (précipitations - évapotranspiration) à la recharge des nappes repart à la baisse par rapport au mois dernier. Toutefois, celui-ci reste positif de part et d'autre de la vallée de Seine sur les deux départements (compris entre 0 et + 50 mm).

Sur le reste du territoire, le bilan redevient négatif avec des valeurs comprises entre 0 et - 25 mm et très ponctuellement jusqu'à - 50 mm dans le centre du département de l'Eure.

Au 1er juillet, l'indice d'humidité affiche des valeurs comprises entre 0.75 et 1 (1 étant un sol saturé en eau).

Cette situation révèle une humidité des sols bien plus importante que la normale. Les valeurs sont comprises entre +30 % et + 100 % par rapport à la normale.



Rapport à la normale de l'indice d'humidité des sols au 1<sup>er</sup> juillet 2016

Source:



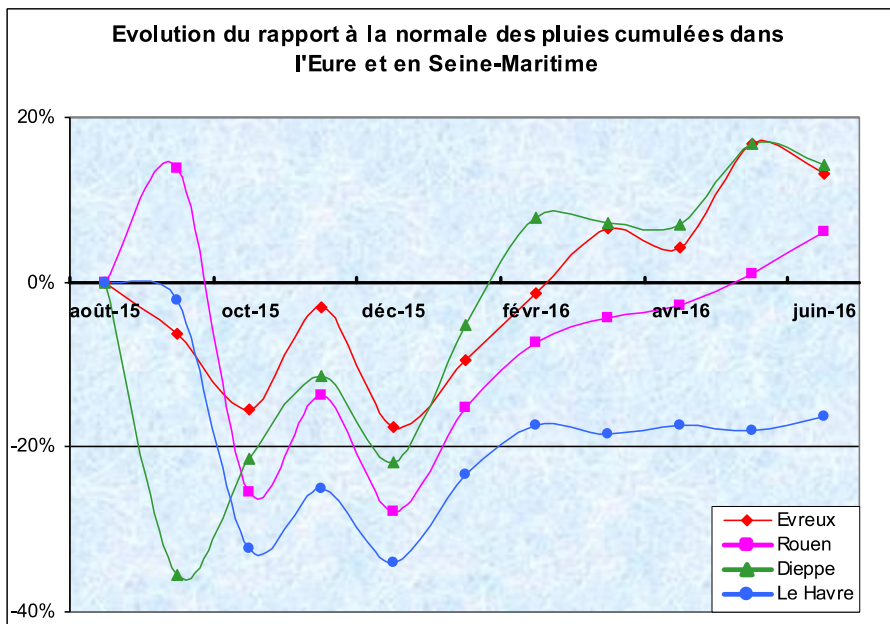
**Nota :** des différences peuvent exister entre les cartes issues de modèles développés par Météo-France et le cumul de précipitations effectivement enregistré par les pluviomètres.



Direction régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement  
NORMANDIE



Pluviométrie sur l'année hydrologique « Les valeurs deviennent excédentaires à l'est»



Depuis septembre 2015, début de l'année hydrologique, le cumul de précipitations est proche des normales pour la quasi-totalité du territoire des deux départements. En effet, les déficits enregistrés jusqu'en décembre ont été comblés par les mois de janvier à mai.

On relève notamment + 13 % à Evreux, + 6 % à Rouen, + 14% à Dieppe et - 16 % au Havre.

Concernant les pluies efficaces à la recharge des nappes, le cumul enregistré depuis septembre reste positif que ce soit dans l'Eure ou la Seine-Maritime (compris entre 100 mm et 750 mm) et reste largement supérieur à celui observé l'année passée (compris entre 0 mm et 300 mm).



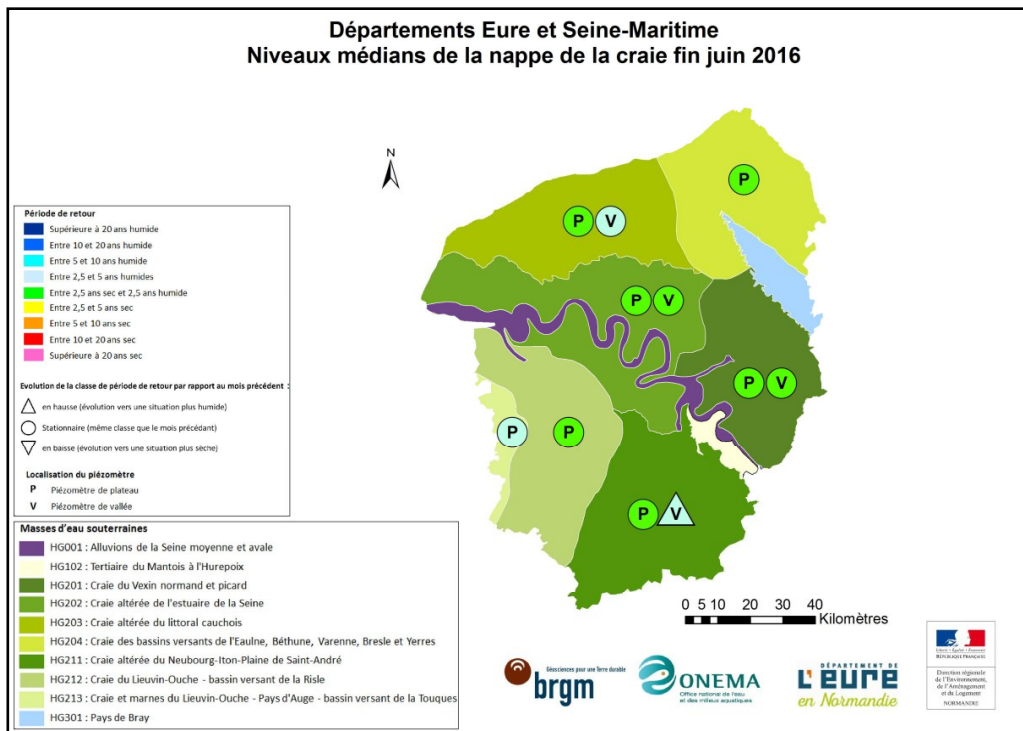
Etat des nappes « Retour à la normale »

La carte ci-contre représente la situation hydrogéologique médiane pour chaque type de piézomètre (situés en plateaux (P) ou en vallées (V)) et pour chaque grande masse d'eau. Elle indique également l'évolution de la fréquence de retour par rapport au mois précédent.

À l'échelle des deux départements, les eaux souterraines enregistrent des fréquences de retour souvent stables par rapport au mois précédent.

Seuls les ouvrages situés en vallée de la masse d'eau de la craie altérée du Neubourg-Iton-Plaine de St-André ont connu une augmentation de leur fréquence de retour.

Les valeurs des fréquences de retour des piézomètres sur les deux départements sont donc très majoritairement proches des normales (valeurs comprises entre 2.5 ans sec et 2.5 ans humide). Des valeurs supérieures aux normales (entre 2.5 ans et 5 ans humide) sont enregistrées dans les vallées des masses d'eau de la craie altérée du Neubourg-Iton-Plaine de St-André et du littoral Cauchois et au droit des plateaux du bassin versant de la Touques.



## Piézométrie en Seine-Maritime : « Des recharges tardives enregistrées »

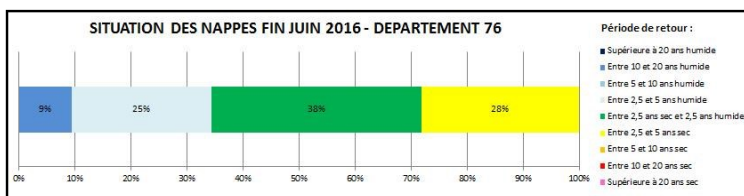
### • Par rapport au mois dernier :

Sous les plateaux comme en vallées, grâce aux précipitations importantes des deux derniers mois, des recharges tardives ont concerné la majorité des ouvrages (65 %). Les valeurs sont comprises entre - 0.09 m et + 1.47 m sous les plateaux et entre - 0.03 m et + 0.11 m en vallées. En moyenne, les niveaux sont en augmentation sous les plateaux (+ 0.26 m) et stables en vallées (+ 0.04 m).

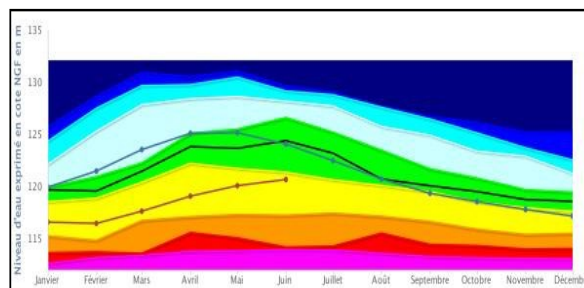
### • Évolution annuelle :

La moitié des piézomètres (17/34) indiquent des niveaux piézométriques en baisse. En moyenne, les niveaux sont inférieurs à ceux de juin 2015 de 0.57 m sous les plateaux et semblables (+0.07 m) au droit des vallées.

Ce mois-ci, la situation est assez hétérogène à l'échelle du département. 38 % des ouvrages mesurés sont dans une situation proche de la médiane (entre 2,5 ans sec et 2,5 ans humide). A noter que les piézomètres indiquant des valeurs inférieures à 2,5 ans sec se situent essentiellement dans la moitié sud du département.



À Catenay, la recharge hivernale s'est poursuivie au mois de juin. Les niveaux piézométriques sont inférieurs à ceux de juin 2015 mais l'écart diminue par rapport aux mois précédents. Le piézomètre suivi présente une situation sèche de période de retour proche de 2,5 ans sec (proche de la médiane en juin 2015).



## Piézométrie dans l'Eure : « Des valeurs proches des normales »

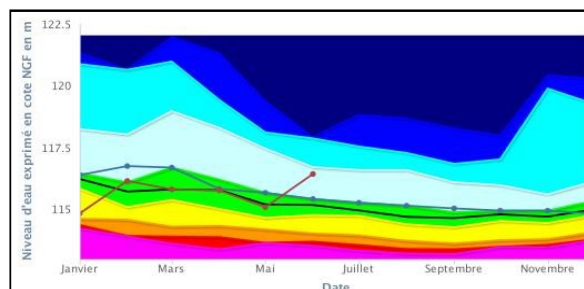
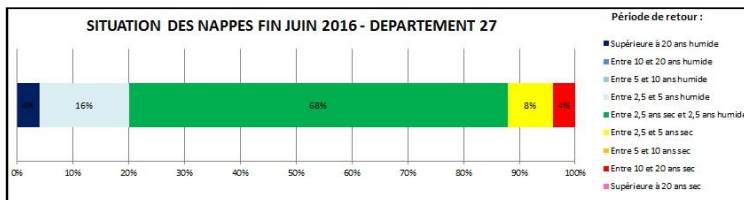
### • Par rapport au mois dernier :

Tout comme en Seine-Maritime, les précipitations importantes des deux derniers mois ont permis d'observer des recharges tardives de la nappe. De fortes amplitudes ont notamment été observées sur les piézomètres de Chaignes, Coulonges, Fains, Normanville, Saint-Christophe-sur-Avre et Val-de-Reuil. Les valeurs sont comprises entre - 0.25 m et + 1.66 m sous les plateaux et entre + 0.09 m et + 1.56 m en vallées. En moyenne, les niveaux sont en augmentation sous les plateaux (+ 0.14 m) et en vallées (+ 0.74 m).

### • Évolution annuelle :

Sous les plateaux comme en vallées, la majorité des piézomètres (66 %) indiquent toujours des niveaux piézométriques en baisse. En moyenne, les niveaux sont inférieurs à ceux de juin 2015 de 0.48 m sous les plateaux et de 0.40 m au droit des vallées.

Ce mois-ci, la très grande majorité des ouvrages mesurés (68 %) sont dans une situation proche de la médiane (entre 2,5 ans sec et 2,5 ans humide). Seuls les piézomètres de Lieurey, Montauve et Nogent-le-Sec enregistrent des valeurs inférieures aux normales.



A Coulonges, situé dans la vallée de l'Iton, la vidange estivale démarrée en avril s'est interrompue fin mai. Une très forte recharge a en effet été observée fin mai - début juin, faisant passer ce piézomètre d'une situation proche de la médiane à une situation de hautes eaux de période de retour 5 ans humide.

## Résumé :

Au cours du mois de juin 2016, du fait des fortes précipitations des mois de mai et juin, des recharges tardives parfois importantes ont été observées sur les piézomètres les plus réactifs. Ces recharges ont concerné près des deux tiers des piézomètres.

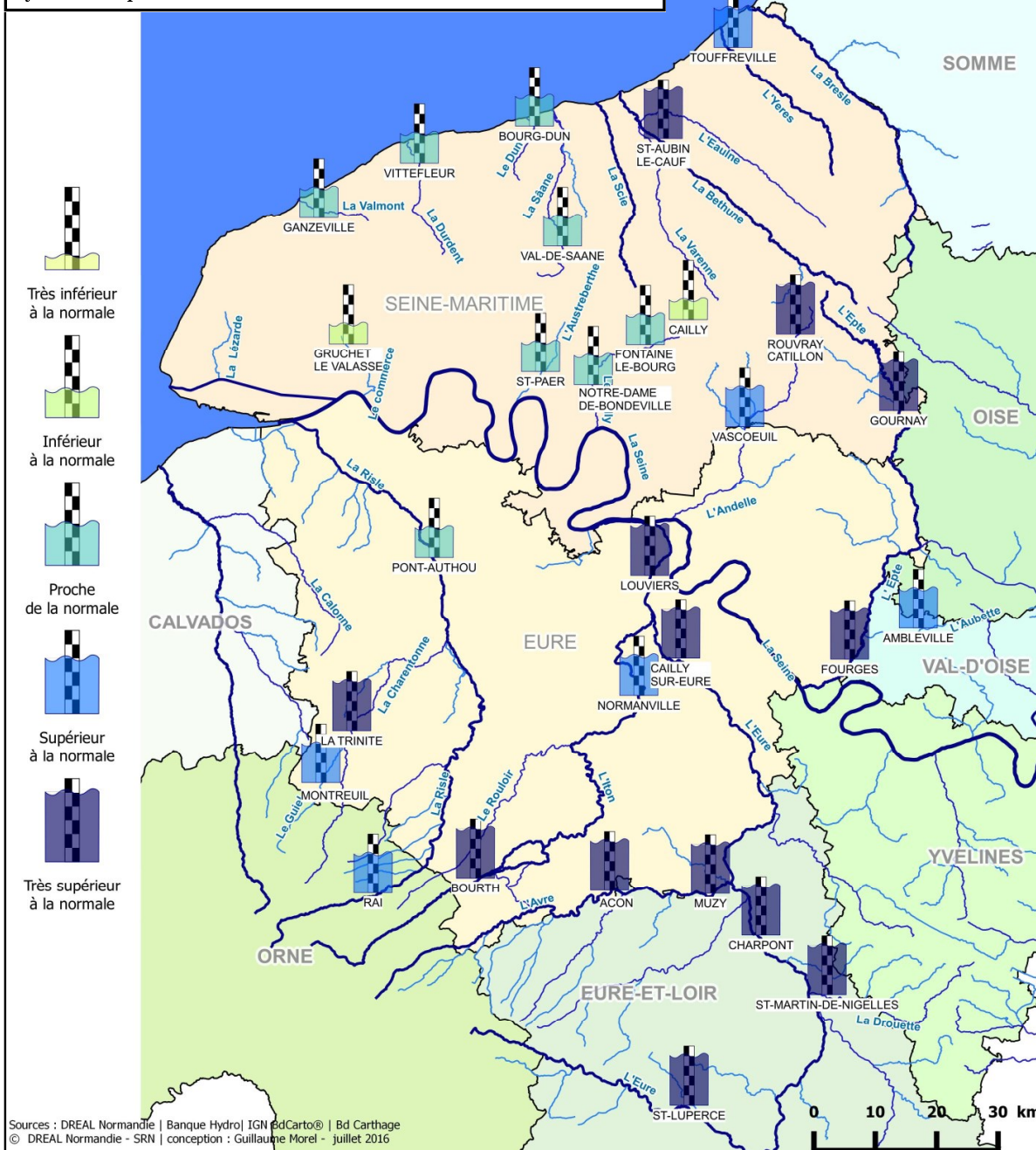
Toutefois, la majorité des ouvrages indiquent toujours des niveaux plus bas que l'année passée.

Par rapport aux valeurs interannuelles du mois de juin, on constate que la moitié des ouvrages suivis (29/57) présentent des niveaux proches de la médiane. À noter qu'en Seine-Maritime, près d'un tiers des piézomètres sont cependant dans une situation sèche de période de retour de 2,5 à 5 ans, quasiment tous situés dans le sud du département.



**Débits moyens mensuels des cours d'eau : « Des valeurs très élevées pour la saison »**

**Rapport aux normales des débits moyens mensuels sur les stations hydrométriques de l'Eure et de Seine-Maritime - Juin 2016**



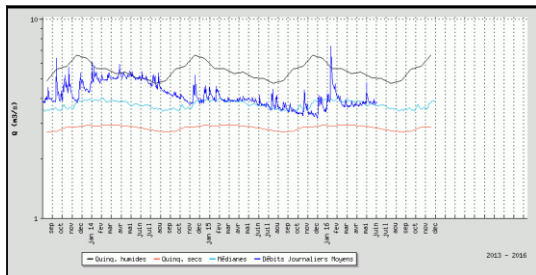
Concernant les débits moyens mensuels, la situation est similaire aux débits de base. En effet, sur la très grande majorité des stations (34/36), le débit mensuel est soit stable soit en hausse.

Par rapport aux normales, la très grande majorité des cours d'eau affichent des valeurs de débit soit proches des normales soit supérieures à la moyenne mensuelle. En moyenne, les débits sont supérieurs de 90 % par rapport à la normale.

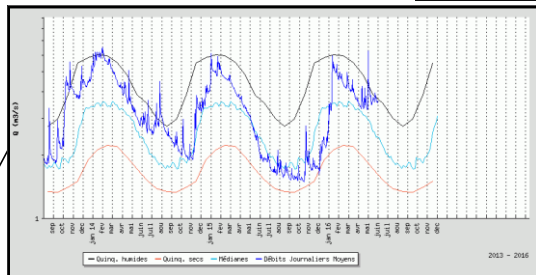
On notera que sur certains cours d'eau les volumes écoulés, dus aux crues de fin mai-début juin, ont été également très importants et ont fortement influencé les valeurs d'hydraulicité. C'est notamment le cas sur La Charentonne à Bocquencé (+130 % par rapport à la normale), l'Eure à Cailly-sur-Eure (+130 % par rapport à la normale), la Béthune à Saint-Aubin-le-Cauf (+140 % par rapport à la normale), l'Avre à Saint-Christophe-Sur-Avre (+230 % par rapport à la normale), l'Eure à Charpont (+240 % par rapport à la normale), l'Epte à Gournay-en-Bray (+320 % par rapport à la normale), l'Andelle à Rouvray-Catillon (+340 % par rapport à la normale), l'Epte à Saumon-la-Poterie (+340 % par rapport à la normale), la Drouette à Saint-Martin-de-Nigelles (+420 % par rapport à la normale), l'Eure à Saint-Lupercé (+480 % par rapport à la normale).

À contrario, les stations du Commerce à Gruchet-le-Valasse et du Cailly à Cailly affichent un déficit respectif de 40 % et 20 %.

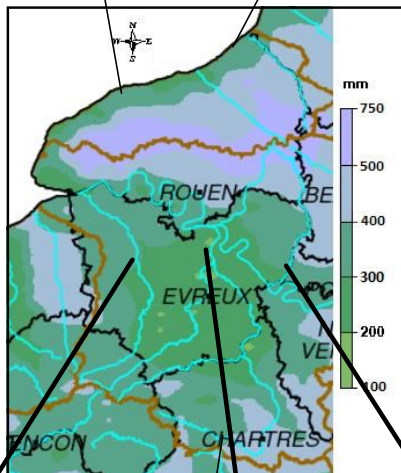
## Hydrogrammes de quelques rivières représentatives des deux départements



La Durdent à Vittefleury



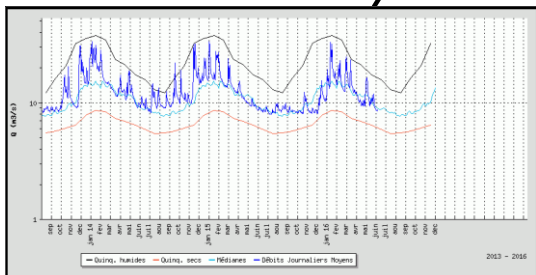
L'Yères à Touffreville



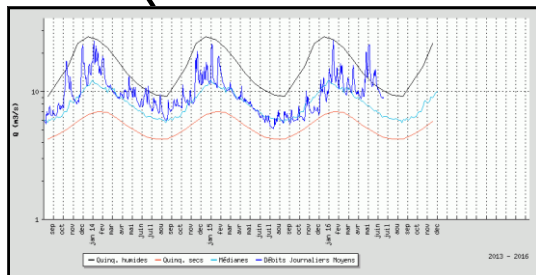
Cumul des pluies efficaces  
Septembre 2015 à juin 2016

À l'ouest des deux départements, les débits sont globalement proches des normales.

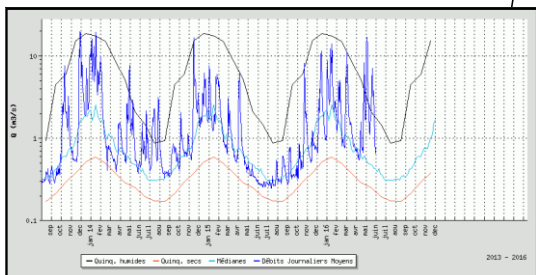
À l'est, grâce aux précipitations importantes des deux derniers mois, les cours d'eau enregistrent souvent des débits largement supérieurs aux normales.



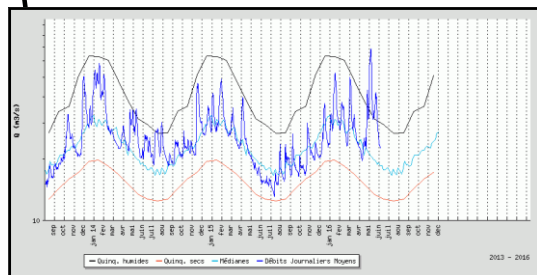
La Risle à Pont-Authou



L'Epte à Fourges



L'Eure à Saint-Lupercé



L'Eure à Louviers

Ce bulletin est réalisé par l'Unité hydrométrie du Service Ressources de la DREAL Normandie.  
Contacts :  
Claude GIRARD /  
Stéphane HELOUIN :  
b2hpc.srn.dreal-normandie@developpement-durable.gouv.fr

Le cumul de pluies efficaces depuis septembre 2015 est compris entre 100 mm et 750 mm. Ce cumul est supérieur à celui observé l'année passée à la même époque.





## **Résumé**

Les bactéries sont une composante indissociable des réseaux de distribution d'eau potable qui, en les colonisant, forment des communautés complexes. Il est émis l'hypothèse que des variations de structure et de composition de ce microbiome pourraient refléter des changements de la qualité de l'eau liés à différents phénomènes (stagnation, biocorrosion, changement de pression, ...). Une importante campagne de prélèvements menée sur le réseau d'eau potable de Paris a permis d'apprécier la dynamique de ces communautés bactériennes selon trois méthodes différentes : la description de la communauté par metabarcoding, la culture de la flore hétérotrophe totale et la quantification par PCR de trois pathogènes opportunistes, *Mycobacterium* spp. *L. pneumophila*, et *P. aeruginosa*. Cette étude a mis en évidence une certaine diversité au sein des communautés bactériennes de l'eau potable malgré une prédominance des genres *Hyphomicrobium* et *Phreatobacter*. Les méthodes de culture et de PCR quantitative mettent également à jour l'importance écologique du genre *Mycobacterium*. L'intégration aux analyses des paramètres spatio-temporels et physico-chimiques de l'eau potable a permis de constater une relative stabilité des communautés bactériennes. Cependant, suite à d'importants événements climatiques, des variations dans la structure des communautés sont visibles sans conséquence sur la qualité sanitaire de l'eau. Ces travaux suggèrent que l'utilisation en parallèle de différentes méthodologies, et notamment l'apport du metabarcoding, permet d'améliorer la connaissance sur le réseau de distribution d'eau potable et de mieux observer des changements fins, invisibles aux méthodes classiques.

**Mot clés :** *Bactéries, Microbiome, écologie microbienne, eau potable, suivi spatio-temporel.*

---

## **Abstract**

Bacteria are an indivisible component of drinking water distribution systems which, by colonizing them, form complex communities. It is assumed that variations in the structure and composition of this microbiome could reflect a change in water quality related to different events (stagnation, biocorrosion, pressure change, etc.). A major sampling campaign was conducted within the Paris drinking water distribution systems allowing to assess the diversity and the dynamic of these bacterial communities using three different methods: description of the community by metabarcoding, heterotrophic plate count and quantification by PCR of three opportunistic pathogens, *Mycobacterium* spp. *L. pneumophila*, and *P. aeruginosa*. This study revealed some diversity within the drinking water bacterial communities. Culture and quantitative PCR methods also reveal the ecological importance of the *Mycobacterium* genus. The integration of spatio-temporal and physico-chemical parameters of drinking water into analyses has highlighted a relative stability of bacterial communities. However, variations in the structure of the communities are visible following important climatic events, without consequences on the sanitary quality of the water. Altogether, our work suggests that the use in parallel of different methodologies, particularly metabarcoding, has improved our knowledge of the bacterial communities within the Paris drinking water distribution systems and better observe subtle changes, invisible to conventional methods.

**Keywords:** *Bacteria, Microbiome, microbial ecology, drinking water, spatio-temporal survey.*