

DISS. ETH NO. 30361

***Legionella* in biofilms:
Initial colonization and impact of environmental
factors**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

CÉLINE MARGOT
MSc ETH, ETH Zurich
born on 13.12.1993

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Martin Ackermann, examiner
Dr. Frederik Hammes, co-examiner
Dr. Olga Schubert, co-examiner
Prof. Dr. Michèle Prévost, co-examiner
Prof. Dr. Amy Pruden, co-examiner

2024

Summary

In the last twenty years, the incidence of legionellosis, a disease caused by the bacterium *Legionella*, has been increasing in Switzerland and around the world. To address the increasing number of legionellosis cases, one avenue is to study the sources of infections. Among different aquatic environmental sources, building plumbing drinking water systems (BP-DWS) combine conditions that are ideal for the proliferation of the pathogen and its spread to humans. There, the bacterium is part of a complex microbiome inside the biofilms, which form on the inner side of the pipes. These biofilms act as a reservoir where *Legionella* can proliferate and benefit from increased protection from environmental stressors. In order to develop strategies to control the pathogen in BP-DWS, it is essential to understand the behavior of the pathogen within biofilms.

Since biofilms in real BP-DWS are difficult to access, a laboratory-scale set-up and a pilot-scale set-up were employed in this thesis to study the behavior of *Legionella* and the drinking water microbiome during initial biofilm formation. First, the dynamics of biofilm formation associated with *Legionella* biofilm colonization were studied using a reactor set-up. *Legionella pneumophila* rapidly colonized the biofilms, and the community composition continuously evolved over an eight-week period, with multiple bacterial succession events. The amoebae *Vermamoeba vermiformis*, a known *Legionella* host, was omnipresent in the biofilms. The findings of this experiment were used to propose a conceptual model for biofilm formation in BP-DWS.

Second, the effect of operating conditions (hose temperature, flushing temperature and flushing frequency) on initial biofilm formation and *Legionella* concentrations in a pilot-scale system was investigated. Overall, operating conditions had an impact on the community composition in the biofilms after six weeks. Moreover, *Legionella* species concentrations in hoses maintained at 50 °C or in hoses flushed with high temperature (~60 °C) were below the level of detection of the ddPCR method used in this thesis, suggesting that high temperatures impaired *Legionella* biofilm colonization.

Altogether, the results presented in this thesis indicate that colonization of biofilms with *Legionella* in BP-DWS is rapid and influenced by the operating conditions. Moreover, the improved understanding of the BP-DWS biofilm formation process associated with *Legionella* colonization could help inform strategies to control the pathogen and limit its spread to humans.

Résumé

Ces vingt dernières années, l'incidence de la légionellose, une maladie causée par la bactérie *Legionella*, a augmenté en Suisse et dans le monde. Pour répondre à l'augmentation des cas de légionellose, une possibilité est d'étudier les sources d'infection. *Legionella* vit dans les milieux aquatiques, notamment dans les systèmes domestiques de distribution de l'eau potable, qui réunissent plusieurs conditions favorisant la prolifération et la transmission de ces bactéries à l'Homme. *Legionella* fait partie d'un microbiome complexe à l'intérieur du biofilm qui se forme dans les conduites. Ce biofilm est un réservoir où la bactérie se multiplie et peut bénéficier d'une protection accrue face aux facteurs de stress de l'environnement. Il est donc essentiel de comprendre comment les légionelles colonisent et prolifèrent à l'intérieur des biofilms pour développer des stratégies visant à contrôler le pathogène dans les systèmes de distribution de l'eau.

Le biofilm à l'intérieur des conduites des systèmes de distribution est difficile d'accès. Pour pallier ce problème, un réacteur à biofilm et un système de distribution à l'échelle pilote sont utilisés dans cette thèse. Dans un premier temps, ce travail étudie la colonisation initiale du biofilm par *Legionella* et le reste du microbiome en utilisant le réacteur à biofilm. Au cours des huit semaines d'expérimentation, la communauté microbienne évolue par successions dans le biofilm du réacteur. La colonisation du biofilm par *Legionella* est rapide, et l'amibe *Vermamoeba vermiformis*, connue pour être un hôte de *Legionella*, est omniprésente. Les résultats de cette expérience sont utilisés pour le développement d'un modèle conceptuel décrivant le processus de

formation initiale du biofilm dans les systèmes domestiques de distribution de l'eau.

Dans la seconde partie de cette thèse, l'impact des conditions d'opération (température maintenue au niveau des tuyaux, température de rinçage et fréquence de rinçage) sur la formation du biofilm dans un système de distribution à l'échelle pilote est analysé. Les résultats montrent que les conditions d'opération du système pilote ont un impact sur la composition du microbiome dans le biofilm, ainsi que sur la concentration de *Legionella*. De plus, le maintien d'une température élevée au niveau des tuyaux (50 °C) ou le rinçage avec une eau à ~60 °C semblent compromettre la colonisation des biofilms par *Legionella*. Les résultats présentés dans cette thèse indiquent que *Legionella* est capable de rapidement coloniser le biofilm et que ce processus est influencé par les conditions d'opération telle que la température ou la fréquence de rinçage. Dans l'ensemble, ces conclusions contribuent à une meilleure compréhension du comportement de *Legionella* lors du processus de formation du biofilm et pourront, dans le futur, aider à élaborer des stratégies pour limiter la prolifération du pathogène dans les systèmes de distribution de l'eau.