



Déterminants écologiques et microbiologiques de la composante environnementale de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie

Emilie Bierque

► To cite this version:

Emilie Bierque. Déterminants écologiques et microbiologiques de la composante environnementale de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie. Maladies infectieuses. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2020. Français. NNT : 2020NCAL0001 . tel-03387409

HAL Id: tel-03387409

<https://unc.hal.science/tel-03387409>

Submitted on 29 Oct 2021

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.



UNIVERSITÉ DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE

ÉCOLE DOCTORALE DU PACIFIQUE

Unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose

Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie

Thèse de Doctorat

Biologie des organismes

Emilie BIERQUE

**Déterminants écologiques et microbiologiques de la composante
environnementale de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie**

Thèse dirigée par Cyrille GOARANT

Co encadrée par Linda GUENTAS

Soutenue le 08 octobre 2020

Jury :

Mme Maëlle Molmeret
M. Philippe Jourand
M. Mathieu Picardeau
M. Hamid Amir
M. Cyrille Goarant
Mme Linda Guentas

Rapportrice
Rapporteur
Examineur
Président du jury
Directeur de thèse
Co-encadrante de thèse



« Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les espèces les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements »

Charles Darwin (1809 – 1882)

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier en premier lieu mon Directeur de thèse M. Cyrille Goarant, responsable de l'Unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose de m'avoir accordé sa confiance lorsqu'un vendredi soir j'ai évoqué l'idée de réaliser une thèse sous sa direction. Cyrille, merci pour ta rigueur scientifique, ta disponibilité, ta patience et ta compréhension, ton encadrement m'a permis de m'enrichir d'un point de vue professionnel aussi bien que personnel.

Mes sincères remerciements vont également à Mme Linda Guentas, Maître de conférence de l'Université de la Nouvelle-Calédonie, qui a accepté d'encadrer ce travail de thèse. Merci pour ton soutien autant professionnel que personnel dans ce défi que représente la thèse.

J'adresse tous mes remerciements à Mme Maëlle Molmeret, Professeure de l'Université de Toulon et M. Philippe Jourand, chercheur à l'IRD, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse. J'exprime ma gratitude à M. Mathieu Picardeau, chercheur de l'Institut Pasteur, et M. Hamid Amir, Professeur de l'UNC, qui ont accepté de juger ce travail en prenant part à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier M. Marc Jouan, ancien directeur du Réseau International des Instituts Pasteur et directeur actuel de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, d'avoir cru en ce projet de thèse à travers l'attribution d'une bourse Calmette et Yersin et de m'avoir soutenue jusqu'à la fin de ce travail. J'adresse également mes remerciements à M. Vincent Richard, directeur de l'IPNC au début de ma thèse, de m'avoir permis d'initier ce projet au sein de l'institut.

J'adresse ma plus grande gratitude à mes collègues de l'URE-L, Marie-Estelle Soupé-Gilbert, Dominique Girault et Roman Thibeaux qui m'ont accueillie à bras ouverts. Je remercie également Malia Kainiu, arrivée pendant ma thèse, qui a complété cette équipe. Ils ont su être présents à chaque instant pour m'aider à mener à bien ce projet qui, à mes yeux, n'aurait pas pu aboutir sans eux. Je remercie en particulier les "leptogirls" pour le partage de leurs connaissances, de leurs savoir-faire et de leurs expériences dans la bonne humeur, l'entraide et la gourmandise constante.

Que tous mes collègues de l'IPNC, intervenus tout au long de cette thèse, trouvent ici ma sincère reconnaissance pour leur aide dans ce travail. Je tiens notamment à remercier M.

Arnaud Tarantola, épidémiologiste de l'Institut Pasteur, pour la réalisation de cartes SIG, outil d'aide à la préparation des campagnes de prélèvement. Mes collègues doctorants ont su m'épauler et me conseiller dans l'analyse statistique et la rédaction de ce manuscrit en s'intéressant à un sujet différent du leur. Notamment, Noé Ochida, doctorant IPNC et IRD, s'est investi pour établir un modèle statistique avec "si peu" de données. Alexandre Bourles, ancien doctorant UNC et actuel post-doctorant IPNC, m'a initiée au logiciel R. Marion Voide a su s'impliquer entièrement dans son projet de stage et n'a jamais rechigné face aux centaines d'extractions d'ADN réalisées. Je les remercie sincèrement pour leur grande aide, le temps qu'ils m'ont accordé et leur implication.

De nombreux acteurs de la recherche calédonienne ont participé au bon déroulement de ce projet de thèse. Je remercie en particulier M. Laurent L'Huillier, directeur de l'Institut Agronomique Calédonien, pour l'aide qu'il nous a apporté à travers son manuel sur les sols cultivables de Nouvelle-Calédonie.

Il me paraît important de remercier ici avec sincérité et humilité les propriétaires de foncier de Nouvelle-Calédonie, qu'ils soient habitants de tribus, collègues ou amis, de nous avoir acceptés sur leur terre afin de réaliser un échantillonnage complet des sols calédoniens.

La campagne de prélèvement n'aurait pas non plus pu se faire sans l'aide de M. Farid Juillot, chercheur de l'IRD. Je le remercie sincèrement de m'avoir accompagnée tout au long de ma thèse aussi bien concernant les missions de terrain que pour l'analyse de données et les discussions constructives lors de mes comités de suivi individuel du doctorant.

J'en profite pour remercier tous les membres de mon comité de suivi, M. Mathieu Picardeau, M. Alexis Bazire, M. Raphaël Lami et M. Farid Juillot, d'avoir accepté de m'accompagner au cours de ces plus de trois années de thèse, ainsi que pour leurs encouragements.

Cette thèse a été pleinement intégrée au sein du projet ASSurPluHyT. Que toutes les personnes impliquées dans ce projet trouvent ici ma considération. Notamment M. Pierre Genthon, directeur de recherche de l'IRD et Caroline Tramier, doctorante IRD, pour nous avoir permis d'accéder aux sites de prélèvement de Touho, ainsi que de leur implication dans l'analyse de résultats. Mme Peggy Gunkel-Grillon, Directrice de l'Institut des Sciences Exactes et Appliquées de l'UNC, Mme Christine Laporte-Magoni, Maître de conférence de l'UNC, et Mme Monika Lemestre, Technicienne de recherche de l'UNC, pour leur réflexion sur l'analyse granulométrique de nos échantillons et ma formation à l'utilisation du

granulomètre laser. Ce projet a été financé dans le cadre du programme "Au fil de l'eau" par le CRESICA. J'exprime donc ma gratitude à Mme Claire Tatin, chargé de mission CRESICA pour son implication, ainsi qu'à Laura Boher pour l'analyse spectrofluorométrique de nos échantillons. Que Mme Léocadie Jamet soit ici remerciée pour les analyses physicochimiques réalisées tout au long de cette thèse.

Comment ne pas évoquer l'open-space, au sens large, qui pourrait être considéré comme une unité transversale de recherche à part entière, s'appuyant sur les compétences pluridisciplinaires de chacun. J'adresse mes remerciements à chacun d'entre eux pour leur soutien, pour leurs rires et pour tous les moments gourmands qui ont su me remonter le moral dans les périodes plus difficiles.

Un remerciement tout particulier va à M. Sylvain Lorgnier, qui m'a accompagné pendant l'expérience intense de « Ma thèse en 180 secondes » et m'a permis d'appréhender mes communications avec plus de sérénité et de confiance en mes capacités.

Enfin, j'aimerais remercier toutes les personnes qui sont intervenues de près ou de loin et qui, parfois sans le savoir, m'ont permis d'aller jusqu'au bout de ce projet.

*À Nicolas,
Pour m'avoir donné assez de confiance pour me lancer dans cette aventure,
Sans vraiment savoir ce qui l'attendait.*

*À mon fils Léo,
Qui sans le savoir a été d'un soutien infini.*

*À mes parents, ma famille,
Et à toutes les personnes qui veillent désormais sur nous.*

SOMMAIRE

Remerciements	3
Sommaire	6
Liste des illustrations et tableaux	7
Liste des annexes	8
Résumé en français	9
English Abstract.....	10
Introduction : La leptospirose	11
I. Leptospirose humaine	11
II. Modes de transmission	14
III. Contexte épidémiologique	16
Problématiques et Objectifs	20
Chapitre 1 : Biodiversité et phylogénie des leptospires	21
I. Évolution de la phylogénie	21
<i>Article scientifique 4^{ème} auteur (Annexe I)</i>	
II. Biodiversité des leptospires dans les sols.....	28
<i>Article scientifique 3^{ème} auteur (Annexe II)</i>	
Chapitre 2 : Écologie et exposition humaine	34
I. La composante environnementale de la leptospirose	34
<i>Article scientifique 1^{er} auteur</i>	
II. Les leptospires comme pathogènes d'origine hydrique	59
<i>Chapitre d'ouvrage 3^{ème} auteur (Annexe III)</i>	
Chapitre 3 : Études de survie des leptospires pathogènes <i>in vitro</i>	61
I. Survie et préservation de la virulence de leptospires pathogènes dans des eaux pauvres en nutriment	61
<i>Article scientifique 1^{er} auteur</i>	
II. Survie de leptospires pathogènes dans l'environnement hydrotellurique en Nouvelle-Calédonie	72
Conclusion et perspectives	101
<i>Article scientifique 5^{ème} auteur (Annexe VIII)</i>	
<i>Chapitre d'ouvrage 1^{er} auteur (Annexe IX)</i>	
Liste des communications et publications scientifiques	112
Bibliographie	115
Annexes	124

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1 Evolution de la leptospirose humaine et méthodes de détection adaptées à chaque stade infectieux.....	13
Figure 2 Cycle de transmission de la leptospirose	15
Figure 3 Carte de répartition mondiale de la leptospirose.....	16
Figure 4 Evolution du nombre de cas de leptospirose en fonction de la pluviométrie mensuelle entre 2009 et 2015 en Nouvelle-Calédonie.....	18
Figure 5 Carte d'incidence de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie	19
Figure 6 Page de titre de la publication « Deciphering the unexplored <i>Leptospira</i> diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence ».....	23
Figure 7 Classification du genre <i>Leptospira</i> en trois clades monophylétiques	25
Figure 8 Page de titre de la publication « Biodiversity of environmental <i>Leptospira</i> : Improving identification and revisiting the diagnosis »	26
Figure 9 Classification actuelle du genre <i>Leptospira</i>	27
Figure 10 Évolution du nombre d'espèces décrites au sein du genre <i>Leptospira</i>	29
Figure 11 Page de couverture du chapitre de monographie sur la leptospirose dans le cadre du « Global Water Pathogen Project ».....	60
Figure 12 Carte pédologique de Nouvelle-Calédonie.....	74
Figure 13 Carte des prélèvements de sols en Nouvelle-Calédonie.....	75
Figure 14 Mix réactionnel et programme PCR utilisés	82
Figure 15 Analyse factorielle multiple de la survie à une semaine de <i>L. interrogans</i>	85
Figure 16 Visualisation du modèle SVM.....	89
Figure 17 Évolution du ratio Ct/Ci en fonction du temps.....	91
Figure 18 Matrice de corrélations	93
Figure 19 Visualisation de l'analyse en composantes principales	94
Figure 20 Page de titre de la publication « The zoonotic pathogen <i>Leptospira interrogans</i> mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production ».....	105
Figure 21 Page de couverture du chapitre d'ouvrage sur le projet ASSurPluHyT	107
Figure 22 Schéma synthétisant l'hypothèse de mobilité verticale des leptospires en fonction des précipitations	111
Tableau 1 Historique des espèces décrites et validées au sein du genre <i>Leptospira</i> de 1914 à 2019.....	31
Tableau 2 Mise en eau des sols pour la préparation des solutions de sols.....	77
Tableau 3 Temps de survie de <i>L. interrogans</i> Manilae en solutions de sols.....	83
Tableau 4 Tests statistiques de Mann-Whitney-U	86
Tableau 5 Matrice de confusion du modèle SVM.....	87
Tableau 6 Temps de dégradation d'ADN de <i>L. interrogans</i> Manilae tués à la chaleur en microcosmes de sols.....	90
Tableau 7 Temps pour atteindre 3% de la concentration initiale de <i>L. interrogans</i> Manilae en microcosmes de sols.....	92

LISTE DES ANNEXES

Annexe I	124
<i>Thibeaux, R., Iraola, G., Ferrés, I., Bierque, E., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.-E., Picardeau, M., Goarant, C., 2018b. Deciphering the unexplored Leptospira diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. Microb. Genomics 4. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144</i>	
Annexe II	135
<i>Thibeaux, R., Girault, D., Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.-E., Rettinger, A., Douyère, A., Meyer, M., Iraola, G., Picardeau, M., Goarant, C., 2018a. Biodiversity of Environmental Leptospira: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. Front. Microbiol. 9, 816. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816</i>	
Annexe III	150
<i>Goarant, C., Trueba, G., Bierque, E., Thibeaux, R., Davis, B. and De la Peña Moctezuma. (2019). "Leptospira and Leptospirosis". In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) Global Water Pathogen Project. http://www.waterpathogens.org (A. Pruden, N. Ashbolt and J. Miller (eds) Part 3 Bacteria) http://www.waterpathogens.org/book/leptospira-and-leptospirosis Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. doi:10.14321/waterpathogens.26</i>	
Annexe IV	184
<i>Base de données des sols collectés lors de la campagne de prélèvements.</i>	
Annexe Va	186
<i>Tableau résumant les résultats de dosage physicochimique des solutions de sols</i>	
Annexe Vb	188
<i>Tableau résumant les résultats de dosage physicochimique des sols</i>	
Annexe VI	190
<i>Scripts utilisés pour l'analyse statistique des données de survie en microcosme de solutions de sols et de sols</i>	
Annexe VII	195
<i>Résultats préliminaires de la détermination de la nature de la matière organique dissoute fluorescente par spectrofluorométrie.</i>	
Annexe VIII	197
<i>Thibeaux, R., Soupé-Gilbert, M.-E., Kainiu, M., Girault, D., Bierque, E., Fernandes, J., Bähre, H., Douyère, A., Eskenazi, N., Vinh, J., Picardeau, M., Goarant, C., 2020. The zoonotic pathogen Leptospira interrogans mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. Npj Biofilms Microbiomes 6, 24. https://doi.org/10.1038/s41522-020-0134-1</i>	
Annexe IX	209
<i>Bierque, E., Tramier, C., Genthon, P., Girault, D., Gunkel-Grillon, P., Juillot, F., Laporte-Magoni, C., Lemestre, M., Soupé-Gilbert, M.E., Thibeaux, R., Goarant, C. (2020). "ASSURPLUHYT (volet 1) Aspects sanitaires des eaux de surface : une approche pluridisciplinaire de la contamination hydrique par la leptospirose sur un site pilote à Touho". F. Cayrol et C. Tatin (éditeurs), Au fil de l'eau, Nouméa 2019, Workshop des 17 et 18 septembre, p17-18, Presses universitaires de Nouvelle-Calédonie.</i>	

RESUME EN FRANÇAIS

Principalement étudiée comme une zoonose, la leptospirose est également une infection d'origine environnementale, comme en témoigne l'importance des contaminations humaines via les eaux et les sols. Pourtant, peu d'études s'intéressent à la survie des leptospires pathogènes dans l'environnement hydrotellurique.

Depuis 2018, la phylogénie du genre *Leptospira* a subi de grands bouleversements. À ce jour, il est composé de deux groupes, divisés chacun en deux sous-groupes et désignés comme Pathogène 1 (P1, ancien groupe des pathogènes), Pathogène 2 (P2, anciennement intermédiaires), Saprophyte 1 (S1, ancien groupe des saprophytes) et Saprophyte 2 (S2, nouveau groupe de saprophytes). Ce remaniement repose sur la découverte d'une grande biodiversité de leptospires. Plus de 20 nouvelles espèces isolées à partir de prélèvements de sol, ont été décrites en trois ans, permettant de considérer le sol comme l'habitat originel des leptospires.

Une revue systématique de la littérature a permis de conforter une hypothèse où le sol constitue l'habitat environnemental des leptospires pathogènes, qui seraient remobilisés par l'eau lors des pluies. Afin de mieux comprendre ce mode de vie environnemental, la survie des leptospires a été étudiée dans des microcosmes d'eaux, de solutions de sols et de sols. Ainsi, la capacité des leptospires pathogènes à survivre plus d'un an en eau sans apport en nutriment a été confirmée. De plus, le maintien de leur virulence après une longue incubation dans ces conditions défavorables a été démontré. D'autre part, les solutions de sols à pH neutre et de faible conductivité ainsi que les sols à faible capacité d'échange cationique et capacité au champ ainsi que pauvres en sodium et calcium semblent favoriser la survie des leptospires pathogènes.

Ces études contribuent à une meilleure compréhension de la transmission environnementale de la leptospirose. Compte-tenu de son risque élevé pour la population calédonienne, limiter l'exposition aux leptospires dans l'environnement constitue un véritable enjeu de santé publique. Ainsi, l'identification de l'habitat environnemental de ces bactéries pathogènes permettra l'amélioration des stratégies de contrôle et de prévention de cette maladie potentiellement mortelle, applicables à d'autres infections environnementales.

ENGLISH ABSTRACT

Mostly studied as a zoonosis, leptospirosis is also an environment-borne infection and most human cases originate in water or soil. Yet, few studies have been interested in the survival of pathogenic *Leptospira* in the hydrotelluric environment.

Since 2018, the phylogeny of the genus *Leptospira* has undergone major changes. The genus is now composed of two groups, each divided into two subgroups, and designated as Pathogen 1 (P1, former group of pathogens), Pathogen 2 (P2, formerly intermediates), Saprophyte 1 (S1, former group of saprophytes) and Saprophyte 2 (S2, new group of saprophytes). This revision is supported by the discovery of a huge leptospires biodiversity. More than 20 new species isolated from soil samples, have been described since three years, allowing considering the soil as the original habitat of leptospires.

A systematic review of the literature supported the hypothesis considering the soil as the environmental habitat of pathogenic leptospires; they would then be resuspended into water bodies during heavy rain. To better understand this environmental lifestyle, the survival of leptospires was studied using water, soil solution, and soil microcosms. Thus, the ability of pathogenic leptospires to survive more than one year in nutrient-free freshwater has been confirmed. Furthermore, the preservation of direct virulence after long-term survival under unfavorable conditions was shown. Soil solutions with neutral pH and low conductivity, as well as soils with low cation exchange capacity, low field capacity and low sodium and calcium concentrations, appeared to favor the survival of pathogenic leptospires.

These studies contribute to a better understanding of the environmental transmission of leptospirosis. Given the high risk of leptospirosis in New Caledonia, limiting exposure to leptospires in the environment is a real public health challenge. Thus, identifying the environmental habitat of these pathogenic bacteria will offer better strategies for the control and prevention of this potentially fatal disease, applicable to other environmental infections.

I. Leptospirose humaine

a. Symptômes

Les manifestations cliniques sévères de la leptospirose en font une maladie grave qui est souvent létale. Les symptômes de la leptospirose sont multiples et peuvent aller d'un syndrome grippal bénin à une atteinte poly-viscérale pouvant être fatale (Bharti et al., 2003; Levett, 2001).

Les premiers signes d'infection correspondent à un état fébrile ou syndrome grippal, c'est à dire à une forte fièvre, des maux de tête et la sensation de courbatures. Ces symptômes apparaissent après une période d'incubation pouvant varier de 2 à 20 jours durant laquelle la bactérie infectante circule dans l'organisme *via* le système circulatoire et s'y multiplie (Faine, 1999). Dans 5 à 20% des cas, la maladie pourra évoluer vers des formes plus sévères (Levett, 2001). Les hémorragies pulmonaires liées à la leptospirose sont considérées comme étant l'une des formes cliniques les plus sévères entraînant des taux de mortalité élevés jusqu'à 70% (Gulati and Gulati, 2012; Papa et al., 2009; Segura et al., 2005). La maladie de Weil est développée chez 10% des cas de leptospirose humaine avec une mortalité souvent supérieure à 10% (McBride et al., 2005; Seguro and Andrade, 2013). Ce syndrome est caractérisé par des hémorragies et des atteintes rénales et hépatiques. A l'origine de la jaunisse, la défaillance hépatique est observée chez 5 à 10% des cas de leptospirose humaine avec un taux de mortalité compris entre 5 et 10% (Levett, 2001). La défaillance rénale est également une complication majeure puisqu'elle est retrouvée chez 16 à 40% des patients qui peuvent alors présenter une insuffisance rénale aiguë. Les reins sont l'un des principaux organes cibles des *Leptospir*es (Levett, 2001). L'atteinte polyviscérale causée par la leptospirose peut également toucher des organes aussi divers que le cœur, le système nerveux central et les yeux (Martins et al., 1998; Parsons, 1965). Moins fréquent, des cas d'avortement ou d'accident cardiovasculaire ont aussi été reportés (Levett, 2001).

b. Diagnostic

La diversité des formes cliniques que peut prendre la leptospirose représente un véritable défi pour son diagnostic. Cette difficulté est particulièrement marquée dans les régions où co-circulent d'autres causes de fièvres aiguës, par exemple, la grippe, la dengue ou le paludisme qui partagent les mêmes symptômes (Nhan et al., 2016).

Du fait de sa présentation clinique très souvent non spécifique, le diagnostic de la leptospirose repose actuellement sur la détection directe de leptospires par technique microbiologique ou moléculaire ou indirectement *via* la mise en évidence d'anticorps spécifiques, confirmant l'infection. Lors de l'apparition des premiers signes cliniques, essentiellement la fièvre, l'agent infectant peut être détecté à partir des fluides biologiques tels que le sang puis les urines (Figure 1). Historiquement, les méthodes de microbiologie consistaient en l'observation de bactéries en microscopie optique à fond noir à partir de prélèvements sanguins et/ou urinaires de patients malades ou de cultures de ces bactéries (Ellinghausen and McCullough, 1965; Johnson and Harris, 1967). Ce type de diagnostic dépendant fortement de l'observateur, des résultats faussement positifs sont fréquents et cette technique n'est plus recommandée (Picardeau, 2013). De plus, les prélèvements biologiques étant rarement riches, une mise en culture est souvent requise afin de confirmer le diagnostic. La culture des leptospires est une technique difficile à mettre en œuvre du fait de la fragilité de ces micro-organismes en laboratoire, ainsi que de leur croissance lente, de plusieurs semaines à 2 voire 3 mois. Du fait de ces délais, cette technique n'a pas d'intérêt pour le diagnostic et la stratégie de traitement.

A partir d'une semaine après le début de l'infection, une réponse immunitaire se met en place avec production d'anticorps qui peuvent alors être détectés grâce à des techniques sérologiques, correspondant à la détection directe ou indirecte d'anticorps anti-*Leptospira* (Figure 1). Ces méthodes sont les plus répandues grâce à leur rapidité de mise en œuvre, leur sensibilité et leur faible coût (Signorini et al., 2013). On distingue deux techniques sérologiques. La méthode de référence est le test d'agglutination microscopique ou MAT (Brato et al., 1988) dont le principe est d'induire une agglutination bactérienne visible en microscopie optique grâce à la reconnaissance de la souche bactérienne incriminée par des anticorps spécifiques de cette souche dans le sérum testé. La relative spécificité de cette technique permet une identification au niveau des sérogroupes (Levett, 2003). Cette technique est la plus exigeante en terme de qualification requise du personnel pour la lecture du résultat et demande également le maintien en culture d'un panel de souches de leptospires pathogènes adaptées au contexte épidémiologique. C'est pour cette raison que la technique du MAT est peu utilisée par les laboratoires de diagnostic qui utilisent préférentiellement la technique ELISA afin de doser les immunoglobulines de type M anti-*Leptospira* (Cumberland et al., 1999). Cette technique plus rapide mais moins spécifique que le MAT nécessite d'être

confirmée par un second diagnostic en MAT si le résultat est positif (Haake and Levett, 2015).

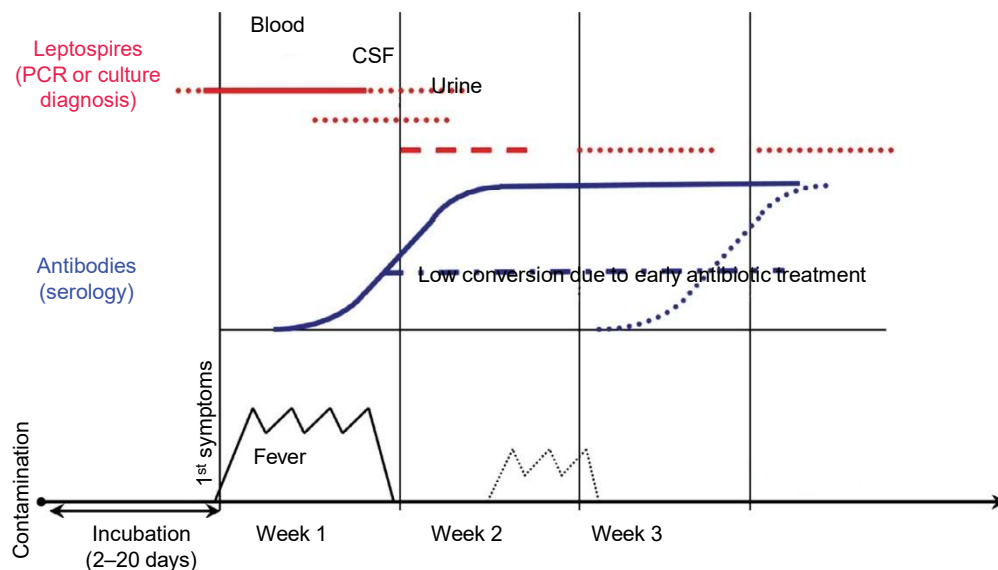


Figure 1 Evolution de la leptospirose humaine et méthodes de détection adaptées à chaque stade infectieux

Le sigle CSF correspond au fluide cérébrospinal. (Goarant, 2016)

Plus récemment, les techniques de biologie moléculaire ont contribué à un diagnostic rapide et précis (Bharti et al., 2003; Haake and Levett, 2015; Picardeau, 2013). L'utilisation de la PCR quantitative en temps réel permet une mise en évidence rapide de la présence de leptospires pathogènes dans des prélèvements biologiques. Le principe est de cibler des gènes spécifiques aux leptospires pathogènes tels que le gène *lipL32*, exprimé au cours de l'infection (Haake et al., 2000). Malgré un coût élevé, cette méthode spécifique permet la détection de faibles concentrations bactériennes dès les premiers symptômes (Levett et al., 2005; Merien et al., 2005; Smythe et al., 2002).

c. Traitements et prophylaxie

Bien que la leptospirose soit une infection bactérienne potentiellement sévère, la prise en charge précoce par antibiothérapie ciblée permet souvent une guérison rapide (Levett, 2001). Cependant, les patients présentant des signes cliniques plus sévères nécessiteront une hospitalisation avec soins intensifs. Les antibiotiques reconnus comme étant efficaces contre la leptospirose sont des antibiotiques souvent utilisés en première intention comme la pénicilline (Edwards et al., 1988; Watt et al., 1988) ou la doxycycline (McClain et al., 1984). A ce jour,

aucune résistance des leptospires contre des antibiotiques n'a été démontrée.

Afin de diminuer l'exposition aux leptospires pathogènes, des mesures de prévention sont à adopter pour les populations à risque. Il peut s'agir de professionnels en contact direct avec les animaux réservoirs de la leptospirose mais aussi des populations en contact avec un environnement potentiellement contaminé. Dans ces cas, des mesures de protection individuelle adaptées sont recommandées telles que le port de gants, bottes ou cuissardes et de lunettes de protection si nécessaire. Les mesures prophylactiques de la leptospirose concernent essentiellement les professionnels à risque, comme mentionné auparavant. La doxycycline est l'antibiotique utilisé pour des mesures prophylactiques (Gonsalez et al., 1998; Sehgal et al., 2000; Takafuji et al., 1984). De la même manière, la vaccination reste réservée aux populations les plus exposées du fait, entre autres, d'un schéma vaccinal très contraignant constitué de 2 injections à 15 jours d'intervalle suivies de rappels à 6 mois puis tous les 2 ans (recommandations de l'Agence Nationale de sécurité du médicament et des produits de santé). Un vaccin monovalent contenant uniquement le sérotype Icterohaemorrhagiae est disponible en France pour les professionnels à risque (Levett, 2001). De fait, l'immunisation peut protéger contre un seul sérotype. Bien que le sérotype Icterohaemorrhagiae, ciblé par ce vaccin, soit le plus fréquemment retrouvé dans les cas d'infection humaine (Levett, 2001), la contamination par d'autres sérotypes est possible (Desvars et al., 2011; Habus et al., 2017). La faible incidence de la leptospirose en France, de 0,5 à 1 cas pour 100 000 habitants et par an ainsi que la protection du vaccin contre un seul sérotype de leptospires expliquent également qu'il n'y ait pas de plan de vaccination de la population générale.

II. Modes de transmission

La leptospirose est une zoonose, ce qui implique une composante animale à son cycle de transmission, qu'on peut constater sur la figure 2 (Ko et al., 2009). Les animaux peuvent être des hôtes accidentels de la leptospirose. Ils peuvent manifester des signes d'infection aiguë et déclarer une maladie pouvant également être sévère voire fatale (Andre-Fontaine, 2004). Mais les animaux jouent un rôle important dans la propagation de la maladie. L'une des principales caractéristiques de cette maladie est ainsi l'existence d'animaux réservoirs. La souche de leptospire adaptée à un animal réservoir va infecter son hôte spécifiquement, le plus souvent sans que celui-ci ne présente de symptôme. La bactérie colonise et persiste dans les tubules rénaux de l'organisme hôte. C'est ce qu'on appelle un portage chronique asymptomatique. Le rat représente le principal réservoir animal, d'où le nom de "maladie des rats" utilisé parfois

pour la leptospirose. Cependant, les leptospires sont capables d'infecter tous les mammifères, les réservoirs les plus connus sont les porcs, les bovins, les chevaux ou encore la faune ensauvagée tel que le cerf (Bracken, 1955; Cook, 1964; Verma et al., 2013; Villanueva et al., 2018). Les animaux domestiques sont également considérés réservoirs notamment les chiens mais aussi des mammifères sauvages comme les chauve-souris (Cox et al., 2005; Goldstein, 2010).

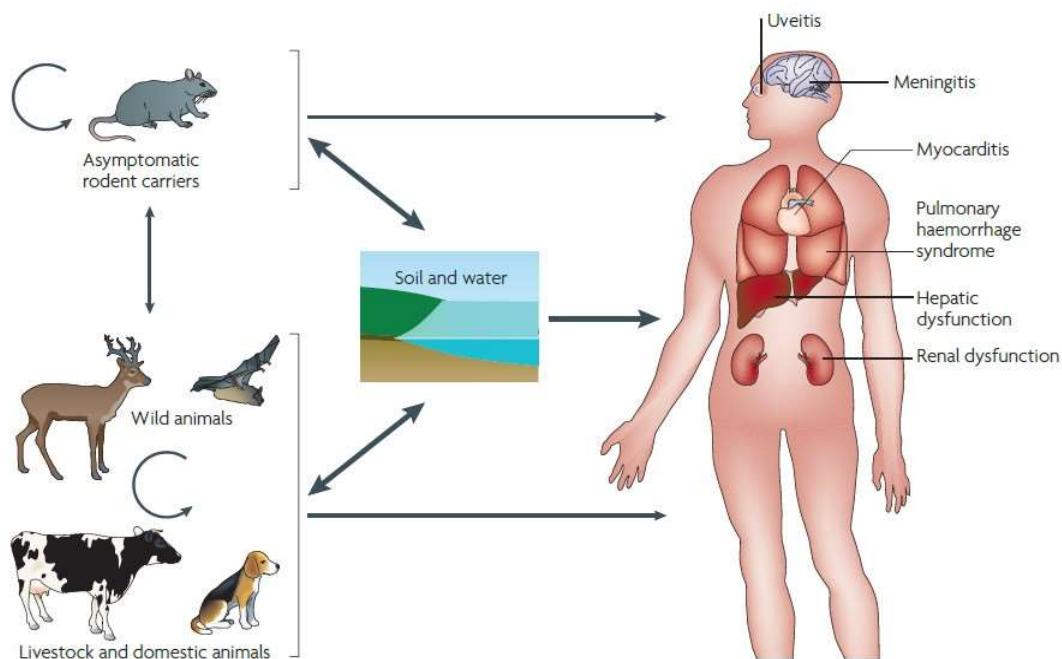


Figure 2 Cycle de transmission de la leptospirose
(Ko et al., 2009)

Les lésions cutanées et les muqueuses constituent la porte d'entrée de la bactérie dans l'organisme qui pourra ensuite atteindre les organes cibles par voie hématogène. Une fois en portage chronique, les leptospires vont être excrétés *via* les urines de leur hôte dans l'environnement (Adler and de la Peña Moctezuma, 2010). Les contaminations humaines peuvent avoir lieu par contact direct avec du tissu ou de l'urine d'animaux infectés. Il s'agit alors le plus souvent d'infection en milieu professionnel qui touchent les vétérinaires, les éleveurs, les personnels d'abattoirs ou encore les bouchers (Haake and Levett, 2015). Toutefois les contaminations *via* des activités de plein air comme la chasse sont également possibles (Pakoa et al., 2018).

La leptospirose se transmet également de manière indirecte. C'est par l'intermédiaire d'un environnement souillé par l'urine d'animaux réservoirs que la plupart des contaminations humaines ont lieu. Ce mode de transmission représente un risque lors d'activités de loisirs en eau douce. Des épidémies de leptospirose ont pu être observées lors d'événements sportifs en

eau douce (Guillois et al., 2018; Pagès et al., 2016; Sejvar et al., 2005). Les agriculteurs, plus particulièrement dans les plantations irriguées comme les rizières ou les tarodières, sont également concernés (Levett, 2001).

L'environnement constitue donc un facteur clé dans la transmission et donc dans l'épidémiologie de la leptospirose humaine.

III. Contexte épidémiologique

a. Dans le monde

La leptospirose est une zoonose majeure causant une forte morbidité dans le monde et est responsable de nombreux morts. La sous-estimation du nombre de cas humains, due aux difficultés de diagnostic, ainsi que le manque d'information font de la leptospirose une maladie négligée. En 2015, Costa *et al.* estiment la leptospirose responsable de 1,03 millions de cas et 58 900 morts par an dans le monde, en prenant en compte ces facteurs de sous-estimation (Costa et al., 2015).

Les plus forts taux de mortalité et morbidité sont retrouvés dans les pays à faible ressource où l'incidence de la maladie est sous-estimée, notamment en Océanie, dans les régions d'Asie du Sud et du Sud-Est, en Amérique Centrale et Tropicale ainsi qu'en Afrique Sub-Saharienne (Figure 3).

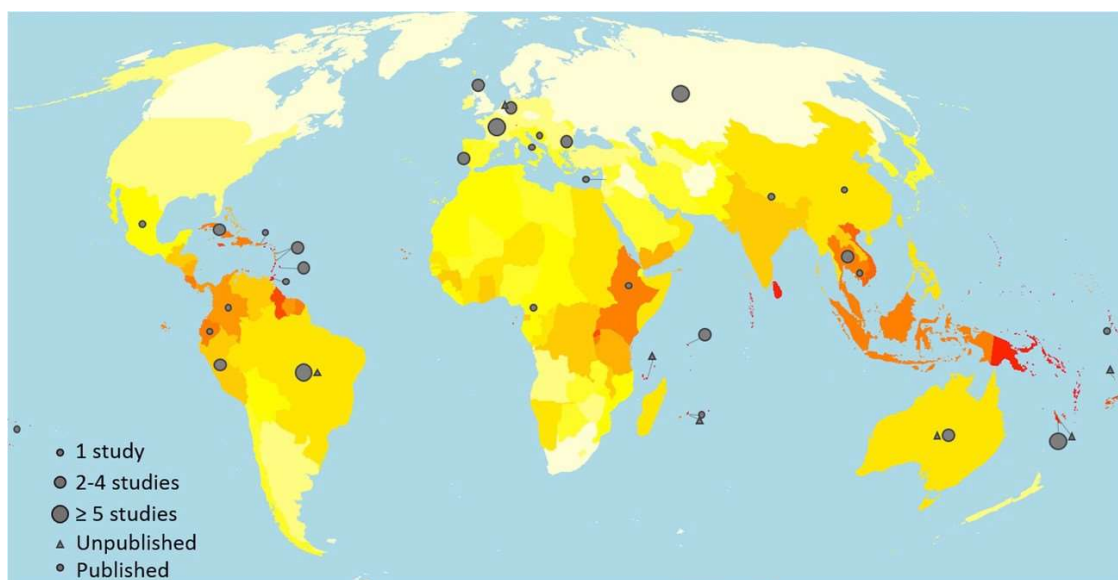


Figure 3 Carte de répartition mondiale de la leptospirose

L'incidence annuelle de la leptospirose est représentée par un gradient exponentiel de couleurs du blanc (0-3), jaune (7-10), orange (20-25) jusqu'au rouge (plus de 100), en nombre de cas pour 100 000 habitants. Les points gris indiquent l'origine des études publiées sur le sujet. (Costa et al., 2015)

D'importantes épidémies ont ainsi été observées au Sri Lanka avec plus de 7000 cas diagnostiqués (Warnasekara and Agampodi, 2017). De même, 1980 cas ont été recensés entre 2004 et 2010 au Nicaragua en Amérique Centrale (Schneider et al., 2012). Dans ces régions où la leptospirose est endémique, son incidence est le plus souvent saisonnière et marquée par des pics liés aux fortes pluies (Chadsuthi et al., 2012; Desvars et al., 2011). Ce type d'épidémie risque de toucher de plus en plus de régions du globe. En effet, le changement climatique actuel aura un impact certain sur la distribution et l'incidence de la leptospirose dans le monde (Lau et al., 2010). De même, l'augmentation de la fréquence et de l'intensité des cyclones et inondations attendue devrait participer à la recrudescence de l'incidence de la leptospirose ainsi que l'ampleur de ses épidémies.

Au-delà de la répartition climatique des cas de leptospirose humaine, les pays les plus industrialisés semblent peu touchés en comparaison avec les zones moins développées. Les populations à risque se situent principalement dans des zones péri-urbaines au développement anarchique, comme les bidonvilles au Brésil (Ko et al., 1999) mais aussi en zone rurale, aux alentours des rizières en Asie (Schønning et al., 2019). La leptospirose se retrouve donc aussi bien dans les zones rurales qu'urbaines.

b. En Nouvelle-Calédonie

En Nouvelle-Calédonie, la leptospirose est reconnue depuis de nombreuses années comme un réel problème de santé publique. Avec une incidence moyenne actuelle de 30 à 35 cas pour 100 000 habitants et par an, la leptospirose humaine est endémique en Nouvelle-Calédonie. Son profil épidémiologique prend la forme de pics saisonniers mais aussi d'épidémies durant les périodes de fortes pluies, l'incidence pouvant alors atteindre 150 cas pour 100 000 habitants par an.

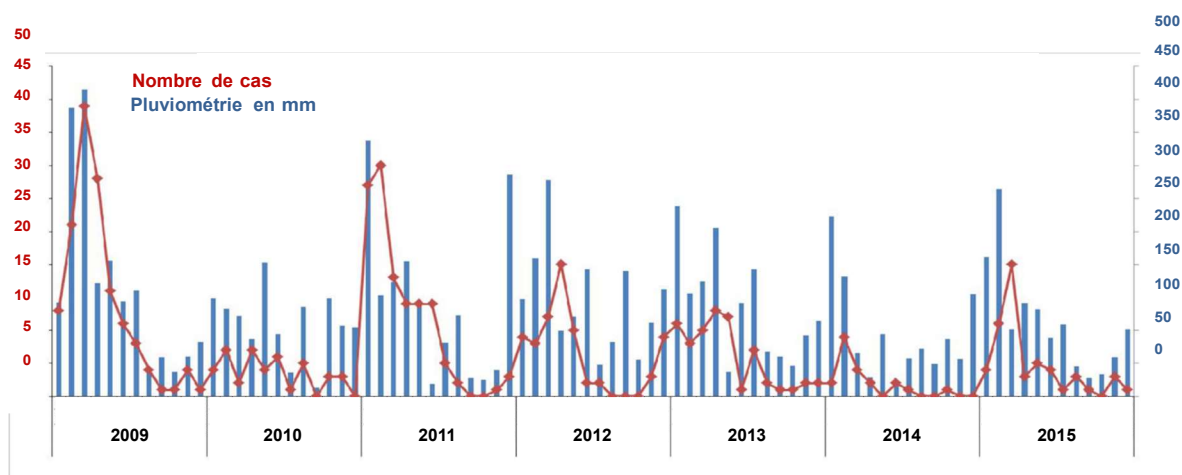


Figure 4 Evolution du nombre de cas de leptospirose en fonction de la pluviométrie mensuelle entre 2009 et 2015 en Nouvelle-Calédonie

(adapté de Données : DASS Nouvelle-Calédonie)

De façon plus marquée encore, il existe des zones dites hyper-endémiques qualifiées de "hotspots" où l'on dénombre plus de 500 cas pour 100 000 habitants (Goarant et al., 2009; Perez et al., 2011). Les régions de Bourail et Ponerihouen sont des exemples de ces "hotspots" (Figure 5). En Nouvelle-Calédonie l'augmentation de la température moyenne (scénario le plus probable selon le GIEC et les travaux locaux) pourrait également allonger la durée de la saison propice à la leptospirose humaine et ainsi augmenter son incidence.

Du fait de son impact majeur en santé publique, cette maladie a été inscrite par la Nouvelle-Calédonie comme maladie à déclaration obligatoire depuis 1991. Elle est étudiée depuis près de 30 ans à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC), devenu le laboratoire de référence sur le territoire ainsi que pour d'autres îles du Pacifique telles que Wallis & Futuna. Les données épidémiologiques acquises par l'IPNC et la Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de Nouvelle-Calédonie (DASS-NC) durant ces années d'études montrent des caractéristiques majeures de sa répartition au sein de la population et du territoire néo-calédoniens. Il a ainsi été démontré que la leptospirose impacte très majoritairement les zones rurales.

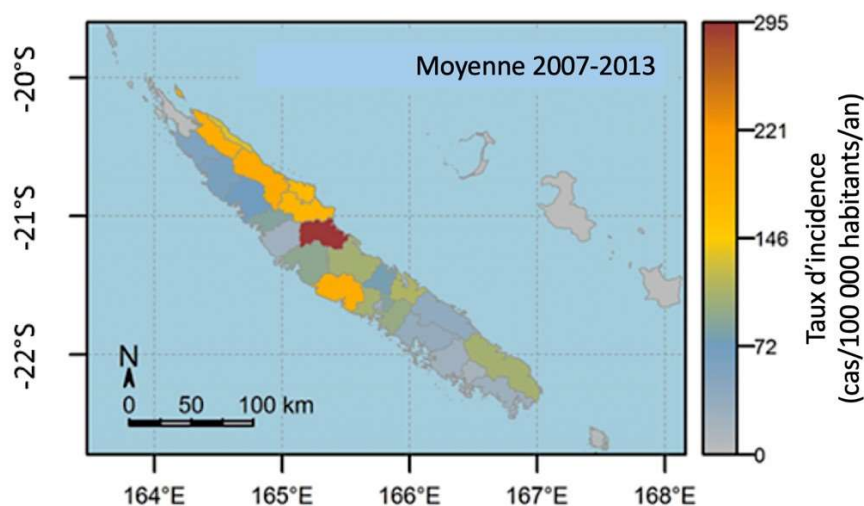


Figure 5 Carte d'incidence de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie
(produite par Dr M. Teurlai, IPNC)

En effet, les épidémies de 2008 et 2009 ont particulièrement affecté les régions de Bourail et Ponerihouen, qui subissent régulièrement des inondations et où la population est fortement impliquée dans des activités agricoles. Entre 2011 et 2015, 73% des cas confirmés de leptospirose concernaient des personnes vivant en tribu ; cette zoonose est donc fortement liée au mode de vie tribal (DASS Nouvelle-Calédonie, 2016). Les métiers des domaines de l'agriculture, de l'élevage de bétail ou des travaux publics, représentaient 12,6% des cas confirmés de leptospirose humaine pour la période 2011-2015. Tout comme dans le reste du monde, la transmission à l'homme par contact direct avec un animal réservoir, a majoritairement lieu dans un contexte professionnel. Ainsi, les vétérinaires, les chasseurs, les fermiers, les personnels d'abattoir ou encore les dératisseurs peuvent être directement exposés à de l'urine ou des reins infectés. Toutefois, l'exposition indirecte via les eaux, les sols et la boue reste la source d'infection humaine la plus fréquente en Nouvelle-Calédonie. Elle peut avoir lieu lors d'activités de loisirs comme la baignade en eau douce (DASS Nouvelle- Calédonie, 2016; Thibeaux et al., 2017).

L'espèce pathogène la plus fréquemment retrouvée lors de cas humains en Nouvelle- Calédonie est *Leptospira interrogans*, les sérogroupes Icterohaemorrhagiae, Australis et Pyrogenes étant les plus fréquents (Goarant et al., 2009).

PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS

Malgré l'importance de l'environnement dans la transmission de la leptospirose, peu de choses sont connues sur le mode de vie des leptospires pathogènes dans l'environnement hydrotellurique ainsi que leur stratégie de survie. Les objectifs de ma thèse sont donc de comprendre la transmission environnementale des leptospires pathogènes, de connaître leur stratégie de survie dans des environnements pauvres en nutriments et d'analyser les facteurs pouvant influencer cette survie.

L'incidence élevée de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie, ainsi que le taux important de contamination via un environnement souillé, font du territoire calédonien le terrain idéal pour l'étude de la transmission environnementale de la leptospirose.

Dans ce manuscrit, le premier chapitre s'intéresse aux travaux récents, notamment de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, sur la phylogénie du genre *Leptospira* ainsi que la diversité et l'écologie des leptospires dans l'environnement hydrotellurique. Dans le second chapitre, une revue systématique de la littérature a été utilisée pour affiner une hypothèse de mécanisme liant l'écologie des leptospires pathogènes dans l'environnement et le risque sanitaire pour les humains. Le troisième chapitre présente les travaux réalisés *in vitro* en microcosmes destinés à identifier les déterminants de la survie des leptospires pathogènes dans l'environnement. Enfin, la conclusion s'efforce d'identifier les priorités de recherche dans ce domaine.

I. Évolution de la phylogénie

Les leptospires sont de fines bactéries hélicoïdales d'environ 0,1 µm de diamètre et dont la taille est comprise entre 6 et 20 µm de longueur. Ils appartiennent au genre *Leptospira*, famille des *Leptospiraceae* qui fait partie du phylum des *Spirochaetes*.

a. Classifications taxonomiques

Deux types de classifications taxonomiques existent. Les leptospires peuvent être classés en fonction de leur signature antigénique mais également de leur diversité génétique. La classification sérologique repose sur la diversité des antigènes présents à leur surface alors que la classification moléculaire ou génomique se base sur les différences génétiques.

La classification sérologique est utilisée de façon historique à des fins de diagnostic de la leptospirose ainsi que dans la majorité des études épidémiologiques. Elle est basée sur la diversité des antigènes de surface portés par les leptospires, principalement les lipopolysaccharides (LPS), grâce à l'utilisation d'anticorps issus de sérums selon la technique du MAT pour "microscopic agglutination test". Cette classification permet de différencier les leptospires en taxons sérologiques appelés sérovars. Les sérovars proches, d'un point de vue antigénique, sont traditionnellement regroupés en sérogroupe (Kmety and Dikken, 1993). On distingue ainsi au sein du genre *Leptospira* plus de 300 sérovars, regroupés en plus de 20 sérogroupe, lesquels n'ont toutefois pas de valeur phylogénique dans ce système (Picardeau, 2013). Le sérogroupe décrit comme responsable du plus grand nombre de cas de leptospirose humaine est le sérogroupe Icterohaemorrhagiae et notamment le sérovar éponyme Icterohaemorrhagiae et le sérovar Copenhageni.

Une classification génomique, moins utilisée en épidémiologie et diagnostic, a été mise en place à l'avènement de la biologie moléculaire et regroupe les souches alors connues en espèces (Yasuda et al., 1987). Cette classification moléculaire, plus récente, était initialement fondée sur l'étude de l'ADN de l'ARN 16S des leptospires avant de se baser sur du séquençage de génomes complets. Cette classification pose des difficultés d'utilisation en microbiologie clinique du fait de l'absence de corrélation avec la classification sérologique.

En effet, un même sérovar peut être retrouvé au sein de différentes espèces. Par exemple, le sérovar Pyrogenes est retrouvé au sein des espèces *L. interrogans* et *L. santarosai*. De même, le sérovar Pomona existe au sein des espèces *L. interrogans* et *L. noguchii*. On peut même

retrouver le sérovar hardjo dans les trois espèces génomiques *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* et *L. meyeri* (Levett, 2001). Ainsi, l'identification de sérovars identiques peut en fait correspondre à des espèces distinctes. Pour ces raisons, mais aussi grâce à la découverte de nouvelles espèces, une révision taxonomique de la classification des leptospires a été proposée à partir de la fin des années 1980 (Brenner et al., 1999; Letocart et al., 1999; Postic et al., 2000; Ramadass et al., 1992; Yasuda et al., 1987).

b. Phylogénie

Historiquement, le genre *Leptospira* était composé de seulement 2 espèces, *L. interrogans*, regroupant toutes les souches pathogènes, et *L. biflexa*, comprenant les souches saprophytes isolées de l'environnement, qualifiées de « water *Leptospira* » (Faine and Stallman, 1982). Les leptospires saprophytes sont incapables d'infecter un hôte et sont des habitants naturels des eaux et sols. À l'inverse, les leptospires pathogènes, à l'origine des contaminations humaines et animales, sont responsables de la leptospirose. L'avènement de la biologie moléculaire a d'abord permis de révéler, grâce à des études phylogéniques, la division du genre *Leptospira* en trois groupes monophylétiques : saprophyte, intermédiaire et pathogène. De plus, les espèces génomiques du genre *Leptospira* ne correspondent plus seulement aux 2 espèces *L. interrogans* et *L. biflexa*. En effet, le groupe des leptospires intermédiaires est capable de provoquer des infections chez les animaux et les humains, mais les pathologies provoquées sont modérées. De plus, les infections expérimentales en modèle animal montrent que ces espèces ne provoquent pas de leptospirose dans les modèles animaux classiquement utilisés. Cependant, l'exemple de *Leptospira kmetyi* remet en doute la cohérence écologique de la classification. Cette espèce a été décrite à partir d'un échantillon de sol (Slack et al., 2009) et n'a jamais été détectée dans des prélèvements animaux ni humains. Pourtant, la phylogénie la classe parmi le groupe des pathogènes.

c. Nouvelles classifications des leptospires

La génomique comparative a permis de rechercher quelles différences dans le génome des leptospires pourraient expliquer leurs différents modes de vie (Fouts et al., 2016). Par exemple, *Leptospira borgpetersenii*, connu pour avoir une faible capacité de survie environnementale, semble évoluer vers un mode de vie strictement parasitaire impliquant une transmission directe d'un hôte à un autre. Dans le même temps, cette évolution se traduit par une réduction de son génome (Bulach et al., 2006). Cependant, il existe un manque de connaissance sur les mécanismes moléculaires sous-jacents la pathogénicité, la virulence ou la persistance environnementale des leptospires pathogènes, essentiellement dû aux difficultés

de les cultiver en laboratoire ainsi que de les manipuler génétiquement (Murray et al., 2009a). Des travaux étudiant la relation entre la virulence et les caractéristiques génomiques au sein du genre *Leptospira* pourraient répondre à ces questions (Picardeau, 2017).

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont participé à l'isolement, la caractérisation et l'évaluation de la virulence en modèles animaux de nouvelles espèces isolées de l'environnement Néo-Calédonien (Thibeaux et al., 2018b). Les expériences d'infections par des leptospires virulents permettent d'étudier les infections aiguës de la leptospirose chez les animaux sensibles comme le hamster (Haake, 2006) mais aussi l'infection chronique chez les animaux résistants tels que la souris ou le rat (Marcsisin et al., 2013). Les travaux réalisés ont montré que les nouvelles espèces des groupes phylogénétiques « pathogène » et « intermédiaire » ne sont capables de provoquer ni infection aiguë chez le hamster ni colonisation chronique chez la souris. Ces résultats sous-tendent l'existence de leptospires "pathogènes à faible virulence", malgré leur position phylogénétique au sein des pathogènes, comme le suggère un article auquel j'ai participé expérimentalement et présenté en annexe I (Thibeaux et al., 2018b).

MICROBIAL GENOMICS

RESEARCH ARTICLE

Thibeaux et al., *Microbial Genomics* 2018;4
DOI 10.1099/mgen.0.000144



Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence

Roman Thibeaux,^{1†} Gregorio Iraola,^{2†} Ignacio Ferrés,² Emilie Bierque,¹ Dominique Girault,¹ Marie-Estelle Soupé-Gilbert,¹ Mathieu Picardeau^{3,*†} and Cyrille Goarant^{1,*†}

Figure 6 Page de titre de la publication « Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence »

paru en 2018 dans le journal *Microbial genomics*

Il est ainsi démontré une forte hétérogénéité au sein du groupe des leptospires pathogènes qui est composé de souches plus ou moins virulentes. L'originalité de ce travail est également que ce niveau de virulence corrèle avec des caractéristiques particulières du génome accessoire. En phylogénie comparative, le pangénome correspond à l'ensemble des gènes présents au sein d'un genre bactérien. Il regroupe les gènes communs aux souches étudiées, appelé le core-génome, et les gènes spécifiques de certaines espèces, regroupés dans le génome

accessoire (Medini et al., 2005). La construction d'un arbre phylogénétique basé sur les séquences concaténées de 671 gènes du core-génome de leptospires a permis de valider la pertinence de subdiviser les leptospires en trois groupes phylogénétiques nommés pathogènes, intermédiaires et saprophytes (Figure 7). Douze nouvelles espèces, isolées en Nouvelle-Calédonie et décrites dans le cadre de ce travail, ont ainsi pu être placées dans cet arbre. Cette étude a permis de mettre en lumière la diversité taxonomique actuelle des leptospires. Cependant, les 3 nouvelles espèces qui se situent à la base du groupe des pathogènes sur cet arbre phylogénétique montrent une virulence faible ou absente. Cette observation remet en question le principe, jusqu'alors admis, d'une corrélation entre la phylogénie et la virulence pour les mammifères.

L'ensemble de ces résultats argumente ainsi l'intérêt d'une nouvelle classification du genre *Leptospira*. À l'issue de ce travail, nous proposons ainsi la distinction de souches « de faible virulence » au sein du groupe phylogénétique des pathogènes. La pertinence de cette distinction est supportée par l'étude des génomes accessoires des différentes espèces de *Leptospira* de ce groupe (Thibeaux et al., 2018b).

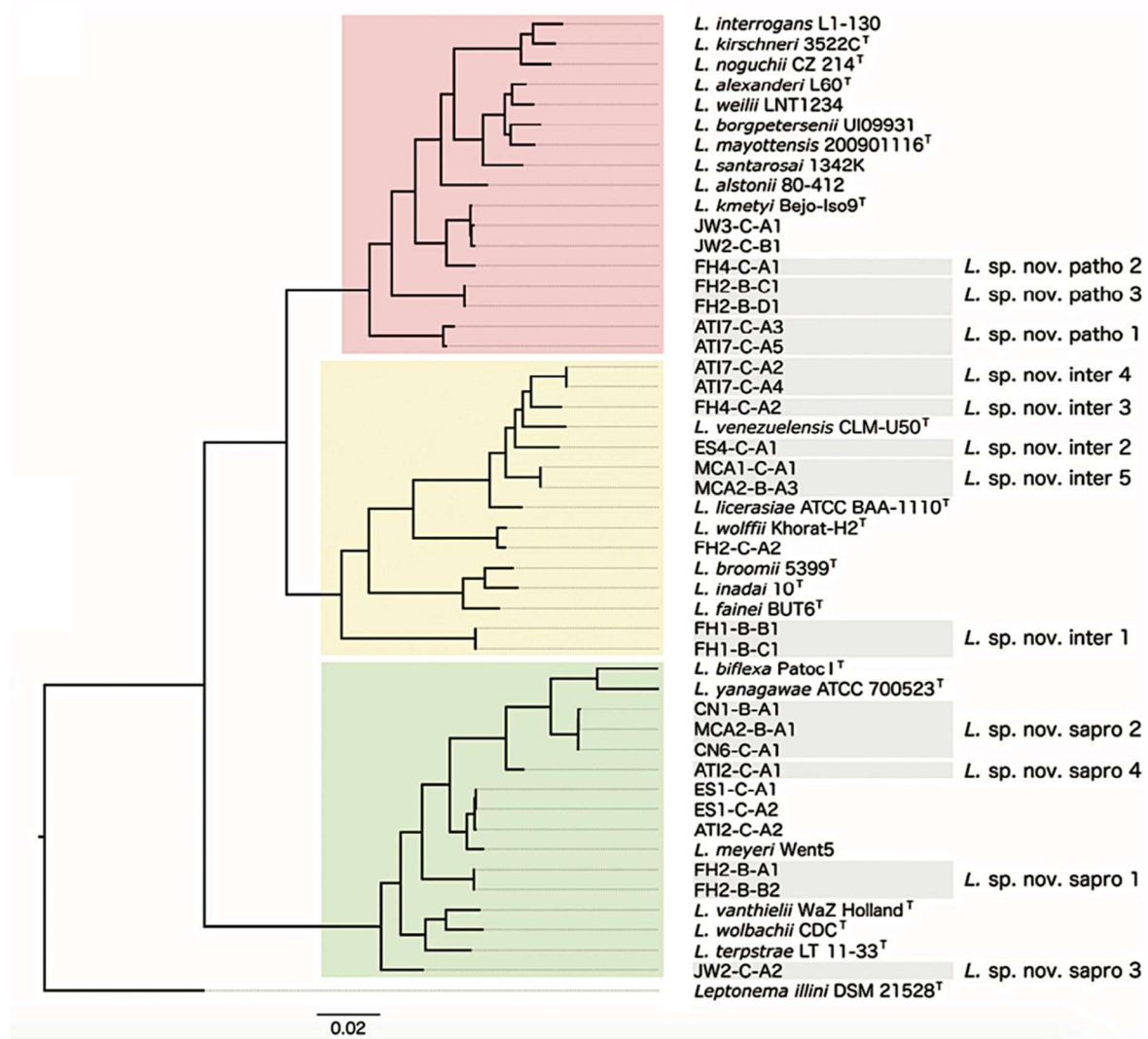


Figure 7 Classification du genre *Leptosira* en trois clades monophylétiques

Cet arbre est basé sur les séquences concaténées de 671 gènes présents au sein du genre *Leptosira*. Les trois groupes associés à différents niveaux de pathogénicités sont représentés en rouge pour les pathogènes, en jaune pour les intermédiaires et en vert pour les saprophytes. Les encarts gris correspondent aux nouvelles espèces décrites dans cette étude. (adapté de Thibeaux et al. 2018)

Ces nouvelles espèces ont été nommées dans le cadre d'un article auquel j'ai également contribué de façon expérimentale (Thibeaux et al., 2018a). Les noms choisis rendent hommage à des chercheurs prestigieux du domaine, comme le veut la tradition taxonomique du genre *Leptosira*, mais incluent également *Leptosira neocaledonica* sp. nov. pour témoigner de l'origine de cette espèce. Dans cet article, présenté en annexe II, nous soulignons la capacité de la spectrométrie de masse MALDI-ToF à identifier correctement les leptospires au niveau de l'espèce.



Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis

Roman Thibaux^{1†}, Dominique Girault^{1†}, Emilie Bierque¹, Marie-Estelle Soupé-Gilbert¹, Anna Rettinger^{2†}, Anthony Douyère³, Michael Meyer³, Gregorio Iraola⁴, Mathieu Picardeau⁵ and Cyrille Goarant^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Paolina Garbeva,
Netherlands Institute of Ecology
(NIOO-KNAW), Netherlands

¹ Leptospirosis Research and Expertise Unit, Institut Pasteur in New Caledonia, Institut Pasteur International Network, Noumea, New Caledonia, ² Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich, Munich, Germany, ³ Institut des Sciences Exactes et Appliquées, Plateau MET/MEB, Université de la Nouvelle-Calédonie, Noumea, New Caledonia, ⁴ Bioinformatics Unit, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay, ⁵ Biology of Spirochetes Unit, Institut Pasteur, National Reference Centre and WHO Collaborating Center for Leptospirosis, Paris, France

Figure 8 Page de titre de la publication « Biodiversity of environmental *Leptospira* : Improving identification and revisiting the diagnosis »

paru en 2018 dans le journal Frontiers in Microbiology

Plus récemment, le séquençage massif de près de 100 souches de leptospires a permis de décrire davantage de nouvelles espèces environnementales, mais aussi de réorganiser la classification moléculaire (Vincent et al., 2019). Ces travaux établissent l'existence de quatre sous-clades, désignées Pathogène 1 (P1, ancien groupe des Pathogènes), Pathogène 2 (P2, anciennement intermédiaires), Saprophyte 1 (S1) et Saprophyte 2 (S2), et illustrées sur la figure 9.

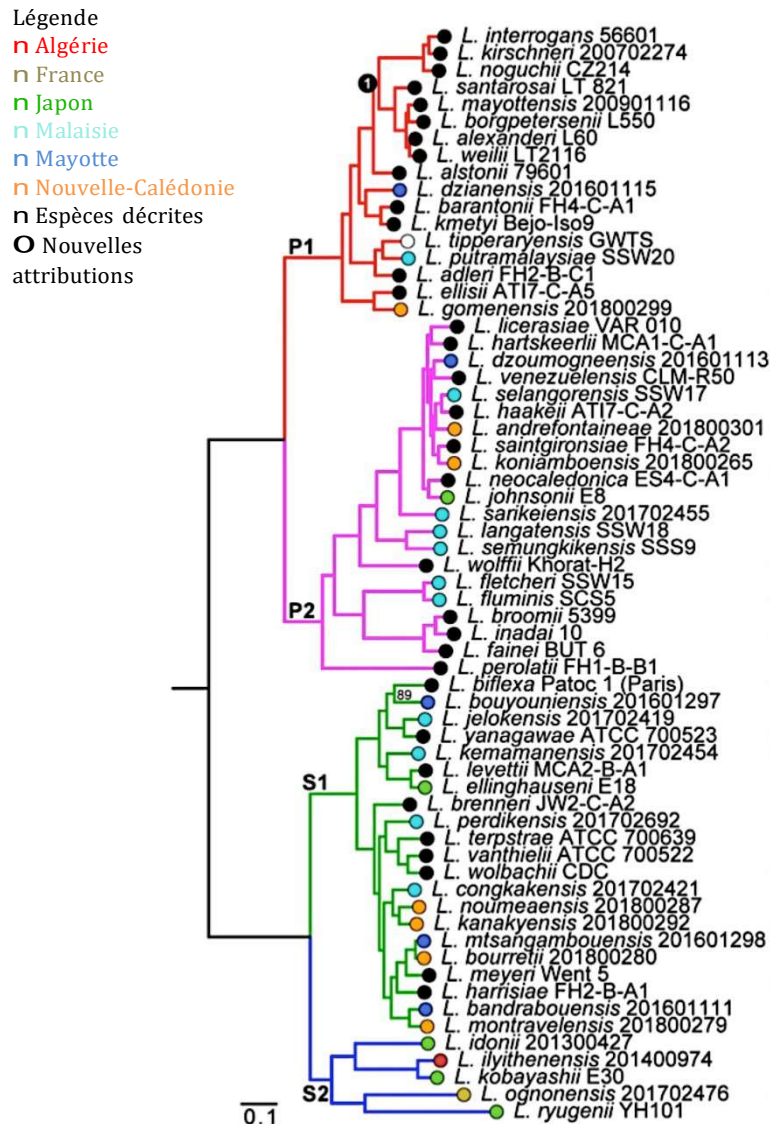


Figure 9 Classification actuelle du genre *Leptospira*

Cet arbre est basé sur les séquences de 1371 gènes considérés orthologues c'est à dire qu'il s'agit de gènes homologues chez différentes espèces. Les branches sont colorées en fonction des sous-clades P1 en rouge, P2 en rose, S1 en vert et S2 en bleu. Les cercles de couleurs représentent l'origine géographique de chaque nouvelle espèce présentée ici. (Vincent et al. 2019)

La phylogénie maintient ainsi une relation présumée avec la pathogénicité. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour aboutir à une meilleure compréhension du déterminisme génétique de la virulence.

À nouveau grâce à une étude de génomique comparative, les caractéristiques de chaque sous-clade ont pu être identifiées permettant d'affiner la classification du genre *Leptospira*. De façon plus approfondie, le groupe P1, incluant les pathogènes virulents, montre des

caractéristiques génomiques particulières suggérant une évolution de la virulence chez les leptospires pathogènes pour l'homme et les animaux.

II. Biodiversité des leptospires dans les sols

En 1914, le premier leptospire décrit a été isolé à partir d'un échantillon d'eau en Italie (Wolbach and Binger, 1914). Désigné alors en tant que *Spirocheta biflexa*, il appartient aujourd'hui au groupe des saprophytes S1. Cette espèce a été renommée plus tard *Leptospira biflexa*. Seulement un an après, le premier représentant des pathogènes était décrit sous le nom de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, correspondant à l'actuel *L. interrogans* (Inada and Ido, 1915).

La figure 10 montre l'évolution de la biodiversité connue des leptospires depuis 1914. Il faudra ensuite attendre la fin des années 1980 pour qu'une troisième espèce, *Leptospira inadai*, appartenant au groupe des intermédiaires ou P2 selon la nomenclature actuelle, soit décrite (Schmid *et al.*, 1986; Hookey *et al.*, 1993). Ainsi, les trois catégories (que l'on sait maintenant monophylétiques) du genre *Leptospira* étaient alors chacune représentées par une seule espèce. En 1987, les travaux de Yasuda et collaborateurs ont permis de décrire 7 espèces, portant à 9 le nombre des espèces génomiques au sein du genre *Leptospira*, parmi lesquelles *Leptospira borgpetersenii* (Yasuda *et al.*, 1987). Jusqu'en 2014, le nombre d'espèces de leptospires décrits augmente lentement, passant de 9 à 22 espèces. Un pic est tout de même observé en 1999 avec la description de 5 espèces pathogènes P1 et saprophytes S1 à partir d'isolats historiques de Chine (Brenner *et al.*, 1999).

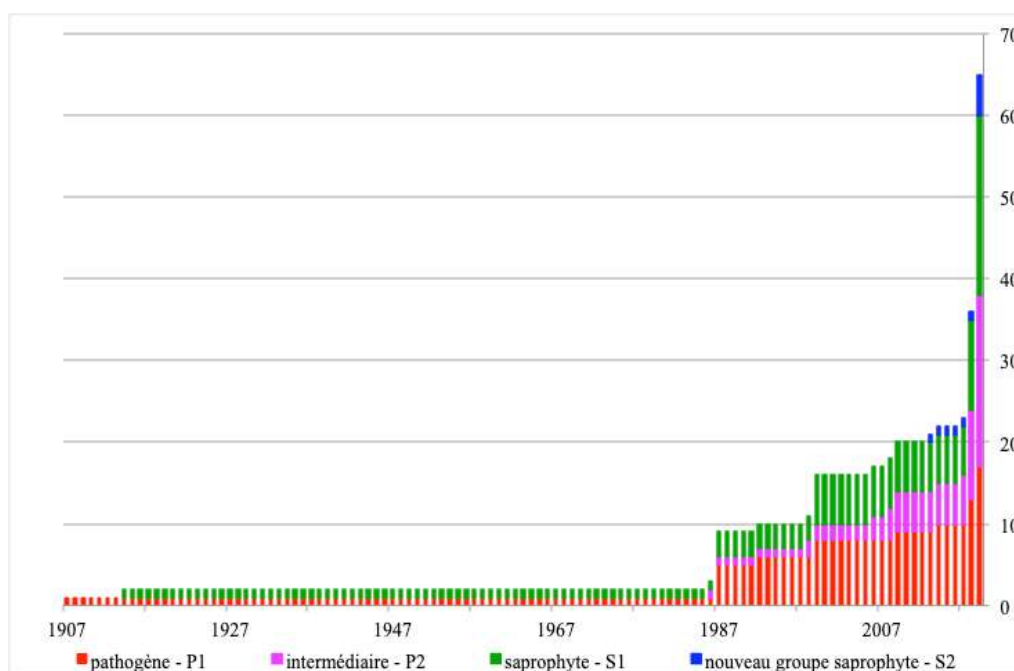


Figure 10 Évolution du nombre d'espèces décrites au sein du genre *Leptospira*

Ces courbes représentent le nombre d'espèces de leptospires décrites en fonction de leur année de description. En respectant le code couleur de la figure 7, les données représentées en rouge et en rose correspondent aux espèces appartenant aux groupes P1 et P2, respectivement. Les courbes de couleur verte et bleue représentent respectivement les groupes saprophytes S1 et S2. (Adapté de C. Goarant, IPNC).

Les 22 espèces de leptospires connues en 2013 comprenaient alors 10 pathogènes (actuellement le groupe P1), 5 intermédiaires (groupe P2 actuel), 7 saprophytes dont 6 du groupe S1. Le tableau 1 regroupe l'historique de la connaissance de la biodiversité au sein du genre *Leptospira* de 1914 à nos jours.

L'optimisation des techniques de détection moléculaire et l'élaboration de méthodes d'isolement à partir d'échantillons environnementaux complexes ont ainsi permis la découverte d'une biodiversité importante dans l'environnement et surtout dans les sols. À partir de 2017, la diversité connue du genre *Leptospira* explose en multipliant par trois le nombre d'espèces décrites, en seulement trois ans.

L'IPNC a largement contribué à cette augmentation rapide, démontrant la grande diversité du genre au sein de l'environnement hydro-tellurique. Les travaux menés ont permis l'isolement de 26 souches de *Leptospira* retrouvées sur 6 sites différents en Nouvelle-Calédonie (Thibeaux et al., 2018a). L'analyse phylogénétique de ces souches via l'étude de leurs génomes complets a permis d'identifier 12 nouvelles espèces, amenant à un total de 35 espèces appartenant au genre *Leptospira* et donc une augmentation de sa diversité de plus de

50%. Selon la phylogénie typique en trois groupes, on compte parmi ces nouvelles espèces : trois pathogènes, cinq intermédiaires et quatre saprophytes (Tableau 1). L'étude détaillée de leur génome accessoire prenant en considération leur virulence en modèles animaux permet aussi de montrer l'imperfection de la corrélation présumée entre phylogénie et virulence (Thibeaux et al., 2018b).

Le nombre d'espèces isolées en Nouvelle-Calédonie s'est encore accru avec la description de 7 nouvelles espèces, dont *Leptospira kanakyensis* sp. nov. et *Leptospira koniambonensis* sp. nov. par exemple (Vincent et al., 2019). Ces descriptions démontrent l'existence d'une diversité jusqu'alors inexplorée au sein du genre *Leptospira*. Dans ce contexte, la communauté scientifique montre un intérêt grandissant à la recherche de nouvelles espèces dans les sols et les eaux. Les études de détection et d'isolement se multiplient. Grâce à cette diversité récemment mise en lumière, la nomenclature des leptospires a été revisitée en reconnaissant 4 sous-clades au sein du genre *Leptospira*, comme décrit précédemment dans ce chapitre (Vincent et al., 2019). L'analyse des génomes de 90 souches de leptospires, isolées dans différents pays du monde dont la Nouvelle-Calédonie, a ainsi permis de révéler 30 nouvelles espèces de leptospires. Parmi les 42 nouvelles espèces décrites récemment, 21 proviennent d'échantillons de sols comme le souligne le tableau 1. Les progrès de la génomique comparative, couplés à la découverte d'un nombre croissant d'espèces, permettront de mieux comprendre le déterminisme génétique de la virulence.

Tableau 1 Historique des espèces décrites et validées au sein du genre *Leptospira* de 1914 à 2019

Pour chaque espèce sont détaillés l'année de description, le type et l'origine de l'échantillon à partir duquel l'espèce a été décrite. Les échantillons provenant de l'environnement tellurique sont notifiés en gris. La classification de chaque espèce y est également informée. Le code couleur utilisé se réfère à la figure 7 représentant la phylogénie actuelle des leptospires. Les groupes pathogènes sont inscrits en rouge pour les pathogènes 1 et en rose pour les pathogènes 2, anciennement intermédiaire ; en vert, on retrouve le groupe saprophyte S1 et en bleu le nouveau groupe phylogénétique S2. (Adapté de C. Goarant, IPNC)

Année de description	Espèces	Origine		Nomenclature		Nombre total d'espèces décrites validées	Références
		échantillon	géographie	Mono phylétique	Phylogénie actuelle		
1914	<i>biflexa</i>	eau	Italie	saprophyte	S1	1	<i>Wolbach and Binger, 1914</i>
1917	<i>interrogans</i>			pathogène	P1	2	<i>Inada and Ido, 1915</i>
1986	<i>inadai</i>	humain	Etats-Unis	intermédiaire	P2	3	<i>Schmid et al., 1986</i>
1987	<i>borgpetersenii</i>	rat	Indonésie	pathogène	P1	9	<i>Yasuda et al., 1987</i>
	<i>noguchii</i>	opossum	Panama	pathogène	P1		
	<i>santarosai</i>	rat		pathogène	P1		
	<i>weilii</i>	humain	Australie	pathogène	P1		
	<i>meyeri</i>	grenouille	Etats-Unis	saprophyte	S1		
	<i>wolbachii</i>	eau		saprophyte	S1		
1992	<i>kirschneri</i>	chauve-souris	Indonésie	pathogène	P1	10	<i>Ramadass et al., 1992</i>
1998	<i>fainei</i>	cochon	Australie	intermédiaire	P2	11	<i>Perolat et al., 1998</i>
1999	<i>alexanderi</i>	humain	Chine	pathogène	P1	16	<i>Brenner et al., 1999</i>
	<i>alstonii</i>	grenouille		pathogène	P1		
	<i>terpstrae</i>	inconnue		saprophyte	S1		
	<i>vanthielii</i>	eau	Pays-Bas	saprophyte	S1		
	<i>yanagawae</i>	eau	Brésil	saprophyte	S1		
2006	<i>broomii</i>	humain	Danemark / France	intermédiaire	P2	17	<i>Levett et al., 2006</i>
2008	<i>wolffii</i>	humain	Thaïlande	intermédiaire	P2	19	<i>Matthias et al., 2008</i> <i>Slack et al., 2008</i>
	<i>licerasiae</i>	humain	Pérou	intermédiaire	P2		
2009	<i>kmetyi</i>	sol	Malaisie	pathogène	P1	20	<i>Slack et al., 2009</i>
2013	<i>idonii</i>	eau	Japon		S2	21	<i>Saito et al., 2013</i>
2014	<i>mayottensis</i>	humain	Mayotte	pathogène	P1	22	<i>Bourhy et al., 2014</i>
2017	<i>venezuelensis</i>	humain	Venezuela	intermédiaire	P2	23	<i>Puche et al., 2018</i>

2018	<i>brenneri</i>	sol	Nouvelle-Calédonie	saprophyte	S1	34	<i>Thibeaux et al., 2018</i>
	<i>ellisii</i>	sol		pathogène	P1		
	<i>barantonii</i>	sol		pathogène	P1		
	<i>adleri</i>	sol		pathogène	P1		
	<i>perolatii</i>	sol		intermédiaire	P2		
	<i>neocaledonica</i>	sol		intermédiaire	P2		
	<i>saintgironisae</i>	sol		intermédiaire	P2		
	<i>haakeii</i>	sol		intermédiaire	P2		
	<i>hartskeerlii</i>	sol		intermédiaire	P2		
	<i>harrisiae</i>	sol		saprophyte	S1		
	<i>levettii</i>	sol		saprophyte	S1		
2019	<i>bandrabouaensis</i>	eau	Mayotte	saprophyte	S1	64	<i>Vincent et al., 2019</i>
	<i>bouyouniensis</i>	eau	Mayotte	saprophyte	S1		
	<i>congkakensis</i>	sol	Malaisie	saprophyte	S1		
	<i>ellinghausenii</i>	eau	Japon	saprophyte	S1		
	<i>jelokensis</i>	sol	Malaisie	saprophyte	S1		
	<i>kanakyensis</i>	sol	Nouvelle-Calédonie	saprophyte	S1		
	<i>ryugenii</i>	eau	Japon		S2		
	<i>kemamanensis</i>	eau	Malaisie	saprophyte	S1		
	<i>johnsonii</i>	eau	Japon	intermédiaire	P2		
	<i>kobayashii</i>	sol			S2		
	<i>ilyithenensis</i>	eau	Algérie		S2		
	<i>ognonensis</i>	eau	France		S2		
	<i>mtsangambouensis</i>	eau	Mayotte	saprophyte	S1		
	<i>noumeaensis</i>	sol	Nouvelle-Calédonie	saprophyte	S1		
	<i>selangorensis</i>	eau	Malaisie	intermédiaire	P2		
	<i>sarikeiensis</i>	eau		intermédiaire	P2		
	<i>langatensis</i>	eau		intermédiaire	P2		
	<i>semungkisensis</i>	sol		intermédiaire	P2		
	<i>fletcheri</i>	eau		intermédiaire	P2		
	<i>fluminis</i>	sol		intermédiaire	P2		
	<i>putramalaysiae</i>	eau		pathogène	P1		
	<i>montravelensis</i>	eau	Nouvelle-Calédonie	saprophyte	S1		
	<i>perdikensis</i>	eau	Malaisie	saprophyte	S1		
	<i>dzoumognensis</i>	eau	Mayotte	intermédiaire	P2		
	<i>dzianensis</i>	eau		pathogène	P1		
	<i>gomenensis</i>	sol	Nouvelle-Calédonie	pathogène	P1		
	<i>andrefontaineae</i>	sol		intermédiaire	P2		
	<i>koniambonensis</i>	eau		intermédiaire	P2		
	<i>bourretii</i>	sol		saprophyte	S1		
	<i>tipperaryensis</i>	<i>Crocidura russula</i>	Irlande	pathogène	P1		

De façon intéressante, des études antérieures ont aussi révélé un nombre plus important d'isolement de leptospires à partir d'échantillons de sols que provenant d'échantillons d'eaux (Baker and Baker, 1970; Henry and Johnson, 1978; Wilson and Fujioka, 1995). Ces résultats

supportent l'hypothèse selon laquelle les sols constituent l'habitat environnemental préférentiel des leptospires et qu'il existe un possible réservoir environnemental (Schneider et al., 2018; Thibeaux et al., 2018a, 2018b). De cette évidence écologique d'un habitat tellurique préférentiel a émergé l'hypothèse d'une remise en suspension des leptospires, possiblement liés aux particules de sol, lors des fortes pluies et des crues. Certaines observations supportaient cette hypothèse, par exemple, la corrélation positive entre la concentration de leptospires et la turbidité dans une même eau (Viau and Boehm, 2011). Dans la même idée, les observations épidémiologiques suggèrent une exposition humaine à la leptospirose pendant des événements de fortes pluies ou des inondations (Togami et al., 2018).

Nous avons voulu confronter cette hypothèse avec l'ensemble des connaissances scientifiques actuelles, en adoptant la méthode exigeante d'une revue systématique de la littérature scientifique. Cette étude est présentée sous forme d'article dans le prochain chapitre.

I. La composante environnementale de la leptospirose

Bien que la leptospirose soit décrite comme une zoonose, il apparaît essentiel de prendre en considération la notion d'écosystème dans sa transmission. Comme le montre le cycle de transmission de la leptospirose présenté en introduction, l'environnement joue en effet un rôle central dans son épidémiologie du fait de l'importance des contaminations indirectes, *via* les sols et les eaux. Un nombre croissant d'études a permis de mettre en évidence la survie des leptospires pathogènes dans l'environnement (Saito et al., 2013; Smith and Self, 1955). En amont de ce travail de thèse, l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie a notamment montré la présence de leptospires viables dans des sols plusieurs mois après un cas de contamination humaine (Thibeaux et al., 2017). Néanmoins les connaissances sur le mode de vie des leptospires en dehors d'un hôte sont limitées et éparses, du fait de la difficulté de les cultiver *in vitro*, ainsi que des remaniements de classification qu'a subis le genre *Leptospira*.

La survie des leptospires pathogènes a été principalement étudiée en laboratoire *via* la mise en place de microcosmes d'eaux (Andre-Fontaine et al., 2015; Smith and Turner, 1961) et de sols (Hellstrom and Marshall, 1978; Smith and Self, 1955). Ces études ont ainsi démontré la capacité des leptospires pathogènes à survivre plusieurs semaines voire plusieurs mois dans différents types d'environnements hydrotelluriques (Casanovas-Massana et al., 2018; Okazaki and Ringen, 1957).

Les techniques de biologie moléculaire permettent la détection de leptospires saprophytes et pathogènes. Cependant, l'intérêt sanitaire pour la détection spécifique de leptospires pathogènes suscite des études majoritairement ciblées sur les leptospires virulents du groupe P1. Grâce à ces technologies, la présence de leptospires pathogènes a été mise en évidence dans des eaux de surface notamment en Asie du Sud-Est (Azali et al., 2016; Mohd Radi et al., 2018; Tansuphasiri et al., 2006) mais également dans les sols (Benacer et al., 2013; Fuh et al., 2011). Pourtant, les données de quantification des leptospires virulents dans l'eau et les sols sont rares.

Historiquement, l'isolement de leptospires à partir d'échantillons environnementaux était réalisé grâce à leur mise en culture. Les leptospires virulents sont des bactéries délicates à cultiver au laboratoire et à croissance lente, leur isolement à partir d'échantillons d'eau ou de sol reste donc un défi, toujours d'actualité. De ce fait, peu d'études antérieures ont permis

d'isoler des leptospires virulents. L'inoculation en animal sensible a permis par le passé l'isolement de leptospires pathogènes dans différents pays (Baker and Baker, 1970; Diesch and McCulloch, 1966; Kim, 1987), mais son utilisation systématique n'est aujourd'hui pas acceptable sur le plan éthique du bien-être animal.

Dans ce contexte, une partie de mon travail de thèse a consisté à réaliser une revue systématique de la littérature, présentée ici. Cette étude identifie et synthétise 86 articles scientifiques d'intérêt afin d'obtenir une vision complète des connaissances actuelles sur (1) le rôle de l'environnement dans l'épidémiologie de la leptospirose ainsi que (2) sur les techniques utilisées pour l'étude des leptospires dans l'environnement.

Article 1 Revue systématique de la littérature synthétisant les connaissances actuelles sur les leptospires dans l'environnement hydrotellurique.

Bierque, E., Thibeaux, R., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.E., Goarant, C. (2020). "A systematic review of *Leptospira* in the hydrotelluric environment". PLoS ONE. 15(1) :e02227055. doi:10.1371/journal.pone.0227055

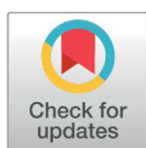
RESEARCH ARTICLE

A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments

Emilie Bierque , Roman Thibeaux, Dominique Girault, Marie-Estelle Soupé -Gilbert, Cyrille Goarant *

Leptospirosis Research and Expertise Unit, Institut Pasteur in New Caledonia, Institut Pasteur International Network, Noumea, New Caledonia

* cgoarant@pasteur.nc



Abstract

Background

Leptospirosis, caused by pathogenic *Leptospira*, is a zoonosis of global distribution. This infectious disease is mainly transmitted by indirect exposure to urine of asymptomatic animals via the environment. As human cases generally occur after heavy rain, an emerging hypothesis suggests that rainfall re-suspend leptospires together with soil particles. Bacteria are then carried to surface water, where humans get exposed. It is currently assumed that pathogenic leptospires can survive in the environment but do not multiply. However, little is known on their capacity to survive in a soil and freshwater environment.

Methods

We conducted a systematic review on *Leptospira* and leptospirosis in the environment in order to collect current knowledge on the lifestyle of *Leptospira* in soil and water. In total, 86 scientific articles retrieved from online databases or institutional libraries were included in this study.

Principals findings/significance

This work identified evidence of survival of *Leptospira* in the environment but major gaps remain about the survival of virulent species associated with human and animal diseases. Studies providing quantitative data on *Leptospira* in soil and water are a very recent trend, but must be interpreted with caution because of the uncertainty in the species identification. Several studies mentioned the presence of *Leptospira* in soils more frequently than in waters, supporting the hypothesis of the soil habitat and dispersion of *Leptospira* with re-suspended soil particles during heavy rain. In a near future, the growing use of high throughput sequencing will offer new opportunities to improve our understanding of the habitat of *Leptospira* in the environment. This better insight into the risk of leptospirosis will allow implementing efficient control measures and prevention for the human and animal populations exposed.

OPEN ACCESS

Citation: Bierque E, Thibeaux R, Girault D, Soupé-Gilbert M-E, Goarant C (2020) A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. PLoS ONE 15(1): e0227055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055>

Editor: Odir A. Dellagostin, UFPL, BRAZIL

Received: October 17, 2019

Accepted: December 10, 2019

Published: January 27, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055>

Copyright: © 2020 Bierque et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

1 Introduction

Pathogenic *Leptospira*, the etiological agents of leptospirosis, occur worldwide. This infectious disease affects people living in temperate and tropical climates in both rural and urban areas. Previous studies have estimated that the disease is responsible for at least 1 million cases and nearly 60,000 deaths annually [1]. This bacterial infection is frequently asymptomatic or initially presents as a flu-like febrile illness, making its clinical diagnosis challenging. Patients can then develop severe illness as Weil's disease (jaundice, bleeding and acute renal failure), and/or severe pulmonary haemorrhage [2].

Pathogenic leptospires multiply in the renal tubules of chronically infected mammals [3]. Then, bacteria are shed via urine into the environment. Humans can be exposed directly or indirectly: veterinarians, farmers and meat workers, for example, may be in contact with infected kidneys or urine. However, indirect contamination through the environment is the most frequent human exposure route. This complex epidemiology makes it a paradigm of a One Health disease. Cases of leptospirosis occur after both occupational and recreational activities [4]. Transmission can occur by contact between wounded skin or mucosae and contaminated soil or water. Leptospirosis had long been known as an environment-borne infection, even before its etiological agent could be identified [5] and the term of "environmental reservoir" of leptospirosis has been proposed for soils in endemic regions [5–15]. Consequently, studies have focused on source investigations and on environmental risk factors to understand interspecies contaminations [16]. Besides risk factors of global significance, there is evidence that the risk assessment of leptospirosis transmission should take into account the geographical scale studied in order to evaluate locally relevant environmental and socioeconomic factors of human contamination [17].

It is currently assumed that pathogenic virulent leptospires are unable to multiply in the environment [18,19]. However, although the survival capacity of most species outside a host is not questionable, little is known on the environmental factors and determinants conditioning this survival [20]. The capacity of *Leptospira* to adapt to parameters such as osmolarity inside a host or in nature was also shown to be species-specific and related to the size of the *Leptospira* genome [21]. Knowledge on the lifestyle and the survival mechanisms of pathogenic leptospires in the environment remains scarce. This contributes to our insufficient understanding of basic aspects of leptospirosis epidemiology. More precisely, the capacity of different strains to survive in environmental conditions remains largely unexplored. Yet, understanding *Leptospira* survival is of prime importance for a better control and prevention of human leptospirosis.

Generally, massive leptospirosis outbreaks occur after heavy rain or flooding, notably after storms or hurricanes. Such outbreaks have been described in many tropical countries such as Brazil [22], Nicaragua [23], Sri Lanka [24] or the Philippines [25] among others, but seasonal peaks exist in most regions including tropical islands [26–30], illustrating the numerous environmental drivers of this disease [31]. Consequently, global climate change is expected to have an influence on the incidence and the distribution of leptospirosis [32–34].

This study aims to provide a systematic overview of the knowledge available on *Leptospira* presence and persistence in soil and water environments, including isolation and detection methods through a systematic literature review.

2 Materials & methods

2.1 Databases and search strategy

Articles were sought in April 2017 and the searches were further updated until December 2018 from three international databases: Medline (through PubMed), Scopus, and ScienceDirect.

We used a combination of the following search terms: [Leptospir⁺ AND (soil OR water OR mud OR ecology OR hydric OR telluric OR environment OR paddy)]. The search terms were chosen to account for the diversity of words used to describe the soil and water ecosystems. In addition, the search term “ecology” was included to capture articles dealing with *Leptospira* ecology more generally.

2.2 Article selection process

The stepwise selection of articles was based on the strategy presented in Fig 1. First, duplicate articles were identified by sorting article titles in alphabetical and publication date order using a custom formatting of the database on an Excel spreadsheet. An additional identification of duplicates was made manually. Duplicates were discarded. Secondly, only articles in English or French were kept for further consideration. The third step consisted in excluding references that did not correspond to original scientific articles (e.g. indexes, abstracts, meeting announcements, reviews, posters, course material). In addition, articles that were out of the scope of this systematic review (e.g. about *Leptospirillum*, dealing with other viral or bacterial diseases, toxicology) were also excluded. Similarly, articles dealing with leptospirosis but without any link with the environmental aspect of the disease were removed. At this step, the availability of abstracts associated with articles was checked. Each abstract available was read by at least 2 researchers to confirm its relevance to the scope of the review and further proceed to the reading of the full length article. If a disagreement was observed, a third researcher was involved to further include or exclude the article. The full texts of the articles included for consideration in this systematic review were retrieved from various sources, including paper copies from institutional libraries. Articles whose abstract were not available were also read independently by 2 or 3 researchers to decide on their inclusion in the final analysis. The process is summarized in Fig 1.

2.3 Analysis of article content—Inclusion criteria

The full texts of all included articles were read independently by 2 or more researchers as described above, who collected all relevant data. This included the methods used as well as qualitative and/or quantitative results and taxonomic position of the strain as well as any other information useful for the understanding of *Leptospira* environmental survival. In addition, critical analysis of the articles allowed taking note of possible biases or limitations, including taxonomic uncertainties. Data was collected on Microsoft Excel for each individual article by one researcher and systematically checked by two other contributors.

3 Results

3.1 Studies selected

The initial search on databases retrieved 10,884 articles in total using Scopus, Medline and ScienceDirect databases. After removing 1,401 duplicates, 9,021 articles, either in English or in French, were submitted to inclusion criteria. Then 7,381 original scientific articles were sorted according to the scope of our systematic review. Finally 410 articles dealt with *Leptospira* or leptospirosis with mention of possible study in the environment. Of these, 75 were selected based on the abstract and 11 based on their full text, leading to a total of 86 full-text articles included for our analysis, as summarized in Fig 1.

Despite the selection of relevant keywords and a rigorous selection process, our final selection included articles that did not provide any relevant information, mostly because *Leptospira* was not sought in the ecosystem or the authors failed to evidence its presence [35–38]. Another

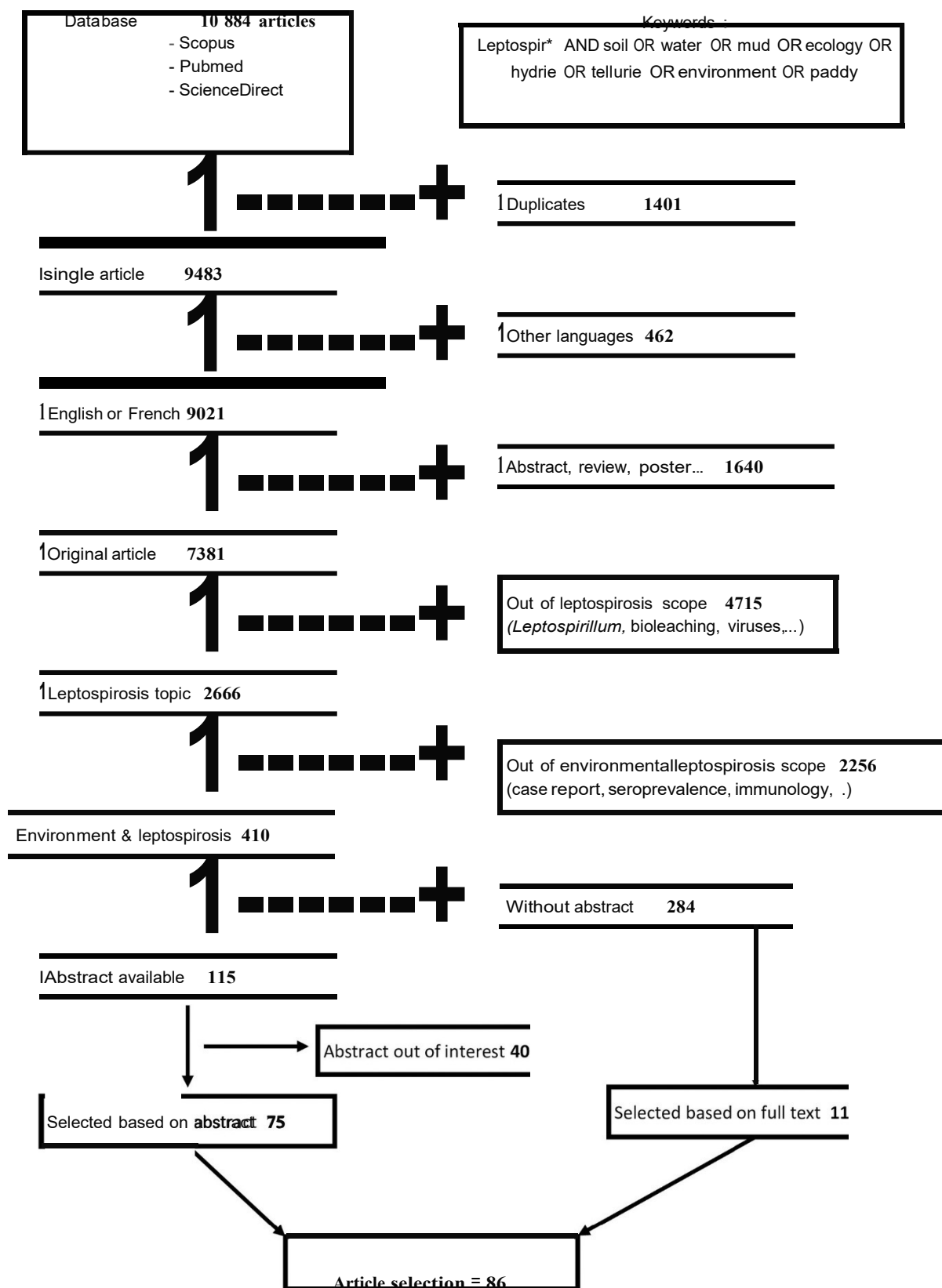


Fig 1. Flow diagram of the systematic review and identification of the 78 articles included in our study.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055.g001>

article fulfilling our selection process used former data to build a deterministic model, not providing original results [39]. In spite of these examples, our systematic review allowed collecting the techniques used and the current knowledge on *Leptospira* in the environment.

Factors usually reported to influence the survival of *Leptospira* in water or soils such as pH, salinity, temperature, moisture were not sufficiently reported in the studies selected to allow meta-analysis. However, it should be noted that a number of studies demonstrated *Leptospira* survival at low pH or low temperature in water or soils [11,40–45].

3.2 Methods used for the detection or isolation of *Leptospira* from the environment

3.2.1 Molecular techniques to detect *Leptospira* in environmental samples and limitations. Recent work suggests that some *Leptospira* within the “Pathogens” subclade have very low virulence towards mammals [14]. Oppositely, an increasing number of human leptospirosis cases have been reported as caused by *Leptospira* from the “Intermediate” subclade [46]. Together with comparative genomics data, this recently led to rename these subclades P1 and P2, with poor correlation to virulence in mammals [47]. Within the P1 subclade (formerly “pathogens”), another comparative genomics study separated 4 groups, namely Group I (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*), Group II (*L. santarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. alexanderi* as well as *L. mayottensis*), Group III (*L. alstonii*) and group IV (*L. kmetyi*) [48]. Within subclade P1 and to date, only species from Groups I and II have been isolated from humans or mammals and are considered virulent. Therefore, most articles reporting the molecular detection of “pathogenic” *Leptospira* must be interpreted with caution as they may not evidence the presence of virulent leptospires.

Techniques of leptospiral DNA amplification have been developed in order to detect leptospires from environmental samples. Early studies used 16S rRNA primers to detect saprophytic and pathogenic *Leptospira* [49,50] but most PCR techniques target genes only present in pathogenic *Leptospira* species like *lipL32* [51–55]. Other targets are sequences of *flaB* [10], *secY* [56–58] or *lfb1* genes [59,60] which display relevant polymorphisms; the PCR used and their possible applications to epidemiological studies have been reviewed recently [61]. Some studies combined two sets of primers to implement a multiplex PCR targeting both *lipL32* (a gene present only in species from the P1 and P2 subclades, but detected by most PCR only in species from the P1 subclade) and genus-specific 16S rRNA (detecting all *Leptospira* spp.) to detect pathogenic *Leptospira* in environmental samples. The advent of real-time PCR has facilitated the acquisition of quantitative PCR data from environmental samples. Of note, there is also evidence that several targets for molecular detection of *Leptospira* in environmental samples can result in a high proportion of non-specific false-positive detections [62,63]. Even when specific, the detection of leptospires by PCR-based techniques does not provide any information concerning viability of cells in the environment. Yet, this point is of prime importance in the assessment of the risk of environmental transmission of the disease.

PCR methods have successfully been combined with the use of propidium monoazide to dramatically reduce the detection of dead or membrane-compromised cells. This technique, known as viability-PCR, provides indications about *Leptospira* viability in environmental samples [13,19]. Recently, some researchers have optimized procedures for the molecular detection of pathogenic leptospires from environmental waters [64], increasing possibilities for

further studies on environmental leptospirosis and opening avenues for real One Health studies of this complex zoonosis.

3.2.2 Isolation of *Leptospira* from environmental samples. Isolating pathogenic leptospires from the environment is very challenging. However, some leptospires were historically isolated from environmental samples. Since saprophyte species, which are common inhabitants of the environment, are abundant and grow faster, they are the most frequently isolated from soil and water samples [8,65,66]. They also constitute a major difficulty to isolate virulent leptospires from Group I and II from surface water or soil by overgrowing these slow-growing strains [11,56]. Leptospires are sensitive bacteria in the laboratory. Strains from the P1 subclade are fastidious slow growing microorganisms with specific requirements [67]. The main culture media developed for *Leptospira* are the Korthof medium and the Ellinghausen McCullough Johnson Harris (EMJH) medium [68]. Different synthetic media have been developed for the culture of *Leptospira* [69], but EMJH is the principal medium used for both routine culture and isolation [70,71]. Benacer and colleagues [56] used it with addition of 5-fluorouracil to prevent contamination [72] while others used antibacterial and antifungal cocktails, the most recent being named STAFF (for sulfamethoxazole, trimethoprim, amphotericin B, fosfomycin and 5-fluorouracil) combination [6,10,11,14,73]. Another possibility to avoid contamination from water sample is the prefiltration through 0.22µm-pore size filters to inoculate culture media [10,74,75], although only a small proportion of leptospires pass through 0.22µm filter membranes [76]. This classical detection method does not allow quantification approaches because of a culture step. Likewise, this technique results in a loss of *Leptospira* diversity, notably accounting for the very rare isolation of significant pathogens from the groups I and II. Furthermore, isolation and culture techniques do not take into account possible viable but non-cultivable organisms, a physiological state never evidenced in *Leptospira*, but known from a large number of bacterial genera [77].

One of the historical methods used to isolate virulent leptospires has been the *in vivo* inoculation into susceptible animals. The strategy was to inoculate environmental samples (water or soil washings) directly into a susceptible animal in order to recover infecting leptospires in pure culture from blood. Still, this method does neither allow quantification, because pathogens are amplified or cleared by immune system of the host. Likewise, *Leptospira* infection can be concealed by another infection that kills the animal, preventing to isolate the virulent leptospires.

Lastly, Electron Microscopy studies provided evidence of *Leptospira*-shaped Spirochetes in microbial mats from salt marshes, but did not provide unambiguous evidence that these organism belong to the genus *Leptospira* [78].

3.3 *Leptospira* in water environments

3.3.1 Occurrence of *Leptospira* in water. Studies have identified DNA sequences of *Leptospira* from the P1 subclade in drinking water (for human or for animals) samples [79–82]. This suggested a significant health concern and opened the way to consider *Leptospira* in studies on the potential risks associated with drinking water [83,84]. In 2017, Zhang and colleagues used metagenomics approaches to get insight into microbial communities of an urban drinking water system. Different pathogenic bacteria genomes were found in their dataset. An almost complete *Leptospira* genome was also retrieved; however, a Multi Locus Sequence Typing analysis shows that it corresponded to a saprophytic species [85]. A study in Colombia investigated the presence of *Leptospira* from the pathogenic subclade in drinking water systems and detected DNA of *Leptospira* from the P1 subclade in 41% of water fountains in Cali [86].

Environmental freshwater is one of the main sources of leptospirosis for humans and animals. In this typical One Health context, early studies attempted to identify potential human contamination sources [87–93]. Most often, isolation and identification of pathogenic *Leptospira* from surface water were attempted after contamination events [94] and data on occurrence were analyzed to explain past outbreaks [95]. As discussed above, authors who used culture-based methods mostly detected saprophytic strains [70,74,96–99]. When *Leptospira* from the Pathogenic subclade P1 were successfully isolated, they were most frequently related to the low-virulent Groups III & IV [8,65] or could not be further characterized [93]. In total, only very few studies described successful isolation of pathogenic leptospires from Group I and II, with proven virulence, from freshwater or soil [100–103]. Susceptible animal inoculation works provided isolates of virulent leptospires from creek's water samples in the USA [100] and from soils and water samples in Malaysia [101]. This technique however is currently unacceptable for ethical reasons because of the important number of susceptible animal used (almost 14,000 in the study in Malaysia [101]). More recently, *Leptospira interrogans* was successfully isolated from paddy water in Korea after inoculation into guinea pigs [102]. In Iowa (USA) scientists found the pathogenic "*Leptospira pomona*" (obsolete nomenclature, a pathogenic *Leptospira* from serogroup Pomona) during several years in surface waters used for recreational activities in the 1960s [100,104]. Later, molecular detections have facilitated studies. In Malaysia, where leptospirosis is endemic, leptospires from the P1 subclade have been found in up to 23.1% of lakes and recreational areas [56,75,105]. Similarly, Tansuphasiri detected leptospires from the P1 subclade in 23% of surface waters in Thailand [91]. These studies used classical PCR detection so did not collect quantitative data.

Only few studies provided quantitative data of *Leptospira* in environmental samples, mostly using quantitative real time PCR techniques. Estimations of concentrations of leptospires in surface water samples in Peru have evidenced from 1 to 17,147 leptospires per mL [106]. These authors demonstrated higher frequency but also higher concentrations in the urban area than in the surrounding rural areas. However, the PCR used also detected *Leptospira* from the P2 subclade [12] and sequences mostly pointed to an unknown subclade of *Leptospira* spp. with no known virulence [106]. Recently, quantitative detection of pathogenic *Leptospira* have been conducted in France, a temperate region. From 47 water samples, 3 were positive with concentrations from 10^3 to 10^4 genome-equivalent per mL [51]. In subtropical climate, 98.8% of Hawaiian streams revealed the presence of *Leptospira* (from the P2 subclade) with concentrations between 5 and 1000 genomes per 100 mL; this study highlighted a strong correlation between *Leptospira* concentration in water and the measured turbidity [15]. Other turbid water sources are represented by sewage water, historically linked with human contamination among sewage-workers [5,107,108]. A recent study in a Brazilian urban slum has shown that pathogenic *Leptospira* DNA was detected in 36% of sewage samples and even more frequently during the rainy season, with a mean concentration of 152 bacteria per mL [7].

3.3.2 Survival and persistence of *Leptospira* in water. Table 1 presents findings of studies on the persistence or survival of *Leptospira* spp. in water. Noguchi was the first to demonstrate the survival of pathogenic *Leptospira* for up to one week in drinking water, already pointing to environmental survival as an important clue in the epidemiology of leptospirosis, probably pioneering the One Health concept for leptospirosis [109]. However, technical difficulties to culture and identify leptospires from environmental samples restrict our knowledge of the environmental survival of pathogenic leptospires.

Microcosms or larger mesocosms have been largely used to study the survival of virulent *Leptospira* under different physicochemical conditions (See Table 1). Studies have demonstrated their capacity to survive in soil and water for prolonged periods. In a study, the survival and virulence was maintained for more than 40 days in soil and more than 20 days in water

Table 1. Studies about persistence of pathogenic *Leptospira* in the environment [11,13,19,40–45,67,109,116,119,128–132].

Matrix	Microorganism [–]	Survival (Days unless stated otherwise) or DNA persistence	Experimental Conditions	Geographical Area of Study, Country	Reference
East river water	"Leptospira icterohaemorrhagiae"	no survival	survival observed in (1) sample without treatment, (2) autoclaved sample and (3) filtered sample	laboratory experiment, USA	Noguchi 1918
sewage water					
stagnant water					
horse stool emulsion					
sewer filtrate					
drinking water		one week (infectious)	culture		
non sterile distilled water with few large motile bacilli	Pathogenic <i>Leptospira</i> strain Flanders	3 days	Flanders strain cultured 22 days in rabbit serum+Ringer's solution and then placed in non sterile distilled water with few large motile bacilli		
Plain tap water with air contamination	<i>"Leptospira icterohaemorrhagiae"</i>	18–20	Inoculation 10 ⁶ washed leptospires / mL of fluid 190 ml of water seeded with 10 ml of leptospiral suspension at 2.10 ⁷ cells/ mL incubated at 25–27°C	laboratory experiment, USA	Chang et al. 1948
Sterile tap water		From 28 hours to 32 days depending on pH values			
Sterile tap water with 1% serum		98–102			
Sterile tap water with 0.1% tryptose		50–54			
Tap water with bacterial flora		10–12			
Tap water with bacterial flora and 0.1% tryptose		36–40 hours			
Charles River water		5–6			
Sea water		18–20 hours			
Domestic sewage undiluted		12–14 hours			
Undiluted sewage aerated		2–3			
10% sewage in tap water		3–4			
1% sewage in tap water		7–8			
Sterile tap water 5–6°C		16–18	Inoculation 10 ⁶ washed leptospires / mL of fluid 190 ml of water seeded with 10 ml of leptospiral suspension at 2.10 ⁷ cells/ mL incubated at different temperatures		
Sterile tap water 25–27°C		30–32			
Sterile tap water 31–33°C		26–28			
Charles River water 5–6°C		8–9			
Charles River water 25–27°C		5–6			
Charles River water 31–32°C		3–4			
10% sewage in tap water 5–6°C		6–7			
10% sewage in tap water 25–27°C		3–4			
10% sewage in tap water 31–34°C		2–3			
Soil from a sugarcane farm on an alluvial flat bordering a river with addition of rainwater "to a fully moist condition" Soil pH reported to be 6.1–6.2	<i>"L. australis A"</i>	15 (2/2 replicates) to 43 (1/6) 15 (5/5 replicates)	Soil inoculated with cultures, then Soil inoculated with the urine of an experimentally infected rat Detection by re-isolation in guinea pigs	Laboratory experiment, Queensland, Australia	Smith and Self 1955

(Continued)

Table 1. (Continued)

Matrix	Microorganism ⁺	Survival (Days unless stated otherwise) or DNA persistence	Experimental Conditions	Geographical Area of Study, Country	Reference
distilled water—pH 6–34 to 36°C	<i>"Leptospira pomona"</i>	motility 2 culture 1	water inoculated with 2.10 ⁶ leptospires/mL soil inoculated with 10 ⁶ leptospires/2 gram microcosm assessment motility by observation on darkfield microscope and 0.1 mL for culturing	Laboratory experiment, USA	Okazaki and Ringen 1957
distilled water—pH 6–20 to 26°C		motility 11.3 culture 4			
distilled water—pH 6–7 to 10°C		motility 12.2 culture 8			
distilled water—pH 6–2 to -2°C		motility 0.23 culture 0.96			
distilled water—pH 6 - -20°C		motility 0.08 culture 0.04			
distilled water—pH 7.2–34 to 36°C		motility 6.8 culture 6.5			
distilled water—pH 7.2–20 to 26°C		motility 34.8 culture 29			
distilled water—pH 7.2–7 to 10°C		motility 54 culture 44.5			
distilled water—pH 7.2–2 to -2°C		motility 0.92 culture 1.35			
distilled water—pH 7.2 - -20°C		motility 0.8 culture 0.8			
distilled water—pH 8.4–34 to 36°C		motility 2.4 culture 2.0			
distilled water—pH 8.4–20 to 26°C		motility 17 culture 15			
distilled water—pH 8.4–7 to 10°C		motility 2.6 culture 2			
distilled water—pH 8.4–2 to -2°C		motility 0.42 culture 1.35			
distilled water—pH 8.4 - -20°C		motility 0.08 culture 0.08			
Palouse river water (Washington, USA)		motility 8 infection 10			
filtered Palouse river water		motility 99 culture 94 infection>18			
autoclaved Palouse river water		motility 47 culture 27			
double-distilled water		motility 18 infection 9			
Dry soil		motility 0 culture 2 hours			
Damp soil		motility 3 culture 5			
Water-supersaturated soil		motility 193 culture 183			
Phosphate-buffered distilled water at varying pH	4 different pathogenic <i>Leptospira</i>	Strain-dependent effect of pH.From ~10 days at low pH (<6.3) to >100 days.	Inoculation of phosphate-buffered distilled water tubes with an unknown number of leptospires. Survival assessed by microscopic observation of motile organisms.Of note, the cells are not washed, so diluted culture medium is also seeded in test tubes.	Laboratory experiment, London, UK	Smith and Turner 1961
Paddy field Water and artificially inoculated water	Pathogenic <i>Leptospira</i> (serogroup Australis)	In paddy field: survived up to 7 days. In laboratory experiments: survived 3h at 42°C; 7 days at 0°C and 14 days at 30°C	initial innoculum : 0.1 ml of one week old culture Paddy water were autoclaved, inoculated and distributed in 2mL ampoules dropped back into the paddy rice field or incubated into water baths/incubators/refrigerated room at various temperatures	Taiwan, 1965	Ryu and Liu 1966
	Saprophytic <i>Leptospira</i> (serogroup Semarang)	in paddy field: survived up to 7 days. In laboratory experiments: survived 6h at 42°C; 7 days at 0°C and 14 days at 30°C			

(Continued)

Table 1. (Continued)

Matrix	Microorganism ⁺	Survival (Days unless stated otherwise) or DNA persistence	Experimental Conditions	Geographical Area of Study, Country	Reference
Soil 1—pH 5.3—Dry matter (DM) 9.5%	Pathogenic <i>Leptospira</i> serogroups Grippotyphosa, Hebdomadis, Sejroe	6 hours	Soils inoculated with urine (0.5–0.8 mL) of <i>Leptospira</i> -carrying voles at $\sim 4.10^6$ leptospires/mL. 19 tests : 11 soil samples with different vegetation covers, pH and moisture. Survival determined by collecting twice a day, several mg of soil, resuspending in saline and examining by dark field microscopy	Laboratory experiment, Lake Nero, Yaroslav region, Russia, June–August 1970	Karaseva et al 1973
Soil 1—pH 5.5—DM 14.2%		8 hours			
Soil 1—pH 6.2—DM 16.5%		12 hours			
Soil 2—pH 7.1—DM 41.4%		3			
Soil 2—pH 7.4—DM 49.7%		5			
Soil 2—pH 6.8—DM 52.4%		5			
Soil 2—pH 7.5—DM 65.4%		7			
Soil 3—pH 6.9—DM 69.8%		14			
Soil 3—pH 7.4—DM 72.6%		14			
Soil 3—pH 7.5—DM 74.3%		15			
Soil 3—pH 6.5—DM 77.4%		15			
Ringer's solution at pH 7.15 and 20°C	" <i>L. autumnalis</i> " Akiyami A	>30 hours	10^5 leptospires per ml : 1-ml of this suspension added to 100 ml of a buffered-test solution to obtain 990 leptospires/mL. Incubation was at 30°C for up to 17 days.	Laboratory experiments, North Carolina	Schiemann 1973
buffered (5.33 mM phosphate) thiosulfate (4.95 mM) solution at pH 7.39 and 20°C		>95 hours			
buffered (5.33 mM phosphate) thiosulfate (4.95 mM) solutions at pH 7.40 and 25°C		~120 hours			
buffered (5.33 mM phosphate) thiosulfate (4.95 mM) solutions at pH 7.40 and 30°C		75 hours			
buffered (10 mM phosphate) thiosulfate (4.95 mM) solutions at 20°C and pH 8.22/7.82		>80 hours			
buffered (10 mM phosphate) thiosulfate (4.95 mM) solutions at 20°C and pH 7.42/7.37		>80 hours			
buffered (10 mM phosphate) thiosulfate (4.95 mM) solutions at 20°C and pH 6.79/6.72		25 hours			
EMJH medium at 37°C	23 pathogenic <i>Leptospira</i> and <i>Leptospira biflexa</i>	7–42 strain-dependent	1-mL inocula initially. Cells were cultured in EMJH medium at 37°C on successive subculture at 7-days intervals.	Laboratory experiments, USA	Ellinghausen 1973
phosphate-buffered solution with / without 1% Bovine Albumin	14 pathogenic <i>Leptospira</i> strains	7 days for all strains and conditions. Strain-dependent, but better survival with 1% Bovine Albumin compared to buffer alone.	1-mL inocula initially. Cells suspensions were stored at 23–25°C for 7 days before assessment of viability of serial dilutions		
Sandy loam acidic soil	Pathogenic <i>Leptospira</i> serogroup Pomona	Detection of live and virulent <i>Leptospira</i> up to 42 days	Soil incubated with 5×10^8 organisms. 10 g dried soil (40°C, 3 days) saturated at 75%, 100% and 125% water level incubated for 1, 3, 6, 10, 15, 22, 31, 42, 49, 56, 63 and 70 days. Each sample is, then, treated by added 20 mL sterile distilled water and agitated 4 hours before being centrifuged for 5 min at 3000 g. Soil washed supernatant. Culture and hamster inoculation.	Laboratory experiment, New Zealand	Hellstrom and Marshall 1978
Sensitivity to UV in diluted culture broth	<i>L. biflexa</i> serovar patoc Patoc I	<i>L. biflexa</i> more resistant to UV than <i>L. interrogans</i> serovar Pomona	2. 10^6 leptospires/mL initially. 3-mL of cell suspension were exposed to UV radiation under red light. The UV radiation dose was varied by changing the time of exposure with an intensity of 2 J/m ² /s. Survival assessed by culture	Laboratory experiments, North Carolina	Stamm and Charon 1988
	<i>L. interrogans</i> serovar Pomona				

(Continued)

Table 1. (Continued)

Matrix	Microorganism [*]	Survival (Days unless stated otherwise) or DNA persistence	Experimental Conditions	Geographical Area of Study, Country	Reference
pH-buffered solutions (2.2–7.9) at different temperatures (25–50°C)	<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae M-20	Survival assessed over 4 days Survival depends on both pH and temperature (modelled in the article) <i>Leptospira</i> total mortality at temperatures 45°C	~3x10 ⁵ leptospires / 100µL initially final survival assessed by re-culture factorial design investigating the combined effects of temperature and pH on survival. Analysis with a logistic regression model	Laboratory experiment, USA	Parker and Walker 2011
Rain puddle	Pathogenic and Intermediate <i>Leptospira</i>	~150 Of note, a real field study, new <i>Leptospira</i> contaminations may have occurred	soil sample 3-cm deep (7.8% moisture content) in a rain puddle Re-detection of the same isolate 5 months after the first sampling (same PFGE profile)	Fukuoka, Japan	Saito et al. 2013
pH 5.65; 25°C	pathogenic <i>Leptospira</i> spp <i>L. interrogans</i> and <i>L. kirschneri</i>	12 weeks	Rice field water and pond water were autoclaved. 12 ml at 0.5 McFarland standard of a logarithmic phase culture Spiking was performed by centrifuging 12 mL of the adjusted culture, discarding the supernatant, and then resuspending with 12 mL of Rice field water and pond water	Laboratory experiment, Thailand, 2001–2006	Stoddard et al, 2014
pH 5.65; 30°C		12 weeks			
pH 5.65; 37°C		12 weeks			
pH unadjusted (6.95 to 7.79); 25°C		12 weeks			
pH unadjusted (6.95 to 7.79); 30°C		12 weeks			
pH unadjusted (6.95 to 7.79); 37°C		10 / 12 weeks			
pH 8.65; 25°C		12 weeks			
pH 8.65; 30°C		12 weeks			
pH 8.65; 37°C		8 / 12 weeks			
Mineral bottled waters (5 different)	<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae Nantes 564	Survival 28–593 days depending on water and temperature. Of note, survival observed at low pH and low temperature	Non-sterilized mineral bottled water inoculated with a virulent <i>Leptospira interrogans</i> isolate (6.6x10 ⁴ /mL). Waters incubated at 4°C, 20°C or 30°C for up to 20 months. Survival was assessed by re-culturing in EMJH after filtration through 0.45µm filters. Temperature, pH, salinity and water composition considered independently. Microbial flora of the waters not considered. Of note, the cells are not washed, so diluted culture medium is also seeded in test tubes.	Laboratory experiment, France	Andre-Fontaine et al. 2015
River soils in tropical island	<i>L. interrogans</i> Pyrogenes	>63 Of note, a real field study, new <i>Leptospira</i> contaminations may have occurred	Re-detection of the same isolate 4 months after infection. Virulent leptospires were viable in soil up to 9 weeks Soil samples were submitted to DNA extraction using the PowerSoil DNA Isolation kit and viability was assessed by viability qPCR from soil washings	Field experiments, New Caledonia	Thibeaux et al. 2017
Mineral water pH 7.2	<i>L. interrogans</i> serovar Manilae strain L495	>42	2x10 ⁹ at Day 0 / 2x10 ⁷ at day 42 Late-logarithmic phase <i>Leptospira</i> grown in EMJH are harvested by centrifugation and resuspended in the same volume of mineral water, pH 7.2. Concentration is determined daily by direct count of mobile leptospires in Petroff-Hausser counting chamber, viability is determined by growth in standard EMJH.	Laboratory experiment, Paris, France	Hu et al. 2017
sewage from New Haven, USA	<i>L. interrogans</i> serovar Copenhageni <i>L. biflexa</i> Patoc	DNA persistence <i>L. interrogans</i> 8 days <i>L. biflexa</i> >28 days	Spiking 40g or mL of matrix by 10 ⁶ cells/g or mL incubated under dark condition at 29°C 1g or 1mL harvest at each time point Use of viability-PCR to assess survival	Laboratory experiments, USA	Casanovas-Massana et al. 2018
bottle spring water		Cell survival <i>L. interrogans</i> 28 days			
sandy loam soil from Brazil		<i>L. interrogans</i> DNA persistence 21 days—cell survival 28 days <i>L. biflexa</i> 28 days			
loam soil from New Haven, USA		DNA persistence <i>L. interrogans</i> 8 days <i>L. biflexa</i> >28 days			

^{*} Taxonomy as presented by the authors, may be obsolete for old articles

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055.t001>

[41]. This study, with others, confirmed that pathogenic leptospires can survive and remain virulent for several weeks in the water and soil environment. Environmental survival capacities depend on the species and strains [44]. Despite their increased recognition in human infections, little is known on the epidemiology of *Leptospira* from the P2 subclade [46]. Within the P1 subclade, the paradigm *L. interrogans* has been the model species to describe the well-known One Health epidemiology. However, other species are most likely unable to survive outside a host for prolonged periods, as was shown for *Leptospira borgpetersenii* [110]. Lastly, other species from the P1 subclade described more recently were only found in the environment, mostly soils, as is the case for *Leptospira kmetyi* [111]. Some of these novel P1 *Leptospira* species were also unable to cause infection in animal models, even questioning their real need of an animal reservoir [14]. Recent studies have shown survival and conservation of virulence ability of *Leptospira interrogans* for around 20 months in mineral bottled water [40]. However, in this latter study, the bacteria were inoculated with their EMJH culture medium (10 mL into 1.5 liters), rather mimicking highly diluted culture medium. This data remains the longest survival reported in such conditions like cold, acidic and nutrient-poor conditions.

3.4 *Leptospira* in the soil environment

3.4.1 Occurrence of *Leptospira* in soils. Again pioneering, Noguchi appears to be one of the first to consider, one century ago, soils as a possible environment where *Leptospira* could survive [109]. Culture methods have allowed isolation from only 1.1% of lake Nero soil samples in Russia [112]. Kingscote has revealed in 1970 a correlation between the bedrock of Southern Ontario and animal leptospirosis, but did not assess the presence of pathogenic *Leptospira in situ* [113]. Because of the technical challenges of studying delicate slow-growing organisms in soils, this environmental compartment remains poorly studied.

As discussed above, the advent of molecular techniques has allowed detection of *Leptospira* from soil samples. In Taiwan, 30.6% of farm soils that have been flooded sheltered pathogenic (P1) and non-pathogenic *Leptospira* [114]. The same proportion (31%) of *Leptospira* from the P1 subclade were found in soils of an urban slum in Brazil using *lipL32* qPCR [12]. In New Caledonia, the biodiversity of *Leptospira* isolated from soil has been revealed recently by identifying 12 novel species using MALDI-ToF mass spectrum and whole-genome sequencing analysis [6]. Using culture techniques and DNA detection, *Leptospira* has also been found in environmental samples from Malaysia [111,115]. In the same country, pathogenic *Leptospira* were recovered from soil washings in the early 1960s using animal inoculation. Interestingly, authors noted a higher isolation frequency from soil washings than from waters [101]. Quite similarly, a study in Minnesota showed a higher isolation frequency of saprophytic leptospires from soils than from adjacent waters [9]. Once again, in Hawaii, leptospires were isolated from 7 of 13 water samples, but from all 16 soil samples examined [99].

3.4.2 Survival and persistence of *Leptospira* in soils. Table 1 also includes findings of studies on the persistence or survival of *Leptospira* spp. in soils. Okazaki and Ringen probably pioneered the field of soil microcosms to study *Leptospira* survival and evidenced a 6-month survival of a virulent *Leptospira* in water-saturated soil [116] (See Table 1). Another study confirmed survival and virulence after 6 weeks in soil microcosms [42]. Recent work has studied DNA persistence and viability of virulent leptospires in soil and water using microcosms [19] (see Table 1). In this work, the authors have used viability-PCR and shown a rapid decay of DNA in soil and sewage, allowing to assume viability from a direct qPCR from these matrices, contrasting with their findings in water where DNA detection does not demonstrate survival due to longer persistence of free DNA in water [19]. In this study, the authors built a model of *Leptospira* (both *L. interrogans* and *L. biflexa*) persistence in the soils, waters and sewage

studied, notably showing survival of *L. interrogans* up to 3 weeks in one soil together with a stronger survival capacity of the saprophyte *L. biflexa* [19].

In field conditions in New Caledonia, data have shown the capacity of *Leptospira interrogans* to survive and remain virulent in riverbank soils and sediments up to 9 weeks after human infection events [13]. Similarly, the putative same *L. alstonii* strain (identical PFGE profile) was isolated twice five months apart from the same soil in Fukuoka, Japan [11]. However, these findings can also be explained by repeated contaminations from animals or the surrounding environment and the persistence of virulent leptospires in real environmental conditions deserves further studies.

Together with survival studies, the increasing number of novel *Leptospira* isolated from the environment raises the question of their lifestyle. Recent studies have developed an interest in soil compositions affecting survival of *Leptospira*. Lall and collaborators have highlighted positive correlation between the presence of pathogenic leptospires and soil nutrients such as nitrate but also with metals as iron, manganese and copper. This work may help the comprehension of environmental transmission of the human and animal disease in a One Health approach [117] but it remains crucial to better understand the survival of pathogenic *Leptospira* in soil.

4 Discussion

Our systematic review used a rigorous process to identify the published literature on *Leptospira* survival and persistence in the environment in relation to leptospirosis. There is strong and convergent evidence that virulent leptospires can survive and remain infectious in the environment for months, notably in soils. However, no definitive proof could be obtained from field studies in open environments, where water and soils could possibly be exposed to repeated contamination from animals or the surrounding ecosystem. In addition, the current molecular tools hardly predict the true virulence of *Leptospira* upon molecular detection in the context of our changing comprehension of virulence in this complex bacterial genus [47].

Mesocosms and microcosms studies have been used in the past and have recently attracted renewed interest. Complementary approaches linking field studies and lab-controlled experimental evidence can help gain further insights into *Leptospira* environmental ecology and leptospirosis epidemiology.

Numerous studies have shown the consequences of heavy rain triggering massive outbreaks of leptospirosis. An emerging hypothetical mechanism is that virulent leptospires survive in soils and that rains wash soil surfaces, putting particles, including leptospires in suspension into surface water [12,13]. Thereby, leptospires would reach streams and freshwater bodies where humans get exposed. This hypothetical mechanism is depicted in Fig 2 and bibliographic data supporting this hypothesis are summarized in Table 2.

Studies have revealed higher isolation rates of *Leptospira* from soil than from freshwater samples [9,99,101]. These findings support the hypothesis that soils may be the original habitat of the genus *Leptospira* and a possible environmental reservoir or at least a temporary carrier of pathogenic strains [6,14,19]. This mechanism hypothesis is also supported by other findings, notably the positive correlation between *Leptospira* concentration in water and turbidity shown in Hawaiian streams [15]. The epidemiological records also suggest that human exposure occurs during the heavy rain events, or shortly after during floods, also supporting this hypothesis [118].

Little is known on survival strategies and physiological mechanisms used by leptospires [119]. However, strategies of positive interactions with environmental microbiota and biofilm formation are now well-known for other bacteria. Pathogenic leptospires have capabilities to



Fig 2. Figure summarizing the hypothetical mechanisms of *Leptospira* environmental survival and dispersion upon heavy rainfall. Table 2 identifies data supporting this hypothesis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055.g002>

Table 2. Significant findings supporting the hypothesis of the leptospiral dispersion from soil to water depicted in Fig 2.

Evidence supporting the hypothetical model	Geographical areas, Countries	Type of samples (% positive samples)	Reference
More frequent detection or isolation of <i>Leptospira</i> spp. from soils or sediment than from water	New Caledonia	Stream water vs sediment or bank soil (0% vs 57%)	[13]
	Malaysia	Stagnant water vs soil (19% vs 67%)	[115]
	Minesotta, USA	Lake shore water vs soil (65% vs 75%)	[9]
		Bog water vs soil (5% vs 44%)	
		Spring water vs soil (28% vs 59%)	
<i>Leptospira</i> concentration (log) has a significant positive correlation with turbidity (log)	Malaysia	Water vs soil (5% vs 18%)	[75]
	Hawaii	Water vs soil (54% vs 100%)	[99]
	Hawaii	Coastal stream water	[15]
	Brazil	Surface waters	[7]
	New Caledonia	Soils	[6]
Higher <i>Leptospira</i> concentration upon rainfall	Japan, New Caledonia, Malaysia	Water and soils	[47]
	Japan	Soils	[65]
	Philippines	Soils	[10]
	Brazil	Soils	[12]
	Philippines	Soils	[10]
High concentration and genetic diversity of <i>Leptospira</i> spp. in soils, supporting the hypothesis of soils being a natural habitat of <i>Leptospira</i> spp.	Philippines, Japan	Soils and water	[11]
Soils apparently protect <i>Leptospira</i> from seawater toxicity	Japan	River water	[127]
<i>Leptospira</i> survive in wet soil on dry days and appear in surface water on rainy days			
<i>Leptospira</i> concentration in surface waters correlates with rainfall intensity			
suggest that disturbance of river sediments increase the <i>Leptospira</i> concentration in water			

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055.t002>

form a biofilm *in vitro* as well as to survive in biofilms *in natura*, even in nutrient-free environments [120,121]. Genetic mechanisms underlying biofilm formation of *Leptospira* have been studied recently [122]. Furthermore, Vinod Kumar and collaborators highlighted cell coaggregation of pathogenic leptospires with other environmental bacteria within biofilms [53,123]. Supporting the protective role of biofilm [124], antibiotics tolerance was increased 5 to 6-fold by biofilm formation [125]. Altogether, these results support the hypothesis that *Leptospira* survival in the environment might be favored by biofilm formation or protection within a multispecies natural biofilm, but the precise interactions of virulent *Leptospira* in complex environmental microbiota remains to be determined.

Leptospira may also interact with other members of soil communities such as Free-Living Amoebas. Amoebas, which are one of the main colonizers of drinking water networks, are known to be possible reservoirs of potentially pathogenic bacteria. Diversity of cultivable amoebas and their bacterial community were analyzed by sampling a large drinking water network; *Leptospira* was found to be part of the bacterial community associated with Amoebas from surface water samples [79]. However, our review did not identify any study of the possible interaction of virulent leptospires with free-living Amoeba. This hypothesis would deserve to be considered through both field investigations and laboratory studies.

High throughput sequencing techniques are increasingly used in microbial ecology studies. These technologies allow identifying the diversity of bacterial communities. For instance, using modern molecular techniques, *Leptospira* reads were detected in Chinese river sediments receiving rural domestic wastewater [126]. Using shotgun sequencing (that offers higher sequencing depth) an almost complete genome of a saprophytic *Leptospira* sp. was retrieved from a drinking water network [85]. More recently, a study used environmental DNA metabarcoding and ecological techniques targeting *Leptospira* spp. and Vertebrates in Japan, successfully evidencing Group I *Leptospira* in the environment and providing an unprecedented insight into animal / *Leptospira* / weather ecological associations in a very elegant One Health approach [127]. These technologies and the corresponding datasets offer unique opportunities to gain new knowledge on *Leptospira* habitat in the water and soil environments.

Although the role of the environment in leptospirosis epidemiology was suspected more than a century ago [109], major knowledge gaps remain in our understanding of the survival and persistence of virulent *Leptospira* in the environment. The advent of environmental metagenomics and the combination of field studies with laboratory-controlled experiments are gaining renewed interest. This will offer new opportunities to better understand the environmental risk of leptospirosis and allow the implementation of efficient control measures.

Supporting information

S1 PRISMA checklist.
(DOC)

Acknowledgments

The authors would like to thank Noémie Baroux for developing Excel tools to identify rapidly duplicate articles.

Author Contributions

Conceptualization: Cyrille Goarant.

Data curation: Emilie Bierque, Cyrille Goarant.

Formal analysis: Emilie Bierque, Roman Thibeaux, Dominique Girault, Marie-Estelle Soupé-Gilbert, Cyrille Goarant.

Investigation: Emilie Bierque, Roman Thibeaux, Dominique Girault, Marie-Estelle Soupé-Gilbert, Cyrille Goarant.

Methodology: Cyrille Goarant.

Supervision: Cyrille Goarant.

Validation: Emilie Bierque, Roman Thibeaux, Dominique Girault, Marie-Estelle Soupé-Gilbert, Cyrille Goarant.

Visualization: Emilie Bierque, Cyrille Goarant.

Writing – original draft: Emilie Bierque, Cyrille Goarant.

Writing – review & editing: Roman Thibeaux, Dominique Girault, Marie-Estelle Soupé-Gilbert, Cyrille Goarant.

References

- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, et al. (2015) Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898> PMID: 26379143
- Haake DA, Levett PN (2015) Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 387: 65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5 PMID: 25388133
- Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001> PMID: 11292640
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M (2009) Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7: 736–747. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208> PMID: 19756012
- Tarantola A, Goarant C (2018) Leptospirosis in French historical medical literature—Weil's disease or Kelsch's disease? *Am J Trop Med Hyg* 99: 1366–1368. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0629> PMID: 30298813
- Thibeaux R, Girault D, Bierque E, Soupé-Gilbert ME, Rettinger A, et al. (2018) Biodiversity of environmental Leptospira: improving identification and revisiting the diagnosis. *Front Microbiol* 9: 816. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816> PMID: 29765361
- Casanovas-Massana A, Costa F, Riediger IN, Cunha M, de Oliveira D, et al. (2018) Spatial and temporal dynamics of pathogenic Leptospira in surface waters from the urban slum environment. *Water Res* 130: 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.068> PMID: 29220718
- Chaiwattananarungruengpaisan S, Suwanpakdee S, Sangkachai N, Chamsai T, Taruyanon K, et al. (2018) Potentially pathogenic Leptospira species isolated from waterfall in Thailand. *Jpn J Infect Dis* 71: 65–67. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2017.363> PMID: 29093324
- Henry RA, Johnson RC (1978) Distribution of the genus Leptospira in soil and water. *Appl Environ Microbiol* 35: 492–499. PMID: 637546
- Saito M, Miyahara S, Villanueva SY, Aramaki N, Ikejiri M, et al. (2014) PCR and culture identification of pathogenic Leptospira from coastal soil in Leyte, Philippines after a storm surge during Super Typhoon Haiyan (Yolanda). *Appl Environ Microbiol* 80: 6926–6932. <https://doi.org/10.1128/AEM.02568-14> PMID: 25172869
- Saito M, Villanueva SY, Chakraborty A, Miyahara S, Segawa T, et al. (2013) Comparative analysis of Leptospira strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. *Appl Environ Microbiol* 79: 601–609. <https://doi.org/10.1128/AEM.02728-12> PMID: 23144130
- Schneider AG, Casanovas-Massana A, Hacker KP, Wunder EA Jr., Begon M, et al. (2018) Quantification of pathogenic Leptospira in the soils of a Brazilian urban slum. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006415. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006415> PMID: 29624576
- Thibeaux R, Gerout S, Benezech C, Chabaud S, Soupé-Gilbert ME, et al. (2017) Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005414. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005414> PMID: 28241042

14. Thibeaux R, Iraola G, Ferrés I, Bierque E, Girault D, et al. (2018) Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb Genom* 4: 000144.
15. Viau EJ, Boehm AB (2011) Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawaiian coastal streams. *J Water Health* 9: 637–646. <https://doi.org/10.2166/wh.2011.064> PMID: 22048423
16. Day TD, Waas JR, O'Connor CE, Carey PW, Matthews LR, et al. (1997) Leptospirosis in brushtail possums: is *Leptospira interrogans* serovar balcanica environmentally transmitted? *J Wildl Dis* 33: 254–260. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-33.2.254> PMID: 9131555
17. Gracie R, Barcellos C, Magalhães M, Souza-Santos R, Guimarães Barrocas PR (2014) Geographical Scale Effects on the Analysis of Leptospirosis Determinants. *Int J Environ Res Public Health* 11: 10366–10383. <https://doi.org/10.3390/ijerph111010366> PMID: 25310536
18. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) *Leptospira* and Leptospirosis. Second Edition; MedSci, editor. Melbourne, Australia: MedSci, Melbourne, Vic. Australia. 272 p.
19. Casanovas-Massana A, Pedra GG, Wunder EA Jr., Diggle PJ, Begon M, et al. (2018) Quantification of *Leptospira interrogans* Survival in Soil and Water Microcosms. *Appl Environ Microbiol* 84: e00507–00518. <https://doi.org/10.1128/AEM.00507-18> PMID: 29703737
20. Barragan V, Olivas S, Keim P, Pearson T (2017) Critical knowledge gaps in our understanding about environmental cycling and transmission of *Leptospira*. *Appl Environ Microbiol* 83: e01190–01117. <https://doi.org/10.1128/AEM.01190-17> PMID: 28754706
21. Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B, et al. (2007) Response of *Leptospira interrogans* to Physiologic Osmolarity: Relevance in Signaling the Environment-to-Host Transition. *Infect Immun* 75: 2864–2874. <https://doi.org/10.1128/IAI.01619-06> PMID: 17371863
22. Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD Jr., Riley LW (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354: 820–825. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)80012-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)80012-9) PMID: 10485724
23. Trevejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, et al. (1998) Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 178: 1457–1463. <https://doi.org/10.1086/314424> PMID: 9780268
24. Agampodi SB, Nugegoda DB, Thevanesam V, Vinetz JM (2015) Characteristics of Rural Leptospirosis Patients Admitted to Referral Hospitals during the 2008 Leptospirosis Outbreak in Sri Lanka: Implications for Developing Public Health Control Measures. *Am J Trop Med Hyg* 92: 139–144. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0465> PMID: 25331809
25. Amilasan AT, Ujiie M, Suzuki M, Salva E, Belo MCP, et al. (2012) Outbreak of Leptospirosis after Flood, the Philippines, 2009. *Emerg Infect Dis* 18: 91–94. <https://doi.org/10.3201/eid1801.101892> PMID: 22257492
26. Goarant C, Laumond-Barry S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S, et al. (2009) Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Trop Med Int Health* 14: 926–929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02310.x> PMID: 19552660
27. Desvars A, Jegou S, Chiroleu F, Bourhy P, Cardinale E, et al. (2011) Seasonality of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and its association with meteorological data. *PLoS One* 6: e20377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020377> PMID: 21655257
28. Ghizzo Filho J, Nazario NO, Freitas PF, Pinto GA, Schlindwein AD (2018) Temporal analysis of the relationship between leptospirosis, rainfall levels and seasonality, Santa Catarina, Brazil, 2005–2015. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 60: e39. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201860039> PMID: 30066807
29. Katz AR, Buchholz AE, Hinson K, Park SY, Effler PV (2011) Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999–2008. *Emerg Infect Dis* 17: 221–226. <https://doi.org/10.3201/eid1702.101109> PMID: 21291592
30. Baranton G, Postic D (2006) Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. *Int J Infect Dis* 10: 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2005.02.010> PMID: 16298537
31. Mwachui MA, Crump L, Hartskeerl R, Zinsstag J, Hattendorf J (2015) Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003843. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003843> PMID: 26379035
32. Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P (2010) Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.07.002> PMID: 20813388
33. Weinberger D, Baroux N, Grangeon J-P, Ko AI, Goarant C (2014) El Niño Southern Oscillation and leptospirosis outbreaks in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2798. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002798> PMID: 24743322

34. Dufour B, Moutou F, Hattenberger AM, Rodhain F (2008) Global change: impact, management, risk approach and health measures—the case of Europe. *Rev Sci Tech* 27: 529–550. PMID: [18819676](#)
35. Derne BT, Weinstein P, Lau CL (2015) Wetlands as sites of exposure to water-borne infectious diseases. *Wetlands and Human Health*. pp. 45–74.
36. Guelain J, Le Gonidec G, Bouchard E, Peghini M (1983) [Leptospiroses in New Caledonia]. *Med Trop* 43: 137–143.
37. Lambrecht FL (1982) Health Hazards Associated with Development of Water Resources and Other Changes in the Environment in the Tropics. *Canadian Journal of Development Studies/Revue canadienne d'études du développement* 3: 341–354.
38. Higa HH, Sawa TR, Sato VT (1982) *Aeromonas hydrophila* encountered during survey of leptospirae in prawn farm pond water. *Journal of Environmental Health* 45: 20–23.
39. Baca-Carrasco D, Olmos D, Barradas I (2015) A Mathematical Model for Human and Animal Leptospirosis. *Journal of Biological Systems* 23: S55–S65.
40. Andre-Fontaine G, Aviat F, Thorin C (2015) Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. *Current Microbiology* 71: 136–142. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0836-4> PMID: [26003629](#)
41. Smith DJ, Self HR (1955) Observations on the survival of *Leptospira australis* A in soil and water. *J Hyg (Lond)* 53: 436–444.
42. Hellstrom JS, Marshall RB (1978) Survival of *Leptospira interrogans* serovar pomona in an acidic soil under simulated New Zealand field conditions. *Res Vet Sci* 25: 29–33. PMID: [30123](#)
43. Stoddard RA, Bui D, Haberling DL, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, et al. (2014) Viability of *Leptospira* Isolates from a Human Outbreak in Thailand in Various Water Types, pH, and Temperature Conditions. *Am J Trop Med Hyg* 91: 1020–1022. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0748> PMID: [25200260](#)
44. Smith CEG, Turner LH (1961) The effect of pH on the survival of leptospires in water. *Bulletin WHO* 24: 35–43.
45. Parker J, Walker M (2011) Survival of a pathogenic *Leptospira* serovar in response to combined in vitro pH and temperature stresses. *Vet Microbiol* 152: 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.028> PMID: [21592682](#)
46. Tsuboi M, Koizumi N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari N, et al. (2017) Imported *Leptospira licerasiae* Infection in Traveler Returning to Japan from Brazil. *Emerg Infect Dis* 23: 548–549. <https://doi.org/10.3201/eid2303.161262> PMID: [28221126](#)
47. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, et al. (2019) Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis* 13: e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270> PMID: [31120895](#)
48. Xu Y, Zhu Y, Wang Y, Chang YF, Zhang Y, et al. (2016) Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Sci Rep* 6: 20020. <https://doi.org/10.1038/srep20020> PMID: [26833181](#)
49. Murgia R, Riquelme N, Baranton G, Cinco M (1997) Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water. *FEMS Microbiol Lett* 148: 27–34. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10262.x> PMID: [9066106](#)
50. Cárdenas-Marrufo MF, Vado-Solís I, Pérez-Orsorio CE, Segura-Correa JC (2011) Seropositivity to leptospirosis in domestic reservoirs and detection of *Leptospira* spp. From water sources, in farms of yucatan, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14: 185–189.
51. Vein J, Perrin A, Berny PJ, Benoit E, Leblond A, et al. (2012) Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water. *Can J Microbiol* 58: 828–835. <https://doi.org/10.1139/w2012-060> PMID: [22698616](#)
52. Rawlins J, Portanova A, Zuckerman I, Loftis A, Ceccato P, et al. (2014) Molecular detection of leptospiral DNA in environmental water on st. Kitts. *Int J Environ Res Public Health* 11: 7953–7960. <https://doi.org/10.3390/ijerph110807953> PMID: [25105546](#)
53. Vinod Kumar K, Lall C, Raj RV, Vedhagiri K, Vijayachari P (2016) Molecular detection of pathogenic leptospiral protein encoding gene (lipL32) in environmental aquatic biofilms. *Lett Appl Microbiol* 62: 311–315. <https://doi.org/10.1111/lam.12533> PMID: [26643849](#)
54. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR (2009) Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64: 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014> PMID: [19395218](#)
55. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, et al. (2005) Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 54: 45–49. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45860-0> PMID: [15591254](#)

56. Benacer D, Woh PY, Mohd Zain SN, Amran F, Thong KL (2013) Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species in Water and Soils from Selected Urban Sites in Peninsular Malaysia. *Microbes Environ* 28: 135–140. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12154> PMID: 23363618
57. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA (2009) Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS One* 4: e7093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007093> PMID: 19763264
58. Luchini D, Meacci F, Oggioni MR, Morabito G, D'Amato V, et al. (2008) Molecular detection of *Leptospira interrogans* in human tissues and environmental samples in a lethal case of leptospirosis. *Int J Legal Med* 122: 229–233. <https://doi.org/10.1007/s00414-007-0212-4> PMID: 17943302
59. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, et al. (2005) A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 249: 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.011> PMID: 16006065
60. Perez J, Goarant C (2010) Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol* 10: 325. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-325> PMID: 21176235
61. Guernier V, Allan KJ, Goarant C (2018) Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. *Parasitology* 145: 595–607. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001147> PMID: 28716157
62. Dzulaikha K, Yuziana MN, Maizatuniah J, Marfiah A. Association of Rainfall and the Occurrence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Recreational Stream Water, Hulu Langat, Selangor; 2018. Springer. pp. 119–124.
63. Zulkifli NF, Wan SJ, Neela VK, Chee HY, Masri SN, et al. (2018) Detection of *Leptospira* Species in Environmental Samples by Amplification of 16S rRNA and *rpmB* Genes. *Sains Malaysiana* 47: 1795–1800.
64. Riediger IN, Hoffmaster AR, Casanovas-Massana A, Biondo AW, Ko AI, et al. (2016) An Optimized Method for Quantification of Pathogenic *Leptospira* in Environmental Water Samples. *PLoS One* 11: e0160523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160523> PMID: 27487084
65. Masuzawa T, Sakakibara K, Saito M, Hidaka Y, Villanueva S, et al. (2018) Characterization of *Leptospira* species isolated from soil collected in Japan. *Microbiol Immunol* 62: 55–59. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12551> PMID: 29105847
66. Scialfa E, Grune S, Brihuega B, Aguirre P, Rivero M (2018) Isolation of saprophytic *Leptospira* spp. from a selected environmental water source of Argentina. *Rev Argent Microbiol* 50: 323–326. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.003> PMID: 29198840
67. Ellinghausen HC Jr. (1973) Growth temperatures, virulence, survival, and nutrition of leptospires. *J Med Microbiol* 6: 487–497. <https://doi.org/10.1099/00222615-6-4-487> PMID: 4763972
68. Johnson RC, Harris VG, Walby JK (1969) Characterization of leptospires according to fatty acid requirements. *J Gen Microbiol* 55: 399–407. <https://doi.org/10.1099/00221287-55-3-399> PMID: 4891171
69. Henneberry RC, Baseman JB, Cox CD (1970) Growth of a water strain of *Leptospira* in synthetic media. *Antonie van Leeuwenhoek* 36: 489–501. <https://doi.org/10.1007/bf02069051> PMID: 4922749
70. Cox CD (1966) Studies on the isolation and growth of *Leptospira* from surface waters. *Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol* 46: 193–202. PMID: 5944009
71. Ridzlan FR, Bahaman AR, Khairani-Bejo S, Mutalib AR (2010) Detection of pathogenic *Leptospira* from selected environment in Kelantan and Terengganu, Malaysia. *Trop Biomed* 27: 632–638. PMID: 21399605
72. Johnson RC, Rogers P (1964) 5-Fluorouracil as a Selective Agent for Growth of *Leptospirae*. *J Bacteriol* 87: 422–426. PMID: 14151066
73. Chakraborty A, Miyahara S, Villanueva SY, Saito M, Gloriani NG, et al. (2011) A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. *Microbiol Immunol* 55: 494–501. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x> PMID: 21545510
74. Cinco M, Faidutti BM (1972) Isolation and classification of water leptospira strains: identification of three new serotypes. *Experientia* 28: 598–600. <https://doi.org/10.1007/bf01931900> PMID: 5040817
75. Azali MA, Yean Yean C, Harun A, Aminuddin Baki NN, Ismail N (2016) Molecular Characterization of *Leptospira* spp. in Environmental Samples from North-Eastern Malaysia Revealed a Pathogenic Strain, *Leptospira alstonii*. *J Trop Med* 2016: 2060241. <https://doi.org/10.1155/2016/2060241> PMID: 27127522
76. Kaboosi H, Razavi MR, al Sadat Noohi A (2010) Efficiency of filtration technique for isolation of leptospires from surface waters: Role of different membranes with different pore size and materials. *African Journal of Microbiology Research* 4: 671–676.

77. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP (2014) The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* 5: 258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258> PMID: [24917854](#)
78. Teal TH, Chapman M, Guillemette T, Margulis L (1996) Free-living spirochetes from Cape Cod microbial mats detected by electron microscopy. *Microbiologia* 12: 571–584. PMID: [9018691](#)
79. Delafont V, Bouchon D, Hechard Y, Moulin L (2016) Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network. *Water Res* 100: 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.044> PMID: [27219048](#)
80. Mason MR, Encina C, Sreevatsan S, Muñoz-Zanzi C (2016) Distribution and Diversity of Pathogenic *Leptospira* Species in Peri-domestic Surface Waters from South Central Chile. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004895. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004895> PMID: [27529550](#)
81. Muñoz-Zanzi C, Mason MR, Encina C, Astroza A, Romero A (2014) *Leptospira* Contamination in Household and Environmental Water in Rural Communities in Southern Chile. *Int J Environ Res Public Health* 11: 6666–6680. <https://doi.org/10.3390/ijerph110706666> PMID: [24972030](#)
82. Huang K, Zhang XX, Shi P, Wu B, Ren H (2014) A comprehensive insight into bacterial virulence in drinking water using 454 pyrosequencing and Illumina high-throughput sequencing. *Ecotoxicol Environ Saf* 109: 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.029> PMID: [25129220](#)
83. Bennett A (2008) Drinking water: Pathogen removal from water—technologies and techniques. *Filtration & Separation* 45: 14–16.
84. Delzell E, Doull J, Giesy J, Mackay D, Munro I, et al. (1994) Chapter 7: Drinking water and wastewater. In: Delzell E, Doull J, Giesy J, Mackay D, Munro I et al., editors. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. pp. S416–S539.
85. Zhang Y, Kitajima M, Whittle AJ, Liu W-T (2017) Benefits of Genomic Insights and CRISPR-Cas Signatures to Monitor Potential Pathogens across Drinking Water Production and Distribution Systems. *Front Microbiol* 8: 2036. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02036> PMID: [29097994](#)
86. Escandon-Vargas K, Bustamante-Rengifo JA, Astudillo-Hernandez M (2019) Detection of pathogenic *Leptospira* in ornamental water fountains from urban sites in Cali, Colombia. *Int J Environ Health Res* 29: 107–115. <https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1519526> PMID: [30213207](#)
87. Mailloux M (1962) [*Leptospira* of surface waters in Algeria. I. Preliminary survey on the waters of the Algiers area and of the plain of Mitidja]. *Arch Inst Pasteur Alger* 40: 16–24. PMID: [14468513](#)
88. Mailloux M (1963) [*Leptospira* in Surface Waters in Algeria. II. The Waters of Petite Kabylie; Identification of 2 Strains]. *Arch Inst Pasteur Alger* 41: 4–6. PMID: [14102721](#)
89. Nicolescu M, Andreescu N (1982) Human Icterohaemorrhagiae leptospirosis after bathing in rivers (1977–1981). *Arch Roum Pathol Exp Microbiol* 41: 133–136. PMID: [7149958](#)
90. Wojcik-Fatla A, Zajac V, Wasinski B, Sroka J, Cisak E, et al. (2014) Occurrence of *Leptospira* DNA in water and soil samples collected in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med* 21: 730–732. <https://doi.org/10.5604/12321966.1129924> PMID: [25528911](#)
91. Tansuphasiri U, Thipsuk C, Phulsuksombati D, Chanyasanha C (2006) Duplex PCR-hybridization based detection of pathogenic *Leptospira* in environmental water samples obtained from endemic areas in northeast region of Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37: 729–741. PMID: [17121299](#)
92. Vital-Brazil JM, Balassiano IT, Oliveira FS, Costa AD, Hillen L, et al. (2010) Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 353–355. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000300020> PMID: [20512254](#)
93. Romero-Vivas CM, Thiry D, Rodriguez V, Calderon A, Arrieta G, et al. (2013) Molecular serovar characterization of *Leptospira* isolates from animals and water in Colombia. *Biomedica* 33 Suppl 1: 179–184.
94. Harvey RW, Price TH (1981) Observations on infections associated with South Wales natural waters. *J Appl Bacteriol* 51: 369–374. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1981.tb01254.x> PMID: [6795173](#)
95. Svircev Z, Markovic SB, Vukadinov J, Stefan-Mikic S, Ruzic M, et al. (2009) Leptospirosis distribution related to freshwater habitats in the Vojvodina region (Republic of Serbia). *Sci China C Life Sci* 52: 965–971. <https://doi.org/10.1007/s11427-009-0124-2> PMID: [19911133](#)
96. Braun JL, Diesch SL, McCulloch WF (1968) A method for isolating leptospires from natural surface waters. *Can J Microbiol* 14: 1011–1012. <https://doi.org/10.1139/m68-167> PMID: [5681508](#)
97. Braun JL, McCulloch WF (1968) Use of 8-azaguanine to differentiate leptospires isolated from Iowa surface waters. *Appl Microbiol* 16: 174–175. PMID: [5636463](#)
98. Cinco M, Petelin N (1970) Serogroups and serotypes in Water-*Leptospira* strains. *Trop Geogr Med* 22: 237–244. PMID: [5429917](#)

99. Wilson R, Fujioka R (1995) Development of a method to selectively isolate pathogenic *Leptospira* from environmental samples. *Water Science and Technology* 31: 275–282.
100. Diesch SL, McCulloch WF (1966) Isolation of pathogenic leptospires from waters used for recreation. *Public Health Rep* 81: 299–304. PMID: [4956096](#)
101. Baker MF, Baker HJ (1970) Pathogenic *Leptospira* in Malaysian surface waters. I. A method of survey for *Leptospira* in natural waters and soils. *Am J Trop Med Hyg* 19: 485–492. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1970.19.485> PMID: [5446317](#)
102. Kim JS (1987) Leptospirosis: a newly identified disease in Korea. *Asia Pac J Public Health* 1: 61–68. <https://doi.org/10.1177/101053958700100115> PMID: [3452382](#)
103. Alexander AD, Evans LB, Baker MF, Ellison D, Marriapan M (1975) Pathogenic *Leptospiras* Isolated from Malaysian Surface Waters. *Appl Microbiol* 29: 30–33. PMID: [1110490](#)
104. Crawford RP Jr, Braun JL, McCulloch WF, Diesch SL (1969) Characterization of leptospires isolated from surface waters in Iowa. *Wildlife disease* 5: 157–165. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-5.3.157> PMID: [5809642](#)
105. Ismail S, Wahab NZA, Badya N, Rahman NIA, Yeo CC, et al. (2014) A study on the presence of pathogenic *leptospira* spp. in environmental water samples obtained from selected recreational areas in terengganu, malaysia. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 7: 1153–1157.
106. Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, et al. (2006) Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med* 3: e308. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030308> PMID: [16933963](#)
107. Alston JM (1935) LEPTOSPIRAL JAUNDICE AMONG SEWER-WORKERS. *Lancet* 225: 806–809.
108. Ullmann LS, Langoni H (2011) Interactions between environment, wild animals and human leptospirosis. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 17: 119–129.
109. Noguchi H (1918) The Survival of *Leptospira* (*Spirochaeta*) *Icterohaemorrhagiae* in Nature; Observations Concerning Microchemical Reactions and Intermediary Hosts. *J Exp Med* 27: 609–625. <https://doi.org/10.1084/jem.27.5.609> PMID: [19868229](#)
110. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, et al. (2006) Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14560–14565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603979103> PMID: [16973745](#)
111. Slack AT, Khairani-Bejo S, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, et al. (2009) *Leptospira kmetzi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 705–708. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.002766-0> PMID: [19329592](#)
112. Karaseva EV, Chernukha Yu G, Sakharova TF (1977) Results of the investigation of soil for contamination with pathogenic leptospires. *Folia Parasitol* 24: 301–304. PMID: [342368](#)
113. Kingscote BF (1970) Correlation of bedrock type with the geography of leptospirosis. *Can J Comp Med* 34: 31–37. PMID: [4246001](#)
114. Fuh YB, Shia WY, Lee WM, Shyu CL, Wang CY, et al. (2011) The use of commercial soil nucleic acid extraction kit and nested PCR for detection of *Leptospira* in farm environment after flooding in Taiwan. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 41: 493–498.
115. Mohd Ali MR, Mohamad Safiee AW, Yusof NY, Fauzi MH, Yean Yean C, et al. (2018) Isolation of *Leptospira kmetzi* from residential areas of patients with leptospirosis in Kelantan, Malaysia. *J Infect Public Health* 11: 578–580. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.12.008> PMID: [29277333](#)
116. Okazaki W, Ringen LM (1957) Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira pomona*. *Am J Vet Res* 18: 219–223. PMID: [13394849](#)
117. Lall C, Vinod Kumar K, Raj RV, Vedhagiri K, Sunish IP, et al. (2018) Correlation Between Physico-chemical Properties of Soil and Presence of *Leptospira*. *EcoHealth* 15: 670–675. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1346-1> PMID: [29946901](#)
118. Togami E, Kama M, Goarant C, Craig SB, Lau C, et al. (2018) A large leptospirosis outbreak following successive severe floods in Fiji, 2012. *Am J Trop Med Hyg* 99: 849–851. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0335> PMID: [30141390](#)
119. Hu WL, Pappas CJ, Zhang JJ, Yang YY, Yan J, et al. (2017) The EbpA-RpoN regulatory pathway of the pathogen *Leptospira interrogans* is essential for survival in the environment. *Appl Environ Microbiol* 83: e02377–02316. <https://doi.org/10.1128/AEM.02377-16> PMID: [27864172](#)
120. Barragan VA, Mejia ME, Travez A, Zapata S, Hartskeerl RA, et al. (2011) Interactions of *Leptospira* with Environmental Bacteria from Surface Water. *Curr Microbiol* 62: 1802–1806. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9931-3> PMID: [21479795](#)

121. Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, et al. (2008) Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* 154: 1309–1317. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/014746-0> PMID: 18451039
122. Iraola G, Spangenberg L, Lopes Bastos B, Grana M, Vasconcelos L, et al. (2016) Transcriptome Sequencing Reveals Wide Expression Reprogramming of Basal and Unknown Genes in *Leptospira biflexa* Biofilms. *mSphere* 1: 00042–00016.
123. Vinod Kumar K, Lall C, Vimal Raj R, Vedhagiri K, Vijayachari P (2015) Co-existence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. *FEMS Microbiol Ecol* 91: pii:fiv051. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv051> PMID: 25962762
124. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D (2004) Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 7: 35–40. PMID: 15179605
125. Vinod Kumar K, Lall C, Vimal Raj R, Vedhagiri K, Sunish IP, et al. (2016) In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic *Leptospira* Biofilm. *Microb Drug Resist* 22: 511–514. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0284> PMID: 26978023
126. Lu XM, Lu PZ (2014) Characterization of Bacterial Communities in Sediments Receiving Various Wastewater Effluents with High-Throughput Sequencing Analysis. *Microb Ecol* 67: 612–623. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0370-0> PMID: 24477925
127. Sato Y, Mizuyama M, Sato M, Minamoto T, Kimura R, et al. (2019) Environmental DNA metabarcoding to detect pathogenic *Leptospira* and associated organisms in leptospirosis-endemic areas of Japan. *Sci Rep* 9: 6575. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42978-1> PMID: 31024059
128. Chang SL, Buckingham M, Taylor MP (1948) Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae*; survival in water and sewage; destruction in water by halogen compounds, synthetic detergents, and heat. *J Infect Dis* 82: 256–266. <https://doi.org/10.1093/infdis/82.3.256> PMID: 18864110
129. Karaseva EV, Chernukha YG, Piskunova LA (1973) Results of studying the time of survival of pathogenic leptospires under natural conditions. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 17: 339–345. PMID: 4795565
130. Ryu E, Liu CK (1966) The viability of leptospires in the summer paddy water. *Jpn J Microbiol* 10: 51–57. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1966.tb00291.x> PMID: 5297541
131. Schiemann DA (1973) Survivor curves for *Leptospira autumnalis* Akiyami A based on most-probable-number values. *Appl Microbiol* 25: 240–243. PMID: 4571659
132. Stamm LV, Charon NW (1988) Sensitivity of pathogenic and free-living *Leptospira* spp. to UV radiation and mitomycin C. *Appl Environ Microbiol* 54: 728–733. PMID: 3132098

Cette revue systématique de la littérature met en lumière l'intérêt du développement d'outils de séquençage haut débit qui permettront bientôt une meilleure compréhension du mode de vie des leptospires dans l'environnement. Elle souligne également l'intérêt croissant des chercheurs pour les données quantitatives documentant la survie des leptospires dans l'environnement hydrotellurique. Cette synthèse suggère une abondance ou une fréquence de détection des leptospires plus importante dans les sols que dans les eaux (Baker and Baker, 1970; Henry and Johnson, 1978; Wilson and Fujioka, 1995). Ces résultats supportent l'idée, détaillée dans le chapitre précédent, que les sols constituent l'habitat originel et principal des leptospires. Leur dispersion se ferait donc grâce à la mise en suspension des particules du sol, auxquelles ils sont associés, lors de fortes pluies (Schneider et al., 2018; Thibeaux et al., 2018b).

II. Les leptospires comme pathogènes d'origine hydrique

La communauté scientifique travaillant sur les risques sanitaires d'origine hydrique, ne considère que de manière très récente la leptospirose en tant que sujet de préoccupation. Le "Global Water Pathogen Project" est un projet mis en œuvre par le Programme Hydrologique International (PHI) de l'Organisation des Nations Unies pour l'Education, la Science et la Culture (UNESCO) et l'Université d'État du Michigan (MSU). Il a pour but de renforcer les aspects sanitaires et de sécurité autour de l'eau dans le monde en utilisant les nouveaux outils et technologies d'information. L'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, en particulier l'Unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose, a ainsi été sollicité pour participer à la rédaction d'un chapitre de monographie dédié aux leptospires et à la leptospirose. Ce chapitre, publié en mai 2019, s'intéresse à l'épidémiologie et aux aspects environnementaux de la leptospirose. Ces travaux auxquels j'ai participé dans le cadre de ma thèse portent sur l'analyse de données de l'occurrence et de la persistance des leptospires dans l'environnement, impliquant la rédaction d'une partie de chapitre. L'analyse de données issues de travaux antérieurs a permis (1) de mettre en évidence les outils disponibles pour la détection de leptospires à partir d'échantillons environnementaux ; (2) de regrouper les données concernant l'occurrence des leptospires détectés à partir de différentes sources d'eau comme les eaux usées ou de surface par exemple ; ainsi que (3) d'établir une synthèse des études disponibles sur la survie des leptospires dans l'eau. Ce chapitre est disponible librement en ligne (<http://www.waterpathogens.org/book/leptospira-and-leptospirosis>) et présenté en annexe III.

* / 2 % \$ / : \$ 7 (5 3 \$ 7 + 2 * (1 3 5 2 - (& 7
3 \$ 5 7 7 + 5 ((. 6 3 (& ,) , & (; & 5 (7 (' 3 \$ 7 + 2 * (1 6 : (1 9 , 5 2 1 0 (1 7 \$ / \$ 1 '
(3 , ' (0 , 2 / 2 * < \$ 6 3 (& 7 6

/(37263,5\$ \$1'

/(37263,526,6

& \ U L O O H * R D U D Q W
, Q V W L W X W 3 D V W H X U , Q W H U Q D W L R Q D O 1 H W Z R U N
1 R X P H D , 1 H Z & D O H G R Q L D

* D E U L H O 7 U X H E D
\$ Q L Y H U V L G D G 6 D Q) U D Q F L V F R ' H 4 X L W R O , Q V W L W X W H R I 0 L F U R E L R O R J
4 X L W R , (F X D G R U

(P L O L H % L H U T X H
, Q V W L W X W 3 D V W H X U , Q W H U Q D W L R Q D O 1 H W Z R U N
1 R X P H D , 1 H Z & D O H G R Q L D

5 R P D Q 7 K L E H D X [
, Q V W L W X W 3 D V W H X U , Q W H U Q D W L R Q D O 1 H W Z R U N
1 R X P H D , 1 H Z & D O H G R Q L D

% H Q M D P L Q ' D Y L V
9 L U L Q L D 7 H F K
% O D F N V E X U J , 8 Q L W H G 6 W D W H V

\$ O H M D Q G U R G H O D 3 H Q D - 0 R F W H] X P D
8 Q L Y H U V L G D G 1 D F L R Q D O \$ X W R Q R P D G H 0 H [L F R
* X V W D Y R \$. 0 D G H U R , 0 H [L F R

Figure 11 Page de couverture du chapitre de monographie sur la leptospirose dans le cadre du « Global Water Pathogen Project »

I. Survie et préservation de la virulence de leptospires pathogènes dans des eaux pauvres en nutriment

Majoritairement décrite comme une zoonose, la leptospirose est pourtant principalement une infection d'origine environnementale, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent. Bien que la majorité des cas humains provienne de contaminations d'origine hydrotellurique, seules quelques études s'intéressent à la survie des leptospires pathogènes dans l'eau. Dans ce contexte, une partie de mon travail de thèse a consisté en l'évaluation de la survie et du maintien de la virulence de leptospires dans des eaux. Dans ce but, l'étude présentée ici a utilisé des microcosmes d'eaux afin de suivre *in vitro* la survie et la virulence de leptospires, pendant deux ans, dans des conditions très pauvres en nutriments.

Cinq eaux ont été choisies en fonction de leurs concentrations contrastées en minéraux dont quatre eaux commerciales en bouteilles plus ou moins minéralisées et une eau déionisée. Leur stérilisation par filtration à 0,1 µm a permis d'évaluer strictement l'influence de leur composition chimique sur la survie des leptospires sans modification de leur composition minérale. Quatre souches de leptospires ont été inoculées. Les deux souches pathogènes de *Leptospira interrogans* étudiées étaient la souche Manilae L495, correspondant à la souche parentale des banques de mutants (Murray et al., 2009a) et l'isolat calédonien *L. interrogans* sérovar Pyrogenes 2016-001, isolé d'un cas humain de leptospirose. Cette souche de Pyrogenes est estimée responsable d'environ 25% des cas de leptospirose en Nouvelle-Calédonie et est fortement liée à des contaminations lors de baignades en eau douce. La troisième souche pathogène utilisée correspondait à *Leptospira borgpetersenii* Ballum isolat B3-13S issue d'une souris sauvage de Nouvelle-Calédonie (Perez et al., 2011). *L. borgpetersenii* est une espèce connue pour avoir une faible capacité de survie dans l'environnement (Bulach et al., 2006). Enfin, la souche saprophyte *Leptospira biflexa* Patoc I a été choisie pour son mode de vie strictement environnemental.

Des approches (i) de biologie moléculaires telles que la PCR quantitative, (ii) de microscopie avec de la visualisation en fluorescence et (iii) de culture en milieu riche ont été utilisées dans le but d'étudier la survie de ces leptospires. La virulence directe des pathogènes a également été évaluée par inoculation en animal sensible sans passer par une étape préalable d'enrichissement en culture.

Article 2 Maintien de la virulence de *Leptospira interrogans* en eaux dépourvues de nutriments.

Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.E., Thibeaux, R., Girault, D., Guentas, L., Goarant, C. (2020). "*Leptospira interrogans* retains virulent after long starvation in water". Current Microbiology. 10.1007/s00284-020-02128-7. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02128-7>



Leptospira interrogans Retains Direct Virulence After Long Starvation in Water

Emilie Bierque^{1,2} · Marie-Estelle Soupé-Gilbert¹ · Roman Thibeaux¹ · Dominique Girault¹ · Linda Guentas² · Cyrille Goarant¹

Received: 5 March 2020 / Accepted: 9 July 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Mostly studied as a zoonosis, leptospirosis is also an environment-borne infection and most human cases originate from soil or water contaminations. Yet, only few studies have been interested in the survival of pathogenic *Leptospira* in freshwater. In this study, water microcosms were designed to evaluate the survival and virulence of *Leptospira* spp. for 2 years. Four commercial bottled drinking waters and a non-ionized water, all previously filter-sterilized, were studied. Either one of two *Leptospira interrogans* strains, one *Leptospira borgpetersenii* strain, or a saprophytic *Leptospira biflexa* was inoculated in these waters under nutrient-deprived conditions. Molecular, microscopic and cultural approaches were used to study *Leptospira* survival. Direct virulence of the pathogens was assessed using animal challenge without re-culturing. Our results confirmed the capacity of pathogenic *Leptospira* to survive for more than a year in water. In addition, we showed the ability of *L. interrogans* in nutrient-deprived conditions to directly cause systemic infection in susceptible animals. To our knowledge, this is the first report of direct infection of a susceptible host with *Leptospira* following a long starvation and survival period in nutrient-deprived water. Our results also suggest that *Leptospira* turned into a physiological “survival” state in harsh freshwater conditions. These data are of prime importance considering that freshwater is a major source of *Leptospira* infections. Environmental survival and virulence of pathogenic *Leptospira* spp. are becoming a crucial challenge to determine the environmental risk and adopt relevant prevention and control strategies.

Introduction

Pathogenic *Leptospira* are the etiological agents of leptospirosis, a re-emerging zoonosis found worldwide. The global burden of leptospirosis has been estimated over 1 million cases and nearly 60,000 deaths annually [1]. Clinical presentation of the disease is diverse, ranging from flu-like fever to severe polyvisceral failures. Leptospirosis can infect all mammals; some like rats or pigs are asymptomatic

chronically infected reservoirs. Leptospire are shed via urine of reservoir animals into the surrounding environment [2]. Pathogenic *Leptospira* infect hosts through skin injuries or mucosae. Most human cases originate in environmental contamination. Heavy rainfall and floods are recognized triggers of outbreaks, as they contribute to put pathogenic *Leptospira* in contact with humans [3]. Such outbreaks have been described in Latin America [4, 5], South Asia [6, 7] and Oceania [8, 9], illustrating the key role of freshwater in the transmission of the disease.

Though environmental survival of *Leptospira* is accepted, few studies have been interested on their lifestyle [3]. Persistence of pathogenic *Leptospira* has been shown in soil and water in situ for weeks to months [10, 11]. However, possible repeated contaminations prevent from formal conclusions about the survival duration of these pathogens in an open natural environment. Early studies on *Leptospira* survival mostly focused on saprophytic strains [12] or studied only a very few serovars [13, 14]. André-Fontaine and collaborators have studied the survival and preservation of virulence of pathogenic *Leptospira* in nutrient-poor bottled

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02128-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

* Cyrille Goarant
cgoarant@pasteur.nc

¹ Institut Pasteur in New Caledonia, Institut Pasteur International Network, Leptospirosis Research and expertise unit, 11 avenue Paul Doumer BP 61, 98845 Noumea Cedex, New Caledonia

² Exact and Applied Science Institute, University of New Caledonia, Noumea, New Caledonia

drinking waters [15]. A survival up to 20 months of a pathogenic strain in conditions assumed unfavorable has notably been demonstrated, highlighting the waterborne aspect of leptospirosis. These authors have also revealed a preservation of virulence over this 20-month period after sub-culturing. Former studies have demonstrated virulence preservation of pathogenic *Leptospira* in environmental freshwater [16, 17]. Authors highlighted an infectivity maintained from 13 days to 3 weeks using guinea pigs. Moreover, long-term survival of *Leptospira* occurring in the environment could be supported by microbial communities [14]. Interactions of *Leptospira* with environmental microorganisms have been described from surface water [18]. Thus, biofilm formation as a social lifestyle could also play a role in the survival of *Leptospira* [19, 20].

In this study, we aimed at evaluating how pathogenic *Leptospira* survive in nutrient-free freshwater, using four different *Leptospira* strains and 5 well-characterized freshwaters.

Materials and Methods

Leptospira Strains

The experiment was conducted with four different *Leptospira* strains. The two pathogenic *Leptospira interrogans* strains used were (i) *L. interrogans* strain Manilae L495 that corresponds to the parental strain of mutant banks [21] and (ii) the New Caledonian *L. interrogans* serovar Pyrogenes clinical isolate 2016-001 originating from a human leptospirosis case. This Pyrogenes strain is considered responsible for one-fourth of human leptospirosis cases in New Caledonia and is epidemiologically related to freshwater contaminations. The third pathogenic strain used was *Leptospira borgpetersenii* Ballum isolate B3-13S which was isolated from a wild mouse in New Caledonia [22]. Last, the saprophyte *Leptospira biflexa* Patoc I was chosen as the most commonly used model of *Leptospira* with a strictly environmental lifestyle.

Experimental Conditions

Each *Leptospira* strain was grown in Ellinghausen McCullough Johnson Harris medium (EMJH), and incubated at 30 °C under agitation in aerobic conditions [23]. Cells collected were washed twice with sterile ultrapure water to eliminate the culture medium and the pellet was resuspended in sterile ultrapure water.

The waters tested included sterile ultrapure deionized MilliQ® water and four commercial mineral bottled waters with various ionic compositions, including “Mont-Dore®” from New Caledonia. Water compositions as described by the companies are summarized in Table 1.

Waters were filter-sterilized by serial 0.22-μm and 0.1-μm filtration using sterile disposable cartridges to avoid salt precipitation upon autoclaving.

Filter-sterilized waters were inoculated with washed *Leptospira* cells at a final concentration of 10⁶ leptospores mL⁻¹. Twelve milliliters were then distributed into 50-mL plastic culture flasks (Falcon® 25 cm² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vented Cap) with two autoclave-sterilized microscope circular cover slides. Culture flasks were incubated in the dark under constant moisture at 30 °C for up to 2 years. For the follow-up, one condition was defined as each unique water–strain combination. One flask of each condition was studied at various time-points after 2, 7, 15 days and 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18 and 24 months. Over this 24-month period, 260 culture flasks corresponding to all conditions (waters, strains and time-points) were analyzed with the five following techniques.

Leptospira DNA Extraction and Quantification

DNA extraction and quantification were performed for each condition. For each sample collected, 100 μL of water was incubated with 100 μL phosphate-buffered saline (PBS) for DNA extraction using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Doncaster, Victoria, Australia) as per the manufacturer's instructions.

For the pathogenic strains, *L. borgpetersenii* B3-13S, *L. interrogans* L495 and *L. interrogans* 2016-001, DNA

Table 1 pH and chemical composition of the 4 bottled spring waters used (from legal indications on the bottle)

Waters	pH	Dried residues at 180 °C	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	F ⁻
MONT-DORE®	7.8	94.5	0.4	15	0.4	5.8	74.4	10.4	2.6	<0.1	ND
EVIAN®	7.2	309	80	26	1	6.5	360	6.8	12.6	3.7	ND
CONTREX®	7.4	2078	468	74.5	2.8	9.4	372	7.6	1121	2.9	0.36
VOLVIC®	7	130	11.5	8	6.2	11.6	71	13.5	8.1	6.3	0.22

ND not determined

quantification was performed using a real-time quantitative PCR technique targeting the pathogen-specific *lipL32* gene using TaqMan technology [24] with the LightCycler480 probe Master kit (Roche Applied Science, Auckland, New Zealand) on a LightCycler 480 platform. Results were expressed as the number of *Leptospira* per mL of water sample.

For the saprophyte *L. biflexa* Patoc I, lacking the *lipL32* gene, the amplification targeted the 16S rRNA gene using SYBR Green technology on the same LightCycler480. LC480 SYBR Green I Master kit (Roche Applied Science, Auckland, New Zealand) was used with primers described previously [25].

From 60 days post-inoculation (dpi) on, we suspected the sedimentation of *Leptospira*, so DNA extraction and quantification were processed on samples collected both before and after shaking the culture flasks at 1400 rpm for 5 min on an Eppendorf® Thermomixer Compact.

Viability-PCR

Leptospira viability was assessed for each condition using BLU-V Viability PMA kit (Qiagen, Doncaster, Victoria, Australia) as described previously [26]. In brief, propidium monoazide (PMA) only penetrates membrane-compromised cells where it irreversibly binds DNA after a photoactivation step [27]. Three samples, corresponding to the “live bacteria” (1 μ M PMA), “dead bacteria control” (1 μ M PMA after the cells are heat-killed) and “total bacteria” (no PMA added), were used, photoactivated at 460–470 nm and extracted using the QIAamp DNA mini-kit as described above. As per the manufacturer’s recommendations, the viability-PCR procedure is valid only when the qPCR Cycle threshold shift between “dead bacteria control” and “total bacteria” is at least 6 cycles.

Live/Dead Double Fluorescent Staining

Visualization of viable *Leptospira* was performed with Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR) as described before [26]. Before 60 dpi, 300 μ L of water was stained, whereas the microscope cover slides were stained after 60 dpi. After a 30-min to 2-h incubation in the dark, treated samples were visualized under a Leica DM4000 fluorescence microscope equipped with a 100X lens.

Culture from Water Sample

At each time-point, 2 mL of each condition was collected and subcultured in EMJH by inoculation into 2 mL 2X EMJH medium. Cultures were incubated at 30 °C in the

dark under agitation and checked weekly for up to 4 months by dark-field microscopy.

Virulence In Vivo

At specific time-points, pathogenic *Leptospira* were harvested and directly injected into healthy 2- to 3-month-old Golden Syrian hamsters to evaluate their virulence. Hamsters, bred at Institut Pasteur in New Caledonia, were housed in individual cages with water bottles and commercial pelleted feed for laboratory rodents ad libitum. One milliliter of water sample was injected by intraperitoneal route. Hamsters were euthanized by carbon dioxide inhalation 4.5 days after injection. The blood was collected by heart puncture 4.5 days after injection and inoculated into EMJH. Cultures were incubated at 30 °C under agitation and observed weekly for up to 4 months. Virulence was considered positive when leptospires were observed in EMJH cultures. To minimize the number of experimental animals, not all conditions were tested for each time-point.

Virulence was only tested once every other time-point, namely 2 and 15 dpi and 2, 4, 9, 12, 15 and 24 months post-inoculation (mpi).

Compliance with Ethical Standards

Over this 2-year experiment, 16 hamsters were used in agreement with ethical standards and as validated by our institutional review board. All experiments were conducted according to the institutional guidelines of the Animal Care and Use Committees of the Institut Pasteur and followed European Recommendation 2007/526/EC.

Results

The pathogenic *L. borgpetersenii* B3-13S strain was not detected in subcultures as early as 2 dpi in any of the five waters studied. As expected, *L. borgpetersenii* B3-13S was also unable to infect hamster after 2 days of incubation. The monitoring of *L. borgpetersenii* B3-13S was therefore stopped after 60 days of incubation with only negative results.

pH Evolution

pH was measured for each condition at all time-points. MilliQ water had both the lowest pH (mean 6.94) and the strongest pH variations (standard deviation SD = 0.63). The pH of Evian® water was the most alkaline with a mean pH of 8.20 ± 0.43 SD. The pH in Volvic® water was $7.92 (\pm 0.49$ SD). Last, Contrex® water had a mean pH of 7.62 ± 0.32

SD. Of note, these measured values poorly correlated with the pH values indicated on the bottle labels (Supplementary Figure 1). Interestingly, there was a significant drop in pH for *L. interrogans* microcosms in the late time-points, possibly resulting from the death of *Leptospira* cells.

Quantification of Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* by Quantitative PCR

DNA of *L. interrogans* was usually detected in the five waters. From 18 mpi on, leptospiral DNA was not detectable in the deionized water MilliQ. The four bottled waters studied have shown a DNA persistence of 2 years with higher concentrations in Mont-Dore® and Volvic® waters. Results are shown in Fig. 1a for *L. interrogans* Pyrogenes 2016-001 and Fig. 1b for *L. interrogans* Manilae L495.

Figure 1c represents the results for the saprophytic strain *L. biflexa* Patoc I. Again, DNA could not be detected in the MilliQ ultrapure water from 6 mpi on. As with the pathogenic strains, DNA remained detectable for the 2-year experimentation in Mont-Dore®, Evian® and Volvic® waters. Whatever the strain, Contrex® water was characterized by fluctuations in DNA detection with sporadic negative results.

Viability of *Leptospira* in Nutrient-Free Freshwaters

We assessed the viability of *Leptospira* using both the viability-PCR (V-PCR) approach and Live/Dead double fluorescence staining.

During the first days of the study, only 16 out of 35 V-PCR results could be validated based on the expected Ct-shift. The viability rates calculated were in the range [0–164%]. In addition, one condition with a valid result of 0% was successfully recovered from EMJH culture. Therefore, Viability-PCR was not considered appropriate to evaluate the viability of leptospires in the following time-points and abandoned.

The Live/Dead double fluorescence staining is also based on membrane integrity allowing microscopic visualization of live *Leptospira*. At the beginning of experiment, Live/

Dead double staining was performed on planktonic cells. From 60 dpi on, the protocol was modified to integrate the observation of sessile *Leptospira* by staining a glass cover slide for each condition. With all strains used, we could not identify any live or dead *Leptospira* in the ultrapure water MilliQ. The highest number of live bacteria was observed in the Mont-Dore® water. From 60 dpi on, differentiation of live or dead *Leptospira* started to be challenging, as bacteria staining was frequently a mix of the two colors, red and green (Fig. 2). *Leptospira* fluorescence was orange in the middle and green at cell extremities but entirely red (putatively dead) bacteria were still observed.

Culturing provides a definitive evidence of bacterial viability. Therefore, EMJH culture of the *Leptospira* studied has been used to confirm viability of strains. Surprisingly, culture results from MilliQ water were most frequently negative and only *L. interrogans* L495 was subcultured at 2 and 15 dpi from this non-ionized water. *L. interrogans* 2016-001 and *L. interrogans* L495 were successfully subcultured until 12 mpi and 9 mpi respectively in at least one of the water tested. The saprophyte *L. biflexa* Patoc I remained cultivable up to 9 months in Mont Dore® and Evian and as long as 15 mpi in Volvic®. Results are presented in Fig. 1.

Virulence of Pathogenic *Leptospira interrogans*: In Vivo Assessment

Virulence was assessed by direct intraperitoneal injection into golden Syrian hamsters at defined time-points (Table 2). *L. interrogans* were designated virulent when successfully subcultured from the blood collected 4.5 days after inoculation. This strategy was used because isolation from blood of bacteremic individuals allows detecting non-lethal and subclinical infections that might result from low *Leptospira* concentration in the inoculum. Results revealed the preservation of *L. interrogans* 2016-001 virulence in Mont-Dore® water and of *L. interrogans* Manilae L495 in Evian® water both for 1 year. However and of note, to minimize the number of experimental animals, not all conditions were tested

Table 2 Preservation of *Leptospira interrogans* virulence in vivo

	Waters	2 dpi	15 dpi	2 mpi	4 mpi	9 mpi	12 mpi	15 mpi	24 mpi
<i>Leptospira interrogans</i> Manilae L495	Mont-Dore®		+		+				–
	Evian®						+		
	Contrex®	+							
<i>Leptospira interrogans</i> 2016-001	Volvic®			+		+		–	
	Mont-Dore®		+		+	+	+	–	–
	Evian®	+							
	Volvic®			+					

Virulence was assessed by direct intraperitoneal injection into hamster. Plus signs designate positive culture from cardiac puncture. Note that not all conditions were tested at each timepoint

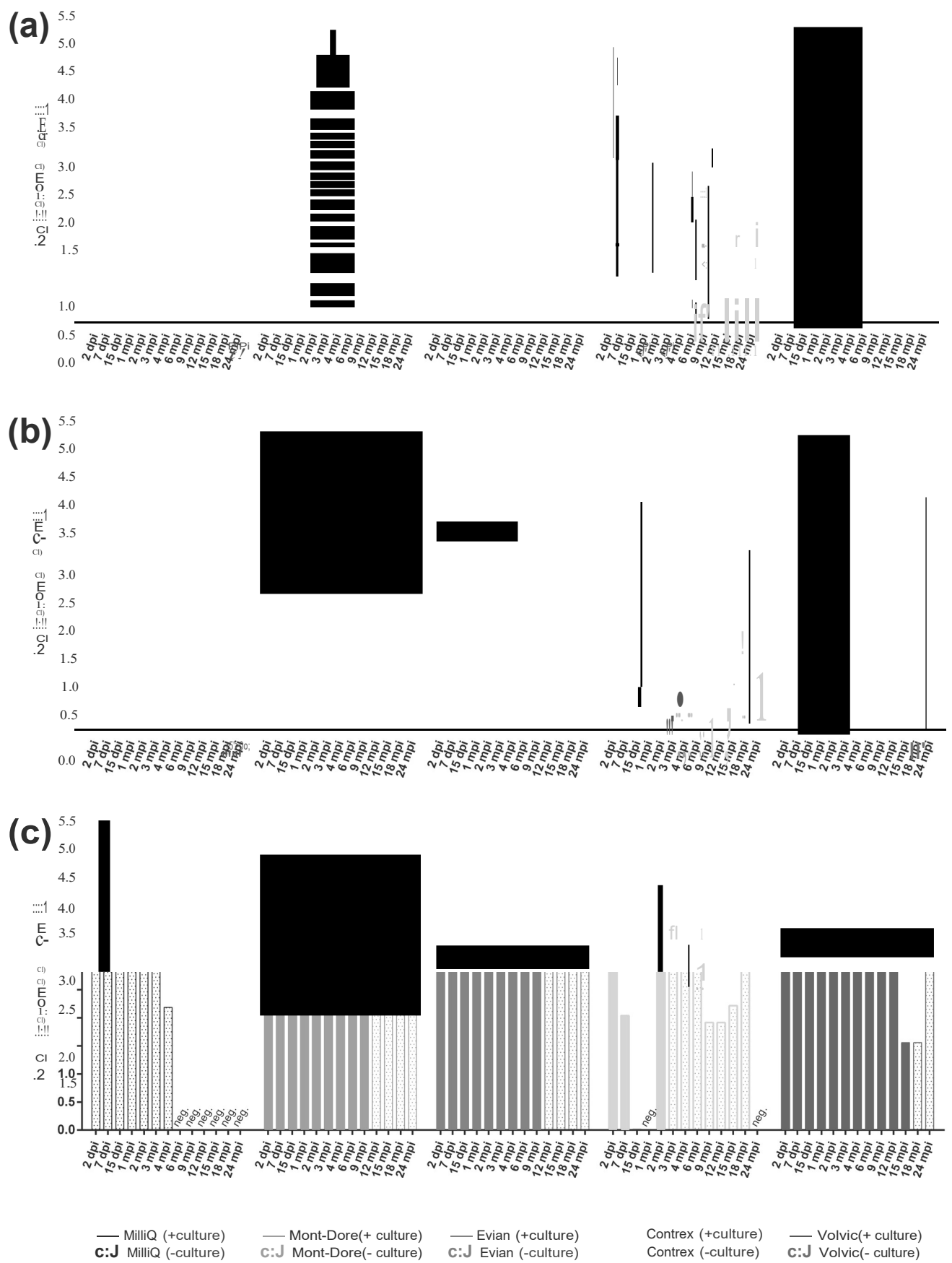


Fig.1 Evolution of *Leptospira* qPCR counts and cultivability in EMJH after various starvation times in 5 different waters. Results are expressed using logarithm of leptospiral DNA concentration (as Genome equivalents per mL). Plain boxes are for lime-points with

successful subculture, dashed boxes for lime-points with negative subculture. a *Leptospira interrogans* 2016-001, b *Leptospira interrogans* L495, and c *Leptospira biflexa* Patoc 1

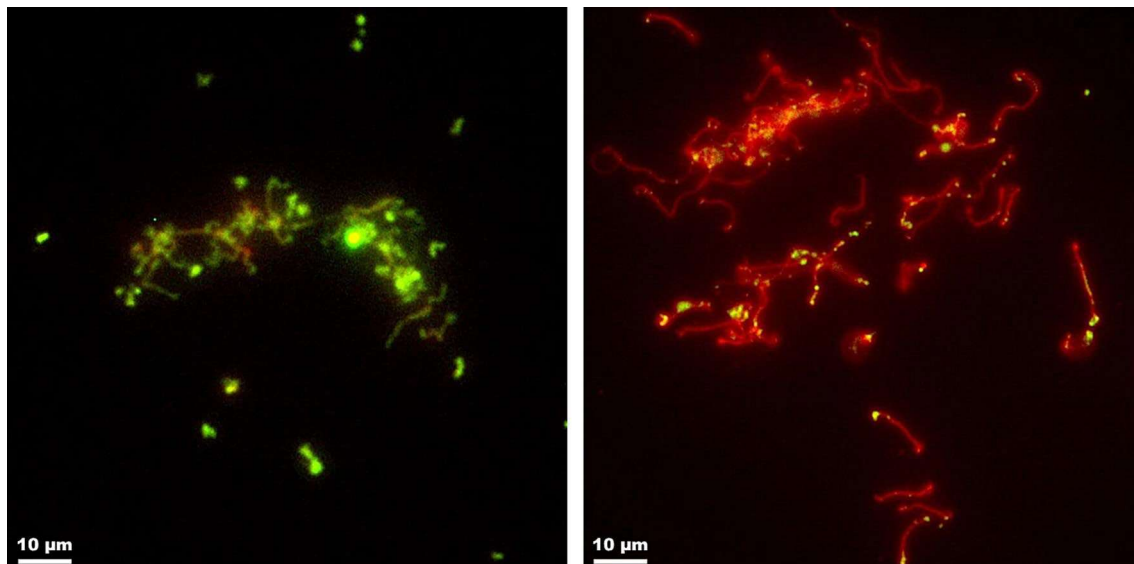


Fig. 2 Microscopic images of *Leptospira interrogans* 2016-001 after 2 months of incubation in Mont-Dore® water (left panel) and *Leptospira biflexa* Patoc I 4 mpi in Volvic® water (right panel). Observa-

tions were made under a Leica DM4000 fluorescence microscope using Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit. Magnification ×1000

at each time-point, so other conditions possibly also allowed virulence preservation.

Discussion

The importance of the environment in the transmission of leptospirosis is largely recognized. Moreover, freshwater is known to be a key factor in the spillover transmission of pathogenic *Leptospira* from animal reservoirs to humans. Previous studies have detected pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* in freshwater environments using molecular or culture techniques [28, 29] but only few were interested in determining their survival and virulence in this environment [15–17, 30].

Our study aimed at assessing survival of *Leptospira* undergoing prolonged starvation in nutrient-free freshwater. Of four strains studied, *L. borgpetersenii* B3-13S was unable to survive in any of the five waters used. This result could be expected given the low capacity of environmental survival of this species [31]. Oppositely, the saprophyte *L. biflexa* Patoc I has shown a survival of at least 15 months in the low-mineralized water Volvic® (See Table 1 and Fig. 1c). Survival of this strain was expected to be longer because of the purely environmental lifestyle of this species [32]. Interestingly, we also demonstrated a 1-year survival of pathogenic *L. interrogans* strains 2016-001 and L495; furthermore, these strains remained directly virulent in low-mineralized waters (See Table 2).

Despite the absence of statistical analysis, our results suggest that MilliQ water was not favorable to *Leptospira*

survival. This result is probably due to the composition of MilliQ, which is non-ionic and therefore non-buffered. In addition, non-ionized MilliQ pure water may also prove unfavorable because of osmotic forces. Also, the most mineralized water Contrex® (See Table 1) poorly supported survival of *Leptospira* likely not only because of its high mineral concentration, but also possibly because of opposite osmotic forces. Finally, buffered waters with slightly alkaline pH, like Mont-Dore® and Volvic® waters, have supported the survival and the preservation of virulence.

Pioneer studies used microscopic observations to report survival of pathogenic *Leptospira* in freshwater from 1 week [30] to more than 3 months depending on temperature and pH [14, 33]. However, results from these works must be interpreted with caution because of the use of the old taxonomy for pathogenic and non-pathogenic *Leptospira*. More recently, water microcosms were used to study the survival capacity of different *L. interrogans* in environmental and spring waters. Authors have shown a survival from 8 weeks in environmental waters [31] to 20 months in spring waters associated with a preservation of virulence capacity, revealed after subculture [15].

In our study, the use of quantitative PCR gave information on DNA concentration of *Leptospira* in nutrient-deprived environments. Quantitative PCR detects not only DNA contained in live cells but also free DNA from dead cells. In the most mineralized water Contrex®, variations in the qPCR detection were probably due to bacterial interactions with salt precipitates that occurred in this highly mineralized water, making the Contrex® microcosms highly heterogeneous. However, a recent study has confirmed that

Leptospira DNA can persist for long periods in water [34]. Thus, the presence of DNA in a sample may not correlate with the presence of live cells. In our study, viability-PCR and Live/Dead double staining, assessing viability of pathogenic *L. interrogans* and the saprophyte *L. biflexa*, based on cell membrane integrity or impermeability, have both shown their limitations. Differentiation between live and dead cells appeared challenging after 2-month starvation. Our results suggest that *Leptospira* were then entering a specific physiological state characterized by atypical membrane permeability, possibly related to some form of “survival” state (See Fig. 2). This hypothesis would deserve to be further studied. *Leptospira* cells could be reducing their metabolism while waiting for favorable environmental conditions. This hypothesis is supported by *Leptospira* successfully subcultured in EMJH that were not detected as viable based on neither viability-PCR nor Live/Dead staining results. Oppositely, viable but non-cultivable forms cannot be suspected from our results, since *Leptospira* cells in the “survival” mode hypothesized remained cultivable.

To reflect *Leptospira* survival in environment, previous works have assessed survival in non-sterilized waters [15, 30]. This strategy precludes differentiating the influence of water chemical parameters and the complex effects of microbial communities. Here, we used 0.1- μ m filter-sterilized waters to minimize alteration of water composition and to focus our data on water chemical parameters. Actually, sterilization by autoclaving, as used in a recent study [35], can lead to an important modification of water composition, notably salt precipitation that we also observed in our preliminary experiments (data not shown). Although bacteriophages might pass through a 0.1- μ m membrane, none of our results suggested the presence of *Leptospira* lytic phages in our study conditions [36]. Using non-sterilized water, biases could be induced due to positive or negative interactions between *Leptospira* and other environmental bacteria [18, 37, 38].

The use of non-sterilized water can also result in an input of nutrients, improving survival capacity [33]. As described previously, water inoculations performed directly with *Leptospira* cultures in EMJH mostly reflect nutrient-poor conditions [15]. In contrast, our work attempted to assess the survival of *Leptospira* undergoing strict starvation in nutrient-free freshwater. Thus, *Leptospira* cells were washed twice prior to inoculation in nutrient-free conditions, providing evidence of the capacity of saprophytic, and also pathogenic *Leptospira* to survive for at least 1 year in nutrient-deprived water.

Leptospira are known to lose their infectious capacity with successive in vitro subcultures. Despite the “survival” state hypothesized above, direct virulence without

subculture was evidenced for as long as 1 year. In former studies, authors have revealed infectivity of pathogenic *Leptospira* from 13 days to 3 weeks of incubation in surface water [16, 17]. To our knowledge, the direct virulence of pathogenic *Leptospira* after 1 year in nutrient-free water was not reported before. Our experimental design consisted in direct injection of sample into a susceptible animal, without any enrichment or subculture as assessed before [15]. Actually, subculture would not only correspond to cell multiplication, but also to changing the physiological state of the cells used for infection.

The objective of this work was to collect information on long-term *Leptospira* survival. In this context, survival parameters of four *Leptospira* strains were studied in five different waters during 2 years. To avoid contaminations, each time-point consisted in sampling one culture flask for each condition (water $\times$ strain). Thus, the number of time-points associated with all conditions and additional flasks led to 260 flasks inoculated and analyzed. This large quantity of culture flasks explains the absence of replicates in our experiments that could influence the results and precluded any statistical analysis.

The launch of this experiment corresponded to the distribution of 12 mL of inoculated water into 50-mL flask before incubation at 30 °C. Evaporation was observed at some point leading to an increase of mineral concentration in the waters studied, despite our efforts to limit this phenomenon by maintaining a moisturized environment.

Overall, our study provides valuable information about the survival and the direct virulence of pathogenic *Leptospira* under environmental-like nutrient-free conditions. Pathogenic *L. interrogans* survived for at least 1 year in a physiological state allowing not only growth in culture medium, but also direct infection of a susceptible new host. These data are of prime importance considering that freshwater is an important source of *Leptospira* infections.

Since a few years, estimation of survival time and virulence preservation of pathogenic *Leptospira* spp. after excretion into the environment is becoming a crucial challenge to determine the environmental risk and to adopt relevant preventive measures.

Acknowledgements The authors would like to acknowledge Sophie Geroult who worked on preliminary experiments, Malia Kainiu for her feedback on the manuscript and Mélanie Faure for her help during her internship. We are also thankful to Institut Pasteur in New Caledonia for supporting this research by an internal funding.

Author Contributions CG and RT conceived the initial project. EB, MESG and DG planned and carried out experimentations. EB analyzed results and wrote the manuscript with support from CG and LG. CG supervised the entire project. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Research Involving Animal Rights Animal experiments were validated by our institutional review board and conducted in agreement with guidelines of the Animal Care and Use Committees of the Institut Pasteur and followed European Recommendation 2007/526/EC.

References

- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI (2015) Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9):e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
- Thiermann AB (1981) The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *J Wildl Dis* 17(1):39–43. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-17.1.39>
- Bierque E, Thibaux R, Girault D, Soupé-Gilbert ME, Goarant C (2020) A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS ONE* 15(1):e0227055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055>
- Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD Jr, Riley LW (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354(9181):820–825. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)80012-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)80012-9)
- Trejejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJ, de los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki SR, Shieh WJ, McLean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Bragg SL, Perkins BA, Spiegel RA (1998) Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 178(5):1457–1463. <https://doi.org/10.1086/314424>
- Agampodi SB, Nugegoda DB, Thevanesam V, Vinetz JM (2015) Characteristics of rural leptospirosis patients admitted to referral hospitals during the 2008 leptospirosis outbreak in Sri Lanka: implications for developing public health control measures. *Am J Trop Med Hygiene* 92(1):139–144. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0465>
- Amilasan AT, Ujiie M, Suzuki M, Salva E, Belo MCP, Koizumi N, Yoshimatsu K, Schmidt W-P, Marte S, Dimaano EM, Villarama JB, Ariyoshi K (2012) Outbreak of leptospirosis after flood, the Philippines, 2009. *Emerg Infect Dis* 18(1):91–94. <https://doi.org/10.3201/eid1801.101892>
- Togami E, Kama M, Goarant C, Craig SB, Lau C, Ritter JM, Imrie A, Ko A, Nilles E (2018) A large leptospirosis outbreak following successive severe floods in Fiji, 2012. *Am J Trop Med Hygiene* 99(4):849–851. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0335>
- Weinberger D, Baroux N, Grangeon J-P, Ko AI, Goarant C (2014) El Niño Southern Oscillation and leptospirosis outbreaks in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis* 8(4):e2798. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002798>
- Saito M, Villanueva SY, Chakraborty A, Miyahara S, Segawa T, Asoh T, Ozuru R, Gloriani NG, Yanagihara Y, Yoshida SI (2013) Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. *Appl Environ Microbiol* 79(2):601–609. <https://doi.org/10.1128/AEM.02728-12>
- Thibaux R, Geroult S, Benezech C, Chabaud S, Soupé-Gilbert ME, Girault D, Bierque E, Goarant C (2017) Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Negl Trop Dis* 11(2):e0005414. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005414>
- Tripathy DN, Hanson LE (1973) Leptospire from water sources at Dixon Springs Agricultural Center. *J Wildl Dis* 9(3):209–212
- Smith DJ, Self HR (1955) Observations on the survival of *Leptospira australis* A in soil and water. *J Hygiene* 53(4):436–444
- Smith CEG, Turner LH (1961) The effect of pH on the survival of leptospire in water. *Bull WHO* 24(1):35–43
- Andre-Fontaine G, Aviat F, Thorin C (2015) Waterborne Leptospirosis: survival and preservation of the virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in fresh water. *Curr Microbiol* 71(1):136–142. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0836-4>
- Gillespie RWH, Ryno J (1963) Epidemiology of Leptospirosis. *Am J Public Health Nat Health* 53(6):950–955
- Crawford RP, Heinemann JM, McCulloch WF, Diesch SL (1971) Human infections associated with waterborne Leptospire, and survival studies on serotype pomona. *J Am Vet Med Assoc* 159(11):1477–1484
- Barragan VA, Mejia ME, Travez A, Zapata S, Hartskeerl RA, Haake DA, Trueba GA (2011) Interactions of *Leptospira* with environmental bacteria from surface water. *Curr Microbiol* 62(6):1802–1806. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9931-3>
- Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, Lilienbaum W, Picardeau M (2008) Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospire. *Microbiology* 154(Pt 5):1309–1317
- Schietekat O, Vincent AT, Malosse C, Lechat P, Chamot-Rooke J, Veyrier FJ, Picardeau M, Bourhy P (2018) Characterization of LE3 and LE4, the only lytic phages known to infect the spirochete *Leptospira*. *Sci Rep* 8:11781
- Murray GL, Morel V, Cerqueira GM, Croda J, Srikram A, Henry R, Ko AI, Dellagostin OA, Bulach DM, Serruwan R, Adler B, Picardeau M (2009) Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect Immun* 77(2):810–816. <https://doi.org/10.1128/IAI.01293-08>
- Perez J, Brescia F, Becam J, Mauron C, Goarant C (2011) Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in an area of hyper-endemicity in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis* 5(10):e1361. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001361>
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) *Leptospira* and Leptospirosis, Second Edition. MedSci, Melbourne, Vic. Australia, Melbourne, Australia
- Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR (2009) Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64(3):247–255. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>
- Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I (1992) Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 30(9):2219–2224
- Soupé-Gilbert ME, Bierque E, Geroult S, Teurlai M, Goarant C (2017) Continuous excretion of *Leptospira borgpetersenii* Ballum in mice assessed by viability-quantitative PCR. *Am J Tropical Med Hygiene* 97(4):1088–1093. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0114>
- Bae S, Wuertz S (2009) Discrimination of viable and dead fecal Bacteroidales bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Appl Environ Microbiol* 75(9):2940–2944. <https://doi.org/10.1128/AEM.01333-08>
- Murgia R, Riquelme N, Baranton G, Cinco M (1997) Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic *Leptospira* occurring in water. *FEMS Microbiol Lett* 148(1):27–34
- Scialfa E, Grune S, Brihuega B, Aguirre P, Rivero M (2018) Isolation of saprophytic *Leptospira* spp. from a selected environmental water source of Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia* 50(3):323–326. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.003>
- Noguchi H (1918) The survival of *Leptospira* (Spirochaeta) icterohaemorrhagiae in nature; observations concerning microchemical reactions and intermediary hosts. *J Exp Med* 27(5):609–625

31. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Culen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B (2006) Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(39):14560–14565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603979103>
32. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Medigue C, Adler B (2008) Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 3(2):e1607
33. Chang SL, Buckingham M, Taylor MP (1948) Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae*; survival in water and sewage; destruction in water by halogen compounds, synthetic detergents, and heat. *J Infect Dis* 82(3):256–266
34. Casanovas-Massana A, Pedra GG, Wunder EA Jr, Diggle PJ, Begon M, Ko AI (2018) Quantification of *Leptospira interrogans* survival in soil and water microcosms. *Appl Environ Microbiol* 84(13):e00507–00518. <https://doi.org/10.1128/aem.00507-18>
35. Stoddard RA, Bui D, Haberling DL, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Hoffmaster AR (2014) Viability of *Leptospira* isolates from a human outbreak in thailand in various water types, pH, and temperature conditions. *Am J Tropical Med Hygiene* 91(5):1020–1022. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0748>
20. Thibeaux R, Soupé-Gilbert M-E, Kainiu M, Girault D, Bierque E, Fernandes J, Bähre H, Douyère A, Eskenazi N, Vinh J, Picardeau M, Goarant C (2020) The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. *NPJ Biofilms Microbi* 6:24
37. Vinod Kumar K, Lall C, Vimal Raj R, Vedhagiri K, Vijayachari P (2015) Co-existence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. *FEMS Microbiol Ecol* 91(6):pii:fiv051. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv051>
38. Vinod Kumar K, Lall C, Raj RV, Vijayachari P (2019) Coaggregation and biofilm formation of *Leptospira* with *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 63(3–4):147–150. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12679>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ce travail a permis de confirmer la capacité de leptospires pathogènes à survivre plus d'un an dans l'eau en l'absence de nutriments. De plus, nous avons démontré la capacité de *L. interrogans* à provoquer une infection systémique chez un animal sensible directement après une incubation longue dans ces conditions. À notre connaissance, il s'agit de la première description d'une infection directe d'un hôte sensible par un leptospire après une longue période de survie en eau dépourvue de nutriments. Nos résultats évoquent également un état physiologique de survie des leptospires dans des conditions aqueuses défavorables, suggéré notamment par une perméabilité particulière de la paroi cellulaire. L'hypothèse, ici, est que les leptospires pourraient réduire leur métabolisme « en attendant » de meilleures conditions environnementales.

Ces données sont de première importance si on considère que l'eau constitue une source majeure d'infection par les leptospires. L'étude de la survie environnementale et de la virulence de leptospires pathogènes est un enjeu crucial pour déterminer les risques environnementaux et adopter des mesures préventives et des stratégies de contrôle de la leptospirose.

II. Survie de leptospires pathogènes dans l'environnement hydrotellurique en Nouvelle-Calédonie

a. Introduction

Des études antérieures ont identifié les paramètres physicochimiques d'humidité, de salinité, de température et de pH d'un sol comme impactant la survie des leptospires dans l'environnement hydrotellurique (Parker and Walker, 2011; Saito et al., 2013; Smith and Turner, 1961). En Nouvelle-Calédonie, des données de terrain, issues de travaux auxquels j'ai participé avant ma thèse, suggèrent fortement la capacité de *L. interrogans* à survivre dans des sols et sédiments jusqu'à 9 semaines après des événements de contamination humaine (Thibeaux et al., 2017). De façon comparable, une même souche a pu être isolée deux fois à cinq mois d'intervalle à partir du même sol au Japon (Saito et al., 2013). Cependant, ces résultats pourraient également être expliqués par des contaminations répétées issues d'animaux ou de l'environnement proche et la persistance de leptospires virulents dans des milieux ouverts en conditions environnementales réelles nécessite d'autres études. De ce constat a émergé l'intérêt de mettre au point des microcosmes à partir d'échantillons de terrain afin d'étudier la survie des leptospires *in vitro* au laboratoire.

Notre revue systématique de la littérature (cf. chapitre précédent) a montré que la survie des leptospires dans les sols a principalement été étudiée sous forme de microcosmes dès les premières études (Hellstrom and Marshall, 1978; Smith and Self, 1955). Plus récemment, des microcosmes de sols et d'eaux ont été élaborés afin d'y étudier la persistance de l'ADN et la viabilité de leptospires virulents (Casanovas-Massana et al., 2018). Les auteurs ont montré une dégradation rapide de l'ADN dans les sols et les eaux usées grâce à la technique de Viability-PCR, permettant ainsi d'évaluer la viabilité des leptospires dans ces matrices grâce à une quantification directe par qPCR. Cette étude a mis en évidence une survie de *L. interrogans* jusqu'à trois semaines dans un sol ainsi qu'une capacité de survie plus grande de l'espèce saprophyte *L. biflexa*.

Le but de la présente étude est d'acquérir davantage de connaissances sur le mode de vie des leptospires pathogènes en dehors d'un organisme hôte. L'hypothèse avancée étant que ce sont les sols qui constituent l'habitat des leptospires, nous voulons ici identifier les paramètres physicochimiques d'un sol qui sont favorables à la survie des leptospires pathogènes. Ainsi, la survie a été investiguée dans des sols par la mise en place de microcosmes de solutions de sols, dans un premier temps, puis de sols. L'identification de caractéristiques physicochimiques de solutions de sol, permettra d'étudier la survie des leptospires dans des eaux chargées de composants organiques et minéraux d'origine tellurique, mimant ainsi l'eau interstitielle des sols sursaturés lors de fortes pluies. Pour répondre à ces questions, des microcosmes ont été élaborés à partir de 37 sols collectés lors d'une campagne de prélèvements en Nouvelle-Calédonie en 2018.

b. Matériels et méthodes

i. Campagne de prélèvement

Choix des sols et plan d'échantillonnage

En Nouvelle-Calédonie, il existe 6 grands types pédologiques séparés en 15 sous-catégories, représentant 98,7% de la surface de la Grande Terre (Latham et al., 1978). Ces grands types pédologiques comprennent les sols alluviaux ou fluvisols, les sols peu évolués d'érosion (régosols et leptosols), les sols argileux gonflants appelés vertisols, les sols bruns tropicaux dits cambisols, les sols appauvris ou acrisols et les latérites comme les ferralsols et plinthosols.

Un plan d'échantillonnage a été réalisé grâce au logiciel de système d'information géographique ArcGIS. Le traitement a consisté en la simplification de la carte morpho-

pédologique de la Nouvelle-Calédonie (Bonvallot et al., 2012) ainsi qu'en l'ajout des cours d'eau et des principaux axes routiers de la Grande Terre (Figure 12).

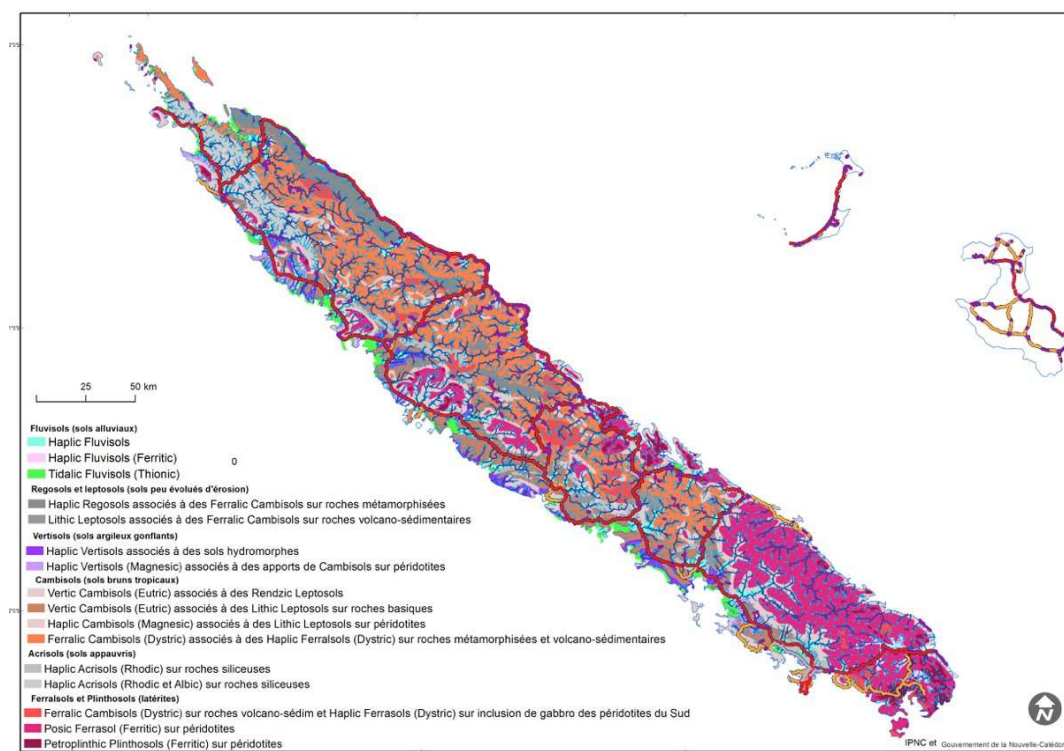


Figure 12 Carte pédologique de Nouvelle-Calédonie

La carte a été produite par Dr A.Tarantola, IPNC depuis les données pédologiques de Bonvallot *et al.*, 2012

À partir de cette carte, le plan d'échantillonnage a été établi afin que l'ensemble des prélèvements soit représentatif des 15 sous-catégories de sols calédoniens, puis adapté sur le terrain pour prendre en considération l'accessibilité. Les sols échantillonnés ainsi que leur type pédologique sont résumés en annexe IV.

Sites et méthodes de prélèvement

La campagne de prélèvements s'est déroulée entre mai et septembre 2018. Les autorisations de prélèvement ont été obtenues auprès de la Province Nord (n° autorisation de collecte 60912-2002-2017) et de la province Sud (Arrêté 1689-2017 Province Sud) de la Nouvelle-Calédonie. La carte, présentée en figure 13, positionne les points auxquels les prélèvements ont été effectués. Ils sont répertoriés en annexe IV. Pour chaque prélèvement, le même mode opératoire a été suivi. Les prélèvements ont été réalisés sur une zone la plus naturelle possible et éloignée de la route. Le sol était alors mis à nu en enlevant les débris végétaux et la litière présents à sa surface. À l'aide d'une pelle ou d'une pioche, un minimum de 3 kg de sols sont

prélevés sur une profondeur d'environ 12-15 centimètres et stockés en sachet plastique fermé jusqu'au retour au laboratoire. La teneur en eau, la conductivité, la température et le potentiel Redox ont été mesurés *in situ*, grâce à des sondes spécifiques, sur chaque site de prélèvement. Ces mesures sont également regroupées en annexe IV.



Figure 13 Carte des prélèvements de sols en Nouvelle-Calédonie

Les marqueurs jaunes correspondent aux lieux de prélèvements des 37 échantillons de sols.

Conditionnement et utilisation des échantillons

Une campagne de prélèvements a permis la collecte de 37 sols représentatifs de 15 sous-types pédologiques différents en Nouvelle-Calédonie sur la Grande Terre. Dès le retour au laboratoire, 250 mg de sols frais ont été utilisés pour extraire l'ADN génomique total afin de détecter la présence de leptospires pathogènes dans les échantillons à l'état natif. Les extractions d'ADN ont été réalisées en triplicat grâce au kit PowerSoil en suivant les instructions du fabricant (DNeasy PowerSoil® Qiagen). La détection d'ADN de leptospires pathogènes a été réalisée en PCR quantitative (qPCR). Ces deux techniques sont détaillées dans la partie iv de ce chapitre concernant la mise en place des microcosmes de sol. Les échantillons ont ensuite été séchés à l'air en extérieur (exposés au soleil) et tamisés à 2 mm avant d'être stockés à -20°C jusqu'à leur analyse ou utilisation ultérieure.

La caractérisation physicochimique de chaque sol a été réalisée par le Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA) de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) à Nouméa. Les mesures réalisées sont résumées en annexe Vb. L'acidité (pH H₂O et pH KCl), les taux d'azote et de carbone organiques, les concentrations en cations d'échange (Calcium, Magnésium, Sodium et Potassium), la capacité d'échange de cations et les concentrations de

11 métaux ont été mesurés. De même, le taux d'humidité résiduelle ainsi que la valeur de pF3, qui correspond au pourcentage d'eau retenue par un sol lorsqu'on lui applique 1 bar de pression, ont été mesurés pour déterminer les propriétés physiques des sols.

En parallèle, les échantillons sont utilisés pour la réalisation de microcosmes de sols et de solutions de sols.

ii. Souche modèle de Leptospira et milieu de culture

La souche pathogène *L. interrogans* sérovar Manilae L495 a été choisie pour les manipulations en microcosmes de solutions de sols et de sols. Cette souche est largement étudiée puisqu'elle correspond à la souche parentale des banques de mutants, notamment de l'Institut Pasteur à Paris (Murray et al., 2009b).

Le milieu Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) a été utilisé pour la culture des leptospires avant leur inoculation en microcosme. Il s'agit d'un milieu riche spécifique de la culture des leptospires. Chaque culture est incubée à 30°C sous agitation en condition aérobie (Faine, 1999).

iii. Mise en place des microcosmes de solution de sols

Préparation des solutions de sol

Chaque sol conditionné est décongelé et réhydraté dans une proportion de 2:3 eau : sol sec. Pour obtenir le volume nécessaire à la mise en place du microcosme de solutions de sol et à leur dosage physicochimique par le LAMA, 480 g de sols sont utilisés. Le volume d'eau à ajouter est alors calculé en intégrant l'humidité résiduelle du sol. Ces données sont regroupées dans le tableau 2. Les mélanges sont alors incubés à 30°C, à l'obscurité et sous agitation durant 72 heures. Ce temps d'incubation a été choisi pour simuler une crue avec inondation durant 3 jours, avant ressuyage par les sols. Les solutions de sols sont ensuite obtenues par centrifugation des mélanges sol-eau pendant 20 minutes à 13000 g. Le surnageant est alors récupéré, correspondant à l'eau non absorbée par les particules du sol.

Tableau 2 Mise en eau des sols pour la préparation des solutions de sols

Les sols ont été mis en eau dans les proportions 2/3 eau/sol sec. Le volume d'eau à ajouter a été calculé à partir du pourcentage d'humidité résiduelle de chaque sol et de la quantité de sol à utiliser.

Références	Humidité résiduelle	Sol brut en g	Eau ajoutée en mL
1 SUD	25%	480	120
2 SUD	12%	480	224
3 PIROGUE	14%	480	208
4 YATE	8%	480	256
5 LAC8	5%	480	280
6 CARENAGE	11%	480	232
7 MARRE	9%	480	248
8 RIVIERE	1%	480	312
9 POYA	8%	480	256
10 PLAGE	5%	480	280
11 SOURCE	11%	480	232
12a SCARE	9%	480	248
12b REGENE	9%	480	248
12c SAVANE	8%	480	256
13 AMOS	1%	480	312
14 BLANC	0%	480	320
15 KOUMAC	4%	480	288
16 KG	5%	480	280
17 KG HC	6%	480	272
18 KGS	2%	480	304
19 KONIAMBO	5%	480	280
20 POUEMBOUT	12%	480	224
21 REGOSOL POUEMBOUT	7%	480	264
22 PINDAI	5%	480	280
23 SARRAMEA	5%	480	280
24 SARRAMEA CREEK	2%	480	304
25 POUEO	6%	480	272
26 NERA	5%	480	280
27 TENE	3%	480	296
28 BOGHEN	5%	480	280
29 ARABES	4%	480	288
30 LA FOA	4%	480	288
31 OUANO	6%	480	272
32 NASSIRAH	3%	480	296
33 OUENGHI	4%	480	288
34 MANGO	10%	480	240
35 TAMOA	7%	480	264

Afin de prendre uniquement en considération la composition physicochimique des solutions, les surnageants ont été filtrés successivement sur des filtres de différentes porosités, GF/C Whatman® (porosité environ 1,2 µm), puis membranes de nitrocellulose de porosité 0,45 µm et 0,22 µm pour les analyses physicochimiques. Les éléments dosés sont répertoriés en annexe Va (dosages réalisés par le LAMA). Une dernière filtration des solutions de sols à 0,1 µm (membrane en Polyfluorure de vinylidène (PVDF) hydrophile, Millex) a été effectuée stérilement pour être utilisée dans nos expérimentations en microcosme, certaines bactéries, notamment les leptospires, étant susceptibles de filtrer à 0,22µm. Les solutions de sols filtrées à 0,1 µm ont été utilisées en microcosmes, comme décrit ci-après, dans les 24 heures qui ont suivi leur fabrication afin d'éviter une modification physicochimique de leur composition.

Préparation et inoculation des microcosmes de solution de sol

Les microcosmes de solutions de sols ont été réalisés en plaque 96 puits stérile (plaque de culture 96 puits, à fond plat, en polystyrène, Nunc). Chaque solution de sol a été inoculée avec une culture de *L. interrogans* Manilae à une concentration finale de 10^7 leptospires par puits. Pour éviter l'apport de nutriments dans les solutions de sols, les cultures de leptospires sont lavées avant inoculation, par centrifugation 12 minutes à 1000 g ; le culot est ensuite repris en eau ppi (pour préparation pour injection) stérile. Le témoin positif correspond à l'inoculation identique de 10^7 leptospires par puits dans 150 µL d'EMJH dilué à 10%. Les témoins négatifs correspondent aux solutions de sols et l'EMJH 10% sans inoculation. Les tests de survie en solutions de sols et le témoin positif ont été réalisés en triplicat. Les témoins négatifs, quant à eux, ont été réalisés en duplicat. Pour éviter les effets de bord et les contaminations ainsi que les phénomènes d'évaporation, les puits extérieurs et entre les échantillons ont été remplis avec de l'eau ppi stérile.

Une fois inoculés, les microcosmes de solutions de sols ont été incubés à 30°C à l'obscurité.

Suivi des microcosmes de solutions de sols

La survie des leptospires a été évaluée 1 heure puis 3, 5 et 10 jours après inoculation pour chaque solution de sol. À chaque temps, l'activité métabolique des leptospires dans les solutions de sols a été mesurée par ajout de Bleu d'Alamar (Alamarblue™ cell viability reagent, Invitrogen) à 10% soit 15 µL pour 150 µL de solution de sol (Mouville and Benaroudj, 2020). Brièvement, le Bleu d'Alamar est un composé bleu (résazurine) qui est réduit en rose (résorufine) lorsqu'il est métabolisé par les cellules. Cette technique correspond donc à un indicateur de l'activité métabolique des leptospires en solution de sol.

Au temps suivant l'ajout de Bleu d'Alamar, 15 μ L d'EMJH sont ajoutés aux puits restés bleus. Par exemple, si le Bleu d'Alamar est ajouté au temps J3, l'EMJH est ajouté dans les puits bleus à J5. L'ajout de milieu de culture à 10% final permet de savoir si les leptospires inoculés qui n'ont pas métabolisé le Bleu d'Alamar sont morts ou s'ils sont viables mais inactifs. En effet, l'apport en nutriments contenus dans le milieu permet de réactiver le métabolisme des cellules viables mais inactives qui pourront alors réduire la résazurine en résorufine. Les puits contenant des leptospires morts resteront bleus après ajout d'EMJH.

Analyses des résultats

Les analyses statistiques des résultats de survie ont été réalisées grâce au logiciel R (Version 1.3.959). Dans un premier temps, les relations entre la composition physicochimique des solutions de sols et leur capacité à supporter la survie de leptospires pathogènes ont été investiguées grâce à une analyse factorielle multiple (AFM). Le paramètre survie à une semaine a été choisi dans les analyses statistiques décrites ci-dessous.

Un modèle statistique "Support Vector Machine " (SVM) a été réalisé par Noé Ochida, doctorant à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie et l'IRD-Nouméa, en langage de programmation Python. Ce modèle utilise la survie ou non des leptospires après une semaine d'incubation en solutions de sols comme variable à expliquer. Les variables explicatives correspondent aux dosages des composants physicochimiques des solutions de sols étudiées. Les modèles SVM permettent de contourner des problèmes méthodologiques tels que la multi-colinéarité entre plusieurs variables explicatives ou encore l'existence possible de liens non-linéaires complexes entre variables explicatives et réponses.

Pour entraîner le modèle, les valeurs de la variable pH ont été normalisées c'est à dire qu'elles ont été transformées en valeurs absolues de l'écart entre la neutralité et le pH mesuré. La variable conductivité a, quant à elle, été standardisée par la formule [conductivité mesurée – moyenne] / écart-type.

Un test de Mann-Whitney-U a permis de discriminer quatre variables à partir de solutions de sols capables de supporter ou non une survie des leptospires de plus d'une semaine. Ce test permet de comparer la distribution de deux populations à partir d'observations indépendantes les unes des autres. Il repose sur deux hypothèses qui correspondent à l'hypothèse nulle (H0) qui décrit comme égales les distributions des deux populations étudiées, et l'hypothèse alternative (H1) qui repose sur une différence dans les distributions des deux populations étudiées. Ici, les deux populations étudiées correspondent (1) aux solutions de sols qui permettent la survie des leptospires pathogènes après une semaine d'incubation et (2) aux

solutions de sols qui ne permettent pas cette survie. Ainsi, quatre variables sur 32 au total ont été sélectionnées pour la construction du modèle SVM à partir des résultats du test statistique de Mann-Whitney-U.

Finalement, trois variables sur quatre sélectionnées ont été centrées et réduites avant d'être utilisées pour l'élaboration du modèle SVM. Tous les modèles SVM possibles, comprenant ces quatre variables explicatives, ont été entraînés selon une gamme de paramètres afin d'obtenir le meilleur modèle SVM. Les scripts correspondant à ces analyses sont décrits en annexe VI.

iv. Mise en place des microcosmes de sols

Préparation des microcosmes de sol

Les échantillons de sols conservés à -20°C ont été décongelés et réhydratés deux jours avant leur utilisation en microcosme. L'étape de réhydratation consiste à ajouter le volume d'eau ppi nécessaire pour atteindre la valeur de capacité au champ ou pF3, auquel on soustrait un volume de 800 µL pour 10 g de chaque sol. Les 800 µL manquants seront ajoutés avec les leptospires au moment de l'inoculation. Les sols ainsi réhydratés ont ensuite été incubés à 30°C pendant 48h dans le but de permettre une relative restructuration des sols étudiés.

Préparation et inoculation des microcosmes de sol

Les microcosmes de sols ont été réalisés à partir de 10 g de sols en pot à coproculture stérile. Chaque microcosme de sol a été inoculé avec une culture de *L. interrogans* Manilae L495 à une concentration finale de $1,76 \cdot 10^7$ leptospires /g de sol sec. À nouveau, pour limiter l'apport de milieu nutritif dans les microcosmes de sols, les leptospires sont lavés avant inoculation, par centrifugation 12 minutes à 1000 g et reprise du culot en eau ppi stérile. Après comptage en cellule de Petroff-Hausser, 800 µL de suspension de leptospires à une concentration finale de $2,2 \cdot 10^8$ leptospires/mL ont été inoculés de façon uniforme à la surface de chaque microcosme.

Une fois inoculés, les microcosmes de sols ont été incubés à 30°C à l'obscurité.

Pour confirmer la dégradation de l'ADN des leptospires morts dans les sols, des témoins de dégradation ont été réalisés. Dans ce cas, les leptospires contenus dans la suspension à $2,2 \cdot 10^8$ leptospires/mL sont préalablement tués par chauffage une heure à 97°C avant l'inoculation de neuf sols en microcosmes.

Suivi des microcosmes de sols

Le suivi des microcosmes de sols a été réalisé une heure et un jour après leur inoculation puis toutes les semaines jusqu'à deux mois post-inoculation et toutes les deux semaines jusqu'à quatre mois d'incubation. À chaque temps, l'ADN total contenu dans 250 mg prélevés de chaque microcosme a été extrait et le nombre de leptospires pathogènes a été quantifié par qPCR. Le suivi d'un microcosme est arrêté lorsqu'un microcosme est ressorti négatif en qPCR à deux temps successifs ou après 4 mois d'incubation.

Extraction d'ADN génomique à partir d'échantillons de sols et PCR quantitative

Chaque extraction d'ADN génomique a été réalisée à partir d'une masse de sol comprise entre 245 et 255 mg grâce au kit d'extraction DNeasy PowerSoil® de Qiagen. Le principe de ce kit repose sur l'élimination des débris du sol et des inhibiteurs de PCR afin d'extraire et purifier l'ADN total présent de l'échantillon. Les extraits sont ensuite stockés à 4°C avant d'être quantifiés par qPCR ciblant le gène *lipL32*, codant une protéine de la membrane externe des leptospires, hautement conservée chez les espèces pathogènes (Stoddard, 2013).

La réaction PCR a été réalisée comme suit : prémix Perfecta Toughmix adapté aux échantillons contenant des inhibiteurs (Perfecta qPCR Tough Mix, Quantabio), amorces lipL32-45F et lipL32-286R à 0,4 µM final, sonde lipL32-189P à 0,13 µM. Les séquences des amorces et de la sonde utilisées sont résumées en figure 14. Le programme utilisé sur le thermocycleur LightCycler 480 (Roche Applied Science) était constitué d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes, suivie de 55 cycles de dénaturation 5 secondes à 95°C et hybridation/élongation 15 secondes à 58°C en alternance. Les résultats de qPCR sont exprimés en nombre de leptospires par µL d'éluat de chaque échantillon (moyenne de 2 réplicats), qui a ensuite été rapporté en nombre de leptospires par mg de sol. La survie des leptospires est exprimée en temps nécessaire à atteindre 3% de la concentration détectée 1 heure après inoculation.

Préparation de la réaction PCR

	pour	réaction
	1	
	en μL	
Eau distillée	2	
Enzyme Perfecta Tough Mix (2x)	5	
Amorce lipL32-F (10 μM)	0,4	0,4 μM final
Amorce lipL32-R (10 μM)	0,4	0,4 μM final
Sonde lipL32-189P (6,5 μM)	0,2	0,13 μM final
Total	8	
	+2 μL échantillon ADN	

Liste des amorces et sonde utilisées

Références	Type	Séquences	Bases
lipL32-45F	amorce sens	AAG-CAT-TAC-CGC-TTG-TGG-TG	20
lipL32-286R	amorce anti-sens	GAA-CTC-CCA-TTT-CAG-CGA-TT	20
lipL32-189P	sonde	AAA-GCC-AGG-ACA-AGC-GCC-G	19

Références	Tm en $^{\circ}\text{C}$	%GC	Masse molaire en g/mol
lipL32-45F	60	50	6148,1
lipL32-286R	58	45	6052
lipL32-189P	62	63,2	7001,9

Programme PCR sur LightCycler480

Étapes	Températures	Durée	Cycles
Dénaturation	95 $^{\circ}\text{C}$	10 minutes	x1
Dénaturation	95 $^{\circ}\text{C}$	5 secondes	x55
Hybridation	58 $^{\circ}\text{C}$	15 secondes	

Figure 14 Mix réactionnel et programme PCR utilisés

Analyses statistiques

Les analyses de données ont été réalisées grâce au logiciel d'analyses statistiques R (Version 1.3.959). Une matrice de corrélation ainsi qu'une analyse en composantes principales ou ACP ont été réalisées afin de relier la survie à la composition physicochimique des sols étudiés. Les scripts correspondant à ces analyses sont décrits en annexe VI.

c. Résultats

i. Occurrence des leptospires pathogènes à l'état natif

Dans un premier temps, l'occurrence des leptospires à l'état natif a été étudiée dans les 37 sols collectés lors de la campagne de prélèvements en 2018. La présence de leptospires pathogènes a été investiguée par extraction d'ADN total et détection par PCR quantitative. Ces analyses ont permis de mettre en évidence la présence de leptospires pathogènes dans 10 sols des 37 prélevés ce qui correspond à 27% d'échantillons positifs. La présence ou absence de leptospires à l'état natif n'a pas été étudiée en fonction des paramètres des sols, car les prélèvements ont été répartis sur environ 2 mois (mi-mai à mi-juillet 2018), avec des conditions météorologiques contrastées.

ii. *Survie de L. interrogans Manilae en solutions de sol*

La première approche utilisée pour déterminer les composants chimiques des sols qui influencent la survie des leptospires a consisté à tester la capacité de solutions de sols à permettre leur survie en microcosmes. Ces solutions de sols ont été réalisées à partir des 37 échantillons de sols collectés en 2018. La survie dans chaque solution de sol a été estimée grâce à une mesure d'activité métabolique comme décrit ci-dessus. Cette technique a permis de classer les solutions en fonction de leur capacité à supporter la survie de leptospires moins d'une heure, entre une heure et 3 jours, entre 3 et 5 jours, entre 5 et 10 jours ou plus de 10 jours après inoculation. Ces catégories sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 Temps de survie de *L. interrogans Manilae* en solutions de sols

Durée de survie	<1 heure	1 heure à 3 jours	3 à 5 jours	5 à 10 jours	>10 jours
Nombre de sols	23	2	3	5	12
Pourcentage	51,11	4,44	6,67	11,11	26,67

On peut noter que plus de 50% de ces solutions de sols sont défavorables à la survie de leptospires pathogènes après seulement une heure d'incubation. À l'opposé, près d'un quart des solutions de sols permettent une survie pendant plus de 10 jours d'incubation. La capacité à supporter des survies dites intermédiaires est moins représentée. Elles correspondent, lorsqu'elles sont regroupées, à 22,22% des solutions de sols. Ces données ont mis en évidence des résultats très contrastés qui interrogent sur les éléments chimiques qui expliqueraient ces différences. À l'opposé, ces résultats confortent l'hypothèse d'un rôle important de la composition chimique des sols dans la persistance variable des leptospires dans l'environnement et, par suite, dans le risque environnemental de leptospirose.

Dans cet objectif, la composition physicochimique des solutions de sols a été analysée statistiquement afin de la mettre en relation avec les résultats de survie obtenus. D'abord, une analyse factorielle multiple ou AFM a été utilisée afin d'étudier le lien entre les propriétés physicochimiques des solutions de sol et leur capacité à supporter la survie de leptospires pathogènes. Cette analyse permet de réaliser une analyse en composantes principales (ACP) sur les variables quantitatives du jeu de données, ici les résultats de dosages des solutions de sols. Puis la répartition des échantillons est observée en fonction du paramètre de survie. La durée d'une semaine a été choisie comme seuil pour représenter le paramètre de survie en solutions de sols. Deux sols, de type haplic vertisol, n'ont pas été pris en compte lors de la réalisation de l'AFM. En effet, ces sols ont été prélevés à proximité d'une mangrove ce qui implique un environnement hypersalé reconnu comme non propice à la survie des leptospires ; les concentrations de plusieurs éléments, notamment sodium et chlorure, introduisaient une trop importante dispersion des données. De plus, nous avons choisi de représenter la variable pH en tant que pH normalisé, qui correspond à la valeur absolue de l'écart entre la neutralité et le pH mesuré (ainsi, pour une solution de sol à pH=7, le pH normalisé vaut 0, alors qu'il vaut 1 pour une solution à pH=6 ou 8). La figure 15 représente les résultats de l'AFM.

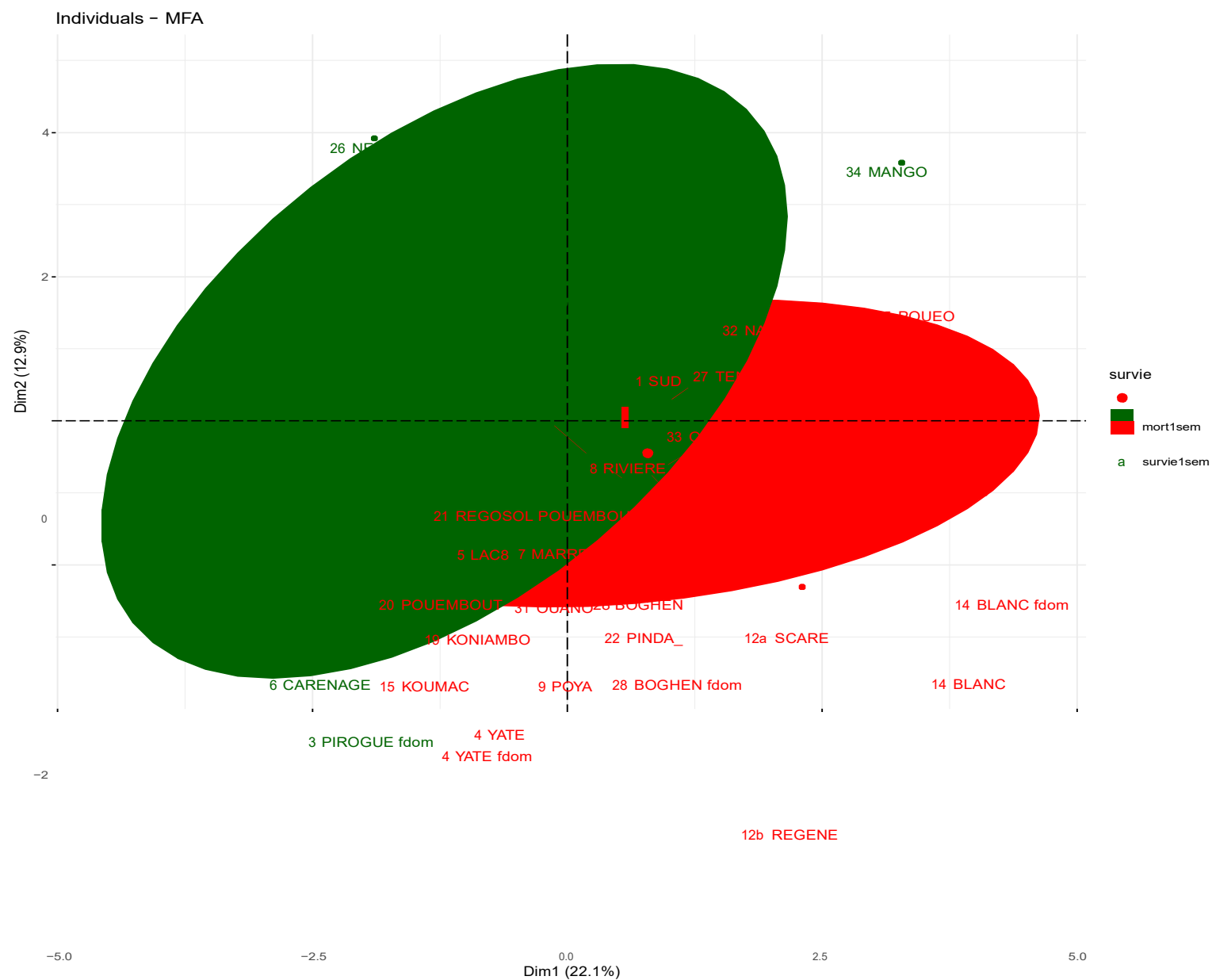


Figure 15 Analyse factorielle multiple de la survie à une semaine de *L. interrogans*

L'analyse a été réalisée sur la survie à une semaine de *L. interrogans* en fonction des caractéristiques chimiques des solutions de sols testées. Les points verts

représentent les solutions de sols qui ont permis une survie des leptospires après une semaine d'incubation. Les points rouges correspondent aux solutions de sols qui n'ont pas permis de survie une semaine après inoculation. La dimension 1 explique 22,4% et la dimension 2 explique 12,6% des variations dans le jeu de données.

L'analyse de la contribution de chaque variable aux deux dimensions de l'AFM a permis d'identifier les variables conductivité et pH normalisé comme expliquant la dimension 1 et les variables Oxyde d'azote et Azote total dissous comme variables explicatives de la dimension 2. Le regroupement de ces données, présenté en figure 15, a donc permis de déterminer que les variables qui expliquent le mieux la survie des leptospires pathogènes en solutions de sols sont la conductivité et le pH. Sur cette figure, la répartition du paramètre survie à une semaine révèle deux clusters. Les solutions favorisant la survie des leptospires une semaine après leur inoculation, en vert, représentent 39,5% des échantillons. L'AFM indique donc que les leptospires semblent mieux survivre dans des solutions de sols avec une faible conductivité et un pH proche de la neutralité. Malgré une répartition plus étendue des solutions de sols ne permettant pas aux leptospires pathogènes de survivre après une semaine d'incubation, les résultats ont suggéré une mort des leptospires due à une conductivité élevée et à un pH éloigné de la neutralité.

Un modèle de type "Support Vector Machine" ou SVM, créé par Noé Ochida, a été généré afin de supporter ces premiers résultats statistiques. Ce modèle a été mis au point afin d'expliquer la survie de leptospires pathogènes après une semaine d'incubation en solutions de sols. Un test statistique de Mann-Whitney-U a permis de sélectionner les variables utilisées dans la construction du modèle SVM.

Ainsi, quatre variables sur 32 au total ont validé l'hypothèse alternative H1, reposant sur une différence dans la distribution des deux populations étudiées, avec un seuil de significativité $\alpha = 0,01$. Les résultats de comparaison des distributions des deux populations selon les quatre variables discriminées sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 Tests statistiques de Mann-Whitney-U

Les résultats des tests sont indiqués sur les variables explicatives sélectionnées pour la construction du modèle SVM. Les valeurs correspondent aux médianes de chacune des deux populations étudiées selon les quatre variables discriminées.

Variables explicatives	Solutions de sols	
	Avec survie à une semaine	Sans survie à une semaine
pH normalisé	0,46	1,385
Conductivité	186	692,5
Fer	0,01	0,14
Aluminium	0	0,04

Le modèle SVM a ainsi été capable d'expliquer la survie des leptospires virulents grâce aux variables explicatives pH normalisé et conductivité des solutions de sols. La matrice de

confusion, résumée dans le tableau 5, permet de calculer la sensibilité, la spécificité et les précisions positives et négatives du modèle.

Tableau 5 Matrice de confusion du modèle SVM

Le modèle se base sur les paramètres pH et conductivité. Les sigles VP et VN correspondent respectivement au nombre de vrais positifs et vrais négatifs alors que les sigles FP et FN représentent respectivement le nombre de faux positifs et faux négatifs. Les valeurs encadrées en rouge ont été impliquées dans le calcul de la sensibilité du modèle alors que les valeurs encadrées en bleu ont été prises en compte pour obtenir la spécificité du modèle. De même, les valeurs sur trame grise ont permis de connaître la précision du modèle SVM.

Prédiction \ Réalité	Survie à une semaine	Non-survie à une semaine	
Survie à une semaine	VP = 14	FN = 3	17
Non-survie à une semaine	FP = 5	VN = 21	26
	19	24	

Le modèle a pu prédire correctement la survie de leptospires pathogènes après une semaine dans 14 des 17 solutions de sols validées expérimentalement, ce qui correspond à une sensibilité du modèle de 82,3%. De même, la matrice de confusion a mis en évidence que 21 solutions de sols qui ne permettent pas de survie des leptospires à une semaine ont été prédites correctement sur les 26 solutions de sols démontrées expérimentalement, correspondant à une spécificité du modèle de 80,8%.

La précision du modèle correspond au nombre de solutions prédites correctement par rapport à l'ensemble des prédictions émises, qu'elles soient correctes ou non. Ainsi, la précision positive du modèle est de 73,7%, soit 14 solutions de sols prédites correctement sur un ensemble de 19 solutions de sols prédites comme supportant la survie après une semaine d'incubation. À l'inverse, la précision négative du modèle a atteint 87,5% avec 21 solutions de sols prédites correctement sur 24 solutions de sols prédites au total, comme ne supportant pas la survie après une semaine d'incubation.

La visualisation du modèle SVM, en figure 16, a mis en évidence cinq solutions de sols, qui ne permettent pas la survie de leptospires à plus d'une semaine d'incubation expérimentalement, au sein du noyau considéré par le modèle SVM comme à forte de chance de survie. La précision positive, plus faible que les autres indicateurs de performance du modèle, explique ces erreurs de prédictions. Les échantillons 4 YATE (sur deux réplicats), 15

KOUMAC, 19 KONIAMBO et 20 POUEMBOUT correspondent aux solutions de sols considérées comme des faux-positifs grâce à la matrice de confusion.

À l'inverse, le modèle SVM a prédit trois solutions de sols comme ne permettant pas la survie de leptospires pathogènes après une semaine d'incubation alors que les expérimentations ont démontré leur survie. Il s'agit des échantillons 6 CARENAGE, 17 KG HC et 34 MANGO. Cependant, les emplacements de 6 CARENAGE et 17 KG HC sur la visualisation du SVM indiquent une faible probabilité de ces deux solutions de sols à ne pas supporter la survie à une semaine. Le modèle montre donc ici une légère imprécision contrairement à la troisième solution de sol qui est prédite comme ayant une forte probabilité de ne pas supporter la survie une semaine après son inoculation.

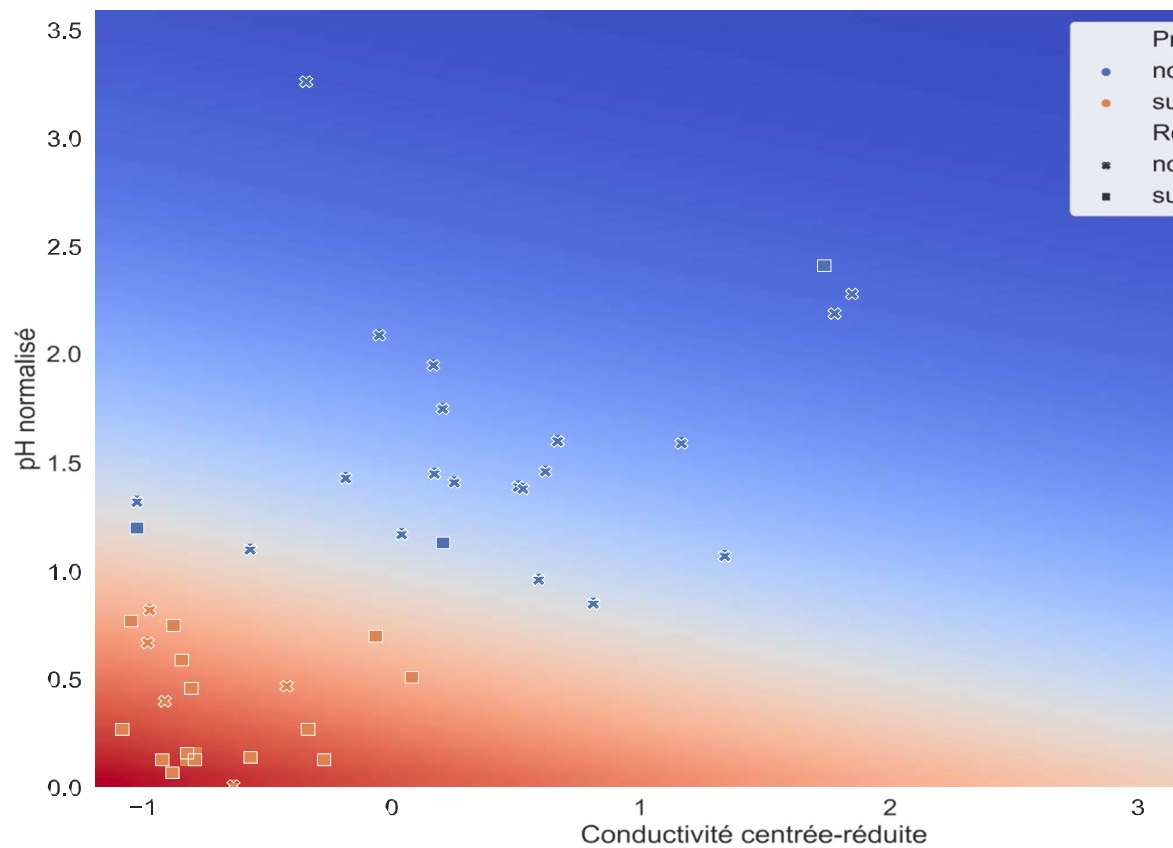


Figure 16 Visualisation du modèle SVM

Le modèle a permis de prédire la survie de leptospires pathogènes en microcosmes en fonction du pH et de la conductivité. L'axe des abscisses correspond à la variable conductivité et le pH normalisé est représenté par l'axe des ordonnées. La surimpression de la couleur représente la probabilité de survie des leptospires à une semaine prédite par le modèle. Plus la couleur est rouge, plus la probabilité de survie est forte. À l'inverse, la couleur bleue représente la faible probabilité des leptospires de survivre après une semaine d'incubation en microcosmes. Les points de couleur rouge et bleue représentent respectivement à la survie et à la mort des leptospires après une semaine d'incubation en microcosmes, observée expérimentalement. Les points de couleur rouge et bleue à une semaine prédite par le modèle sont représentés respectivement par les individus de couleur rouge et bleue. (Noé C.)

iii. Survie de *L. interrogans Manilae* en microcosmes de sol

Les tests de survie de leptospires virulents ont été réalisés en microcosmes à partir des 37 échantillons de sols. La persistance de l'ADN a été évaluée par PCR quantitative jusqu'à quatre mois post-incubation ou jusqu'à ce que l'ADN ne soit plus détectable.

Pour chaque sol, la concentration en ADN quantifiée une heure après inoculation est largement inférieure à la concentration d'inoculation calculée de $1,76.10^4$ leptospires /mg de sol. En effet, 11 sols sur 37 ont une concentration en ADN inférieure à 528 leptospires /mg de sol ce qui représente 3% de la concentration initiale calculée. Cette différence pourrait certes être expliquée par la mort des cellules, mais également la dégradation de leur ADN pendant l'heure d'incubation dans le sol. Néanmoins, l'efficacité de détection c'est à dire les rendements d'extraction et de PCR peut plus probablement être à l'origine de ces différences de concentrations quantifiées seulement une heure après inoculation. Par conséquent, la concentration en ADN à une heure d'incubation a été considérée comme la concentration initiale (Ci) du suivi en microcosme.

Des travaux récents ont démontré une réduction brutale (3 Log décimaux) de la concentration en ADN de leptospires en 4 à 6 jours en microcosme de sol (Casanovas-Massana et al., 2018). Cette dégradation rapide de l'ADN dans les sols permet d'assimiler la détection d'ADN dans un échantillon de sol à la présence de cellules vivantes. Afin de confirmer ces données dans nos conditions expérimentales, 11 sols ont été inoculés avec une suspension de leptospires tués par chauffage et l'ADN de leptospires dans ces microcosmes a été quantifié jusqu'à dégradation complète. Les résultats sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 Temps de dégradation d'ADN de *L. interrogans Manilae* tués à la chaleur en microcosmes de sols

Temps de dégradation (jours)	<1	1 à 4	4 à 8	8 à 15
Nombre de sols	2	5	1	3
Pourcentage de sols	18,2	45,5	9,1	27,3

Les résultats de ces tests ont montré que dans certains sols, 2 semaines peuvent être nécessaires à la complète dégradation de l'ADN de leptospires tués. Des vitesses de dégradation de l'ADN différentes ont été observées en fonction des sols. La majorité a montré une dégradation de l'ADN de leptospires après 4 jours d'incubation. Deux sols ont permis une dégradation de l'ADN en moins d'un jour alors que 27,3% des sols testés ont eu un temps de dégradation de l'ADN supérieur à 8 jours mais restant néanmoins inférieur à 15 jours post-

inoculation. Ces différences de vitesse de dégradation peuvent être expliquées par la faible concentration en bactéries et donc en enzymes de dégradation de l'ADN, présentes dans les sols naturels. Ceci peut notamment être dû au conditionnement des sols avant leur utilisation en microcosmes, notamment par séchage au soleil et congélation.

Les premiers résultats issus des microcosmes de sols ont mis en évidence la survie de leptospires pathogènes plus de 5 mois après l'inoculation dans trois microcosmes, correspondant aux échantillons 6 CARENAGE, 8 RIVIERE et 19 KONIAMBO. La comparaison des courbes de survie des leptospires dans les 37 sols étudiés a permis de les catégoriser en fonction de leur capacité à supporter la survie de leptospires virulents *L. interrogans* Manilae L495. Les résultats sont représentés sous la forme de courbes Ct/Ci au cours du temps. Comme attendu, toutes les courbes ont montré une forte vitesse de décroissance dans les premiers jours d'incubation. La figure 17 montre l'exemple de 8 courbes représentant la survie dans 8 microcosmes de sols différents.

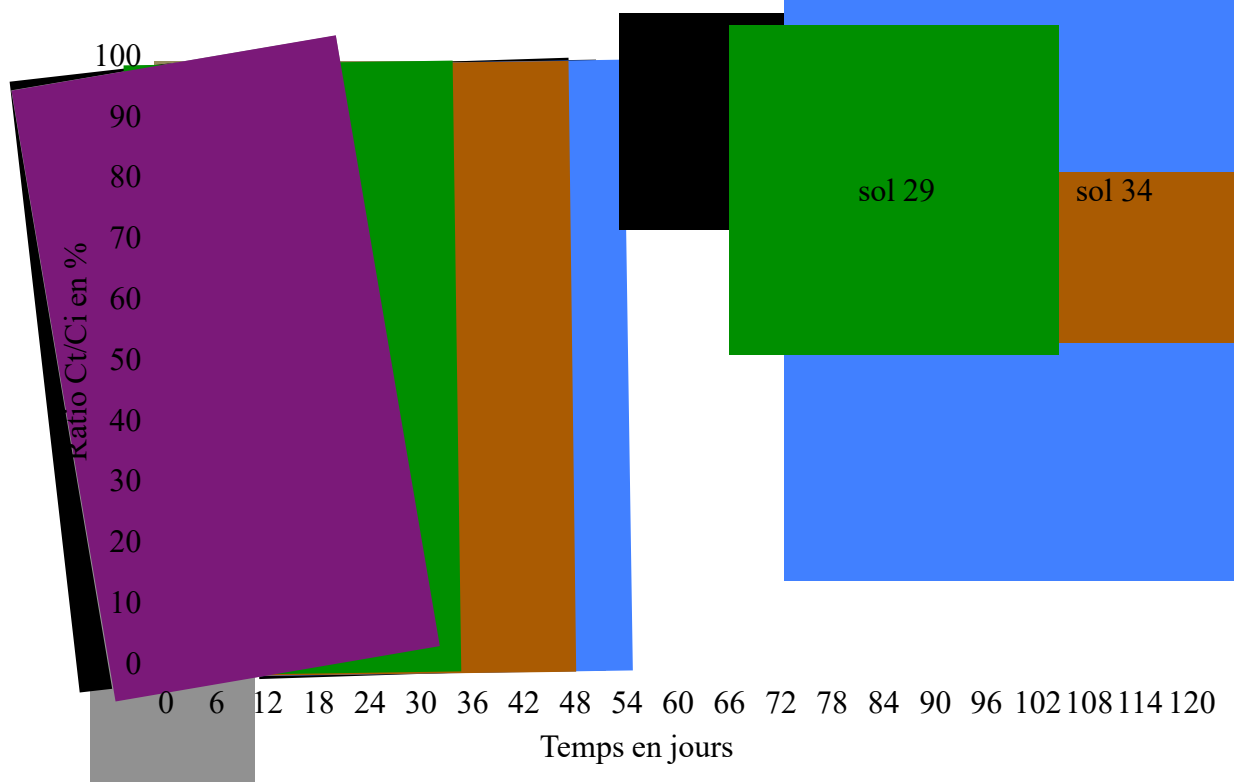


Figure 17 Évolution du ratio Ct/Ci en fonction du temps.

Ct représente la concentration mesurée au temps t et Ci la concentration initiale en leptospires dans les échantillons. Chaque courbe correspond à l'évolution du ratio Ct/Ci dans un microcosme de sol. La courbe noire pleine représente le sol 4, en pointillé le sol 9, et en tiret/pointillé le sol 12b. Les sols 16, 27 et 34 sont respectivement représentées par les courbes grise, orange et violette. Enfin, les courbes en pointillé bleu et vert correspondent respectivement aux sols 21 et 29.

Les courbes montrent toutes une décroissance brutale dans les premiers jours qui suivent l'inoculation des microcosmes avant de se stabiliser entre 0 et 10%. Les décroissances les plus rapides correspondent aux sols 3 PIROGUE, 7 MARRE, 14 BLANC, 20 POUEMBOUT et 27 TENE, qui présentent des courbes similaires. Ils atteignent des valeurs inférieures à 3% un jour après inoculation. À l'opposé, les sols 2 SUD, 8 RIVIERE et 16 KG correspondent aux sols permettant les survies les plus longues. Le ratio Ct/Ci ne devient inférieur à 3% qu'à partir de 56 jours soit environ deux mois d'incubation en microcosmes. Entre ces deux extrêmes, des valeurs inférieures à 3% sont atteintes en une semaine, en 15 jours et en 3 semaines en fonction des sols. Les courbes montrent que les sols 19 KONIAMBO, 29 ARABES et 30 LAFOA ont atteint un ratio Ct/Ci inférieur à 3% après plus d'un mois d'incubation en microcosme, mais des fluctuations ont été observées jusqu'à la fin du suivi.

La valeur représentant le temps pour atteindre 3% de la concentration initiale (Ci) correspond au seuil le plus discriminant choisi pour interpréter nos résultats de survie des leptospires dans les microcosmes de sol. Ce temps a été déterminé par interpolation à partir des courbes d'évolution de la concentration de l'ADN de leptospires dans les microcosmes. Ainsi, les sols ont été répartis en 7 groupes reflétant ce temps, représentés dans le tableau 7. Environ 8% des sols atteignent 3% de leur concentration initiale en moins d'un jour après inoculation. Une grande partie des sols (près de 43%) atteignent 3% de leur concentration initiale en 14 jours et plus de 16% en 3 semaines d'incubation. Finalement, près d'un quart des sols atteignent 3% de leur concentration initiale plus d'un mois après leur inoculation.

Tableau 7 Temps pour atteindre 3% de la concentration initiale de *L. interrogans* Manilae en microcosmes de sols

Temps pour 3%Ci	1 jour	7 jours	14 jours	21 jours	1 mois	2 mois
Nombre de sols	3	2	16	6	4	6
Proportion de sols (%)	8,1	5,4	43,2	16,2	10,8	16,2

Afin d'expliquer statistiquement les différences de survie entre les sols par leurs propriétés physicochimiques, différentes analyses statistiques ont été utilisées. Une matrice de corrélations, représentée en figure 18, a permis de faire ressortir deux corrélations positives significatives ($p < 0,05$), avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,40, qui correspondent aux éléments nickel (Ni) et chrome (Cr). Trois corrélations négatives significatives ($p < 0,05$), représentant les paramètres capacité au champ (pF3), Capacité d'Échange de Cations (CEC) et aluminium (Al), avec des coefficients de corrélation

également supérieurs à 0,40, ont été mises en évidence grâce à cette analyse. Les résultats de matrice de corrélations ont également montré des corrélations significatives avec le calcium (Ca.meq) et le sodium (Na.meq) avec des coefficients légèrement plus faibles de 0,39 et 0,38 respectivement.

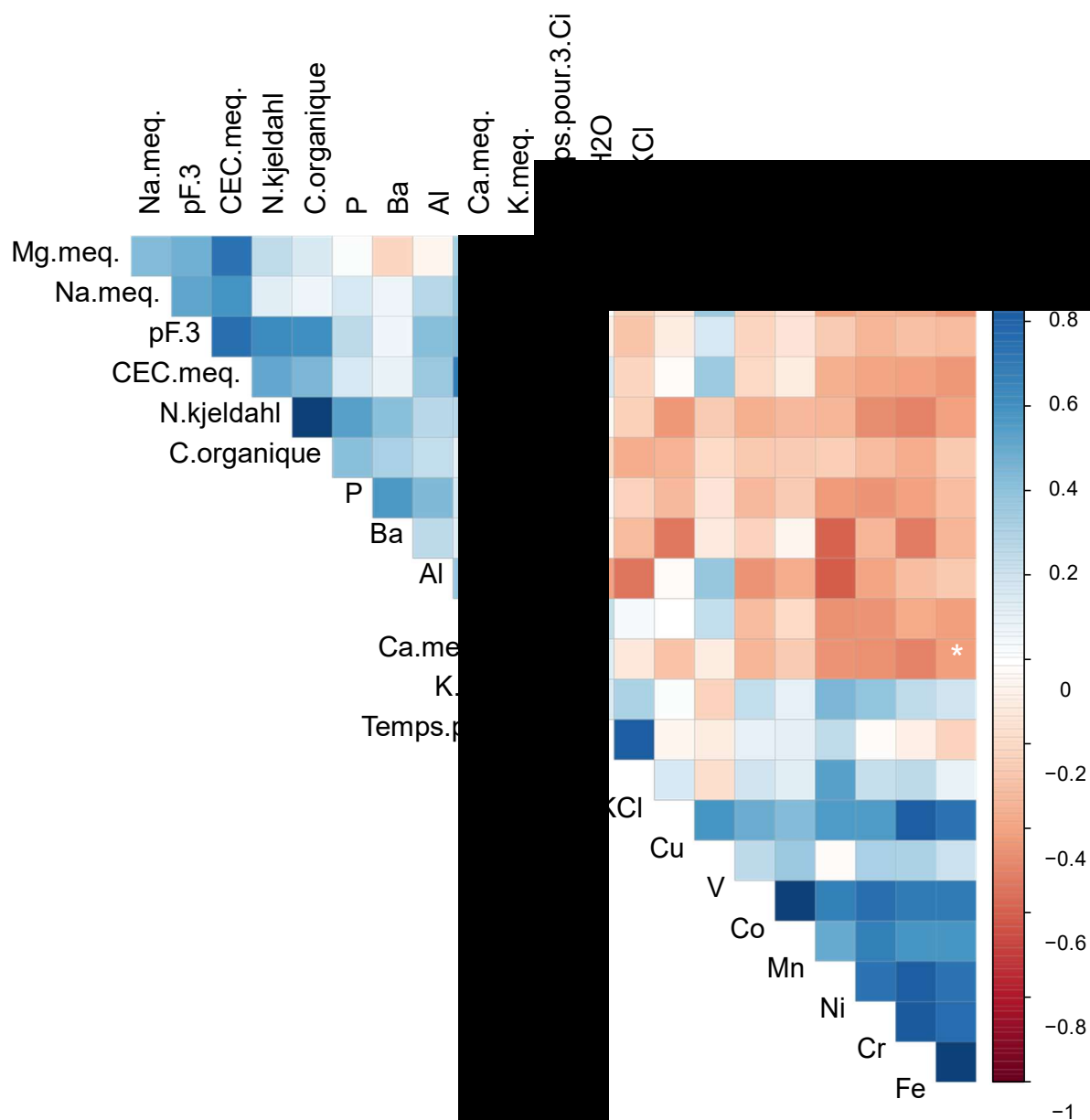


Figure 18 Matrice de corrélations

comparant le temps pour atteindre 3% de leptospires et la composition physicochimique des sols étudiés. La matrice de corrélations a été réalisée grâce au logiciel R (Version 1.3.959). La couleur bleue représente les corrélations positives, tandis que la couleur rouge montre les corrélations négatives. Les résultats significatifs sont repérés par des étoiles (*). Les corrélations encadrées en noir correspondent aux corrélations significatives pour 3% Ci".

tion initiale en leptospires et la composition physicochimique des sols étudiés. La matrice de corrélations a été réalisée grâce au logiciel R (Version 1.3.959). La couleur bleue représente les corrélations positives, tandis que la couleur rouge montre les corrélations négatives. Les résultats significatifs sont repérés par des étoiles (*). Les corrélations encadrées en noir correspondent aux corrélations significatives pour 3% Ci".

Les résultats d'analyses en ACP, visualisés en figure 19, semblent en accord avec la matrice de corrélations puisque les éléments CEC, pF3 et aluminium sont également ressortis en tant qu'interactions négatives avec la survie.

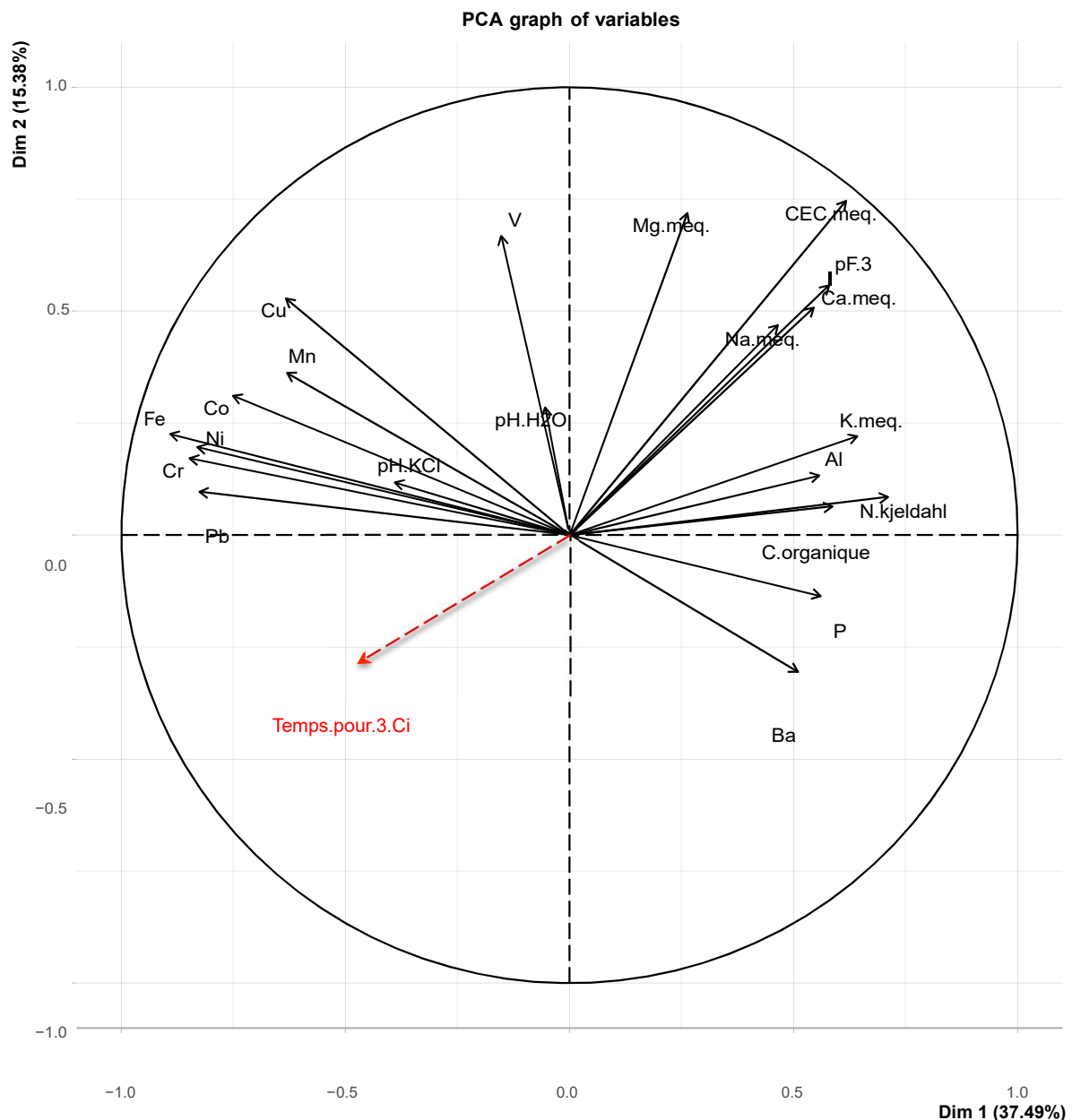


Figure 19 Visualisation de l'analyse en composantes principales

réalisée à partir des données de temps pour atteindre 3% de la concentration initiale en leptospires et la composition physicochimique des sols étudiés, à l'aide du logiciel R (Version 1.3.959). Le vecteur d'intérêt, correspondant au temps pour atteindre 3% de la concentration initiale en leptospires, est représenté en rouge. Les vecteurs de même direction impactent positivement alors que ceux de directions opposées impactent négativement cette survie. Deux vecteurs à angles droits n'ont pas montré d'influence l'un sur l'autre.

Les éléments calcium (Ca.meq) et sodium (Na.meq) semblent également affecter négativement la survie des leptospires pathogènes. Toutefois, l'analyse en ACP n'est que peu

influencée par les corrélations positives avec les éléments nickel et chrome, révélées par la matrice de corrélation.

d. Discussion

Le rôle clé de l'environnement dans la transmission de la leptospirose est largement reconnu. Pourtant, le mode de vie et les mécanismes de survie des leptospires dans l'environnement demeurent mal connus. Acquérir de meilleures connaissances sur la survie environnementale des leptospires, et notamment les facteurs physicochimiques qui l'influencent est donc de prime importance.

Les travaux effectués durant ma thèse sur la survie de leptospires pathogènes dans différents types d'environnements à l'origine des contaminations humaines ont été détaillés dans cette partie du manuscrit. Des microcosmes de sols et de solutions de sols, mimant l'eau interstitielle de sols saturés lors de fortes pluies, ont été élaborés à partir d'échantillons de terrain.

L'occurrence des leptospires pathogènes à l'état natif a été déterminée par détection de la présence d'ADN de leptospires dans les 37 échantillons de sols collectés. Il a ainsi été démontré une occurrence de leptospires du clade P1 dans 27% des échantillons natifs, soit plus d'un quart des sols testés, malgré une campagne de prélèvements réalisée principalement en dehors de la saison de plus forte incidence de la leptospirose. En dépit de l'absence d'analyses statistiques, ces résultats confirment la présence fréquente des leptospires pathogènes dans l'environnement hydrotellurique calédonien mise en évidence antérieurement (Thibeaux et al., 2018a, 2017).

Les expériences de survie de leptospires en microcosmes de solutions de sol ou de sols ont été élaborées à partir d'échantillons de sols non autoclavés afin de préserver la composition physicochimique et l'intégrité structurale des sols. Les résultats de survie d'un même échantillon en microcosmes de solution de sols et de sols ne semblent pas concordants. De façon générale, les résultats obtenus ont montré des survies plus longues dans les sols que dans les microcosmes de solutions de sols. Utiliser les solutions de sols afin de prédire la survie de leptospires pathogènes dans les sols ne semble donc pas une méthode appropriée. Toutefois, l'analyse statistique des résultats de microcosmes de solutions de sols a permis d'identifier les paramètres pH et conductivité comme des facteurs influençant la survie des leptospires pathogènes en solution de sol. Les résultats obtenus suggèrent une meilleure

survie des leptospires dans des solutions de sols de faible conductivité et pH neutre. L'influence du pH sur les leptospires a été largement étudiée. Des travaux antérieurs ont démontré l'effet du pH sur la survie de différentes souches de leptospires pathogènes *in vitro* (Parker and Walker, 2011; Smith and Turner, 1961). Concernant la conductivité, il s'agit, à notre connaissance, du premier rapport illustrant son importance dans la survie de leptospires pathogènes dans l'environnement. L'influence négative de la conductivité était néanmoins attendue du fait que la conductivité d'un sol dépend essentiellement de sa salinité.

Les études conduites durant ma thèse ont également mis en évidence différentes capacités des sols à supporter la survie des leptospires pathogènes. Ainsi, des survies de plus de 5 mois ont été observées dans trois sols sur 37 testés en microcosme. Sur la totalité des sols, les vitesses de décroissance dans les microcosmes ont permis de les classer en huit catégories représentant leurs capacités à supporter la survie des leptospires pathogènes. De façon intéressante, nos résultats ne montrent pas de relation claire entre la classification pédologique et la capacité à permettre une survie durable des leptospires pathogènes. L'analyse statistique de ces résultats a révélé des corrélations significatives avec cinq paramètres physicochimiques caractéristiques des sols. Ainsi, le pathogène *L. interrogans* Manilae semble avoir une meilleure survie dans des sols à faible capacité d'échange cationique et capacité au champ et pauvres en aluminium, sodium et calcium.

L'influence négative de la capacité au champ pF3 sur la survie des leptospires est surprenante du fait de la corrélation de la pF3 avec la quantité d'eau présente dans un sol et de l'importance de l'humidité dans la survie des leptospires (Borowik and Wyszowska, 2016). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la pF3 correspond à la part d'eau liée fortement aux particules d'un sol, laquelle n'est donc pas nécessairement intégralement disponible pour les microorganismes du sol. Les résultats similaires entre la faible capacité d'échange cationique et les faibles concentrations en Sodium et Calcium étaient attendus puisque la mesure de cette capacité d'échange cationique prend en compte, par définition, la capacité d'un sol à retenir les cations comme le potassium, le magnésium, le calcium et le sodium. De plus, cette propriété des sols a été démontrée comme étant corrélée positivement avec la capacité de rétention d'eau des sols et donc avec la capacité au champ (Munroe, 2006).

La matière organique semble jouer un rôle dans la survie des leptospires pathogènes dans les sols. Les analyses statistiques des résultats de microcosmes de sols ont mis en évidence des corrélations entre cette survie et les paramètres Azote Kjeldahl et Carbone organique. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés dans les solutions de sols. Au vu des

premières analyses statistiques en solutions de sols, nous nous sommes demandé si des éléments non dosés pourraient jouer un rôle dans la survie des leptospires pathogènes en solutions de sols. Dans ce cadre, une étude préliminaire a été menée afin d'évaluer la matière organique dans 10 solutions de sols. Ainsi, la matière organique dissoute fluorescente ou fDOM a été évaluée par spectrofluorométrie à l'IRD de Nouméa par Laura Boher (CRESICA). Brièvement, la nature de la matière organique dissoute est caractérisée en fonction de l'intensité et de la localisation de composés fluorescents connus, sur des spectres d'excitation et d'émission en 3 dimensions (Coble et al., 1998; Parlanti et al., 2000). La fDOM ne correspond toutefois qu'à une fraction limitée de la matière organique dissoute totale (Coble et al., 1998). Les résultats, résumés en annexe VII, ont révélé une nature et des quantités différentes de la fDOM en fonction des solutions de sols testées. Deux composés supposés de type humique, un composé supposé de type fulvique et un composé supposé de type tryptophane ont été détectés comme composants majeurs de la fDOM dans les échantillons testés. Les quatre composés détectés, et en particulier le composé de type tryptophane, semblent avoir une influence négative sur la survie à 10 jours des leptospires pathogènes en solution de sol. En milieu naturel, le composé supposé de type tryptophane est issu de la dégradation de substances humiques terrestres. La présence d'un composé de type tryptophane est un indicateur d'une activité microbienne au sein des sols dont sont issues nos solutions de sols utilisées pour les caractérisations de fDOM (Osburn et al., 2012).

Ces résultats préliminaires montrent l'intérêt de prendre en considération la matière organique comme facteur pouvant influencer la survie environnementale des leptospires virulents. L'augmentation du nombre d'échantillons testés permettrait de renforcer et préciser ces résultats.

Des études pionnières ont mis en évidence la survie de leptospires virulents pendant plus de 6 mois dans des microcosmes de sols, de type argileux, saturés en eau (Okazaki and Ringen, 1957). D'autres études ont confirmé la survie et la virulence de leptospires en microcosme de sol après 6 semaines d'incubation (Hellstrom and Marshall, 1978). Plus récemment, la persistance de l'ADN et la viabilité de leptospires virulents ont été étudiées en microcosme de sols et d'eau (Casanovas-Massana et al., 2018). Les deux eaux et deux sols, de compositions différentes, utilisés dans cette étude, ont été stérilisés par autoclavage avant inoculation en microcosme. Cette étape permettant de s'affranchir des interactions entre micro-organismes ayant une influence sur la survie des leptospires peut également être à l'origine d'une modification de la composition des eaux et de la structure des sols (Wolf et al., 1989). Les

auteurs ont mis en évidence la survie de *L. interrogans* jusqu'à 3 semaines dans un des deux sols étudiés (Casanovas-Massana et al., 2018). En parallèle, Lall et collaborateurs se sont intéressés à l'influence de la composition du sol sur la présence de leptospires dans les sols à l'état natif dans les îles indiennes Andaman et Nicobar où la leptospirose est endémique (Lall et al., 2018). Grâce à l'analyse de plus de 220 échantillons de sols, les auteurs ont mis en évidence une présence de leptospires pathogènes à l'état natif dans 13,8% des sols en zone endémique contre 5,4% en zone non-endémique. En comparaison, nos travaux ont révélé une occurrence de leptospires du clade P1 à l'état natif dans 27% des échantillons testés. Ces résultats sont probablement en relation avec le caractère endémique de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie.

Cette même étude a permis d'identifier des corrélations négatives entre la présence de leptospires pathogènes *in situ* et certains paramètres du sol tels que le calcium ou encore la Capacité d'Échange Cationique (Lall et al., 2018). Ces résultats montrent donc l'influence négative de ces paramètres sur la présence de leptospires pathogènes dans les sols, tout comme nos résultats montrent cette même influence sur leur survie dans nos microcosmes visant à mimer l'environnement.

Ce chapitre transcrit ici une étude de grande ampleur qui s'intéresse à expliquer la survie environnementale de leptospires pathogènes par les différences de composition physicochimique du milieu en investiguant un nombre important de paramètres sur un nombre significatif de sols.

Le caractère pionnier de ces travaux a impliqué une part importante d'optimisation des designs expérimentaux dont les limitations concernent notamment le traitement des échantillons de sols et leur utilisation au sein des microcosmes. Par exemple, le conditionnement par séchage au soleil des échantillons de sols a pu affecter leurs caractéristiques physicochimiques. Ces modifications pourraient expliquer certaines limites de nos suivis en microcosmes de solutions de sols et de sols.

Lors du processus de préparation des solutions de sols, les sols sont saturés en eau pendant 72 heures afin de permettre les échanges d'éléments chimiques du sol. Cependant, ce temps d'incubation reste insuffisant pour obtenir l'empreinte réelle du sol dans l'eau, c'est à dire pour représenter réellement l'eau interstitielle du sol. Pour cette raison, le dosage des éléments chimiques a été réalisé sur les mêmes solutions de sols que celles utilisées en microcosme.

La préparation des solutions de sols est une étape chronophage, qui demande le travail de plusieurs manipulateurs notamment du fait de l'impossibilité de conserver ces solutions de sols, pour ne pas observer de modifications physicochimiques. Les sols argileux ont été particulièrement difficiles à traiter puisqu'ils nécessitent un grand volume d'eau. De plus, leur capacité à retenir l'eau en fait des sols dont il est difficile d'extraire les solutions de sols par centrifugation.

Lors de la mise en place des microcosmes de sols, l'utilisation de la valeur de pF3 pour réhydrater les sols peut être discutable. En effet, les volumes correspondant à pF3-800 μ L (cf. Matériels et méthodes) de chaque sol n'étaient pas suffisants pour réhydrater la totalité des 10 grammes de sol de certains microcosmes. L'homogénéisation des microcosmes après hydratation a pu répondre à cette problématique avec toutefois un risque d'agrégation des particules de sols par exemple dans le cas des sols argileux. Le suivi de ces microcosmes a, de plus, montré que les sols semblent s'assécher à partir de 3 semaines d'incubation. L'évaporation de l'eau contenue dans le sol a été observée sur les parois et le couvercle des microcosmes. De façon surprenante, la détection de leptospires est restée possible plusieurs mois malgré cet aspect sec.

Lors de l'étude du suivi en microcosmes de sols, des fluctuations du ratio Ct/Ci ont été observées. Ces pics pourraient être expliqués par une répartition hétérogène des leptospires au sein du microcosme. Une étude récente, à laquelle j'ai participé, a étudié la formation de biofilm par des leptospires, y compris pathogènes du clade P1, dont *L. interrogans* sérovar Manilae L495 (Thibeaux et al., 2020). Le biofilm est ainsi considéré comme une forme de résistance des leptospires dans l'environnement. Il est ainsi possible que les pics observés sur les courbes Ct/Ci, soient dus au prélèvement pour l'extraction d'ADN de zones de sols contenant des agrégats voire du biofilm de leptospires.

Globalement, la lourdeur des expérimentations sous les deux formes de microcosmes n'a pas toujours permis de réaliser de réels réplicats indépendants. Il s'agit d'une des principales limitations à ces études en microcosmes liée, entre autres, à l'impossibilité de conserver les solutions de sols afin de ne pas modifier leur composition physicochimique, comme observé antérieurement dans des eaux minérales. De même, le suivi en microcosmes de sols a consisté à extraire l'ADN de 37 sols à plusieurs temps, ce qui a représenté un total de 514 extractions d'ADN de sols, qui explique également l'absence de réplicats.

D'un point de vue expérimental, le nombre de sols étudiés a semblé important pour le traitement des échantillons. Cependant, l'étude de 37 sols n'est pas suffisante pour obtenir

une puissance statistique ayant du poids dans l'analyse de données. Dans la même idée, le modèle SVM, établi pour expliquer la survie des leptospires pathogènes en microcosmes de solutions de sols, pourrait être affiné et rendu plus puissant avec l'entrée de nouvelles valeurs.

Finalement, l'étude rapportée ici a permis de regrouper un grand nombre de données sur la survie des leptospires dans l'environnement calédonien. Ces informations pourront être précisées par de plus amples analyses. En particulier, la collecte d'un nombre plus important d'échantillons de sol augmenterait la puissance des analyses statistiques. Ainsi, les corrélations possibles entre la présence de leptospires dans les sols calédoniens et leurs compositions physicochimiques pourraient être confirmées. De même, l'ajout de données de survie, notamment avec plusieurs souches de leptospires virulents, pourrait mener à l'élaboration d'un modèle de survie des leptospires pathogènes dans différents types d'environnements hydrotelluriques. Plus précisément, il serait intéressant d'étudier plus en détails les éléments associés à la survie prolongée des leptospires ou au contraire à la mort rapide des cellules, en les testant individuellement ou dans des designs expérimentaux plurifactoriels sous forme de microcosmes de solutions synthétiques ou semi-synthétiques.

Plus généralement, cette étude a permis d'apporter des informations de qualité sur les paramètres physicochimiques intervenant dans la survie des leptospires pathogènes dans l'environnement hydrotellurique. Ces données contribuent ainsi à une meilleure compréhension de la transmission environnementale de la leptospirose, notamment mais pas uniquement en Nouvelle-Calédonie. Compte-tenu du risque élevé de leptospirose pour la population calédonienne, limiter l'exposition aux leptospires dans l'environnement constitue un véritable enjeu de santé publique afin d'améliorer la prévention de cette maladie potentiellement mortelle.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Synthèse des résultats

Depuis 2016, les travaux réalisés à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie ont grandement contribué à la recherche sur la composante environnementale de la leptospirose. Mes travaux de thèse se sont déroulés dans un contexte de réorganisation de la phylogénie du genre *Leptospira* dû à la découverte d'une importante diversité des leptospires présents dans l'environnement. Associées au fait que l'origine principale des contaminations humaines est l'environnement, ces évidences ont éveillé particulièrement notre curiosité sur le mode de vie des leptospires en dehors d'un organisme hôte.

En parallèle de mon projet de thèse, les travaux menés à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie et auxquels j'ai participé, ont mis en lumière une relation inattendue entre la faible capacité de virulence de nouvelles espèces et leur position phylogénétique au sein des groupes alors nommés pathogènes et intermédiaires (Thibeaux et al., 2018b). Cette étude souligne l'intérêt d'une nouvelle classification du genre *Leptospira* et propose alors de distinguer, au sein du groupe des leptospires pathogènes, les souches faiblement virulentes. Grâce à des travaux plus récents, le genre *Leptospira* est à ce jour organisé en deux groupes, pathogène et saprophyte, qui sont chacun subdivisé en deux sous-groupes, désignés comme Pathogène 1 (P1, ancien groupe des pathogènes), Pathogène 2 (P2, anciennement intermédiaires), Saprophyte 1 (S1, ancien groupe des saprophytes) et Saprophyte 2 (S2, nouveau groupe de saprophytes) (Vincent et al., 2019). De cette façon, la phylogénie des leptospires reste toutefois corrélée avec la notion de leur virulence vis-à-vis des mammifères. Ce large remaniement de la phylogénie au sein du genre *Leptospira* repose sur l'augmentation de la diversité connue des leptospires durant ces dernières années, grâce à la découverte de nouvelles espèces de leptospires à partir d'échantillons environnementaux. L'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie a largement participé à cet essor en isolant et décrivant 18 nouvelles espèces issues de l'environnement en Nouvelle-Calédonie (Thibeaux et al., 2018a; Vincent et al., 2019). Ces études ont permis de tripler la diversité connue au sein du genre *Leptospira* qui compte aujourd'hui 64 espèces validement décrites.

De façon intéressante, ces travaux de recherche, couplés avec des études antérieures, montrent une diversité des leptospires plus importante dans les sols que dans les eaux (Baker and Baker, 1970; Henry and Johnson, 1978; Wilson and Fujioka, 1995). Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle les sols correspondent à l'habitat principal des leptospires. La

remise en suspension des leptospires, liés aux particules du sol, lors de fortes pluies et crues permettrait donc l'acheminement des leptospires vers des points d'eau, source de contamination humaine.

Une partie de mon travail de thèse a été de confronter cette hypothèse à l'ensemble des connaissances scientifiques actuelles par la réalisation d'une revue systématique de la littérature, publiée dans le journal *PLoS ONE* (Bierque et al., 2020b). Cette étude a permis d'illustrer l'importance des outils de séquençage haut débit, l'étude comparative des génomes complets permettant d'en savoir davantage sur le mode de vie des leptospires dans l'environnement et sur l'acquisition de la virulence au sein du genre *Leptospira*. Elle dévoile un intérêt grandissant des scientifiques travaillant sur la leptospirose pour les études quantitatives sur l'occurrence et la survie des leptospires dans l'environnement hydrotellurique. Les données synthétisées confirment l'abondance des leptospires dans les sols plutôt que dans l'eau, et ainsi notre hypothèse considérant le sol comme habitat principal et donc réservoir des leptospires pathogènes. Il est connu que les leptospires saprophytes ont un mode de vie environnemental. L'originalité de notre hypothèse repose ici sur l'idée que le mode de vie tellurique est également celui que les leptospires pathogènes virulents, responsables d'infections humaines, empruntent lors de leur phase de vie environnementale. Dans ce contexte, le but de ma thèse a été de comprendre comment ces leptospires sont capables de survivre dans un environnement hydrotellurique jusqu'à l'infection d'un nouvel hôte.

La communauté scientifique a montré récemment son intérêt pour considérer la leptospirose comme risque sanitaire d'origine hydrique. Ceci se traduit par exemple par le fait de l'inclure dans le projet mondial de renforcement des aspects sanitaires et de sécurité autour de l'eau, nommé "Global Water Pathogen Project". Le chapitre dédié aux leptospires et à la leptospirose, co-rédigé par l'Unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie et auquel j'ai participé dans le cadre de ma thèse (Annexe III), a permis d'analyser les données existantes sur l'occurrence et la persistance des leptospires dans l'environnement. Ainsi, des outils disponibles pour la détection de leptospires à partir d'échantillons environnementaux ont pu être mis en évidence. Dans le même temps, les données d'occurrence des leptospires détectés à partir de différentes sources d'eau ont été regroupées et une synthèse des études disponibles sur la survie des leptospires dans l'eau a pu être établie. Cette synthèse a montré que peu d'études s'intéressent à la survie des leptospires dans ce compartiment environnemental.

Afin de combler ce manque de connaissance, un des objectifs de ma thèse a été d'évaluer la survie et le maintien de la virulence de souches de leptospires dans différentes eaux bien caractérisées. Ce projet, dont les résultats ont été acceptés pour publication dans le journal *Current Microbiology* en juillet 2020, a permis de confirmer la capacité de leptospires pathogènes à survivre plus d'un an en eau sans apport en nutriment (Bierque et al., 2020a). Il s'agit également, à notre connaissance, du premier rapport décrivant une infection directe d'un animal sensible par un leptospire après une longue incubation dans ces conditions défavorables. Les résultats de ce travail ont aussi permis d'émettre l'hypothèse d'un état physiologique original de survie des leptospires dans ces conditions aqueuses défavorables.

L'hypothèse de remise en suspension, lors de fortes pluies et de crues, des leptospires associés aux particules du sol nous a, quant à elle, mené à la question de la survie des leptospires dans des environnements telluriques saturés en eau. Des microcosmes de solutions de sols ont permis d'identifier le pH et la conductivité comme paramètres capables d'influencer la survie des leptospires pathogènes. L'analyse statistique des résultats suggère une meilleure survie des leptospires dans des solutions de sols à pH neutre et de faible conductivité. À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui démontre expérimentalement l'influence potentielle de la conductivité sur la survie des leptospires virulents.

Des résultats préliminaires, obtenus au cours de ma thèse, suggèrent également que la quantité et la nature de la matière organique en solution pourraient avoir un rôle dans la survie environnementale des leptospires virulents. La matière organique dissoute, fraction de la matière organique totale, semble avoir un impact négatif sur la survie de leptospires pathogènes en solution de sol. Nos données semblent indiquer qu'un sol riche en matière organique n'est pas propice à la survie de leptospires pathogènes.

La dégradation d'un sol s'accompagne souvent d'une diminution de sa matière organique. Par exemple, la partie superficielle d'un sol, composée majoritairement de matière organique issue de la biomasse végétale, peut être dégradée du fait du fouissage et du piétinement par des espèces envahissantes comme le cerf ou le cochon en Nouvelle-Calédonie. De même, les feux de forêt brûlent cette litière végétale organique et mettent à nu les sols, entraînant un appauvrissement de la matière organique du sol. L'appauvrissement des sols pourrait donc modifier leur capacité à permettre la survie de leptospires pathogènes. Ainsi, le risque d'exposition à la leptospirose pourrait être augmenté avec la dégradation des sols. Ces travaux méritent d'être poursuivis pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Les travaux, présentés ici, de survie des leptospires pathogènes en microcosmes de sols constituent une étude de grande ampleur qui s'intéresse à corréliser cette survie environnementale avec la composition chimique des sols testés. Dans ce contexte, une survie de plus de 5 mois a été mise en évidence dans 8%, soit 3/37 échantillons testés. Les données ont permis d'identifier huit profils de survie différents en fonction des sols testés. Ainsi, les résultats suggèrent une meilleure survie des leptospires virulents dans des sols à faible capacité d'échange cationique et capacité au champ ainsi que pauvres en Sodium et Calcium.

En parallèle, l'étude de la présence des leptospires à l'état natif a montré une occurrence de leptospires du clade P1 dans 27% des sols collectés en Nouvelle-Calédonie dans le cadre de ma thèse. Cette occurrence n'a pas pu être reliée avec la composition physicochimique des sols prélevés, du fait du faible nombre d'échantillons testés et des délais entre les prélèvements de ces 37 échantillons.

Limites de mes recherches

Ma thèse a permis d'initier un travail important de rassemblement de données sur les écosystèmes favorables ou non à la survie des leptospires pathogènes afin d'avoir une meilleure connaissance de l'habitat environnemental des leptospires.

Le nombre important de données générées résulte de la mise en place de tests de survie chronophages et nécessitant des moyens humains importants. La lourdeur de ces expérimentations au cours de ma thèse n'a pas permis de répliquer certains tests, diminuant de ce fait la puissance statistique des résultats présentés. De façon similaire, la majorité de mes travaux de thèse ont reposé sur 37 prélèvements de sols en Nouvelle-Calédonie. Cet échantillonnage est trop faible pour générer des données suffisamment robustes pour construire un modèle de survie des leptospires dans les sols. Il est donc important de noter ici que nous ne pouvons parler que de tendances de paramètres expliquant la survie des leptospires.

Les paramètres analysés pour étudier leur influence sur la survie des leptospires correspondent majoritairement aux éléments chimiques qui composent les sols et solutions de sols. Seuls les éléments tels que la capacité au champ, le pH et la conductivité ont permis de prendre en considération les propriétés physiques des sols, bien que le pH et la conductivité soient fortement liés à la composition ionique des sols. L'impact des paramètres physiques n'a donc pas été investigué plus en détail. Pourtant, des essais d'analyse granulométrique ont

été réalisés mais ces résultats ont montré des discordances avec la texture attendue des sols. Ces différences sont potentiellement dues aux traitements des échantillons, notamment par séchage au soleil mais aussi à un prélèvement de l'échantillon non homogène avant analyse. Une optimisation du conditionnement et de la méthode de prélèvement des échantillons permettrait d'obtenir des résultats granulométriques pouvant être reliés à l'occurrence et à la survie des leptospires dans les sols. Par exemple, la représentativité d'un échantillon pourrait être améliorée en rassemblant et homogénéisant plusieurs prélèvements effectués dans un rayon de 20 mètres autour du point de référence repéré par ses coordonnées GPS (méthode proposée par l'arrêté boue du 8 janvier 1998, précisant la norme AFNOR X31-100).

Mon projet de thèse s'est intéressé à la survie des leptospires sous forme libre dans l'environnement. Cependant, il a été démontré que les microorganismes sont capables de coopérer dans des assemblages complexes afin de mieux exploiter les ressources nutritives et de résister à des conditions environnementales défavorables (Hall-Stoodley et al., 2004). Les leptospires sont connus pour leur haute sensibilité face aux environnements stressants. Il y a donc de fortes probabilités pour qu'ils aient développé des interactions uniques afin de mieux survivre et persister dans la nature. Cette idée émergente a été confirmée par la découverte d'un biofilm produit par des leptospires pathogènes (Ristow et al., 2008; Trueba et al., 2004). Les biofilms naturels, souvent composés de plusieurs espèces, pourraient fournir un abri aux leptospires pathogènes, leur permettant de survivre à long terme dans des environnements défavorables (Vinod Kumar et al., 2015). La formation de biofilm par les leptospires a été étudiée en parallèle de ma thèse par Roman Thibeaux, jeune chercheur dans l'Unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose. Cette étude, à laquelle j'ai participé de manière expérimentale, a été valorisée récemment par la publication d'un article scientifique dans le journal NPJ Biofilms and Microbiomes présenté en annexe VIII (Thibeaux et al., 2020).



Figure 20 Page de titre de la publication « The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production »

paru en 2020 dans le journal NPJ Biofilms and Microbiomes

Pour combler le manque de connaissance sur l'habitat et les préférences écologiques des leptospires pathogènes, le projet ASSurPluHyT a été mis en place par l'unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. Son but est de décrire l'habitat et le mode de vie des leptospires pathogènes ainsi que d'étudier la dispersion des leptospires dans l'eau lors de fortes pluies. Ce travail pluridisciplinaire, financé par le programme "Au fil de l'eau" du CRESICA (Consortium pour la Recherche, l'Enseignement Supérieur et l'Innovation en Nouvelle-Calédonie), fait appel à des connaissances en microbiologie, hydrologie, hydrochimie et géochimie de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, l'Institut de Recherche et Développement et l'Université de Nouvelle-Calédonie. ASSurPluHyT a fait l'objet d'un chapitre d'ouvrage, présenté en annexe IX, auquel j'ai participé. Mon projet de thèse a fait partie intégrante de cette étude dont la stratégie est d'allier un travail de terrain avec des manipulations en laboratoire afin, notamment, d'identifier et caractériser les sols favorables à la survie des leptospires.

ASSURPLUHYT (volet 1) Aspects sanitaires des eaux de surface : une approche pluridisciplinaire de la contamination hydrique par la leptospirose sur un site pilote à Touho



Programmation du préleveur automatique sur une des parcelles d'étude à Touho — © C. Goarant/IPNC

La leptospirose est une zoonose (maladie commune à l'homme et certains animaux) d'origine bactérienne sévère de répartition mondiale. Responsable de plus d'un million de cas et près de 60 000 morts chaque année, elle affecte tout particulièrement les populations rurales d'Océanie, continent où son incidence est la plus élevée au monde. La contamination, saisonnière et liée aux fortes pluies, se fait au contact de sols ou d'eaux contaminés.

En dépit de cette exposition élevée de la population et de la sévérité potentielle de la maladie dont les leptospires pathogènes sont responsables, le mode de vie et les mécanismes de survie dans l'environnement de ces bactéries sont mal connus. Le projet ASSURPLUHYT (2018-2020) vise à combler ces lacunes en décrivant l'habitat et les préférences écologiques des leptospires pathogènes et les modalités de leur mise en suspension dans les eaux lors des pluies.

En Nouvelle-Calédonie, 15 à 200 cas sont identifiés par an et la maladie est responsable de décès chaque année (entre 1 et 18 par an depuis 1997). De meilleures connaissances de la survie des leptospires dans l'environnement et de la durée de leur présence dans les eaux lors des pluies permettront d'améliorer la prévention.

Approche, méthode et compétences mobilisées

Le projet mobilise des compétences en microbiologie, hydrologie, hydrochimie et géochimie de l'IPNC, l'IRD et l'UNC. L'approche choisie combine des observations,

des prélèvements de terrain et des études en laboratoire. Elle se décompose en deux volets visant à :

- identifier et caractériser les sols favorables à la survie des leptospires ;
- quantifier la présence de leptospires dans l'eau pendant et après les crues.

Terrain(s) d'étude

Les terrains d'étude tiennent compte de ces deux volets. Du fait de la rareté des eaux de surface et de la maladie aux îles Loyautés, les échantillons de sols ont été prélevés uniquement sur la Grande Terre. Ces sols ont été sélectionnés de manière à représenter la diversité pédologique de l'île.

Touho a été choisi pour y mener la recherche hydrologique car la leptospirose y a une forte incidence. Le site d'étude est le bassin versant de la Thiem, initialement aménagé pour des études hydrologiques dans le cadre d'un projet régional « Restauration des Services Écosystémiques et Adaptation au Changement Climatique », RESCCUE (2014-2019), et dont les équipements ont été renforcés par la province Nord et le CRESICA. Ce projet a été financé par l'Agence française de développement (8,5 millions d'euros) et il associe la Polynésie française, Fidji, Vanuatu et la Nouvelle-Calédonie.

Trois parcelles de surfaces et de pentes comparables, représentant des couverts végétaux contrastés, sont aujourd'hui étudiées : savane à niaoulis, forêt impactée par les cerfs et les cochons sauvages et forêt mise en

Figure 21 Page de couverture du chapitre d'ouvrage sur le projet ASSurPluHyT

Mises en perspectives

Le projet SpiRAL porté par l'Unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose s'inscrit dans la continuité du projet ASSurPluHyT. SpiRAL est une étude de grande ampleur financée par l'Agence Nationale pour la Recherche qui vise à proposer une vision complète du mode de vie et de la transmission environnementale des leptospires. Ainsi, la recherche sur l'origine environnementale de la leptospirose bénéficiera d'une compréhension plus globale du rôle de l'environnement dans la persistance et la dynamique de dispersion des leptospires, et donc de l'exposition aux leptospires pathogènes. Ces connaissances cruciales permettront d'améliorer les interventions de prévention et de contrôle en santé publique, améliorant ainsi la santé de la population. Un premier objectif du projet SpiRAL est de caractériser les paramètres abiotiques qui influencent la survie des leptospires dans les sols et l'eau. Il pourra ainsi compléter les données acquises durant ma thèse grâce à un échantillonnage de 150 sols et sédiments. Le but est de permettre une meilleure représentativité de la diversité des sols calédoniens. De manière similaire, les tests de survie prévus généreront une importante base de données, permettant une meilleure puissance statistique lors des analyses. La granulométrie du sol fera l'objet d'une étude particulière car elle constitue l'un des facteurs physico-chimiques pouvant jouer un rôle dans la survie environnementale des leptospires. Plus particulièrement la taille des particules du sol auxquelles s'associent les leptospires sera investiguée. Ainsi, il sera possible de décrire avec précision les interactions entre les leptospires et les particules du sol. Le projet SpiRAL s'intéresse également à l'étude des interactions entre les micro-organismes du sol et les leptospires dans l'environnement. Une analyse métagénomique permettra de décrire le microbiote associé à la présence de leptospires dans les sols et sédiments. La survie des leptospires sous forme de biofilm dans le milieu naturel sera aussi explorée, ainsi que les interactions possibles entre leptospires pathogènes et microorganismes eucaryotes. Notamment, les amibes libres environnementales ont été décrites antérieurement comme habitats de germes pathogènes (Molmeret et al., 2005). La co-occurrence dans les eaux de surface du genre *Leptospira* et d'amibes libres environnementales dans des eaux de surface (Delafont et al., 2016) a ainsi amené à proposer l'hypothèse selon laquelle les amibes pourraient jouer un rôle protecteur des leptospires dans un environnement défavorable à leur survie. Des études préliminaires ont été réalisées durant ma thèse afin d'identifier le type d'interactions entre amibes libres environnementales et leptospires. Cependant, des biais *in vitro* et l'utilisation d'une diversité limitée de souches d'amibes libres environnementales n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse.

Enfin, cette étude pluridisciplinaire ambitionne de modéliser la dynamique de dispersion des leptospires lors de fortes pluies entraînant crues et inondations. Un site pilote, entièrement instrumentalisé pour des études hydrologiques, permettra de générer les données nécessaires à cette modélisation. Ce site a constitué une zone de prélèvement pour mon projet de thèse où des leptospires pathogènes ont été détectés.

En les regroupant avec des données spatiales, l'ensemble des résultats générés permettra de construire des modèles réalistes du risque de leptospirose. Ils permettront d'établir une cartographie du risque de leptospirose qui prendra en considération les variables et paramètres environnementaux, écologiques et climatiques pertinents.

L'hypothèse de l'augmentation du risque d'exposition à la leptospirose dans des écosystèmes dégradés dans lesquels les sols sont appauvris en matière organique serait également intéressante à explorer. Dans un premier temps, la relation entre nature et quantité de la matière organique et survie des leptospires pathogènes pourrait être étudiée. La détection *insitu* de leptospires pathogènes dans des échantillons de sols serait ainsi potentiellement reliée à une caractérisation et un dosage de la matière organique composant ces mêmes échantillons. Lall et collaborateurs ont ainsi mis en évidence une association négative entre la présence de leptospires pathogènes du clade P1 et la quantité de matière organique dans le sol (Lall et al., 2018). La survie pourrait également être investiguée au laboratoire grâce à la mise en place de microcosmes à partir d'échantillons caractérisés sur lesquels la quantité de matière organique pourrait varier. Les données générées seraient d'une grande importance afin de sensibiliser davantage sur des notions de risques pour la santé humaine liés à la détérioration du milieu naturel, dans une approche One Health.

Les études actuelles portant sur le mode de vie des leptospires, dont ma thèse, s'intéressent essentiellement à la caractérisation de l'habitat hydrotellurique dans son ensemble. Cependant, les sols constituent un environnement complexe et structuré dans lequel existe de nombreux gradients physicochimiques. L'existence d'une niche écologique plus précise des leptospires est donc probable au sein des sols, dépendant de critères physicochimiques indispensables à leur survie. Les leptospires sont des microorganismes aérobies pour lesquels la teneur en eau joue un rôle déterminant. Le chapitre précédent a en effet suggéré une relation négative entre la survie des leptospires pathogènes et la capacité au champ d'un sol.

Le profil hydrique d'un sol se traduit par une augmentation de la teneur en eau avec la profondeur, jusqu'à atteindre un sol saturé en eau (Fouché and Hirschauer, 2013). Avant cette saturation, l'espace entre les particules d'un sol est comblé par un mélange d'eau et de gaz,

créant un gradient d'oxygène inverse à celui de l'eau. Lüdemann et collaborateurs ont démontré des concentrations en oxygène allant de 140 μM à la surface d'un sol immergé à des valeurs non détectables à partir de seulement 2 mm de l'interface eau / sol (Lüdemann et al., 2000). Au vu de leurs préférences écologiques, une hypothèse peut être que les leptospires sont susceptibles, par leur mobilité, d'adapter leur profondeur dans un sol pour obtenir le meilleur compromis entre leurs besoins en eau et en oxygène. De plus, la sensibilité des leptospires aux rayonnements ultraviolets (UVs) (Stamm and Charon, 1988) peut permettre d'expliquer une niche écologique des leptospires en profondeur, à l'abri de ces rayonnements. Une équipe japonaise a récemment découvert que la mobilité de certains leptospires pouvait être modulée par la lumière (Nakamura, 2019). Cette capacité à répondre à un stress lumineux, en augmentant leur vitesse de déplacement, pourrait correspondre à une stratégie de survie des leptospires dans l'eau, en condition ensoleillée, afin de retourner dans les sols, à l'abri des rayonnements UVs.

Récemment, Thibeaux et collaborateurs ont étudié la présence de leptospires dans les sols le long de ce gradient et en s'affranchissant du gradient d'eau, grâce aux prélèvements de sols par carottage horizontal des bords d'une rivière (Thibeaux et al., 2017). Ainsi, des leptospires pathogènes ont été détectés tous les centimètres jusqu'à une profondeur de 5 cm (données non publiées). Ces résultats suggèrent une influence du gradient d'oxygène sur la survie des leptospires pathogènes dans les sols et par conséquent son impact sur la profondeur optimale de leur habitat. Une étude antérieure indique une survie des leptospires saprophytes dans les couches humides des sols lors de périodes sèches (Saito et al., 2013). Les auteurs ont, en effet, détecté la présence de leptospires saprophytes à 3 cm de profondeur, correspondant à une humidité supérieure à 10%, y compris après une période de sécheresse où l'humidité du sol descend à environ 8%. Sur le même site de prélèvement, aucun leptospire n'avait pu être détecté en surface, soit à une humidité proche de 3%, indiquant l'incapacité des leptospires à résister en conditions sèches. À la suite d'une pluie, la même souche a pu être mise en évidence dans le sol superficiel. Ces données mettent en lumière l'idée d'un déplacement vertical des leptospires dans les sols en fonction de leur taux d'humidité. Ce déplacement pourrait également être modulé par le gradient d'oxygène des sols. Notamment, la saturation en eau du sol, lors de périodes de précipitations, a un impact certain sur ce gradient en diminuant le taux d'oxygène. Ainsi, la capacité des leptospires à se déplacer serait déterminante pour leur survie dans les sols. Cette hypothèse de mobilité verticale des

leptospires dans les sols, contrôlée entre autres par les gradients d'oxygène et d'eau, est schématisée en figure 22.

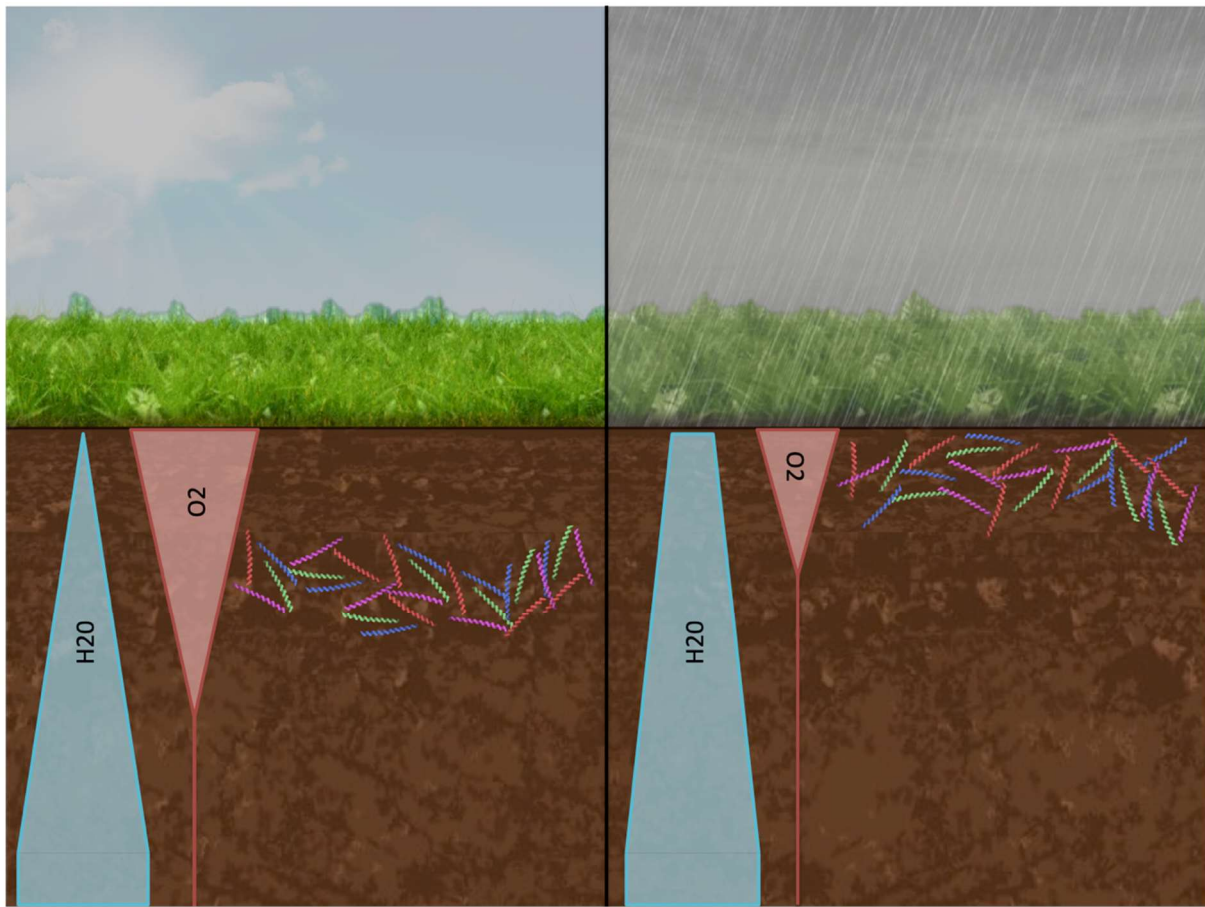


Figure 22 Schéma synthétisant l'hypothèse de mobilité verticale des leptospires en fonction des précipitations

Au vu de l'importance de l'environnement dans la transmission de la leptospirose, investiguer cette hypothèse fournirait des informations importantes à la compréhension de son épidémiologie. De même, l'étude en détail du sol, considéré comme réservoir de leptospires, permettrait de comprendre davantage les stratégies de survie des leptospires *in natura*, jusqu'à l'infection d'un nouvel organisme hôte. Ainsi, de meilleures connaissances de l'aspect environnemental de la leptospirose offriront de nouvelles cibles pour améliorer les stratégies de contrôle et de prévention de la maladie, applicables à d'autres infections environnementales.

LISTE DES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

a. Posters

Bierque, E., Guentas, L., Goarant, C. (2017). "Déterminants écologiques et microbiologiques de la composante environnementale de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie". Doctoriales 2017 de l'Ecole Doctorale du Pacifique, Université de la Nouvelle-Calédonie.

Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.E., Gerault, S., Thibeaux, R., Goarant, C. (2017). "*Leptospira* survival in freshwater microcosms". The International Leptospirosis Society 2017 Scientific Meeting in New Zealand.

Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.E., Girault, D., Thibeaux, R., Guentas, L., Goarant, C. (2018). "Survie des leptospires virulents dans l'environnement hydrotellurique calédonien". Doctoriales 2018 de l'Ecole Doctorale du Pacifique, Université de la Nouvelle-Calédonie.

b. Communications orales

Concours « Ma thèse en 180 secondes » édition 2018, prix du public de Nouvelle-Calédonie, demi-finales nationales à Paris

Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.E., Girault, D., Thibeaux, R., Goarant, C. (2019). "Microbiology and ecology of environmental leptospirosis in New Caledonia". The International Leptospirosis Society 2019 Scientific Meeting in Canada.

Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.E., Girault, D., Thibeaux, R., Goarant, C. (2019). "Ecologie microbienne des leptospires dans l'environnement hydrotellurique en Nouvelle-Calédonie". Doctoriales 2019 de l'Ecole Doctorale du Pacifique, Université de la Nouvelle-Calédonie.

c. *Publications*

Soupé-Gilbert, M.E., **Bierque, E.**, Geroult, S., Teurlai, M., Goarant, C. (2017). "Continuous excretion of *Leptospira borgpetersenii* Ballum in mice assessed by viability-quantitative PCR". *Am J Trop Med Hyg* 97(4): 1088-1093. doi: 10.4269/ajtmh.17-0114

Thibeaux, R., Iraola, G., Ferrés, I., **Bierque, E.**, Girault, D., Soupé-Gilbert, M.E., Picardeau, M., Goarant, C. (2018). "Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence". *Microb Genom* 4(1):000144. doi:10.1099/mgen.0.000144

Thibeaux, R., Girault, D., **Bierque, E.**, Soupé-Gilbert, M.E., Rettinger, A., Douyère, A., Meyer, M., Iraola, G., Picardeau, M., Goarant, C. (2018). "Biodiversity of environmental *Leptospira*: improving identification and revisiting the diagnosis". *Front. Microbiol.* 9:816. doi:10.3389/fmicb.2018.00816

Goarant, C., Trueba, G., **Bierque, E.**, Thibeaux, R., Davis, B. and De la Peña Moctezuma. (2019). "*Leptospira* and Leptospirosis". In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) *Global Water Pathogen Project*. <http://www.waterpathogens.org> (A. Pruden, N. Ashbolt and J. Miller (eds) Part 3 Bacteria) <http://www.waterpathogens.org/book/leptospira-and-leptospirosis> Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. doi:10.14321/waterpathogens.26

Bierque, E., Thibeaux, R., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.E., Goarant, C. (2020). "A systematic review of *Leptospira* in the hydrotelluric environment". *PLoS ONE*. 15(1) :e02227055. doi:10.1371/journal.pone.0227055

Bierque, E., Tramier, C., Genthon, P., Girault, D., Gunkel-Grillon, P., Juillot, F., Laporte-Magoni, C., Lemestre, M., Soupé-Gilbert, M.E., Thibeaux, R., Goarant, C. (2020). "ASSURPLUHYT (volet 1) Aspects sanitaires des eaux de surface : une approche pluridisciplinaire de la contamination hydrique par la leptospirose sur un site pilote à Touho". F. Cayrol et C. Tatin (editeurs), *Au fil de l'eau*, Nouméa 2019, Workshop des 17 et 18 septembre, p17-18, Presses universitaires de Nouvelle-Calédonie.

Thibeaux, R., Soupé-Gilbert, M.E., Kainiu, M., Girault, D., **Bierque, E.**, Fernandes, J., Bähre, H., Douyère, A., Eskenazi, N., Vinh, J., Picardeau, M., Goarant, C. (2020). "The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production". Npj biofilms. 6:24. doi:10.1038/s41522-020-0134-1

Bierque, E., Thibeaux, R., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.E., Guentas, L., Goarant, C. (2020). "*Leptospira interrogans* retains direct virulence after long starvation in water". Curr Microbiol. Online ahead of print. doi:10.1007/s00284-020-02128-7

BIBLIOGRAPHIE

- Adler, B., de la Peña Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Andre-Fontaine, G., 2004. Animal leptospirosis. *Bull. Epidemiol.* 12, 1–3.
- Andre-Fontaine, G., Aviat, F., Thorin, C., 2015. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. *Curr. Microbiol.* 71, 136–142. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0836-4>
- Azali, M.A., Yean Yean, C., Harun, A., Aminuddin Baki, N.N., Ismail, N., 2016. Molecular Characterization of *Leptospira* spp. in Environmental Samples from North-Eastern Malaysia Revealed a Pathogenic Strain, *Leptospira alstonii*. *J. Trop. Med.* 2016, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/2060241>
- Baker, M.F., Baker, H.J., 1970. Pathogenic *Leptospira* in Malaysian Surface Waters: I. A Method of Survey for *Leptospira* in Natural Waters and Soils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19, 485–492. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1970.19.485>
- Benacer, D., Woh, P.Y., Mohd Zain, S.N., Amran, F., Thong, K.L., 2013. Pathogenic and saprophytic *Leptospira* species in water and soils from selected urban sites in peninsular Malaysia. *Microbes Environ.* 28, 135–140. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me12154>
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M., Peru-United States Leptospirosis Consortium, 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3, 757–771. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00830-2)
- Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.-E., Thibeaux, R., Girault, D., Guentas, L., Goarant, C., 2020a. *Leptospira interrogans* Retains Direct Virulence After Long Starvation in Water. *Curr. Microbiol.* 77, 3035–3043. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02128-7>
- Bierque, E., Thibeaux, R., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.-E., Goarant, C., 2020b. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PloS One* 15, e0227055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055>
- Bonvallot, J., Gay, J.-C., Habert, E., 2012. Atlas de la Nouvelle-Calédonie. IRD Institut de recherche pour le développement; Congrès de la Nouvelle-Calédonie.
- Borowik, A., Wyszowska, J., 2016. Soil moisture as a factor affecting the microbiological and biochemical activity of soil. *Plant Soil Environ.* 62, 250–255. <https://doi.org/10.17221/158/2016-PSE>
- Bracken, F.K., 1955. Bovine Leptospirosis in the United States. *J. Dairy Sci.* 38, 821–822. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(55\)95045-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(55)95045-1)
- Brato, D.G., Mendoza, M.T., Cordero, C.P., 1988. Validation of the World Health Organization (WHO) criteria using the Microscopic Agglutination Test (MAT) as the Gold standard in the diagnosis of leptospirosis. *Phil J Microbiol Infect Dis* 125–128.
- Brenner, D.J., Kaufmann, A.F., Sulzer, K.R., Steigerwalt, A.G., Rogers, F.C., Weyant, R.S., 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 2, 839–858. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-839>

- Bulach, D.M., Zuerner, R.L., Wilson, P., Seemann, T., McGrath, A., Cullen, P.A., Davis, J., Johnson, M., Kuczek, E., Alt, D.P., Peterson-Burch, B., Coppel, R.L., Rood, J.I., Davies, J.K., Adler, B., 2006. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14560–14565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603979103>
- Casanovas-Massana, A., Pedra, G.G., Wunder, E.A., Diggle, P.J., Begon, M., Ko, A.I., 2018. Quantification of *Leptospira interrogans* Survival in Soil and Water Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e00507-18, /aem/84/13/e00507-18.atom. <https://doi.org/10.1128/AEM.00507-18>
- Chadsuthi, S., Modchang, C., Lenbury, Y., Iamsirithaworn, S., Triampo, W., 2012. Modeling seasonal leptospirosis transmission and its association with rainfall and temperature in Thailand using time-series and ARIMAX analyses. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5, 539–546. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60095-9](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60095-9)
- Coble, P.G., Del Castillo, C.E., Avril, B., 1998. Distribution and optical properties of CDOM in the Arabian Sea during the 1995 Southwest Monsoon. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 45, 2195–2223. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(98\)00068-X](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(98)00068-X)
- Cook, B.R., 1964. Leptospirosis in pigs: Vaccination to control perinatal deaths in piglets. *N. Z. Vet. J.* 12, 17–17. <https://doi.org/10.1080/00480169.1964.33535>
- Costa, F., Hagan, J.E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M.S., Stein, C., Abela-Ridder, B., Ko, A.I., 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
- Cox, T.E., Smythe, L.D., Leung, L.K.-P., 2005. FLYING FOXES AS CARRIERS OF PATHOGENIC LEPTOSPIRA SPECIES. *J. Wildl. Dis.* 41, 753–757. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.4.753>
- Cumberland, P., Everard, C.O., Levett, P.N., 1999. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 61, 731–4.
- DASS Nouvelle-Calédonie, 2016. Bilan de la surveillance de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie, Année 2015.
- Delafont, V., Bouchon, D., Héchard, Y., Moulin, L., 2016. Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network. *Water Res.* 100, 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.044>
- Desvars, A., Gigan, J., Hoarau, G., Gérardin, P., Favier, F., Michault, A., 2011. Short report: Seroprevalence of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) assessed by microscopic agglutination test on paper disc-absorbed whole blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 1097–1099. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0470>
- Diesch, S.L., McCulloch, W.F., 1966. Isolation of pathogenic leptospires from waters used for recreation. *Public Health Rep. Wash. DC* 81, 299–304.
- Edwards, C.N., Nicholson, G.D., Hassell, T.A., Everard, C.O., Callender, J., 1988. Penicillin therapy in icteric leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 388–390. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.39.388>
- Ellinghausen, H.C., Jr., McCullough, W.G., 1965. Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80. *Am J Vet Res* 26, 45–51.

Faine, 1999. *Leptospira* and Leptospirosis.

Faine, S., Stallman, N.D., 1982. Amended Descriptions of the Genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the Species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 461–463.
<https://doi.org/10.1099/00207713-32-4-461>

Fouché, O., Hirschauer, A., 2013. Hydrologie et niveaux d'eau dans le sol, in: *Théorie et Pratique de La Géotechnique*. p. pp.73-125.

Fouts, D.E., Matthias, M.A., Adhikarla, H., Adler, B., Amorim-Santos, L., Berg, D.E., Bulach, D., Buschiazzi, A., Chang, Y.-F., Galloway, R.L., Haake, D.A., Haft, D.H., Hartskeerl, R., Ko, A.I., Levett, P.N., Matsunaga, J., Mechaly, A.E., Monk, J.M., Nascimento, A.L.T., Nelson, K.E., Palsson, B., Peacock, S.J., Picardeau, M., Ricaldi, J.N., Thaipandungpanit, J., Wunder, E.A., Yang, X.F., Zhang, J.-J., Vinetz, J.M., 2016. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004403.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004403>

Fuh, Y.B., Shia, W.Y., Lee, W.M., Shyu, C.L., Wang, C.Y., Fei, C.Y., 2011. The use of commercial soil nucleic acid extraction kit and nested PCR for detection of *Leptospira* in farm environment after flooding in Taiwan. *Thai J. Vet. Med.* 493–498.

Goarant, C., 2016. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. *Res. Rep. Trop. Med.* 7, 49–62. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S102543>

Goarant, C., Laumond-Barny, S., Perez, J., Vernel-Pauillac, F., Chanteau, S., Guigon, A., 2009. Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 14, 926–929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02310.x>

Goldstein, R.E., 2010. Canine leptospirosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40, 1091–1101. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.008>

Gonsalez, C.R., Casseb, J., Monteiro, F.G., Paula-Neto, J.B., Fernandez, R.B., Silva, M.V., Camargo, E.D., Mairinque, J.M., Tavares, L.C., 1998. Use of doxycycline for leptospirosis after high-risk exposure in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 40, 59–61.
<https://doi.org/10.1590/s0036-46651998000100012>

Guillois, Y., Bourhy, P., Ayral, F., Pivette, M., Decors, A., Aranda Grau, J.H., Champenois, B., Malhère, C., Combes, B., Richomme, C., Le Guyader, M., King, L.A., Septfons, A., 2018. An outbreak of leptospirosis among kayakers in Brittany, North-West France, 2016. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 23.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.48.1700848>

Gulati, S., Gulati, A., 2012. Pulmonary manifestations of leptospirosis. *Lung India Off. Organ Indian Chest Soc.* 29, 347–353. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.102822>

Haake, D.A., 2006. Hamster model of leptospirosis. *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 12, Unit 12E.2. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc12e02s02>

Haake, D.A., Chao, G., Zuerner, R.L., Barnett, J.K., Barnett, D., Mazel, M., Matsunaga, J., Levett, P.N., Bolin, C.A., 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 68, 2276–2285.
<https://doi.org/10.1128/iai.68.4.2276-2285.2000>

Haake, D.A., Levett, P.N., 2015. Leptospirosis in humans. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387, 65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5

- Habus, J., Persic, Z., Spicic, S., Vince, S., Stritof, Z., Milas, Z., Cvetnic, Z., Perharic, M., Turk, N., 2017. New trends in human and animal leptospirosis in Croatia, 2009-2014. *Acta Trop.* 168, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.002>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hellstrom, J.S., Marshall, R.B., 1978. Survival of *Leptospira interrogans* serovar pomona in an acidic soil under simulated New Zealand field conditions. *Res. Vet. Sci.* 25, 29–33.
- Henry, R.A., Johnson, R.C., 1978. Distribution of the genus *Leptospira* in soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 492–499.
- Hookey, J.V., Bryden, J., Gatehouse, L., 1993. The use of 16S rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of *Leptospiraceae* and related spirochaetes. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2585–2590. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-11-2585>
- Inada, T., Ido, T., 1915. Isolation of the etiological agent of Weil's disease. 351–362.
- Johnson, R.C., Harris, V.G., 1967. Differentiation of pathogenic and saprophytic *Leptospirae*. I. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.* 94, 27–31.
- Kim, J.S., 1987. Leptospirosis: a newly identified disease in Korea. *Asia. Pac. J. Public Health* 1, 61–68. <https://doi.org/10.1177/101053958700100115>
- Kmety, E., Dikken, H., 1993. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. Groningen, the Netherlands : University Press Groningen.
- Ko, A.I., Galvão Reis, M., Ribeiro Dourado, C.M., Johnson, W.D., Riley, L.W., 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet Lond. Engl.* 354, 820–825. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)80012-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)80012-9)
- Ko, A.I., Goarant, C., Picardeau, M., 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 736–747. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>
- Lall, C., Vinod Kumar, K., Raj, R.V., Vedhagiri, K., Sunish, I.P., Vijayachari, P., 2018. Correlation Between Physicochemical Properties of Soil and Presence of *Leptospira*. *EcoHealth* 15, 670–675. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1346-1>
- Latham, M., Quantin, P., Aubert, G., 1978. Etude des sols de la Nouvelle-Calédonie : nouvel essai sur la classification, la caractérisation, la pédogenèse et les aptitudes des sols de Nouvelle-Calédonie : carte pédologique de la Nouvelle-Calédonie à 1/1 000 000 : carte d'aptitudes culturale et forestière des sols de Nouvelle-Calédonie à 1/1 000 000, Notice Explicative. ORSTOM, Paris.
- Lau, C.L., Smythe, L.D., Craig, S.B., Weinstein, P., 2010. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104, 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.07.002>
- Letocart, M., Boerlin, P., Boerlin-Petzold, F., Goudet, J., Baranton, G., Perolat, P., 1999. Genetic structure of the genus *Leptospira* by multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49, 231–238. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-231>
- Levett, P.N., 2003. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 36, 447–452. <https://doi.org/10.1086/346208>

- Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296–326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Levett, P.N., Morey, R.E., Galloway, R.L., Turner, D.E., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W., 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J. Med. Microbiol.* 54, 45–49. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45860-0>
- Lüdemann, H., Liesack, W., Arth, I., 2000. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Appl Environ Microbiol* 754–762.
- Marcisisin, R.A., Bartpho, T., Bulach, D.M., Srikram, A., Sermswan, R.W., Adler, B., Murray, G.L., 2013. Use of a high-throughput screen to identify *Leptospira* mutants unable to colonize the carrier host or cause disease in the acute model of infection. *J. Med. Microbiol.* 62, 1601–1608. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.058586-0>
- Martins, M.G., Matos, K.T., da Silva, M.V., de Abreu, M.T., 1998. Ocular manifestations in the acute phase of leptospirosis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 6, 75–79. <https://doi.org/10.1076/ocii.6.2.75.4045>
- McBride, A.J.A., Athanazio, D.A., Reis, M.G., Ko, A.I., 2005. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 18, 376–386. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000178824.05715.2c>
- McClain, J.B., Ballou, W.R., Harrison, S.M., Steinweg, D.L., 1984. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann. Intern. Med.* 100, 696–698. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-100-5-696>
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., Rappuoli, R., 2005. The microbial pan-genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>
- Merien, F., Portnoi, D., Bourhy, P., Charavay, F., Berlioz-Arthaud, A., Baranton, G., 2005. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 249, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.011>
- Mohd Radi, M.F., Hashim, J.H., Jaafar, M.H., Hod, R., Ahmad, N., Mohammed Nawi, A., Baloch, G.M., Ismail, R., Farakhin Ayub, N.I., 2018. Leptospirosis Outbreak After the 2014 Major Flooding Event in Kelantan, Malaysia: A Spatial-Temporal Analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 98, 1281–1295. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0922>
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., Abu Kwaik, Y., 2005. Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 20–28. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.20-28.2005>
- Mouville, C., Benaroudj, N., 2020. Survival Tests for *Leptospira* spp. *Methods Mol Biol* 2134, 215–228.
- Munroe, J., 2006. Manuel de fertilité des sols, IPNI, 2006, 3e édition. ed.
- Murray, G.L., Morel, V., Cerqueira, G.M., Croda, J., Srikram, A., Henry, R., Ko, A.I., Dellagostin, O.A., Bulach, D.M., Sermswan, R.W., Adler, B., Picardeau, M., 2009a. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infect. Immun.* 77, 810–816. <https://doi.org/10.1128/IAI.01293-08>
- Murray, G.L., Morel, V., Cerqueira, G.M., Croda, J., Srikram, A., Henry, R., Ko, A.I., Dellagostin, O.A., Bulach, D.M., Sermswan, R.W., Adler, B., Picardeau, M., 2009b. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infect. Immun.* 77, 810–816. <https://doi.org/10.1128/IAI.01293-08>
- Nakamura, S., 2019. Proposal of the photo-responsive clade in the genus *Leptospira*.

- Nhan, T.-X., Bonnieux, E., Rovey, C., De Pina, J.-J., Musso, D., 2016. Fatal leptospirosis and chikungunya co-infection: Do not forget leptospirosis during chikungunya outbreaks. *IDCases* 5, 12–14. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2016.06.003>
- Okazaki, W., Ringen, L.M., 1957. Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira pomona*. *Am. J. Vet. Res.* 18, 219–223.
- Osburn, C.L., Handsel, L.T., Mikan, M.P., Paerl, H.W., Montgomery, M.T., 2012. Fluorescence Tracking of Dissolved and Particulate Organic Matter Quality in a River-Dominated Estuary. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8628–8636. <https://doi.org/10.1021/es3007723>
- Pagès, F., Larrieu, S., Simoes, J., Lenabat, P., Kurtkowiak, B., Guernier, V., Le Minter, G., Lagadec, E., Gomard, Y., Michault, A., Jaffar-Bandjee, M.C., Dellagi, K., Picardeau, M., Tortosa, P., Filleul, L., 2016. Investigation of a leptospirosis outbreak in triathlon participants, Réunion Island, 2013. *Epidemiol. Infect.* 144, 661–669. <https://doi.org/10.1017/S0950268815001740>
- Pakoa, J.G., Soupé-Gilbert, M.-E., Girault, D., Takau, D., Gaviga, J., Gourinat, A.-C., Tarantola, A., Goarant, C., 2018. High incidence of leptospirosis in an observational study of hospital outpatients in Vanuatu highlights the need for improved awareness and diagnostic capacities. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006564. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006564>
- Papa, A., Theoharidou, D., Antoniadis, A., 2009. Pulmonary involvement and leptospirosis, Greece. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 834–835. <https://doi.org/10.3201/eid1505.080270>
- Parker, J., Walker, M., 2011. Survival of a pathogenic *Leptospira* serovar in response to combined in vitro pH and temperature stresses. *Vet Microbiol* 152, 146–150.
- Parlanti, E., Wörz, K., Geoffroy, L., Lamotte, M., 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Org. Geochem.* 31, 1765–1781. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(00\)00124-8](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00124-8)
- Parsons, M., 1965. Electrocardiographic Changes in Leptospirosis. *Br. Med. J.* 2, 201–203. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5455.201>
- Perez, J., Brescia, F., Becam, J., Mauron, C., Goarant, C., 2011. Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in an area of hyper-endemicity in New Caledonia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1361. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001361>
- Picardeau, M., 2017. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 297–307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
- Picardeau, M., 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med. Mal. Infect.* 43, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
- Postic, D., Riquelme-Sertour, N., Merien, F., Perolat, P., Baranton, G., 2000. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res. Microbiol.* 151, 333–341. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(00\)00156-x](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(00)00156-x)
- Ramadass, P., Jarvis, B.D., Corner, R.J., Penny, D., Marshall, R.B., 1992. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 42, 215–219. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-215>
- Ristow, P., Bourhy, P., Kerneis, S., Schmitt, C., Prevost, M.C., Lilenbaum, W., Picardeau, M., 2008. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* 154,

Saito, M., Villanueva, S.Y.A.M., Chakraborty, A., Miyahara, S., Segawa, T., Asoh, T., Ozuru, R., Gloriani, N.G., Yanagihara, Y., Yoshida, S., 2013. Comparative Analysis of *Leptospira* Strains Isolated from Environmental Soil and Water in the Philippines and Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 601–609. <https://doi.org/10.1128/AEM.02728-12>

Schmid, G.P., Steere, A.C., Kornblatt, A.N., Kaufmann, A.F., Moss, C.W., Johnson, R.C., Hovind-Hougen, K., Brenner, D.J., 1986. Newly recognized *Leptospira* species (“*Leptospira inadai*” serovar lyme) isolated from human skin. *J. Clin. Microbiol.* 24, 484–486.

Schneider, A.G., Casanovas-Massana, A., Hacker, K.P., Wunder, E.A., Begon, M., Reis, M.G., Childs, J.E., Costa, F., Lindow, J.C., Ko, A.I., 2018. Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006415. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006415>

Schneider, M.C., Nájera, P., Aldighieri, S., Bacallao, J., Soto, A., Marquino, W., Altamirano, L., Saenz, C., Marin, J., Jimenez, E., Moynihan, M., Espinal, M., 2012. Leptospirosis outbreaks in Nicaragua: identifying critical areas and exploring drivers for evidence-based planning. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, 3883–3910. <https://doi.org/10.3390/ijerph9113883>

Schønning, M.H., Phelps, M.D., Warnasekara, J., Agampodi, S.B., Furu, P., 2019. A Case-Control Study of Environmental and Occupational Risks of Leptospirosis in Sri Lanka. *EcoHealth* 16, 534–543. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01448-w>

Segura, E.R., Ganoza, C.A., Campos, K., Ricaldi, J.N., Torres, S., Silva, H., Céspedes, M.J., Matthias, M.A., Swancutt, M.A., López Liñán, R., Gotuzzo, E., Guerra, H., Gilman, R.H., Vinetz, J.M., Peru-United States Leptospirosis Consortium, 2005. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 40, 343–351. <https://doi.org/10.1086/427110>

Seguro, A.C., Andrade, L., 2013. Pathophysiology of leptospirosis. *Shock Augusta Ga* 39 Suppl 1, 17–23. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31828fae49>

Sehgal, S.C., Sugunan, A.P., Murhekar, M.V., Sharma, S., Vijayachari, P., 2000. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *Int. J. Antimicrob. Agents* 13, 249–255. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(99\)00134-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(99)00134-x)

Sejvar, J., Tangkanakul, W., Ratanasang, P., Dowell, S.F., Sangjun, N., Bragg, S., Ashford, D., Tappero, J., 2005. An outbreak of leptospirosis, Thailand--the importance of the laboratory. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 36, 289–295.

Signorini, M.L., Lottersberger, J., Tarabla, H.D., Vanasco, N.B., 2013. Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: a meta-analysis of the published literature. *Epidemiol. Infect.* 141, 22–32. <https://doi.org/10.1017/S0950268812001951>

Slack, A.T., Khairani-Bejo, S., Symonds, M.L., Dohnt, M.F., Galloway, R.L., Steigerwalt, A.G., Bahaman, A.R., Craig, S., Harrower, B.J., Smythe, L.D., 2009. *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 705–708. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.002766-0>

Smith, C.E., Turner, L.H., 1961. The effect of pH on the survival of leptospires in water. *Bull. World Health Organ.* 24, 35–43.

Smith, D.J.W., Self, H.R.M., 1955. Observations on the Survival of *Leptospira Australis* A in Soil and Water. *Epidemiol. Infect.* 53, 436–444. <https://doi.org/10.1017/S0022172400000942>

- Smythe, L.D., Smith, I.L., Smith, G.A., Dohnt, M.F., Symonds, M.L., Barnett, L.J., McKay, D.B., 2002. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infect. Dis. 2, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-2-13>
- Stamm, L.V., Charon, N.W., 1988. Sensitivity of pathogenic and free-living *Leptospira* spp. to UV radiation and mitomycin C. Appl. Environ. Microbiol. 54, 728–33.
- Stoddard, R.A., 2013. Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. Through Real-Time PCR (qPCR) Targeting the LipL32 Gene. Methods Mol Biol 943, 257–66. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_17
- Takafuji, E.T., Kirkpatrick, J.W., Miller, R.N., Karwacki, J.J., Kelley, P.W., Gray, M.R., McNeill, K.M., Timboe, H.L., Kane, R.E., Sanchez, J.L., 1984. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. N. Engl. J. Med. 310, 497–500. <https://doi.org/10.1056/NEJM198402233100805>
- Tansuphasiri, U., Thipsuk, C., Phulsuksombati, D., Chanyasanha, C., 2006. Duplex PCR-hybridization based detection of pathogenic *Leptospira* in environmental water samples obtained from endemic areas in northeast region of Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 37, 729–741.
- Thibeaux, R., Geroult, S., Benezech, C., Chabaud, S., Soupé-Gilbert, M.-E., Girault, D., Bierque, E., Goarant, C., 2017. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. PLoS Negl. Trop. Dis. 11, e0005414. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005414>
- Thibeaux, R., Girault, D., Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.-E., Rettinger, A., Douyère, A., Meyer, M., Iraola, G., Picardeau, M., Goarant, C., 2018a. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. Front. Microbiol. 9, 816. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816>
- Thibeaux, R., Iraola, G., Ferrés, I., Bierque, E., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.-E., Picardeau, M., Goarant, C., 2018b. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. Microb. Genomics 4. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144>
- Thibeaux, R., Soupé-Gilbert, M.-E., Kainiu, M., Girault, D., Bierque, E., Fernandes, J., Bähre, H., Douyère, A., Eskenazi, N., Vinh, J., Picardeau, M., Goarant, C., 2020. The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. Npj Biofilms Microbiomes 6, 24. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0134-1>
- Togami, E., Kama, M., Goarant, C., Craig, S.B., Lau, C., Ritter, J.M., Imrie, A., Ko, A.I., Nilles, E.J., 2018. A Large Leptospirosis Outbreak following Successive Severe Floods in Fiji, 2012. Am. J. Trop. Med. Hyg. 99, 849–851. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0335>
- Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P., Haake, D., 2004. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. Int. J. Microbiol. 7, 35–40.
- Verma, A., Stevenson, B., Adler, B., 2013. Leptospirosis in horses. Vet. Microbiol. 167, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.012>
- Viau, E.J., Boehm, A.B., 2011. Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawai'ian coastal streams. J. Water Health 9, 637–646. <https://doi.org/10.2166/wh.2011.064>
- Villanueva, S., Baterna, R., Cavinta, L.L., Yanagihara, Y., Gloriani, N., Yoshida, S., -i, 2018. Seroprevalence of leptospirosis among water buffaloes, pigs, and dogs in selected areas in the Philippines, 2007 to 2008. Acta Med. Philipp. 122

- Vincent, A.T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V.K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Mohd Khalid, M.K.N., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Amara Korba, A., Bourhy, P., Veyrier, F.J., Picardeau, M., 2019. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
- Vinod Kumar, K., Lall, C., Vimal Raj, R., Vedhagiri, K., Vijayachari, P., 2015. Co-existence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. *FEMS Microbiol Ecol* 91, pii:fiv051. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv051>
- Warnasekara, J.N., Agampodi, S., 2017. Leptospirosis in Sri Lanka. *Sri Lankan J. Infect. Dis.* 7, 67. <https://doi.org/10.4038/sljid.v7i2.8155>
- Watt, G., Padre, L.P., Tuazon, M.L., Calubaquib, C., Santiago, E., Ranoa, C.P., Laughlin, L.W., 1988. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet Lond. Engl.* 1, 433–435. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)91230-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)91230-5)
- Wilson, R., Fujioka, R., 1995. Development of a method to selectively isolate pathogenic *Leptospira* from environmental samples. *Water Sci. Technol.* 31. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00280-Z](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00280-Z)
- Wolbach, S.B., Binger, C.A., 1914. Notes on a filterable Spirochete from fresh Water. *Spirocheta biflexa* (new Species). *J. Med. Res.* 30, 23-26.1.
- Wolf, D.C., Dao, T.H., Scott, H.D., Lavy, T.L., 1989. Influence of Sterilization Methods on Selected Soil Microbiological, Physical, and Chemical Properties. *J. Environ. Qual.* 18, 39–44. <https://doi.org/10.2134/jeq1989.00472425001800010007x>
- Yasuda, P.H., Steigerwalt, A.G., Sulzer, K.R., Kaufmann, A.F., Rogers, F., Brenner, D.J., 1987. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family *Leptospiraceae* with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 407–415. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-407>

ANNEXES

Annexe I

Thibeaux, R., Iraola, G., Ferrés, I., Bierque, E., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.-E., Picardeau, M., Goarant, C., 2018b. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb. Genomics* 4. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144>

Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence

Roman Thibeaux,^{1†} Gregorio Iraola,^{2†} Ignacio Ferrès,² ¹ Dominique Girault,¹
Marie-Estelle Soupé-Gilbert,¹ Mathieu Picardeau^{3,*†} and Cyrille Goarant^{1,*†}

Abstract

Despite recent advances in our understanding of the genomics of members of the genus *Leptospira*, little is known on how virulence has emerged in this heterogeneous bacterial genus as well as on the lifestyle of pathogenic members of the genus *Leptospira* outside animal hosts. Here, we isolated 12 novel species of the genus *Leptospira* from tropical soils, significantly increasing the number of known species to 35 and finding evidence of highly unexplored biodiversity in the genus. Extended comparative phylogenomics and pan-genome analyses at the genus level by incorporating 26 novel genomes, revealed that, the traditional leptospiral 'pathogens' cluster, as defined by their phylogenetic position, can be split in two groups with distinct virulence potential and accessory gene patterns. These genomic distinctions are strongly linked to the ability to cause or not severe infections in animal models and humans. Our results not only provide new insights into virulence evolution in the members of the genus *Leptospira*, but also lay the foundations for refining the classification of the pathogenic species.

DATA SUMMARY

1. *Leptospira* isolates are described in Table S1 (available in the online version of this article) and locations of isolation are shown on Fig. S1.
2. Genomes have been deposited in GenBank; accession numbers are given in Table S2.
3. Overall genomic relatedness indices are presented in Tables S3 (ANI) and S4 (AAI).
4. The protein domain abundance matrix is shown in Table S6 (xls file).

INTRODUCTION

Pathogenic species of the genus *Leptospira* cause leptospirosis, an emerging zoonosis worldwide with high prevalence in tropical low-income countries. Leptospirosis affects 1 million and kills 60 000 people annually, but remains poorly documented and often underestimated [1]. The

burden of leptospirosis and its economic cost are significant and similar to that of other important neglected tropical diseases, including schistosomiasis, leishmaniasis and lymphatic filariasis [2]. Pathogenic leptospires are maintained in the renal tubules of asymptomatic reservoir animals, frequently rodents, and are excreted through the urine, contaminating the environment, where they can survive for months. Environment-mediated contamination is considered to be the major source of transmission to humans. Other animals, including livestock and companion animals, can also get infected and develop leptospirosis.

The genus *Leptospira* (phylum Spirochetes) is highly heterogeneous and genetically distinct from other bacteria, being currently divided into 22 species and more than 300 serovars. Phylogenetic analysis, initially based on the 16S rRNA gene but later on whole-genome sequences, showed that the genus is separated into three monophyletic clusters named 'saprophytes', 'intermediates' and 'pathogens'. The 'saprophytes' are environmental species which are rapidly cleared

Received 18 September 2017; Accepted 27 November 2017

Author affiliations: ¹Institut Pasteur in New Caledonia, Institut Pasteur International Network, Leptospirosis Research and Expertise Unit, Noumea, New Caledonia; ²Institut Pasteur Montevideo, Bioinformatics Unit, Uruguay; ³Institut Pasteur, Unité de Biologie des Spirochètes, 28 rue du docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

*Correspondence: Mathieu Picardeau, mathieu.picardeau@pasteur.fr; Cyrille Goarant, cgoarant@pasteur.nc

Keywords: *Leptospira*; genomics; evolution; virulence; ecology.

Abbreviations: AAI, average amino acid identity; ANI, average nucleotide identity; COG, clusters of ortholog groups; DAPC, discriminant analysis of principal components; EMJH, Ellinghausen McCullough Johnson Harris culture medium; OGRI, overall genomic relatedness indices; SD, standard deviation.

†These authors contributed equally to this work

Data statement: All supporting data, code and protocols have been provided within the article or through supplementary data files. Five supplementary figures and six supplementary tables are available with the online version of this article.

author and source are credited.

in animal models, and are non-pathogenic to humans and other animals. The 'intermediates' have been recently described in both humans and animals, but infection of the classical animal models for acute leptospirosis with these species cannot reproduce the disease. Life-threatening species like *Leptospira interrogans*, which is the dominant pathogenic species worldwide, are classified within the 'pathogens' cluster and can infect every mammal. Conversely, *Leptospira kmetyi* belongs to the 'pathogens' cluster but has been isolated only from soil and never recovered from animals [3], calling the ecological coherence of the current classification into question.

The molecular bases of leptospiral pathogenicity, virulence and persistence remain at the onset of understanding, mainly because pathogenic species are fastidious and not prone to genetic manipulations, hampering the experimental discovery and validation of virulence determinants [4]. Alternatively, comparative genomics has uncovered key aspects of genomic adaptations to virulence [5, 6] but relevant questions still remain to be answered, fundamentally about the mechanisms that led the leptospiral ancestor to evolve from a saprophytic lifestyle into mammal-adapted pathogens. Consequently, a systematic evaluation of the relationship between genomic traits' evolution and virulence potential requires to be established [7].

In this work we reveal a significant amount of unexplored taxonomic diversity within the genus *Leptospira* by isolating 12 novel species from soils in areas of endemic leptospirosis. Using comparative phylogenetics, pan-genome analyses and in vivo models of infection we demonstrate that the 'pathogens' cluster is heterogeneous, being composed of both virulent and low-virulence strains with remarkable genomic distinctions. Our results provide new insights into virulence evolution in the genus *Leptospira* and indicate that the current classification of leptospiral species should be revised.

METHODS

Ethics statement, patient contact and authorization for interview

Institut Pasteur in New Caledonia has been the country reference and only laboratory for the biological diagnosis of human leptospirosis from 1980 to 2016. The patients were identified by a positive diagnostic quantitative PCR and notified to the New Caledonian Health Authority, which also investigates cases through interviews. Oral consent was requested by the Health Authority to meet with the patient, visit and collect environmental samples in the suspected infection sites. The detailed procedure has been described previously [8].

Study sites

Six sites were chosen based on the good acceptance of the project by the patients and custom chiefdom [Konè, Touho (two sites), Ponerihouen (two sites) and Yatè]. All sites were within Melanesian tribal areas and three (Konè and two

IMPACT STATEMENT

Water-associated exposures are the main risk factors for leptospirosis, a complex disease with a multitude of infecting serovars, a broad reservoir host range, non-specific clinical manifestations and difficult diagnosis. To assess the diversity of environmental members of the genus *Leptospira*, we isolated and sequenced members of the genus *Leptospira* from hot spots of leptospirosis. General analysis of these genomes provided unprecedented insight into the diversity of the genus *Leptospira*. We described a total of 12 novel species, including species belonging to the cluster of potentially infectious leptospires. Surprisingly, novel species from the pathogenic cluster failed to produce an infection in animal models. A detailed analysis of accessory genomes revealed clear differences within this pathogen cluster between virulent species and others failing to cause infection. This sheds new light into the evolution and acquisition of virulence in this highly heterogeneous genus.

sites in Touho) were also included in a previous study [8]. These sites are indicated on Fig. S1 together with the 30 year average temperatures (minima and maxima) and rainfall of the closest meteorological stations (retrieved from the Météo France free online public database).

Collection and processing of environmental samples on site

Leptospira collection permits were obtained from the North (# 60912-2002-2017/JJC) and South (Arrêté 1689-2017/ARR/DENV) Provinces of New Caledonia. Environmental investigations were started a few weeks after the presumed human infection dates and after recovery of the patients, between March and June 2016. The soils selected to attempt culture of members of the genus *Leptospira* and isolation were chosen following discussions on site with the patients, based on environmental exposure of the patient on the day of probable contamination. The samples mostly included river soils, but also moist soils at a distance from any waterway if suggested by patient interviews (muddy walking tracks, agricultural soils). Most samples from the study sites were collected less than 20 meters one from one another; 27 soil samples were used to isolate members of the genus *Leptospira*. Samples were collected and processed on site as follows: approximately 5g topsoil was collected from riverbanks (from 10 cm below to 1 m above water level), walking track or culture fields from a core sample (3 cm large by 5–7 cm height). Each soil sample was placed into a 15 ml sterile Falcon tube within 2 h of collection and vigorously shaken with 5–10 ml sterile water. The soil particles were allowed to settle for 5–15 min and 2 ml of supernatant were filtered through a sterile 0.45 µm filter into a tube filled with 2.5 ml of 2× EMJH medium. Alternatively, the process was repeated the next day at the laboratory, leaving more

time for particles to settle, then culturing without filtration. Finally, we added 500 µl of 10× concentrated STAFF, a combination of selective agents for isolation of members of the genus *Leptospira* made of sulfamethoxazole, trimethoprim, amphotericin B, fosfomycin, and 5-fluorouracil [9]. Culture tubes from the field were transported within 12 h at ambient temperature to the laboratory, where they were put in an incubator at 30°C. Alternatively, they were directly

placed in the incubators when prepared in the laboratory.

Leptospira isolation

Cultures were checked daily by dark-field microscopy for the growth of spirochetes. When contaminants were observed, the culture tubes were subcultured with STAFF after filtration through a 0.45 µm membrane filter. When spirochetes were observed, a 50 µl and a 200 µl volume of the culture at various dilutions was plated onto EMJH agar and incubated at 30°C until individual subsurface colonies were visible. Most of individual colonies started to appear after 3 days of incubation, and at day 10 all plates were positive with 10 to 100 colonies of members of the genus *Leptospira*. One to five characteristic subsurface individual colonies were collected from each plate for confirmation of a morphology typical of members of the genus *Leptospira* by dark field microscopy before clonal subculture in liquid EMJH (Table S1).

Whole-genome sequencing

Genomic DNA was prepared by collection of cells by centrifugation from an exponential-phase culture and extraction with a MagNA Pure 96 Instrument (Roche). Next-generation sequencing was performed by the Mutualized Platform for Microbiology (P2M) at Institut Pasteur, using the Nextera XT DNA Library Preparation kit (Illumina), the NextSeq 500 sequencing system (Illumina) and the CLC Genomics Workbench 9 software (Qiagen) for analysis. The quality of the initial assemblies was improved with SPAdes [10] and a post-assembly improvement pipeline [11], the resulting draft genomes were automatically annotated with Prokka [12]. Draft genomes were submitted to Genbank, accession numbers are available in Table S2.

Taxonogenomics, pan-genome and phylogenetic analyses

A comprehensive set of draft and closed genomes that represents the currently described leptospiral species was retrieved from the PATRIC database [13]. Most of these genomes have been previously used to study the genomic evolution of the genus *Leptospira* [5]. The final dataset was composed of available genomes (n=22, because whole genome sequences for *Leptospira idonii* were not publicly available, but including the reference genome of *Leptospira venezuelensis* sp. nov. currently under description by members of our group [14]) and those sequenced in this study (n=26).

To determine the relationship of each sequenced genome to previously described or novel leptospiral species, we calculated two Overall Genetic Relatedness Indices (OGRIs): the

Average Nucleotide Identity (ANI) and the Average Amino acid Identity (AAI). Both indices were automatically calculated using two-way BLAST + blastn and blastp [15] comparisons as previously implemented [16], using the Taxxo R package (<https://github.com/giraola/taxxo>).

To build a standard phylogeny the 16S rRNA gene sequences were extracted from whole genomes (the genome of *Lept-*

tonema illini DSM 21528 was included as an outgroup)

using BLAST + blastn against the 16S ribosomal RNA sequence database at the NCBI. Sequences were aligned with MAFFT [17] and phylogenetic reconstruction was performed with FastTree v.2.1 [18] using the GTR substitution model and 1000 replicates to calculate bootstrap values.

To build a genome-wide high-resolution phylogeny of the whole genus *Leptospira* and using the *Leptonema illini* DSM 21528^T genome as the outgroup (n=49), a set of highly conserved core genes (present in at least 95 % of the genomes) was identified by comparing each genome against the eggNOG v3.0 database [19] specifically customized for the phylum Spirochaetes (spiNOG) using HMMER v3.1b2 [20]. A set of 671 genes were identified, concatenated and aligned with MAFFT [17] (total alignment length was 778 190 bp). Phylogenetic reconstruction was performed as described above. Pairwise patristic distances were calculated from the resulting tree using the APE package [21].

Comparative pan-genome analyses were performed over the set of genomes belonging to the 'intermediates' (n=15) and 'pathogens' (n=17) clusters. The pan-genome was reconstructed using an in-house pipeline (available at <https://github.com/iferres/pewit>). Briefly, for every genome, each annotated gene was scanned against the Pfam database [22] using HMMER3 v3.1b2 hmmsearch [20] and its domain architecture was recorded (presence and order). A primary set of orthologous clusters was generated by grouping genes sharing exactly the same domain architecture. Then, remaining genes without hits against the Pfam database were compared with each other at protein level using HMMER3 v3.1b2 phmmer and clustered using the MCL algorithm [23]. These coarse clusters were then split using a tree-pruning algorithm which allows discrimination between orthologous and paralogous genes. Functional category assignments to each orthologous cluster were performed with BLAST + blastp against the Clusters of Ortholog Groups (COGs) database [24]. The Jaccard distance over accessory gene patterns was calculated with the package ade4 [25]. Cluster-defining accessory genes were identified with K-pax2 [26] by running its Bayesian clustering method over the pan-genome matrix with default parameters. Paralogous genes were defined as those orthologous clusters with more than one gene copy in at least one genome and the Bray-Curtis distance was calculated with the package Vegan [27]. Protein domains were extracted by comparing each genome annotation against the Pfam database [23] using HMMER3 v3.1b2 hmmsearch [20]. A domain abundance matrix was created by recording the number of occurrences of each domain in each genome and this was used to

perform a Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) as implemented in package *adeget* [28]. To identify genes contributing highly to the observed clustering we used the PCA loadings and adjusted them to a normal distribution. Then those genes with loadings departing more than two standard deviations (SD) from the mean were selected. Bray–Curtis distances from the abundance patterns of selected genes were calculated as explained above. Tests of proportions and Mann–Witney U were calculated in R [29].

Virulence of novel species

To evaluate if isolates of the novel pathogenic and intermediate species were virulent, 7–8-week-old golden Syrian hamsters (males and females) and 8-week-old Oncins-France 1 (OF-1, outbred) mice (males and females) whose progenitors originate from Charles River Laboratories, were infected by intraperitoneal injection of 2×10^8 leptospirae in pure culture. Similar infections were performed with hamsters and mice, which were similarly infected with *Leptospira interrogans* serovar Manilae strain L495 (2×10^6 per animal) and *Leptospira borgpetersenii* serogroup Ballum strain B3-13S (2×10^8 per animal). Hamsters were euthanized by carbon dioxide inhalation 4.5 days after infection and the blood collected from heart puncture was cultured in EMJH. The urine of mice was collected 7–8 days after infection, DNA was extracted and analyzed by a real-time PCR targeting the conserved regions of the 16S rRNA gene *rrs* [30]. After two weeks, mice were euthanized by carbon dioxide inhalation. One kidney was collected and its DNA extracted and analyzed using the same PCR. All experiments were replicated twice on different days and using independent bacterial cultures. Animal experiments were conducted according to the guidelines of the Animal Care and Use Committees of the Institut Pasteur of Paris and of New Caledonia, and followed European Recommendation 2007/526/EC. Protocols and experiments were approved by the Animal Care and Use Committees of the Institut Pasteur in New Caledonia.

RESULTS

Culture isolation, identification and phylogenetic position of novel species

Using a previously described [9] combination of selective agents that facilitates the isolation of leptospirae from complex environmental samples, we isolated 26 strains of members of the genus *Leptospira* from tropical soils from six sites in New Caledonia, where the disease is endemic (Fig. S1 and Table S1).

Whole-genome sequences of all 26 isolates were determined (genome statistics are presented in Table S2). To assign the novel species to the traditional leptospiral phylogenetic clusters we built a full-length 16S rRNA gene phylogeny (Fig. S2). By comparing the identity of full-length 16S rRNA gene sequences, we could assign a few isolates to previously described leptospiral species (100 % nucleotide identity). However, the remaining isolates had unique sequences,

suggesting the presence of unknown species. We calculated both the average nucleotide identity (ANI) and the average amino acid identity (AAI) of the 26 isolates against each other and to the 22 previously described species of the genus *Leptospira* (see Methods and Tables S3 and S4). Fig. 1a shows the relationship between genomes according to the standard ANI and/or AAI threshold $>95 \pm 1$ %. This analysis confirmed the presence of 12 novel species of the genus *Leptospira*, thus extending by 55 % the number of species within this genus.

As 16S rRNA gene sequence conservation prevents precise separation of some well-defined species of the genus *Leptospira* [5], we then built a high-resolution phylogenetic tree based on the concatenated coding sequences of 671 leptospiral core genes (also occurring in *Leptonema illini*) (see Methods). This phylogeny not only reproduced the typical topology with the three main clusters designated as pathogens, intermediates and saprophytes but also confirmed the position of the 12 novel species as separate branches (Fig. 1b). Three of them were classified with the pathogens (later designated sp. nov. patho 1–3), five novel species were identified as intermediates (later designated sp. nov. inter 1–5) and four novel species were assigned to the saprophytes (later designated sp. nov. sapro 1–4). Interestingly, the three novel species assigned to the pathogens presented a basal position with respect to the previously identified species within this group and were closer to the tree root (Fig. S3).

Accessory gene patterns recapitulate virulence potential

The description of novel species assigned to both pathogens and intermediates prompted us to evaluate their relative virulence using animal models. Infection with virulent strains is associated with systemic infection with bacteremia and usually with severe acute disease in susceptible animals such as hamsters [31], and with an asymptomatic infection leading to renal colonization and urinary shedding in mice and rats [32]. Fig. 2a shows the infection profiles of one representative isolate per novel species identified as a member of the pathogens and intermediates, in comparison with the virulent references *Leptospira interrogans* strain L495 and *Leptospira borgpetersenii* strain B3-13S. The hamsters infected with these virulent strains showed signs of acute infection 3–4 days after infection (decreased activity, anorexia, ruffled fur and jaundice visible at the oral mucosa and skin levels) and renal colonization was evidenced in mice one and two weeks after infection. In contrast, hamsters infected with the novel species displayed no alteration in behavior, aspect or appetite and no culture was obtained from their blood and no leptospiral DNA was detected in the urine or the kidney of mice infected with the same strains. These results indicate the inability of these novel species to establish acute infection or renal colonization in these animal models. This is in marked contrast to the behavior of virulent pathogens like *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*, suggesting the hereinafter

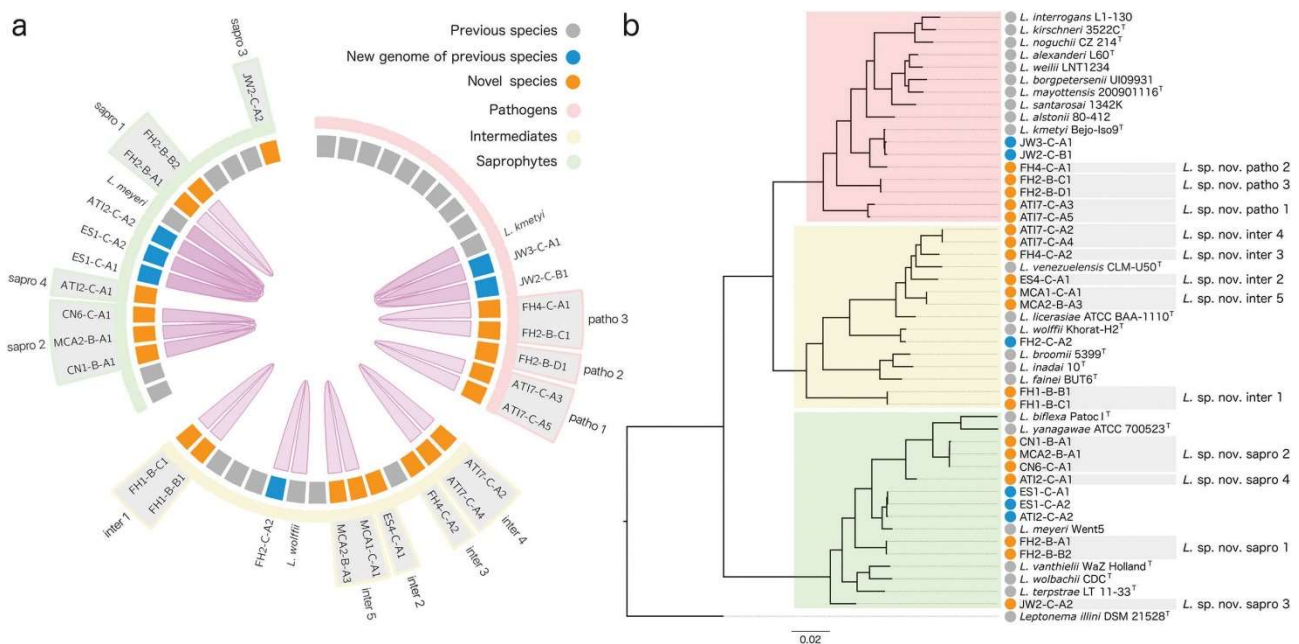


Fig. 1. Phylogenetic position of the novel species. (a) Circos diagram showing the relationships between leptospiral genomes based on overall genomic relatedness indices (OGRIs). The inner violet ribbons connect pairs of genomes if they share >95 % average nucleotide identity (ANI) and average amino acid identity (AAI). Blocks represent each genome coloured as explained below. The outer highlights show the leptospiral clades. (b) Maximum-likelihood phylogeny for the genus *Leptospira* based on the core genome alignment. The tree is rooted with *Leptonema illini* DSM 21528^T. The three classic leptospiral clades historically associated with differential pathogenicity are highlighted in red ('pathogens'), yellow ('intermediates') and green ('saprophytes'). Coloured circles at species labels indicate a public genome from a previously described species (grey), a genome sequenced in this study assigned to a previously described species (blue) or a genome sequenced in this study from a novel species (orange).

denomination of these novel species as 'low-virulence pathogens'.

These results led us to conduct a detailed comparative analysis of the accessory genomes of virulent pathogens, low-virulence pathogens and intermediates. We first noted that after adding the genomes from novel species belonging to these groups the pan-genome remained open (Fig. S4), revealing the divergent and highly diverse attributes of the members of the genus *Leptospira*. Then, a comparison of accessory gene patterns using the Jaccard distance showed a clear separation of intermediates from virulent and low-virulence pathogens (Fig. 2b). More interestingly, the accessory gene patterns were informative enough to discriminate two clusters that correlate with the subdivision of pathogens into virulent pathogens and low-virulence pathogens, in agreement with the virulence experiments. It is worth mentioning that *Leptospira kmetyi* belongs to the accessory genome cluster containing the low-virulence pathogens, which is also coherent with the unknown virulence potential of this species whose isolation has been only reported from soils. Hence, this analysis revealed clear genomic distinctions in the accessory genome of virulent and low-virulence pathogens that are not evident from the core genome phylogeny, which shows that low-virulence pathogens are a paraphyletic group (Fig. 2b).

Genomic features associated with leptospiral virulence

To provide a functional overview of the evolutionary adaptations associated with leptospiral virulence, we identified the genes that are associated with virulent or low-virulence pathogens. First, we used a Bayesian probabilistic framework [26] to detect those accessory genes with high discriminatory power for the three virulence groups (virulent pathogens, low-virulence pathogens and intermediates). Fig. 3a shows the number of discriminatory genes for each group ($n=409$), representing approximately 1.5 % of the accessory genes occurring in intermediates, low-virulence and virulent pathogens. Among these, 18 genes were found to distinguish virulent pathogens from both low-virulence pathogens and from intermediates (Table S5). Fig. 3b shows that using the presence/absence patterns of this small subset of genes completely recapitulates the three virulence groups, showing that very specific accessory genes can explain the evolution of virulence in the genus *Leptospira*. To gain insight into the biological functions related to this discrimination, we assigned COG [24] annotations to detect any functional enrichment. Fig. 3c shows that many functional categories are differentially represented in the accessory gene subsets defining each virulence group. Virulent pathogens are mainly distinguished from others by a significantly

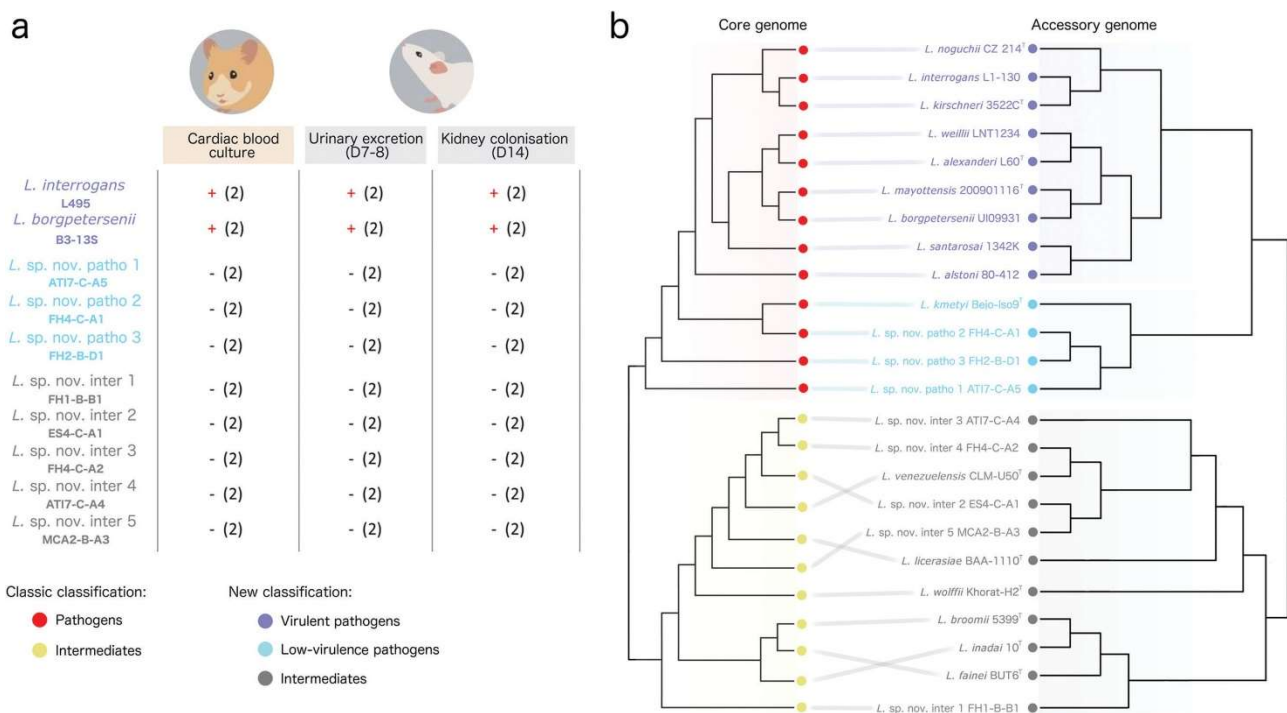


Fig. 2. Virulence in animal models and accessory genome topology. (a) Virulence of novel species in experimental challenge infections ($n=2$ for each strain and animal model). Only the pathogenic strains *Leptospira interrogans* L495 and *Leptospira borgpetersenii* B3-13S were recovered from hamster cardiac blood or evidenced from mouse urine and kidney. (b) Tanglegram comparing the topology of the core genome phylogeny (left) and the topology obtained by clustering the genomes using Jaccard distance calculated over the accessory gene patterns (right). On the left, genomes are coloured according to the classic phylogenetic classification (only pathogens and intermediates are shown here). On the right, genomes are coloured according to the new classification based on accessory gene patterns.

higher number of genes related to cell wall/membrane biogenesis (M), cell motility and chemotaxis (N), both known or suspected to be involved in virulence [33, 34], post-translational modification (O), also suspected to be involved in virulence [5, 35], as well as a lower number of genes related to amino acid metabolism and transport (E) and transcription (K). These differences reflect functional distinctions that are specific to virulent pathogens in comparison with both low-virulence pathogens and intermediates.

To have a more complete description of group-specific molecular functions associated with virulence, and considering the observed bias in COG annotations where a substantial proportion (44 %) of genes is not assigned to any known function, we analyzed the abundance patterns of protein domains by comparing each genome against the Pfam database [22]. Fig. 4a shows a Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) [28] that completely discriminates the three virulence groups using protein domain patterns. Furthermore, when considering only those domains that are highly informative for generating the observed clustering (see Methods), we were able to reproduce the three virulence groups using a different clustering analysis based on the Bray-Curtis distance (Fig. 4b).

Interestingly, we noticed a group of six domains whose abundance was high in virulent pathogens while almost null in low-virulence pathogens and intermediates. Most of these domains belong to repeated elements such as mobile elements (DDE endonuclease superfamily) and proteins of paralogous families (Beta-propeller repeat- and leucine-rich repeat-containing proteins). This indicates that virulent pathogens can be distinguished by increased repeat sequence elements in comparison with the low-virulence pathogens and intermediates, suggesting a functional link to virulence. Other Pfam domains allowing this discrimination are presented in Table S6.

Given the importance of repeat sequence elements in ecological adaptation of organisms by shaping their genomes [36], an analysis focused on the abundance of paralogous genes in the accessory genomes was performed. First, we evidenced that patristic distances obtained from the core genome phylogeny were highly correlated with Bray-Curtis distances calculated from the abundance of paralogous genes (Fig. 5a), indicating that phylogenetically closer species share more similar paralogy patterns. Also, when observing just the abundance distributions of paralogous genes in each virulence group we detected a significantly

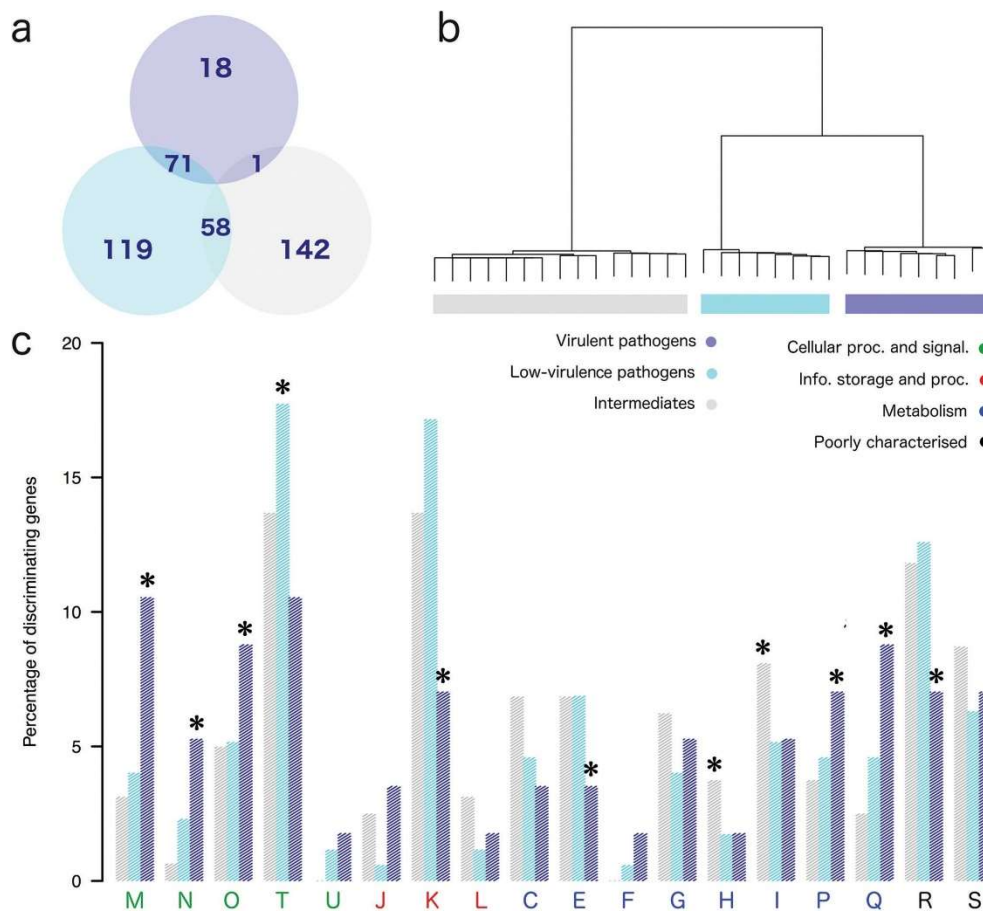


Fig. 3. Functional analysis of discriminating accessory genes. (a) Venn diagram showing the Bayesian identification of cluster-defining accessory genes from the pan-genome. (b) Clustering analysis based on Jaccard distances calculated from the presence/absence vectors of cluster-defining genes. (c) Barplots showing the percentage of cluster-defining genes assigned to each COG functional category in each cluster. Statistical significance ($P < 0.001$, test of proportions) is indicated with asterisks.

higher incidence of paralogy in virulent pathogens in comparison with low-virulence pathogens and intermediates ($P < 0.001$, Mann–Whitney U test) (Fig. 5b). The same trend was observed in Fig. 5c, where Bray–Curtis distances were used to perform a cluster analysis that reconstructed the three virulence groups. Additionally, a significant and positive correlation was found between the number of transposase domains and the number of paralogous genes encoded in each genome (Fig. S5). In summary, these results indicate that paralogy has played an important role in the emergence of virulent pathogens.

DISCUSSION

Pathogenic species of the genus *Leptospira* are a unique group of highly fastidious bacteria, difficult to isolate in pure cultures. In this study, 12 novel species were successfully isolated from a relatively small number of soil samples from New Caledonia, highlighting a greatly unexplored biodiversity in the genus that is probably only the tip of the iceberg, and the number of recognized species may explode in

a near future. Indeed, the presence of putatively novel uncultured species of the genus *Leptospira* has been detected from unrelated sources such as bats [37–41] and Amazonian soils [42]. The impressive diversity found in our study indicates that soils may not only be considered as a secondary passive reservoir of leptospirosis, but also the birthplace of the genus *Leptospira* as previously suggested [6].

From a medical point of view, the description of novel species of intermediates and pathogens may have implications for public health. However, in our infection experiments and despite high infectious doses, none of these novel species could induce signs or symptoms of infection in the hamster model, and isolates could not be recovered from hamster blood. Similarly, these isolates could not be detected in mouse urine or kidney, suggesting their inability either to infect mice or to colonize kidney tubules, also calling into question the need for a mammal reservoir in their biology. Moreover, only *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii* have been detected in clinical cases in

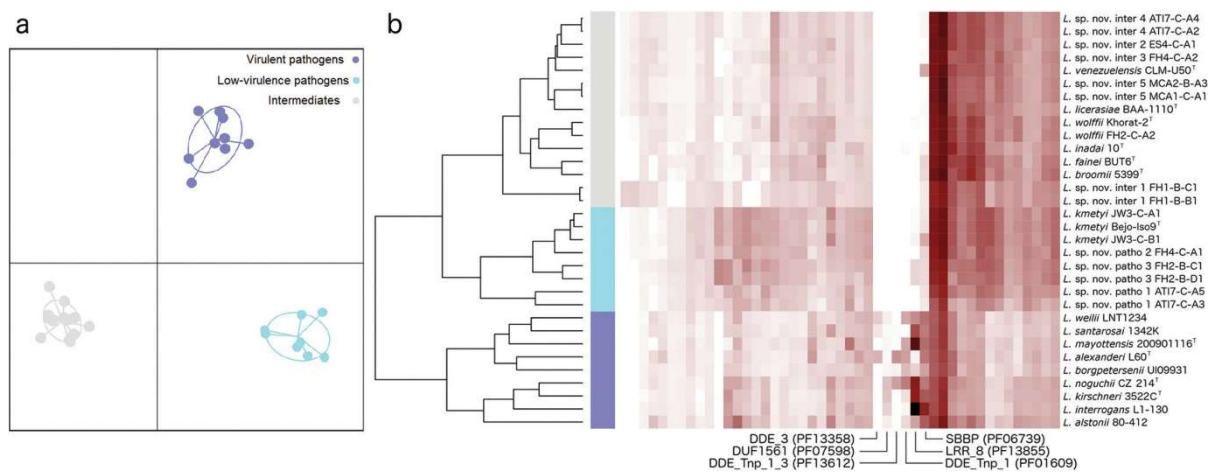


Fig. 4. Protein domains analysis. (a) Scatterplot showing the first and second discriminant functions obtained from the Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC), performed with protein domain abundances extracted from the coding sequences of each genome. Groups are coloured according to the new classification: intermediates (grey), low-virulence pathogens (cyan) and virulent pathogens (purple). (b) Heatmap showing the relationships between genomes obtained by calculating the Bray–Curtis distances from abundance patterns of a subset of highly discriminating domains obtained from the DAPC analysis. Redness indicates increasing domain copy number.

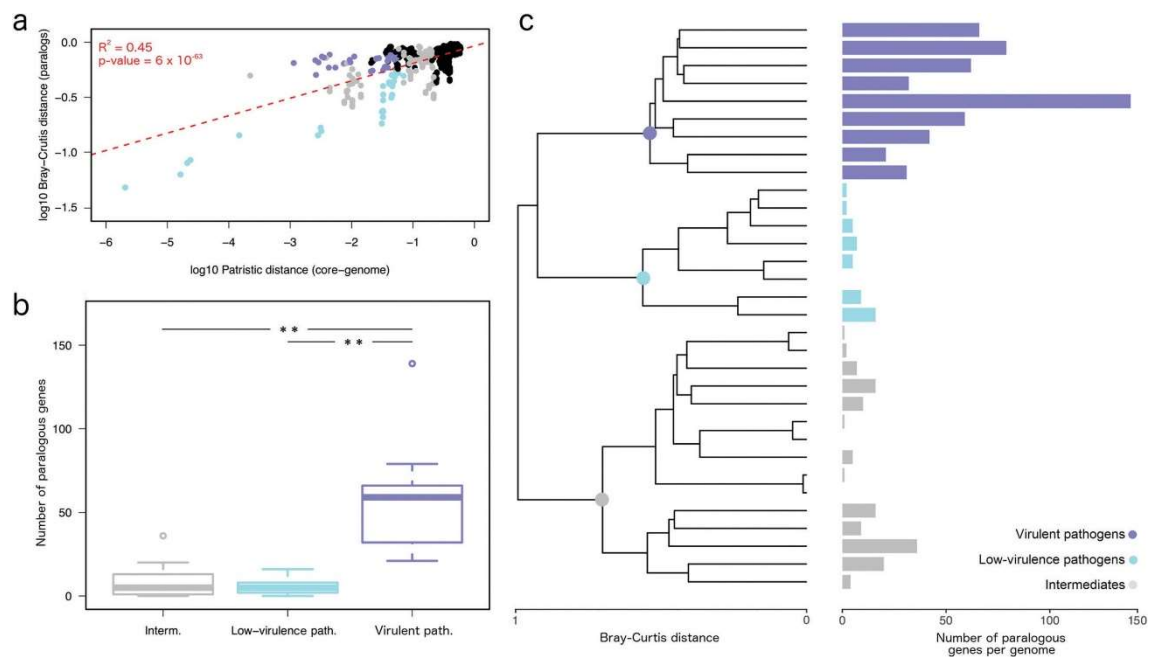


Fig. 5. Analysis of paralogous genes. (a) Linear regression showing the correlation between patristic distances calculated from the core genome phylogeny and Bray–Curtis distances calculated from the abundance patterns of paralogous genes. Dots are coloured according to virulence clusters when both genomes in the pair belong to the same cluster, black dots represent pairs of genomes belonging to different groups. (b) Boxplots showing the distribution of paralogous genes in the three virulence clusters. Asterisks indicate $P < 0.001$ (Mann–Witney U test). (c) Clustering analysis using the Bray–Curtis distances calculated from the abundance patterns of paralogous genes. Horizontal bars indicate the number of paralogous genes per genome and are coloured according to virulence clusters.

New Caledonia through an active surveillance system [43, 44]. Together, these results indicate that the novel species have no or very limited virulence potential to mammals.

From an evolutionary perspective, genomes of these low-virulence species present an ancestral phylogenetic position with respect to the virulent pathogens, supporting the current hypothesis for explaining the emergence of leptospiral pathogens from free-living ancestral species inhabiting soils. This also indicates that virulence has evolved independently in pathogens and intermediates, as evidenced by different accessory gene and domain patterns in virulent pathogens and intermediates. More importantly, our results support the need to refine the classification of pathogens, which today are assumed to be an ecologically coherent group by sharing a higher virulence potential in comparison with intermediates. Despite the authors of some previous studies having proposed that virulence may be variable among different species classed as pathogens [5, 6, 45], our more comprehensive taxonomic coverage combined with infection experiments and accessory genome analyses demonstrated the presence of two groups of species of the genus *Leptospira* within the pathogens, correlated with clearly distinctive virulence potentials.

Taken together, our results indicate that virulent pathogens have adapted their genomes from a soil free-living to a mammal-associated virulent lifestyle mainly by expanding particular groups of protein families through gene duplication. These genomic distinctions should be used to establish more adequate criteria for the classification of pathogenic leptospires and to focus future work on the dissection of the molecular mechanisms and biological role of these genes.

Funding information

The current researcher position of R.T. is supported by an AXA Research Funds grant 'AXA Postdoctoral Fellowship', 15-AXA-PDOC-037. I.F. is supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación postgraduation bursaries program from Uruguay grant POS_NAC_2016_1_131079 and G.I. by the Fondo de Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM) grant COF 04/11. E.B. is supported by a doctoral grant of the Institut Pasteur International Network.

Acknowledgements

Thanks are due to the patients and their relatives, who kindly visited the suspected contamination sites with us for the study and to the New Caledonian Health Authority who gained the consent for site visits. We thank Vincent Enouf and his platform team [Institut Pasteur, Pasteur International Bioresources network (PIBnet), Mutualized Platform for Microbiology (P2M)] for the next-generation sequencing analysis.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

The Institut Pasteur in New Caledonia has been the country reference and only laboratory for the biological diagnosis of human leptospirosis from 1980 to 2016. The patients were identified by a positive diagnostic qPCR and notified to the New Caledonian Health Authority, which also investigates cases through interviews. Oral consent was requested by the Health Authority to meet with the patient, visit and collect environmental samples in the suspected infection sites. Leptospira collection permits were obtained from the North (# 60912-2002-

2017/JJC) and South (Arrêté 1689-2017/ARR/DENV) Provinces of New Caledonia. Animal experiments were conducted according to the guidelines of the Animal Care and Use Committees of the Institut Pasteur of Paris and of New Caledonia, and followed European Recommendation 2007/526/EC. Protocols and experiments were approved by the Animal Care and Use Committees of the Institut Pasteur in New Caledonia.

Data bibliography

1. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 2004;32:138D–141.
2. Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L et al. What makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004403.
3. Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res* 2015;43:D261–D269.
4. Puche R, Ferrés I, Caraballo L, Rangel Y, Picardeau M et al. *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediates group isolated from rodents, cattle and humans. *IJSEM*. doi:10.1099/ijsem.0.002528 [Epub ahead of print].

References

1. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003898.
2. Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M et al. Global burden of leptospirosis: estimated in terms of disability adjusted life years. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0004122.
3. Slack AT, Khairani-Bejo S, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL et al. *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:705–708.
4. Murray GL, Morel V, Cerqueira GM, Croda J, Srikram A et al. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 2009;77:810–816.
5. Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L et al. What makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004403.
6. Xu Y, Zhu Y, Wang Y, Chang YF, Zhang Y et al. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Sci Rep* 2016;6:20020.
7. Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol* 2017;15:297–307.
8. Thibeaux R, Gerault S, Benezech C, Chabaud S, Soupé-Gilbert ME et al. Seeking the environmental source of leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:e0005414.
9. Chakraborty A, Miyahara S, Villanueva SY, Saito M, Gloriani NG et al. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. *Microbiol Immunol* 2011;55:494–501.
10. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19:455–477.
11. Page AJ, de Silva N, Hunt M, Quail MA, Parkhill J et al. Robust high-throughput prokaryote de novo assembly and improvement pipeline for Illumina data. *Microb Genom* 2016;2:e000083.
12. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014;30:2068–2069.
13. Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, Boisvert S, Brettin T et al. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res* 2017;45:D535–D542.
14. Puche R, Ferrés I, Caraballo L, Rangel Y, Picardeau M et al. *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediates group isolated from rodents, cattle and humans. *IJSEM*. doi:10.1099/ijsem.0.002528 [Epub ahead of print].

15. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009; 10:421.
16. Piccirillo A, Niero G, Calleros L, Pérez R, Naya H et al. *Campylobacter geochelonis* sp. nov. isolated from the western Hermann's tortoise (*Testudo hermanni hermanni*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:3468–3476.
17. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3059–3066.
18. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 2010;5: e9490.
19. Powell S, Szklarczyk D, Trachana K, Roth A, Kuhn M et al. egg-NOG v3.0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges. *Nucleic Acids Res* 2012;40:D284–D289.
20. Eddy SR. Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput Biol* 2011;7:e1002195.
21. Popescu AA, Huber KT, Paradis E. ape 3.0: New tools for distance-based phylogenetics and evolutionary analysis in R. *Bioinformatics* 2012;28:1536–1537.
22. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 2004;32:138D–141.
23. Enright AJ, van Dongen S, Ouzounis CA. An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:1575–1584.
24. Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res* 2015;43:D261–D269.
25. Dray S, Dufour A-B. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J Stat Softw* 2007;22:1–20.
26. Pessia A, Grad Y, Cobey S, Puranen JS, Corander J. K-Pax2: Bayesian identification of cluster-defining amino acid positions in large sequence datasets. *Microb Genom* 2015;1:e000025.
27. Oksanen J, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P. *Vegan: community Ecology Package*. R Package 2.0. 3 CRAN R-project org/package= vegan. 2012
28. Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 2011;27:3070–3071.
29. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing. 2014
30. Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992;30:2219–2224.
31. Haake DA. Hamster model of leptospirosis. *Current Protocols in Microbiology*; 2006. Chapter :12:Unit 12E 12.
32. Marcsisin RA, Bartpho T, Bulach DM, Srikrum A, Sermswan RW et al. Use of a high-throughput screen to identify *Leptospira* mutants unable to colonize the carrier host or cause disease in the acute model of infection. *J Med Microbiol* 2013;62:1601–1608.
33. Eshghi A, Becam J, Lambert A, Sismeiro O, Dillies MA et al. A putative regulatory genetic locus modulates virulence in the pathogen *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2014;82:2542–2552.
34. Lambert A, Picardeau M, Haake DA, Sermswan RW, Srikrum A et al. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. *Infect Immun* 2012;80:2019–2025.
35. Ricaldi JN, Matthias MA, Vinetz JM, Lewis AL. Expression of sialic acids and other nonulosonic acids in *Leptospira*. *BMC Microbiol* 2012;12:161.
36. Erme L, Doolittle WF. Microbial evolution: Xenology (apparently) trumps paralogy. *Curr Biol* 2016;26:R1181–R1183.
37. Dietrich M, Wilkinson DA, Benlali A, Lagadec E, Ramasindrazana B et al. *Leptospira* and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity enlightens pathogen maintenance in wildlife. *Environ Microbiol* 2015;17:4280–4289.
38. Dietrich M, Wilkinson DA, Soarimalala V, Goodman SM, Dellagi K et al. Diversification of an emerging pathogen in a biodiversity hotspot: *Leptospira* in endemic small mammals of Madagascar. *Mol Ecol* 2014;23:2783–2796.
39. Gomard Y, Dietrich M, Wieseke N, Ramasindrazana B, Lagadec E et al. Malagasy bats shelter a considerable genetic diversity of pathogenic *Leptospira* suggesting notable host-specificity patterns. *FEMS Microbiol Ecol* 2016;92:fiw037.
40. Matthias MA, Díaz MM, Campos KJ, Calderon M, Willig MR et al. Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:964–974.
41. Ogawa H, Koizumi N, Ohnuma A, Mutemwa A, Hang'ombe BM et al. Molecular epidemiology of pathogenic *Leptospira* spp. in the straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*) migrating to Zambia from the Democratic Republic of Congo. *Infect Genet Evol* 2015;32:143–147.
42. Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med* 2006;3:e308.
43. Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2006;44:3954–3962.
44. Goarant C, Laumond-Barry S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S et al. Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Trop Med Int Health* 2009; 14:926–929.
45. Lehmann JS, Matthias MA, Vinetz JM, Fouts DE. Leptospiral pathogenomics. *Pathogens* 2014;3:280–308.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.

Annexe II

Thibeaux, R., Girault, D., Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.-E., Rettinger, A., Douyère, A., Meyer, M., Iraola, G., Picardeau, M., Goarant, C., 2018a. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Front. Microbiol.* 9, 816.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816>



Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis

Roman Thibeaux^{1†}, Dominique Girault^{1†}, , Marie-Estelle Soupé-Gilbert¹, Anna Rettinger^{2‡}, Anthony Douyère³, Michael Meyer³, Gregorio Iraola⁴, Mathieu Picardeau⁵ and Cyrille Goarant^{*†}

OPEN ACCESS

Edited by:
Paolina Garbeva,
Netherlands Institute of Ecology
(NIOO-KNAW), Netherlands

Reviewed by:
Jason Sahl,
Northern Arizona University,
United States
Ulisses Padua Pereira,
Universidade Estadual de Londrina,
Brazil

*Correspondence:
Cyrille Goarant
cgoarant@pasteur.nc

†These authors have contributed
equally to this work.

‡Present Address:
Anna Rettinger,
Bavarian Health and Food Safety
Authority, Erlangen, Germany

Specialty section:
This article was submitted to
Terrestrial Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 06 February 2018
Accepted: 10 April 2018
Published: 01 May 2018

Citation:
Thibeaux R, Girault D, Bierque E,
Soupé-Gilbert M-E, Rettinger A,
Douyère A, Meyer M, Iraola G,
Picardeau M and Goarant C (2018)
Biodiversity of Environmental
Leptospira: Improving Identification
and Revisiting the Diagnosis.
Front. Microbiol. 9:816.
doi: 10.3389/fmicb.2018.00816

¹ Leptospirosis Research and Expertise Unit, Institut Pasteur in New Caledonia, Institut Pasteur International Network, Noumea, New Caledonia, ² Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich, Munich, Germany, ³ Institut des Sciences Exactes et Appliquées, Plateau MET/MEB, Université de la Nouvelle-Calédonie, Noumea, New Caledonia, ⁴ Bioinformatics Unit, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay, ⁵ Biology of Spirochetes Unit, Institut Pasteur, National Reference Centre and WHO Collaborating Center for Leptospirosis, Paris, France

Leptospirosis is an important environmental disease and a major threat to human health causing at least 1 million clinical infections annually. There has recently been a growing interest in understanding the environmental lifestyle of *Leptospira*. However, *Leptospira* isolation from complex environmental samples is difficult and time-consuming and few tools are available to identify *Leptospira* isolates at the species level. Here, we propose a polyphasic isolation and identification scheme, which might prove useful to recover and identify environmental isolates and select those to be submitted to whole-genome sequencing. Using this approach, we recently described 12 novel *Leptospira* species for which we propose names. We also show that MALDI-ToF MS allows rapid and reliable identification and provide an extensive database of *Leptospira* MALDI-ToF mass spectra, which will be valuable to researchers in the leptospirosis community for species identification. Lastly, we also re-evaluate some of the current techniques for the molecular diagnosis of leptospirosis taking into account the extensive and recently revealed biodiversity of *Leptospira* in the environment. In conclusion, we describe our method for isolating *Leptospira* from the environment, confirm the usefulness of mass spectrometry for species identification and propose names for 12 novel species. This also offers the opportunity to refine current molecular diagnostic tools.

Keywords: soil microbiology, MALDI-TOF MS, WGS comparisons, novel species, isolation

INTRODUCTION

Leptospirosis is a bacterial disease that affects human and animals that are exposed to a contaminated environment; usually water or soils contaminated by the urine of reservoir animals. The global burden of leptospirosis is estimated to more than 1 million cases and 60,000 fatalities annually, mostly impacting rural or suburban impoverished populations in tropical and subtropical regions worldwide (Costa et al., 2015).

Leptospirae are thin helical-shaped bacteria from the phylum of Spirochaetes. One century ago, freshwater saprophytic leptospirae and pathogenic leptospirae, the etiological agents of

leptospirosis, had been first described and rats had been identified as the main animal reservoirs of virulent strains (Ido et al., 1917; Noguchi, 1917). Prophetically, in the same issue of *The Journal of Experimental Medicine*, Noguchi questioned the survival of leptospires in nature, including in water and soils, and studied the interactions of *Leptospira* with other bacteria (Noguchi, 1918a). The foundations of the epidemiology and taxonomy of *Leptospira* were therefore clearly established in a very short period of time one century ago (Noguchi, 1918b).

Pathogenic *Leptospira* have then been classified as *L. interrogans sensu lato* while saprophytes were named *L. biflexa sensu lato* for decades (both denominations being now inappropriate in modern taxonomy), until the 1980's and the description of *Leptospira inadai* (Schmid et al., 1986). This species later proved to be the first representative of the so-called "intermediate" cluster (Hookey et al., 1993). At the end of the twentieth century, there were 16 validly described *Leptospira* species, with the description of a second intermediate species *Leptospira fainei* (Perolat et al., 1998) and further molecular reclassification of collection strains (Brenner et al., 1999).

In the recent years, a pan-*Leptospira* genome project supported by the National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID) Genome Sequencing Center has provided the scientific community with hundreds of whole-genome sequences allowing large comparative genomic analyses (Lehmann et al., 2013, 2014; Fouts et al., 2016). This has offered new insights into the phylogeny of the genus *Leptospira*, notably confirming the discrimination of the three major clades ("pathogens," "intermediates," and "saprophytes") by whole-genome analysis. Within the pathogens, this has also allowed to identify sub-clusters of varying pathogenicity (Xu et al., 2016). Our recent genomic study of environmental isolates from New Caledonia, a tropical island where leptospirosis is endemic, suggested that more heterogeneity in virulence exists in the cluster named "pathogens" and that virulence was acquired independently in "pathogens" and "intermediates" (Thibeaux et al., 2018). However, major questions are still open about the comparative virulence (Picardeau, 2017) as some species from the cluster "intermediates" are increasingly recognized in human disease (Tsuboi et al., 2017; Puche et al., 2018).

In this study, we isolated *Leptospira* from soils suspected

to be contamination sources in New Caledonia. Isolates were submitted to a polyphasic approach for identification, with three sequential steps. First, a melting curve analysis of the 16S ribosomal RNA gene achieved a fast presumptive identification of the cluster (i.e., pathogens, intermediates, or saprophytes). A proteomic analysis based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-ToF) mass spectrometry using the MALDI Biotyper Systems allowed species identification through pairwise comparison with reference spectra of the 23 validly described *Leptospira* species. Whole-genome sequencing (WGS) for formal identification of all 26 isolates provided unambiguous identification of clusters and species, thus allowing to evaluate the relevance of the identification scheme. In total, whole-genome sequencing confirmed the relevance of this approach and showed that

MALDI-ToF spectra-based identification is a powerful tool to identify *Leptospira* at the species level. In parallel, the biodiversity revealed from these environmental isolates also questions molecular diagnosis. Therefore, we evaluated two real time PCR assays for leptospirosis diagnosis (Merien et al., 2005; Stoddard et al., 2009) and discuss possible improvement as well as their applicability in different contexts.

MATERIALS AND METHODS

Leptospira Reference Strains and Environmental Isolates

Leptospira strains used in this study (Supplementary Table 1) were from the bacterial collections of the Institut Pasteur in New Caledonia and in Paris.

Environmental isolates as well as isolation procedure have been described previously (Thibeaux et al., 2018). Briefly, 5 g of topsoil were mixed with 5 mL of PBS (phosphate buffered saline) and 2 mL of supernatant were filtered through a sterile 0.45 µm filter into a tube filled with 2.5 mL of Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium 2x and 0.5 mL of 10X concentrated STAFF (sulfamethoxazole, trimethoprim, amphotericin B, fosfomycin, and 5-fluorouracil) (Chakraborty et al., 2011). Cultures were incubated at 30°C and when spirochetes were observed, 100-µL of the diluted culture (1:100 and 1:1,000) was plated onto solid EMJH agar (12 g/L) using sterile glass beads and incubated at 30°C until individual subsurface colonies were visible. One to five characteristic subsurface individual colonies from each plate were collected with a sterile tip, for confirmation of a *Leptospira* morphology and motility by dark field microscopy before clonal subculture in liquid EMJH. The isolation procedure is summarized in **Figure 1A**.

DNA Extraction and 16S RNA Molecular Typing

Genomic DNA was extracted from 200 µL of EMJH liquid clonal cultures. Extraction was performed using a commercial kit

(QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen, Australia) according to the

manufacturer's instructions. DNA elution was performed with 50 µL of buffer AE. The quantity of DNA was measured with NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) and adjusted to 0.1 ng/µL.

Amplification of a fragment of the 16S rRNA gene was performed in a total volume of 10 µL on a LightCycler 480 II. The reaction mixture consisted in 2 µL PCR grade water, 5 µL of 2X reaction SYBR Green Mix (LC480 SYBR Green I Master kit, Roche, New Zealand), 0.5 µL of forward primer (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3'), 0.5 µL of reverse primer (5'-CTTAAGTCTGCTCCCGTA-3'), and 2 µL (0.2 ng) of DNA (Mérien et al., 1992). After amplification, the melting temperature of the amplified product was analyzed using LightCycler 480 Software.

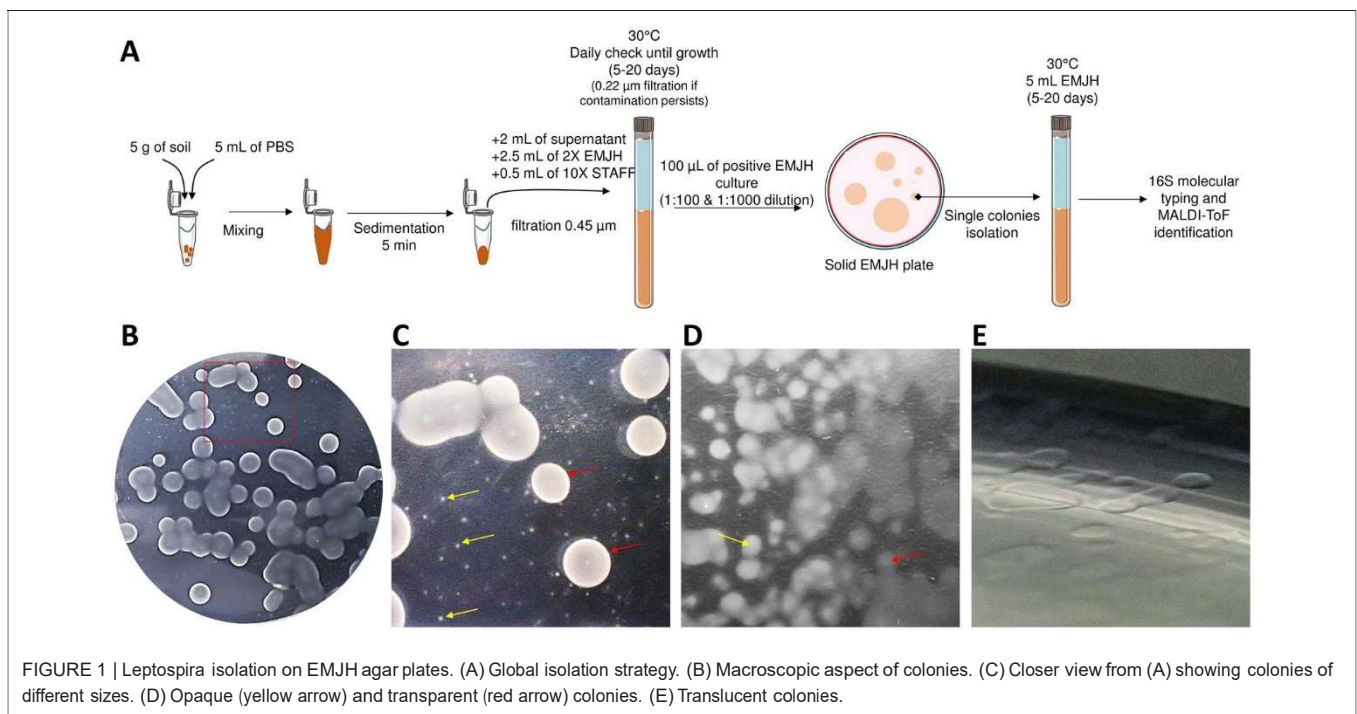


FIGURE 1 | *Leptospira* isolation on EMJH agar plates. (A) Global isolation strategy. (B) Macroscopic aspect of colonies. (C) Closer view from (A) showing colonies of different sizes. (D) Opaque (yellow arrow) and transparent (red arrow) colonies. (E) Translucent colonies.

MALDI-ToF Mass Spectrum Analysis: Sample Preparation and Construction of a Database

Samples were prepared as described in an earlier study (Rettinger et al., 2012) with minor changes. Briefly, *Leptospira* cells from liquid EMJH culture were harvested by centrifugation (18,000 g for 10 min) of 1 mL of an exponential 8-day old culture in EMJH culture medium. The pellet was resuspended in 200 μL PBS to wash cells and remove the excess of protein coming from the EMJH culture medium. Bacterial cells were pelleted again by identical centrifugation (18,000 g for 10 min). The pellet was resuspended and homogenized in 300 μL sterile distilled water before addition of 900 μL absolute ethanol. At this step, the sample can be stored up to 6 months at -20°C . The cells were pelleted again (18,000 g for 10 min), the pellet was dried under a hood. Finally, the dry pellet was thoroughly homogenized in 30 μL 70% formic acid before addition of 30 μL pure acetonitrile.

The homogeneous mixture was centrifuged 2 min at 15,000 g and 1 μL of the supernatant was spotted on a MSP-96 polished steel target plate (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) and allowed to dry at room temperature. The sample was overlaid with 1.2 μL matrix (10 mg α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid / mL in 50% acetonitrile/2.5% trifluoroacetic acid). Mass spectra (MS) were acquired using a Microflex mass spectrometer (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) in the linear mode and a mass range of 2–20 kDa using the automated functionality of flexControl 3.0 software (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). To create reference spectra, at least 20 raw spectra (8 spots read 3 times each) were used to generate a main spectrum. A database was constructed with the reference MS of 43 strains (30 pathogenic, 6 intermediates and 7 saprophytes,

Supplementary Table 1) encompassing representative of all 23 validly described species.

To identify isolates, samples were prepared similarly. The MS database was loaded into MALDI Biotyper 3.0 software (Bruker Daltonics) and used to compare the MS of the isolate with the MS database. The software MALDI Biotyper calculates a similarity score considering the proportion of matching peaks between the analyzed MS and all MS in the database. The similarity score values range from 0 (no similarity) to 3 (absolute identity). An identification score ≥ 2.3 was considered valid for identification at the species level as recommended by the manufacturer and confirmed in a previous study (Rettinger et al., 2012). We first loaded reference MS created in another laboratory (Rettinger et al., 2012) to evaluate the inter-laboratory portability of reference MS. Using this imported database, we submitted our routine strains and isolates (bold lines in Supplementary Table 1) to identification. We considered that an identification score in the range 2.0–2.3 could reveal “possible” novel species whereas a score below 2.0 was regarded as a “probable” novel species (Table 1). The main spectra library (MSP) dendrogram was created by the standard MALDI Biotyper MSP creation method (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), where distance values are relative and are always normalized to a maximum value of 1,000.

Whole-Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis

The methods for DNA extraction, Whole-genome sequencing, assembly and species identification have been described in an earlier study (Thibeaux et al., 2018). Briefly, genomic DNA was prepared by collection of cells by centrifugation

TABLE 1 | Summary of the stepwise identification process using 26 environmental isolates.

Isolate	STEP I: Clade identification		STEP II: Maldi ToF identification		STEP III: Identification through WGS
	16S rRNA T _m	Clades	Maldi-ToF score	Maldi-ToF identification	Formal identification
AT12-C-A1	85.11	Saprophyte	1.93	probable novel saprophyte	<i>L. macculloughii</i> sp. nov. (sp. nov sapro 4)
FH2-B-B2	85.17	Saprophyte	1.88	probable novel saprophyte	<i>L. harrisiae</i> sp. nov. (sp. nov sapro 1)
MCA2-B-A1	85.17	Saprophyte	1.93	probable novel saprophyte	<i>L. levettii</i> sp. nov. (sp. nov sapro 2)
JW2-C-A2	85.20	Saprophyte	1.86	probable novel saprophyte	<i>L. brenneri</i> sp. nov. (sp. nov sapro 3)
CN6-C-A1	85.24	Saprophyte	1.90	probable novel saprophyte	<i>L. levettii</i> sp. nov. (sp. nov sapro 2)
CN1-B-A1	85.31	Saprophyte	1.97	probable novel saprophyte	<i>L. levettii</i> sp. nov. (sp. nov sapro 2)
AT12-C-A2	85.31	Saprophyte	2.42	<i>L. meyeri</i>	<i>L. meyeri</i>
FH2-B-A1	85.33	Saprophyte	2.04	possible novel saprophyte	<i>L. harrisiae</i> sp. nov. (sp. nov sapro 1)
ES1-C-A1	85.37	Saprophyte	2.31	<i>L. meyeri</i>	<i>L. meyeri</i>
ES1-C-A2	85.40	Saprophyte	2.31	<i>L. meyeri</i>	<i>L. meyeri</i>
FH4-C-A1	85.81	Pathogenic	1.87	probable novel pathogen	<i>L. barantonii</i> sp. nov. (sp. nov patho 2)
AT17-C-A5	85.84	Pathogenic	1.50	probable novel pathogen	<i>L. ellisii</i> sp. nov. (sp. nov. patho 1)
FH2-B-D1	85.92	Pathogenic	1.49	probable novel pathogen	<i>L. adleri</i> sp. nov. (sp. nov. patho 3)
FH2-B-C1	85.95	Pathogenic	1.33	probable novel pathogen	<i>L. adleri</i> sp. nov. (sp. nov. patho 3)
AT17-C-A3	85.95	Pathogenic	1.41	probable novel pathogen	<i>L. ellisii</i> sp. nov. (sp. nov. patho 1)
JW2-C-B1	86.15	Pathogenic	2.41	<i>L. kmetyi</i>	<i>L. kmetyi</i>
JW3-C-A1	86.18	Pathogenic	2.42	<i>L. kmetyi</i>	<i>L. kmetyi</i>
MCA2-B-A3	86.52	Intermediate	1.82	probable novel intermediate	<i>L. hartskeerlii</i> sp. nov. (sp. nov inter 5)
FH4-C-A2	86.52	Intermediate	1.45	probable novel intermediate	<i>L. saintgironsiae</i> sp. nov. (sp. nov. inter 3)
ES4-C-A1	86.60	Intermediate	1.35	probable novel intermediate	<i>L. neocaledonica</i> sp. nov. (sp. nov inter 2)
AT17-C-A4	86.62	Intermediate	1.48	probable novel intermediate	<i>L. haakeii</i> sp. nov. (sp. nov inter 4)
AT17-C-A2	86.64	Intermediate	1.70	probable novel intermediate	<i>L. haakeii</i> sp. nov. (sp. nov inter 4)
FH2-C-A2	86.64	Intermediate	2.07	possible novel intermediate	<i>L. wolffii</i>
MCA1-C-A1	86.7	Intermediate	1.79	probable novel intermediate	<i>L. hartskeerlii</i> sp. nov. (sp. nov inter 5)
FH1-B-B1	86.82	Intermediate	0.52	probable novel intermediate	<i>L. perolatii</i> sp. nov. (sp. nov inter 1)
FH1-B-C1	86.95	Intermediate	0.94	probable novel intermediate	<i>L. perolatii</i> sp. nov. (sp. nov inter 1)

MALDI-ToF identification scores ≥ 2.3 (in red) reliably identify the species. Scores in the uncertainty range 2.00–2.29 (bold) do not provide definitive identification. Color shade in T_m values indicates the clustering by increasing T_m values.

from an exponential-phase liquid culture and extraction with MagNA Pure 96 Instrument (Roche Life Science, Auckland, New Zealand). Next-generation sequencing was performed by the Mutualized Platform for Microbiology (P2M) at Institut Pasteur, using the Nextera XT DNA Library Preparation kit (Illumina), the NextSeq 500 sequencing systems (Illumina), and the CLC Genomics Workbench 9 software (Qiagen) for analysis. The whole genome sequences were studied as described previously and novel species were identified by pairwise comparisons of overall genomic relatedness indices ANI and AAI (Thibeaux et al., 2018).

Ability of Routine Diagnostic PCR to Detect the Pathogenic Species

The biological diagnosis of leptospirosis increasingly uses real time PCR. Here, we tested both a Taq-Man based PCR targeting lipL32 for detection (Stoddard et al., 2009) and a lfb1 SYBR Green I real time PCR that is used for both detection and genotyping (Merien et al., 2005; Perez and Goarant, 2010). Both techniques are used in a number of diagnostic or reference laboratories globally. The lfb1 and lipL32 sequences were

retrieved from whole-genomes by blastn (Altschul et al., 1990), aligned and compared to the primers and probe described before (Supplementary Figure 1). Degenerate primers were designed to evaluate a possible improved detection of lipL32 from all pathogens: lipL32-47Fd (GCATTACMGCTTGTTGGTG) and lipL32-301Rd (CCGATTTTCGCCWGTGG) were used together with lipL32-189P (Stoddard et al., 2009) using the same PCR cycles. Using both qPCR designs, 0.2 ng pure DNA were amplified in a LightCycler 480 (lipL32) or in a LightCycler 2.0 (lfb1). Ct values were compared with the Ct values obtained from the same concentrations of pure DNA for each species with the original and the degenerate primers.

Scanning Electron Microscopy Imaging and Morphology

Glass coverslips (12 × 12 mm, Menzel-Glaser) were placed into 24-well polystyrene plates (Corning) with 1 mL of a bacterial suspension at 10⁶ bacteria / mL and were incubated for 2 days. Coverslips were removed and rinsed once in PBS, then fixed in 4% paraformaldehyde / 1% glutaraldehyde for 15 min. Coverslips were rinse again in PBS and stained with 1%

osmium tetroxide (OsO_4 in PBS, Acros Organics) for 1 h. After staining, samples were dehydrated through a series of ethanol concentrations (25, 50, 70, 90, and 100% for 10 min each) before being desiccated using hexamethyldisilazane (HMDS, Acros Organics). Before visualization, samples were submitted to carbon sputtering to increase their electrical conductance (Em ACE600, Carbon Coater, Leica) and examined under a Jeol JSM IT-300 IntouchScope microscope (SED detector, 10 kV). Length, width and helix pitch were measured on 6–10 representative isolated cells to calculate mean dimensions.

RESULTS

Environmental Strain Isolation

The major difficulty for isolating environmental leptospires resides in the ability to recover a clonal pure *Leptospira* culture from a complex polymicrobial arrangement. This procedure has been greatly facilitated by using the STAFF combination of antimicrobial agents (Chakraborty et al., 2011) which allows selective isolation of leptospires from contaminated samples. Earlier work has used quite similar combinations of agents to grow leptospires selectively with some success (Cousineau and McKiel, 1961; Jones et al., 1981). Although very effective, this is not sufficient to recover pure cultures as multiple *Leptospira* species can be present alongside in the initial sample. An additional step of clonal isolation from an individual isolated colony on an agar plate was necessary to recover clonal *Leptospira* cultures. We applied this procedure to attempt *Leptospira* isolation in 27 soil samples collected from 7 different sites throughout the mainland of New Caledonia (Thibeaux et al., 2018). After 5–10 days of liquid culture with STAFF, 23 cultures displayed the growth of *Leptospira*-like motile helical-shaped bacteria by dark-field microscopy. Positive liquid cultures were plated on solid agar plates and 26 individual colonies were sub-cloned in liquid EMJH according to their size, color and opacity (Figure 1).

16S rRNA T_m Analysis for Rapid Identification of *Leptospira* at the Clade-Level

The melting temperature analysis of the amplicon of a region of the 16S rRNA gene (Mérien et al., 1992) conserved in the entire *Leptospira* genus allowed a rapid putative identification of the clade. Melting temperature values ranged from 85.26 to 86.65 and could separate the three clades within the *Leptospira* genus. T_m values of the saprophytic species were the lowest, ranging from 85.26 to 85.76 without overlapping with T_m values of the other species. Intermediate species had the highest melting temperature (86.45–86.54) while pathogenic species had T_m values ranging from 85.84 to 86.20, with the remarkable exception of *Leptospira weilii*, belonging to the pathogenic cluster but had the highest T_m value: 86.65°C, making this particular species the only outlier reported in this study (Figure 2). Using these cluster-specific T_m ranges, we presumptively identified 10 saprophytic, 9 intermediate and 7 pathogenic *Leptospira* strains from pure cultures (Table 1, Step I).

MALDI-ToF Analysis for Rapid Identification of *Leptospira* Species

Using the imported MS database on our MALDI-ToF apparatus with our strain collection, culture medium and preparation reagents, we correctly identified all 27 reference strains at the species level with identification scores ≥ 2.30 and not significantly different from scores obtained with our in-house database (data not shown). These results confirm the portability of MS databases. MALDI-ToF MS was then used to attempt identification of our 26 isolates. Pairwise comparison with reference spectra representative of the 23 known *Leptospira* species was performed to identify isolates at the species level. Referring to the most complete database of reference spectra is a prerequisite to make use of the MALDI-ToF as an identification strategy of unknown species. In this case, an identification that fail to be matched with reference species MS with a valid score ≥ 2.3 would possibly point to a novel species deserving WGS analysis. Applying this identification strategy to our environmental isolates, 5 isolates had a high-confidence identification score (≥ 2.3) and were identified as *L. kmetyi* ($n = 2$), and *L. meyeri* ($n = 3$) (Table 1, Step II). The other 21 isolates failed to be matched with known species, suggesting possible novel species. Interestingly, we noticed for these isolates that even though the score was below the identification threshold, the proposed closest hit was always in good agreement with the proposed clade putatively assigned with the T_m of the 16S rRNA PCR product (Table 1, Step II).

Furthermore, we have refined the identification of these 21 unidentified cultures by performing pairwise comparison with each other to identify isolates belonging to the same species, if any. Some cultures were identified as identical putative novel species (comparison score ≥ 2.3), pointing to 13 possible or putative novel species (Table 1 and Figure 3).

Whole-Genome Sequencing

As the last step of the stepwise identification, the whole-genome sequence of all 26 isolates were determined. The 5 isolates identified by MALDI-ToF MS as *L. meyeri* ($n = 3$) or *L. kmetyi* ($n = 2$) were confirmed members of these species by ad-hoc analysis of whole-genome sequences (Thibeaux et al., 2018). Of 21 unknown isolates possibly representing novel species, one isolate (FH2-C-A2), assigned to a possible novel intermediate species, was formally identified as *L. wolffii*. Of note, the MALDI-ToF identification score with *L. wolffii* Khorat-H2^T was 2.07, in the range of the species uncertainty suggested in a former study (Rettinger et al., 2012) and recommended by the manufacturer. In addition, 20 isolates were confirmed to belong to 12 novel *Leptospira* species (3 pathogens, 5 intermediates and 4 saprophytes) by WGS and genome analysis (Thibeaux et al., 2018) (Table 1, step III).

Description of Novel Species

Figure 4 shows the morphology of novel species obtained by scanning electron microscopy. The position of novel species in a 16S rRNA phylogenetic tree is shown in Supplementary Figure 2. We propose the following names and descriptions for the novel species:

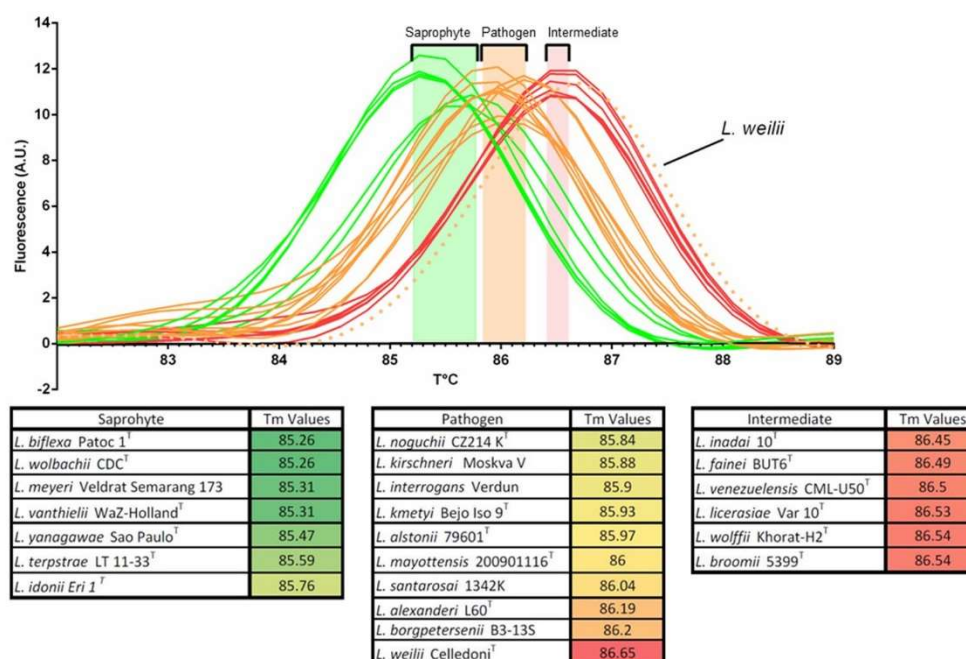


FIGURE 2 | Melting peaks and melting temperatures (T_m) of a 16S rRNA PCR product for representative strains from all 23 validly described *Leptospira* species, evidencing the clustering of T_m values with the notable exception of *Leptospira weilii*.

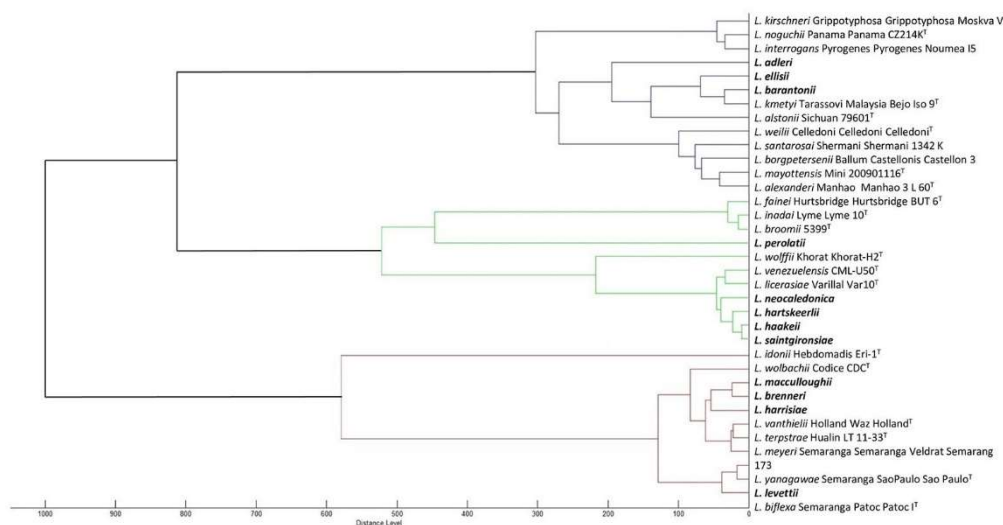


FIGURE 3 | Dendrogram based on the comparison of MALDI-ToF mass spectra of the 35 *Leptospira* species. Novel species are indicated in bold.

Description of *Leptospira ellisii* sp. nov

Leptospira ellisii (e.li'si.i N.L gen. masc. n. ellisii of Ellis, named after Dr William A. Ellis, an Irish veterinary microbiologist who made significant contributions to the study of *Leptospira* and leptospirosis in animals). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each end, forming a semicircular hook. Cells are $11.13 \pm 1 \mu\text{m}$ long

and $221 \pm 18 \text{ nm}$ in diameter with a pitch of $396 \pm 44 \text{ nm}$. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30°C . Growth in the presence of antibiotics, such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 $\mu\text{g/mL}$; Sulfamethoxazole, 400 $\mu\text{g/mL}$; Trimethoprim, 200 $\mu\text{g/mL}$ and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 47.8%. This strain could neither induce signs or symptoms of infection in the hamster model

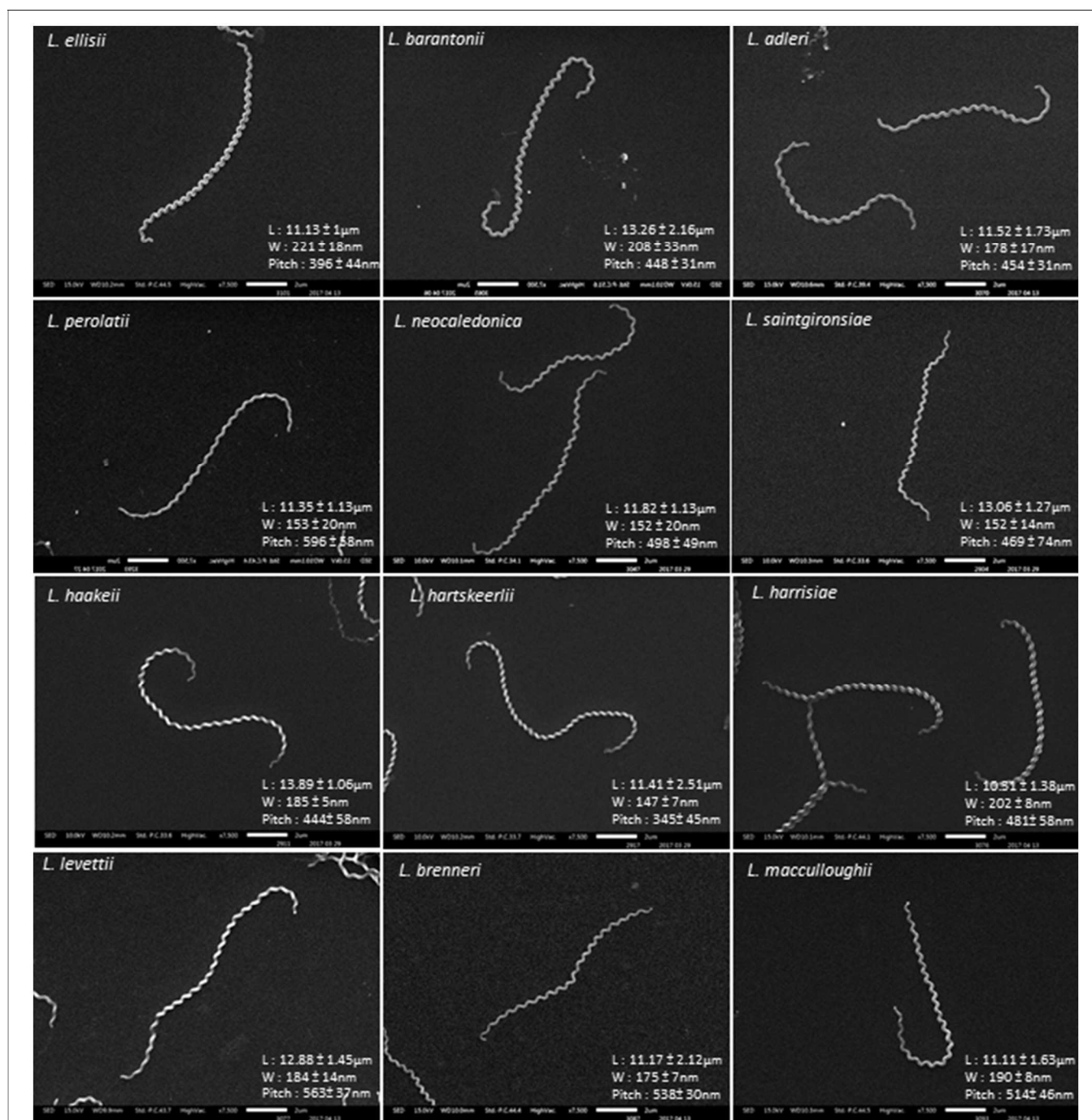


FIGURE 4 | SEM morphology of representative cells of novel *Leptospira* species. L, length; W, width.

nor be recovered from hamster blood. Similarly, it could not be detected in mouse urine or kidney after inoculation. The type strain isolated to date is AT17-C-A5^T, isolated from a soil sample in the South Province of New Caledonia. Genome Accession Number is NPEF00000000. Belonging to the cluster of “pathogens,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. patho 1 (Thibeaux et al., 2018).

Description of *Leptospira barantonii* sp. nov

Leptospira barantonii (ba.ran.to'ni.i. N.L. gen. masc. n. barantonii of Baranton, named after Pr Guy Baranton, a French microbiologist who made significant contributions to the study of Spirochaetes). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each

end, forming a semicircular hook. Cells are $13.26 \pm 2.16 \mu\text{m}$ long and $208 \pm 33 \text{ nm}$ in diameter with a pitch of $448 \pm 31 \text{ nm}$. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30°C . Growth in the presence of antibiotics, such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 $\mu\text{g/mL}$; Sulfamethoxazole, 400 $\mu\text{g/mL}$; Trimethoprim, 200 $\mu\text{g/mL}$ and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 43.96%. This strain could neither induce signs or symptoms of infection in the hamster model nor be recovered from hamster blood. Similarly, it could not be detected in mouse urine or kidney after inoculation. The type and only strain isolated to date is FH4-C-A1^T, isolated from a soil sample in the North Province of New Caledonia. Genome Accession Number is NPDS00000000. Belonging to the cluster of “pathogens,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. patho 2 (Thibeaux et al., 2018).

Description of *Leptospira adleri* sp. nov

Leptospira adleri (a.dle'ri. N.L. gen. masc. n. adleri of Adler, named after Pr Ben Adler, an Australian microbiologist who made significant research contributions in many aspects of *Leptospira* and leptospirosis). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each end, forming a semicircular hook. Cells are $11.52 \pm 1.73 \mu\text{m}$ long and $178 \pm 17 \text{ nm}$ in diameter with a pitch of $454 \pm 31 \text{ nm}$. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30°C . Growth in the presence of antibiotics, such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 $\mu\text{g/mL}$; Sulfamethoxazole, 400 $\mu\text{g/mL}$; Trimethoprim, 200 $\mu\text{g/mL}$ and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 43.55%. This strain could neither induce signs or symptoms of infection in the hamster model nor be recovered from hamster blood. Similarly, it could not be detected in mouse urine or kidney after inoculation. The type strain isolated to date is FH2-B-D1^T, isolated from a soil sample in the North Province of New Caledonia. Genome Accession Number is NPDU00000000. Belonging to the cluster of “pathogens,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. patho 3 (Thibeaux et al., 2018).

Description of *Leptospira perolatii* sp. nov

Leptospira perolatii (pe.ro.la'ti.i. N.L. gen. masc. n. perolatii of Perolat, named after Dr Philippe Perolat, a French microbiologist who made significant contributions to the study of *Leptospira*). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each end, forming a semicircular hook but spiral structure of this isolate appear more relaxed. Cells are $11.35 \pm 1.13 \mu\text{m}$ long and $153 \pm 20 \text{ nm}$ in diameter with a pitch of $596 \pm 58 \text{ nm}$. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30°C . Growth in the presence of antibiotics, such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 $\mu\text{g/mL}$; Sulfamethoxazole, 400 $\mu\text{g/mL}$; Trimethoprim, 200 $\mu\text{g/mL}$ and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 42.36%. The type strain isolated to date is FH1-B-B1^T, isolated from a soil sample in the North

Province of New Caledonia. Genome Accession Number is NPDZ00000000. Belonging to the cluster of “intermediates,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. inter 1 (Thibeaux et al., 2018).

Description of *Leptospira neocaledonica* sp. nov

Leptospira neocaledonica (neo.ca.le.do.ni'ca. N.L. gen. fem. adj. neocaledonica reflecting its geographic origin in New Caledonia). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each end, forming a semicircular hook. Cells are $11.82 \pm 1.13 \mu\text{m}$ long and $152 \pm 20 \text{ nm}$ in diameter with a pitch of $498 \pm 49 \text{ nm}$. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30°C . Growth in the presence of antibiotics, such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 $\mu\text{g/mL}$; Sulfamethoxazole, 400 $\mu\text{g/mL}$; Trimethoprim, 200 $\mu\text{g/mL}$ and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 40.17%. The type and only strain isolated to date is ES4-C-A1^T, isolated from a soil sample in the North Province of New Caledonia. Genome Accession Number is NPEA00000000. Belonging to the cluster of “intermediates,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. inter 2 (Thibeaux et al., 2018).

Description of *Leptospira saintgironisae* sp. nov

Leptospira saintgironisae (saint.gi.ron'si.ae. N.L. gen. fem. n. saintgironisae of Saint-Girons, named after Dr Isabelle Saint-Girons, a French microbiologist who made significant contributions to the study of Spirochaetes). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each end, forming a semicircular hook. Cells are $13.06 \pm 1.27 \mu\text{m}$ long and $152 \pm 14 \text{ nm}$ in diameter with a pitch of $469 \pm 74 \text{ nm}$. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30°C . Growth in the presence of antibiotics, such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 $\mu\text{g/mL}$; Sulfamethoxazole, 400 $\mu\text{g/mL}$; Trimethoprim, 200 $\mu\text{g/mL}$ and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 45.82%. The type and only strain isolated to date is FH4-C-A2^T, isolated from a soil sample in the North Province of New Caledonia. Genome Accession Number is NPDR00000000. Belonging to the cluster of “intermediates,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. inter 3 (Thibeaux et al., 2018).

Description of *Leptospira haakeii* sp. nov

Leptospira haakeii (ha.a'kei.i. N.L. gen. masc. n. haakeii of Haake, named after Pr David Haake, an American microbiologist who made significant contributions to the study of *Leptospira*, notably on the role of outer membrane proteins in the pathophysiology of leptospirosis). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each end, forming a semicircular hook. Cells are $13.89 \pm 1.06 \mu\text{m}$ long and $183 \pm 5 \text{ nm}$ in diameter with a pitch of $444 \pm 58 \text{ nm}$. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30°C . Growth in the presence of antibiotics,

such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 µg/mL; Sulfamethoxazole, 400 µg/mL; Trimethoprim, 200 µg/mL and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 39.8%. The type strain isolated to date is AT17-C-A4^T, isolated from a soil sample in the South Province of New Caledonia. Genome Accession Number is NPEG00000000. Belonging to the cluster of “intermediates,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. inter 4 (Thibeaux et al., 2018).

Description of *Leptospira hartskeerlii* sp. nov

Leptospira hartskeerlii (hart.skeer.li.i. N.L. gen. masc. n. hartskeerlii of Harskeerl named after Dr Rudy Harskeerl, an Dutch microbiologist who made significant contributions to the study of all aspects of leptospirosis, notably diagnosis and epidemiology). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each end, forming a semicircular hook. Cells are 11.41 ± 2.51 µm long and 147 ± 7 nm in diameter with a pitch of 345 ± 45 nm. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30°C. Growth in the presence of antibiotics, such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 µg/mL; Sulfamethoxazole, 400 µg/mL; Trimethoprim, 200 µg/mL and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 40.47%. The type strain isolated to date is MCA2-B-A3^T, isolated from a soil sample in the North Province of New Caledonia. Genome Accession Number is NPD00000000. Belonging to the cluster of “intermediates,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. inter 5 (Thibeaux et al., 2018).

Description of *Leptospira harrisiae* sp. nov

Leptospira harrisiae (ha.ri'si.ae. N.L. gen. fem. n. harrisiae of Harris named after Dr Virginia G. Harris, an American microbiologist who made significant contributions to the study of nutrition and physiology of *Leptospira*). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each end, forming a semicircular hook. Cells are 10.31 ± 1.38 µm long and 202 ± 8 nm in diameter with a pitch of 481 ± 58 nm. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30°C. Growth in the presence of antibiotics, such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 µg/mL; Sulfamethoxazole, 400 µg/mL; Trimethoprim, 200 µg/mL and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 37.86%. The type strain isolated to date is FH2-B-A1^T, isolated from a soil sample in the North Province of New Caledonia. Genome Accession Number is NPD00000000. Belonging to the cluster of “saprophytes,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. sapro 1 (Thibeaux et al., 2018).

Description of *Leptospira levettii* sp. nov

Leptospira levettii (le'vet.ti.i. N.L. gen. masc. n. levettii of Levett named after Dr Paul N. Levett, a Canadian microbiologist who made significant contributions to the study of *Leptospira* and

leptospirosis). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each end, forming a semicircular hook. Cells are 12.88 ± 1.45 µm long and 184 ± 14 nm in diameter with a pitch of 563 ± 14 nm. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30°C. Growth in the presence of antibiotics, such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 µg/mL; Sulfamethoxazole, 400 µg/mL; Trimethoprim, 200 µg/mL and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 37.61%. The type strain isolated to date is MCA2-B-A1^T, isolated from a soil sample in the North Province of New Caledonia. Genome Accession Number is NPDM00000000. Belonging to the cluster of “saprophytes,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. sapro 2 (Thibeaux et al., 2018).

Description of *Leptospira brenneri* sp. nov

Leptospira brenneri (bre.nne.ri. N.L. gen. masc. n. brenneri of Brenner named after Dr Don J. Brenner, an American microbiologist who made significant contributions to the study of *Leptospira*, notably pioneered the field of molecular taxonomy). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each end, forming a semicircular hook. Cells are 11.17 ± 2.12 µm long and 175 ± 7 nm in diameter with a pitch of 538 ± 30 nm. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30°C. Growth in the presence of antibiotics, such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 µg/mL; Sulfamethoxazole, 400 µg/mL; Trimethoprim, 200 µg/mL and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 38.34%. The type and only strain isolated to date is JW2-C-A2^T, isolated from a soil sample in the North Province of New Caledonia. Genome Accession Number is NPDQ00000000. Belonging to the cluster of “saprophytes,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. sapro 3 (Thibeaux et al., 2018).

Description of *Leptospira macculloughii* sp. nov

Leptospira macculloughii (mac.cu.lou'ghi.i. N.L. gen. masc. n. macculloughii of McCullough named after Dr. Willard G. McCullough, an American microbiologist who made significant contributions to the study of the nutritional requirements of *Leptospira*). Morphology observed under scanning electron microscopy is consistent with those for the genus. Cells have helical morphology, finely thin and usually curved at each end, forming a semicircular hook. Cells are 11.11 ± 1.63 µm long and 190 ± 8 nm in diameter with a pitch of 514 ± 46 nm. Motile and aerobic. Cells grow well in liquid and solid EMJH medium (1.2% agar) at 30 °C. Growth in the presence of antibiotics, such as 5-fluorouracil, 1 mg/mL; Amphotericin B, 50 µg/mL; Sulfamethoxazole, 400 µg/mL; Trimethoprim, 200 µg/mL and Fosmomycin, 4 mg/mL was also observed. The genomic G+C content of the type strain is 37.93%. The type and only strain isolated to date is AT12-C-A1^T, isolated from a soil sample in the North Province of New Caledonia. Genome

Accession Number is NPEK00000000. Belonging to the cluster of “saprophytes,” this species was formerly described as *Leptospira* sp. nov. sapro 4 (Thibeaux et al., 2018).

Evaluation and Optimization of qPCR Targeting the Pathogenic Species

Alignments of *lipL32* and *lfb1* gene sequences from previously described and novel pathogenic species revealed polymorphisms resulting in mismatches in the primers and probe of the diagnostic qPCR designs tested. Using routine protocols, the novel species were still amplified and detected, but with much higher Cycle threshold (Ct) values, pointing to a low sensitivity of these diagnostic PCR for these novel species as well as others. **Figure 5** shows the real-time PCR amplification curves and Ct values for qPCR using *lipL32* as the target. The degenerate *lipL32* primers *lipL32-47Fd* and *lipL32-301Rd* (Supplementary Figure 1) used in conjunction with the probe *lipL32-189P* described in the original design (Stoddard et al., 2009) demonstrated a higher efficacy to detect all species from the cluster “pathogens.” Indeed, using these degenerate *lipL32* primers, an astonishing Ct gain (showing improved sensitivity) of 16.94 cycles was observed for *L. alexanderi*. PCR sensitivity was also greatly increased for *L. mayottensis* (a 12.34-cycle gain), *L. alstonii* (7.06 cycles), *L. kmetyi* (6.72 cycles), *L. adleri* sp. nov. (3.6 cycles), *L. ellisii* sp. nov. (1.82 cycles), *L. weilii* (1.58 cycles) and *L. barantonii* sp. nov. (1.22 cycles). For *L. borgpetersenii*, *L. noguchii*, *L. kirschneri*, *L. interrogans* and *L. santarosai*, PCR sensitivity was barely affected with respectively + 0.17 cycle, −0.26 cycle, −0.08 cycle, −0.17 cycle, +0.16 cycle. All these results are summarized in Supplementary Table 2. A proper evaluation of this new qPCR design in terms of sensitivity and specificity would still be needed before it could be used for diagnostic purpose.

Concerning Ct values and amplification curves for qPCR using *lfb1* as a target, important discrepancies were also observed with Ct values ranging from 23.43 to 47.48 also resulting from important sequence polymorphisms affecting primer match. Comparative Ct values and Melting temperatures obtained with the *lfb1* qPCR (Merien et al., 2005) are presented in Supplementary Table 3.

DISCUSSION

In the last decade, the size of the genus *Leptospira* has increased through the description of novel species from clinical specimens, either belonging to the intermediate cluster like *Leptospira broomii* (Levett et al., 2006), *Leptospira licerisae* (Matthias et al., 2008), *Leptospira wolffii* (Slack et al., 2008), *Leptospira venezuelensis* (Puche et al., 2018) or to the pathogenic cluster with *Leptospira mayottensis* (Bourhy et al., 2014) and novel species from soils (Thibeaux et al., 2018). Simultaneously, concern is increasing about intermediate species being etiological agents of human disease (Tsuboi et al., 2017). This highlights both the need to continue *Leptospira* isolation to better evaluate the diversity of this genus (Girault et al., 2017) and a growing need for a universal PCR assay for the diagnostic of both intermediate and pathogenic *Leptospira* from clinical specimens.

In this study, we first report the stepwise identification of 26 *Leptospira* isolates from tropical freshwater soils in New Caledonia. Studying *Leptospira* in water and soil has first revealed (Ganoza et al., 2006; Viau and Boehm, 2011), then confirmed an overlooked biodiversity within the genus *Leptospira* (Thibeaux et al., 2018). These studies support the concept that leptospires are primarily telluric saprophytic bacteria and that only some members have evolved toward pathogenicity. From an epidemiological viewpoint, this illustrates the importance of soils in the infection cycle by virulent strains, pointing to the notion that ecosystems that support the survival of virulent leptospires should be considered as a passive, yet major reservoir in the epidemiology of the disease. Not only water content and pH, but a number of soil parameters may determine the suitability of a soil to leptospires and condition the risk to human and animal health.

To progress in this understanding, the discovery of this high biodiversity also reinforces the need of accurate isolation and identification techniques as well as relevant diagnostic tools. For isolation, an essential technical step was to plate positive liquid cultures on EMJH-agar to pick each isolate from a single colony, as shown by the diversity on plates from a single liquid culture (**Figure 1**). For identification, we used a polyphasic approach based on three sequential steps: (i) melting temperature analysis of a PCR product within the 16S rRNA gene, (ii) MALDI-ToF MS pairwise comparisons to a broad MS database and (iii) WGS analyses.

The recovery of isolates from the cluster “pathogens” from the environment is fastidious and challenging (Henry et al., 1971). Pathogenic leptospires have been historically isolated from soils in Malaysia (Baker and Baker, 1970; Alexander et al., 1975), using inoculation to a large number of susceptible animals, a technique nowadays ethically unacceptable. In addition, this animal-based strategy is biased since only strains leading to hamster disease could be recovered. Only virulent strains at a concentration above the infective dose can be recovered with this technique. Attempts to isolate *Leptospira* from the environment has led to the description of *L. kmetyi* from soil and other successful isolation of pathogenic leptospires from the environment in Malaysia (Slack et al., 2009; Ridzlan et al., 2010; Benacer et al., 2013). The use of selective agents to isolate leptospires from complex samples was imagined in the early 1960s (Cousineau and McKiel, 1961), successfully used later (Jones et al., 1981), and a revised combination was successfully used recently (Chakraborty et al., 2011).

Comparative analysis of the small ribosomal 16S rRNA subunit gene has been regarded as a standard for bacterial species identification for decades. In *Leptospira*, this gene was also largely used as a target for diagnostics (Mérien et al., 1992; Smythe et al., 2002) and typing (Ahmed et al., 2006; Guernier et al., 2018). Sequences of partial 16S rRNA gene are also widely used to identify *Leptospira* at the species level, either by direct sequencing (Benacer et al., 2013; Saito et al., 2014; Chaiwattananarungruengpaisan et al., 2018) or using High Resolution Melting (Pelaez Sanchez et al., 2017). However, partial sequences of the 16S rRNA gene might not be able to differentiate between closely-related species (Guernier et al., 2018), possibly

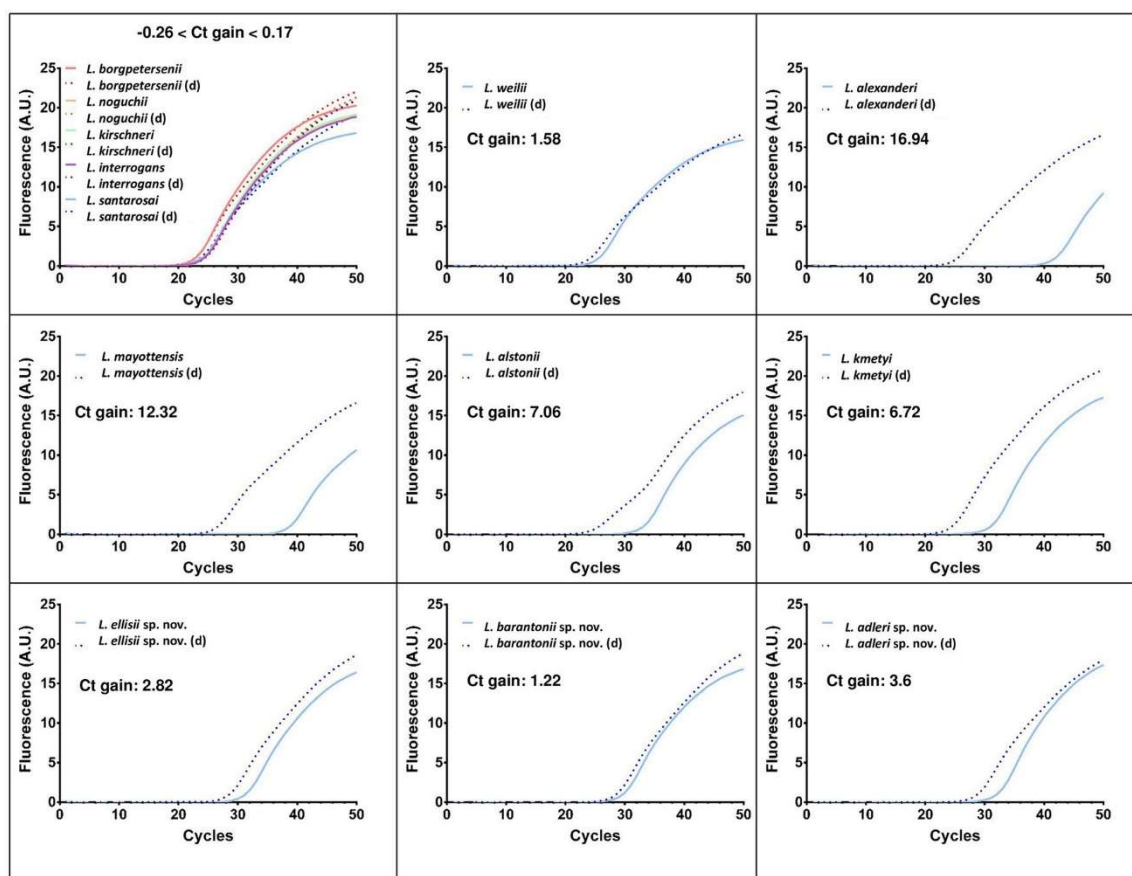


FIGURE 5 | Real-time PCR amplification curves and Ct gains using the original (Merien et al., 2005) and a modified qPCR using degenerate primers (d) described in this paper targeting lipL32 to detect pathogenic *Leptospira*.

leading to inconclusive or even improper identification at the species level. In recent studies, many isolates were putatively identified as *L. alstonii*, *L. wolffii*, or *L. licerasiae* based on their 16S rRNA gene sequence (Chakraborty et al., 2011; Benacer et al., 2013; Saito et al., 2013; Azali et al., 2016). Here, we suggest that these isolates would deserve further characterization. Hence, we propose that the simple melting temperature after real time PCR of a short portion of the 16S rRNA gene can presumptively classify an isolate in one of the 3 *Leptospira* clusters (pathogens, intermediates and saprophytes), with the notable exception of *L. weilii* (Table 1 and Figure 2).

We then used MALDI-ToF to identify pure cultures by creating a broad MS database allowing automated pairwise comparison to all validly described species. This technology is emerging in the field of medical microbiology and already used in the genus *Leptospira* (Djelouadji et al., 2012; Rettinger et al., 2012; Calderaro et al., 2014). As expected from previous work, we were able to identify some environmental isolates as members of species already described in all three *Leptospira* clusters. The MSP dendrogram deduced from the MALDI-ToF MS fingerprints clearly separated the three main clusters within the genus *Leptospira* and successfully distinguished all previously described

species (Figure 3). Lastly, we used whole-genome sequence analyses to provide an identification of species (Thibeaux et al., 2018). This unambiguous identification of species confirmed the validity of the MALDI-ToF identifications, with correct species assignment for identification scores ≥ 2.3 . WGS analyses also identified one isolate as *L. wolffii*; pairwise comparisons of MS to *L. wolffii* Khorat KH2^T had an identification score of 2.07, in the “uncertain identification” range. Within this range, all other isolates corresponded to novel species not included in the MS database. Lastly, isolates with an identification score below 2.0 all corresponded to novel species. After WGS analyses and phylogenetic assignment of novel species, we confirmed the correct identification of the cluster based on 16S rRNA melting peaks (Figure 2). Compared to MALDI-ToF identifications, we also noted that the closest match was always a species from the same *Leptospira* cluster (Figure 3). Taken together, we propose a sequential approach to isolate and identify environmental *Leptospira*. Although MALDI-ToF bacterial identification is not readily available in every research laboratory, the possibility to halt the identification process by freezing the protein extract (see section Materials and Methods) offers the possibility to refer specimens to distant laboratories. MALDI-ToF-based

species identification requires a broad MS database, which is provided for research use as part of our article (Supplementary: MspExport_BDD-UREL.btmsp file available online).

The diagnostic and surveillance of leptospirosis has mostly used serology and culture for decades. Since the advent of molecular techniques, PCR and real time PCR have been most widely used, frequently leading to abandon culture isolation (Perez and Goarant, 2010; Girault et al., 2017). However, most of the current molecular techniques specifically target the pathogenic cluster of *Leptospira*, or take *L. interrogans* sequences as the model target. The real time PCR primers (and eventually probe) may not be fitted to all relevant species. We tested two real time PCR assays widely used for diagnosis over the 10 validly described pathogenic species as well as the 3 novel pathogens. Surprisingly, we found that a TaqMan-based real time PCR targeting lipL32 that is widely used (Stoddard et al., 2009) was poorly sensitive for the detection of several *Leptospira* from the pathogenic cluster, including *L. alexanderi* and *L. mayottensis* (Supplementary Table 2). Using a new set of degenerate primers with the original probe of a TaqMan assay used widely, we significantly improved the detection of these species (Figure 5 and Supplementary Table 2). Similarly, a SYBR-Green I technique targeting lfb1 that is used for diagnostic purpose (Merien et al., 2005) was poorly sensitive for the detection of *L. alstonii*, *L. kmetyi* and the novel pathogenic species (Supplementary Table 3). This suggests that the high specificity of diagnostic PCR might lead to miss the detection of several rare or atypical *Leptospira* strains. The modified design proposed here should be tested further for validation of sensitivity and specificity, but may already be useful for exploratory studies.

LipL32 is known to be present in all species from both “pathogens” and “intermediate” clusters. However, this gene is not necessary for virulence (Murray et al., 2009) and is also present in low-virulence species described recently (Thibeaux et al., 2018). In addition and because of gene sequence polymorphisms, the most used real time PCR techniques targeting lipL32 do not detect intermediate species (Levett et al., 2005; Stoddard et al., 2009). Genus-specific targets might be used in clinical specimens, where only virulent leptospires are expected to be present. However and because recent work strongly suggests very distinct virulence levels within the pathogenic cluster (Lehmann et al., 2014; Xu et al., 2016; Thibeaux et al., 2018), molecular detection in environmental samples should either be followed by typing (Thibeaux et al., 2017) or interpreted with caution until

validated virulence-specific detection methods are available. The identification of relevant target genes by comparative genomics will help improve the relevance of future diagnostic tools.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CG conceived and designed the study. CG, RT, DG, EB, and MESG designed isolation strategy and isolated leptospires. CG, RT, EB, and MESG developed and implemented molecular strategy. DG, AR, and CG developed MALDI-ToF techniques and constructed MSP database. GI, MP, and CG WGS and analysis. RT, AD, and MM did the Electron Microscopy. CG, RT, DG, GI, and MP analyzed the data. CG, RT, and DG wrote the manuscript. MP, GI, and AR revised and edited the manuscript. All authors validated the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a PTR (grant 30-17) from the Institut Pasteur (Paris). The researcher position of RT was supported in 2015-2017 by an AXA Research Funds grant AXA Postdoctoral Fellowship 15-AXA-PDOC-037 and by the Government of New Caledonia since 2018. EB has a doctoral grant from the Institut Pasteur International Network. GI is supported by the Fondo de Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM) grant COF 04/11. Thanks are due to Emilie Barsac, Benjamin De Georges De Ledenon and Julien Colot, for technical assistance with the MALDI-ToF and to Vincent Enouf and his platform team [Institut Pasteur, Pasteur International Bioresources network (PIBnet), Mutualized Platform for Microbiology (P2M)] for the next-generation sequencing analysis. Thanks are also due to the CRESICA [Consortium for Research, Higher Education and Innovation in New Caledonia] for funding the SEM platform. *Leptospira* collection permits were obtained from the North (# 60912-2002-2017/JJC) and South (Arrêté 1689-2017/ARR/DENV) Provinces of New Caledonia.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00816/full#supplementary-material>

MALDI-ToF database with mass spectra of 35 *Leptospira* species (btmsp file).

REFERENCES

- Ahmed, N., Devi, S. M., Valverde Mde, L., Vijayachari, P., Machang'u, R. S., Ellis, W. A., et al. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5:28. doi: 10.1186/1476-0711-5-28
- Alexander, A. D., Evans, L. B., Baker, M. F., Ellison, D., and Marriapan, M. (1975). Pathogenic *Leptospiras* isolated from Malaysian surface waters. *Appl. Microbiol.* 29, 30–33.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Azali, M. A., Yean Yean, C., Harun, A., Aminuddin Baki, N. N., and Ismail, N. (2016). Molecular characterization of *Leptospira* spp. in environmental samples from North-Eastern Malaysia revealed a pathogenic strain, *Leptospira alstonii*. *J. Trop. Med.* 2016:2060241. doi: 10.1155/2016/2060241
- Baker, M. F., and Baker, H. J. (1970). Pathogenic *Leptospira* in Malaysian surface waters. I. a method of survey for *Leptospira* in natural waters and soils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19, 485–492. doi: 10.4269/ajtmh.1970.19.485
- Benacer, D., Woh, P. Y., Mohd Zain, S. N., Amran, F., and Thong, K. L. (2013). Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* species in water and soils from selected urban sites in Peninsular Malaysia. *Microbes Environ. JSME* 28, 135–140. doi: 10.1264/jsme2.ME12154

- Bourhy, P., Collet, L., Brisse, S., and Picardeau, M. (2014). *Leptospira mayottensis* sp., nov., a pathogenic *Leptospira* species isolated from humans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 4061–4067. doi: 10.1099/ijs.0.066597-0
- Brenner, D. J., Kaufmann, A. F., Sulzer, K. R., Steigerwalt, A. G., Rogers, F. C., and Weyant, R. S. (1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 839–858. doi: 10.1099/00207713-49-2-839
- Calderaro, A., Piccolo, G., Gorrini, C., Montecchini, S., Buttrini, M., Rossi, S., et al. (2014). *Leptospira* species and serovars identified by MALDI-TOF mass spectrometry after database implementation. *BMC Res. Notes* 7:330. doi: 10.1186/1756-0500-7-330
- Chaiwattananarungruengpaisan, S., Suwanpakdee, S., Sangkachai, N., Chamsai, T., Taruayanon, K., and Thongdee, M. (2018). Potential pathogenic *Leptospira* species isolated from waterfall in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* 71, 65–67. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.363
- Chakraborty, A., Miyahara, S., Villanueva, S. Y., Saito, M., Gloriani, N. G., and Yoshida, S. I. (2011). A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. *Microbiol. Immunol.* 55, 494–501. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x
- Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., et al. (2015). Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:e0003898. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898
- Cousineau, J. G., and McKiel, J. A. (1961). In vitro sensitivity of *Leptospira* to various antimicrobial agents. *Can. J. Microbiol.* 7, 751–758. doi: 10.1139/m61-089
- Djelouadi, Z., Roux, V., Raoult, D., Kodjo, A., and Drancourt, M., (2012). Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms. *Vet. Microbiol.* 158, 142–146. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.01.028
- Fouts, D. E., Matthias, M. A., Adhikarla, H., Adler, B., Amorim-Santos, L., Berg, D. E., et al. (2016). What makes a bacterial species pathogenic? comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004403. doi: 10.1371/journal.pntd.0004403
- Ganoza, C. A., Matthias, M. A., Collins-Richards, D., Brouwer, K. C., Cunningham, C. B., Segura, E. R., et al. (2006). Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med.* 3:e308. doi: 10.1371/journal.pmed.0030308
- Girault, D., Soupé-Gilbert, M. E., Geroult, S., Colot, J., and Goarant, C. (2017). Isolation of *Leptospira* from blood culture bottles. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 88, 17–19. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.014
- Guernier, V., Allan, K. J., and Goarant, C. (2018). Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. *Parasitology* doi: 10.1017/S0031182017001147. [Epub ahead of print].
- Henry, R. A., Johnson, R. C., Bohlool, B. B., and Schmidt, E. L. (1971). Detection of *Leptospira* in soil and water by immunofluorescence staining. *Appl. Microbiol.* 21, 953–956.
- Hookey, J. V., Bryden, J., and Gatehouse, L. (1993). The use of 16S rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of *Leptospiraceae* and related spirochaetes. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2585–2590. doi: 10.1099/00221287-139-11-2585
- Ido, Y., Hoki, R., Ito, H., and Wani, H. (1917). The rat as a carrier of *Spirochaeta Icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (*Spirochaetosis Icterohaemorrhagica*). *J. Exp. Med.* 26, 341–353. doi: 10.1084/jem.26.3.341
- Jones, P. W., Rennison, L. M., Matthews, P. R., Collins, P., and Brown, A. (1981). The occurrence and significance to animal health of *Leptospira*, *Mycobacterium*, *Escherichia coli*, *Brucella abortus* and *Bacillus anthracis* in sewage and sewage sludges. *J. Hyg.* 86, 129–137. doi: 10.1017/S0022172400068820
- Lehmann, J. S., Fouts, D. E., Haft, D. H., Cannella, A. P., Ricaldi, J. N., Brinkac, L., et al. (2013). Pathogenomic inference of virulence-associated genes in *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2468. doi: 10.1371/journal.pntd.0002468
- Lehmann, J. S., Matthias, M. A., Vinet, J. M., and Fouts, D. E. (2014). *Leptospira* pathogenomics. *Pathogens* 3, 280–308. doi: 10.3390/pathogens3020280
- Levett, P. N., Morey, R. E., Galloway, R. L., and Steigerwalt, A. G. (2006). *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56(Pt 3), 671–673. doi: 10.1099/ijs.0.63783-0
- Levett, P. N., Morey, R. E., Galloway, R. L., Turner, D. E., Steigerwalt, A. G., and Mayer, L. W., (2005). Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J. Med. Microbiol.* 54, 45–49. doi: 10.1099/jmm.0.45860-0
- Matthias, M. A., Ricaldi, J. N., Cespedes, M., Diaz, M. M., Galloway, R. L., Saito, M., et al. (2008). Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2:e213. doi: 10.1371/journal.pntd.0000213
- Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., and Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2219–2224.
- Merien, F., Portnoi, D., Bourhy, P., Charavay, F., Berlioz-Arthaud, A., and Baranton, G. (2005). A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 249, 139–147. doi: 10.1016/j.femsle.2005.06.011
- Murray, G. L., Srikram, A., Hoke, D. E., Wunder, E. A. Jr., Henry, R., Lo, M., et al., (2009). Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 77, 952–958. doi: 10.1128/IAI.01370-08
- Noguchi, H. (1917). *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* in American wild rats and its relation to the Japanese and European strains: first paper. *J. Exp. Med.* 25, 755–763. doi: 10.1084/jem.25.5.755
- Noguchi, H. (1918a). The survival of *Leptospira* (*Spirochaeta*) *Icterohaemorrhagiae* in nature; observations concerning microchemical reactions and intermediary hosts. *J. Exp. Med.* 27, 609–625. doi: 10.1084/jem.27.5.609
- Noguchi, H. (1918b). Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira* (*Spirochaeta*) *ictero-hemorrhagiae* (Inada and Ido). *J. Exp. Med.* 27, 575–592. doi: 10.1084/jem.27.5.575
- Peláez Sánchez, R. G., Quintero, J. A. L., Pereira, M. M., and Agudelo-Florez, P. (2017). High-resolution melting curve analysis of the 16S ribosomal gene to detect and identify pathogenic and saprophytic *Leptospira* species in Colombian isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96, 1031–1038. doi: 10.4269/ajtmh.16-0312
- Perez, J., and Goarant, C. (2010). Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol.* 10:325. doi: 10.1186/1471-2180-10-325
- Perolat, P., Chappel, R. J., Adler, B., Baranton, G., Bulach, D. M., Billingham, M. L., et al. (1998). *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 851–858. doi: 10.1099/00207713-48-3-851
- Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat. Rev.* 15, 297–307. doi: 10.1038/nrmicro.2017.5
- Puche, R., Ferrès, I., Caraballo, L., Rangel, Y., Picardeau, M., Takiff, H., et al. (2018). *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediates group isolated from rodents, cattle and humans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 513–517. doi: 10.1099/ijsem.0.002528
- Rettinger, A., Krupka, I., Grunwald, K., Dyachenko, V., Fingerle, V., Konrad, R., et al. (2012). *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiol.* 12:185. doi: 10.1186/1471-2180-12-185
- Ridzlan, F. R., Bahaman, A. R., Khairani-Bejo, S., and Mutalib, A. R. (2010). Detection of pathogenic *Leptospira* from selected environment in Kelantan and Terengganu, Malaysia. *Trop. Biomed.* 27, 632–638.
- Saito, M., Miyahara, S., Villanueva, S. Y., Aramaki, N., Ikejiri, M., Kobayashi, Y., et al. (2014). PCR and culture identification of pathogenic *Leptospira* from coastal soil in Leyte, Philippines after a storm surge during Super Typhoon Haiyan (Yolanda). *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6926–6932. doi: 10.1128/AEM.02568-14
- Saito, M., Villanueva, S. Y., Chakraborty, A., Miyahara, S., Segawa, T., Asoh, T., et al. (2013). Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 601–609. doi: 10.1128/AEM.02728-12
- Schmid, G. P., Steere, A. C., Kornblatt, A. N., Kaufmann, A. F., Moss, C. W., Johnson, R. C., et al. (1986). Newly recognized *Leptospira* species ("*Leptospira inadae*" serovar Iyme) isolated from human skin. *J. Clin. Microbiol.* 24, 484–486.
- Slack, A. T., Kalambaheti, T., Symonds, M. L., Dohnt, M. F., Galloway, R. L., Steigerwalt, A. G., et al. (2008). *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(Pt 10), 2305–2308. doi: 10.1099/ijs.0.64947-0
- Slack, A. T., Khairani-Bejo, S., Symonds, M. L., Dohnt, M. F., Galloway, R. L., Steigerwalt, A. G., et al. (2009). *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59(Pt 4), 705–708. doi: 10.1099/ijs.0.002766-0

- Smythe, L. D., Smith, I. L., Smith, G. A., Dohnt, M. F., Symonds, M. L., Barnett, L. J., et al. (2002). A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect. Dis.* 2:13. doi: 10.1186/1471-2334-2-13
- Stoddard, R. A., Gee, J. E., Wilkins, P. P., McCaustland, K., and Hoffmaster, A. R. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 247–55. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014
- Thibeaux, R., Geroult, S., Benezech, C., Chabaud, S., Soupé-Gilbert, M. E., Girault, D., et al. (2017). Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11:e0005414. doi: 10.1371/journal.pntd.0005414
- Thibeaux, R., Iraola, G., Ferrés, I., Bierque, E., Girault, D., Soupé-Gilbert, M. E., et al. (2018). Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb. Genomics* 4:000144. doi: 10.1099/mgen.0.000144
- Tsuboi, M., Koizumi, N., Hayakawa, K., Kanagawa, S., Ohmagari, N., and Kato, Y. (2017). Imported *Leptospira icterohaemolyticum* infection in traveler returning to Japan from Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 548–549. doi: 10.3201/eid2303.161262
- Viau, E. J., and Boehm, A. B. (2011). Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawai'ian coastal streams. *J. Water Health* 9, 637–646. doi: 10.2166/wh.2011.064
- Xu, Y., Zhu, Y., Wang, Y., Chang, Y. F., Zhang, Y., Jiang, X., et al. (2016). Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Sci. Rep.* 6:20020. doi: 10.1038/srep20020
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Thibeaux, Girault, Bierque, Soupé-Gilbert, Rettinger, Douyère, Meyer, Iraola, Picardeau and Goarant. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe III

Goarant, C., Trueba, G., Bierque, E., Thibeaux, R., Davis, B. and De la Peña Moctezuma. (2019). "*Leptospira* and Leptospirosis". In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) Global Water Pathogen Project. <http://www.waterpathogens.org> (A. Pruden, N. Ashbolt and J. Miller (eds) Part 3 Bacteria) <http://www.waterpathogens.org/book/leptospira-and-leptospirosis> Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. doi:10.14321/waterpathogens.26

/2%\$/ :\$7(5 3\$7+2(1 352-(&7
3\$57 7+5((. 63(&,),& (;&5(7(' 3\$7+2*(16:(19,5210(17\$/ \$1'
(3, '(0,2/2*< \$63(&76

/(37263,5\$ \$1'
/(37263,526,6

&\ULOOH *RDUDQW
,QVWLWXW 3DVWHXU,QWHUQDWLRQDO IHWZRUN
1RXPHD, 1HZ &DOHGRQLD

*DEULHO 7UXHED
8QLYHUVLGDG 6DQ)UDQFLVFR 'H 4XLWRO,QVWLWXWH RI 0LFURELRORJ\
4XLWR, (FXDGRU


,QVWLWXW 3DVWHXU,QWHUQDWLRQDO IHWZRUN
1RXPHD, 1HZ &DOHGRQLD

5RPDQ 7KLEHDX[
,QVWLWXW 3DVWHXU,QWHUQDWLRQDO IHWZRUN
1RXPHD, 1HZ &DOHGRQLD

%HQMDPLQ 'DYL
9LUJQLD 7HFK
%ODFNVEXUJ, 8QLWHG 6WDWHV

\$OHMDQGUR GH OD 3HQD-0RFWH]XPD
8QLYHUVLGDG 1DFLRQDO \$XWRQRPD GH 0H[LFR
*XVWDYR \$. 0DGHUR, 0H[LFR

&RS\ULJKW:



7KL\ SXEOLFDWLRQ LV DYDLODEOH LQ 2SHQ \$FFHV\ XQGHU WKH \$WWULEXWLRQ-6KDU\$OLNH 3.0 ,*2 (&&-%<-6\$ 3.0 ,*2) OLFHQVH (K\WS://FUHDWLYHFRPPRQV.RUJ/OLFHQVHV/E\VD/3.0/LJR). %\ XVLQJ WKH FRQWHQW RI WKLV SXEOLFDWLRQ, WKH XVHUV DFFHSW WR EH ERXQG E\ WKH WHUPV RI XVH RI WKH 81(6&2 2SHQ \$FFHV\5HSRVLWRU\ (K\WS://ZZZ.XQH\VR.RUJ/RSHQDFFHV\WHUPV-XVH-FFE\VD-HQ).

'LVFODLPHU:

7KH GHVLJQDWLRQV HPSOR\HG DQG WKH SUHVHQDWLRQ RI PDWHULDO WKURXJKRXW WKLV SXEOLFDWLRQ GR QRW LPSO\ WKH H[SUHVVLRQ RI DQ\ RSLQLRQ ZKD\VRHYHU RQ WKH SDUW RI 81(6&2 FRQFHUQLQJ WKH OHJDO VWDWXV RI DQ\ FRXQWU\, WHUULWRU\, FLW\ RU DUHD RU RI LWV DXWKRULWLV, RU FRQFHUQLQJ WKH GHOLPLDWLRQ RI LWV IURQWLHUV RU ERXQGDULHV. 7KH LGHDV DQG RSLQLRQV H[SUHVVHG LQ WKLV SXEOLFDWLRQ DUH WKRVH RI WKH DXWKRUV; WKH\ DUH QRW QHFHVVDULO\ WKRVH RI 81(6&2 DQG GR QRW FRPPLW WKH 2UJDQLJDWLRQ.

&LWDWLRQ:

*RDUDQW, &, 7UXHED, *, %LHUTXH, (., 7KLEHDX[, 5., 'DYL\, %. DQG 'H OD 3HbD ORF\WH]XP. 2019. /HSWRVSLUD DQG /HSWRVSLURVLV. ,Q: -.%. 5RVH DQG %. -LPeQH]-&LVQHURV, (HGV) *OREDO :DWHU 3DWKRJHQ 3URMHFW. K\WS://ZZZ.ZDWHUSDWKRJHQV.RUJ (\$. 3UXGHQ, 1. \$VKEROW DQG -. 0LOOHU (HGV) 3DUW 3 %DFWHULD) K\WS://ZZZ.ZDWHUSDWKRJHQV.RUJ/ERRN/OHSWRVSLUD-DQG-OHSWRVSULRVLV 0LFKLJDQ 6WDWH 8QLYHUVLW\, (. /DQVLQJ, O., 81(6&2. K\WSV://GRL.RUJ/10.14321/ZDWHUSDWKRJHQV.26 \$FNQRZOHGJH\PHQWV: ..5./. <RXQJ, 3URMHFW 'HVLJQ HGLWRU; :HEVLWH 'HVLJQ: \$JURNQRZ (K\WS://ZZZ.DJURNQRZ.FRP)

/DVW SXEOLVKHG: OD\ 30, 2019

6XPPDU\

/HSWRVSLURVLV LV DQ LPSRUWDQW DQG RIWHQ LJQRUHG GLVHDVH DIIHFWLQJ PRUH WKDQ RQH PLOOLRQ SHRSOH D \HDU ZRUOGZLGH, IURP ZKLFK 50,000 GLH. 1R VHURYDU LV NQRZQ WREH DGDSWHG WR KXPDPV, VR KXPDPV DFTXLUH WKH GLVHDVH GLUHFWO\ IURP DQLPDOV (FRQWDFW ZLWK XULQH RU WLWVXH) RU LQGLUHFWO\ (FRQWDFW ZLWK XULQH FRQWDPLQDWHG ZDWHU). 7KH WKUHH PDLQ HQYLURQPHQWV VKRZLQJ WUDQVPLVLRQ ULNV DUH ZDWHU-EDVHG, URGHQW-ERUQH DQG OLYHVWRFN/SHW-ERUQH HQYLURQPHQWV. /HSWRVSLURVLV RFFXUV ZRUOGZLGH EXW LW LV PRUH IUHTXHQWO\ IRXQG LQ KXPLG WURSLFDO FOLPDWHV, HVSHFDOO\ LQ UHJLRQV ZLWK SRRU VDQLWDU\ LQIUDVWUXFWXUH, GHILFLHQW GUDLQDJH, DQG DV D UHVXOW ODUJH QXPEHUV RI UDWV. 7KH FRQWDFW ZLWK QDWXUDO ERGLHV RI ZDWHU (ZHW IDUPLQJ) LQFUHDVHV WKH ULVN RI LQIHFWLRQ. 2XWEUHDNV WHQG WR RFFXU GXULQJ UDLQ\ VHDVVRQV DQG LW KDV EHHQ DVVRFLDWHG ZLWK IORRGLQJ. 7KH GLVHDVH KDV D EURDG JHRJUDSKLFDO GLVWULEXWLRQ GXH WR WKH ODUJH VSHFWUXP RI KRWWV LQFOXGLQJ GRPHVWLQ DQG ZLOG PDPDOV. /HSWRVSLURVLV DIIHFWV ULVN JURXS WKDW DUH H[SRVHG WR DQLPDO UHVHUYRLUV RU XULQH FRQWDPLQDWHG HQYLURQPHQWV DQG SHRSOH LQ FRQWDFW ZLWK QDWXUDO ERGLHV RI ZDWHU. /HSWRVSLURVLV LV UHJDUGHG DV WKH PRVW ZLGHVSUHDG JRRQRVLV.

/HSWRVSLURVLV LV FDXVHG E\ VSLURFKHWHV RI WKH JHQXV /HSWRVSLUD ZKLFK FRPSULVHV 20 VSHFLHV WKDW DUH SK\ORJQHWFDOO\ VHSUDWHG LQWR 3 FOXVWHUV: 9 SDWKRJHQLF, 6 VDSURSK\WLF, DQG 5 LQWHUPHGLDWH. 7KH HWLORJLF DJHQWV RI WKLV GLVHDVH DUH SDWKRJHQLF DQG LQWHUPHGLDWH VSHFLHV RI /HSWRVSLUD ZKLFK FRPSULVHV PRUH WKDQ 260 VHURYDUV. 3DWKRJHQLF DQG LQWHUPHGLDWH FOXVWHUV KDYH EHHQ UHSRUWHG WR FDXVH LQIHFWLRQ DQG LQ WKLV WH[W ZH ZLOO UHIIH WR WKHP DV SDUDVLWL /HSWRVSLUD. 7KH RUJDQLVP LV D WKLV VSLURFKHWH RI 0.1 WR 0.2 cP LQ GLDPWHU DQG 6 WR 12 cP LQ OHQJWK, VR WKDW LW FDQ EH ILQWUHG WKURXJK 0.45 cP ILQWUHV. ,W LV YHU\ PRWLOH VKRZLQJ WUDQVODWLRQDO PRWLOLW, WUDYHOOHQJ DSSUR[LPDWHO\ 20 kP LQ 2 WR 3 VHFQRGV LQ RUGLQDU\ PHGLD.

/HSWRVSLURVLV LV FRQVLGHUHG D QHJOHFWHG GLVHDVH, DQG WKH VSLURFKHWH FDXVLQJ WKLV GLVHDVH, /HSWRVSLUD LV GLILFXOW WR UHFYHU LQ EXOWXUH DQG RQO\ UHFHQWO\ PROHFODU JHQHWLFV WRRV KDYH EHHQ GHYHORSHG XVLDWEOH IRU WKH VWXG\ RI WKLV VSLURFKHWH. 7KHVH IDFWRUV KDYH FRQWULEXWHG WR D ODJ LQ WKH XQGHHVWDQGLQJ RI LWV YLUXOHQFH PHFKDQLVPV, LWV LPPXQRJHQLF SURSHUWLHV DQG ILQDOO\ D ODJ LQ WKH GHYHORSHPHQW RI YDFFLQHV WKDW PD\ LQGXFH VWURQJ DQG GXUDEOH SURWHFWLRQ.

7R GDWH, GLIIHUVHQW PHWKRGV IRU LQDFWLYDWLRQ RI OHSWRVSLUHV IRU XVH DV YDFFLQHV KDYH EHHQ DSSOLHG, WKHVH LQFOXGH IRUPDOLQ, SKHQRO, HWKDQRO, KHDW, IUHHJH DQG WKDZ DQG UDGDLWLRQ; DQG DIWHU 100 \HDUV WKH RQO\ OLFWHQVHG YDFFLQHV DUH ZKROH OHSWRVSLUD LQDFWLYDWHG EDFWHULQV. 7KHVH KDYH EHHQ XVHG WR LPPXQLJH DQLPDOV, PDLQO\ GRJV, FDWWOH DQG SLJV. EHFDXVH RI SUREOHPV ZLWK FRPSRQHQQV RI WKH EXOWXUH PHGLD DQG UHDFWRJHQLFLW\, VXFK EDFWHULQV KDYH QRW EHHQ ZLGHQ\ DFFHSHG IRU XVH LQ KXPDPV, KRZHYHU KXPDPQ EDFWHULQ YDFFLQHV KDYH EHHQ XVHG VXFHHVVIXOO\ LQ VHYHUDO UHJLRQV, LQFOXGLQJ &KLQD, -DSDQ, &XED, DQG (XURSH. 1R OLYH YDFFLQHV DUH FXUUHQWO\ OLFWHQVHG.

6WXGLHV RI SDUDVLWL /HSWRVSLUD LQ WKH HQYLURQPHQW DUH

YHU\ OLPLWHG PDLQO\ EHFDXVH LW LV GLILFXOW WR LVRODWH WKHVH VSLURFKHWHV IURP VXUIDFH ZDWHUV RU VRLO ZLWKRXW JHWLQJ FRQWDPLQDWLRQ ZLWK VDSURSK\WLF /HSWRVSLUD. +RZHYHU, JHQRP LF VWXGLHV VXJJHVW WKDW SDUDVLWL /HSWRVSLUD HYROYHG IURP DQ HQYLURQPHQWDO (IUHH OLYLQJ) /HSWRVSLUD IRXQG LQ ZDWHU RU PXG, VLPDOUO\ WR WKH FRQWHPSPRUDU\ PHPEHUV RI WKH VDSURSK\WLF FOXVWHU (VXFK DV /. ELIOH[D). 7KHUH VHHPV WR EH VRPH HYROXWLRQDU\ YDULDWLRQ ZLWKLQ SDUDVLWL OHSWRVSLUHV; VRPH VSHFLHV (VXFK DV /. LQWHUURJDQV) KDYH UHWDLQHG JHQHV DVVRFLDWHG WR HQYLURQPHQWDO VXUYLYDO ZKHUHDV RWKHU SDUDVLWL OHSWRVSLUHV (VXFK DV /. ERUJSHWHUVHQLL) VHP WR KDYH ORVV WKHVH JHQHV. /HSWRVSLUD VXUYLYDO LQ ZDWHU LV EROVWHUHG E\ YLVFRXV PDWHULDO VXFK DV DJDU (DQG SRVLEO\ ELRILOP). 6RPH VWUDLQV RI SDUDVLWL /HSWRVSLUD DUH DEOH WR SURGXFH ELRILOPV ZKHQ LQFXEDWHG LQ IUHVK ZDWHU HYHQ XQGHU WKH DEVHQFH RI QXWULHQWV, IXUWKHUPRUH /. LQWHUURJDQV (3DWKRJHQLF FOXVWHU) KDV EHHQ IRXQG LQ QDWXUH DVVRFLDWHG WR ELRILOPV IRUPHG E\ HQYLURQPHQWDO EDFWHULD. 6RPH SDUDVLWL OHSWRVSLUD DUH DEOH WR SURGXFH ELRILOPV ZKHQ LQFXEDWHG LQ GLVWLOOHG ZDWHU (ORZ QXWULHQW FRQGLWLRQV) DQG VHHPHG WR GHWHFW QXWULHQW VXFK DV IDWW\DFLG FDXVLQJ WKH GLVSHUVRQ (UHOHDVH) RI OHSWRVSLUD FHOV IURP WKH ELRILOP. ,W KDV EHHQ REVHUYHG WKDW OHSWRVSLUD ELRILOP KDV D ILYH WR VL[IROG LQFUHDVH LQ DQWLRLWLHV UHVLVWDQFH LQ DOO WKH VWUDLQV XVHG. ,W LV WHPSWLQJ WR VSHFXODWH WKDW ELRILOPV PD\ SURWHFW SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD DJDLQVW RWKHU WR[LF FRPSRXQGV LQ WKH HQYLURQPHQW. 7KH UROH RI ELRILOP LQ WKH WUDQVPLVLRQ RI /HSWRVSLUD WR VXVHSHWLEOH KRWWV DUH VWLOO XQFOHDU.

6RLO PD\ DOVR SOD\ D UROH LQ HQYLURQPHQWDO VXUYLYDO; VRPH UHVHDFKHUV KDYH VKRZQ WKDW /HSWRVSLUD VXUYLYHG LQ WKH ZHW VRLO RQ GU\ GD\V DQG DSSHDUHG LQ WKH VXUIDFH ZDWHU RQ UDLQ\GD\V, VXJJHVWLQJ WKDW VRLO FRXOG EH D UHVHUYRLU IRU OHSWRVSLUHV LQ WKH HQYLURQPHQW. (YHQ WKRXJK OHSWRVSLUHV DUH FRQVLGHUHG DV IUDLOH VSLURFKHWHV, VWXGLHV KDYH VKRZQ WKDW WKH FDQ VXUYLYH DQG HYHQ PDLQWDLQ WKHLU YLUXOHQFH GHVSLWH XQIDYRUDEOH FRQGLWLRQV VXFK DV FROG DQG QXWULHQW-SRRU DFLGLF ZDWHUV DIWHU XS WR 20 PRQWKV.

7KHUH LV QR VWDQGDUG SURWRFROV WR EXOWXUH SDUDVLWL VSHFLHV RI /HSWRVSLUD IURP ERGLHV RI IUHVK ZDWHU RU VRLO. 7KHUH DUH RQO\ IHZ UHSRUWV GHVFULELQJ LVRODWRQ RI SDUDVLWL /HSWRVSLUD IURP HQYLURQPHQWDO VDP SOHV DQG WKH UHSRUWV VKRZ OLWWOH VXFHHVV; WKH PDLQ GLILFXOW\ LQ WKH LVRODWRQ RI WKHVH VSHFLHV LV WKH RYHUJURZWK RI HQYLURQPHQWDO EDFWHULD RU WKH IDVW-JURZLQJ VDSURSK\WLF /HSWRVSLUD. ORHFXODU WHFKQLTXHV DUH D ORW PRUH SURPLVLQJ DW GHWHFWLQJ SDUDVLWL /HSWRVSLUD LQ WKH HQYLURQPHQW. 0DQ\ 3&5 SURWRFROV KDYH EHHQ GHYHORSHG XVLQJ PDLQO\ JHQHV WKDW DUH SUHVHQWRQO\ LQ SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD VXFK DV WKH KHPRO\VLV-DVVRFLDWHG SURWHLQ-IHQH, OLS/32, RU SDWKRJHQLF VSHFLILF VHTXHQFHV RI JHQHV VXFK DV 10D%, VHF<, DQG 166 ULERVPRD JHQH. 7KH PDLQ OLPLDWLRQ RI PDQ\ RI WKHVH DQDO\HV LV WKDW WKH IDLO WR GHWHFW SDUDVLWL /HSWRVSLUD RI WKH LQWHUPHGLDWH FOXVWHU ZKLFK DUH FRPPRQO\ IRXQG LQ ZDWHU. HWHFWLRQ RI JHQRP LF '1\$ VHTXHQFHV GR QRW JXDUDQW\ WKH YDELOLW\ RI EDFWHULD LQ ZDWHU RU RWKHU VDP SOHV. 51\$ PHWKRGV DUH XQGHU GHYHORSHPHQW WR GHWHFW YLDEOH EDFWHULD.

1.0 (SLGHPLRORJ\ RI WKH 'LVHVDH DQG 3DWKRJHQ(V)

/HSWRVSLURVLV LV D GHDGO\ EDFWHULDO LQIHFWLRQ FDXVHG E\ SDWKRJHQLF PHPEHUV RI WKH JHQXV /HSWRVSLUD. +XPDQ OHSWRVSLURVLV KDV ORQJ EHHQ UHFRLJQLJHG DV DQ HQYLURQPHQWDO GLVHDVH, ZLWK GRFXPHQWHG UHSRUWV GDWLQJ DW OHDVW D FHQWXU\ DJR (IRJXFKL, 1918). 7RGD\, LW LV FOHDUO\ DFNQRZOHGJHG WKDW PRVW KXPDPQ LQIHFWLRQV RULJLQDWH IURP HQYLURQPHQWDO H[SRVXUH WR ZDWHU DQG VRLOV FRQWDPDQDWHG E\ WKH XULQH H[FUHWHG E\ LQIHFWHG DQLPDOV. +XPDQ H[SRVXUH WR FRQWDPDQDWHG ZDWHU PRVWO\ RFFXUV WKURXJK EDWKLQJ RU VZLPPPLQJ LQ QDWXUDO IUHVKZDWHU ERGLHV, EXW LVRODWHG FRQWDPDQDWHG RI ZDWHU VXSSOLHV KDV DOVR EHHQ LQYROYHG LQ RXWEUHDNV RI OHSWRVSLURVLV (UHYLHZHG LQ /HYHWW, 2001).

/HSWRVSLURVLV LV YHU\ FKDOOHQJLQJ WR GLDJQRVH FOLQLFDOO\ (GXFDWLQJ FOLQLFDQV DERXW FRQVLGHULQJ OHSWRVSLURVLV ZKHQ SDWLHQWV SUHVHQW ZLWK DFXWH IHEULO\ V\QGURPHV, SDUWLFXODUO\ ZKHQ WKHUH KDV EHHQ UHFHQWH[SRVXUH WR IUHVKZDWHU, FRXOG JUHDWO\ LPSURYH GLDJQRVLV. \$OWKRXJK OHSWRVSLUHV DUH FRQVLGHUHJ WR EH YHU\ IUDJLOH EDFWHULD, EHLQJ KLJKO\ VVVFHSWLEOH WR D QXPEHU RI SK\VLFDQ DQG FKHPDFDQ DJHQWV (DLQH HW DO., 1999), WKH\ SUHVHQW DQ D\VRQLVKLQJ FDSDFLW\ WR VXUYLYH LQ IUHVKZDWHU HFRV\WWHPV IRU ZHHN WR PRQWKV. +RZHYHU, OLWWOH LV NQRZQ DERXW WKH IDWH RI SDWKRJHQLF OHSWRVSLUHV LQ ZDWHU, GHVSLWH WKH LPSRUWDQFH RI VXFK NQRZOHGJH WRZDUGV SUHYHQWLQJ WKLV SRWHQWLDUO\ IDWDO EDFWHULDO LQIHFWLRQ LQ KXPDPQV.

7KHU DUH WKUHH PDLQ UHVRQV IRU OLPLWHG NQRZOHGJH DERXW WKH IDWH RI OHSWRVSLUHV LQ ZDWHU.)LUVW, WKH JHQXV /HSWRVSLUD FRPSULVHV ERWK YLUXOHQW VSHFLHV, ZKLFK DUH WKH HWLORJLFDQ DJHQWV RI KXPDPQ DQG DQLPDO OHSWRVSLURVLV, DQG VDSURSK\WLF VSHFLHV, ZKLFK DUH QRQ-YLUXOHQW QRUPDO LQDELWDQWV RI IUHVKZDWHU HFRV\WWHPV. 6HFRQG, WKH WD[RQR\ RI WKH JHQXV KDV ORQJ EHHQ EDVHG RQ VHUORJ\, ZKLFK GLVWLQJXLVKHG DOPRVW 300 VHURYDUV JURXSHG LQWR PRUH WKDQ 23 VHURJURXS, EXW RQO\ WZR VSHFLHV (/HSWRVSLUD LQWHUURJDQV VHQV\ ODWR, ZKLFK JURXSHG DOO YLUXOHQW VSHFLHV, DQG /HSWRVSLUD ELIOHJD VHQV\ ODWR IRU DOO VDSURSK\WLF VSHFLHV XQWLO WKH 1980V). 7KH WZR SUHYLRXV VSHFLHV JURXSLQJ RI WKH 1980V KDYH VLQFH EHHQ GHFODUHG LQYDOLG, EDVHG RQ PRUH UHFHQW FKDUFWHULJDLWRQ XVLQJ JHQHWLF PROHFODU WD[RQR\, ZKLFK WR GDWH KDV GLVFULPLQDWHG DW OHDVW 35 VSHFLHV (%UHQQHU HW DO., 1999; 5DPDGDVV HW DO., 1992; <DVXGD HW DO., 1987; 7KLEHDX\ HW DO., 2018E; 7KLEHDX\ HW DO., 2018D). ,Q DGGLWLRQ, DQRWKHU JURXS RI /HSWRVSLUD (QDPHG NLQWHUPHGLDWHV) KDV DOVR EHHQ GHVFULEHG (6FKPLG HW DO., 1986; 3HURODW HW DO., 1998), ZKLFK FXUUHQWO\ LQFRUSRUDWHV 11 VSHFLHV ZLWK DW OHDVW VRPH GLVSODLQJ VRPH GHJUHH RI YLUXOHQFH. (DUO\ VFLHQWLILF UHSRUW GLG QRW DOZD\V GHVFULEH ZKHWKHU WKH OHSWRVSLUHV VWXGLHG KDQ VRPH YLUXOHQFH SRWHQWLDQ. 7KH ROGHU OLWHUDWXUH WKUHUHUH QHHGV WR EH LQWHUSUHHG ZLWK FDXWLRQ WR FRQVLGHU WKHVH WD[RQRPLFDQ GLIHUHQFHV. 7KLUG, DQG ILQDOO\, \HW DV LPSRUWDQWO\, SDWKRJHQLF VWUDLQV RI /HSWRVSLUD DUH FORZJURZLQJ, DQG FDQ HDVLO\ EHFRPH RYHUJURZQ E\ VDSURSK\WLF VSHFLHV DQG RWKHU PLFURRUJDQLVPV, HYHQ ZLWK VHOHFWLYH FXOWXUH PHGLXP. 6WLOO, WKH ERG\ RI OLWHUDWXUH SXEOLVKHG RYHU WKH ODVW FHQWXU\ LV SURYLQJ XVHIXO LQ EXOLOGJQ VRPH NQRZOHGJH DERXW WKH RFFXUUHQFH, SHUVLVWHQFH DQG VXUYLYDO RI OHSWRVSLUHV LQ ZDWHU. 3XWVLQJ WKLV NQRZOHGJH WRHJKHU FDQ KHOS LPSURYH SUHYHQWLQJ RI WKLV VLJQLILFDQW, SRVLEO\

UHHPHUJLQJ, HQYLURQPHQWDO GLVHDVH.

1.1 *OREDO %XUGHQ RI 'LVHVDH

1.1.1 *OREDO GLVWULEXWLRQ

2QH RI WKH ILUVW GHVFULSWLRQV RI WKH GLVHDVH QRZ NQRZQ DV OHSWRVSLURVLV ZDV UHSRUWHG E\ /DUUH LQ 1812, GXULQJ D EORFNDGH RI IDSROHRQmV WURRSV LQ &DLUR; DQG PRUH WKDQ D FHQWXU\ DJR \$GROSK :HLO GHVFULEHG D VHYHUH IRUP RI WKH GLVHDVH, VLQFH NQRZQ DV :HLOmV GLVHDVH. /HSWRVSLURVLV LV DQ LPSRUWDQW DQG RIWHQ LJQRUHJ GLVHDVH DIIHFWLQJ PRUH WKDQ RQH PLOOLRQ SHRSOH SHU \HDU ZRUOGZLGH, ZLWK 58,900 GHDWKV (&RVWD HW DO., 2015; .R HW DO., 2009). /HSWRVSLURVLV RFFXUV ZRUOGZLGH, EXW LW LV PRUH IUHTXHQWO\ IRXQG LQ KXPLG WURSLFDQ FOLPDWHV, HVSHFLDOO\ LQ UHJLRQV ZLWK SRRU VDWLWDU\ LQIUDVWUXFWXUH, GHILFLHQW GUDLQDJH, DQG DV D UHVXOW, ODUJH QXPEHUV RI D NH\ DQLPDO UHVHUYRLU: UDWV. :KLOH LQDSSURSULDWH PDQDJHPHQW RI KXPDPQ H[FUHW D\ VXSSRUW URGHQW GHQVLWLV DQG WKHUH\ EH D FRQWULEXWLQJ IDFWRU, KXPDPQ LQIHFWLRQV DUH RIWHQ D\VRFLDWHG ZLWK H[SRVXUH WR QDWXUDO ERGLHV RI ZDWHU (ZHW IDUPLQJ). 2XWEUHDNV WHQG WR RFFXU GXULQJ UDLQ\ VHDVRQV DQG LW KDV EHHQ D\VRFLDWHG ZLWK IORRGLQJ ('OOD 5RVVD HW DO., 2016; *DQRJ\DW HW DO., 2006; 7UHYHMR HW DO., 1998; &RQFHSFLRQ-\$FHYHGR HW DO., 2018; 5HDUGRQ, 2017). 7KH GLVHDVH KDV D EURDG JHRJUDSKLFDQ GLVWULEXWLRQ GXH WR WKH ODUJH VSHFWXP RI KRWWV, LQFOXGLQJ GRPHVWLF DQG ZLOG PDPPDOV, LQFOXGLQJ UDWV DQG PLFH, ZKLFK KDUERU WKH EDFWHULXP LQ WKHU NLGQH\V DQG UHOHDVH LW WKURXJK WKHU XULQH (&DUPRDQ *DVFD HW DO., 2013; 'LHWULFK HW DO., 2015; .R HW DO., 2009). 9DULRXV DQLPDO KRWWV DUH IXUWKHU GLVFXXVHG LQ 6HFWLRQ 1.3.2. /HSWRVSLURVLV DIIHFWV ULVN JURXS WKDW DUH H[SRVHG WR DQLPDO UHVHUYRLUV RU XULQH-FRQWDPDQDWHG HQYLURQPHQWV, VXFK DV YHWULQDULDOV, DEDWRLU ZRUNHUV, VHZDJH ZRUNHUV, PLOLWU\ SHUVRQQHO, SHRSOH LQ FRQWDFW ZLWK QDWXUDO ERGLHV RI ZDWHU, DQG LQFUHDVLQJO\ LQFOXGLQJ LQGLYLGDQV SDUWDLQJ LQ ZDWHU VSRUWV DQG UHFUHDWLQJ (\$JDPGRGL HW DO., 2014; .DWJ HW DO., 2002; .R HW DO., 2009; /DX HW DO., 2010; 0RUJDQ HW DO., 2002; 6HMYDU HW DO., 2003). /HSWRVSLURVLV LV UHJDUGHG DV WKH PRVW ZLGHVSUHDG JRRQRWLF GLVHDVH (YDQJHOLVWDQ DQG &REXUQ, 2010) DQG LV UHHPHUJLQJ LQ UHJLRQV RQFH WKRXJK WR EH UHODWLYHO\ UHH RI WKH SDWKRJHQ, VXFK DV QRUWKHUQ 6ZHHGQ (6WUDQG HW DO., 2015) (VH 7DEOH 1 EHORZ).

1.1.2 6PSWRPDWRORJ\ (PRUELGLW\ DQG FDVH-IDWDO\W\ UDWLWV)

7KH V\PSWRPV RI OHSWRVSLURVLV YDU\ IURP DV\PSWRPDWLF WR D VHYHUH KHPRUUKDJLQ DQG/RU PXOWL-RUJDQ GLVHDVH. 7KH VHYHULW\ RI WKH GLVHDVH GHSHQGV RQ WKH /HSWRVSLUD VSHFLHV (\$OVWRQ, 1935) DQG WKH DELOLW\ RI WKH VWUDLQ WR FDXVH LQIHFWLRQ. 7KH GLVHDVH FDQ EH GLYLGHG LQ WZR VWDJHV; LQ WKH ILUVW VWDJH (VHSWLFHPLF SKDVH), OHSWRVSLUHV PXOWLSO\ LQ KRWWVm EORRG DQG RWKHU WLVVXHV DQG FDXVH IHYHU, FKL00V, KHDGDFKH, DQRUHLQ, P\DOJLD (PDLQO\ LQ FDOYHV) DQG QDXVHD RU IXOPLQDQW FDVHV, DQG LQ WKH LPPXQH SKDVH FRQMXQFWLYDO VXIIXVLQJ DQG MDXQGLFH. +HDGDFKH, SKRWRSKRELD, QDXVHD, UHWUR-RUELWDO SDLQ PD\ LQGLFDWH WKH SUHVHQFH RI /HSWRVSLUD LQ WKH FHUHEURVSLQDO IOXLG (3LFDUGHD, 2013). 6HYHUH OHSWRVSLURVLV (:HLOmV GLVHDVH RU VHYHUH SXOPRQDU\ KHPRUUKDJH V\QGURPH) FDQ GHYHORS DIWHU WKH VHSWLFHPLF SKDVH. :HLOmV GLVHDVH LV FKDUFWHULJHG E\ KHPRUUKDJH,

MDXQGLFH, DQG UHQDO IDLOXUH (%KDUWL HW DO., 2003), ZKLOH VHYHUH SXOPRQDU\ KHPRUUKDJH LV OLQNHG WR PDVVLYH LQWUD-DOYHRODU EOHHLGLQJ. ORUWDOLW\GXH WR WKHVH 2 V\QGURPHV PD\ UDQJH IURP 5115% DQG UHQDO IDLOXUH PD\ DIIHFW 16140% RI FDVHV. 3XOPRQDU\ SDWKRORJ\ PD\ RFFXU LQ 20170% RI WKH FDVHV DQG V\PSWRPV PD\ UDQJH IURP FRXJK, G\VSQHD, KHPRSW\LV, WR UHVSUDWRU\ GLVWUHV V\QGURPH (\$GOHU DQG GH OD 3HgD-ORFWHJXP, 2010). 'HDWK FDQ RFFXU IURP NLGQH\ IDLOXUH, SXOPRQDU\ KHPRUUKDJH, RU RWKHU VHULRXV PXOWL-RUJDQ V\VWHP G\IXQFWLRQ.

1.2 7D[RQRPLF & ODVVILFDWLRQ RI WKH \$JHQW(V)

/HSWRVSLURVLV LV FDXVHG E\ VSLURFKHWHV RI WKH JHQXV /HSWRVSLUD, ZKLFK FXUUHQW\ FRPSULVHV 35 VSHFLHV WKDW DUH SK\ORJHQHWFDOO\ VHSUDUDWHG LQWR WKUHH FOXVWHUV: 13 SDWKRJHQLF, 11 VDSURSK\WLF, DQG 11 LQWHUPHGLDWH (\$GOHU DQG GH OD 3HgD-ORFWHJXP, 2010; 7KLEHDX\ HW DO., 2018E; 7KLEHDX\ HW DO., 2018D). 7KH HWLORJLF DJHQWV RI WKLV GLVHDVH DUH SDWKRJHQLF DQG LQWHUPHGLDWH VSHFLHV RI /HSWRVSLUD, ZKLFK FRPSULVH PRUH WKDQ 260 VHURYDUV (\$GOHU, 2015D). 3DWKRJHQLF DQG LQWHUPHGLDWH FOXVWHUV KDYH EHHQ UHSRUWHG WR FDXVH LQIHFWLRQ DQG, LQ WKLV &KDSWHU, ZH ZLOO UHIIU WR WKHP DV nYLUXOHQW\ /HSWRVSLUD. 7KH RUJDQ\LV LV D WKLV VSLURFKHWH RI 0.1 WR 0.2 cP LQ GLDPHWHU DQG 6 WR 12 cP LQ OHQJWK, VR LW PD\ HYHQ SDVV WKURXJK 0.22 cP ilowhuv. +HQFH 0.22 cP SUH-ILOWDULRQ LV RIWHQ XVHG WR GHFRQWDPDQWH /HSWRVSLUD FXOWXUHV IURP RWKHU EDFWHULD ((YDQJOLVWD DQG &REXUQ, 2010). ,W LV D KLJK\ PRWLOH EDFWHULXP VKRZLQJ WUDQVODWLRQDO PRWLOLW\, WUDYHOOHQJ DSSUR[LPDWHO\ 20 kP LQ 2 WR 3 VFRQGV LQ RUGLQDU\ PHGLD. ,W KDV EHHQ GHPRQVWUDWHG WKDW VXFK D PRWLOLW\ LV GXH WR LWV FRLOHG SHULSODVPLF IODJHOXP WKDW URWDWHV DW WKH OHDGLQJ HQG, JHQHUDWLQJ D KHOLFDO ZDYH WKDW SURSHOV WKH FHOE\ UROOLQJ LQ DQ GLUHFWLRQ RSSRVLWH WR WKDW RI WKH IODJHOODU JUDWLRQ (*ROGVWHLQ DQG &KDURQ, 1988, 3LFDUGHDX HW DO., 2001).

1.3 7UDQVPLVVLRQ

1.3.1 SRXWHV RI WUDQVPLVVLRQ

/HSWRVSLUD, DV D IUDJLOH VSLURFKHWH, LV QRW UHVLVWDQW WR GHVLFDFWLRQ, VR DTXHRXV HQYLURQPHQWV DUH QHFHVVDU\ IRU VXUYLYDO DQG WUDQVPLVVLRQ DPRQJ PDPDQV VKDULQJ D FRPPRQ HQYLURQPHQW (\$GOHU, 2015D). 7UDQVPLVVLRQ RI /HSWRVSLUD WR VXVHSHWLEOH KRWWV XVXDOO\ RFFXUV WKURXJK FRQWDFW ZLWK XULQH RU ZDWHU VRXUFHV FRQWDPDQWHG ZLWK DQLPDO XULQH (.R HW DO., 2009). 6LFN DQLPDOV XVXDOO\ VKHG YLUXOHQW OHSWRVSLUHV GXULQJ WKH LPPXQH SKDVH DQG FRQYDOHVFHQFH RI WKH GLVHDVH (DV\PSWRPDWLF FDUULHUV). SRGHQWV, RQ WKH RWKHU KDQG, XVXDOO\ DUH UHVLVWDQW WR GLVHDVH, EXW FDQ UHPDLQ LQIHFWHG DQG DFW DV FRQWLQXRXV UHVHUYRLUV, VKHGGHQJ LQIHFWLQJ OHSWRVSLUHV WKURXJK XULQH WR HQYLURQPHQW IRU OLH (7KLHUPDQ, 1981). ORVW PDPDQV FDQ FDUU\ OHSWRVSLUHV ZLWK QR VLQV RI GLVHDVH RU RQ\ PLOG FOLQLFDO PDQLHVWDWLRQV. 6XFK VXEFOLQLFDO LQIHFWLRQV DUH FDXVHG PDLQO\ (EXW QRW H[FOXVLYHO\) E\ KRWW-DGDSWHG VHURYDUV. 7KH WKUHH PDLQ HQYLURQPHQWV LQGLFDWLQJ KXPDQ WUDQVPLVVLRQ ULNV DUH ZDWHU-EDVHG, URGHQW-ERUQH DQG OLYHVWRFN/SHW-ERUQH HQYLURQPHQWV.

1.3.2 +XPDQ, DQLPDO, DQG HQYLURQPHQWDO UHVHUYRLUV

/HSWRVSLURVLV LV SULPDULO\ DQ DQLPDO GLVHDVH DIIHFWLQJ ZLOG DQG GRPHVWLF PDPDQV. \$FXWH OHSWRVSLURVLV LQ DQLPDOV FDQ SUHVHQQW ZLWK WKH VDPH FOLQLFDO SDWWHUQV DV LQ KXPDQV, PRVWO\ LQ RXQJ DQLPDOV. SIWHU WKH VHSWLFLHPLF SKDVH, RQFH WKH FLUFQDOWLQJ DQWLERG\ WLWHUV KDYH ULVHQ, SDWKRJHQLF VHURYDUV RI /HSWRVSLUD XVXDOO\ DFFXPXODWH LQ NLGQH\, LQVLGH WKH UHQDO WEXOHV; VR WKDW LQIHFWHG DQLPDOV VKHG SRWHQWLDQO\ LQIHFWLQJ OHSWRVSLUHV WR WKH HQYLURQPHQW WKURXJK WKHLU XULQH. ,W FDXVHV LPSRUWDQW ORVVHV WR OLYHVWRFN RSHUDWLRQV (HVSFLDOO\ FDUWHQ DQG VZLQH), PDLQO\ EHFDDXVH RI DERUWLRQ DQG LQIHUWLOLW\ ,Q GRJV WKH GLVHDVH VKRZV DW OHDVV WKUHH GLIHUHQW SDWKRORJLF V\QGURPHV: LFWHULF V\QGURPH, XUHPLF V\QGURPH DQG KHPRUUKDJLF V\QGURPH (\$GOHU DQG GH OD 3HgD-ORFWHJXP, 2010). 6HURSUHYDOHQFH LQ FDUWHQ PD\ EH DV KLJK DV 84% DQG LQ GRJV 35% (GH JUHLWDV HW DO., 2010, (OOLV HW DO., 1986E, 20LYHLUD /DYLQV\ HW DO., 2012, 6FKXOOHU HW DO., 2015). /RZHU LQFLGHQFHV KDYH EHHQ IRXQG LQ RWKHU GRPHVWLF DQLPDOV DPRQJ WKHP VKHS DFWLQJ PDLQO\ DV DV\PSWRPDWLF UHVHUYRLUV (&HUUL HW DO., 1996, (OOLV HW DO., 1994, /LOHQEDXP HW DO., 2009); LQ KRUVHV WKH GLVHDVH XVXDOO\ KDV D FKURQLF FRXUVH UHVXOWLQJ LQ UHFUXUHQW XYHLWL ((58) EHLQJ WKH PDLQ FDXVH RI HTXLQH EOLQGQHVV (+DOOLZHO HW DO., 1985, ODODODQD HW DO., 2015, :ROODQNH HW DO., 2001). &DW DUH XVXDOO\ UHVLVWDQW WR LQIHFWLRQ XQOHVV D FRQFXUUHQW LPPXQRVXSUHVVLV GLVHDVH PLJKW EH DIIHFWLQJ WKHP, VXFK DV IHOHQ OHXNHPLD YLUX RU IHOHQ \$,'6 (\$RFDU-\$HGR HW DO., 2014, +DUWPDQ HW DO., 2013). 2XWUHDNV RI OHSWRVSLURVLV KDYH DOVR EHHQ GHVFULEHG LQ ZLOG DQLPDOV VXFK DV VHD OLRQV LQ &DOLIRUQLD (SYDORV-7eOOH) HW DO., 2016, &RODJURVV-6FKRXWHQ HW DO., 2002, 3UDJHU HW DO., 2013). 2WKHU ZLOG VSHFLHV VXFK DV UKLQRFHURVHV DQG ZROYHV PD\ VXIIHU RI DFXWH OHSWRVSLURVLV, EXW SUREDEO\ RQO\ ZKHQ NSW LQ FDSWLYLW\ (1HLIHU HW DO., 2001). SRGHQWV SOD\ DQ LPSRUWDQW UROH LQ WUDQVPLVVLRQ DQG DUH FRQVLGHUHG WKH SULQFSDO UHVHUYRLUV WKDW PDLQWDLQ OHSWRVSLUHV SUHVHQQW LQ HQYLURQPHQW DQG WKH PDLQ VRXUFH RI LQIHFWLRQ WR VXVHSHWLEOH KRWWV VXFK DV SLJV, GRJV, JRR DQLPDOV DQG KXPDQV (\$WKDQJLR HW DO., 2008, &RVW HW DO., 2014, +DDNH DQG /HYHWW, 2015). 'H)DULD HW DO. (2008) UHSRUWHG WKDW XS WR 80.3% RI 1RUZD\ UDWW (5DWXV QRUYHJLFXV), D VSHFLHV WKDW VSUHDG DOPRVW DOO RYHU WKH JOREH, ZHUH FXOWXU SRVLWLYH DQG 68.1% ZHUH VKRZQ SRVLWLYH E\ DQWLERG\ WLWHUV RI DW OHDVV 1:100 LQ D PLFURVFRSLF DJOXWLQDWLRQ WHVW (O\$7). 2WKHU VSHFLHV RI ZLOG PDPDQV KDYH EHHQ GHWHFWHG DV OHSWRVSLUD FDUULHUV (\$GUHROL HW DO., 2014, 'XQFDQ HW DO., 2012, 3LQD HW DO., 2012, 6FLDOID HW DO., 2013). ,Q)UDQFH, VHURSRVLWLYLW\ UDWHV ZHUH IRXQG WR UDQJH IURP 31% LQ IDUPHG \$PHULFDQ PLQN, 74% LQ ZLOG (XURSHDQ PLQN DQG XS WR 89% LQ VWRQH PDUWHQV (ORLQHW HW DO., 2010). ,Q WKH 8QLWHG .LQJGRP, VHURSRVLWLYLW\ UDWHV ZHUH 6.2% LQ ZDWHU YROHV (*HOOLQJ HW DO., 2015). %DWV IURP GLIHUHQW FRQWLQHQW KDYH DOVR EHHQ VKRZQ DV FDUULHUV RI GLIHUHQW /HSWRVSLUD VSHFLHV, ZLWK D YDULDEOH H[FWHULRQ UDWHV (IURP 6 WR 45%) (LHWULFK HW DO., 2015). ORVW LQIHFWHG DQLPDOV UHFHYHU DQG EHFRPH DV\PSWRPDWLF FDUULHUV IRU ORQJ SHULRGV RI WLPH, VKHGGHQJ OHSWRVSLUHV WKURXJK WKHLU XULQH ('OOD SRVVD HW DO., 2016, .R HW DO., 2009, 9LOODQXHYD HW DO., 2014). 6RPH VHURYDUV DUH DGDSWHG WR D VSHFLILF DQLPDO VSHFLHV, VHURYDU &DQLFROD WR GRJV (ORUULVRQ DQG :ULJKW, 1976), VHURYDU +DUGMR WR FDUWHQ ((OOLV HW DO., 1986E), VHURYDUV 3RPRQD DQG %UDWLVDYD WR SLJV ((OOLV HW DO., 1986D; 6WDOKHLP,

1968), VHURYDU 3RPRQD WR KRUVHV (+DOOLZHO HW DO., 1985, 9HUPD HW DO., 2013D), VHURYDU %DOOX WR PLFH(&DUPRQD *DVF HW DO., 2013; GD 6LOYD HW DO., 2010; %UHP HW DO., 1995), VHURYDU,FWHURKDHPRUUKDJLDH WR UDWV (7KLHUPDQD, 1981; \$GOHU DQG GH OD 3HgD-ORFWHJXP, 2010). ([FHSW LQ VSHFLILF HQGHPLF VHWVLQV (*DQRJD HW DO., 2010), FKURQLF UHQDO FDUULDJH LQ KXPDPV LV YHU\ UDUH DQG GRHV QRW VLJQLILFDQW\ FRQWULEXWH WR WKH HSLGHLROR\ RI OHSWRVSLURVLV. +XPDP WR KXPDP WUDQVPLVLRQ LV D YHU\ UDUH HYHQW DQG KXPDP PRVW\ DFTXLUH WKH GLVHDVH GLUHFWO\ IURP DQLPDOV (L.H., FRQWDFW ZLWK XULQH RU WLWVXH) RU PRUH IUHTXHQW\ LQGLUHFWO\ (L.H., FRQWDFW ZLWK XULQH-FRQWDPDQDWHG ZDWHU) (.RLJXPL HW DO., 2009, .R HW DO., 2009).

1.3.3 QFXEDWLRQ SHULRG

/HSWRVSLURVLV KDV D YDULDEOH LQFXEDWLRQ SHULRG GHSHQGLQJ RQ YLUXOHQH RI WKH LQHFWRQJ VWUDLQ LQHFWRQJ GRVH DQG WKH SDWLHQW VVFXSWLEOLW\ (HYHWW, 2001). (QWUDQH RI SDWKRIHQQLF /HSWRVSLUD WR VVFXSWLEOH KRVW RFFXUV WKURXJK PFXRXV PHPEUDQHV RU VNLQ DEUDVLRQV (\$GOHU DQG GH OD 3HgD-ORFWHJXP, 2010; /HYHWW, 2001). /HSWRVSLUH VUHDFK WKH EORRGVWUHDQ DQG UHSOLFDPH LQ WKH DEVHQFH RI VSHFLILF DQWLERGLHV (OHSWRVSLUHLDP), GLVVHPLQDWLQJ WR PDQ\ WLWVXH (&RXWLQKR HW DO., 2014, .R HW DO., 2009). 7KLV SKDVH LV FDOOHG VHSWLFHPLF SKDVH DQG WSLFDOO\ LV FKDUFDWHULJHG E\ IHYHU, P\DOJLD, DUWKUDOJLD, HUWKHPD DQG FHSKDOJLD (\$OVWRQ, 1935) DQG ODVWLQJ IURP WUHH WR WHQ GD\\$. SIWHU WKLV SKDVH, VHUXP DQWLERGLHV EHFRPH HOHYDWHG DQG OHSWRVSLUH FRUHVSRQGLQJ\ GLVDSSHU IURP WKH EORRGVWUHDQ (.R HW DO., 2009; /HYHWW, 2001). 6WXGLHV LQ DQLPDOV, SDUWLFXODU\ KDPVWHUV, KDYH UHYDOHG WKDW PRVW WLWVXH DUH LQYDGHG, HVSFLDOO\ NLGQH\, ZKHUH OHSWRVSLUH DOORFDWH LQWR WKH UHQDO WXEXOHV DZD\ IURP WKH FLUFODWLQJ VSHFLILF DQWLERGLHV (&RXWLQKR HW DO., 2014). /HSWRVSLUH DUH VXEVTXHQW\ VKHG WR WKH HQYLURQPHQW YLD XULQH (OHSWRVSLUXULD). 7KLV VHFRRG SKDVH RI WKH GLVHDVH, LQ ZKLFK OHSWRVSLUH DUH VKHG, LV FDOOHG WKH LPPXQH SKDVH DQG FDQ ODVW IRU ORQJ SHULRGV RI WLP, HYHQ IRU OLIH LQ UHVHUYRLU DQLPDOV (.R HW DO., 2009). ODQ\ RI WKH VHYHU\ \PSWRPV RI WKLV SKDVH RI WKH GLVHDVH PD\ EH GXH WR LPPXQRSDWKOR\ (UDJD HW DO., 2011).

1.3.4 3HULRG RI FRPPXQLFDELOLW\

\$OWKRJK YHU\ UDUH FDVHV RI LQWHU-KXPDP WUDQVPLVLRQ KDYH EHHQ VVXSHFWHG DQG UHSRUWHG, OHSWRVSLURVLV LV QRW D FRQWDLRXV GLVHDVH. 7KHUHIRUH, WKLV VHFWRQ GLVFXVHV FRPPXQLFDELOLW\ IURP WKH DQLPDO UHVHUYRLU DQG KXPDP VVFXSWLEOLW\ 7KHU PDLQ IDFWRUV LQWHUYHQH WR GHILQH WKH SHULRG GXULQJ ZKLFK VLFN DQLPDOV, DV\PSWRPDWLF FDUULHUV RU UHVHUYRLUV PD\ VKHG LQHFWRQJ OHSWRVSLUH WR WKH HQYLURQPHQW (\$GOHU DQG GH OD 3HgD-ORFWHJXP, 2010; +ROW HW DO., 2006).

1. 6HURYDU YLUXOHQH. 9LUXOHQH REYLXVO\ DQG GLUHFWO\ UHODWHV WR WKH LQHFWRQJ GRVH. ,W KDV EHHQ VKRZQ WKDW /HSWRVSLUD VHURYDUV YDU\ LQ WKHLU OHYHO RI SDWKRIHQQLFW\ 7KHU DUH GLIIHUHQFHV LQ YLUXOHQH (OHYHO RI SDWKRIHQQLFW\), HYHQ DPRQJ LVRODWHV RI WKH VDPH VHURYDU. 6RPH H[WUHPO\ YLUXOHQW VHURYDUV KDYH DQ H[SHULPHQWDO /₅₀ RI IRXU RU OHVV EDFWHULD (&8) SHU DQLPDO LQ WKH KDPVWHU PRGHO (6dQFKH),

2008; :DWDQDEH HW DO., 2014). ,Q DQ\ FDVH, WKH LQHFWRQJ GRVH LV FUXFLDO WR WKH VHYHULW\ RI WKH GLVHDVH. (YHQ WKRXJK VRPH VSHFLHV-DGDSWHG VHURYDUV PD\ FDXVH PLOG RU QR REYLXV VLJQV RI GLVHDVH, WKH PD\ VWLOO EH VKHG WR WKH HQYLURQPHQW WKURXJK XULQH.

2. ,PPXQH VWDWXV RI WKH KRVW. \$QLPDOV WKDW KDYH QHYHU EHHQ LQ FRQWDFW ZLWK D YLUXOHQW /HSWRVSLUD VHURYDU, \RXQJ RU LPPXQRVXSSUHVVHG LQGLYLGXDOV DUH PRUH SURQH WR DFTXLUH D VHYHU FOLQLFDO LQHFWRQJ, UHODWLYH WR DGXOWV RU LPPXQH FRPSHWHQW LQGLYLGXDOV WKDW GHYHORS D PLOG GLVHDVH. 6HYHU FOLQLFDO LQHFWRQJ PD\ HQG LQ GHDWK RI VLFN DQLPDOV. &KURQLF FDUULHUV, LQ FRQWUDVW, PD\ VKHG LQHFWRQJ OHSWRVSLUH IRU ORQJ SHULRGV RI WLP, HYHQ IRU OLIH. 2I QRWH, OHSWRVSLURVLV LPPXQLW\ LV ERWK VKRUW ODVWLQJ DQG VHURJRXS-VSHFLILF. 3HRSOH LQ K\SHUHQGHPLF DUHDV PD\ JHW OHSWRVSLURVLV VHYHUO\ WLP, HLWKHU IURP VWUDLQV EHORQJLQJ WR GLIIHUHQW VHURJRXSV RU DIWHU SRVW-LQHFWRQJ LPPXQLW\ KDV GHFOLQHG.
3. 7KH VHURYDU 1 DQLPDO VSHFLHV UHODWLRQV. ,W LV ZHOO NQRZQ WKDW VSHFLHV-DGDSWHG VHURYDUV GHYHORS PLOG RU VXEFOQLFDO LQHFWRQJ LQ WKH FRUHVSRQGLQJ DQLPDO VSHFLHV, IUHTXHQW\ OHDGLQJ WR FKURQLF FDUULDJH LQ WKHLU DQLPDO KRVW DQG FKURQLF XULQDU\ VKHGGLQJ (HYHWW, 2001). ,Q FRQWUDVW, VHURYDUV QRQ-DGDSWHG WR WKH LQHFWRQJ VSHFLHV XVXDOO\ SURGXFH VHYHU RU HYHQ IDWDO LQHFWRQJ, EXW UHVXOW LQ VKRUW-WHUP H[FUHWLRQ.

'HSHQGLQJ RQ WKHVH WUHH IDFWRUV, DQ DQLPDO PD\, RQ WKH RQH KDQG, EHFRPH VHYHUO\ VLFN DQG HYHQ GLH IURP WKH OHSWRVSLUD LQHFWRQJ, VR WKDW WKH SHULRG RI VKHGGLQJ PLJKW EH VKRUW RU HYHQ QRQ-H[LVWHQW. 2Q WKH RWKHU KDQG, LI WKH LQHFWRQJ LV QRW VR VHYHU DV WR NLOO WKH SDWLHQW/DQLPDO, WKH UHODVH DQG UHFYHU\ FDQ OHG WR D VWDWH RI FKURQLFW\ DQG DQLPDO WKHQ EHFRPH DV\PSWRPDWLF FDUULHUV IRU ORQJ SHULRGV RI WLP DQG HYHQ IRU OLIH (\$GOHU, 2015D). 1XPEHU VKHG LQ XULQH DUH UDUO\ UHSRUWHG, EXW DUH XVXDOO\ KLJK, H.J. *LOOHVSLH DQG 5\QR UHSRUWHG D GLUHFWRPLFURVFRSLF FRXQW RI XS WR 108 OHSWRVSLUH SHU PLOOLWHU VKHG LQ FRZmV XULQH (*LOOHVSLH DQG 5\QR, 1963).

1.3.5 3RSXODWLRQ VVFXSWLEOLW\

\$V PHQWRQHG DERYH, OHSWRVSLURVLV DIIHFW PRUH WKDQ RQH PLOOLQ SHRSOH D\HDO ZRUOGZLGH, DQG DOPRVW 60,000 IDWDO FDVHV SHU \HDO (&RVW HW DO., 2015; .R HW DO., 2009).)DUPHUV DQG VXEXUEDQ VOXP LQKDELWDQW DUH DW WKH KLJKHVW ULVN RI LQHFWRQJ (&RVW HW DO., 2014), KRZHYHU WKHU LV RQH UHSRUW VXJHVLQJ WKDW QDWXUDO ERGLHV RI ZDWHU LQ XUEDQ VHWVLQV PD\ SRVH KLJKHU ULVNV RI VHYHU OHSWRVSLURVLV WKDQ UXUDO RQHV (*DQRJD HW DO., 2006). 7KHU KDYH EHHQ UHSRUWV RI KXPDP OHSWRVSLURVLV RXWEUHDNV DVVRFDWHG ZLWK XULQH FRQWDPDQDWRQ RI ZDWHU VRXUFHV SUHVHQWLQJ D IDWDOLW\ UDWI RI 8.6% (3 RXW RI 35) (&DFLDXSRWL HW DO., 1987). ORVV RXWEUHDNV KRZHYHU DUH UHODWLYH WR IORRGHQJ IROORZLQJ KHDY\ H[FHSWRQDO RU VHDVRQDO UDLQIDOO (:QZRRG HW DO., 2014; 6PLWK HW DO., 2013; (DVWRQ, 1999; *D\QRU HW DO., 2007; :HLQEHUJHU HW DO., 2014). +RZHYHU, WKHU LV DW OHDVW RQH UHSRUW ZKHUH WKH PDLQ ULVN IDFWRU ZDV WKH RSSRVLWH, VXEQRPDO UDLQIDOO WKDW PD\ KDYH FRQWULEXWHG WR WKH ULVN RI H[SRVXUH LQ PLOLDU\ SHUVRQHO H[SRVHG WR FRQWDPDQDWHG

ZDWHU VRXUFHV (&RUZLQ HW DO., 1990). 7KH HQYLURQPHQWDO H[SRVXUH LV GHWDLOHG LQ VHFWRU 2. 2I QRWH, PDOHV DUH LQIHFWHG PRUH IUHTXHQWO\ WKDQ IHPDOHV, SRVVLEO\ UHIOHFWLQJ ERWK DQ RFFXSDWLRQDO QDWXUH RI WKH WUDQVPLVVLRQ DQG VHI-

UHODWHG VVVFHSWLELOLW\ (&RVWD HW DO., 2014; +DDNH DQG /HYHWW, 2015; *RPHV HW DO., 2018). *OREDO LQFLGHQFH UDWHV DUH LQGLFDWHG LQ 7DEOH 1.

7DEOH 1. ,QFLGHQFH RI GLDJQRVHG GLVHDVH IRU YLUXOHQW /HSWRVSLUD

*HRJUDSKLFDO \$UHD RI 6WXG\	*HQGHU	,QFLGHQFH SHU 100,000 ,QDELWDQWV ^b	<HDU RI 'DWD &ROOHFWLRQ
:RUOG-ZLGH	%RWK	1.03(+06 FDVHV /HDU	1970 WR 2008
\$IULFD	)HPDOH	8.6	1970 WR 2008
\$IULFD	ODOH	25.5	1970 WR 2008
\$PHULFDV	)HPDOH	6.6	1970 WR 2008
\$PHULFDV	ODOH	23.3	1970 WR 2008
\$VLD DQG 2FHDQLD	)HPDOH	10.9	1970 WR 2008
\$VLD DQG 2FHDQLD	ODOH	37.5	1970 WR 2008
(XURSH	)HPDOH	2.3	1970 WR 2008
(XURSH	ODOH	7.8	1970 WR 2008

6RXUFH: &RVWD HW DO., 2015

^bSHU 100,000 LQDELWDQWV XQOHVV RWKHUZH V QRWHG EXW, QR GDWD DYDLODEOH IRU SUHYDOHQFH RU VHDVRQDOLW\

1.4 3RSXODWLRQ DQG ,QGLYLGXDO &RQWURO 0HDVXUHV

7R GDWH, DYDLODEOH /HSWRVSLUD YDFFLQHV RQO\ SURYLGH D

1.4.1 9DFFLQHV

\$IWHU WKH ILUVW LVRODWLRQ RI /HSWRVSLUD LQ -DSDQ LQ 1914, -DSDQVH UHVHDUFKHUV VKRZH G WZR \HDUV ODWHU WKDW D SKHQRO-LQDFWLYDWHG FXOWXUH RI D YLUXOHQW /HSWRVSLUD HOLFLWHG LPPXQLW\ DJDLQV LQIHFWLRQ LQ *XLQHD SLJV (GR HW DO., 1916; \$GOHU, 2015E). 7R GDWH, GLIIHUHQW PHWKRGV IRU LQDFWLYDWLRQ RI OHSWRVSLUHV IRU XVH DV YDFFLQHV KDYH EHHQ DSSOLHG, WKHVH LQFOXGH IRUPDOLQ, SKHQRO, HWKDQRO, KHDW, IUHHJH DQG WKDZ DQG UDGLDWLRQ. \$IWHU 100 \HDUV, WKH RQO\ OLFHQVHG YDFFLQHV DUH ZKROH /HSWRVSLUD LQDFWLYDWHG EDFWHULQV (\$GOHU, 2015E). \$V OHSWRVSLURVLV LV ODUJHO\ D JRRQRWLF GLVHDVH, LW LV LPSRUWDQW WR FRQVLGHU DQLPDO LPPXQLJDWLRQ DV SDUW RI D FRQWURO VWUDWHJ\ 1 KHQFH WKH GHWDLOHG GLVFXVVRQ LQ WKLV VHFWRU RQ YDFFLQHV. &XUHQW SUDFWLFH VKRXOG FRQVLGHU LPPXQLJDWLRQ RI OREDO DQLPDOV, VXFK DV GRJV, FDWWOH DQG SLJV.

/HSWRVSLURVLV LV FRQVLGHUHG D QHJOHFWHG GLVHDVH, DQG WKH VSLURFKWHW FDXVLQJ WKLV GLVHDVH, /HSWRVSLUD, LV YHU\ GLIILFXOW WR UHFRYHU LQ FXOWXUH. 2QO\ UHFHQWO\ KDYH PROHFODU JHQHWLFV WRRV EHHQ GHYHORSHG WKDW DUH VXLWDEOH IRU WKH VWXG\ RI WKLV VSLURFKWHW (\$GOHU, 2015D; (YDQJHOLVWD DQG &REXUQ, 2010; .R HW DO., 2009). 7KHVH IDFWRUV KDYH FRQWULEXWHG WR D ODJ LQ WKH XQGHUDWDQGLQJ RI LWV YLUXOHQFH PHFKDQLVPV, LWV LPPXQRJHQLF SURSHUWLHV DQG ILQDOO\ D ODJ LQ WKH GHYHORSHPHQW RI YDFFLQHV WKDW PD\ LQGXFH UREXVW DQG ODVWLQJ SURWHFWLRQ (\$GOHU, 2015E; (YDQJHOLVWD DQG &REXUQ, 2010).

1.4.1.1 *OREDO FRYHUDJH DQG IXWXUH SURVSHFWV

VKRUW ODVWLQJ DQG VHURJURXS-VSHFLILF LPPXQLW\ 3UREOHPV ZLWK FRPSRQHQWV RI WKH FXOWXUH PHGLD DQG UHDFWRJHQLFLW\ KDYH DOVR EHHQ VVSHFWHG, DOWKRXJK QRW GHPRQVWUDWHG (%HQEULN HW DO., 2001). 7KHUHIRUH, VXFK EDFWHULQV KDYH QRW EHHQ ZLGHO\ XVHG LQ KXPDQV. +RZHYHU KXPDQ EDFWHULQ YDFFLQHV KDYH EHHQ XVHG VXFHVVVIXOO\ LQ VHYHUDO UHJLRQV, LQFOXGLQJ &KLQD, -DSDQ, &XED, DQG (XURSH (9HUPD HW DO., 2013E; =DPRUD HW DO., 2005), QRWDEO\ WR SUHYHQW RFFXSDWLRQDO OHSWRVSLURVLV LQ VHZDJH-ZRUNHUV ('H 6HUUV HW DO., 1995; IDUGRQH HW DO., 2004). ,PSRUWDQWO\, DQLPDO YDFFLQDWLRQ PLJKW VWL00 SURYH XVHIXO LQ UHGXFQJ OHSWRVSLURVLV EXUGHQ LQ KXPDQV, E\ GHFUHDVLQJ WKH HQYLURQPHQWDO FRQWDPDQDWLRQ. ,Q WKL V UHJDUG, GRJ YDFFLQDWLRQ LV URXWLQHO\ SHUIRUPHG LQ D QXPEHU RI FRXQWULHV, DLPLQJ DW SURWHFWLQJ ERWK WKH GRJ DQG LWV RZQHU (*D\ HW DO., 2014). /LYHVWRFN YDFFLQDWLRQ LV ZLGHO\ LPSOHPHQWHG LQ 1HZ =HDODQG DQG FRUHHODWHG ZLWK D VLJQLILFDQW GHFUHDV LQ KXPDQ FDVHV (7KRUQOH HW DO., 2002).)XUWKHU GHWDLOV RQ YDFFLQHV DUH SUHVHQWHG LQ \$\$\$HQGL[\$.

1.4.2 +JLHQH PHDVXUHV

&XUHQWO\, LPSOHPHQWLQJ URGHQW FRQWURO WKURXJK LPSURYHG VDWLWDWLRQ DQG IRRG UHVLGXDOV PDQDJPHQW VHHPV WKH PRVW HIIHFWLYH PHDVXUHV WR OLPLW OHSWRVSLURVLV.)DUPHUV DQG RWKHU SURIHVVLRQDOV LQ RFFXSDWLRQV DW ULVN VKRXOG XVH SURWHFWLYH JHDU (DSURQ, JORYHV, ERRWV DQG SURWHFWLYH PDVN), H.J. LQ DEDWWRLUV RU ZKHQ XVLQJ KLJK SUHVXUH ZDWHU (IRU FOHDQLQJ) WR DYRLG LQIHFWLRQ E\ DHURVROLJHG DQLPDO XULQH. \$GGLWLRQDOO\, DQLPDO YDFFLQDWLRQ PD\ UHGXFH OHSWRVSLUDO VKHGGHQJ (6XEKUDW HW DO., 2012).)RU ZRUNHUV H[SRVHG WR PXQLFLSDO ZDVWHZDWHUV (H.J. VHZDJH ZRUNHUV), YDFFLQDWLRQ, HYHQ LQ GHYHORSHG UHJLRQV ZRXOG VHHP DSSURSULDWH IRU ULVN

PDQDJPHQW ('H 6HUHV HW DO., 1995), KRZHYHU YDFFLQHV IRU KXPQV DUH DYDLODEOH RQ\ LQ D IHZ FRXQWULHV.

2.0 (QYLURQPHQWDO 2FFXUUHQFH DQG 3HUVLVWHQFH

6WXGLHV RI YLUXOHQW /HSWRVSLUD LQ WKH HQYLURQPHQW DUH YHU\ OLPLWHG, PDLQO\ EHFDXVH LW LV GLIILFXOW WR LVRODWH WKH VSLURFKHWHV IURP VXUIDFH ZDWHU RU VRLO ZLWKRXW FRQWDLQDWRQ ZLWK VDSURSK\WLF /HSWRVSLUD. +RZHYHU, WKHUH LV D JURZLQJ LQWHUHV LQ XQGHUVWDQGLQJ WKH OLHVW\OH DQG VXUYLYDO FDSDELOLWLV RI YLUXOHQW /HSWRVSLUD LQ WKH HQYLURQPHQW. ,Q DGGLWLRQ, JHQRP LF VWXGLHV VXJJHVW WKDW YLUXOHQW /HSWRVSLUD HYROYHG IURP DQ HQYLURQPHQWDO (IUHH-OLYLQJ) /HSWRVSLUD SUHVHQW LQ ZDWHU RU PXG, VLPLODU\ WR WKH FRQWHPSRUDU\ PHPEHUV RI WKH VDSURSK\WLF FOXVWHU (VXFK DV /. ELIOH[D] (6DLWR HW DO., 2013; 7KLEHDX[HW DO., 2018E; 7KLEHDX[HW DO., 2018D). 7KHUH VHHPV WR EH VRPH HYROXWLRQDU\ YDULDWRQ ZLWK LQ YLUXOHQW OHSWRVSLUHV; VRPH VSHFLHV (VXFK DV /. LQWHUURJDQV) KDYH UHWDLQHG JHQHV DVVRELDWHG WR HQYLURQPHQWDO VXUYLYDO ZKHUHDV RWKHU YLUXOHQW PHPEHUV (VXFK DV /. ERUJSHWHUVHQLL) VHHP WR KDYH ORVV WKH JHQHV. 7KHVH ILQGLQJV KDYH EHHQ FRUURERUDWHG E\ LQ YLWUR H[SHULPHQWV VKRZLQJ WKDW /. LQWHUURJDQV VXUYLYHV EHWWHU LQ GLVWLOOHG ZDWHU WKDQ /. ERUJSHWHUVHQLL (%XODFK HW DO., 2006, 3LFDUGHD HW DO., 2008), ZKLFK PD\ LPSO\ WKDW /. ERUJSHWHUVHQLL LV QRW WUDQVPLWWHG E\ ZDWHU EXW UDWKHU UHOLHV RQ GLUHFWRUV WR-VR-VRW WUDQVPLVLRQ (%XODFK HW DO., 2006).

/HSWRVSLUDO VXUYLYDO LQ ZDWHU LV EROVWHUHG E\ YLVFRXV PDWHULDO, VXFK DV DJDU, ZKLFK SRVVLEO\ WUDQVODWHV WR ELRILOP LQ QDWXUDO HQYLURQPHQWV. 6RPH VWUDLQV RI YLUXOHQW /HSWRVSLUD DUH DEOH WR SURGXFH ELRILOPV ZKHQ LQFXEDWHG LQ IUHV ZDWHU, HYHQ LQ WKH DEVHQFH RI QXWULHQW (%DUUDJDQ HW

DO., 2011; 5LVWRZ HW DO., 2008).)XUWKHUPRUH /. LQWHUURJDQV (SDWKRJHQLF FOXVWHU) KDV EHHQ IRXQG LQ QDWXUH DVVRELDWHG ZLWK ELRILOPV IRUPHG E\ HQYLURQPHQWDO EDFWHULD (9LQRG .XPDU HW DO., 2015D). 6RPH YLUXOHQW /HSWRVSLUD DUH DEOH WR SURGXFH ELRILOP ZKHQ LQFXEDWHG LQ GLVWLOOHG ZDWHU (ORZ QXWULHQW FRQGLWLRQV) DQG DSSHDU VHQVH WKH SUHVHQFH RI QXWULHQWV, VXFK DV IDWW\DFLG, ZKLFK WULJJHV UHODVH RI OHSWRVSLUDO FHOV IURP WKH ELRILOP (%DUUDJDQ HW DO., 2011). ,W KDV EHHQ REVHUYHG WKDW ELRILOP-ERUQ OHSWRVSLUDO FHOV GLVSOD\ D ILYH- WR VL[-IROG LQFUHDVH LQ DQWLELRWLF WROHUDQFH (9LQRG .XPDU HW DO., 2016D). ,W KDV DOVR EHHQ VSHFXODWHG WKDW ELRILOPV SURWHFW SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD DJDLQV RWKHU WR[LF FRPSRXQGV DQG VWUHVVRUV LQ WKH HQYLURQPHQW. 7DNHQ WRJHWKHU, /HSWRVSLUD VXUYLYDO LQ WKH HQYLURQPHQW VHHPV WR EH IDYRUHG E\ ELRILOP IRUPDWRQ, ZKLFK FRXOG FRQWULEXWH WR GLVHDVH WUDQVPLVLRQ DPRQJ ULVN JURXS VXFK DV VHZDJH DQG DJULFXOWXUDO ZRUNHUV (HOOD 5RVVD HW DO., 2016; *DQRJ]D HW DO., 2006; .RL]XPL HW DO., 2009; 7UXHED HW DO., 2004).

6RLO PD\ DOVR SOD\ D UROH LQ HQYLURQPHQWDO VXUYLYDO. 6RPH UHVHDFKHUV KDYH VKRZ WKDW /HSWRVSLUD VXUYLYHG LQ WKH ZHW VRLO RQ GU\GD\V DQG DSSHDUHG LQ VXUIDFH ZDWHU RQ UDLQ\ GD\V, VXJJHVWLQJ WKDW VRLO FRXOG EH D UHVHUYRLU IRU OHSWRVSLUHV LQ WKH HQYLURQPHQW (6DLWR HW DO., 2013; 7KLEHDX[HW DO., 2017). (YHQ WKRXJK OHSWRVSLUHV DUH FRQVLGHUHG IUDLOH VSLURFKHWHV, VWXGLHV KDYH VKRZ WKDW WKH\ FDQ VXUYLYH DQG HYHQ PDLQWDLQ WKHLU YLUXOHQFH IRU XS WR 20 PRQWV GHVSLWH XQIDYUDEOH FRQGLWLRQV, VXFK DV FROG DQG QXWULHQW-SRRU DFLGLF ZDWHU (\$QGUH-)RQWDLQH HW DO., 2015). +RZHYHU, WKHUH LV OLPLWHG NQRZOHGJH DERXW SRVVLEOH GLIHUHQFHV LQ WKH QXWULHQW UHTXLUPHQWV RI VDSURSK\WLF DQG YLUXOHQW VSHFLHV DQG DERXW DELOLW\ RI YLUXOHQW OHSWRVSLUHV WR PXOWLSO\ LQ VXUIDFH ZDWHU RU VRLOV. *HQHUDO GDWD RQ WKH RFFXUUHQFH RI OHSWRVSLUHV LQ WKH HQYLURQPHQW LV SUHVHQWHG LQ 7DEOHV 2-5.

7DEOH 2. SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD RFFXUUHQFH LQ VHZDJH DQG ZDVWHZDWHU

SUHD	<HDU	6DPSOH 'HVFULSWLRQ	2FFXUUHQFH 3HUFHQW 3RVLWLYH (6DPSOH 1XPEHUV)	'HWHFWLRQ 0HWKRG	5HIHQHQFH
%UD]LO (6DOYDGRU,	2011 WR 2012	6HZDJH :DWHU	36%	/LS/32 T3&5 RQ 40 P/	&DVDQRYDV-0DVVDQD
3DX GD (LPD)	(-XO\ WR -DQXDU\)		(121/335)	ZDWHU VDP SOH	HW DO., 2018
&RORPELD (&RUGRED)	2009 WR 2011	:DVWH ZDWHU (IURP SLJ VWDEOH)	5.56% (1/18)	&XOWXUH HQULFKPHQW 0.5 P/ ZLWK DQG ZLWKRXW ILOWUDWRQ WKURXJK 0.45cP ILOWHU	&DOGHURQ HW DO., 2014 ;
8. (/RQRQ)	1977	6HZDJH (FDWWOH PDUNHW DQG IDUPV)	100% (2/2)	&XOWXUH RI 20 P/ VHURJURXS /DQVVRIL LGHQWLILHG &XOWXUH ^p 20PO UHGXFHG WR 0.2PO 9LD FHQWULXJDWRQ/ILOWUDWRQ WDUUDVVRYL VHURW\SH LGHQWLILHG	&RJKODQ DQG .PHW\, 1987
8. (2[IRUG)	1980 WR 1981	6HZDJH DQG VHZDJH VOXGJHV	15.9% (30/189)		-RQHV HW DO., 1981

^D/LTXLG DQG VROLG (O-+ VXSSOPHPHQWHG ZLWK 5-)OXRUR-8UDFLO (100 cJ/PO), UDEELW VHUXP 1%, \$PSKRWHULFLQH % (50cJ/PO), 6XOSKDWDLJROH (50 PJ//), QHRP\FLQ VXOSKDW (5 PJ//), DFWLGLRQH (0.5 PJ//) DQG LQFXEDWHG DW 29b&. ,GHQWLILFDWLQJ E\ VHURORJLFD W\SLQJ.

7DEOH 3. 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD RFFXUUHQFH LQ ZDWHU VDP SOHV

\$UHD	<HDU	6DPSOH 'HVFULSWLRQ	2FFXUUHQFH 3HUFHQW 3RVLWLYH (6DPSOH 1XPEHUV)	'HWHFWLRQ 0HWKRG	SHIHUHQFH
%UDJLO (3HORWDV)	1.5 ^D	6WDJQDQW :DWHU (DPPHQWV VZLWLRQ SRVV ZLWK GHDG SRVV XPV DQG UDWV)	100% (1/1)	&XOWXUH (HZ 'URSV)	)RUVWHU HW DO., 2013
%UDJLO (5LR GH -DQHLUR, 3HWURSROLV)	2009 (OD\ WR -XO\)	&RPPXQLW\ ZDWHU VXSSOLHV, VPDOO ODNHV, DQG VXUIDFH ZDWHU	0.1% (1/100)	0XOWLSOH[3&5 RQ 125 P/ OLV/32 DQG 1&5 RQ 40 ERWK JHQHV DPSOLILHG LQ SDWKRJHQLF VSHFLHV	9LWDO-%UDJLO HW DO., 2010
%UDJLO	2011 WR				
(6DOYDGRU, 3DX GD /LPD)	2012 (-XO\ WR -DQXDU\)	6WDQGLQJ :DWHU	34% (82/250)	OLV/32 T3&5 RQ 40 P/ ZDWHU VDP SOH	&DQDQRYDV-0DVVDQD HW DO., 2018
&KLOH	2010 WR 2012		19.3%	OLV/32-3&5 RQ 50P/ WR	0XgR]-=DQJL HW DO.,
(/RV 5LRV)	(1RYHPEHU WR SSULO)	3XGGOHV	(36/306)	1.0/ ZDWHU	2014
&KLOH (/RV 5LRV)	2010 WR 2012 (1RYHPEHU WR SSULO)	:DWHU LQ RSHQ FRQWDLQHUV	45.5% (10/22)	OLV/32-3&5 RQ 50P/ WR 1.0/ ZDWHU	0XgR]-=DQJL HW DO., 2014
&KLOH (/RV 5LRV)	2010 WR 2012 (1RYHPEHU WR SSULO)	:DWHU &DQDOV/5LYHUV	3.9% (4/103)	OLV/32-3&5 RQ 50P/ WR 1.0/ ZDWHU	0XgR]-=DQJL HW DO., 2014
&KLOH	2010 WR 2012		27.3%	3&5 DQG VHTXHQLQJ RQ	
(/RV 5LRV)	(2FWREHU WR SSULO)	3XGGOHV	(84/208)	50 P/ WR 1/ ZDWHU	0DVRQ HW DO., 2016
&KLOH (/RV 5LRV)	2010 WR 2012 (2FWREHU WR SSULO)	:DWHU LQ RSHQ FRQWDLQHUV	14.4% (28/194)	3&5 DQG VHTXHQLQJ RQ 50 P/ WR 1/ ZDWHU	0DVRQ HW DO., 2016
&KLOH (/RV 5LRV)	2010 WR 2012 (2FWREHU WR SSULO)	:DWHU &DQDOV/5LYHUV	9.7% (13/134)	3&5 DQG VHTXHQLQJ RQ 50 P/ WR 1/ ZDWHU	0DVRQ HW DO., 2016
&RORPELD (&RUGRED)	2009 WR 2011	:HOO :DWHU	0% (0/18)	&XOWXUH HQULFKPHQW 0.5 P/ ZLWK DQG ZLWKRXW ILOWUDWLQJ WKURXJK 0.45cP ILOWHU 15 P/ ZDWHU VDP SOHV FROOHFWHG RQ IDUPV &HQWULIXJHG 14,000	&DOGHURQ HW DO., 2014
&RORPELD (&RUGRED)	E 1 \$	8QUHDWHG ZDWHU VDP SOHV	0% (0/13)	USP / 5 PLQ. 3HOHW ZDVKHG E\ 3%6. 3&5	DQG VHTXHQLQJ.

DO, 2017

2FFXUUHQFH 3HUFHQW 3RVLWLYH (6DPSOH 1XPEHUV)					
SUHD	<HDU	6DPSOH 'HVFULSWLRQ		'HWHFWLRQ 0HWKRG	SHIHUHQFH
)UDQFH (^RQ)	2008 (6SULQJ)	:DWHU	6.38% (3/47)	T3&5 RQ 50 P/ RI ZDWHU 103 WR 104 JHQRPH- HTXLYDOHQWV/P/	9HLQ HW DO., 2012
,QGLD (ILFREDU DQG \$QGDPDQ ,VODQGV)	2012	8UEDQ :DWHU 6DPSOHV	9.7% (11/113)	3&5 RQ 20 P/ ZDWHU VDPSOH, &HQWULIXJHG 8,000 J IRU 10 PLQ. '1 \$ H[WUDFWHG IURP SHOOHW	/DOO HW DO., 2016
,QGLD (ILFREDU DQG \$QGDPDQ ,VODQGV)	2012	5XUDO :DWHU 6DPSOHV	6.7% (9/133)	3&5 RQ 20 P/ ZDWHU VDPSOH, &HQWULIXJHG 8,000 J IRU 10 PLQ. '1 \$ H[WUDFWHG IURP SHOOHW	/DOO HW DO., 2016
,QGLD (ILFREDU DQG \$QGDPDQ ,VODQGV)	2012	3DGG\)LHOGV	15.9% (18/113)	3&5 RQ 20 P/ ZDWHU VDPSOH, &HQWULIXJHG 8,000 J IRU 10 PLQ. '1 \$ H[WUDFWHG IURP SHOOHW	/DOO HW DO., 2016
,VODQG RI 6W. .LWWV	1 \$	((QYLURQPHQWDO ZDWHU: SRQGV, SXGGOHV, ZDWHU GDPV, PRXQWDLQ VSULQJ DQG VWUHDV)	18.18% (8/44)	HQYLURQPHQWDO ZDWHU VDPSOH (20.6 WR 56 JHQRPHV SHU 300 P/) (QYLURQPHQWDO VRXUFH	5DZOLQV HW DO., 2014
,WDO\	2005	:DWHU ()URP WRLOHW DQG WDS)	50% (2/4)	WUDFNQJ DIWHU IDWDO FDVH	/XFKLQL HW DO., 2008
	2012 WR 2013			40 P/ RI ZDWHU ILOWHUHG WKURXJK 0.2cP, ILOWUDWH	
0DOD\VLD 0DOD\VLD	('HFHPEHU WR 1RYHPEHU)	:DWHU	0% (0/72)	FHQWULIXJHG 4,000J/27b&/20 PLQ EHIRUH FXOWXUH.	\$]DOL HW DO., 2016
(/XEXN, <X, 3DKDQJ)	2011	6WDJQDQW :DWHU	100% (8/8)	3&5 RQ 100 P/ RI ZDWHU 100 P/ VDPSOH,	6DSLQ HW DO., 2012
0DOD\VLD (HODQWDQ)	2016 (-XQH WR 6HSWHPEHU)	:DWHU	0% (0/21)	FXOWXUH 1 P/ ILOWHUHG WKURXJK 0.22cP ZLWK 5-)OXRUR-8UDFLO	0RKG \$OL HW DO., 2018
0DOD\VLD (HODQWDQ DQG 7HUHQJJDQX)	2009 (\$SULO)	:DWHU DIWHU FXOWXUH SUH- HQULFKHPPHQW	6.78% (12/177)	3&5 DIWHU HQULFKHPPHQW LQ FXOWXUH, 5-10 GURSV XVHG	5LG]ODQ HW DO., 2010
0DOD\VLD	2014 WR 2015	:DWHU	1.96%	3&5 RQ 50 P/ ZDWHU	
(6DUDZDN)	(\$SULO WR)HEUXDU'	('UDLQ HHOXHQW, ULYHU, ODNH, SXGGOH)	(6/324)	VDPSOH	3XL HW DO., 2017E
0DOD\VLD	2012		7.5%	&XOWXUH ((O--+ PHGLD) DQG 3&5	
(7HUHQJJDQX)	1HZ &DOHGRQLD	(HEU XDU\ DQG	0DUFK)	2016	:DWHU

(3/40)	2.5 PO RI 0.22c P ILOWUDWHG ZDWHU RU SHOOHW RI 985 PO 3&5/9LDEL OLW\3&5 RQ 10 P/ RI ZDW HU	,VPDLO HW DO., 2014			
(1RUWK SURYLQFH UHJLRQV)	(0DUFK WR -XQH)	:DWHU	0% (0/10)	/LQNHG WKH LGHQWLW\ RI HQYLURQPHQWDO /HSWRVSLUD WR KXPDQ LQIHFWLQJ VWUDLQ	7KLEHDX[HW DO., 2017

SUHD	<HDU	6DPSOH 'HVFULSWLRQ	2FFXUUHQFH 3HUFHQW 3RVLWLYH (6DPSOH 1XPEHUV)	'HWHFWLRQ 0HWKRG	SHIHUHQFH
5XVVLD (ODNH 1HUR, <DURVODY UHJLRQ)	1974 (-XQH WR 6HSWHPEHU)	PDUVK DQG EDQN RI ODNH (PRLVWXUH: 69.5 WR 70.3%, S+ 7.4 WR 7.8)	1.1% (7/630)	1 J VDPSOH VXVSHQGHH LQWR 5 PO ,QRFXODWLRQ WR KDPVWHUV ,VRODWHG 4 VHURJURXS JULSSRW\SKRVD DQG 1 VHURJURXS KHEGRPDGLV	.DUDVHYD HW DO., 1977
7KDLODQG (%DQJNRN)	2011 (1RYHPEHU)	5LYHU :DWHU	0% (0/2)	1.5-6 / T3&5 %DFWHULD FROOHFWHG RQ 0.2 cP ILOWHU PHPEUDQH 1.5 WR 6 / T3&5 %DFWHULD FROOHFWHG RQ	&KDWXURQJNDVXPULW HW DO., 2013
7KDLODQG (%DQJNRN)	2011 (1RYHPEHU)	)ORRG :DWHU	8.33% (1/12)	0.2 cP ILOWHU PHPEUDQH (6LQJOH SRVLWLYH IURP XUEDQ UHVLGHQWLDO DUHD, VDPSOH ZDV WXUELJ ZLWK S+ 8.05, 9LEULR FKROHUDH GHWHFWHG)	&KDWXURQJNDVXPULW HW DO., 2013
7KDLODQG (%DQJNRN SURYLQFH, 'RQ 0XDQJ	2011 (1RYHPEHU)	)ORRGZDWHU	0.9% (1/110)	3&5 DQG &XOWXUH RQ 100 P/ RI IORRG ZDWHU (50 P/ IRU 3&5, 50 P/ IRU FXOWXUH)	7KDLSDGXQJSDQLW HW DO., 2013
GLVWULFW DQG 1DNKRQ 3DWKRP SURYLQFH)	DQG 'HFHPEHU)				
7KDLODQG (.KRQ .DHQ	2005 WR 2006		23% (23/100)	'XSOH[3&5	7DQVXS KDVLUL HW DO., 2006
DQG 1DNKRQ 5DWFKDVLDP 3URYLQFH)	(1RY WR -DQ)	:DWHU		5UV QHVWHG 3&5 DQG 0/67 SHUIRUPHG RQ 50 P/ RIZDWHU.	
7KDLODQG (1DQ 3URYLQFH)	2013 WR 2016	:DWHU	21.4% (3/14)	8QGHUJURXQG ZDWHU VRXUFH XVHG LQ DQLPDO KXVEDQGU\, GULQNLQJ/FOHDQLQJ SHQV, DQG/RU ULFH ILHOGV	.XULOXQJ HW DO., 2017
86\$ (, /)	1998 (-XO)	FRDVWDO DUHDV /DNH 6SULQJILHOG (7ULDWKORQ)	3.7% (1/27)	3&5	0RUJDQ HW DO., 2002

^D15: 1RW 5HSRUWHG; ^E1\$: 1RW \$YDLODEOH

7DEOH 4. 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD RFFXUUHQFH LQ VRLO, VRLO DQG ZDWHU, DQG PLVF.

\$UHD	<H DU	6DPSOH 'HVFULSWLRQ	2FFXUUHQFH 3HUFHQW 3RVLWLYH (6DPSOH 1XPEHUV)	'HWHFWLRQ 0HWKRG	50
,QGLD (\$UFKLSHODJR				3&5 RQ ILYH VWHULOH JODVV URGV (EXULHG XS WR 3 GHHS LQ	
RI \$QGDPDQ DQG 1LFREDU)	15 ^D	:DWHUORJJHG SDGG\ ILHOG VRLO	60% (6/10)	GLIIHUHQW ZDWHUORJJHG SDGG\ ILHOG VRLOV DQG DOORZHG WR UHVW IRU 48 K)	9LQRG .XPDU HW DO., 2015E
,QGLD (1LFREDU DQG \$QGDPDQ ,VODQGV)	2014 (-XO\ WR \$XJXVW)	3DGG\ ILHOG :DWHU DQG /HDYHV	24% (34/142)	3&5 RQ VWHULOH JODVV VOLGHV LQFXEDWHG IRU 48 K LQ GLIIHUHQW VRXUFHV	
-DSDQ (+RNNDLGR	2014 WR 2016		9.1%	RI ZDWHU, 3DGG\ OHYHV ZHUH FROOHFWHG DQG FXW WR 1 FP LQ OHQJWK DW DLU-OLTXLG LQWHUSKDVH	9LQRG .XPDU HW DO., 2016D
DQG 2NLQDZD)	(-XO\ WR \$SULO)	6RLO	(12/132)	20 J RI VRLO, FXOWXUH ZLWK 67\$)) DQG	0DVXJDZD HW DO., 2018
	2012 WR 2013			166 U'1\$ IRU LGHQWLILFDWLRQ 1R VDP SOH YROXPH IRU VRLO VRLO UHVXVSHQG HG	
0DOD\ VLD	('HFHPEHU WR 1RYHPEHU)	6RLO	1.39% (1/72)	ZLWK VWHULOH ZDWHU, VXSHUQDWDQW ILOWHUHG WKURXJK 0.2cP EHIRUH FXOWXUH.	\$JDOL HW DO., 2016
0DOD\ VLD	2016		33.3%	20 J VRLO VDP SOH, FXOWXUH 1 P/ ZDVKLQJV ILOWHUHG	
(HODQWDQ)	(-XQH WR 6HSWHPEHU)	6RLO	(7/21)	WKURXJK 0.22cP ZLWK 5-)OXRUR- 8UDFLO	0RKG \$OL HW DO., 2018
0DOD\ VLD (20 PLOHV				1 WR 5 PO RIZDWHU 0.5 PO ZDVKLQJ RI WRSVRLO	
DURXQG .XDOD /XPSXU)	1961 WR 1962	:DWHU DQG 6RLO	2.9% (397/13,848)	,QRFXODWLRQ WR KDPVWHU V/XLQHD SLJV VHURJURXS 3RPRQD LVRODWHG ^E	%DNHU DQG %DNHU, 1970
0DOD\ VLD (/XEXN, <X, 3DKDQJ)	2011	6XUIDFH 6RLO	50% (2/4)	3&5 RI 100 J RI VRLO	6DSL DQ HW DO., 2012
0DOD\ VLD (/XEXN, <X, 3DKDQJ)	2011	'HHS 6RLO (30 FP)	12% (3/25)	3&5 RI 100 J RI VRLO	6DSL DQ HW DO., 2012
		6XUURXQGLQJV RI			

0DOD\VLD (6DUDZDN)	2014 WR 2015 (\$SULO WR)HEUXDU\)	KRXVLQJ DUHDV, 0DQGIL00V, RSHQ ILHOG, DQG 0DNH VRLO	11.6% (34/292)	3&5 RQ 20 J	3XL HW DO., 2017D
-----------------------	---	---	-------------------	-------------	-------------------

\$UHD	<HDU	6DPSOH 'HVFULSWLRQ	2FFXUUHQFH 3HUFHQW 3RVLWLYH (6DPSOH 1XPEHUV)	'HWHFWLRQ 0HWKRG	50
1HZ				3&5/9LDELOLW\3&5 RQ 250 PJ VRLO 3DWKRJHQLF	
&DOHGRQLD (1RUWK SURYLQFH UHJLRQV)	2016 (0DUFK WR -XQH)	6RLO	56.69% (30/52)	OHSWRVSLUHV ZHUH DOLYH DQG SUHVHQW LQ VRLOV VHYHUDO ZHHNV DIWHU WKH LQIHFWLQJ HYHQW	7KLEHDX[HW DO., 2017
1HZ &DOHGRQLD (1RUWK SURYLQFH UHJLRQV)	2016 (0DUFK WR -XQH)	9HJHWD0)ORDW GHEULV	12.2% (2/11)	3&5/9LDELOLW\3&5 RQ 250 PJ YHJHWD0 GHEULV	7KLEHDX[HW DO., 2017
3KLOLSSLQHV	2014		48%	3&5 DQG FXOWXUH HQULFKPHQW RQ 10 J RIZHW VRLO	
(/HWH 3URYLQFH)	(-DQXDU\)	:HW 6RLO	(11/23)	(166 U51\$ JHQH VHTXHQFH VLPLODU WR /. NPHWL)	6DLWR HW DO., 2014
3RODQG				7UDGLWLRQDO DQG IHVWHG 3&5 WDUJHWLQJ OLS/-32	
(/XEOLQ SURYLQFH)	2010 WR 2013	:DWHU DQG 6RLO	0.94% (2/212)	(5/ RI ZDWHU DQG VRLOV ZHUH FROOHFWHG LQ 50P/ IDOFRQ WXEH)	:RMFLN-)DWOD HW DO., 2014
7DLZDQ				1HVWHG 3&5 RQ 100 PJ VRLO VDPSOH	
(<XQOLQ, &KLDL, 7DLQDQ)	2010 (0D\-'HFHPEHU	6RLO	30.6% (33/108)	,QYHVWLJDWLRQ IROORZLQJ WZR IORRG KDJDUGV GXH WR W\$SKRRQV 0RUDNRW DQG)DQDSL &XOWXUH LQ OLTXLG DQG VROLG (O--+ VXSOPHQWHG ZLWK 100cJ/PO RI 5-)OXRUR-8UDFLO IROORZHG E\ D UUV QHVWHG 3&5. :DWHU: 0.5 P/ ILOWHUH WKURXJK 0.22 cP IURP 30 P/, FXOWXUH DW 28b& 6RLO: 50 J, ZDVKLQJV ILOWHUH WKURXJK 0.22cP FXOWXUH DW 28b&	)XK HW DO., 2011
7KDLODQG (:HVWHUQ 3DUW)	2016 (1RYHPEHU)	:DWHU DQG 6RLO	35.3% (6/17)	:DWHU: 0.5 P/ ILOWHUH WKURXJK 0.22 cP IURP 30 P/, FXOWXUH DW 28b& 6RLO: 50 J, ZDVKLQJV ILOWHUH WKURXJK 0.22cP FXOWXUH DW 28b&	&KDLZDWDQDUXQJXHQJSDLVQ HW DO., 2018
8. (/RQGRQ)	1935	6OLPH IURP /RQGRQ VHZHUV	6.7 (2/30) 0.0%	,QRFXODWLRQ WR JXLQHD SLJV	\$OVWRQ, 1935
86\$ (8, 7DPSD)	2017 (1RYHPEHU)	%LJ &UHHN ZDWHU 6DPSOHG ZLWK VRLO	:DWHU (6RLO)	500 c0 WR 30 PO RI (0/15) 0.0% (0/11)	ZDWHU FXOWLYDWHG LQ (O--+ PHGLXP ZLWK 5-IOXRUXUDFLO

,QRFXODW
LRQ WR 6
JXLQHD W
SLJV H
SPO U
,QWUDSHULWRQHD Q
O LQMHFWRQ H
W
D
O
,
,
2
0
1
0

'LHVFK
DQG
0F&XOORF
K, 1966

\$UHD	<HDU	6DPSOH 'HVFULSWLRQ	2FFXUUHQFH 3HUFHQW 3RVLWLYH (6DPSOH 1XPEHUV)	'HWHFWLRQ 0HWKRG	50
86\$				166 PHWDJHQRPLF VHTXHQFLQJ (,00XPLQD 0L6HT SODWIRUP) 94 UHJLRQ RI WKH	
(&\$, /RQJ 9DOOH\, /LWWOH +RW &UHHN 6SULQJ)	2015 (-XQH)	'HQGUROLWLF FRQH	100% (1/1)	166 U51\$ JHQH (SRVLWLRQV 519 WR 802, (VFKHULFKLD FROL QXPEHULQJ). 'HQGUROLWLF FRQH UDQJHG LQ KHLJKW IURP 0.5-2.0 FP	%UDGOH\ HW DO., 2017
^D 15: 1RW 5HSRUWHG; ^E VRODWHG IURP EORRG FXOWXUHV RIPRULEXQG DQLPDOV					

7DEOH 5. 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD RFFXUUHQFH LQ GULQNLQJ ZDWHU VDP SOHV

\$UHD	<HDU	6DPSOH 'HVFULSWLRQ	2FFXUUHQFH 3HUFHQW 3RVLWLYH (6DPSOH 1XPEHUV)	'HWHFWLRQ 0HWKRG	5HHUHQFHV
	2010 WR				
&KLOH (/RV 5LRV)	2012 (1RYHPEHU WR \$SULO)	\$QLPDO GULQNLQJ ZDWHU ^D	14.5% (12/83)	0LS/32-3&5 RQ 50P/ WR 1.0/ ZDWHU	0XgR]-=DQJL HW DO., 2014
&KLOH (/RV 5LRV)	2010 WR 2012 (1RYHPEHU WR \$SULO)	+XPDQ GULQNLQJ VRXUFHV	19.1% (9/47)	0LS/32-3&5 RQ 50P/ WR 1.0/ ZDWHU	0XgR]-=DQJL HW DO., 2014
	2010 WR			3&5 DQG	
&KLOH (/RV 5LRV)	2012 (2FWREHU WR \$SULO)	\$QLPDO GULQNLQJ ZDWHU ^D	16.5% (14/85)	VHTXHQFLQJ RQ 50 P/ WR 1/ ZDWHU	0DVRQ HW DO., 2016
&KLOH (/RV 5LRV)	2010 WR 2012 (2FWREHU WR \$SULO)	+XPDQ GULQNLQJ VRXUFHV	14.7% (14/95)	3&5 DQG VHTXHQFLQJ RQ 50 P/ WR 1/ ZDWHU	0DVRQ HW DO., 2016
&KLQD (1DQMLQJ, %HMKHNRX GULQNLQJ ZDWHU SODQW)	1\$ ^E	'ULQNLQJ :DWHU	0.45% RI WRWDO PHWDJHQRPLF UHJGV	0HWDJHQRPLFV (454 S\URVHTXHQFLQJ) /. LQWHUURJDQV VWLQ LQ WDS ZDWHU DIWHU FKORULQDWLRQ	+XDQJ HW DO., 2014
				&XOWXUH HQULFKPHQW 0.5 P/ ZLWK DQG	
&RORPELD (&RUGRED)	2009 WR 2011	\$QLPDO GULQNLQJ ZDWHU ^D	5.56% (1/18)	ZLWKRXW ILOWDWLRQ WKURXJK 0.45cP ILOWHU	&DOGHURQ HW DO., 2014

\$UHD	<HDU	6DPSOH 'HVFULSWLRQ	2FFXUUHQFH 3HUFHQW 3RVLWLYH (6DPSOH 1XPEHUV)	'HWHFWLRQ 0HWKRG	5HIHUUHQFHV
&RORPELD	1\$	'ULQNLQJ :DWHU	0%	15 P/ ZDWHU VDPSOHV FROOHFWHG RQ IDUPV &HQWULXJHG 14,000 (QVXQFKR-+R\RV HW	
				USP / 5 PLQ. 3H00HW DO., 2017 ZDVKHG E\ 3%6. 3&5 DQG VHTXHQFLQJ. 1.5-6 /	
7KDLODQG	2011	7DS :DWHU	0%	T3&5 &KDWXURQJNDVXPULW	
				%DFWHULD FROOHFWHG RQ 0.2 cP ILOWHU PHPEUDQH 1.5-6 /	
7KDLODQG	2011	)LOWHUHG 7DS :DWHU	0%	T3&5 &KDWXURQJNDVXPULW	
				%DFWHULD FROOHFWHG RQ 0.2 cP ILOWHU PHPEUDQH 1.5-6 /	

^DIRQ-SRWDEOH GULQNLQJ ZDWHU IRU DQLPDOV; ^E1\$: IRW \$YDLODEOH

2.1 'HWHFWLRQ 0HWKRGV

/HSWRVSLUHV PLJKW EH GHWHFWHG E\ HLWKHU FXOWXUH DQG LVRODWLRQ RU XVLQJ PROHFODU WHFKQLTXHV OLNH (TXDQWLWDWLYH) 3&5. /HSWRVSLUD VSS. DUH IDVWLGLRXV VORZ-JURZLQJ RUJDQLVPV ZLWK YHU\ VSHFLILF QXWULWLRQDO UHTXLUPHQWV. +RZHYHU, DV IRU PRVW EDFWHULD VSHFLHV, LQLWDO ZRUN XVHG FODVVLDO, FXOWXUH-EDVHG LVRODWLRQ SURFHGXUHV. \$OWKRXJK VHYHUDO GLIIHUHQW FXOWXUH PHGLD KDYH EHHQ GHYHORSHG DQG XVHG IRU /HSWRVSLUD, PRVW VWXGLHV KDYH XVHG WKH R0HLF DFLG 1 D0EXP1Q FXOWXUH PHGLXP (OOLQJKDXVHQ-0F&XOORXJK--RKQVRQ+DUULV ((0-+) RU WKH UDEELW VHUXP-HQULFKHG .RUWKRIHV HQULFKPHQWV; DV OLTXLG RU VHPL-VROLG PHGLD IRU DW OHDVW LQLWDO FXOWXUH, WKXV SUHYHQWLQJ TXDQWLILFDWLRQ. 6LQFH WKH PLG 1960V, WKH FRQWURO RI FRQWDPLODQWV KDV EHHQ DFKLHYHG E\ LQFOXGLQJ 5-)OXRUR-8UDFLO LQWR WKH FXOWXUH PHGLXP (-RKQVRQ DQG 5RJHUV, 1964). 0RUH UHFHQWO\, D FRPELQDWLRQ RI VHOHFWLYH DQWLPLFURELDO DJHQWV DV SURSRVHG E\ &KDNURUW\ HW DO. (2011) KDV LQFUHDVLQJO\ EHHQ XVHG (VXOIDPHWKR[D]ROH, 40 kJ/P/; WULPHWKRSLP, 20 kJ/P/; DPSKRWHULFLQ %, 5 kJ/P/; IRVIRPFLQ, 400 kJ/P/; DQG 5-IOXRURXUDFLO, 100 kJ/P/). :KHWKHU WKHVH FXOWXUH PHGLD DQG VHOHFWLYH DJHQWV IDYRU WKH JURZWK RIDOO /HSWRVSLUD VSHFLHV DQG VWUDLQV LV VWL00 XQNQRZQ, DQG WKH LVRODWLRQ SURFHV PRVW OLNH\ UHVXOWV LQ WKH ORVV RI /HSWRVSLUD GLYHUVLW\ .Q DGGLWLRQ, DOWKRXJK YLDEOH EXW QRQ-FXOWXUDEOH (9%1&) /HSWRVSLUD KDYH QRW EHHQ UHSRUWHG, WKH DELOLW\ RI GLIIHUHQW VWUDLQV WR JURZ LQ YLWUR LQ FXOWXUH PHGLD LV VWL00 YHU\ SRRUO\ H VWDEOLVKHG.

\$V ZLWK DQ\ FXOWXUH-EDVHG LVRODWLRQ WHFKQLTXH, IDVW-JURZLQJ

VDSURSK\WLF VSHFLHV DUH PRVW IUHTXHQWO\ LVRODWHG DQG PD\ MHRSDUGLJH WKH GHWHFWLRQ DQG LVRODWLRQ RI VORZHU-JURZLQJ YLUXOHQW OHSWRVSLUHV. +LVWRULFD00\, WR JDLQ LQVLJKW LQWR SDWKRIHQLF /HSWRVSLUD IURP ZDWHUV DQG VRLOV, GLUHFW LQRFXODWLRQ RI HQYLURQPHQWDO VDPSOHV LQWR VVVFHSWLEOH DQLPDO PRGHV KDYH EHHQ XVHG. 3DWKRJHQLF OHSWRVSLUHV WKDW

LQGXFH LQIHFWLRQ DQG GLVHVV LQ VVFK WHVW DQLPDOV DQG
 FXOWXUHV IURP WKHLU EORRG RU WDUJHW RUJDQV DOORZV IRU WKH
 UHFRYHU\ RI SXUH FXOWXUHV. ([DPSOHV DUH SURYLGHG LQ WKH
 IROORZLQJ VHFWRQ 2.2, SDWKRJHQLF OHSWRVSLUHV ZHUH LVRODWHG
 IURP UHFUHDWLRQDO ZDWHU LQ WKH 86\$ DIWHU LQRFODWLRQ LQWR
 JXLQHD SLJV ('LHVFK DQG OF&XOORFK, 1966).

\$ QXPEHU RI SDWKRJHQLF OHSWRVSLUHV ZHUH VLPLODU\
 UHFRYHUHG IURP VRLOV DQG ZDWHU LQ ODOD\ULD DIWHU
 LQRFODWLRQ RI KDPVWHU (%DNHU DQG %DNHU, 1970). 7KLV
 WHFKQLTXH XVHG PDQ\ VVVFHSWLEOH DQLPDOV (KDPVWHU RU
 JXLQHD SLJV), DQG LV FXUUHQWO\ XQDFHFWDEOH IURP DQ HWKLFDO
 SHUVSHFWLYH. 2I QRWH, WKLV WHFKQLTXH GRHV QRW DOORZ D
 TXDQWLWDWLYH DVVHVVPHQW, VLQFH WKH SDWKRJHQLF OHSWRVSLUHV
 DUH DPSOLILHG RU ORVW LQ WKH WHVW DQLPDOV E\ LPPXQH
 FOHDUDQFH, GHSHQGLQJ ERWK RQ WKHLU RZQ YLUXOHQFH DQG WKHLU
 LQLWDO FRQFHQWUDWLRQ LQ WKH VDPSOH VWXGLHG (PLQLPDO
 LQHFWDLYH GRVH). \$QLPDOV PLJKW DOVR GLH IURP DQRWKHU
 LQIHFWLRQ WKDW PD\ PDVN D YLUXOHQW OHSWRVSLUH. 7R
 VXPPDULJH, WKLV WHFKQLTXH KDV DQ H[FHOOHQW VSHFLILFLW\ LI
 /HSWRVSLUD LVRODWRQ LV VVFFHVIXO, EXW PD\ VXIIHU IURP D ORZ
 VHQVLWLYLW\ SUHVXPDEO\ OHDGLQJ WR D QXPEHU RI IDOVH
 QHJDWLYH UHVXOWV. &RQVHTXHQWO\, WKH SURSRUWLRQ RI SRVLWLYH
 VDPSOHV REVHUYHG ZLWK WKLV DQLPDO-HQULFKPHQW WHFKQLTXH
 DUH H[SHFWHG WR XQGHUHVWLPDWH WKH WUXH RFFXUUHQFH.

2QFH WKH OHSWRVSLUHV DUH LVRODWHG, WKHUH LV QR HDV\ DQG
 VSHFLILF SKHQRW\SLF WHFKQLTXH IRU WKHLU LGHQWLILFDWLRQ, HYHQ
 DW WKH VSHFLHV OHYHO. 7KLV IXUWKHU FRPSOLFDFWHG WKH HDUO\
 VWXGLHV RI /HSWRVSLUD LQ WKH HQYLURQPHQW, EXW PRGHUQ
 PROHFODU PHWKRGV DUH QRZ UHGXFQJ WKLV SUREOHP. 7KH
 ,QWHUQDWLRQDO /HSWRVSLURVLV 6RFLHW\ UHJXODUO\ SURGXFHV D
 SRVLWLRQ VWDWHPHQW RQ WKH VSHFDWLRQ RI /HSWRVSLUD LVRODWHV,
 ZKLFK LV SXEOLFO\ DYDLDEOH
 (KWWSV://OHSWRVFLHW\RUJ/UHVXUFHV). 7KH PRVW UHFHQW
 UHFRPPHQGDWLRQ LV WR XVH :KROH *HQRP 6HTXHQFLQJ

WHFKQLTXHV DQG JHQRPLF FRPSDULVRQV IRU VSHFLDWRQ.

2.1.1 &XOWXUH IURP HQYLURQPHQWDO VDP SOHV

7KHUHV LV QR VWDQGDUG SURWRFRQ IRU FXOWXULQJ YLUXOHQW VSHFLHV RI /HSWRVSLUD IURP ERGLHV RI IUHVK ZDWHU RU VRLO.)XUWKHUPRUH, WKHUHV DUH RQ\ D IHZ UHSRUWV GHVFULELQJ WKH LVRODWRQ RI YLUXOHQW /HSWRVSLUD IURP HQYLURQPHQWDO VDP SOHV; DV GLVFXVVHG DERYH, WKH PDLQ GLILFXOW\ LQ WKH LVRODWRQ RI WKH VSHFLHV LV WKH RYHUJURZWK RI HQYLURQPHQWDO EDFWHULD RU WKH IDVW-JURZLQJ VDSURSK\WLF /HSWRVSLUD (%DUUDJDQ HW DO., 2011; %HQDFHU HW DO., 2013; 6DLWR HW DO., 2013). &XOWXUH-EDVHG SURWRFRQV LQFOXGH WKH XVH (O-+ ((OOLQKDXVHQ DQG OF&XOORXJK PRGLLHG E\ -RKQVRQ DQG +DUULV) FXOWXUH PHGLXP FRQWDLQLQJ FRFNWDOV RI DQWLEDFWHULD DQG DQWL-IXQDO FRPSRXQGV VXFK DV VXOIDPHWKR[D]ROH, WULPHWKRSULP, DPSKRWHULFLQ %, IRVIRPFLQ, DQG 5-IOXRURXUDLO (%HQDFHU HW DO., 2013; 6DLWR HW DO., 2015; 6DLWR HW DO., 2013). \$OWHUQDOLYHO\ EDFWHULD FRQWDLQLQJ DQWLDWRQ LQ ZDWHU VDP SOHV FDQ EH UHGXFHG E\ XWLQJLQJ 0.22 cP ILOWUDWH EHURH HQULFKLQJ LQ (O-+ PHGLXP, WKHQ LVRODWRQ FRORQLHV RQ VROLG PHGLXP (6DLWR HW DO., 2015; :XWKLNDQXQ HW DO., 2013).

2.1.2 0ROHXODU EDVHG PHWKRGV: DPSOLILFDWRQ RI OHSWRVSLUD '1\$ IURP HQYLURQPHQWDO VDP SOHV

'XH WR GLILFXOWLHV LQ FXOWXULQJ /HSWRVSLUD IURP HQYLURQPHQWDO VDP SOHV, QXPURXV 3&5-EDVHG WHFKQLTXHV KDYL EHHQ GHYHORSHG WKDW PDLQO\ WDUJHW JHQHV RQ\ SUHVHQW LQ SDWKRIHQLF /HSWRVSLUD, VXFK DV OLS/32 (OXgR)=DQJL HW DO., 2014; 9LQRG .XPDU HW DO., 2016E; \$YLDW HW DO., 2010) RU SDWKRIHQLF VSHFLILF VHTXHQFHV RI JHQHV, VXFK DV IOD% (9LOODQXHYD HW DO., 2014), VHF< (3HUH) DQG *RDUDQW, 2010; *XUQLHU HW DO., 2018) DQG WKH 166 U51\$ JHQH (*DQRJD HW DO., 2006). %HFDXVH RI VHTXHQFH SRO\PRUSKLPV, 3&5 WDUJHWLQJ OLS/32 RU VHF< IDLO WR GHWHFW YLUXOHQW /HSWRVSLUD RI WKH LQWHUPHGLDWH FOXVWHU (H.J. /LQHL, /. EURPLL, /. LQDGL, /ZRMILL, /. OLFHUD\LDH), ZKLFK DUH FRPPRQ\ IRXQG LQ ZDWHU (*DQRJD HW DO., 2006, 7KDSLGDGXQSDQLW HW DO., 2013).

\$ VHFRRG SUREOHP ZLWK 3&5 PHWKRGV XVHG WR GDWH LV WKDW GHWHFWLQJ RI JHQRPLF '1\$ VHTXHQFHV SURYLGHV QR LQGLFDWRQ RI WKH YLDELOLW\ RI EDFWHULD LQ ZDWHU RU RWKHU PDWULFV. ,Q DGGLWLRQ WR WKH SRVVLEOH XVH RI 30\$ RU (OS WR UHGXFH FHOO PHPEUDQH FRPSURPLVHG RU IUHH '1\$ GHWHFWLQJ (7KLEHDX[HW DO., 2017; 6RXSe*LOEHUW HW DO., 2017), WDUJHWLQJ SUH-51\$ DSSHDUV WR EH DQ DOWHUQDOLYH ZLWK SRVVLEO\ JUHDWHU SUHFLVLQJ LQ GHWHFWLQJ YLDEOH EDFWHULD (&DQJHORVL, 2009; *HGDODQJD DQG 20VRQ, 2009). :KLOH \HW WR EH UHSRUWHG IRU /HSWRVSLUD,

WDUJHWLQJ SUH-51\$ EHURH DQG DIWHU PHGLD VWLPXODWRQ DQG

DVVD\QJ E\ T57-3&5 WR LGHQWL\ GLIHUHQFHV LQ WKH SUH51\$ FRSLHV SUHVHQW VKRXOG FRUUHVSRQG WR YLDEOH /HSWRVSLUD (&DQJHORVL, 2018).

0RVW UHFHQW\, GHWDLOHG SURFHGXUHV IRU WKH PROHFODU GHWHFWLQJ RI SDWKRIHQLF OHSWRVSLUH KDYL EHHQ SXEOLVKHG, ZKLFK ZLOO SUREDEO\ WULJHU IXUWKHU VWXGLHV RQ OHSWRVSLUH LQ WKH HQYLURQPHQW (%HLJO DQG 9HUPD, 2017; 5LHGLJHU HW DO., 2016; 7KLEHDX[HW DO., 2018D). 7KHUHV KDV DOVR EHHQ LQFUHDVHG XVH RI KLJK WKURXJKSXW VHTXHQFQLQJ WHFKQRORJLHV.)RU H[DPSOH, 166 U51\$ DPSOLFRQ VHTXHQFQLQJ \HOGHG

VRXUFHV (+XDQJ HW DO., 2014; =KDQJ HW DO., 2017; (VFREHGR-+LQRMVRD DQG 3DUGR-/RSH], 2017). 6WXGLHV XVLQJ VXFK VR-FOOHG QH[W JHQHDFWRQ '1\$ VHTXHQFQLQJ DSSURDFKHV ZLOO OLNHO\ SURYLGH LPSURYHG LQIRUPDWRQ RQ /HSWRVSLUD HFRORJ\ LQ WKH FRPLQJ \HDUV.

2.2 'DWD RQ 2FFXUUHQFH

2.2.1 ([FUHWD LQ WKH HQYLURQPHQW

3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD OLYH DQG PXOWLSO\ LQ WKH SUR[LPDO NLGQH\ WXEXOHV RI UHVHUYRLU DQLPDOV, ZKLFK DUH IUHTXHQW\ DV\PSWRPDWLF, DQG DUH WKHQ VKHG WKURXJK WKH XULQH. 7KXV, WKH\ UHDFK VRLOV DQG ZDWHUV LQ WKH HQYLURQPHQW, ZKLFK DUH WKH VRXUFHV RI PRVW KXPdq LQIHFWLRQ. +RZHYHU, YHU\ OLWWOH LV NQRZQ RQ WKH DFWXDO QXPEHUV RI OHSWRVSLUH WKDW DUH VKHG E\ UHVHUYRLU DQLPDOV. \$ GHWDLOHG DQDO\VLV RI WKH NLQHWLHV RI H[FUHWLRQ LQ PLFH VKRZV WKDW H[FUHWLRQ LQFUHDVHV ZLWK DJH, UHDFKLQJ 3.0 [10⁷ /PO RI XULQH DQG VXJJHVWLQJ WKDW ROGHU URGHQWV H[FUHWH ODUJHU DPRXQV RI OHSWRVSLUH (6RXSe*LOEHUW HW DO., 2017). \$ PHWD-DQDO\VLV LQGLFDWHG WKDW UHVHUYRLU UDWW\ H[FUHWH WKH JUHDWHVW FRQFHQWUDWRQ RI OHSWRVSLUH (5.7[10⁶ SHU P/ RI XULQH), EXW ODUJH PDPPDOV SURGXFH WKH JUHDWHVW TXDQWLW\ (XS WR 10⁹ OHSWRVSLUH SHU GD\). EHFDXVH RI WKH ODUJHU YROXPH RI XULQH (%DUUDJDQ HW DO., 2017). 7KLW PHWD-DQDO\VLV VXJJHVWHG WKDW KXPdqV FRXOG VKHG DSSUR[LPDWHO\ 10⁶ OHSWRVSLUH SHU GD\. +RZHYHU, H[FSW LQ YHU\ VSHFLILF VWXDWLRQV, KXPdqV XVXDOO\ GR QRW EHFRRP FKURQLF FDUULHUV DQG RQ\ H[FUHWH OHSWRVSLUH IRU D FRXSOH RI GD\ WR ZHHN (/HYHW, 2001). 7KHUHIRUH, KXPdq H[FUHWH DUH XVXDOO\ QRW FRQLGHUHG WR SOD\ DQ HSLGHLRORJLDO UROH LQ WUDQVPLVLRQ RI OHSWRVSLURVLV.

2.2.2 6HZDJH

/HSWRVSLURVLV KDV EHHQ KLVWRULFDOO\ DVVRFLDWHG ZLWK VHZDJH DQG LV VWL00 DQ RFFXS DWRQDO KDJDUG LQ VHZHU-ZRUNHUV. 3DWKRJHQLF OHSWRVSLUH ZHUH LVRODWHG IURP VHZDJH RU VHZDJH VOLPH YHU\ HDUO\ (\$OVWRQ, 1935; &RJKODQ DQG .PHW\, 1987; -RQHV HW DO., 1981). 8VLQJ PROHFODU WHFKQLTXHV, SDWKRIHQLF OHSWRVSLUH ZHUH HYLGHQFHG IURP VHZDJH LQ WKH 3HUXYLDQ \$PDJHQ (*DQRJD HW DO., 2006) DQG IURP D ZDVWHDZDWHU VDP SOH LQ &RORPELD ((QVXQFKR-+R\RV HW DO., 2017). ,Q %UDJLOLDQ VOXPV, RSHQ VHZHUV DUH FRQLGHUHG DV D PDMRU VRXUFH RI KXPdq OHSWRVSLURVLV, \HW PD\ EH PRUH D IXQFWLRQ RI UDW XULQH SUHVHQFH WKDQ KXPdq VHZDJH. \$ UHFHQW VWXG\ LQ DQ XUEDQ VOXP LQ 6DOYDGRU, %UDJLO, GHPRQVWUDWHG WKH SUHVHQFH RI SDWKRIHQLF OHSWRVSLUH LQ PRUH WKDQ RQH WKLVG RI VHZDJH ZDWHU VDP SOHV, ZLWK D

FRQFHQWUDWRQ WKDW UDQJH 2.0[10³ WR 1.7[10⁶ /100 P/. 7KH

HYLGHQFH RI WKH SUHVHQFH RI /HSWRVSLUD LQ YDULRXV ZDWHU

KLJKHVW FRQFHQWUDWLRQ ZHUH UHSRUWHG GXULQJ WKH UDLQ\ VHDVRQ DQG DW VDPSOLQJ VLWHV QHDUHVW WKH ERWWRP RI WKH YDOOH\ DQG WKXV PRVW YXOQHUEOH WR IORRG ZDWHUV (&DVDQRYDV-0DVVDQD HWD., 2018).

2.2.3 ODQXUH

'XH WR WKH KXJH TXDQWLWLHV RI OHSWRVSLUHV SRWHQWLD00\ H[FUHHHG LQ WKHXULQH E\ ODUJH PDPPDOV, PDQXUH FDQ EH D PDMRU VRXUFH RI FRQWDPLODWRQ. 'LUHFW GHWHFWLRQLQ RU LVRODWRQ RI SDWKRIHQLF OHSWRVSLUHV IURP PDQXUH LV D PDMRU

FKDOOHQJH, EHFDXVH RI WKH HQRUPRXV EDFWHULDO EXUGHQ DQG WKH GLILFXOWLHV RI VHOHFWLYHO JURZLQJ OHSWRVSLUHV, DV ZHOO DV WKH PDMRU FRQFHUQ RI 3&5 LQKLELWURV SUHYHQWLQJ D UHOHYDQW XVH RI PROHFODU GHWHFWLRQ. &DWWOH PDQXUH ZDV VKRZQ WR EH D VRXUFH RI SDWKRJHQLF OHSWRVSLUHV LQ ILHOG FRQGLWLRQV (*LOOHVSLH DQG 5\QR, 1963). \$ VWXG\ WKDW PRGHOHG WKH VKHGGHQ RI OHSWRVSLUHV LQ FDWWOH PDQXUH IRXQG WKH\ ZHUH UHVLQHQW LQ DQ R\GLDWLRQ GLWFK GHVLJQH IRU QXWULHQW UHPRYDO, SHUHLVWLQJ IRU XSZDUGV RI WZR PRQWKV ('LHVFK, 1971). ORUH UHFHQWO\, D FKDQJH LQ WKH PDQDJHPHQW RI OLYHVWRFN PDQXUH LQ RUHD ZDV DVVRFLDWHG ZLWK D VLJQLILFDQW GHFUHDVH LQ OHSWRVSLURVLV LQFLGHQH (5\X HW DO., 2017).

2.2.4 6XUIDFH ZDWHU

\$V GHVFULEHG DERYH (VHH VHFWRQ 2.1), VWXGLHV XVLQJ RQO\ FXOWXUH-EDVHG PHWKRGV PRVWO\ GHWHFWHG VDSURSK\WLF OHSWRVSLUHV, ZKLFK DUH QRUPDO LQKLELWQWV RI ZDWHU DQG VRLOV DQG IUHTXHQWO\ RYHUJURZ YLUXOHQW OHSWRVSLUHV LQ FXOWXUH. 8VLQJ LQRFXODWLQJ WR VVFXHFWLEOH DQLPDOV (JXLQHD SLJV RU KDPVWHUV), SDWKRJHQLF OHSWRVSLUHV KDYL EHHQ LVRODWHG IURP ERWK WHPSHUDWH DQG WURSLFDO VXUIDFH ZDWHUV ('LHVFK DQG OF&XOORFK, 1966; &UDZIRUG -U HW DO., 1969; %DNHU DQG %DNHU, 1970; SOH\DOGHU HW DO., 1975; -DFNVRQ HW DO., 1993). OROHFXODU GHWHFWLRQ KDV EHHQ XVHG VLQFH WKH ODWH 1990V DQG QRWDEO\ DOORZHG VRPH '1\$ IURP SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD WR EH GHWHFWHG IURP ODNH ZDWHU DVVRFLDWHG ZLWK D UHFUHDWLQDO RXWEUHDN RI OHSWRVSLURVLV DIWHU D WULDWKORQ LQ 00LQRLV, 86\$ (ORUJDQ HW DO., 2002). /DWHU PROHFODU PHWKRGV GHWHFWHG SDWKRJHQLF OHSWRVSLUHV IURP 23% RI YDULRXV VXUIDFH ZDWHU VRXUFHV LQ 7KDOODQG (7DQVXSXDVLU HW DO., 2006). 2I QRWH, FODVVLFDQ 3&5 FDQQRW SURYLGH GLUHFW TXDQWLWDWLYH LQIRUPDWLRQ DERXW WKH OHSWRVSLUHV, EXW ERWK VWXGLHV FLWHG DERYH VXJHVV ORZ FRQFHQWUDWLQJ.

7KH XVH RI TXDQWLWDWLYH UHDO WLPH 3&5 (T3&5) GRHV HQDEOH GLUHFW TXDQWLWDWLYH HVLPLDWHV RI FRQFHQWUDWLQJ RI OHSWRVSLUHV LQ ZDWHU VRXUFHV. &RQFHQWUDWLQJ LQ WKH UDQJH RQH WR VHYHQWHHQ WKRXVDQG OHSWRVSLUHV SHU P/ (LQFOXGLQJ ERWK SDWKRJHQLF DQG LQWHUPHGLDWH VWUDLQV) ZHUH PHDVXUHG LQ YDULRXV VXUIDFH ZDWHU VRXUFHV LQ 3HUX, QRWDEO\ VKRZLQJ ERWK KLJKHU IUHTXHQF\ DQG KLJKHU FRQFHQWUDWLQJ LQ XUEDQ (HVSFLDOO\ LQ D PDUNHW DUHD) WKDQ LQ UXUDO DUHD (*DQRJD HW DO., 2006). ,Q +DZLLDQ VWUHDPLV, /HSWRVSLUD ZHUH GHWHFWHG LQ 87 RI 88 ZDWHU VDP SOHV (98.8%), ZLWK FRQFHQWUDWLQJ IURP 5 WR 10⁴ JHQRPV / 100P/ (DSSUR[. 1 WR 2.0[10³ OHSWRVSLUHV / 100 P/), ZLWK D VWURQJ FRUHHODWLQJ ZLWK WXUELGLW. JUWKHU VHTXHQFLQJ RI WKH 3&5 SURGXFW HYLGHQFHG RQO\ VSHFLHV IURP WKH LQWHUPHGLDWH FOXVWHU (9LDX HW DO., 2011). ,Q D WHPSHUDWH HQYLURQPHQW QHGU /RQ,)UDQFH, SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD ZHUH GHWHFWHG LQ 3 RI 47 (6.38%) ZDWHU VDP SOHV FROOHFWHG IURP SRQGV ZLWK FRQFHQWUDWLQJ LQ WKH UDQJH 10⁵ WR 10⁶ / 100 P/ (9HLQ HW DO., 2012). ,Q WKH WHPSHUDWH UHJLRQ RI /RV 5LRV LQ 6RXWK-&HQWDO &LOH, SDWKRJHQLF OHSWRVSLUHV HYLGHQFHG E\ 3&5 ZHUH PRUH FRPPRQ LQ VWDQGLQJ ZDWHUV (19.3% RI SXGGOHV DQG 45.5% RI RSHQ FRQWDLQHU) WKDQ LQ UXQQLQJ ZDWHUV (3.9% LQ FDQDOV RU ULYHU). 7KH RYHUDOO GHWHFWLRQ UDWH ZDV 77 RXW RI 570 (13.5%) ZDWHU VDP SOHV, UHYHDOLQJ WKH XELTXLW RI SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD LQ VXUIDFH ZDWHUV LQ WKLV WHPSHUDWH UHJLRQ (0XGRJ=-DQJL HW DO., 2014). 3DUWLFXODU DWWHQWLQJ VKRXOG EH SDLG WR IORRGZDWHUV, ZKLFK

DUH NQRZQ WR EH UHVSQVLEOH IRU QXPHURXV OHSWRVSLURVLV LQIHFWLRQV DQG RXWEUHDN LQ KXPDOV. \$OWKRJK IORRGZDWHUV KDYL UDUHO\ EHHQ VWXGLHG (7KDLSDGXQJSDQLW HW DO., 2013; &KDWXURQJNDVXPULW HW DO., 2013), WKH VKRXOG EH FRQVLGHUHG DV SHULRGV RI LQFUHDVHG OHSWRVSLURVLV ULVN, DV VKRZQ E\ WKH KLJK QXPEHU RI OHSWRVSLURVLV RXWEUHDN WULJHUHG E\ IORRGV (6PLWK HW DO., 2013; 3DUN HW DO., 2006; ODWRQR HW DO., 2015; *D\QRU HW DO., 2007; (DVWRQ, 1999) (7DEOH 2-5).

2.2.5 *URXQGZDWHU

)HZ VWXGLHV KDYL LQYHVWLJDWHG OHSWRVSLUHV LQ JURXQG ZDWHU. 5HFHQW 166 U51\$ JHQH DPSOLFQ VWXGLHV FRQILUP D JUHDWHU DEXQGDQFH RI /HSWRVSLUD LQ VXUIDFH WKDQ LQ XQGHUJURXQG ZDWHUV ('HODIRQW HW DO., 2016). 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD ZHUH UHSRUWHG IURP XQGHUJURXQG ZDWHU VRXUFHV LQ 7KDOODQG, EXW WKH VWXG\ GLG QRW SURYLGH KIGURORJLF GHWDLOV DERXW WKH ZDWHU VRXUFHV LQYHVWLJDWHG (.XULOXQJ HW DO., 2017).

2.2.6 'ULQNLQJ ZDWHU

/HSWRVSLUD KDYL EHHQ GHWHFWHG LQ GULQNLQJ ZDWHU VDP SOHV LQ VHYHDO VWXGLHV. 6DSURSK\WLF OHSWRVSLUHV DUH QRUPDO LQKLELWQWV RI IUHVKZDWHU, ZKLFK GR QRW LQYROYH DQ\ VDQLWDO ULVN. +RZHYHU, WKHUH KDV DOVR EHHQ HYLGHQFH RI SDWKRJHQLF OHSWRVSLUHV IURP GULQNLQJ ZDWHU IRU DQLPDOV (&DOGHURQ HW DO., 2014; 0XGRJ=-DQJL HW DO., 2014; ODVRQ HW DO., 2016; .XULOXQJ HW DO., 2017), EXW DOVR IRU KXPDOV (0XGRJ=-DQJL HW DO., 2014; ODVRQ HW DO., 2016). 9HU\ LQWHUHVLUJO\, D VKRWJXQ PHWDJHQRP LQ VWXG\UHWLHYHG D /HSWRVSLUD VSS. GUDIW JHQRP IURP FKORULQDWHG GULQNLQJ ZDWHU, VXJHVVWLQJ DQ DELOLW\ WR UHVLV VRPH GHJUHH RI FKORULQDWLQJ (=KDQJ HW DO., 2017). 6LPLDOUO\, D 166 U51\$ JHQH DPSOLFQ VWXG\ IRXQG /HSWRVSLUD VSS. VHTXHQFH UHGDV LQ D GULQNLQJ ZDWHU QHWZRUN, ERWK ULJKW DIWHU FKORULQDWLQJ (LQWLDO FRQFHQWUDWLQJ RI 0.6-0.8 PJ// IUHH FKORULQH) DQG LQ ILQDO WDSZDWHU (0.1 PJ// UHVLGXDO FKORULQH); LQ WKLV VWXG\, D KLJKHU UHODWLYH DEXQGDQFH RI /HSWRVSLUD VSS. VHTXHQFH UHGDV LQ WDS ZDWHU FRPSDUHG WR LQWLDO ZDWHU IXUWKHU VXSSRUW WKH K\SRWKHVLV RI UHVLVDOFH WR FKORULQDWLQJ (+XDQJ HW DO., 2014). :KHWKHU WKLV UHVLVDOFH LV UHODWHG WR /HSWRVSLUD DELOLW\ WR IRUP ELRIOPV (GLVFXVHG DERYH LQ VHFWRQ 2) UHPDLQV WR EH GHWHUPLQH.

2.2.7 6HDZDWHU

/HSWRVSLUHV DUH WKRXJKW WR VXUYLYH SRRUO\ LQ VHDZDWHU. +RZHYHU, WKHUH LV OLPLWHG HYLGHQFH RI VRPH GHJUHH RI VDOWZDWHU WROHUDQFH E\ VRPH /HSWRVSLUD VWUDLQV. 2QH VWXG\ UHSRUWHG WKH LVRODWLQJ RI D YLUXOHQW OHSWRVSLUHV WKDW ZDV DSSDUHQWO\ WROHUDQW WR VHDZDWHU (*UXQH /RHOHU HW DO., 2015). \$QRWKHU VWXG\, XVLQJ 166 U51\$ JHQH DPSOLFQ, UHSRUWHG /HSWRVSLUD LQ PDULQH ZDWHUV DQG VRLOV LQ WKH *XOI RI OH[LFR ((VREHGR-&LQMRVD DQG 3DUGR-/RSH], 2017). 2Q WKH RWKHU KDQG, OHSWRVSLURVLV FDVHV REVHUYHG LQ PDULQH PDPPDOV FRXOG EH GXH WR FRDVWDO FRQWDPLODWLQJ E\ YLUXOHQW OHSWRVSLUHV DULVLQJ IURP WHUHHVWULDO UXQR II DQG FRQWDPLODWLQJ RI FRDVWDO PDULQH HQYLURQPHQWV (%RJRPROL HW DO., 2008; &DPHURQ HW DO., 2008; 3UDJHU HW DO., 2013).

2.2.8 60XGJH

/HSWRVSLUHV KDYH EHHQ UHSRUWHG IURP VHZDJH DQG VHZDJH VOXGJH VLQFH WKH 1930V (\$OVWRQ, 1935; -RQHV HW DO., 1981; &RJODQ DQG .PHW\, 1987), \HW WKHUH KDV EHHQ OLWWOH LQWHUHVW JHQHUDOO\ LQ VXFK UHSRUWV EHFDXVH KXPdq VHZDJH GRHV QRW DSSHDU WR EH D VLJQLILFDQW VRXUFH RI KXPdq GLYHDVH.

2.2.9 6RLO

1RJXFKL (1918) DSSHDUV WREH RQH RI WKH ILUVW WR UHSRUW VRLOV DV D SRVVLEOH HQYLURQPHQW ZKHUH /HSWRVSLUD VXUYLYH. +RZHYHU, EHFDXVH RI WKH WHFKQLFDO FKDOOHQJHV RI VWXGLQJ GHOLFDPH VORZ-JURZLQJ RUJDQLVPV LQ VRLOV, WKLV HQYLURQPHQWDO FRPSDUWPHQW KDV EHHQ SRRUO\ VWXGLHG. 8VLQJ DQLPDO LQRFKXODWLRQ, SDWKRIHQLF /HSWRVSLUD ZHUH UHFHYHUHG IURP ODOD\VLQJ VRLO ZDVKLQJLV LQ WKH HDUO\ 1960V. 7KH DXWKRUV QRWHG D KLJKHU LVRODWLRQ IUHTXHQF\ IURP VRLO ZDVKLQJLV WKDQ IURP ZDWHUV (%DNHU DQG %DNHU, 1970). 4XLWH VLPLODUO\, D VWXG\ LQ OLQOHHVRWD, ZKLFK IDLOHG WR LVRODWH YLUXOHQW VWUDLQV, QRWHG WKDW LVRODWLRQ RI OHSWRVSLUHV ZDV PRUH IUHTXHQW IURP VRLOV WKDQ IURP DGMDFHQW ZDWHUV (+HQU\ DQG -RKQVRQ, 1978). 6LPLODUO\ LQ +DZDLL, OHSWRVSLUHV ZHUH LVRODWHG IURP 7 RI 13 ZDWHU VDPsohv, EXW IURP DOO 16 VRLO VDPsohv H[DPLQH (LOVRQ DQG \XMLRND, 1995). ,Q 1HZ &DOHGRQLD ZKHUH OHSWRVSLURVLV LV HQGHPLF, D VRXUFH WUDFNQJ VWXG\ XVHG YLDELOLW\ 3&5 DQG GHWHFWHG YLDEOH SDWKRIHQLF OHSWRVSLUHV LQ ULYHU VRLOV ZHHNV DIWHU WKH FRQWDPDQWLRQ HYHQWV (7KLEHDX\ HW DO., 2017). \$ FRPELQDWLRQ RI VHOHFWLYH DJHQWV ZDV SURYHQ WR EH YHU\ HIIHFWLYH IRU WKH FXOWXUH DQG LVRODWLRQ RI /HSWRVSLUD IURP HQYLURQPHQWDO VDPsohv (&KDNuderuw\ HW DO., 2011). 8VLQJ WKLV VHOHFWLRQ WHFKQLTXHV, D JUHDW ELRGlyhuVLW\ RI OHSWRVSLUHV ZHUH LVRODWHG IURP WURSLFDO VRLOV LQ 1HZ &DOHGRQLD, VXSSRUWLQJ WKH KSRWKHVLV WKDW VRLOV PD\ EH WKH RULJLQDO KDELWDW RI WKH JHQXV /HSWRVSLUD DQG D SRVVLEOH HQYLURQPHQWDO UHVHUYRLU RI SDWKRIHQLF VWUDLQV (7KLEHDX\ HW DO., 2018E; 7KLEHDX\ HW DO., 2018D). 7KLV KSRWKHVLV LV DOVR VXSSRUWHG E\ RWKHU ILQGLQJ, QRWDEO\ WKH SRVLWLYH FRUOHODWLRQ EHWZHHQ /HSWRVSLUD FRQFHQWUDWLRQ DQG WXUELGLW\ (9LDX DQG %RHKP, 2011) RU WKH UROH RI IORRGV LQ WULJJHULQJ OHSWRVSLURVLV RXWEUDNV, DV SUHVHQWHG DERYH.

2.2.10 ,UULJDWLRQ ZDWHU DQG RQ FURSV

,UULJDWLRQ ZDWHUV DUH PRVWO\ VXUIDFH ZDWHUV, WKRXJK JURXQGZDWHU LV VRPHWLPHV XVHG. ORVW RI WKH ULNV DVVRFLDWHG ZLWK LUULJDWLRQ ZDWHUV VKRXOG EH HYDOXDWHG E\ NQRZOHGJH DFTXLHG IURP WKH ZDWHU VRXUFH FRQVLGHUH DQG GHVFULEHG LQ WKH FRUHVSRQGLQJ VHFWRQ. 9HU\ IHZ VWXGLHV KDYH FRQVLGHUH /HSWRVSLUD LUULJDWLRQ ZDWHU.

7KHUH LV ERWK GLUHFWDQ LQGLUHFWD HYLGHQFH RI D KLJK ULVN RI OHSWRVSLURVLV LQ KXPdqV WKDW UHO\ RQ LUULJDWHG FURSV. ,Q .RUHD, SDWKRIHQLF OHSWRVSLUHV ZHUH LVRODWHG IURP WKH ZDWHU RI D ULFH SDGG\ ILHOG LGHQWLILHG DV D VRXUFH RI D OHSWRVSLURVLV RXWEUDN (.LP, 1987), SURYLGLQJ GLUHFWD HYLGHQFH. ,QGLUHFWD HYLGHQFH UHOLHV RQ WKH HSLGHPLRORJLFDO DVVRFLDWLRQ RI KXPdq OHSWRVSLURVLV ZLWK DFWLYLW\ LQ ULFH SDGG\ ILHOGV (.LP, 1987; 5\X DQG /X, 1966; ,YDQRYD HW DO., 2012), EXW DOVR RWKHU LUULJDWHG FURSV, VXFK DV LUULJDWHG WDUR ILHOGV (ODVVHQHW HW

DO, 2015).

&URSV DUH QRW FRQVLGHUH WR UHSUHVHQW D GLUHFWD ULVN IRU OHSWRVSLURVLV, EXW LPSURSHU VWURDJH FDQ OHDG WR URGHQW SRSXODWLRQ JURZWK, FRQVWLWXWLQJ DQ LQGLUHFWD ULVN RI OHSWRVSLURVLV YLD LQFUHDVHG H[FUHWLRQ RI XULQH.

2.2.11)LVK DQG VKHOOILVK

/HSWRVSLUD LVRODWHV KDYH KLVWRULFDOO\ EHHQ UHFHYHUHG IURP D QXPEHU RI FROG-EORRGHG DQLPDOV, QRWDEO\ DPSKLELDQV DQG UHSWLOHV (\$QGUHJV HW DO., 1965; OLQHHWH, 1983). ORUH UHFHQWO\, PROHFODU GHWHFWLRQ VXJJHVWHG /HSWRVSLUD FDUULDJH LQ WKH NLGQH\ RI VRPH UHSWLOHV (-REELQV DQG \$OH[DQGHU, 2015). 3RVLWLYH VHUORJ\ ZDV VRPHWLPHV UHSRUWHG IURP IUHVKZDWHU ILVKHV (OJRGH HW DO., 2015), EXW WKLV ILQGLQJ LV FRQVLGHUH DQHFGRWDO DQG GRHV QRW PHDQ WKDW WKH VHUVRVLWLYH ILVKHV KDQ WKH DELOLW\ WR FKURQLFDOO\ FDUU\ DQG VKHG OLYH YLUXOHQW OHSWRVSLUHV. &XUHQW VFLHQWLILF FRQVHQVXV LV WKDW FROG-EORRGHG YHUWHEUDWHV DQG LQYHUWHEUDWHV DUH QRW LQYROYHG DV UHVHUYRLU RI KXPdq-SDWKRIHQLF OHSWRVSLUHV, DQG WKH KDYH QRW EHHQ UHSRUWHG DV SRVVLEOH YHKLFOHV RI KXPdq FRQWDPDQWLRQV. 2Q WKH RWKHU KDQG, IUHVKZDWHU ILVK IDUPLQJ PLJKW SRVH DQ RFXSDWLRQDO ULVN IRU OHSWRVSLURVLV, WKURXJK H[WHQVLYH DQG SURORQJHG FRQWDFW ZLWK IUHVKZDWHU, DV ZHOO DV WKURXJK WKH SRVVLEOH SUHVHQFH RI URGHQW DW IHG VWRFN IDFOLWLHV.

2.2.12 \$LU

/HSWRVSLURVLV LV QRW DQ DLUERUQH LQIHFWLRQ DQG LV RQO\ H[FHSWRQDOO\ DFTXLHG WKURXJK WKH UHVLUDWRU\ \V\WHP. \$HURVROV IURP LQIHFWLRXV VRXUFHV (FRQWDPDQW ZDWHU VRXUFHV, PDPPDO XULQH, XULQH-KXPLG EHG RI URGHQW LQ DQLPDO IDFOLWLHV) FDQ RFFDLRQDOO\ LQGXFH OHSWRVSLURVLV WKURXJK WKH PXFRXV PHPEUDQHV RI WKH UHVLUDWRU\ WUDFW (:+2, 1999; /HYHW, 2001). /HSWRVSLUHV ZHUH LVRODWHG IURP DQ DLU-FRQGLWLRQLQJ SODQW LQ 1HZ =HODQG KRZHYHU, WKH VWUDLQV LVRODWHG GLG QRW GHPRQVWUDWH YLUXOHQH LQ VXVHSHWLEOH DQLPDO PRGHQV, VXJJHVWLQJ WKDW WKH ZHUH QRW SDWKRIHQLF OHSWRVSLUHV (SLV DQG +DPHO, 1979).

2.3 3HUVLVWHQFH

(QYLURQPHQWDO VXUYLYDO DQG SHUVLVWHQFH RI YLUXOHQW /HSWRVSLUD ZDV UHFRLQJHG YHU\ HDUO\ RQ DV NH\ WR OHSWRVSLURVLV HSLGHPLRORJ\ (1RJXFKL, 1918). 9LUXOHQW OHSWRVSLUHV DUH WKRXJKW WR PXOWSO\ LQ DQLPDO KRWWV DQG RQO\ VXUYLYH LQ WKH HQYLURQPHQW. +RZHYHU, EHFDXVH RI WKH WHFKQLFDO GLILFXOWLHV LQYROYHG LQ FXOWXULQJ DQG LGHQWLILQJ /HSWRVSLUD LQ FRPSOH\ HQYLURQPHQWDO VDPsohv, OLPLWHG LQIRUPDWLRQ RQ HQYLURQPHQWDO /HSWRVSLUD VXUYLYDO KDV EHHQ SXEOLVKHG. ORVW VWXGLHV KDYH XVHG PLFURFRVPV LQ ODERUDWRU\ H[SHULPHQWV WR VWXG\ WKH VXUYLYDO RI SDWKRIHQLF OHSWRVSLUHV XQGHU GLIHUHQW SK\VLFR-FKHPLFDO FRQGLWLRQV. ,Q JHQHUDO, OLPLWHG TXDQWLWDLWLYH GDWD ZDV LGHQWLILHG IRU /HSWRVSLUD SHUVLVWHQFH RU VXUYLYDO LQ H[FUHDW RU HQYLURQPHQWDO PDWLFHV. IRQHWKHQHV, IDFWRUV OLNH\ WR LQFUHDVH SHUVLVWHQFH LQFOXGH FRDJJHJDWLRQ ZLWK GLIHUHQW EDFWHULD ZLWK LQ ELRIOPV (9LQRG .XPDU HW DO., 2015E). +HQFH, SDWKRIHQLF /HSWRVSLUD PD\ SHUVLV IRU PRQWKV LQ VXUIDFH ZDWHUV (%DUUDJDQ HW DO., 2011).

2QH FHQWXU\ DJR, 1RJXFKL (1918) LQLWLD00\ GHPRQVWUDWHG ERWK WKH VXUYLYDO DQG YLUXOHQFH RI SDWKRJHQLF OHSWRVSLUHV IRU XS WR RQH ZHHN LQ GULQNLQJ ZDWHU. /DWHU LQ D PRUH FRPSOH[H[SHULPHQWDO GHVLJQ, WKH LQIOXHQFH RI WHPSHUDWXUH DQG S+ ZHUH VWXGLHG, VKRZLQJ D ORQJHU VXUYLYDO DW QHXWUDO WR VOLJKWO\ DONDOLQH S+ DQG DQ RSWLPDO WHPSHUDWXUH DURXQG 25-27b&, ZLWK WHPSHUDWXUHV DERYH 60b& NLOOLQJ OHSWRVSLUHV LQ D IHZ VHFRQGV (&KDQJ HW DO., 1948). 7KL VDPH VWXG\ VKRZHG VXUYLYDO RI 100 GD\V ZLWK WKH DGGLWLRQ RI 1% KRUVH VHUXP LQ VWUHLOH WDS ZDWHU. %DVHG RQ LQRFODWLRQ VWXGLHV XVLQJ VXVHSHWLEOH DQLPDO KRVWV, WKH VXUYLYDO DQG LQIHFWLYLW\ ZDV IRXQG WR EH PDLQWDLQH LQ VRLOV IRU PRUH WKDQ 40 GD\V (6PLWK DQG 6HOI, 1955). 6XFK HYLGHQFH, DV ZHOO WKDW IURP RWKHU DV RWKHU VWXGLHV, KDV EXLOW WKH FDVH WKDW OHSWRVSLUHV FDQ VXUYLYH DQG UHPDLQ LQIHFWLYH IRU ZHHNV WR PRQWKV LQ D IDYRUDEOH HQYLURQPHQW. +RZHYHU, LW PXVW DOVR EH QRWHG WKDW EDFWHULDO VXUYLYDO LV QRW RQO\ HQYLURQPHQW-GHSHQGHHQ, EXW DOVR VWUDLQ-GHSHQGHHQ DQG GLIIHUHQW SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD VWUDLQV KDYH VKRZQ GLIIHUHQW VXUYLYDO FDSDELOLWLV XQGHU WKH VDPH HQYLURQPHQWDO FRQGLWLRQV (6PLWK DQG 7XUQUH, 1961).

7KH ORQJHVW VXUYLYDO UHSRUWHG LQ QXWULHQW-GHSULYHG FRQGLWLRQV ZDV UHSRUWHG IURP DQ H[SHULPHQW LQ D PLQHUDO ERWWOHG ZDWHU KHOG DW 30b&, ZKHUH D /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV VHURJURXS ,FWHURKDHPRUUKDJLDH VXUYLYHG DQG HYHQ LQGXPHG D OHWKDO GLVHDVH LQ JHUELQV DIWHU 593 GD\V (\$QGUH-)RQWDLQH HWO., 2015).

,Q QDWXUDO HQYLURQPHQWV, WKH LVRODWLRQ RI DQ LGHQWLFDQ VWUDLQ ILYH PRQWKV DSDUW LQ WKH VDPH UDLQ SXGGOH VXJJHVWHG LWV DELOLW\ WR VXUYLYH LQ ZHW VRLO EHWZHHQ UDLQ HYHQWV (6DLWR HW DO., 2013). 6LPLODUO\, XVLQJ YLDELOLW\-3&5 DQG JHQRW\SLQJ, WKH /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV VWUDLQ LQYROYHG LQ KXPDPQ LQIHFWLRQV ZDV VKRZQ WR SHUVLVW LQ VRLOV IURP ULYHU HGJHV DQG VHGLPHQWV ZKHUH KXPDPQ LQIHFWLRQV KDG RFFXUUHG 9 ZHHNV HDUOLHU (7KLEHDX[HW DO., 2017). \$OWKRJK UHSHDW FRQWDPLODWLRQ RI QDWXUDO DUHDV LV SRVVLEOH, WKHUH LV VWURQJ HYLGHQFH WKDW SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD QRW RQO\ VXUYLYH, EXW DOVR UHPDLQ LQIHFWLYH IRU ZHHNV WR PRQWKV LQ ZHW VRLOV DQG IUHVKZDWHU HFRV\VVHPV.

7DEOH 6 VKRZV HDUO\ VWXGLHV GRQH RQ SHUVLVWHQFH PRUH UHFHQW GDWD DUH QRW DYDLODEOH.

7DEOH 6. 3HUVLVWHQFH RI /HSWRVSLUD LQ GLIIHUHQW PDWULFHV

SUHD (<HDU)	6WDUWLQJ & RQFHQWUDWLRQV (6SHFLHV)	0DWUL/ & RQGLWLRQV 7HPSHUDWXUH (b&)	0D[LXP 6XUYLYDO LQ 'D\	SHIHUHQFH
1HZ <RUN (1918)	8QNQRZQ (/. LQWHUURJDQV VHURJURXS ,FWHURKDHPRUUKDJLDH)	(DVW ULYHU ZDWHU	<1	1RJXFKL, 1918
1HZ <RUN (1918)	8QNQRZQ (/. LQWHUURJDQV VHURJURXS ,FWHURKDHPRUUKDJLDH)	VHZDJH ZDWHU	<1	1RJXFKL, 1918
1HZ <RUN (1918)	8QNQRZQ (/. LQWHUURJDQV VHURJURXS ,FWHURKDHPRUUKDJLDH)	VWDJQDQW ZDWHU	<1	1RJXFKL, 1918
1HZ <RUN (1918)	8QNQRZQ (/. LQWHUURJDQV VHURJURXS ,FWHURKDHPRUUKDJLDH)	KRUVH VWRRO HPXOVLQ	<1	1RJXFKL, 1918
1HZ <RUN (1918)	8QNQRZQ (/. LQWHUURJDQV VHURJURXS ,FWHURKDHPRUUKDJLDH)	VHZHU ILOWUDWH	<1	1RJXFKL, 1918
1HZ <RUN (1918)	(3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD VWUDLQ)ODQGHUV)	QRQ VWUHLOH GLVWLOOHG ZDWHU ZLWK IHZ ODUJH PRWLOH EDFLOOL	3	1RJXFKL, 1918
1HZ <RUN (1918)	(3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD VWUDLQ)ODQGHUV)	GULQNLQJ ZDWHU	7	1RJXFKL, 1918
1RUWK 4XHHQVODQG,	20 P/ RID 7 GD\ FXOWXUH			
%ULVEDQH, \$XVWUDOLD (1950V)	LQR VRLO 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD (VWUDLQ \$XVWUDOLV \$)	6RLO	43 GD\V LQ VRLO 3 GD\V LQ ZDWHU	6PLWK DQG 6HOI, 1955
1RUWK	20 P/ RID 7 GD\ FXOWXUH			
4XHHQVODQG, %ULVEDQH,	\$XVWUDOLD (1950V)	LQ WR	VR LO	3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD

(VWUDLQ
\$XVWUDOLV \$)

5DLQ ZDWHU IURP VRLO

15 GD\ V LQ VRLO
4 GD\ V LQ ZDWHU

6PLWK DQG
6HOI, 1955

3.O 5HGXFWRQV E\ 6DQLDWRQ 0DQDJHPHQW

9HU\ OLPLWHG GDWD H[LVWV RQ WKH VSHFLILF UHPRYDO HIIHFWLQFLHV RI OHSWRVSLUHV YLD VDQLDWRQ PDQDJHPHQW DQG WUDGLWLRQDO ZDVWHZDWHU WUHDWPHQW SURFHVHV. IRQHWKHOHV, JHQHUDO GLVLQIHFWLRQ PHWKRGV DQG SK\VLFD UHPRYDO WHFKQLTXHV ZRXOG EH FRQVLGHUHG QHFHVVDU\ IRU WKH FRQWURO RI /HSWRVSLURVLV. \$GHTXDWH VXUURJDWHV IRU /HSWRVSLUD UHPRYDO LQ HQJLQHUUHG V\VWHPV KDYH QRW EHHQ LGHQWLILHG, EXW WUDGLWLRQDO IHFDO LQGLFDWRUV (L.H., (VFKHULFKLD FROL DQG (QWHURFRFFL) KDYH UHFHQWO\ EHHQ XVHG WR DVVHVV HQYLURQPHQWDO ULVN GXULQJ D OHSWRVSLURVLV RXWEUHDN LQ VUDHO ('DGRQ HW DO., 2018). 6SRUWV HYHQWV LQ DSSDUHQWO\ SULVWLQ HVXUIDFH ZDWHUV KDYH EHHQ IUHTXHQWO\ OLQNHG WR OHSWRVSLURVLV RXWEUHDN (6HMYDU HW DO., 2003), VXJJHVWLQJ WKDW FROLIRUPV DQG (. FROL FRXQWV PD\ QRW EH D JRRG LQGLFDWRU RI OHSWRVSLUD ULVN (0RUJDQ HW DO., 2002). 7KHUHIRUH, ZKHWKHU WKH\ PD\ EH UHDFRQDEOH VXEVLWXHV IRU HYDOXDWLQJ UHPRYDO WHFKQLTXHV UHPDLQV WR EH GHWHUPLQH. &DPS\OREDFWHU VSS. FRXOG DOVR VHUHV DV D VXUURJDWH GXH WR LW DOVR EHLQJ D *UDP-QHJDWLYH EDFWHULXP ZLWK D VLPLODU\ WKLQDQG HORQJDWHG SK\VLROJ\ /HSWRVSLUD LV JHQHUDOO\ FRQVLGHUHG WR EH DQ HQYLURQPHQWDOO\ -DVRFLDWHG SDWKRIHQ ZKHUH KXPDQ LQIHFWLRQ LV VWURQJO\ OLQNHG WR IORRGLQJ HYHQWV RU RXWVLGH FRQWDPDQDWRQ RI VXUIDFH ZDWHUV IURP DQLPDO XULQH. 2XWEUHDN RI OHSWRVSLURVLV JHQHUDOO\ GR QRW RFFXU LQ UHJLRQV ZLWK SURSHU VDQLDWRQ SUDFWLFHV DQG PD\ EH D UHDFRQ IRU WKH ODEN RI GDWD LQ HQJLQHUUHG V\VWHPV. :KDW SXEOLVKHG GDWD LV DYDLODEOH RQ /HSWRVSLUD LQ VDQLDWRQ DQG UHODWHG V\VWHPV LV VXPPDULJHG LQ WKH IROORZLQJ VXEWHFWLRQV.

2YHUDOO, HIIHFWLYH URGHQW FRQWURO DQG XULQH PDQDJHPHQW IURP YDULRXV GRPHVWLFDWHG DQLPDOV DUH LPSRUWDQW DVSHPV LQ PDQDJLQJ OHSWRVSLUHV DVRFLDWHG ZLWK VDQLDWRQ V\VWHPV.

5HFRPPHQGDWRQV IRU D SHUVRQ LQ D GHYHORSLQJ UHJLRQ WR PDQDJH /HSWRVSLUD LQFOXGH:

1. 8VH FKORULQH WDEOHV WR WUHDW GULQNQJ ZDWHU. ,I QR FKORULQH LV DYDLODEOH, KHDW WKH ZDWHU SDVW 50b& IRU DW OHDVW RQH PLQXWH.
2. 'R QRW EDWKH LQ, RU XVH UHFUHDWLRQDOO\, VXUIDFH ZDWHUV DIWHU IORRGLQJ HYHQWV RU ZLWK NQRZQ VRXUFHV RI IHFDO FRQWDPDQDWRQ. 7KLQ LV HVSHFLDOO\ UHJDUGLQJ LQGLYLGDV ZLWK RSHQ FXWV RU VRUHV.
3. &RPSRVW PDQXUH/GLJHVWDWH LI \RX SODQ RQ DSSO\QJ LW WR ODQG RU RWKHUZYLVH (VHH EHORZ VHFWRQ 3.1).
4. 3UHYHQW OLYHVWRFN H[FUHPHQW IURP VXUIDFHV ZDWHUV, RXWEUHDN DUH WUDFHG WR DQLPDO IHFHV DQG XULQH LQ IUHTXHQWO\ XVHG ZDWHUV.
5. &RQWURO SHVWV OLNH UDWV, PLFH, DQG RWKHU URGHQWV E\ LPSURYLQJ IRRG VWRUDJH DQG JDUEDJH GLVSRVDO FRQGLWLRQV.

3.1 :DVWHZDWHU 7UHDWPHQW

3.1.1 2Q-VLWH ZDWHUOHVV VDQLDWRQ

7KH UHGXFWRQ RI /HSWRVSLUD VSS. EHLQJ LQWURGXFHG LQWR WKH HQYLURQPHQW, RULJLQDWLQJ IURP HLWKHU KXPDQ RU DQLPDO, ZRXOG KHOS LQ UHGXFLOJ WKH IUHTXHQF\ RI KXPDQ FRQWDFW ZLWK SDWKRIHQFV VUURW\SHV. 2YHU D WKLUG RI WKH ZRUOG GRHV

QRW KDYH DFFHVV WR DGHTXDWH VDQLDWRQ IDFLOLWLHV (:+2, 2006), DQG RSHQ GHIFDWRQ LV VWLOO D FRPPRQ SUDFWLFH LQ VRPH RI WKHVH UHJLRQV. %HFDXVH RI WKH GLUHFV OLQN EHWZHHQ IORRGLQJ HYHQWV DQG RXWEUHDN RI /HSWRVSLURVLV, WKHUH LV IXUWKHU HPSKDVLV PDGH RQ WKH SK\VLFD FRQWDLQPHQW RI XQDEWHG H[FUHDW IURP HQWHULQJ WKH HQYLURQPHQW. 'XULQJ WKH UDLQ\ VHDVRQ, WKHVH XQFRQWDLQHG ZDVWHV DOORZ UXQRIL LQWR VXUIDFH ZDWHUV ZKHUH WKH\ FROOHFW DQG DOORZ IRU WUDQVPLVLRQ WR KXPDQV GRZQVWUHDN. 7KH LPSOHPHQDWRQ RI EDVLF VDQLDWRQ LQIUUVWUXFWXUHV FDQ YDVWO\ DLG LQ WKH RYHUDOO UHGXFWRQ DQG SUHYHQWLRQ RI ZDWHUEROH SDWKRIHQFV /HSWRVSLUD WUDQVPLVLRQ.

3.1.1.1 3LW/DWULQHV, YDXOW WRLOHVV, GU\ WRLOHVV

7KH DSSOLFWRQ RI EDVLF W\SHV RI WRLOHVV RU SLW ODWULQHV WR FUHDW SK\VLFD VHSUDWRQ EHWZHHQ ZDVWH VWUHDN DQG KXPDQV ZRXOG EH FRQVLGHUHG EHVW SUDFWLFH IRU KJLHQH DQG VDQLDWRQ PDQDJHPHQW RI OHSWRVSLUHV. 7KH SDWKRIHQ FRQWHQW RI XULQH LV PXFK OHVV WKDQ LQ IHFV (+JOXQG HW DO., 2002), VXJJHVWLQJ WKH SULRULWLJDWRQ RI VROGV SDUWLWLRQLQJ RI KXPDQ ZDVWH LI DW DOO HOVH.

3.1.1.2 &RPSRVWLQJ

&RPSRVWLQJ LV FRQVLGHUHG DQ HIIHFWLYH, SDVVLYH, ZDWHUOHVV DSSURDFK WR UHGXFLOJ WKH RYHUDOO ELROJLFD DFWLYLW\ DQG FRQFHQWUDWRQ RI SDWKRIHQFV EDFWHULQ LQ KJLQO\ FRQFHQWUDWHG ZDVWHV DQG KDV EHHQ IRXQG WREH HIIHFWLYH LQ UHGXFLOJ SDWKRIHQFV /HSWRVSLUD. 7KH PDLQ IDFWRUV LQIOXHQLQJ WKH LQDFWLYDWRQ RI /HSWRVSLUD VSS. LQ VOXGJH DQG PDQXUH FRPSRVWLQJ DUH WKH WHPSHUDWXUH DQG S+ FKDUFWHULVWLQV RI WKH FRPSRVW. 3DUNHU DQG :DONHU (2011) VLPXODWHG WKH S+ DQG WHPSHUDWXUH SURLOHV WUDGLWLRQDOO\ RFFXUULQJ GXULQJ FRPSRVWLQJ, HYDOXDWLQJ WKHLU HIIHFW RQ WKH VXUYLYDELOLW\ RI WKH SDWKRIHQFV OHSWRVSLUHV. 9LD ORJLVWLQ UHJUHVVLRQ, WKH\ FRQFOXGHG WKDW D WHPSHUDWXUH SURLOH DERYH 45b& IRU DW OHDVW 4 KRUV KDV WKH SRWHQWLDO WR NLOO OHSWRVSLUHV. 7KHUPRSKLOLF WHPSHUDWXUHV !50b& IRU FRPSRVWLQJ ZRXOG WKHQ KDYH WKH SRWHQWLDO WR NLOO OHSWRVSLUHV LQ D IHZ VHFRRQV, JLYHQ WKDW WKH HQWLUHW\ RI WKH ZDVWH LV VXEWHFWHG WR FRPSDUDEOH WHPSHUDWXUHV (&DQJ HW DO., 1948; 3DUNHU DQG :DONHU, 2011). /HSWRVSLUHV KDYH D VOLJKW IDYUDELOLW\ WRZDUGV DONDOLOH S+ SURLOHV (6PLWK DQG 7XUQHU, 1961), EXW LQ UHJDUGV WR WKH KHWHURJHQHLW\ RI FRPSRVW PDWULFHV, WKH S+ GHSHQGHQF\ RI /HSWRVSLUD VXUYLYDELOLW\ VHHPV WR GLVVROYH (3DUNHU DQG :DONHU, 2011). &RPSRVWLQJ ZRXOG EH FRQVLGHUHG D YLDEOH DQG HIIHFWLYH VROXWLRQ IRU WKH PDQDJHPHQW RI OHSWRVSLUHV LQ PDQXUH.

3.1.2 2LGDWRQ GLWFK

'LHVFK (1971) SHUIRUPHG D VWXG\ VLPXODWLQJ DQ R[LGDWLRQ GLWFK EHLQJ IHG FDWWOH PDQXUH IURP LQIHFWHG DQLPDOV DW D 1:10 VFDOH ODERUDWRU\ PRGHO DV ZHOO DV ILHOG VDPSOLQJ. /HSWRVSLUHV ZHUH LGHQWLILHG YLD GDUN-ILHOG PLFURVFRS\ LQ WKH DHUDWHG SRUWLRQ RI WKH GLWFK IRU !60 GD\ GXULQJ VXPPHU WHPSHUDWXUH SURLOHV DV FRPSDUHG WR 5 GD\ LQ WKH DQDHURELF SRUWLRQ RI WKH VOXGJH. 7KLQ VXJJHVW WKDW DYDLODEOH GLVVROYHG R[JOH LV FULWLFD WR WKH VXUYLYDO RI OHSWRVSLUHV LQ FRPSDUDEOH PDWULFHV. 7KH VWXG\ HQGHG EHURH D ILQDO FRQWDFW WLP\H FRXOG EH HVWDEOLVKHG IRU WKH FRPSOHVV

UHPRYDO RIOHSWRVSLUHV IURP WKH DHUDWHG SRUWLRQ.

3.1.3 :DVWH VWDELQJ]DWLRQ SRQGV

/LQHG RU XQOLQHGZDVWH SRQGV DUH XVHG ZRUGZLGH WR SDVVLYHO\ WUHDW ZDVWHZDWHU VWUHDVPV. 'HSHQGLQJ RQ WKH FOLPDWH RI WKH UHJLRQ, WKH HIOXHQWV RI WKHVH VWDELQJ]DWLRQ SRQGV FDQ YDU\ JUHDWO\, ZLWK D SUHIHUHQFH IRU ZDUPHU ZHDWKHU WKDW DOORZV IRU KLJKHU NLQHWLF UHPRYDO UDWHV (+LFNH\HW DO., 1989). \$OWKRJK VSHFLILF UHGXFWRQVLQ /HSWRVSLUD FRQFHQWUDWRQV LQ ZDVWH VWDELQJ]DWLRQ SRQGV KDYLH QRW EHHQ GREXPQWHG, LW FDQ EH LQIHUHG WKDW WKH OHYHO RI GLVVROYHG R[JHQ LQ WKHVH SRQGV ZRXOG GLFWDWH WKH HIILDF\ RI /HSWRVSLUD UHGXFWRQ. %HLQJ WKDW WKLV D SDVVLYH WHFKQLTXH (QR PHFKDQLFDO PL[LQJ RU DHUDWRQ), WKH GLVVROYHG R[JHQ FRQWHQW ZRXOG EH PLQLPLJHG LQ WKH ORZHU SRUWLRQV RI WKH VWUDWLILHG SRQG ZKHUH D UHGXFWRQ RI DFWLYH OHSWRVSLUHV ZRXOG EH DQWLFLSDWHG.

3.1.4 :HWODQGV

:HWODQGV RU nFRQVWUXFWHG ZHWODQGV DUH DUWLILFDO HQYLURQPHQW XVHG WR WUHDW HLWKHU PXQLFSDO RU LQGXVWULDO ZDVWHZDWHUV. 7KHVH VVWHPV DUH GHVLJQHG IRU WKH SDVVLYH UHGXFWRQ RI QXWULHQW ORDGLQV RQ WKH HQYLURQPHQW E\ PHFKDQLVPV DOUHDA\ SUHVHQW LQ D QDWXUDO HFRV\VVHP (QLWULILFDWRQ, GHQLWULILFDWRQ, SKRVSKRUXV UHPRYDO). 7KHVH VVWHPV DUH QRW GHVLJQHG QRU LQWHQGHG IRU SDWKRIHQ UHPRYDO DQG ZRXOG QRWEH FRQVLGHUH D YLDEOH DOWHUQDWLYH. 7KH SHUVLVWHQH RI OHSWRVSLUHV LQ ZHW DQG DHUDWHG VRLOV DQG VHGLPHQWV LV ZHOO GREXPQWHG.

3.1.5 \$HUDWHG ODJRRQV

1R UHSRUW RI /HSWRVSLUD VSS. UHGXFWRQV E\ DHUDWHG ODJRRQV ZHUH LGHQWLILHG.

3.1.6 :DVWHZDWHU WUHDWPHQW IDFLOLWLHV

3.1.6.1 3ULPDU\SUHOLPLQDU\ WUHDWPHQW

1R UHSRUW RI /HSWRVSLUD VSS. UHGXFWRQV E\ SULPDU\SUHOLPLQDU\ WUHDWPHQW ZHUH LGHQWLILHG.

3.1.6.2 \$FWLYDWHG VOXGJH

ORUSKRORJLFDO VSLURFKHWHV KDYLH EHHQ IRXQG LQ WKH DFWLYDWHG VOXGJH RI WUHDWPHQW IDFLOLWLHV LQ \$PVWHUGDP, EXW VSHFLILF VWUXFWXUDO PDUNHUV RI WKH /HSWRVSLUD JHQXV ZHUH QRW IRXQG ('HLQHPD, 1976). &RQFHQWUDWHG OHYHOV RI VSLURFKHWHV ZHUH VHHQ LQ WKH LQWHULRU RI DJJUHJDWHG IORFV

DQG DV PRWLOH FHOOV RQ WKH IORF VXUIDFHV. %HLQJ WKDW /HSWRVSLUD LV DQ DHURELF DQG FKHPKHHWURWURSKLF RUJDQLVP, LW LV LQIHUHG WKDW WKH DFWLYDWHG VOXGJH SRUWLRQ RI D WUHDWPHQW IDFLOLW\ HJHQGHUW WKHU SUROLIHUWLRQ.

3.1.6.3 OHPEUDQH ELRUHDFWRUV/WULFNOLQJ ILOWHUV

1R UHSRUW RI /HSWRVSLUD VSS. UHGXFWRQV E\ OHPEUDQH ELRUHDFWRUV RU WULFNOLQJ ILOWHUV ZHUH LGHQWLILHG.

3.1.6.4 \$QDHURELF GLJHVWRQ DQG ELRJDV

7KH DEVHQFH RI R[JHQ, HYHQ LQ RWKHUZLVH IDYUDEOH JURZWK FRQGLWRQV, ZLOO LQKLEW WKH VXUYLYDELOLW\ RI OHSWRVSLUHV LQ PDQXUH DQG VOXGJH PDWULFHV ('LHVFK, 1971). ,W FDQ WKHQ EH LQIHUHG WKDW DQDHURELF GLJHVWRQ RI VOXGJHV ZRXOG EH D IDYUDEOH HQYLURQPHQW IRU WKH HUDGLFDWRQ RI LQIHFWLYH OHSWRVSLUHV. \$ VWXG\ GRQH E\ OF*DUU\ DQG 6WDLQIRUWK (1978) LQYHVWLJDWHG WKH HIIHW RI ELRJDVHV RQ WKH VXUYLYDELOLW\ RI /HSWRVSLUD LFWHURKDHPRUUKDJLFD, ILQGLQJ WKDW WKH VSLURFKHWHV GLHG ZLWK LQ 31 KRUV DIWHU LQWURGXFWRQ RI ELRJDV DV FRPSDUHG WR 300 KRUV LQ WKH FRQWURO.

3.2 'LVLQHFWRQ DV D 7HUWLDU\ (RU 3RVW 3ULPDU\) 7UHDWPHQW DQG 'ULQNLQJ :DWHU

3.2.1 &KORULQH GLVLQHFWRQ

\$V D 7HUWLDU\ WUHDWPHQW PHWKRG IRU ZDVWHZDWHU, FKORULQH DSSHUV WR EH WKH PRVW UHOLHG XSRQ WUHDWPHQW IRU WKH HUDGLFDWRQ RI SDWKRIHQV, LQFOXGLQJ /HSWRVSLUD, DQG LV WKH UHFRPPHQGHG DSSURDFK E\ WKH (3\$ (86(3\$, 1999). 'HSHQGLQJ RQ WKH FKORULQH GHPDQG RI WKH VHFRRGDU\ HIOXHQW PDWULJ, WKH UHFRPPHQGHG GRVDJH UDQJH IRU 7HUWLDU\ WUHDWPHQW LV 5130 PJ//. 7KHVH YDOXHV DUH FRUURUDWHG E\ D 1948 VWXG\ ZKHUH DOO OHSWRVSLUHV ZHUH NLOOHG ZLWK LQ RQH PLQXWH DW D QXWUDO S+ DQG FKORULQH UHVLGXDO RI 3.5 PJ//, RU ZLWK LQ WKUHH PLQXWHV DW D UHVLGXDO RI 1 PJ// (&DQJ HW DO., 1948). 8QIRUWXQDWHO\, VSHFLILF &W (FRQFHQWUDWRQ [WLP) YDOXHV FRXOG QRWEH LGHQWLILHG.

3.2.2 89 GLVLQHFWRQ DQG QDWXUDO SURFHVHV

/HSWRVSLUHV DUH DOVR FRQVLGHUHG KLJKO\ VVVFHSLWLEOH WR 89 OLJKW DQG /HSWRVSLUD FXOWXUHV ZHUH NLOOHG E\ GLUHFH H[SRVXUH WR VXQOLJKW IRU 1-2 KRUV LQ GLVWLOOHG ZDWHU (DLQH HW DO., 1999). ,Q D VWXG\, H[SRVXUH WR 89 OLJKW (10 -/P2) UHVXOWHG LQ LQDFWLYDWRQ RI PRVW SDWKRIHQV /HSWRVSLUD VWUDLQV LQ FRQWUDVW WR QRQ-SDWKRIHQV OHSWRVSLUHV ZLFLK ZHUH PRUH UHVLVWDQW WR WKH VDPH 89 UDGLDWRQ GRVH; WKLV VWXG\ DOVR VKRZHG WKDW /HSWRVSLUD LV PRUH VHQLWLYH WR 89 UDGLDWRQ WKDQ RWKHU EDFWHULD VXFK DV (. FROL (6WDPP DQG &KDURQ, 1988).

SHIHUHQFHV

%HQEULN, (., 3RXOLTXHQ, 3. DQG 'jPRQW, \$. (2001). (YDOXDWLRL GH OD WROeUDQFH GH OD YDFFLQDWLRL FRQWUH /HSWRVSLUD LFWHURKDHPRUUKDJDLDH FKJH] 50 HPSOR\ev GHFDQDX[. \$UFKLYHV GHV 0DODGLHV 3URIHVVLRLQQHOOHV. 62, SS. 35-40.

\$GOHU, %. (2015). 9DFFLQHV DJDLQVW OHSWRVSLURVLV.&XUU 7RS 0LFURELRO,PPXQRO.&XUU 7RS 0LFURELRO ,PPXQRO. SS. 387:251-272.

\$GOHU, %. (2015). +LVWRU\ RI OHSWRVSLURVLV DQG OHSWRVSLUD. &XUU 7RS 0LFURELRO ,PPXQRO.&XUU 7RS 0LFURELRO ,PPXQRO. 387, SS. 1-9.

\$GOHU, %. DQG GH OD 3HgD-ORFWHJXP, \$. (2010). /HSWRVSLUD DQG OHSWRVSLURVLV. 9HW 0LFURELRO9HW 0LFURELRO. 140, SS. 287-96.

\$JDPSRGL, 6.%, .DUXQDUDWKQD, '., -D'DWKLODOD, 1., 5DWKQD'DND, +., \$JDPSRGL, 7.&. DQG .DUXQDQD'DND, /. (2014). 2XWEUHDN RI OHSWRVSLURVLV DIWHU ZKLWH-ZDWHU UDIWLQJ: VLQ RI D VKLIW IURP UXUDO WR UHFUHDWLRLQDO OHSWRVSLURVLV LQ 6UL /DQND. (SLGHPLRO ,QIHFV(SLGHPLRO ,QIHFV(SLGHPLRO ,QIHFV. 142, SS. 843-6.

\$OH[DQGHU, \$.', (YDQV, /., %,DNHU, O.),. (0OLVRQ, '., DQG 0DUULDSQD, O. (1975). 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUDV ,VRODWHG IURP 0DOD\VLQ 6XUIDFH :DWHUV. \$SSO 0LFURELRO\$SSO 0LFURELRO. 29, SS. 30-33.

\$OL, 0.5.0RKG, 6DILHH, \$.:0RKDPDG, <XVRI, 1.<.,)DXJL, O.+., &. <HDQ, <. DQG ,VPDLO, 1. (2018). ,VRODWLRL RI /HSWRVSLUD NPHWL IURP UHVLGHQWLDO DUHDV RI SDWLHQWV ZLWK OHSWRVSLURVLV LQ .HODQWDQ, 0DOD\VL. - ,QIHFV 3XEOLF +HDOWK-,QIHFV 3XEOLF +HDOWK-,QIHFV 3XEOLF +HDOWK. 2017/12/27 HG.11, SS. 578-580.

\$OVWRQ, -.O. (1935). /HSWRVSLUDO -DXQGLFH \$PRQJ 6HZHU-ZRUNHUV. 7KH /DQFHW. 225, SS. 806-809.

\$QGUH-RQWDLQH, *, \$YLDW,). DQG 7KRULQ, &. (2015). :DWHUERUQH /HSWRVSLURVLV: 6XUYLYDO DQG 3UHVHUYDWLRL RI WKH 9LUXOHQFH RI 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD VSS. LQ)UHVK :DWHU. &XUU 0LFURELRO&XUU 0LFURELRO. 71, SS. 136-142.

\$QGUHROL, (., 5DGDHOL, (., %HUWROHWWL, ,, %LDQFKL, \$., 6FDQJLDQL, (., 7DJOLDEXH, 6. HW DO. (2014). /HSWRVSLUD VSS. LQIHFWLRL LQ ZLOG UXPLQDQWV: D VXUYH\ LQ &HQWUDO ,WDOLDQ \$OSV. 9HW ,WDO.9HW ,WDO. 50, SS. 285-291.

\$QGUHZV, 5.', 5HLOO\, -.5.,)HUULV, '+. DQG +DQVRQ, /.(. (1965). /HSWRVSLUDO \$JOXWLQLQV LQ 6HUD IURP 6RXWKHUQ ,0OLQLV +USHWRIDXQD. -. :LOGO. 'LV.- :LOGO. 'LV. 1, SS. 55-59.

\$WKDQD]LR, '\$., 6LOYD, (.), 6DQWRV, &.6., 5RFKD, *.O., 9DQQLHU-6DQWRV, O.\$., 0F%ULGH, \$.-. HW DO. (2008). 5DWXV\ QRUYHJLFXV DV D PRGHO IRU SHUVLVWHQW UHQDO FRORQJDLWLRL E\ SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV. \$FWD 7URS.\$FWD 7URS. 105, SS. 176-180.

\$YDORV-7eOOH], 5., &DUULOR-&DVV, (.O., \$WLODQR-hSH], '., *RGfQH]-5H\HV, &.5., 'fD]-\$SDULFLR, (., 5DPfUH]-HOJDGR, '., HW DO. (2016). 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD VUURYDUV LQ IUHH-OLYLQJ VHD 0LRQV LQ WKH JXOSK RI &DOLIRUQLD DQG DORQJ WKH %DMD &DOLIRUQLD FRDVW RI OHJLFR. - :LOGO. 'LV.- :LOGO. 'LV. 52, SS. 199-208.

\$YLDW,)., 5RFKHUHDX-5RXOHV, 6., %UDQJHU, &., (VWDYR\HU, -.O., &KDWUHQHW, %, 2UVRQQHDX, -./ HW DO. (2010). 6\Q\KHWLF SHSWLGH LVVXH IURP +DS1//LS/32 IRU QHZ HDUO\ VUURGLDQRLV RI KXPQD OHSWRVSLURVLV. &RPS ,PPXQRO 0LFURELRO ,QIHFV 'LV&RPS ,PPXQRO 0LFURELRO ,QIHFV 'LV&RPS ,PPXQRO 0LFURELRO ,QIHFV 'LV. 33, SS. 375-387.

\$JDOL, O.\$., &. <HDQ, <., +DUXQ, \$., %DNL, 1.1.\$PLQXGG DQG ,VPDLO, 1. (2016). 0ROHFODU &KDUDFWHULJDLWLRL RI /HSWRVSLUD VSS. LQ (QYLURQPHQWDO 6DPSOHV IURP IRUWK-(DVWHUQ 0DOD\VL 5HYHODHG D 3DWKRJHQLF 6WUDLQ, /HSWRVSLUD DOVWRQL. - 7URS OHG-7URS OHG- 7URS OHG. 2016/04/30 HG.2016, SS. 2060241.

\$JRFDU-\$HGR, /., 0RQWL, *. DQG -DUD, 5. (2014). /HSWRVSLUD VSS. LQ 'RPHVWL &DWV IURP 'LIIHUHQW (QYLURQPHQWV: 3UHYDOHQFH RI \$QWLRLGHV DQG 5LVN JFWRUV \$VVRFLDWHG ZLWK WKH 6HURSRVLWLYLW\ \$QLPDOV (%DVHO)\$QLPDOV (%DVHO). 4, SS. 612-626.

%DNHU, O.). DQG %DNHU, +.-. (1970). 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD LQ 0DOD\VLQ VXUIDFH ZDWHUV., \$ PHWKRG RI VXUYH\ IRU /HSWRVSLUD LQ QDWXUDO ZDWHUV DQG VRLOV. \$P - 7URS OHG +\J\$P - 7URS OHG +\J\$P - 7URS OHG +\J. 1970/05/01 HG.19, SS. 485-92.

%DUUDJDQ, 9.\$., 0HMLD, 0.(., 7UDYHJ, \$., =DSDWD, 6., +DUWVNHHUO, 5.\$., +DDNH, '. \$.. HW DO. (2011). ,QWHUDFWLQRQ RI /HSWRVSLUD ZLWK (QYLURQPHQWDO %DFWHULD IURP 6XUIDFH :DWHU. &XUU 0LFURELO&XUU 0LFURELO&XUU 0LFURELO. 62, SS. 1802-1806.

%DUUDJDQ, 9., ILHWR, 1., .HLP, 3. DQG 3HDUVRQ, 7. (2017). 0HWD-DQDO\VLV WR HWVLPDWH WKH ORDG RI *HSWRVSLUD* H[FUHWHG LQ XULQH: EH\RQG UDWV DV LPSRUWDQW VRXUFHV RI WUDQVPLVLRQ LQ ORZ-LQFRPH UXUDO FRPPXQLWLHV. %0& 5HV 1RWHV%0& 5HV 1RWHV%0& 5HV 1RWHV.2017/01/29 HG.10, SS. 71.

%HLJHO, %. DQG 9HUPD, \$. (2017). /HSWRVSLUD: OR0HFX0DU ▴HWHFWLRQ RI 3DWKRJHQLF 6SHFLHV LQ 1DWXUD0 6RXUFHV. &XUU 3URWRF 0LFURELO&XUU 3URWRF 0LFURELO&XUU 3URWRF 0LFURELO. 2017/11/10 HG.47, SS. 12(6 1-12(6 8.

%HQDFHU, '., :RK, 3.<., =DLQ, 6.1.ORKG, \$PUDQ,). DQG 7KRQJ, ../. (2013). 3DWKRJHQLF DQG 6DSURSK\WLF /HSWRVSLUD 6SHFLHV LQ :DWHU DQG 6RLOV IURP 6HOHFWHG 8UEDQ 6LWHV LQ 3HQLQVXODU 0DOD\VL. 0LFUREHV (QYLURQ0LFUREHV (QYLURQ0LFUREHV (QYLURQ. 2013/02/01 HG.28, SS. 135-140.

%KDUWL, \$.5., 1DOO, -.(. , 5LFDQGL, -.1., 0DWKWKLDV, 0.\$., 'LDJ, 0.0., /RYHWW, 0.\$. HW DO. (2003). /HSWRVSLURVLV: D JRRQRWLF GLVHVV RI JOREDO LPSRUWDQFH. /DQFHW ,QIHFW 'LV/DQFHW ,QIHFW 'LV/DQFHW ,QIHFW 'LV. 3, SS. 757-71.

%RJRPROQL, \$. /., *DVW, 5.-., (OOLV, -.&., 'HQQHHW, O., 3XJOLDUHV, ..5., /HQWHOO, %.-. HW DO. (2008). 9LFWLPV RU YHFWRUV: D VXUYH\ RI PDULQH YHUWHEUDWH JRRQRVHV IURP FRDVWDO ZDWHUV RI WKH 1RUWKZHVW \$WODQWL. 'LV \$TXDW 2UJDQ'LV \$TXDW 2UJDQ'LV \$TXDW 2UJDQ. 2008/10/03 HG.81, SS. 13-38.

%UDGOH\, -\$. , 'DLOOH, /... , 7ULYHGL, &.%., %RMDQRZVNL, &./., 6WDPSV, %.:., 6WHYHQVRQ, %.6. HW DO. (2017). &DUERQDWH-ULFK GHQGUROLWLF FRQHV: LQVLJKW LQWR D PRGHUQ DQDORJ IRU LQFLSLHQW PLFURELDOLWH IRUPDWLRQ, /LWWOH +RW &UHHN, /RQJ 9DOOH\ &DOGHUD, &DOLIRUQLD. 13- %LRILOPV 0LFURELRPHV13- %LRILOPV 0LFURELRPHV13- %LRILOPV 0LFURELRPHV. 2017/11/28 HG.3, SS. 32.

%UHP, 6., 5DGX, 2., %DXHU, 7., 6FKRQEHUDJ, \$., 5HLVVKDXHU, .., :DLGPDQQ, 5. HW DO. (1995). >HSWRVSLUD LQIHFWHG UDW SRSXODWLRQ DV SUREDEOH FDXVH RI D IDWDOFDVH RI :HLO V GLVHDVH@. %HUO 0XQFK 7LHUDU]WO :RFKHQVFKU%HUO 0XQFK 7LHUDU]WO :RFKHQVFKU. 108, SS. 405-7.

%LHQQUH, '-., .DXIPDQQ, \$.), 6XOJHU, ..5., 6WLJHUZDOW, \$.*, 5RJHUV,)&. DQG :H/DQW, 5.6. (1999).JXUWKHU GHWHUPLQDWRUQ RI '1\$ UHODWHGQHVV EHWZHHQ VHURJURXSU DQG VHURYDUV LQ WKH IDPLO\ /HSWRVSLUDFHDH ZLWK D SURSRVDO IRU /HSWRVSLUD DOH[DQGHUL VS. QRY. DQG IRXU QHZ /HSWRVSLUD JHQRPVSHFLHV. QWHUQDWLRQDO-RXUQDO RI 6VWHPDWLF DQG (YROXWLRQDU\ 0LFURELROJ\,QWHUQDWLRQDO -RXUQDO RI 6VWHPDWLF DQG (YROXWLRQDU\ 0LFURELROJ\ 49, 0LFURELROJ\ 6RFLHW\ SS. 839-858.

%XODFK, '.O., =XHUQH, 5./., :LOVRQ, 3., 6HHPDQQ, 7., 0F*UDWK, \$., &XOOHQ, 3.\$.

*HW DO. (2006). *HQRPH UHGXFWRQ LQ /HSWRVSLUD ERUJSHWHUVHQLL UHIOHFWW OLPLWHG WUDQVPLVVRQ SRWHQWLDO. 3URF 1DWO \$FDG 6FL 8 6 \$3URF 1DWO \$FDG 6FL 8 6 \$. 103, SS. 14560-14565.*

&DFFLDXSRWL, %., &LFHURQL, /., ODIIHL, &., 'L 6WDQLVODR,), 6WUXVL, 3., &DOHJDUL, /. *HW DO.* (1987). \$ ZDWHUERUQH RXWEUHDN RI OHSWRVSLURVLV. **\$P** - (SLGHPLRO.\$P - (SLGHPLRO. 126, SS. 535-545.

&DOGHURQ, \$., 5RGULJXHJ, 9., 0DWWDU, 6. DQG \$UULHW, *. (2014)./HSWRVSLURVLV LQ SLJV, GRJV, URGHQWV, KXPDPV, DQG ZDWHU LQ DQ DUHD RI WKH &RPELDO WURSLFV. 7URS \$QLP +HDOWK 3URG7URS \$QLP +HDOWK 3URG. 2013/11/21 HG.46, SS. 427-432.

&DPHURQ, &.(., =XHUQHU, 5./., 5DYHUW\, 6., &ROHJURYH, ..O., 1RUPDQ, 6.\$., /DPERXUQ, '.O. HW DO. (2008). 'HWHFWLRQ RI 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD LQ 3LQQLSHG 3RSXODWLRQV YLD 3&5 ,GHQWLILHV D 6RXUFH RI 7UDQVPLVVLRQ IRU =RRQRWLF /HSWRVSLURVLV LQ WKH 0DULQH (QYLUROPHQW. - &0Q 0LFURELO- &0Q 0LFURELO- &0Q 0LFURELO. 46. SS. 1728-1733.

&DQJHORVL, *\$. (2009).3URVSHFWV IRU DSSO\LQJ YLUXOHQFH IDFWRU-DFWLYLWL UHODWLRQVKLSV (9)\$5) WR HPHUJLQJ ZDWHUERUQH SDWKRIHOV. - :DWHU +DOWK-:DWHU +DOWK-:DWHU +DOWK.7 6XSXO 1. SS. 664-74.

&DQJHORVL, *. \$., &=DQJL, O., :HLJHO, ..O. DQG 1JX\HQ, 7.+ . (2018). 3HUVRQDO FRPPXQLFDWLRLQ. 'HSDUWPHQW RI (QYLURQPHQWDO DQG 2FFXSDWLRODO +HDOWK 6FLHQFHV, 8QLYHUVLW\ RI :DVKLOJWRO. 6HDWWOH. :DVKLOJWRO, 86\$.

&D&VDQRYD&V&D&VD&Q&D, \$., &R&V&W&D,), 5L&H&L&J&H&U, , 1., &X&Q&K&D, O., GH 20LY&H&L&U&D, ', 0R&W&D, '&. *HW DO.* (2018). 6SD&W&L&D&O D&Q&G W&H&P&S&R&U&D&O G&Q&D&P&L&F&V RI SD&W&K&R&J&H&Q&L&F /*HS&W&R&V&S&L&U&D* L&Q V&X&U&I&D&F&H Z&D&W&H&U&V I&U&R&P W&K&H X&U&E&Q V&O&X&P H&Q&Y&L&U&R&Q&P&H&Q&W.:D&W&H&U 5&H&V:D&W&H&U 5&H&V. 130, SS. 176-184.

&HUUL, '., 1XYRORQL, 5., (EDQL, 9., 3HGULQL, \$., 0DQL, 3., \$QGUHDQL, (. *HW DO.* (1996). /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV VHURYDU KDUGMR LQ WKH NLGQHIV DQG JHQLWDO WUDFWV RI QDWXUDOO\ LQHFHWHG VKHHS. 1HZ 0LFURELRO 1HZ 0LFURELRO. 19, SS. 175-178.

&KDLZDWDQDUXQJUXHQJSDLVLDQ, 6., 6XZDQSDNGHH, 6., 6DQJNDFKDL, 1., &KDPVDL, 7., 7DUX\DQRQ, .. DQG 7KRQJGHH, O. (2018). 3RWHQWLD SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD VSHFLHV LVRODWHG IURP ZDWHUIDOO LQ 7KDLODQG. -SQ - ,QIHFV 'LV-SQ - ,QIHFV 'LV-SQ - ,QIHFV 'LV. 2017/11/03 HG.71, SS. 65-67.

&KDNUDERUW\, \$., 0L\DKDUD, 6., 9LOODQXHYD, 6.<., 6DLWR, O., *ORULDQL, 1.*. DQG <RVKLGD, 6.. (2011). \$ QRYHO FRPELQDWLRQ RI VHOHFWLYH DJHQWV IRU LVRODWLRQ RI /HSWRVSLUD VSHFLHV. 0LFURELRO ,PPXQRO0LFURELRO ,PPXQRO0LFURELRO ,PPXQRO. 55, SS. 494-501.

&KDQJ, 6./., %XFNLQJKDP, O. DQG 7D\ORU, O.3. (1948). 6WXGLHV RQ /HSWRVSLUD LFWHURKDHPRUUKDJLDH; VXUYLYDO LQ ZDWHU DQG VHZDJH; GHVWUXFWLRQ LQ ZDWHU E\ KDORJHQ FRPSRXQGV, V\QWKHWF GHWHUJHQWV, DQG KHDW. - ,QIHFV 'LV- ,QIHFV 'LV- ,QIHFV 'LV. 1948/05/01 HG.82, SS. 256-66.

&KDWXURQJNDVXPULW, <., 7HFKDUXYLFKLW, 3., 7DNDKDVKL, +., .LPXUD, %. DQG .HHUDWLSLEXO, 6. (2013). 0LFURELRO RJLFDQ HYDOXDWRQ RI ZDWHU GXULQJ WKH 2011 IORRG FULVLV LQ 7KDLODQG. 6FL 7RWDO (QYLURQ6FL 7RWDO (QYLURQ6FL 7RWDO (QYLURQ. 2013/07/23 HG.463-464&, SS. 959-967.

&RKODQ, -.'. DQG .PHW\, (. (1987). \$ QHZ VHURYDU PRJGHQL RI VHURJURXS 7DUDVVRYL RI /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV LVRODWHG IURP D VHZDJH SODQW LQ (QODQG. (SLGHPLRO ,QIHFV(SLGHPLRO ,QIHFV(SLGHPLRO ,QIHFV. 1987/10/01 HG.99, SS. 373-7.

&RODJURVV-6FKRXWHQ, \$.O., 0DJHW, -\$. , *XOODQG,).O., 0LOOHU, O.\$ DQG +LHWDOD, 6. (2002). 'LDJQRLV DQG VHURSUHYDOHQFH RI OHSWRVSLURVLV LQ &DOLIRUQLD VHD OLRQV IURP FRDVWDO &DOLIRUQLD. - :LOGO 'LV.- :LOGO 'LV. 38, SS. 7-17.

&RQFHSFLRQ-\$FHYHGR, -. , 3DWHO, \$., /XQD-3LQWR, &., 3HQD, 5.*., 5XLJ, 5., &XHYDV, \$UEROD\, +.5. *HW DO.* (2018). ,QLWLD 3XEOLF +HDOWK /DERUDWRU\ 5HVSQRVH \$IWHU +XUULFDQH 0DULD - 3XHUWR 5LFR, 2017. OO:5 0RUE 0RUWDO :NO\ 5HS. 67, SS. 333-336.

&RUZLQ, \$., 5\DQ, \$., %ORV, :., 7KRPDV, 5., 'HQLHJD, %. DQG :DWWV, '. (1990). \$ ZDWHUERUQH RXWEUHDN RI OHSWRVSLURVLV DPRQJ 8QLWHG 6DWHV PLOLWU\ SHUVRQQHO LQ 2NLQDZD, -DSDQ. QW - (SLGHPLRO. 19, SS. 743-748.

&RVWD,)., +DJDQ, -(., &DOFDJQR, -. , .DQH, O., 7RUJHUVRQ, 3., 0DUWLQHJ-6LOYHLUD, O.6. *HW DO.* (2015). *0RED0 0RUEGLW\ DQG 0RUWDOLW\ RI /HSWRVSLURVLV: \$ 6VWHPDWLF 5HYLHZ. 3/R6 1HJO 7URS 'LV3/R6 1HJO 7URS 'LV3/R6 1HJO 7URS 'LV. 2015/09/18 HG.9, SS. H0003898.

&RVWD,)., 5LEHLUR, *.6.,)HOJHPEXUJK, 5.'., 6DQWRV, 1., 5HLV, 5%., 6DQWRV, \$.& *HW DO.* (2014). ,QI0XHQH RI KRXXHKG UDW LQHVVDWRQ RQ OHSWRVSLUD WUDQVPLVLRQ LQ WKH XUEDQ VOXP HQYLURQPHQW. 3/R6 1HJO 7URS 'LV3/R6 1HJO 7URS 'LV3/R6 1HJO 7URS 'LV. 8, SS. H3338.

&RXWLQKR, O./., 0DWVXQDJ, -. , :DQJ, /.&., GH 0D 3HG-0RFWHJXP, \$., /HZLV, O.6., %DEELWW, -.7. *HW DO.* (2014). .LQHWFV RI /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV LQHFWRQ LQ KDPVWHU DIWHU LQWUDGHUPDO DQG VXEFXWDQHRXV FKDOOHQJH. 3/R6 1HJO 7URS 'LV.3/R6 1HJO 7URS 'LV. 8, SS. H3307.

'DGRQ, <., +DDV, (-., .DOLQHU, (-, \$QLV, (-, 6LQJHU, 6.5., \$WL\D-1DVJL, < *HW DO.* (2018). 2XWEUHDN RI KXPQD OHSWRVSLURVLV OLQHG WR FRQWDLQDWHG ZDWHU ERGLHV LQ IRUWKHUQ ,VUDHO, -XQH WR \$XJXV 2018. (XURVXUYHLOODQH. 23, SS. 1800486.

GD 6LOYD, (-.,)HOL[, 6.5., &HUTXHLUD, *.O.,)DJXQGHV, O.4., 1HWR, \$.&., *UDVVPDQQ, \$. \$ *HW DO.* (2010). 3UH0LP\QDU\ &KDUDFWHUL\DWLRQ RI 0XV PXVFXOXV-'HULYHG 3DWKRJHQLF 6WUDLQV RI /HSWRVSLUD ERUJSHWHVHQLL 6HURJURXS %D00XP LQ D +DPVWHU 0RGHO. \$P - 7URS 0HG +\J\$P - 7URS 0HG +\J\$P - 7URS 0HG +\J. 83, SS. 336-7.

GH)DULD, O.7., &DOGHUZRGR, O.6., \$WKDQDJL, '\$., 0F%ULGH, \$-., +DUWVNHUO, 5.\$., 3HULUD, O.O. *HW DO.* (2008). &DUULDJH RI /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV DPRQJ GRPHVWLQ UDWW IURP DQ XUEDQ VHWWLQJ KLJKO\ HQGHPLF IRU OHSWRVSLURVLV LQ %UDJLO. \$FWD 7URSS\$FWD 7URS. 108, SS. 1-5.

GH)UHLWDV, 7.3., .HXURJKOLDQ, \$., (DWRQ, '.3., GH)UHLWDV, (.%,)LJXHLUHG, \$., 1DNDJDWR, /. *HW DO.* (2010). 3UHYD0HQFH RI /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV DQWLERGLHV LQ IUHH-UDQJLQJ 7D\DVX SHFDUL RI WKH 6RXWKHUQ 3DQWDQDO, %UDJLO, DQ HFRV\VWHP ZKHUH ZLOGLIH DQG FDUWOLQWHUFW. 7URS \$QLP +HDOWK 3URG7URS \$QLP +HDOWK 3URG. 42, SS. 1695-703.

- 'HLQHPD, O.+ (1976). 0RUSKRORJLFDO FKDUFWHULVWLFV RI D VSLURFKHWH SUHVHQW LQ DFWLYDWHG VOXGJH. &DQ - 0LFURELRO. 22, SS. 1768-1771.
- 'HODIRQW, 9., %RXFKRQ, '.+, +HFKDUG, <. DQG 0RXOLQ, /. (2016). (QYLURQPHQWDO IDFWRUV VKDSLQJ FXOWXUH IUHH-OLYLQJ DPRHEDH DQG WKHLU DVVRFLDWHG EDFWHULDO FRPPXQLW\ ZLWKQJ GULQNLQJ ZDWHU QHWZRUN. :DWHU 5HV:DWHU 5HV. 2016/05/25 HG.100, SS. 382-92.
- 'H 6HUHV, *, /HYHVTXH, %, +LJLQV, 5., 0DMRU, O., /DOLEHUWH, ', %RXOLDQQH, 1. *HW DO.* (1995). 1HHG IRU YDFFLQDWLRQ RI VHZHU ZRUNHUV DJDLQVW OHSWRVSLURVLVDQG KHSDWLWL \$. 2FFXS (QYLURQ 0HG2FFXS (QYLURQ 0HG2FFXS (QYLURQ 0HG. 1995/08/01 HG.52, SS. 505-7.
- 'LHVFK, 6./ (1971). 6XUYLYDO RI OHSWRVSLUHV LQ FDWWOH PDQXUH. - \$P 9HW 0HG \$VVRF- \$P 9HW 0HG \$VVRF- \$P 9HW 0HG \$VVRF. 1971/12/01 HG.159, SS. 1513-1517.
- 'LHVFK, 6./ DQG 0F&XOORFK, :.). (1966). VRODWLRQ RI SDWKRJHQLF OHSWRVSLUHV IURP ZDWHUV XVHG IRU UHFUHDWLRQ. 3XEOLF +HDOWK 5HS3XEOLF +HDOWK 5HS3XEOLF +HDOWK 5HS. 1966/04/01 HG.81, SS. 299-304.
- 'LHWULFK, O., 0XKOGRIHU, .., 7RUWRVD, 3. DQG 0DUNRWWHU, :. (2015). /HSWRVSLUD DQG %DWV:6WRU\ RI DQ HPHUJLQJ IULHQGVKLS. 3/R6 3DWKRJ3/R6 3DWKRJ. 11, SS. H1005176.
- 'XQFDQ, &., .UDIVXU, *, 3RGHOO, %, %DHWHQ, /.\$., /H9DQ, .., &KDUOHV, %. *HW DO.* (2012). /HSWRVSLURVLV DQG WX0DUDHPD LQ UDFFRQV (3URF\RQ 0RWU) RI /DULPHU &RXQW\, =RRQRVHV 3XEOLF +HDOWK=RRQRVHV 3XEOLF +HDOWK. 59, SS. 29-34.
- (DVWRQ, \$. (1999). /HSWRVSLURVLV LQ 3KLOSSLQH IORRGV. %0-%0-. 1999/07/23 HG.319, SS. 212.
- (OOLV, *.5., 3DUWLQJWRQ, '.-., +LQPDUVK, O. DQG %DUWRQ, O.'. (1994). 6HURSUHYDOHQFH WR /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV VUURYDU KDUGMR LQ PHULQR VWXG UDPV LQ 6RXWK \$XVWUDOLD.\$XVW 9HW -\$XVW 9HW -. 71, SS. 203-206.
- (OOLV, :.\$., 0F3DUODQG, 3.-., %U\VRQ, '.*. DQG &DVVHOOV,-\$. (1986). %RDUV DV FDUULHUV RI OHSWRVSLUHV RI WKH \$XVWUDOLV VUURJURXS RQ IDUPV ZLWK DQ DERUWLRQ SUREOHP. 9HW 5HF9HW 5HF. 118, SS. 563.
- (OOLV, :.\$., 6RQJHU, -.*, 0RQWJRPHU\, -. DQG &DVVHOOV,-\$. (1986). 3UHYDOHQFH RI /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV VUURYDU KDUGMR LQ WKH JHQLWDO DQG XULQDU\ WUDFWV RI QRQ-SUHJQDQW FDWWOH. 9HW 5HF9HW 5HF. 118, SS. 11-3.
- (QVXQFKR-+R\RV, &., 5RGULJXHJ-5RGULJXHJ, 9., 3HUHJ-'RULD, \$., 9HUJDUD, 2. DQG &DOGHURQ-5DQJHO, \$. (2017). (SLGHPLRORJ\ EHKDYLRU RI OHSWRVSLURVLV LQ &LHQDJ GH 2UR, &RUGRED (&RORPELD). 7URS \$QLP +HDOWK 3URG7URS \$QLP +HDOWK 3URG. 2017/07/01 HG.49, SS. 1345-1351.
- (VFREHGR-+LQMRVD, :. DQG 3DUGR-/RSHJ, /. (2017). \$QDO\VLV RI EDFWHULDO PHWDJHQRPV IURP WKH 6RXWKZHVWHUQ *XOI RI 0H[LFR IRU SDWKRJHQV GHWHFWLRQ. 3DWKRJ 'LV3DWKRJ 'LV3DWKRJ 'LV. 2017/05/24 HG.75, SS. IW[058.
- (YDQJHOLVWD, ..9. DQG &REXUQ, -. (2010). /HSWRVSLUD DV DQ HPHUJLQJ SDWKRJHQ: D UHYLHZ RI LWV ELRORJ\, SDWKRJHQHVLV DQG KRUV LPPXQH UHVSQRVHV.)XWXUH 0LFURELRO.)XWXUH 0LFURELRO. 5, SS. 1413-1425.
-)DLQH, 6., \$GOHU, %, %ROLQ, &. DQG 3HURODW, 3. (1999). /HSWRVSLUD DQG /HSWRVSLURVLV, 6HFRQG (GLWLRQ. (., HG.). 0HG6FL, 0HOERXUQH, 9LF. \$XVWUDOLD. 0HOERXUQH, \$XVWUDOLD. SS. 272.
-)RUVWHU, ..O., +DUWZLJ, '.-., 6HL(DV,)... , %DFHOR, :.-., \$PDUDO, O., +DUWOHEHQ, &.3. *HW DO.* (2013). \$ FRQVHUYHG UHJLRQ RI OHSWRVSLUD LPPXQRJOREXOLQ-OLNH \$ DQG % SURWHLQV DV D '1 \$ YDFFLQH HOLFLW D SURSK\ODFWLF LPPXQH UHVSQRVHV DJDLQVW OHSWRVSLURVLV. &OLQ 9DFFLQH ,PPXQRO.&OLQ 9DFFLQH ,PPXQRO. 20, SS. 725-731.
-)UDJD, 7.5., %DUERVD, \$.6. DQG ,VDDE, /. (2011). /HSWRVSLURVLV: \$VSHFW RI ,QQDWH ,PPXQLW\, ,PPXQRSDWKRJHQHVLV DQG ,PPXQH (YDVLQJ IURP WKH &RPSOHPHQW 6VWHF. 6FDQG -, ,PPXQRO. 73, SS. 408-419.
-)XK, <., 6KLD, :.<., /HH, :.O., 6K\X, &./, :DQJ, &<. DQG)HL, &<. (2011). 7KH XVH RI FRPPHUFLDO VRLO QXFOHFL DFLG H[WUDFWLRQ NLW DQG QHVWHG 3&5 IRU GHWHFWLRQ RI /HSWRVSLUD LQ IDUPHQYLURQPHQW DIWHU IORRGHQJ LQ 7DLZDQ. 7KDL -RXUQDO RI 9HWHULQDU\ 0HGLFLQH7KDL -RXUQDO RI 9HWHULQDU\ 0HGLFLQH. 41, SS. 493-498.

- *DQRJD, &\$. , 0DWWKLDV, O.\$., &ROOLQV-5LFKDUGV, '., %URXZHU, ..&., &XQQLQJKDP, &%. , 6HJXUD, (.5. HW DO. (2006). 'HWHUPLQLQJ ULVN IRU VYHUH OHSWRVSLURVLV E\ PROHFODU DQDOVLV RI HQYLURQPHQWDO VXUIDFH ZDWHUV IRU SDWKRIJQLF /HSWRVSLUD. 3/R6 0HG3/R60HG. 3, SS. H308.
- *DQRJD, &\$. , 0DWWKLDV, O.\$., 6DLWR, O., &HVSHGHV, O., *RWXJJR, (. DQG 9LQHW], -.O. (2010). \$V\PSWRPDWLF 5HQDO &RORQLJDLWRQ RI +XPDQV LQ WKH 3HUXYLDQ \$PDJRQ E\ /HSWRVSLUD. 3/R6 1HJO 7URS 'LV. 4, SS. H612.
- *DVFD, &\$.&DUPRQD, .R, \$.,, \$KPHG, 1., +DUWVNHUO, 5. DQG GH OD 3HgD-ORFWHJXP, \$. (2013). VRODWLRQ DQG PROHFODU FKDUFDWHULJDLWRQ RI /HSWRVSLUD ERUJSHWHUVHQLL VHURYDU %DOOX. 7URSLFDO DQG 6XEWURSLFDO \$JURHFRV\VVHPV. 7URSLFDO DQG 6XEWURSLFDO \$JURHFRV\VVHPV. 16, SS. 143-153.
- *D\, 1., 6RXSe-LOEHUW, O.(. DQG *RDUDQW, &. (2014). 7KRXJK QRW UHVHUYRLUV, GRJV PLJKW WUDQVPLW /HSWRVSLUD LQ 1HZ &DOHGRQLD. QW - (QYLURQ 5HV 3XEOLF +HDOWK. 11, SS. 4316-4325.
- *D\QRU, .., .DW], \$.5., 3DUN, 6.<., 1DNDWD, O., &ODUN, 7.\$.. DQG (IOHU, 3.9. (2007). /HSWRVSLURVLV RQ 2DKX: DQ RXWEUHDN DVVRFDLWHG ZLWK IORRGLQJ RID XQLYHUVLW\ FDPXV. \$P - 7URS 0HG +\J\$P - 7URS 0HG +\J\$P - 7URS 0HG +\J. 76, SS. 882-5.
- *HGDODQJD, 3%. DQG 20VRQ, %+. (2009). 'HYHORSPHQW RID TXDQWLWDWLYH 3&5 PHWKRG WR GLIIHUHQWLWH EHWZHHQ YLDEOH DQG QRQYLDEOH EDFWHULD LQ HQYLURQPHQWDO ZDWHU VDPHSHV. \$SSO 0LFURELRO %LRWHFKQRO\$SSO 0LFURELRO %LRWHFKQRO\$SSO 0LFURELRO %LRWHFKQRO. 82, SS. 587-596.
- *HOOLQJ, O., =RFKRZVNL, :., 0DFGRQDOG, '.:., -RKQVRQ, \$., 3DOPHU, O. DQG 0DWKHZV,). (2015). /HSWRVSLURVLV DFTXLVLWRQ IROORZLQJ WKH UHLQWURGXFWRQ RI ZLOGOLIH. 9HW 5HF9HW 5HF. 2015/10/21 HG. 177, SS. 440.
- *LOOHVSLH, 5.:.+.. DQG 5\QR, -. (1963). (SLGHPLRORJ\ RI /HSWRVSLURVLV. \$PHULFDQ -RXUQDO RI 3XEOLF +HDOWK DQG WKH 1DWLRQV +HDOWK \$PHULFDQ -RXUQDO RI 3XEOLF +HDOWK DQG WKH 1DWLRQV +HDOWK. 53, SS. 950-955.
- *ROGVWHLQ, 6.). DQG &KDURQ, 1.:. (1988). 0RWLOLW\ RI WKH VSLURFKHWH /HSWRVSLUD. &HOO 0RWLO &\WRVNH0HW &HOO 0RWLO &\WRVNH0HW. 9, SS. 101110.
- *RPHV, &..., *XHGHV, O., 3RWXOD, +.+. , 'HOODJRVWLQ, 2.\$.. DQG *RPHV-6ROHFN, O. (2018). 6H[PDWWHUV: PDOH KDPVWHUV DUH PRUH VVYHSHWLEOH WR OHWKDO LQIHFWLRQ ZLWK ORZHU GRVHV RI SDWKRIJQLF /HSWRVSLUD. QIHFW ,PPXQ. 86, SS. H00369-18.
- *XHUQLHU, 9., \$OODQ, ..-. DQG *RDUDQW, &. (2018). \$GYDQFHV DQG FKDOOHQJHV LQ EDUFRGLQJ SDWKRIJQLF DQG HQYLURQPHQWDO /HSWRVSLUD. 3DUDVLWRORJ\ 3DUDVLWRORJ\ 145, SS. 595-607.
- +iJOXQG, &., 6WHQVWU\, 7.\$.. DQG \$VKEROW, 1. (2002). 0LFURELDO ULVN DVVHVVPHQW RI VRXUFH-VHSDUDWHG XULQH XVHG LQ DIULFXOWXUH. :DVWH 0DQDJHPHQW DQG 5HVHDUFK. 20, SS. 150-161.
- +DDNH, '\$.. DQG /HYHWW, 3.1. (2015). /HSWRVSLURVLV LQ KXPDQV. &XUU 7RS 0LFURELRO, PPXQRO &XUU 7RS 0LFURELRO, PPXQRO &XUU 7RS 0LFURELRO, PPXQRO. 2014/11/13 HG. 387, SS. 65-97.
- +DOOLZHOO, 5.(., %ULP, 7.\$., +LQHV, 0.7., :ROI, '. DQG :KLW,).+. (1985). 6WXGLHV RQ HTXLQH UHFUXUHQW XYHLWL. :, 7KH UROH RI LQIHFWLRQ ZLWK /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV VHURYDU SRPRQD. &XUU (\H 5HV &XUU (\H 5HV &XUU (\H 5HV. 4, SS. 1033-40.
- +DUWPDQQ, .., (JEHULQN, +., 3HQQLVL, O.*., /ORUHW, \$., \$GGLH, '., %HODN, 6. HW DO. (2013). /HSWRVSLUD 6SHFLHV, QIHFWLRQ LQ &DWV: \$%&' JXLGHOLQHV RQ SUHYHQWLQJ DQG PDQDJHPHQW. -)HOLQH 0HG 6XUJ-)HOLQH 0HG 6XUJ-)HOLQH 0HG 6XUJ. 2013/07/03 HG. 15, SS. 576-81.
- +HQU\, 5.\$.. DQG -RKQVRQ, 5.&. (1978). 'LVWULEXWLQJ RI WKH JHQXV /HSWRVSLUD LQ VRLQ DQG ZDWHU. \$SSO (QYLURQ 0LFURELRO\$SSO (QYLURQ 0LFURELRO\$SSO (QYLURQ 0LFURELRO. 35, SS. 492-9.
- +LFNH\, &.:., 4XLQQ, -.O. DQG 'DYLHV-&ROOH\, 5.-. (1989). (IOXHQQW FKDUFDWHULVWLQV RI GDLU VKHG R[LGDWLQJ SRQGV DQG WKHLU SRWHQWLDO LPSDFW RQ ULYHUV. 1HZ =HODQJ MRXUQDO RI PDULQH DQG IUVKZDWHU UHVHDUFK. 23, SS. 569-584.
- +ROW, -. , 'DYL, 6. DQG /HLUV, +. (2006). \$ PRGH RI /HSWRVSLURVLV LQIHFWLRQ LQ DQ \$IULFDQ URGHQW WR GHWHUPLQH ULVN WR KXPDQV: VHDVRQDO IOXFWXDWLQJ DQG WKH LPSDFW RI URGHQW FRQWURO. \$FWD 7URS. \$FWD 7URS. 99, SS. 218-225.

+XDQJ, .., =KDQJ, ;:., 6KL, 3., :X, %. DQG 5HQ, +. (2014). \$ FRPSUHKHQVLYH LQVLJKW LQWR EDFWHULDO YLUXOHQFH LQ GULQNLQJ ZDWHU XVLQJ 454 S\URVHTXHQFLQJ DQG ,OOXPLQD KLJK-WKURXJKSXW VHTXHQFLQJ. (FRWR[LFRQ (QYLURQ 6DI(FRWR[LFRQ (QYLURQ 6DI(FRWR[LFRQ (QYLURQ 6DI. 2014/08/19 HG.109, SS. 15-21.

,GR,<., +RNL, 5., ,WR, +. DQG :DQL, +. (1916). 7KH SURSK\OD[LVR I:HLO V GLVHDVH (6SLURFKDHWRLV ,FWHURKDHPRUUKDJLFD). - ([S OHG- ([S OHG- ([S OHG. 1916/11/01 HG.24, SS. 471-83.

,VPDLO, 6., :DKDE, 1.=DULQD \$EG, %DG\D, 1., 5DKPDQ, 1.,JD \$., <HR, &&KLHQJ, /DWLI,\$=XEDLGL \$. *HW DO.* (2014). \$ VWXG\ RQ WKH SUHVHGHQFH RI SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD VSS. LQ HQYLURQPHQWDO ZDWHU VDPSONV REWDLQHG IURP VHOHFWHG UHFUHDWLRQDO DUHDV LQ 7HUHQJJDDQX, 0DOD\LD. 5HVHDFK -RXUQDO RI 3KDUPDF\ DQG 7HFKQRORJ\5HVHDFK -RXUQDO RI 3KDUPDF\ DQG 7HFKQRORJ\ 7, \$&DPS;9 3XEOLFDFWLRQV. SS. 1153.

,YDQRYD, 6., +HUEUHWHDX, 9., %ODVGHOO, .., &KDYDO, <., %XFK\, 3., *XLOODUG, %. *HW DO.* (2012). /HSWRVSLUD DQG 5RGHQWV LQ &DPERGLD: (QYLURQPHQWDO 'HWHUPLQDQWV RI ,QHFWRU. \$P - 7URS OHG +\J\$P - 7URS OHG +\J\$P - 7URS OHG +\J. 2012/06/06 HG.86, SS. 1032-1038.

-DFNVRQ, /. \$., .DXIPDQQ, \$.),, \$GDPV, :.*., 3KHOSV, 0.%, \$QGUHDVHQ, &., /DQJNRS, &.:. *HW DO.* (1993). 2XWEUHDN RI OHSWRVSLURVLV DVVRFLDWHG ZLWK VZLPLQJ. 3HGLDWU ,QHFWRU 'LV -3HGLDWU ,QHFWRU 'LV -3HGLDWU ,QHFWRU 'LV -. 1993/01/01 HG.12, SS. 48-54.

-RKQVRQ, 5.&. DQG 5RJHUV, 3. (1964). 5)OXRUXUDFLO DV D 6HOHFWLYH \$JHQW IRU *URZWK RI /HSWRVSLUDH. - %DFWHULRO- %DFWHULRO. 87, SS. 422-6.

-RQHV, 3.:., 5HQQLVRQ, /.O., 0DWWKHZV, 3.5., &ROOLQV, 3. DQG %URZQ, \$. (1981). 7KH RFFXUUHQFH DQG VLJQLILFDQFH WR DQLPDO KHDOWK RI /HSWRVSLUD, 0\FREDFWHULXP, (VFKHULFKLD FROL, %UXFH00 DERUWXV DQG %DFLOOXV DQWKUDFLV LQ VHZDJH DQG VHZDJH VOXGJHV. - +\J (RQG)- +\J (RQG)- +\J (RQG). 1981/02/01 HG.86, SS. 129-37.

-U, 5.3.&UDZIRU, %UDXQ, -./., 0F&XOORFK, :.). DQG 'LHVFK, 6./. (1969). &KDUDFWHULJDWLQJ RI OHSWRVSLUH VLVRODWHG IURP VXUIDFH ZDWHUV LQ ,RZD. :LOGOLIH GLVHDVH:LOGOLIH GLVHDVH. 5, SS. 157-165.

.DUDVHYD, (.9., *. <X, &. DQG 6DNKDUVVHYD, 7.). (1977). 5HVXOWV RI WKH LQYHVWLJDWLQJ RI VRLO IRU FRQWDPDQLQJ ZLWK SDWKRJHQLF OHSWRVSLUH.)ROLD 3DUDVLWRO (3UDKD))ROLD 3DUDVLWRO (3UDKD))ROLD 3DUDVLWRO (3UDKD). 1977/01/01 HG.24, SS. 301-4.

.DW], \$.5., \$QVGHOO, 9.(., (IOHU, 3.9., 0LGGOHWRQ, &.5. DQG 6DVDNL, '.O. (2002). /HSWRVSLURVLV LQ +DZDLL, 1974-1998: HSLGHPLRORJLF DQD\VLV RI 353 ODERUDWRU\FRQILUPHG FDVHV. \$P - 7URS OHG +\J\$P - 7URS OHG +\J\$P - 7URS OHG +\J. 66, SS. 61-70.

.LP, -.6. (1987). /HSWRVSLURVLV: D QHZO\ LGHQWLILHG GLVHDVH LQ .RUHD. \$VLD3DF - 3XEOLF +HDOWK\$VLD3DF - 3XEOLF +HDOWK. 1, SS. 61-8.

.R, \$.,., *RDUDQW, &. DQG 3LEDUGHDX, O. (2009). /HSWRVSLUD: WKH GDZQ RI WKH PROHF\XODU JHQHWLFV HUD IRU DQ HPHUJLQJ JRRQRWLF SDWKRJHQ. IDWXUH 5HY 0LFURELRO.IDWXUH 5HY 0LFURELRO. 7, SS. 736-747.

.RL]XPL, 1., 0XWR, O., 7DQLNDZD, 7., 0L]XWDQL, +., 6RKPXUD, <., +D\DVKL, (. *HW DO.* (2009). +XPDQ OHSWRVSLURVLV FDVHV DQG WKH SUHYDOHQFH RI UDWV KDUERXULQJ /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV LQ XUEDQ DUHDV RI 7RN\R, -DSDQ. - OHG 0LFURELRO- OHG 0LFURELRO. 58, SS. 1227-1230.

.. .XPDU, 9., /DOO, &., 5. 5DM, 9., 9HGKDJLUL, .., 6XQLVK, ,.3. DQG 9LMD\DFKDUL, 3. (2016). ,Q YLWUR DQWLPLFURELDO VVFXHWSWLELQW RI SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD ELRIOP. 0LFURE 'UXJ 5HVLVW.0LFURE 'UXJ 5HVLVW. >(SXE DKHDG RI SULQW@ 3XE0HG 3O,': 26978023.,.

.. .XPDU, 9., /DOO, &., 5. 5DM, 9., 9HGKDJLUL, .. DQG 9LMD\DFKDUL, 3. (2016). 0ROHF\XODU GHWHFWLRQ RI SDWKRJHQLF OHSWRVSLUD SURWHQ HQFRGLQJ JHQH (OLS/32) LQ HQYLURQPHQWDO DTXDWLF ELRIOPV. /HWW \$SSO 0LFURELRO./HWW \$SSO 0LFURELRO.62, SS. 311-315.

.. .XPDU, 9., /DOO, &., 5. 5DM, 9., 9HGKDJLUL, .. DQG 9LMD\DFKDUL, 3. (2015). &R-H[LVWHQFH DQG VXUYLYDO RI SDWKRJHQLF OHSWRVSLUH E\ IRUPDWLRQ RI ELRIOP ZLWK \$JRVSLULOOXP.)(O6 0LFURELRO (FRO)(O6 0LFURELRO (FRO)(O6 0LFURELRO (FRO. 2015/05/13 HG.91, SS. SLL:ILY051.

.XULOXQJ, \$., &KDQFKDLWKRQJ, 3., /XJVRP\D, .., 1L\RPWKDP, :., :XWKLHNDQXQ, 9. DQG 3UDSDVDUDNXO, 1. (2017). 0ROHFXODU GHWHFWLRQ DQG LVRODWRQ RI SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD IURP DV\PSWRPDWLF KXPDPQV, GRPHVWLF DQLPDOV DQG ZDWHU VRXUFHV LQ 1DQ SURYLQFH, D UXUDO DUHD RI 7KDLODQG. 5HV 9HW 6FL5HV 9HW 6FL5HV 9HW 6FL. 2017/04/07 HG.115, SS. 146-154.

/DOO, &., .XPDU, ..9., 5DM, 5.9., 9HGKDJLUL, .. DQG 9LMD\DFKDUL, 3. (2016). 3UHYDOHQFH DQG 'LYHUVLW\ RI /HSWRVSLUHV LQ 'LIIHUHQW (FRORJLFD 1LFKHV RI 8UEDQ DQG 5XUDO \$UHDV RI 6RXWK \$QGDPDQ,VODQG. 0LFUREHV (QYLURQ0LFUREHV (QYLURQ0LFUREHV (QYLURQ. 2016/03/05 HG.31, SS. 79-82.

/DX, &., 6P\WKH, /. DQG :HLQVWLQ, 3. (2010). /HSWRVSLURVLV: DQ HPHUJLQJ GLVHDVH LQ WUDYHO0HUV. 7UDYHO 0HG ,QIHFV 'LV7UDYHO 0HG ,QIHFV 'LV7UDYHO 0HG ,QIHFV 'LV. 8, SS. 33-9.

O. /DYLQVN\, 2., 6DLG, 5.\$., 6WUHQJHO, *.O. DQG /DQJRQL, +. (2012). 6HURSUHYDOHQFH RI DQWL-/HSWRVSLUD VSS.DQWLERGLHV LQ GRJY LQ %DKLD, %UDJLO. 3UHY 9HW 0HG3UHY 9HW 0HG. 106, SS. 79-84.

/HYHWW, 3.1. (2001). /HSWRVSLURVLV. &OLQ 0LFURELRO 5HY&OLQ 0LFURELRO 5HY. 14, SS. 296-326.

/LOHQEDXP, :., 9DUJHV, 5., 5LVWRZ, 3., &RUWHJ, \$., 6RXJD, 6.2., 5LFKWJHQKDLQ, /.-. HW DO. (2009). ,GHQWILFDWRQ RI /HSWRVSLUD VSS. FDUULHUV DPRQJ VURUHDWLYH JRDV DQG VKHS E\ SRO\PHUDVH FKDLQ UHDFWLRQ. 5HV 9HW 6FL.5HV 9HW 6FL. 87, SS. 16-19.

6. /RIIOHU, *., 5DJR, 9., 0DUWLQHJ, O., 8KDUW, O.,)ORULQ&KULVWHQVHQ, O., 5RPHUR, *. HW DO. (2015). ,VR0DWRQ RI D 6HDZDWHU 7ROHUDQW /HSWRVSLUD VSS. IURP D 6RXWKHUQ 5LJKW :KDOH ((XEDODHQD DXVWUD0LV). 3/R6 2QH3/R6 21(3/R6 21(. 2015/12/30 HG.10, SS. H0144974.

/XFKLQL, '., 0HDFFL,), 2JJLRQL, O.5., 0RUDELWR, *., * \$PDWR, 9., *DEEULHOOL, O. HW DO. (2008). 0ROHFXODU GHWHFWLRQ RI /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV LQ KXPDPQ WLVVXH DQG HQYLURQPHQWDO VDP0HVV LQ D 0HWKDO FDUVH RI OHSWRVSLURVLV. ,QW - /HJD 0HG,QW - /HJD 0HG,QW - /HJD 0HG. 122, SS. 229-33.

0DODODQD,), 6W0LDQLGHV, \$. DQG 0F*RZDQ, &. (2015). (TXLQH UHFUHHQW XYHLWL: +XPDQ DQG HTXLQH SHUVSHFWLYHV. 9HW -9HW -. 206, SS. 22-29.

0DVRQ, O.5., (QFLQD, &., 6UHHYDWVDQ, 6. DQG 0XgR]-=DQJL, &. (2016). 'LVWULEXWLRQ DQG 'LYHUVLW\ RI 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD 6SHFLHV LQ 3HUL-GRPHVWLF 6XUIDFH :DWHU IURP 6RXWK &HQWUDO&KLOH. 3/R6 1HJO 7URS 'LV3/R6 1HJO 7URS 'LV3/R6 1HJO 7URS 'LV. 2016/08/17 HG.10, SS. H0004895.

0DVVHQHW, '., <YRQ, -.), &RXWHDXJ, &. DQG *RDUDQW, &. (2015). \$Q XQSUFHGHHQWHG KLJK LQFLGHQFH RI OHSWRVSLURVLV LQ)XWXQD, 6RXWK 3DFLILF, 2004 1 2014, HYLGHQFHG E\ UHWURVSHFWLYH DQD0VLV RI VXUYHLOODQFH GDWD. 3/R6 2QH3/R6 21(. 10, SS. H0142063.

0DVXJDZD, 7., 6DNDLEDUD, .., 6DLWR, O., +LGDND, <., 9LOODQXHYD, 6., <DQDJLKDUD, <. HW DO. (2018). &KDUDFWHULJDWRQ RI /HSWRVSLUD VSHFLHV LVRODWHG IURP VRLO FROOHFWHG LQ -DSDQ. 0LFURELRO,PPXQRO0LFURELRO ,PPXQRO0LFURELRO ,PPXQRO. 2017/11/07 HG.62, SS. 55-59.

0DWRQR, 7., .XWVXQD, 6., .RLJXPL, 1.,)XML\D, <., 7DNHVKLWD, 1., +D\NDZD, .. HW DO. (2015). ,PSRUWHG)ORRG-5H0DWHG /HSWRVSLURVLV)URP 3DODX: \$ZDUHQHVV RI 5LVN)DFWRUV/HDGV WR (DU\ 7UHDWPHQW.- 7UDYHO 0HG- 7UDYHO 0HG- 7UDYHO 0HG. 2015/10/28 HG.22, SS. 422-4.

0F*DUU\, O.*. DQG 6WDLQIRUWK, -. (1978). &RPSRVW, IHUWL0JHU, DQG ELRJY SURGXFWLRQ IURP KXPDPQ DQG IDUP ZDVWHV LQ WKH 3HR0H V 5HSXEOLF RI&KLQD. ,5&, 2WWDZD, 21, &\$.

0JRGH, *.), 0DFKDQJ X, 5.6., 0KDPSKL, *.*., .DWDNZHED, \$., 0XOXQJX, /.6., 'XUQHJ, /. HW DO. (2015). /HSWRVSLUD 6HURYDUV IRU 'LDJQRLV RI /HSWRVSLURVLV LQ +XPDQV DQG \$QLPDOV LQ \$IULFD: &RPPRQ /HSWRVSLUD ,VR0DWHV DQG 5HVHUYRLU +RVWV. 3/R6 1HJO 7URS 'LV3/R6 1HJO 7URS 'LV3/R6 1HJO 7URS 'LV. 2015/12/02 HG.9, SS. H0004251.

0LQHWWH, +.3. (1983). /HSWRVSLURVLV LQ SRLNORWKHULF YHUWHEUDWHV. \$ UHYLHZ. ,QW - =RRQRVHV,QW - =RRQRVHV,QW - =RRQRVHV. 10, SS. 111-21.

0RLQHW, O.,)RXUQLHU-&DPEULORQ, &., \$QGUH-)RQWDLQH, *., \$XODJLHU, 6., 0HVSOHGH, \$., %ODQFKDUG, %. HW DO. (2010). /HSWRVSLURVLV LQ IUHH-UDQJLQJ HQGDQJHUHG (XURSHDQ PLQN(0XVWHOD 0XWUHOD)DQ RWKHU VPDOO FDUQLYRUHV

(0XVWHOLGDH, 9LYHUULGDH) IURP VRXWKZHVWUHQ)UDQFH. - :LOGO 'LV- :LOGO 'LV- :LOGO 'LV. 46, SS. 1141-51.

0RUJDQ, -, %RUQVWHLQ, 6./., .DUSDWL, \$.O., %UXFH, O., %ROLQ, &.\$., \$XVWLQ, &.& HW DO. (2002). 2XWEUHDN RI OHSWRVSLURVLV DPRQJ WULDWKORQ SDUWLFLSDQWV DQG FRPPXQLW\ UHVLGHQWV LQ 6SULQJLHOG, 00LQRLV, 1998. &OLQ,QIHFV 'LV&OLQ ,QIHFV 'LV&OLQ ,QIHFV 'LV. 34, SS. 1593-9.

0RUULVRQ, :.-, DQG :ULJKW, 1.*. (1976). &DQLQH OHSWRVSLURVLV:DQ LPPXQRSWKRORJLFDO VWXG\ RI LQWHUHVWLWDO QHSKULWLX GXH WR /HSWRVSLUD FDQLFROD. - 3DWKRO- 3DWKRO- 3DWKRO. 120, SS. 83-9.

0XgR]=DQ]L, &., 0DVRQ, 0.5., (QFLQD, &., \$VWUR]D, \$. DQG 5RPHUR, \$. (2014). /HSWRVSLUD &RQWDPLQDWLRQ LQ +RXVHKROG DQG (QYLURQPHQWDO :DWHU LQ 5XUDO &RPPXQLWLHV LQ 6RXWKHUQ &KLOH. QW - (QYLURQ 5HV 3XEOLF +HDOWK,QW - (QYLURQ 5HV 3XEOLF +HDOWK,QW - (QYLURQ 5HV 3XEOLF +HDOWK. 2014/06/28 HG.11, SS. 6666-6680.

1DUGRQH, \$., &DSHN, :., %DUDQWRQ, *., &DPSHVH, &., 3RVWLF, '., 9DLOODQW, 9. HW DO. (2004). 5LVN IDFWRUV IRU OHSWRVSLURVLV LQ PHWURSROLWDO)UDQFH: UHVXOWV RID QDWLRQDO FDUV-FRQWURO VWXG\, 1999-2000. &OLQ,QIHFV 'LV. 39, SS. 751-3.

1HLIHU, './., .OHLQ, (& DQG :DOODFH-6ZLWDOVNL, & (2001). /HSWRVSLUD LQIHFWRQ LQ WZR EODFN UKLQRFHURVHV ('LFHURV ELFRUQLV PLFKDHOL). - =RR :LOGO 0HG.- =RR :LOGO 0HG. 32, SS. 476-486.

1RJXFKL, +. (1918). 7KH 6XUYLYDO RI /HSWRVSLUD (6SLURFKDHWD) ,FWHURKDHPRUUKDJLDH LQ IDWXUH; 2EVHUYDWLRQV &RQFHUQLQJ 0LFURFKHPLFDO SHDFWLRQV DQG ,QWHUPHGLDU\ +RVWV. - ([S 0HG- ([S 0HG- ([S 0HG. 1918/05/01 HG.27, SS. 609-25.

3eUH], -. DQG *RDUDQW, & (2010). 5DSLQ /HSWRVSLUD LGHQWLILFDWLQ E\ GLUHFV VHTXHQFLQJ RI WKH GLDJQRVWLX 3&5 SURGXFWV LQ 1HZ &DOHGRQD. %0& 0LFURELRO%0& 0LFURELRO. 10, SS. 325.

3DUNHU, -. DQG :DONHU, O. (2011). 6XUYLYDO RID SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD VHURYDU LQ UHVSRVH WR FRPELQH LQ YLWUR S+ DQG WHPSHWDWXUH VWUHVHV. 9HW 0LFURELRO9HW 0LFURELRO. 152, SS. 146-150.

3DUN, 6.<., (IOHU, 3.9., 1DNDWD, O., 6DNDNL, '., .DW], \$.5., &ODUN, 7.\$ HW DO. (2006). %ULHI UHSRUW: /HSWRVSLURVLV DIWHU IORRGQJ RID XQLYHUVLW\ FDPXV--&DZLL, 2004. 00:5 0RUE 0RUWDO :NO\ 5HS00:5 0RUE 0RUWDO :NO\ 5HS00:5 0RUE 0RUWDO :NO\ 5HS. 55, SS. 125-7.

3HUODW, 3., &KDSSHQ, 5.-., \$GOHU, %., %DUDQWRQ, *., %XODFK, 'O., %00LQJXUUV, O./ HW DO. (1998). /HSWRVSLUD IDLQHL VS. QRY., LVRODWHG IURP SLJV LQ \$XWUDOLD. QW - 6\WV %DFWHULRO,QW - 6\WV %DFWHULRO. 48, SS. 851-858.

3LFDUGHDX, O. (2013). 'LDJQRVLV DQG HSLGHPLROR\ RI OHSWRVSLURVLV. 0HG 0DODG ,QIHFV.0HG 0DODG ,QIHFV. 43, SS. 1-9.

3LFDUGHDX, O., %UHQRW, \$. DQG ,. *LURQV, 6. (2001).)LUVWHYLGHQFH IRU JHQH UHSODFHPHQW LQ /HSWRVSLUD VSS. ,QDFWLYDWLRQ RI /ELIOH[D IOD% UHVXOWV LQ QRQ-PRWLOH PXWDQWV GHILFLHQW LQ HQGRIODJHOOD. 0RO 0LFURELRO.40, SS. 189-199.

3LFDUGHDX, O., %XODFK, 'O., %RXFKLHU, &., =XHUQHU, 5./., =LGDQH, 1., :LOVRQ, 3.-. HW DO. (2008). *HQRP 6HTXHQFH RI WKH 6DSURSK\WH /HSWRVSLUD ELIOH[D 3URYLGHV ,QVLJKWV LQWR WKH (YROXWLQ RI /HSWRVSLUD DQG WKH 3DWKRJHQHVLV RI /HSWRVSLURVLV. 3/R6 21(3/R6 21(3/R6 21(. 3, SS. H1607.

3LQQD, O.+, 0DUWLQV, *., 3LQKHLUR, \$&., \$OPHLGD, '6., 2ULd, \$.3. DQG /OHQEDXP, :. (2012). 'HWHFWLRQ RIDQWL-/HSWRVSLUD DQWLERGLHV LQ FDSWLYH QRQKXPQD SULPDWHV IURP 6DOYDGRU, %UD]LO. \$P - 3ULPDWRO. \$P - 3ULPDWRO. 74, SS. 8-11.

3UDJHU, ..&., *UHLJ, '.-., \$OW, '3., *DOORZD\, 5./., +RUQVE\, 5./., 3DOPHU, /.-. HW DO. (2013). \$V\PSWRPDWLF DQG FKURQLF FDUULDJH RI /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV VHURYDU 3RPRQD LQ &DOLIRUQLD VHD 0LRQV (=DORSKXV FDUULRUQLDQXV). 9HW 0LFURELRO.9HW 0LFURELRO. 164, SS. 177-183.

3XL, &.), %LOXQJ, /O., \$SXQ, .. DQG 6X XW, /. (2017). 'LYHUVLW\ RI /HSWRVSLUD VSS. LQ 5DWV DQG (QYLURQPHQW IURP 8UEDQ \$UHDV RIDUDZDN, 0DOD\LD. - 7URS 0HG- 7URS 0HG- 7URS 0HG. 2017/03/30 HG.17, SS. 3760674.

3XL, &.)XQJ, %LOXQJ, /0DXULFH, 6X XW, /., &KRQJ, </LQJ DQG \$SXQ, .. (2017). 'HWHFWLRQ RI /HSWRVSLUD VSS. LQ 6HOFWHG IDWLQRDO 6HUYLFH 7UDLQLQJ &HQWUHV DQG 3DGG\)LHOGV RIDUDZDN, 0DOD\LD XVLQJ 3R\PHUDVH &KDLQ SHDFWLRQ 7HFKQLTXH. 3HUWQDND-RXUQDO RIDURSFDQ \$ULFXOWXUDO 6FLHQFH3HUWQDND-RXUQDO RIDURSFDQ \$ULFXOWXUDO 6FLHQFH. 40.,

5DPDGDVV, 3., -DUYLV, %&RUQUHU, 5.-., 3HQQ\, ' . DQG 0DUVKDOO, 5.%. (1992). *HQHWLF FKDUFDWHULJDWLQR RI SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD VSHFLHV '1\$ K'EULGLDWLQR, QWHUQDWLRQDO-RXUQDO RI 6VWHPDWLF DQG (YROXWLRQDU\ 0LFURELRO RJ, QWHUQDWLRQDO -RXUQDO RI 6VWHPDWLF DQG (YROXWLRQDU\ 0LFURELRO RJ, 42, 0LFURELRO RJ 6RFLHW\ SS. 215-219.

5DZOLQV, -, 3RUWDQRYD, \$., =XFNHUPDQ, ,, /RIWLV, \$., &HFDWR, 3., :LOOLQJKDP, \$./ . HW DO. (2014). OR0HFX0DU GHWHFWLRQ RI OHSWRVSLUDO '1\$ LQ HQYLURQPHQWDO ZDWHU RQ VW. LWWV. QW - (QYLURQ 5HV 3XEOLF +HDOWK, QW - (QYLURQ 5HV 3XEOLF +HDOWK, QW - (QYLURQ 5HV 3XEOLF +HDOWK. 2014/08/12 HG.11, SS. 7953-60.

5LGJODQ,).5., %DKDPDQ, \$.5., .KDLUDQL-%HMR, 6. DQG 0XWDOL, \$.5. (2010). 'HWHFWLRQ RI SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD IURP VHOHFWHG HQYLURQPHQW LQ .HODQWDQ DQG 7HUHQJJDQX, 0DOD\LD. TURS %LRPHG7URS %LRPHG7URS %LRPHG. 27, SS. 632-8.

5LHGLJHU, .1., +RIIPDVWU, \$.5., &DVDQRYDV-0DVVDQD, \$., %LRQGR, \$.:., .R, \$., .DQG 6WRGGDUG, 5.\$ (2016). \$Q 2SWLPLJHG 0HWKRGR IRU 4XDQWLILFDWLQR RI 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD LQ (QYLURQPHQWDO :DWHU 6DPSOHV. 3/R6 2QH3/R6 21(3/R6 21(. 2016/08/04 HG.11, SS. H0160523.

5LV, '.5. DQG +DPHO, ../. (1979). 7KHLVRDWRQ RI OHSWRVSLUH IURP DQ DLU-FRQGLWLRQLQJ SODQW. 1 = 0HG -. 1979 6HS 12;90(643):212.

5LVWRZ, 3., %RXUK\, 3., .HUQHLV, 6., 6FKPLWW, &., 3UHYRVW, 0.&., /LOHQEDXP, :. HW DO. (2008). %LRLOP IRUPDWLRQ E\ VDSURSK\WLF DQG SDWKRJHQLF OHSWRVSLUH. 0LFURELRO RJ 0LFURELRO RJ 0LFURELRO RJ, 154, SS. 1309-17.

3. 5RVVD, '. , 7DQWUDNDUQSD, .., 6XWGDQ, '. , .DVHVVQVRPEDW, .., &RVVRQ, -.), 6XSSXWDPRQJNRO, <. HW DO. (2016). (QYLURQPHQWDO IDFWRUV DQG SXEOLF KHDOWK SROLF\ DVVRELDWHG ZLWK KXPDPQ DQG URGHQW LQIHFWLRQ E\ OHSWRVSLURVLV: D ODQG FRYHU-EDVHG VWXG\ LQ 1DQ SURYLQFH, 7KDLQDQ. (SLGHPLRO ,QIHFW(SLGHPLRO ,QIHFW(SLGHPLRO ,QIHFW. 2015/11/27 HG.144, SS. 1550-1562.

5\X, (. DQG /X, &... (1966). 7KH YLDELOLW\ RI OHSWRVSLUH LQ WKH VXPPHU SDGG\ ZDWHU. -SQ - 0LFURELRO-SQ - 0LFURELRO-SQ - 0LFURELRO. 1966/04/01 HG.10, SS. 51-7.

5\X, 6., /DX, &./. DQG &KXQ, %&. (2017). 7KHLPSDFW RI /LYHVWRFN 0DQXUH &RQWURO 3ROLF\ RQ KXPDPQ OHSWRVSLURVLV LQ 5HSXEOLF RI .RUHD XVLQJ LQWHUUXSWHG WLPH VHULHV DQD\LV. (SLGHPLRO ,QIHFW(SLGHPLRO ,QIHFW(SLGHPLRO ,QIHFW. 2017/02/22 HG.145, SS. 1320-1325.

6DLWR, O., 0\DKDUD, 6., 9LOODQXHYD, 6.<., \$UDPDNL, 1., ,NHMLUL, O., .RED\DVKL, <. HW DO. (2014). 3&5 DQG FXOWXUH LGHQWLILFDWLQR RI SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD IURP FRDVWDO VRLO LQ /H\WH, 3KLOSSLQHV DIWHU D VWURUP VXUJH GXULQJ 6XSHU 7\SKRRQ +DL\DQ (<RODQGD). \$SSO (QYLURQ 0LFURELRO\$SSO (QYLURQ 0LFURELRO\$SSO (QYLURQ 0LFURELRO. 2014/08/31 HG.80, SS. 6926-6932.

6DLWR, O., 9LOODQXHYD, 6.<., &KDNURUW\, \$., 0\DKDUD, 6., 6HJDZD, 7., \$VRK, 7. HW DO. (2013). &RPSDUDWLYH DQD\VLV RI /HSWRVSLUD VWUDLQV LVRODWHG IURP HQYLURQPHQWDO VRLO DQG ZDWHU LQ WKH 3KLOSSLQHV DQG -DSDQ. \$SSO (QYLURQ 0LFURELRO.\$SSO (QYLURQ 0LFURELRO. 79, SS. 601-609.

6DLWR, O., 9LOODQXHYD, 6.<., 0DVXJDZD, 7., +DUDJXFKL, <., ,WD, 6., 0\DKDUD, 6. HW DO. (2015). 7KH XVHIX0QHVV RI VHP\VRLOG PHGLXP LQ WKH LVRODWRQ RI KLJK\ YLUXOHQW /HSWRVSLUD VWUDLQV IURP ZLOG UDWV LQ DQ XUEDQ DUHD RI)XNXRND, -DSDQ. 0LFURELRO ,PPXQRO0LFURELRO ,PPXQRO0LFURELRO ,PPXQRO. 59, SS. 322-30.

6DQFKHJ, &. (2008). 3HUVRQDO FRPPXQLFDWLQR. 'HSDUWPHQW RI 0LFURELRO RJ DQG ,PPXQRORJ\, 6FKRRO RI 9HWHULQDU\ 0HGLFLQH DQG =RRWHFKQLFV, 8QLYHUVLGDG IDFLRQDO \$XWRQRPD GH 0H[LFR. 0H[LFR &LW\, 'LVWULWR)HGHUDO, 0H[LFR.

6DSLQDQ, O., .KDLU, 0.7., +RZ, 6.+., 5DMDOLQJDP, 5., 6DKKLU, .., 1RUDJDK, \$. HW DO. (2012). 2XWEUHDN RI PHOLRLGRVLV DQG OHSWRVSLURVLV FR-LQIHFWLRQ IROORZLQJ D UHVFXH RSHUDWLQR. 0HG - 0DOD\LD0HG - 0DOD\LD0HG - 0DOD\LD. 2012/10/23 HG.67, SS. 293-7.

6FKPLG, *.3., 6WHHUH, \$.&., .RUQODWW, \$.1., .DXIPDQ, \$.), 0RVV, &:., -RKVRQ, 5.&. HW DO. (1986). 1HZ0\ UHFRJQLJHG /HSWRVSLUD VSHFLHV ("HSWRVSLUD LQDGL" VHURYDU O\PH) LVRODWHG IURP KXPDPQ VNLQ. - &OLQ 0LFURELRO- &OLQ 0LFURELRO- &OLQ 0LFURELRO. 24, SS. 484-6.

6FKXOOHU, 6., \$UHQW, =.-., *LOPRUH, &. DQG IDOO\, -. (2015). 3UHYDOHQFH RIDQWLOHHSWRVSLUDO VHUXP DQWLERGLHV LQ GRJV LQ UHODQG. 9HW 5HF. 9HW 5HF. 177, SS. 126.

6FLDOID, (. , %ULKXHJD, %, 9HQJDQR, \$., 0RUULV, :.-., %ROSH, -. DQG 6FKHWWLQR, O. (2013).)LUVW LVRODWRQ RI /HSWRVSLUD

LQWHUURJDQV IURP ^FDORSH[JULVHXV (6RXWK \$PHULFDQ JUD\ IR[) LQ \$UHQWLQD VKRZV QHZ O/9\$ JHQRW\SH. - :LOGO 'LV. 49, SS. 168-172.

6HMYDU, -, %DQFURIW, (., :LQWKURS, .., %HWWLQJHU, -, %DMDQL, O., %UDJJ, 6. *HW DO.* (2003). /HSWRVSLURVLV LQ "(FR-&KD00HQJH" DWKOHWHV, ODOD\ULDQ %RUQHR, 2000. (PHUJ ,QIHFV 'LV(PHUJ ,QIHFV 'LV(PHUJ ,QIHFV 'LV. 9, SS. 702-7.

6PLWK, &.(.*. DQG 7XUQHU, /+. (1961). 7KH HIIHFV RIS+ RQ WKH VXUYLYDO RI OHSWRVSLUHV LQ ZDWHU. %XOOHWLQ :+2%XOOHWLQ :+2. 24, SS. 35-43.

6PLWK, '.-. DQG 6HOI, +.5. (1955). 2EVHUYDWLRQV RQ WKH VXUYLYDO RI /HSWRVSLUD DXVWUDOLV \$ LQ VRLO DQG ZDWHU. - +\J (/RQG)- +\J (/RQG)- +\J (/RQG). 53, SS. 436-44.

6PLWK, -... , <RXQJ, O.O., :LOVRQ, ../. DQG &UDLJ, 6.%. (2013). /HSWRVSLURVLV IROORZLQJ D PDMRU IORRG LQ &HQWUDO 4XHHQVODQG, \$XVWUDOLD. (SLGHPLRO ,QIHFV(SLGHPLRO ,QIHFV(SLGHPLRO ,QIHFV. 2012/05/26 HG.141, SS. 585-590.

6RXSe*LOEHUW, O.(., %LHUTXH, (., *HURXOW, 6., 7HXUODL, O. DQG *RDUDQW, &. (2017). &RQLQXRXV H[FUHWLRQ RI /HSWRVSLUD ERUJSHWHUVHQLL %DOOX LQ PLFH DVVHVHVG E\ YLDELOLW\TXDQWLWDWLYH 3&5. \$P - 7URS OHG +\J\$P - 7URS OHG +\J. 97, SS. 1088-1093.

6WDOKHLP, 2.+. (1968). 9DFFLQDWLRQ RI KDPVWHUV, VZLQH, DQG FDWWOH ZLWK YLDEOH, DYLUXOHQW /HSWRVSLUD SRPRQD. \$P - 9HW 5HV.\$P - 9HW 5HV. 29, SS. 1463-1468.

6WDPP, /.9. DQG &KDURQ, 1.:. (1988). 6HQVLWLYLW\ RI SDWKRJHQLF DQG IUHH-OLYLQJ /HSWRVSLUD VSS. WR 89 UDGLDWLRQ DQG PLWRP\FLQ & \$SSO (QYLURQ 0LFUREL. 54, SS. 728-33.

6WHUQ, (.-., *DOORZD\, 5., 6KDGRP\, 6.9., :DQHPXHKOHU, .., \$WUXELQ, '., %ODFNPRUH, &. *HW DO.* (2010). 2XWEUHDN RI OHSWRVSLURVLV DPRQJ \$GYHQWXUH 5DFH SDUWLFLSDQWV LQ)ORULGD, 2005. &OLQLFDO ,QIHFWRXV 'LVHDVHV&OLQLFDO ,QIHFWRXV 'LVHDVHV. 50, 7KH 8QLYHUVLW\ RI &KLFDJR 3UHVV. SS. 843-849.

6WUDQG, 7.O., /RKPXV, O., 7. 9LQQHUVWHQ, 3., 5DVEDFN, 7., 6XQGVWURP, .., %HUJVWURP, 7. *HW DO.* (2015). +LJK\ 3DWKRJHQLF /HSWRVSLUD)RXQG LQ 8UEDQ %URZQ 5DWV (5DWV\ QRUYHJLFXV) LQ WKH /DUJHVW &LWLHV RI 6ZHGHHQ. 9HFWRU %RUQH =RRQRWLF 'LV9HFWRU %RUQH =RRQRWLF 'LV9HFWRU %RUQH =RRQRWLF 'LV. 2015/11/19 HG.15, SS. 779-781.

6XEKDUDW, 6., :LOVRQ, 3.5., +HXHU, &. DQG &ROOLQV-(PHUVRQ, -.0. (2012). *URZWK UHVSQVHDQGHV VKHGGLQJ RI /HSWRVSLUD VSS. LQ XULQH IROORZLQJ YDFFLQDWLRQ IRU OHSWRVSLURVLV LQ \RXQJ IDUPHG GHU. 1HZ =HDODQG YHWHULQDU\MRXUQDO1HZ =HDODQG YHWHULQDU\MRXUQDO. 60, 7D\ORU &DPS; JUDQLV. SS. 14-20.

7DQVXSXDVVLUL, 8., 7KLSVXN, &., 3KXOVXNVRPEDWL, '. DQG &KDQ\DVDQKD, &. (2006). 'XSOH[3&5-K\EULGL]DWLRQ EDVHG GHWHFWLRQ RI SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD LQ HQYLURQPHQWDO ZDWHU VDPHWHU REWDLQHG IURP HQGHPLF DUHDV LQ QRUWKHDVW UHJLRQ RI 7KDLODQG. 6RXWKHDVW \$VLDQ - 7URS OHG 3XEOLF +HDOWK6RXWKHDVW \$VLDQ - 7URS OHG 3XEOLF +HDOWK6RXWKHDVW \$VLDQ - 7URS OHG 3XEOLF +HDOWK. 37, SS. 729-41.

7KDLSDGXQJSDQLW, -, :XWKLHNDQXQ, 9., &KDQWUDWLWD, 1., <LPVDPUDQ, 6., \$PRUQFKDL, 3., %RRQVLOS, 6. *HW DO.* (2013). /HSWRVSLUD 6SHFLHV LQ)ORRGZDWHU GXULQJ WKH 2011)ORRGV LQ WKH %DQJNRN OHWURSROLWDQ 5HJLRQ, 7KDLODQG. \$P - 7URS OHG +\J\$P - 7URS OHG +\J\$P - 7URS OHG +\J. 2013/09/05 HG.89, SS. 794-796.

7KLEHDX[, 5., *HURXOW, 6., %HQH]HFK, &., &KDEDXG, 6., 6RXSe*LOEHUW, O.(., *LUDXOW, '. *HW DO.* (2017). 6HHNLQJ WKH HQYLURQPHQWDO VRXUFH RI /HSWRVSLURVLV UHYHDV GXUDEOH EDFWHULDO YLDELOLW\ LQ ULYHU VRLOV. 3/R6 1HJO 7URS 'LV. 11.,

7KLEHDX[, 5., *LUDXOW, '., %LHUTXH, (., 6RXSe*LOEHUW, O.(., 5HWWLQJHU, \$., 'RX\HUH, \$. *HW DO.* (2018). %LRGLYHUVLW\ RI HQYLURQPHQWDO /HSWRVSLUD: LPSURYLQJ LGHQ\LLFDWLRQ DQG UHYLVWLQJ WKH GLDJQRVLV.)URQW. 0LFUREL0.)URQW. 0LFUREL0. 9, SS. 816.

7KLEHDX[, 5., ,UDROD, *,.)HUUeV, .., %LHUTXH, (., *LUDXOW, '., 6RXSe*LOEHUW, O.(. *HW DO.* (2018). *HFLSKHULQJ WKH XQH[S0RUHG /HSWRVSLUD GLYHUVLW\ IURP VRLOV XQFHYHUV JHQRP LF HYROXWLRQ WR YLUXOHQFH. 0LFURELDO *HQRP LFV0LFURELDO *HQRP LFV. 4, SS. 000144.

7KLHUPDQQ, %%. (1981). 7KH 1RUZD\ UDWDV D VHOHFWLYH FKURQLF FDUULHU RI /HSWRVSLUD LFWHURKDHPRUUKDJLDH. - :LOGO 'LV- :LOGO

'LV- :LOGO 'LV. 17, SS. 39-43.

7KRUQOH\, &.1., %DNHU, O.*., :HLQVWHLQ, 3. DQG ODDV, (. :. (2002). &KDQJLQJ HSLGHPLROR\ RI KXPDPQ OHSWRVSLURVLV LQ 1HZ =HDODQG.(SLGHPLRO ,QIHFV. 128, SS. 29-36.

7UHYHMR, 5.7., 5LJDX-3HUHJ], -.*, \$VKIRUG, '\$., 0F&OXUH, (.O., -DUTXLQ-*RQJDOH], &., \$PDGRU, --. HW DO. (1998). (SLGHPLF OHSWRVSLURVLV DVVRFLEDWHG ZLWK SXOPRQDU\ KHPRUUKDJH-ILFDUDJXD, 1995. - ,QIHFV 'LV- ,QIHFV 'LV- ,QIHFV 'LV. 1998/10/21 HG.178, SS. 1457-63.

7UXHED, *, =DSDWD, 6., 0DGULG, .., &XOOHQ, 3. DQG +DDNH, '. (2004). &H00 DJJUHJDWLRQ:D PHFKDQLVP RI SDWKRJHQLF /HSWRVSLUD WR VXUYLYH LQ IUHVK ZDWHU. ,QW 0LFURELRO,QW 0LFURELRO. 7, SS. 35-40.

86(3\$ (1999). :DVVHZDWHU WHFKQROR\ IDFW VKHHW: FKORULQH GLVLQIHFWRQ. 8QLWHG 6WDWHV (QYLURQPHQWDO 3URWHFWLRQ \$JHQF\, 2HILFH RI :DWHU.

9HLQ, -. , 3HUULQ, \$., %HUQ\, 3.-., %HQRLW, (. , /HEORQG, \$. DQG .RGMR, \$. (2012). \$GSDWDWLRQ RID UHDO-WLP 3&5 PHWKRQ IRU WKH GHWHFWLRQ DQG TXDQWLILFDWLRQ RI SDWKRJHQLF OHSWRVSLURVLV LQ HQYLURQPHQWDO ZDWHU. &DQ - 0LFURELRO&DQ - 0LFURELRO&DQ - 0LFURELRO. 2012/06/16 HG.58, SS. 828-35.

9HUPD, \$., 6WHYHQVRQ,%. DQG \$GOHU,%. (2013). /HSWRVSLURVLV LQ KRUVHV. 9HW 0LFURELRO9HW 0LFURELRO. 167, SS. 61-66.

9HUPD, 5., .KDQQD, 3. DQG &KDZOD, 6. (2013). :KROH-FH00 LQDFWLYDWHG OHSWRVSLURVLV YDFFLQH: IXWXUH SURVSHFWV. +XP 9DFFLQ ,PPXQRWKHU.+XP 9DFFLQ ,PPXQRWKHU. 9, SS. 763-765.

9LDX, (-., *RRGZLQ, --'. , <DPDKDUD, ..O., /DWRQ, %\$. , 6DVVRXEUH, /.O., %XUQV, 6./. HW DO. (2011). %DFWHULD0 SDWKRJHQLV LQ +DZDLLDQ FRDVWDO VWUHDV--DVVRFLEDWLRQV ZLWK IHFDO LQGLFDWRUV, ODQG FRYHU, DQG ZDWHU TXDOLW\ :DWHU 5HV:DWHU 5HV. 2011/04/16 HG.45, SS. 3279-90.

9LOODQXHYD, 6.<., 6DLWR, O., %DWHUQD, 5.\$., (VWUDGD, &\$. , 5LYHUD, \$... , 'DWR, O.&. HW DO. (2014). /HSWRVSLUD-UDW-KXPDPQ UHODWLRQV LQ /XJRQ, 3KLOLSSLQHV. 0LFUREHV ,QIHFWOLFUREHV ,QIHFWOLFUREHV ,QIHFV. 16, SS. 902-10.

9LWDO-%UDJLO, -.O., %DODVVLDQR, .,7., 20LYHLUD,).6., &RVWD, \$'., +LOOHQ, /. DQG 3HUHLUD, O.O. (2010). 0XOWLSOH[3&5-EDVHG GHWHFWLRQ RI /HSWRVSLUD LQ HQYLURQPHQWDO ZDWHU VDP SOHV REWDLQH IURP D VOXP VHWWOHPHQW. OHP ,QVW 2VZDOGR &UXJ0HP ,QVW 2VZDOGR &UXJ0HP ,QVW 2VZDOGR &UXJ. 105, SS. 353-5.

:DWDQDEH, 7., 7HVN, 6.6. DQG +DDV, &.1. (2014). &ODVVLF GRVH-UHVSQVH DQG WLP SRVWLQRFXDWLRQ PRGHV IRU OHSWRVSLUD. 5LVN \$QDO5LVN \$QDO5LVN \$QDO. 34, SS. 465-84.

:HLQEHUJHU, '. , %DURX[, 1., *UDQJHRQ, --.3., .R, \$'., DQG *RDUDQW, &. (2014). (O 1LgR 6RXWKHUQ 2VFLOODWLRQ DQG OHSWRVSLURVLV RXWEUHDNV LQ 1HZ &DOHGRQD. 3/R6 1HJO 7URS 'LV. 8, SS. H2798.

:+2 (2006). *XLGHOLQHV IRU WKH VDIH XVH RI ZDVVHZDWHU, H[FUHD DQG JUHZDWHU. 3ROLF\ DQG 5HJXODWRU\ \$VSHFWV. 2, :DVVHZDWHU XVH LQ DJULFXOWXUH, :RUOG +HDWK 2UJDQLJDWLRQ (:+2). *HQHYD, 6ZLWJHUODQG.

:+2 (1999). :+2 UHFRPPHQGHG VWDQGDUGV DQG VWUDWHJLHV IRU VXUYHLOODQFH SUHYHQWLRQ DQG FRQWURO RI FRPPXQLFDEOH GLVHDVHV: /HSWRVSLURVLV. :+2 UHFRPPHQGHG VWDQGDUGV DQG VWUDWHJLHV IRU VXUYHLOODQFH SUHYHQWLRQ DQG FRQWURO RI FRPPXQLFDEOH GLVHDVHV. :+2/&'6/&65/,65/99.2, :RUOG +HDWK 2UJDQLJDWLRQ, :+.2.

:RMFLN-)DWOD, \$., =DMDF, 9., :DVLQVNL, %, 6URND, --, &LVND, (. , 6DZF\Q, \$. HW DO. (2014). 2FFXUUHQFH RI /HSWRVSLUD '1\$ LQ ZDWHU DQG VRL0 VDP SOHV FROOHFWHG LQ HDVWHUQ 3RODQG. \$QQ \$JULF (QYLURQ OHG\$QQ \$JULF (QYLURQ OHG\$QQ \$JULF (QYLURQ OHG. 2014/12/23 HG.21, SS. 730-2.

:ROODQNH, %, 5RKUEDFK, %.:. DQG *HUKDUGV, +. (2001). 6HUXPDQG YLWUHRXV KXPRU DQWLERG\WLWHUV LQ DQG LVRODWLRQ RI /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV IURP KRUVHV ZLWK UHFUXUHQW XYHLWL. - \$P 9HW OHG \$VVRF- \$P 9HW OHG \$VVRF- \$P 9HW OHG \$VVRF. 219, SS. 795-800.

:XWKLHNDQXQ, 9., \$PRUQFKDL, 3., 3DULV, '.,+., /DQJOD, 6., 7KDLSDGXQSDQLW, --, &KLHUNXO, :. HW DO. (2013). 5DSLG LVRODWLRQ DQG VXVHSHWLEOLW\ WHVWLQJ RI /HSWRVSLUD VSS. XVQLJ D QHZ VROLG PHGLXP, /9: DJDU. \$QWLPLFURE \$JHQV &KHPRWKHU\$QWLPLFURE

\$JHQWV &KHPRWKHU\$QWLPLFURE \$JHQWV &KHPRWKHU. 57, SS. 297-302.

: \QZRRG, 6.-., &UDLJ, 6.%, *UDKDP, *.&., %ODLU, %.5., %XUQV, 0.\$., :HLHU, 6./. HW DO. (2014). 7KH HPHUJHQFH RI /HSWRVSLUD ERUJSHWHUVHQLL VHURYDU \$UERUHD DV WKH GRPLQDQW LQIHFWLQJ VHURYDU IROORZLQJ WKH VXPPHU RI QDWXUDO GLVDVWHUV LQ 4XHHQVODQG, \$XVWUDOLD 2011. 7URS %LRPHG7URS %LRPHG7URS %LRPHG. 2014/08/20 HG.31, SS. 281-5.

<DVXGD, 3.+., 6WHLJHUZDOW, \$.*., 6XO]HU, ..5., .DXIPDQQ, \$.)., 5RJHUV,). DQG %UHQQH, '-. (1987). 'HR[\ULERQXFOHLF DFLG UHODWHGQHVV EHWZHHQ VHURJURXS DQG VHURYDUV LQ WKH IDPLO\ /HSWRVSLUDFHDH ZLWK SURSRVDOV IRU VHYHQ QHZ /HSWRVSLUD VSHFLHV. QWHUQDWLRQDO-RXUQDO RI 6VWHPDWLF DQG (YROXWLRQDU\ 0LFURELROJ\, QWHUQDWLRQDO-RXUQDO RI 6VWHPDWLF DQG (YROXWLRQDU\ 0LFURELROJ\ 37, 0LFURELROJ\ 6RFLHW\ SS. 407-415.

=DPRUD, -.-., (QULTXH, ..)., %RXe, 5.*., 7RUUHV,).+., \$LUDGR, -.-. DQG +HUQdQGH], '-.5. (2005). >6FDOH-XS RI WKH IHUPHQDWLRQ RI /HSWRVSLUD LQWHUURJDQV FDQLFROD FDQLFROD IRU WKH SURGXFWLRQ RI YD[-63,5\$/ YDFFLQH@. 5HY &XEDQD OHG 7URS.5HY &XEDQD OHG 7URS. 57, SS. 71-72.

=KDQJ, <., .LWDMLPD, 0., :KLWWOH, \$.-. DQG /LX, :-.-7. (2017). %HQHILWV RI *HQRPLF ,QVLJKWV DQG &5,635-&DV 6LQDQXUHV WR 0RQLWUR 3RWHQWDO 3DWKRJHQV DFURVV 'ULQNLQJ :DWHU 3URGXFWLRQ DQG 'LVWULEXWLRQ 6VWHPV.)URQW 0LFURELRO)URQW 0LFURELRO. 8, SS. 2036.

Annexe IV

Base de données des sols collectés lors de la campagne de prélèvements.

Annexe IV Base de données des sols collectés lors de la campagne de prélèvement

Le type de sol, le lieu d'échantillonnage et les paramètres physico-chimiques mesurées *in situ* sont précisés pour chaque sol.

Référence	Type pédologique	Points GPS		Teneur H2O en %	Conductivité en mS/cm²	Température en °C	Potentiel Redox en mV
		Latitude	Longitude				
1 SUD	Posic ferralsol	22°13'26.58"S	166°39'21.64"E	15,5375	na	na	320,5
2 SUD	Ferralic Cambisol et haplic ferrasols	22°12'19.40"S	166°41'38.60"E	22,05	na	27,60	391,0
3 PIROGUE	Haplic fluvisol ferritic	22°11'12.54"S	166°43'20.71"E	20,9	na	27,20	379,0
4 YATE	Petroplinthic plinthosol	22° 9'39.53"S	166°50'39.75"E	16,3	na	27,10	348,0
5 LAC8	Posic ferralsol	22°16'17.00"S	166°53'0.30"E	15,8	na	23,70	413,0
6 CARENAGE	Haplic fluvisol ferritic	22°15'44.48"S	166°49'36.57"E	19,7	na	24,80	429,0
7 MARRE	Vertic cambisol sur roche basique	21°23'4.94"S	165°11'28.28"E	35,1	0,9200	24,30	na
8 RIVIERE	Haplic fluvisol	21°23'33.00"S	165°11'30.35"E	1,8	0,0000	24,80	na
9 POYA	Vertic cambisol sur roche basique	21°23'50.79"S	165° 7'36.12"E	41,5	1,2500	25,40	na
10 PLAGE	Haplic vertisol	21°24'16.72"S	165° 6'49.35"E	50,3	2,6200	29,20	268,0
11 SOURCE	Haplic vertisol associés à des sols hydromorph	21°24'16.14"S	165° 6'46.88"E	45,5	3,3200	27,60	na
12a SCARE	Ferralic Cambisol	20°48'35.00"S	165° 8'11.00"E	29,8	0,0900	21,90	423,0
12b REGENE	Ferralic Cambisol	20°48'54.60"S	165° 7'58.83"E	19,5	0,0000	21,90	476,6
12c SAVANE	Ferralic Cambisol	20°47'40.51"S	165° 7'25.52"E	28,2	0,0000	21,70	449,2
13 AMOS	Haplic Regosol	20°17'20.90"S	164°24'53.10"E	16,2	0,0000	24,60	379,0
14 BLANC	Haplic acrisol (rhodic et albic)	20°27'40.90"S	164°20'32.20"E	3,6	0,0000	28,70	338,4
15 KOUMAC	Haplic cambisol avec apport cambisols	20°32'7.20"S	164°15'8.50"E	23	0,0500	31,80	439,7
16 KG	Haplic cambisol magnésic	20°39'2.90"S	164°21'45.70"E	13,3	0,0000	31,60	379,0
17 KG HC	Haplic cambisol magnésic	20°39'59.60"S	164°23'22.10"E	14,8	0,0000	30,80	361,4
18 KGS	Haplic fluvisol	20°40'47.90"S	164°26'50.90"E	37,3	0,2600	30,40	307,3
19 KONIAMBO	Haplic cambisol magnésic	21° 2'10.10"S	164°46'28.90"E	12,6	0,0400	27,10	416,8
20 POUEMBOUT	Haplic vertisol	21° 7'58.80"S	164°54'56.00"E	27,1	0,3400	20,40	339,8
21 REGOSOL POUEMBOUT	Regosol	21°10'42.50"S	164°52'31.70"E	26,3	0,7000	21,30	318,4
22 PINDAI	Ferralic cambisol	21°17'27.90"S	164°58'47.80"E	28,6	0,3417	21,10	239,0
23 SARRAMEA	Lithic leptosol	21°38'21.41"S	165°51'43.94"E	40,5	0,3314	27,48	406,0
24 SARRAMEA CREEK	Lithic leptosol	21°38'30.60"S	165°50'43.60"E	31	0,0867	24,20	397,3
25 POUEO	Ferralic cambisol	21°29'27.36"S	165°30'41.99"E	51,1	0,3560	24,40	322,0
26 NERA	Haplic fluvisol	21°34'11.10"S	165°30'14.13"E	24,2	0,1900	25,82	388,0
27 TENE	Haplic fluvisol	21°34'58.07"S	165°32'35.80"E	38,1	0,2713	24,47	348,8
28 BOGHEN	Haplic fluvisol	21°35'48.72"S	165°35'18.73"E	6,4	0,0100	25,98	310,8
29 ARABES	Vertic cambisol associés à des Rendzic Leptosol	21°38'58.06"S	165°32'3.55"E	14,9	0,0350	27,40	328,0
30 LA FOA	Haplic acrisol (Rhodic) sur roche silicieuse	21°43'6.29"S	165°49'15.08"E	25,5	0,1571	25,66	392,0
31 OUANO	Vertic cambisol associés à des Rendzic Leptosol	21°51'11.34"S	165°48'50.16"E	17,6	0,0410	25,50	350,0
32 NASSIRAH	Lithic leptosol	21°48'5.82"S	166° 4'9.00"E	8,9	0,0075	25,70	336,8
33 OUENGHI	Vertic cambisol sur roche basique	21°54'47.67"S	166° 7'3.05"E	10,8	0,0313	24,73	309,8
34 MANGO	Haplic vertisol magnésic	21°59'17.65"S	166°12'26.29"E	36	0,9788	24,51	109,0
35 TAMOA	Haplic vertisol magnésic	22° 4'33.87"S	166°16'35.54"E	19,6	0,1050	23,55	335,5

Annexe Va

Tableau résumant les résultats de dosage physicochimique des solutions de sols

Annexe Va Tableau résumant les résultats de dosage physicochimiques des solutions de sols, réalisés par le LAMA-IRD
Les sigles ICP OES et MS correspondent respectivement aux techniques de spectrométrie d'émission optique et spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif.

Références	pH	Conductivité	Cl	SO4	NOx	PO4	N Total	P Total	ICP 4 éléments (mg/l)				ICP OES autres éléments (mg/l)										ICPMS (µg/l)															
		µS à 25°C	mg/l	mg/l	µg/L	µg/L	µmol/L	µmol/L	Ca	Mg	Na	K	Al	Ba	Cr	As	Pb	Co	Mn	Fe	Ni	V	As	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Sb	Se*	Se	Ti*	V	Zn	Zr*		
1 SUD	8,46	912	67,06	52,63	595,58	139,11	1605,55	0,30	8,16	131,78	13,85	7,68	0,01	0,42	0,01	0,01	0,00	0,05	2,63	0,24	0,22	0,01	1,20	0,23	38,89	6,98	2,69	179,77	0,18	0,14	0,37	6,64	0,38	5,53	28,98	7,02		
2 SUD	6,87	126	18,13	16,96	167,02	35,33	441,80	0,00	1,27	1,44	6,05	4,41	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,50	0,37	2,16	1,90	1,42	5,49	0,15	0,11	0,10	1,10	0,28	0,60	75,23	1,77		
3 PIROGUE	6,73	44	7,31	6,37	252,60	17,00	85,47	0,00	0,28	0,80	3,81	0,81	0,00	0,19	0,00	0,01	0,00	0,00	0,12	0,00	0,03	0,00	0,39	0,27	4,14	1,70	0,57	33,30	0,17	0,11	0,08	0,52	0,35	0,23	60,70	2,08		
4 YATE	6,182	100	13,43	12,57	271,07	19,37	403,33	0,00	0,24	1,00	4,93	3,01	0,00	0,20	0,01	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,01	0,00	0,39	0,27	3,04	18,29	2,24	18,21	0,16	0,15	0,10	1,00	0,22	0,31	71,21	2,13		
5 LAC8	5,678	74	44,07	37,89	415,63	2875,26	366,03	5,71	0,20	0,67	5,67	2,08	0,12	0,17	0,01	0,00	0,00	0,02	0,23	0,54	0,02	0,00	0,51	0,44	32,33	105,45	4,56	97,33	1,47	0,20	1,68	1,32	10,75	2,62	90,68	93,28		
6 CARNAGE	5,805	74	11,03	6,41	90,17	48,82	78,64	0,24	0,28	0,90	5,78	0,99	0,00	0,15	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,95	0,49	18,81	29,76	0,75	21,56	0,35	0,23	0,09	0,55	0,50	0,49	54,28	2,34		
7 MARRE	8,173	617	7,01	47,76	6405,48	57,17	264,47	0,97	41,14	29,42	37,12	1,95	0,02	0,12	0,01	0,00	0,00	0,00	0,13	0,01	0,01	0,01	0,03	0,00	0,01	0,07	-0,05	0,00	-0,01	0,03	0,07	0,18	0,03	0,02	0,00	3,13		
8 RIVIERE	8,385	856	41,73	13,51	163,89	211,79	655,16	4,37	37,33	28,29	19,77	4,20	0,03	1,30	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	0,48	0,10	0,04	0,03	0,95	0,29	42,06	6,89	4,85	277,96	0,33	0,22	0,63	1,38	1,49	8,45	32,14	46,94	
9 POYA	8,096	306	8,83	9,11	14,80	39,70	71,30	0,25	21,34	8,37	15,63	0,36	0,02	0,47	0,01	0,01	0,00	0,00	0,39	0,01	0,01	0,01	1,02	0,19	2,63	4,93	7,59	24,44	0,12	0,10	0,34	3,49	2,09	14,88	143,87	29,30		
10 PLAGE	8,054	20700	5822,94	2278,12	1739,08	43,12	272,86	0,54	237,37	401,02	3379,08	94,98	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,01	1,98	0,00	0,02	0,04	0,60	0,56	6,74	1,27	9,05	3,37	0,46	0,03	0,10	7,22	1,71	7,97	3,06	7,65		
11 SOURCE	8,633	4210	28,48	2105,52	4871,22	93,55	304,30	0,52	23,91	25,01	939,66	2,31	0,02	0,12	0,01	0,00	0,00	0,00	0,04	0,01	0,03	0,16	3,16	0,25	1,01	5,36	9,41	13,25	0,20	0,13	0,20	18,66	0,42	87,43	10,91	18,77		
12a SCARE	5,052	682	22,56	32,79	106,99	223,28	24,45	1,83	48,44	33,22	20,60	17,37	0,27	1,19	0,00	0,01	0,00	0,01	5,06	18,44	0,01	0,01	2,47	0,58	7,72	3,15	6,57	13,00	1,22	0,12	1,20	10,87	1,33	4,85	258,87	180,08		
12b REGENE	3,741	421	71,73	38,88	57,47	94,88	19,05	1,05	2,70	14,35	21,63	3,54	1,44	0,31	0,00	0,01	0,00	0,01	0,55	20,86	0,03	0,01	2,54	0,68	6,68	2,63	4,68	29,31	2,94	0,32	1,31	17,90	1,53	6,03	292,51	314,17		
12c SAVANE	6,248	149	27,86	23,04	325,09	312,37	781,01	2,69	18,86	111,91	24,43	22,49	0,00	0,15	0,02	0,00	0,00	0,04	1,31	0,04	0,30	0,01	1,29	0,50	1,14	4,82	3,24	4,78	1,20	0,41	0,93	3,88	36,45	8,02	242,09	434,16		
13 AMOS	7,131	193	10,99	17,40	263,10	88,23	435,59	1,39	89,02	61,56	26,95	2,49	0,00	0,84	0,01	0,00	0,00	0,00	1,62	0,00	0,01	0,02	1,59	0,31	28,73	19,83	11,40	19,21	0,59	2,76	1,83	7,07	146,93	11,79	65,35	106,16		
14 BLANC	4,717	1541	401,64	93,69	147,83	35,61	111,56	0,23	2,49	2,55	13,25	2,13	0,62	0,44	0,00	0,01	0,00	0,00	0,05	1,06	0,00	0,01	1,09	0,72	17,33	1,86	2,05	61,34	0,57	1,22	0,30	16,92	0,66	0,65	774,02	67,46		
15 KOUMAC	6,992	272	5,70	11,78	260,10	27,54	188,89	0,10	8,29	8,83	10,39	2,60	0,43	0,38	0,00	0,00	0,00	0,02	2,10	0,39	0,00	0,00	0,57	0,18	42,89	2,57	1,79	76,72	0,13	1,19	0,37	2,17	0,44	0,62	93,34	7,64		
16 KG	6,544	186	19,18	10,99	2043,38	124,79	312,84	3,16	5,13	42,10	240,75	7,30	0,65	0,18	0,00	0,00	0,00	0,01	0,24	0,03	0,05	0,00	0,58	0,26	6,11	28,64	4,81	387,96	0,25	1,17	1,04	1,50	1,53	1,95	39,76	33,20		
17 KG HC	8,133	702	13,20	9,83	296,81	135,81	256,24	2,31	2,63	13,23	36,96	2,06	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00	0,03	1,71	0,00	0,05	0,00	1,10	0,35	88,12	8,69	11,61	136,76	0,27	0,65	0,90	2,41	6,69	13,58	180,65	212,25		
18 KGS	8,38	866	29,14	43,18	53,68	118,24	667,78	2,73	2,58	12,19	16,55	1,06	0,02	0,42	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,66	0,24	0,00	6,83	0,24	3,99	3,85	2,62	26,07	0,48	0,84	0,75	4,35	1,61	10,00	58,15	133,44		
19 KONIAMBO	7,4	131	16,30	12,78	1072,53	28,59	116,14	0,06	33,05	77,89	23,39	3,01	0,00	0,52	0,01	0,00	0,00	0,08	3,75	0,00	0,09	0,01	0,38	0,21	0,70	39,95	0,74	17,72	0,18	0,47	0,34	1,27	0,26	0,46	6,10	6,04		
20 POUEMBOUT	6,53	381	39,39	33,85	700,41	196,50	514,86	1,58	9,50	8,56	51,65	0,54	0,07	0,23	0,00	0,01	0,00	0,00	0,14	0,24	0,00	0,01	0,81	0,30	2,89	4,57	15,12	9,10	0,30	0,71	1,00	3,84	3,39	14,83	75,67	336,91		
21 REGOSOL POUEMBOUT	8,433	502	8,96	16,22	8373,47	25,64	386,29	0,38	55,97	91,96	26,08	4,40	0,00	0,53	0,01	0,01	0,00	0,00	1,00	0,15	0,00	0,01	0,76	0,18	7,43	3,47	2,11	65,19	0,47	0,33	0,48	1,94	0,44	2,75	76,19	16,00		
22 PINDAI	7,846	1010	53,50	35,82	7255,80	58,69	634,12	0,59	0,26	7,89	11,22	0,59	0,00	0,07	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,46	0,97	23,74	5,22	3,96	97,77	0,39	0,38	0,56	4,94	0,57	6,40	51,19	145,56		
23 SARRAMEA	7,512	638	81,18	48,33	77696,92	277,21	2093,21	4,99	5,93	68,25	10,76	2,29	0,00	0,27	0,00	0,00	0,00	0,01	0,28	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,04	0,03	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,09	0,06	0,18	0,11	0,03	0,00	5,29
24 SARRAMEA CREEK	7,071	147	9,61	25,41	210,17	45,78	170,72	0,89	216,29	65,88	19,42	7,44	0,00	0,34	0,01	0,00	0,00	0,02	3,50	0,00	0,08	0,00	1,76	0,14	1,94	1,50	8,90	7,70	0,48	0,37	0,65	1,62	28,51	4,48	87,49	1411,52		
25 POUEO	7,955	2500	198,38	101,86	110,27	548,17	51,04	4,49	37,04	26,23	33,07	6,68	1,43	0,66	0,00	0,01	0,00	0,01	1,26	1,04	0,00	0,01	30,13	0,12	11,90	32,65	7,58	91,93	0,39	0,62	0,77	3,63	2,33	8,25	42,39	417,93		
26 NERA	7,269	425	30,24	66,02	36882,94	2063,35	1725,35	33,35	8,81	4,19	12,38	1,48	0,07	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,17	0,00	0,00	1,61	0,14	10,99	10,98	26,09	185,53	0,37	0,54	0,84	8,15	30,88	11,66	54,61	489,40		
27 TENE	8,453	684	30,18	23,96	127,95	80,92	235,86	1,95	192,20	168,97	184,92	11,78	0,01	0,79	0,04	0,04	0,00	0,01	12,01	1,92	0,11	0,01	0,81	0,09	22,63	5,06	3,96	91,41	0,07	0,15	0,34	3,27	1,04	1,76	66,41	19,42		
28 BOGHEN	8,406	725	13,72	26,15	1752,39	91,36	514,01	1,92	26,29	26,44	21,15	3,15	0,21	0																								

Annexe Vb

Tableau résumant les résultats de dosage physicochimique des sols

Annexe Vb Tableau résumant les résultats de dosage physicochimiques des sols, réalisés par le LAMA-IRD

Le sigle ICP OES correspond à la technique de spectrométrie d'émission optique par plasma à couplage inductif. L'azote Kjeldahl est représenté par le sigle N Kjel.

Références	Humidité	pF 3	pF 2	pH H2O	pH KCl	N Kjel.	C Organique	Cations d'échange				Capacité d'échange en méq%	ICP OES éléments en mg/kg										
								Ca méq%	Mg méq%	Na méq%	K méq%		Fe	Co	Cr	Mn	Ni	Al	Cu	P	Ba	Pb	V
1 SUD	0,25	29,7	30,9	7,48	6,389	2,52	39,99	2,06	16,93	0,07	0,13	15,11	353088,09	676,74	14845,33	4952,43	6863,94	21013,23	105	124,78	22,38	33,85	210,14
2 SUD	0,12	21,5	21,9	5,129	5,257	0,51	17,33	0,04	0,11	0	0	2,31	315626,02	149,59	23306,62	929,61	2420,47	89095,1	111,93	66,9	3,03	23,96	278,7
3 PIROGUE	0,14	26,4	26,6	5,392	5,878	0,24	9,16	0,09	0,18	0,02	0	1,48	333368,45	268,36	13171,42	1396,53	2813,94	86552,55	118,39	76,4	4,63	33,17	269,37
4 YATE	0,08	21,5	20,4	5,134	5,361	0,31	11,09	0,04	0,04	0,02	0	2,7	499751,91	591,75	15318,84	5538,97	5173,61	31067,88	203,92	88,45	3,43	52,53	204,21
5 LAC8	0,05	11,6	11,7	5,615	5,187	0,48	16,41	0,38	0,38	0	0,01	4,2	499026,05	491,1	17919,37	3005,09	4027,01	23069,74	181,45	115,1	3,42	54,39	206,47
6 CARNAGE	0,11	23,7	24,9	5,974	6,361	0,23	9,96	0,31	0,49	0,01	0,01	3,25	460214,94	937	18905,33	5584,95	6307,91	33943,02	168,07	99,2	32,39	52,36	160,09
7 MARRE	0,09	28,8	52,8	6,528	5,109	2,75	40,25	26,23	24,13	0,47	0,84	42,87	103195,71	150,38	468,65	1828,98	201,53	77785,49	135,8	385,91	64,71	9,8	323,14
8 RIVIERE	0,01	11,4	17	7,869	6,669	0,65	14,05	1,87	7,73	0,08	0,31	7,86	113336,65	198,41	8809,25	1574,9	2768,8	17922,83	47,34	102,85	26,73	5,22	134,78
9 POYA	0,08	49,3	53,3	6,634	5,006	1,46	25,23	28,55	24,79	0,41	0,31	44,6	95304,71	100,4	236,94	3028,79	96,15	82248,67	112,75	189,75	76,39	5,03	305,51
10 PLAGE	0,05	47	53,4	8,342	6,878	0,83	14,7	17	14,94	20,23	1,54	42,13	90438,57	117,23	514	3199,86	386,1	70803,62	104,94	316,79	161,96	8,78	330,42
11 SOURCE	0,11	86,4	94,4	9,228	7,841	0,5	9,96	28,18	26,66	31,51	0,78	57,86	103823,23	75,04	283,76	1199,35	136,36	75133	126,71	249,21	172,88	4,05	355,64
12a SCARE	0,09	44,7	47,2	5,218	3,887	4,73	75,85	5,35	4,08	0,28	0,89	23,99	50254,92	16,65	23,02	455,26	15,24	70327,83	32,93	624,6	330,1	7,98	117,41
12b REGENE	0,09	44,1	47,8	4,209	3,178	4,11	70,28	0,3	1,87	0,17	0,2	19,96	43962,73	0	83,42	120,03	24,5	73898,48	23,75	278,52	115,62	12,59	116,48
12c SAVANE	0,08	41	43,5	5,087	3,613	3,86	68,86	2,19	2,38	0,25	0,35	24,01	36508,63	15,35	100,78	104,23	40,6	78500,55	18,95	577	375,24	14,81	107,9
13 AMOS	0,01	15,9	20,2	5,882	4,853	0,66	19,4	1,84	2	0,04	0,08	4,86	85620,57	70,39	526,57	1527,72	307,07	49142,64	48,68	139,06	107,2	16	233,44
14 BLANC	0	14,1	13,8	4,904	4,536	0	4,62	0,05	0,2	0,51	0	0,17	438,69	0	25,92	23,19	18,56	953,4	2,66	48,12	33,21	1,68	28,95
15 KOUMAC	0,04	25,6	32,5	6,181	4,556	1,21	24,02	2,1	9,63	0,44	0,26	17,02	186854,04	725,26	25778,74	10016,22	919,16	36758,5	69,5	183,16	395,55	24,15	352,57
16 KG	0,05	21,7	24,1	6,213	5,055	1,32	32,48	2,72	11,77	0,11	0,08	16,71	321954,39	608,31	24115,39	2276,09	4738,6	20610,83	101,26	88,16	18,06	35,04	212,39
17 KG HC	0,06	28,9	31,1	6,79	4,742	1,34	22,77	10,86	26,42	0,31	0,41	29,07	102947,04	174,09	1646,16	1913,27	477,16	74711,6	147,18	217,76	60,61	15,03	283,12
18 KGS	0,02	16,7	19,3	7,633	6,448	0,99	10,79	4,08	7,32	0,24	0,2	9,48	46493,47	35,44	1105,99	455,96	289,85	42859,35	34,91	257,99	326,08	5,99	130,07
19 KONIAMBO	0,05	23,1	24,5	6,938	5,433	0,37	11,34	0,42	8,85	0,15	0,05	13,85	403783,57	2107,78	24358,88	16202,58	5051,22	14456,97	117,55	99,09	123,68	43,63	261,86
20 POUEMBOUT	0,12	58,1	66,6	5,994	4,35	1,32	21,15	21,05	28,66	1,9	0,11	46,28	105234,93	57,1	344,15	921,45	55,16	80761,25	105,27	130,52	64,05	5,62	404,75
21 REGOSOL POUEMBOUT	0,07	39,8	44,6	7,623	6,226	1,79	26,08	2,35	23,03	0,2	0,22	17,48	99219,45	212,69	3993,73	1822,5	2940,89	13126,11	40,13	147,54	15,07	9,94	58,88
22 PINDA	0,05	38,6	47,1	8,073	7,026	2,47	29,94	43,64	9,01	0,29	0,75	26,49	110561,42	106,19	4680,34	1988,76	1032,23	42336,19	72,55	228,04	139	13,43	155,02
23 SARRAMEA	0,05	44,2	48,7	6,179	4,952	4,24	52,2	12,15	8,88	0,41	0,56	20,16	58999,17	28,62	37,35	837,83	21,93	81164,97	32,55	544,22	171,1	12,58	168,2
24 SARRAMEA CREEK	0,02	9	11,1	6,634	4,754	0,44	5,56	6,32	3,68	0,18	0,27	9,76	62410,08	29,98	84,25	763,2	33,25	78494,41	39,11	604,72	301,31	15,44	159,05
25 POUEO	0,06	28,1	40,6	6,948	5,716	2,1	31,28	9,55	8,08	0,88	0,17	13,16	85993,31	65,17	1744,4	1018,44	399,25	70868,5	44,96	1089,01	222,16	6,36	172,36
26 NERA	0,05	40,9	52,9	6,134	4,837	3,63	38,69	13,61	14,27	0,21	0,39	20,5	86349,39	73,81	456,63	1329,56	412,39	79937,35	69,78	1304,02	288,86	12,17	197,88
27 TENE	0,03	24,7	34,8	7,752	6,385	0,67	11,97	2,03	12,95	0,1	0,1	11,73	222319,94	257,98	9362,76	2057,29	2960,48	33136,47	88,28	126,12	127,59	16,42	190,68
28 BOGHEN	0,05	26,3	31	7,402	6,003	1,45	21,16	6,15	10,72	0,19	0,32	12,46	102260,59	106,45	3933,41	1376,26	956,28	50260,51	56,41	418,16	211,55	14,57	132,95
29 ARABES	0,04	23,2	29,9	5,451	4,014	1,28	15,96	14,56	5,6	0,33	0,47	16,85	54922,92	27,63	97,67	468,19	47,03	74793,96	27,9	109,06	147,41	8,98	133,02
30 LA FOA	0,04	30,4	36,6	5,537	4,37	2,16	23,65	13,15	5,75	0,36	0,6	16,67	47400,64	29,05	48,17	918,42	28,77	73324,87	35,1	601,78	262,1	20,96	136,29
31 OUANO	0,06	35,1	39,7	6,974	5,486	2,7	30,43	27,86	13,75	0,38	1,47	32,62	61765,21	30,75	40,92	880,77	31,86	76220,42	64,34	209,81	180,93	7,29	182,57
32 NASSIRAH	0,03	16,1	7,4	6,718	6,002	3,01	37,04	11,22	3,27	0,09	0,38	11,98	35111,27	39,2	140,18	1098,79	78,96	17838,58	30,22	289,42	409,13	9,88	145,9
33 OUENGHI	0,04	26,4	39,6	7,861	7,141	2,09	27,22	2,92	12,2	0,16	0,21	11,06	128208,56	248,16	7412,78	1686,25	4075,99	9959,38	44,3	105,44	24,8	12,89	86,96
34 MANGO	0,1	31,1	63,8	8,301	7,388	2,98	38,32	4,95	36,12	0,4	0,21	25,47	146759,63	291,4	5337,22	1757,31	4602,81	18068,87	70,05	320,93	22,26	11,16	108,25
35 TAMOA	0,07	39,9	50,2	6,585	5,301	2,98	45,4	4,21	35,05	0,34	0,82	31,59	121076,01	272,88	8770,21	1929,05	2982,48	26447,27	49,31	262,22	118,71	19,23	134,56

Annexe VI

Scripts utilisés pour l'analyse statistique des données de survie en microcosme de solutions de sols et de sols

Scripts utilisés pour l'analyse statistique des données de survie en microcosme grâce au logiciel R version 1.3.959 (Adapté de A. Bourles, Université de Nouvelle-Calédonie et Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie)

Analyse Factorielle Multiple (AFM)

Bibliothèque de l'AFM

```
library(FactoMineR)
library(factoextra)
library(ggpubr)
```

Importation du fichier

```
data <- read.table("basededonnées.csv", sep = ";", dec = ",",
  + header = T, na.strings = "Na", row.names=1)
```

Réalisation de l'AFM

```
res <- MFA (data, group=c(1,1,1,3,3,4,18),
  + type = c("n","s","s","s","s","s","s"),
  + name.group = c("no1","no2","no3","no4","no5","no6","no7"))
```

Contribution des variables quantitatives pour chacune des deux dimensions

```
fviz_contrib (res, choice = "quanti.var", axes = 1, top = 32,
  + palette = "hsv")
fviz_contrib (res, choice = "quanti.var", axes = 2, top = 32,
  + palette = "hsv")
```

Projection graphique des individus en fonction de la variable qualitative

```
fviz_mfa_ind(res, habillage = "survie",
  + palette = c("red","darkgreen"), addEllipses = T, repel = TRUE)
```

Matrice de Corrélation MCOR

Bibliothèque du MCOR

```
library (lmtest)
library(Hmisc)
library(car)
library(agricolae)
library(lawstat)
library(MASS)
library(ade4)
library(FactoMineR)
library(scatterplot3d)
library(vegan)
library(corrplot)
library(RColorBrewer)
```

Importation du fichier

```
data <- read.table("Basededonnées.csv", sep = ";", dec = ",",
```



```

+ header=T, na.strings="Na")

##### Réalisation de la matrice de corrélation
mcor<- cor(data)

corrplot(mcor, type="upper", order="hclust", tl.col="black",
+ tl.srt=90, tl.cex=0.8, col = brewer.pal(n = 8,
+ name = "RdBu"))

##### Visualisation de l'intervalle de confiance
res1 <- cor.mtest(data, conf.level = .95)
corrplot(mcor, p.mat = res1$p, insig = "label_sig",
+ sig.level = c(.001, .01, .05), pch.cex = .9, pch.col = "white")

```

Analyse en Composantes Principales (ACP)

Bibliothèque de l'ACP

```

library(lmtest)
library(Hmisc)
library(car)
library(agricolae)
library(lawstat)
library(MASS)
library(ade4)
library(FactoMineR)
library(scatterplot3d)
library(vegan)
library(corrplot)

```

Importation du fichier

```

data <- read.table("basededonnées.csv", sep = ";", dec = ",",
+ header=T, na.strings="Na", row.names=1)

```

Réalisation de l'ACP

```

res <- PCA(data, quanti.sup=1)

plot(res, choix="varcor", cex=0.8, shadowtext=TRUE,
+ col.quanti.sup="red", axes=c(1,2))

```

Propriété de l'ACP

```

summary(res, nbelements=Infsummary(res, nbelements=Inf,
+ file = "nomdufichier.txt")

```

Scripts utilisés pour la réalisation du modèle "Support Vector Machine", langage Python
(N. Ochida, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie et IRD-Nouméa)

Bibliothèque du SVM

```
from os import chdir
import pandas as pd
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sb
from sklearn.preprocessing import StandardScaler
from scipy.stats import mannwhitneyu
import sklearn
from sklearn.model_selection import train_test_split
from sklearn.svm import SVC
from sklearn.model_selection import cross_val_score
from sklearn.metrics import confusion_matrix
```

Importation du fichier

```
lepto = pd.read_csv(nomdufichier.csv', sep = ';')
```

Préparation des données

```
lepto = lepto.drop(['References'], axis = 1)
df_survival = lepto.loc[lepto.survie > 7]
df_no_survival = lepto.loc[lepto.survie <= 7]
```

Test de Mann Whitney-U

```
dic_pvalue = {}
for elem in df_survival.columns[1:]:
    x = df_survival[elem]
    y = df_no_survival[elem]
    dic_pvalue[elem] = mannwhitneyu(x,y).pvalue

dic_sig = {key:value for (key,value) in dic_pvalue.items()
           + if value < 0.05}
```

```
features = [x for x in dic_sig.keys()]
df = lepto.loc[:,features]
scaled = pd.DataFrame (StandardScaler().fit_transform
    + (df.iloc[:,1:4].values), columns = df.iloc[:,1:4].columns)
    + scaled['pH'] = df['pH normalise']
scaled['survie'] = lepto.survie
```

```
scaled.survie = [1 if x >7 else 0 for x in scaled.survie]
y = scaled.iloc[:,4]
X= scaled.iloc[:,[3,0]]
```

```
svm = SVC(C=1000, gamma=0.001, kernel='rbf', probability = True)
svm.fit(X,y)
scores = cross_val_score(svm, X, y, cv=5)
print("Accuracy: {0} (+/- {1})".format(scores.mean(), scores.std() *
2))
```

```

y_pred = svm.predict(X)
print(confusion_matrix(y,y_pred))

df_full = pd.DataFrame(X, copy = True)
df_full['pred'] = y_pred
df_full['true'] = y
plt.figure(figsize = (8,8))
sb.scatterplot(x = 'Conductivite', y= 'pH', hue = 'true', style =
'pred', data =df_full)
#plt.savefig('Modele_svm_lepto')

##### Visualisation du modèle
max_ph, min_ph = scaled.pH.max()*1.1,scaled.pH.min()*0
min_cond, max_cond =
scaled.Conductivite.min()*1.1,scaled.Conductivite.max()*1.1
x = np.linspace(min_cond, max_cond,40)
y = np.linspace(max_ph, min_ph,40)

grid = np.array([(i,j) for i in y for j in x])
grid = pd.DataFrame(grid, columns = ['pH','Conductivite'])

pred = svm.predict_proba(grid)
pred = pred[:,[1]]
grid['pred'] = pred

matrix = pred.reshape(40,40)

df_plot = pd.DataFrame(df_full, copy = True)
df_plot['pred'] = ['survie' if x == 1 else 'non survie' for x in
df_plot['pred']]
df_plot['true'] = ['survie' if x == 1 else 'non survie' for x in
df_plot['true']]
df_plot.columns = ['pH normalisé','Conductivité centrée-
réduite','Prédiction du Modèle','Réalité']

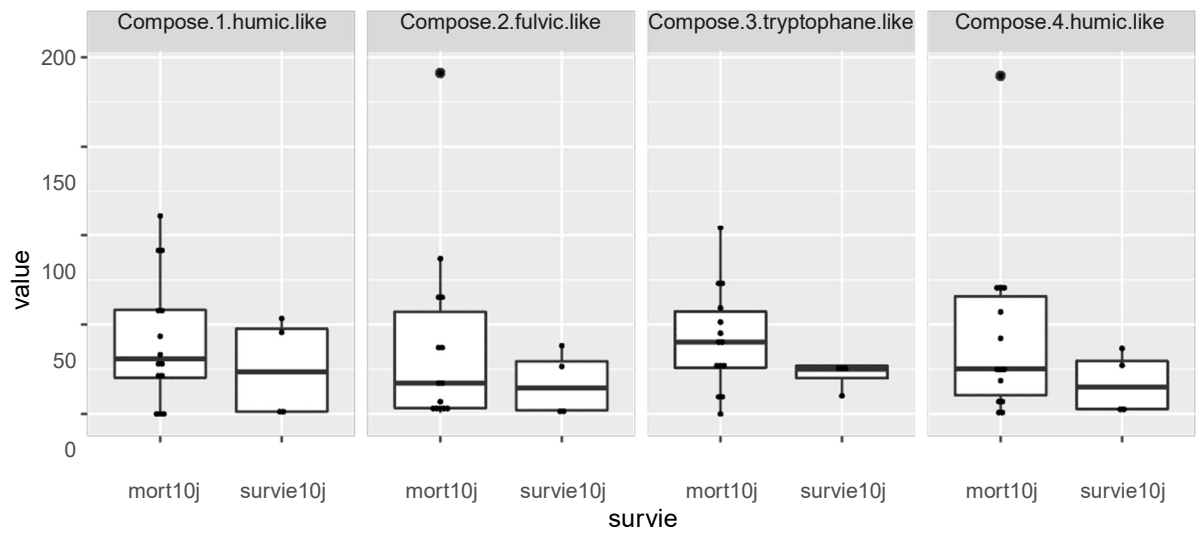
##### Utilisation du paramètre spécial imshow comme axe
fig,ax = plt.subplots(figsize = (16,16))
ax.imshow(matrix, cmap = 'coolwarm', interpolation='gaussian',
+ extent=[min_cond, max_cond, min_ph, max_ph])

sb.scatterplot(x = 'Conductivité centrée-réduite',
+ y= 'pH normalisé', hue = 'Prédiction du Modèle',
+ style = 'Réalité', data =df_plot, markers = ['X','s'],
+ s = 70,ax = ax)
ax.set_ylim(min_ph,max_ph)
sb.set(font_scale = 1.8, context = 'paper', style = 'dark')
#plt.savefig('svm_visualization')

```

Annexe VII

Résultats préliminaires de la détermination de la nature de la matière organique dissoute fluorescente par spectrofluorométrie.



Ce graphique en boîtes à moustache permet de comparer les médianes des composés 1 à 4 détectés en spectrofluorométrie en fonction de la capacité de 10 sols à permettre ou non la survie de leptospires pathogènes pendant 10 jours. Un graphique en dotplot est également intégré afin de pouvoir observer la distribution des échantillons.

Annexe VIII

Thibeaux, R., Soupé-Gilbert, M.-E., Kainiu, M., Girault, D., Bierque, E., Fernandes, J., Bähre, H., Douyère, A., Eskenazi, N., Vinh, J., Picardeau, M., Goarant, C., 2020. The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. *Npj Biofilms Microbiomes* 6, 24. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0134-1>

ARTICLE OPEN



The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production

Roman Thibeaux¹ , Marie-Estelle Soupé-Gilbert¹, Malia Kainiu¹, Dominique Girault¹, Emilie Bierque¹, Julien Fernandes¹ , Heike Bähre³, Anthony Douyère⁴, Nicolas Eskenazi⁵, Joëlle Vinh⁵, Mathieu Picardeau⁶ and Cyrille Goarant¹

The zoonotic bacterium *Leptospira interrogans* is the aetiological agent of leptospirosis, a re-emerging infectious disease that is a growing public health concern. Most human cases of leptospirosis result from environmental infection. Biofilm formation and its contribution to the persistence of virulent leptospires in the environment or in the host have scarcely been addressed. Here, we examined spatial and time-domain changes in biofilm production by *L. interrogans*. Our observations showed that biofilm formation in *L. interrogans* is a highly dynamic process and leads to a polarized architecture. We notably found that the biofilm matrix is composed of extracellular DNA, which enhances the biofilm's cohesiveness. By studying *L. interrogans* mutants with defective diguanylate cyclase and phosphodiesterase genes, we show that biofilm production is regulated by intracellular levels of bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) and underpins the bacterium's ability to withstand a wide variety of simulated environmental stresses. Our present results show how the c-di-GMP pathway regulates biofilm formation by *L. interrogans*, provide insights into the environmental persistence of *L. interrogans* and, more generally, highlight leptospirosis as an environment-borne threat to human health.

npj Biofilms and Microbiomes (2020) 6:24 | <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0134-1>

INTRODUCTION

Pathogenic species of bacteria from the genus *Leptospira* cause leptospirosis, a zoonosis that has been observed worldwide but is especially prevalent in tropical low-income countries¹. The disease affects 1.03 million humans annually, and kills nearly 60,000². Pathogenic leptospires persist in the renal tubules of chronically infected reservoir animals, and are excreted in the urine³—thus contaminating the environment. Leptospires can survive in the environment for months^{4,5}. Contact with a contaminated environment is the predominant cause of transmission to humans⁶. Pathogenic *Leptospira* are able to produce a biofilm *in vitro*^{7,8} and the presence of pathogenic *Leptospira* within a biofilm in the environment has been reported—suggesting that this structure has an important role in *Leptospira*'s ability to survive *in natura*^{4,9}

and in water distribution systems^{10,11}. Studies of reservoir mammals have highlighted the presence of bacterial aggregates

within the lumen of proximal renal tubules^{12,13}. These aggregates share some morphological features with biofilms, which might explain why *Leptospira* are so persistent and why antibiotic treatments fail to clear the bacteria from the kidneys¹⁴.

Biofilms are multicellular aggregates embedded in a three-dimensional self-produced matrix that confers protection against adverse conditions such as desiccation, osmotic shock, and exposure to some types of toxic compounds, UV radiation and predators^{15–20}. The matrix formed by bacteria is held together by interconnecting compounds, such as self-produced polysaccharides, proteins, extracellular DNA (exDNA) and cell lysis products, and material from the surrounding environment²¹.

Leptospira's ability to remain viable and infectious in various environments (such as the soil, water, and mammalian hosts) suggests that these bacteria have fast-acting, sensitive regulatory systems that enable them to adapt to various environmental challenges. In many biofilm-producing bacterial species studied to date, biofilm formation is regulated by the signalling molecule bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP)^{22–24}. C-di-GMP is produced by diguanylate cyclases (DGCs) and degraded by phosphodiesterases (PDEs)^{25,26}. Production of this intracellular signalling molecule is low in motile cells whereas its elevation in the cytoplasm triggers biofilm formation^{27,28}. Our understanding of c-di-GMP turnover in *Leptospira* is limited^{29,30}. An analysis of the *L. interrogans* genome found 25 proteins

predicted to be involved in c-di-GMP metabolism³¹. Some of these enzymes were found to be active *in vivo*.

Although persistent forms have not been described to date, we hypothesized that *L. interrogans*' biofilm helps virulent leptospires to endure unfavourable environments. We, therefore, sought to better understand the role of c-di-GMP in the formation, organization, composition, role and regulation of biofilms in this bacterium. This study increased our understanding of how *L. interrogans*' biofilm is formed and organized. In particular, we revealed the critical role of exDNA in biofilm cohesion. By studying mutants with impairments in the c-di-GMP pathway, we illustrated the key role of intracellular c-di-GMP in controlling biofilm formation and motility in *L. interrogans*. We also showed that biofilm production confers resistance to simulated environmental

¹Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose, Noumea, New Caledonia. ²Institut Pasteur, UTechS PBI, Centre de Ressources et Recherches Technologiques (C2RT), Paris, France. ³Hannover Medical School, Research Core Unit Metabolomics, Hannover, Germany. ⁴Université de la Nouvelle-Calédonie, Institut des Sciences Exactes et Appliquées, Plateau MET/MEB, Noumea, New Caledonia. ⁵École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris, Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, CNRS, Université Paris-Sciences-et-Lettres, Paris, France. ⁶Institut Pasteur, Unité Biologie des Spirochètes, Paris, France. [✉]email: rthibeaux@pasteur.nc; cgoarant@pasteur.nc

stresses but does not seem to promote virulence or chronic infectivity.

RESULTS

Biofilm formation is a collective and dynamic process

We first sought to describe biofilm formation by *L. interrogans*. To this end, we applied a combination of phase-contrast microscopy, time-lapse imaging, confocal laser scanning microscopy (CLSM), and scanning electron microscopy (SEM) (Fig. 1). The phase-contrast microscopy data (Fig. 1a) indicated that the *Leptospira* biofilm changes its shape significantly over time through an expansion process. These bacterial aggregates' sugar moieties were stained with Crystal violet (Fig. 1b). Additional live/dead staining of the biofilm aggregates (Fig. 1c) showed that most of the bacteria in the biofilms were alive. The biofilm's shape varied markedly from one *Leptospira* species to another, with dotted, branching and reticulated patterns (Supplementary Fig. 1A).

Our time-lapse microscopy and SEM images revealed the whole sequence of biofilm formation (Fig. 1d, e). Motile planktonic *L. interrogans* cells were observed shortly after bacteria had been seeded in the glass slide chamber. Small dots of multicellular structures then appeared over the first 72 h of culture (Fig. 1d–f). Live imaging showed that microcolonies originated from the aggregation of planktonic bacteria which were steadily depleted from the supernatant (Supplementary Fig. 1B). These multicellular structures were not anchored to the culture dish but remained motile for up to seven days, and moved together on the substrate surface (Supplementary Movie 1). As more and more multicellular structures appeared over time, we observed collisions and interconnections—leading to massive aggregates that expanded across the surface of the microscope slide (Fig. 1e, f) and, ultimately, stopped moving due to a lack of space. Supplementary Fig. 1C shows a coalescence event that occurred on day three and led to a decrease in the number of aggregates. Extracellular matrix (ECM) deposits were visible under the SEM as early as day 1 (Fig. 1e). After a week, the mature biofilms had grown perpendicularly

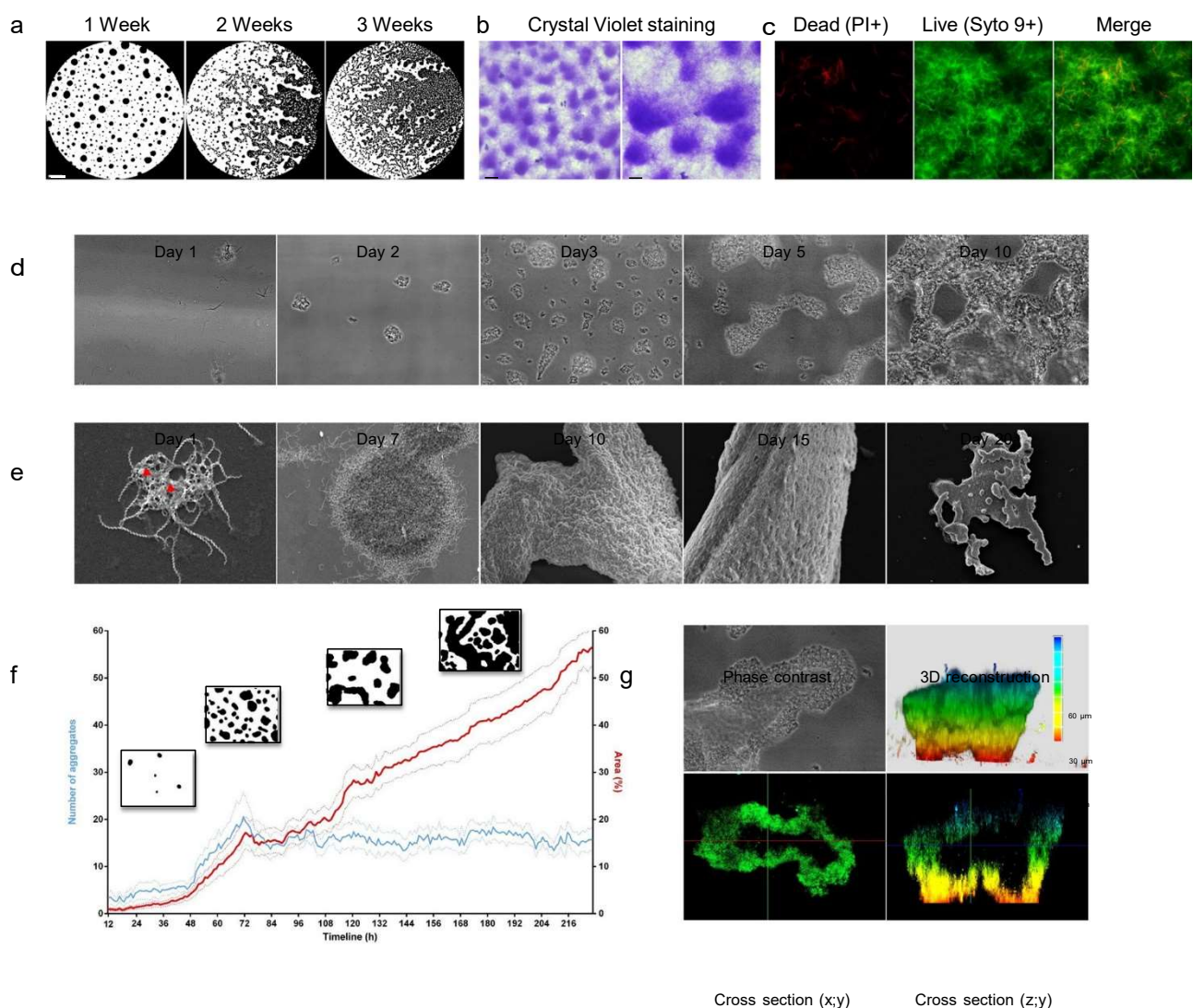


Fig. 1 *Leptospira* biofilm formation. **a** Phase contrast images of *Leptospira* biofilm at 1, 2 and 3 weeks post-inoculation. Scale bar: 500 μ m. **b** Phase contrast images of Crystal Violet-stained biofilms. Scale bars: 100 μ m (left); 50 μ m (right). **c** CLSM images of *Leptospira* biofilm stained with Propidium Iodide (PI, left panel) and Syto 9 (central panel). Merged image is shown in the right panel. Scale bar: 10 μ m. **d** Phase contrast images of *Leptospira* biofilm formation at 1, 2, 3, 5 and 10 days post-inoculation. Scale bar: 50 μ m. **e** SEM images of *Leptospira* biofilm formation at 1, 7, 10, 15 and 20 days post-inoculation. Red arrowheads show ECM deposit. Scale bars: 5 μ m (day 1); 10 μ m (day 7); 50 μ m (days 10 and 15); 100 μ m (day 20). **f** Quantitative phase-contrast image analysis of the number of biofilm aggregates (blue curve) and the biofilm area (red curve) over time between 12 and 216 h post-inoculation. The dotted curves represent the standard error of the mean. Insets show binarized images representative of biofilm aspect at 36, 72, 132 and 180 h post-inoculation. **g** Correlative phase contrast-CLSM image of biofilm stained with CFDA-SE. Cell tracker performed on a native non-fixed biofilm. Phase contrast image (upper left panel), 3D-reconstruction (upper right panel), XY cross-section (lower left panel) and ZY cross-section (lower right panel) are shown. Scale bar: 20 μ m.

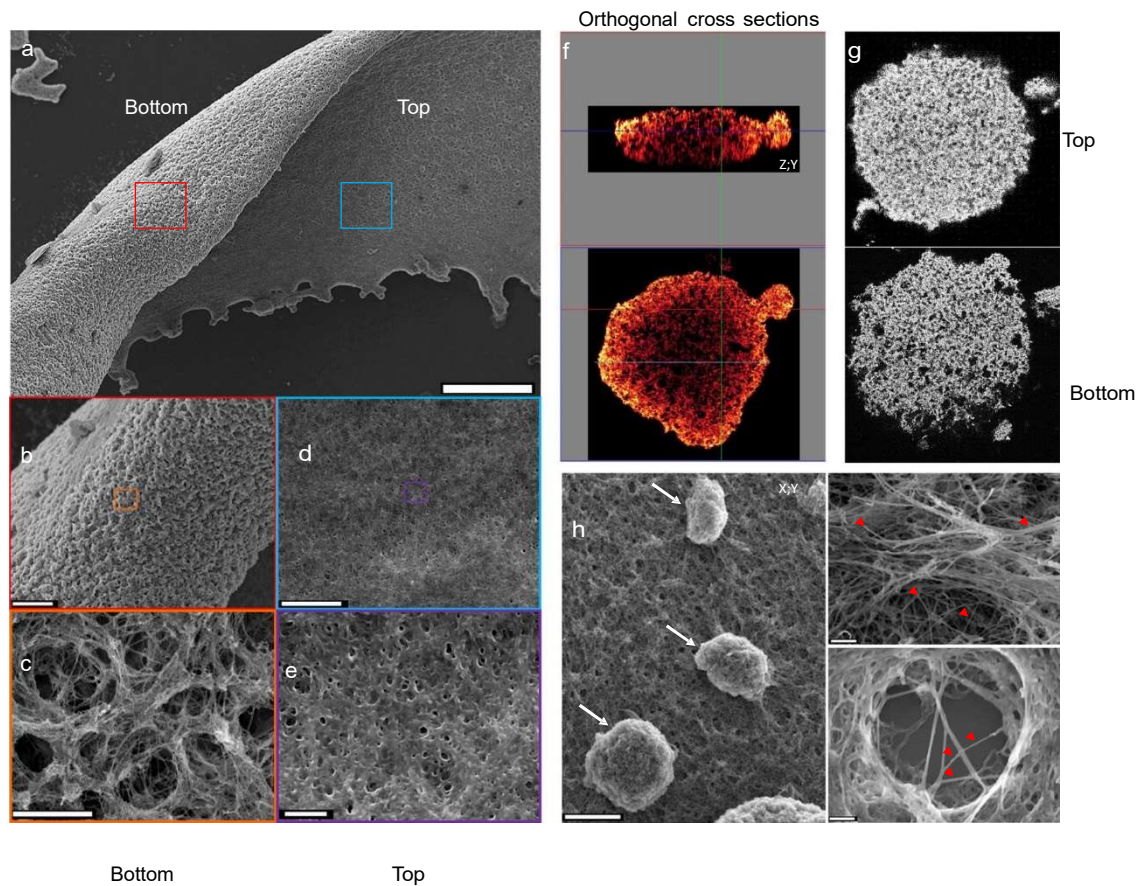


Fig. 2 *Leptospira* biofilm architecture and organization. **a** SEM images of the apical and basal sides of *Leptospira* biofilm after 3 weeks of static culture. Scale bar: 200 μm . **b**, **c** Higher magnification of the biofilm basal side showing large interconnected channels. Scale bars: 50 and 5 μm . **d**, **e** Higher magnification of the biofilm apical side showing a flat surface of bacteria enmeshed within an amorphous ECM. Scale bars: 10 and 2 μm . **f** ZY (upper panel) and XY (lower panel) orthogonal cross-sections of CLSM images of bacteria stained with CFDA/SE Green CellTracker, showing the foam-like architecture of *Leptospira* biofilm. Scale bar: 10 μm . **g** CLSM images at the top (upper panel) and the bottom (lower panel) sides of a *Leptospira* biofilm illustrating the density gradient along the baso-apical polarity axis. Scale bar: 10 μm . **h** SEM images of a mature biofilm showing budding-like structures (left panel, arrows), and branching extracellular matrix filaments (right panels, red arrowheads). Scale bars: 20 μm (left); 2 μm (upper right); 1 μm (lower right).

to the substrate (Fig. 1e, g) and were more than 50 μm thick. Our CLSM experiments systematically highlighted the presence of a void within some aggregates (Fig. 1g) formed by a particular migration of the bacteria; after spreading out, the aggregate contracted to create the void. The full sequence of events is shown in Supplementary Fig. 1D and Supplementary Movie 2.

The biofilm's architecture is highly polarized

A thorough SEM and CLSM analysis of the mature biofilm (Fig. 2) highlighted a number of characteristic structural features. The basal (substrate) side of the character had a rough texture (Fig. 2a, b), and large channels (>five μm in diameter) were visible. The spiral-shaped bacteria could be clearly seen because little or no ECM was present (Fig. 2c). Given the porous nature of the basal side of the biofilm, the entire structure was anchored to the substrate by a small contact area. In contrast, the apical (exposed) side of the biofilm was flat and smooth (Fig. 2d). High-magnification imaging revealed tiny pores (diameter < 1 μm) and bacteria enmeshed within a thick matrix. An analysis of three-dimensional sections of the mature biofilm (Fig. 2f) confirmed the porous, foam-like nature of the structure. The channels that permeated the entire biofilm were wider on the basal side than on the apical side (Fig. 2g). The mature biofilm contained striking phenotypic features, such as mushroom-like structures and branching extracellular polymeric filaments (Fig. 2h).

Extracellular DNA has a structural role in the *Leptospira* biofilm

We used fluorescent probes to assess the mature biofilm's chemical composition (Fig. 3a and Supplementary Fig. 2A). Extracellular DNA was abundant within the mature biofilm. No proteins, other than those closely associated to the bacterial body and surface were detected in the biofilm, suggesting that proteins are not the main component of the ECM. Specific wheat germ agglutinin staining of N-acetyl-d-glucosamine and N-acetylneuraminic acid confirmed that these residues were present in the matrix. Additional concanavalin A staining revealed the presence of x-mannopyranosyl and x-glucopyranosyl moieties within the matrix. We further explored the matrix's composition by using enzymatic treatments (Fig. 3b, c and Supplementary Fig. 2B). Exposure to proteinase K or alginate lyase did not dissociate the biofilm structure. Biofilm quantification after 48 h of exposure to both enzymes did not reveal any differences as compared to the untreated condition. Conversely, DNase disrupted the biofilm after 24 h, with a significant loosening of the biofilm's overall structure. This effect was reflected by an important increase in the surface area occupied by the biofilm (Fig. 3c). Sodium periodate (used to open glycosidic rings by cutting a vicinal diol's carbon-carbon bond) dissolved the biofilm in less than 3 h leading to a significant decrease of the quantified biofilm surface (Fig. 3c).

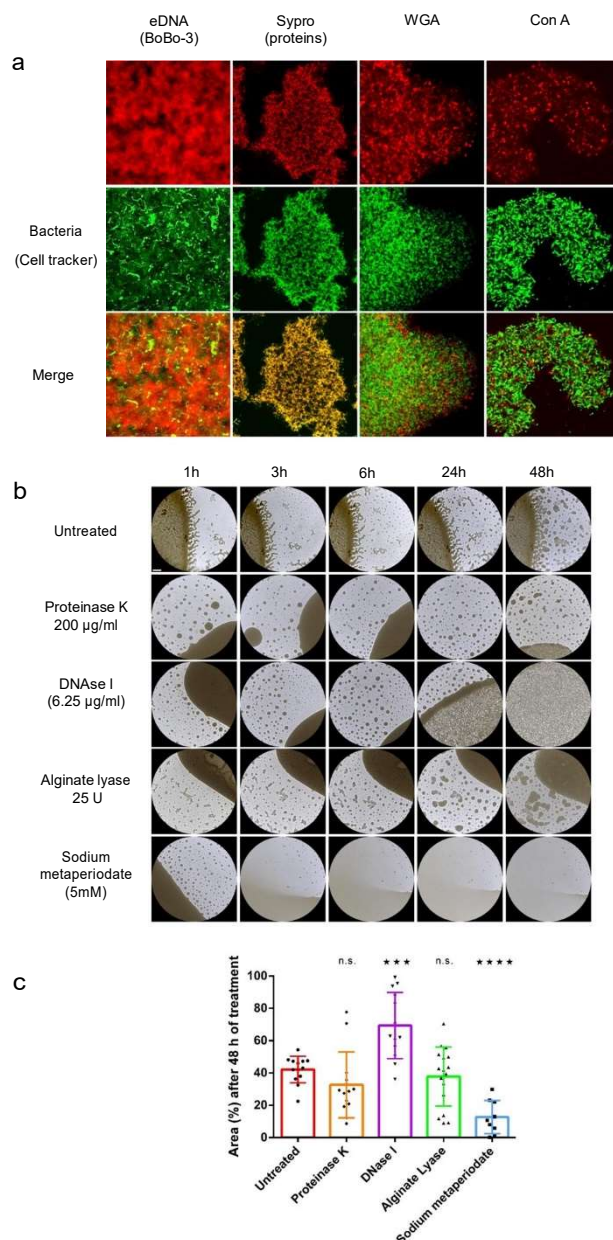


Fig. 3 Composition of the biofilm matrix. **a** CLSM micrographs of biofilms stained with BOBO-3 (exDNA, Scale bar: 10 µm), Sypro Ruby (proteins, Scale bar: 20 µm), WGA (N-acetylglucosamine or sialic acid residues, Scale bar: 10 µm) and ConA (red/α-D-glucosyl or α-D-mannosyl residues, Scale bar: 10 µm), red, upper line. Bacteria were stained with a CFDA-SE cell-tracker (green, middle line). Merged images are shown in the lower line. **b** Phase contrast images of biofilms left untreated or treated for 1, 3, 6, 24 and 48 h with proteinase K (1 µg/mL), DNase I (6.25 µg/mL), alginate lyase (125 U/mL) and sodium metaperiodate (5 mM). Scale bar: 500 µm. **c** Surface based quantification of the area occupied by the biofilm after 48 h of exposure to proteinase K (orange), DNase I (purple), Alginate Lyase (green) and sodium metaperiodate (blue). **** indicates a p value < 0.0001; *** indicates a p value < 0.001; ns indicates a non-significant p value (>0.05) in two-tailed unpaired Mann–Whitney test compared to the untreated condition. Error bars indicate standard deviation.

The intracellular level of c-di-GMP regulates biofilm production. We assessed the ability to form a biofilm in 15 L. interrogans transposon insertion mutants with gene knockouts in the c-di-GMP pathway or for surface adhesins/sugar metabolism enzymes. Based on their biofilm production phenotype, four mutants were

selected for further study (Fig. 4a–d). Three transposon insertions occurred within the c-di-GMP synthesis pathway, namely in the mutants *dgcA::Km* (LMANV2_v2_150005; GGDEF-only; DGC, c-di-GMP synthesis), *pdeA::Km* (LMANV2_v2_270021; EAL-only; PDE, c-di-GMP degradation), and *pdeB::Km* (LMANV2_v2_90001; EAL-only; PDE, c-di-GMP degradation). The fourth mutant (*akrA::Km*) carried a mutation in an aldoketoreductase-encoding gene (LMANV2_v2_50029) that is reportedly over-expressed and involved in biofilm production in *Staphylococcus aureus* and *Vibrio*

cholerae^{32,33}. After 3 weeks of culture, the proportion of biofilm surface coverage was 15.8% for *akrA::Km*, 16.0% for *dgcA::Km*, and 44.6% for the wild-type strain (Fig. 4a, b). Conversely, *pdeA::Km* and *pdeB::Km* displayed abnormally high levels of biofilm production, with surface coverages of 54.2% and 57.2%, respectively (Fig. 4c, d). The mutants' phenotypes were rescued by complementation with the WT gene. The complemented C-*akrA* and C-*dgcA* strains completely recovered their ability to produce a biofilm, with 2.9- and 2.7-fold increases in the surface coverage, respectively, (Fig. 4a, b). The C-*pdeA* and C-*pdeB* strains also changed their phenotype (Fig. 4c, d) but the proportion of biofilm surface coverage fell to a value below that of the WT parental strain, with a 4.4- and 2.3-fold decrease in biofilm production respectively. Trans-complementation may not restore gene expression to WT levels, even when a low-copy-number plasmid is used for complementation.

We assessed changes in *Leptospira*'s proliferative and motile capacities. The four mutant strains exhibited the same growth kinetics as the WT strain, and did not display any impairments in proliferation (Fig. 4e). However, we observed discrepancies in velocity (Fig. 4f and Supplementary Table 1). The velocity was significantly higher in *dgcA::Km* than in the WT. In contrast, *pdeA::Km* and *pdeB::Km* were less motile than the WT. Given that *akrA::Km* was not affected in the c-di-GMP pathway, this strain was used as a control for a c-di-GMP-independent defect in biofilm production; its velocity was similar to that of the WT. We next assessed the impact of mutations in DGCs (using the *dgcA::Km* strain) or PDEs (using *pdeA::Km* and *pdeB::Km*) on intracellular c-di-GMP concentrations (Fig. 4g and Supplementary Table 2). The level was significantly lower in *dgcA::Km* than in the WT; this was expected because the corresponding gene product is involved in c-di-GMP synthesis. A 3-fold increase was observed after complementation with the gene encoding a functional DGC. Conversely, as expected, the intracellular c-di-GMP levels were greatly elevated in *pdeA::Km* and *pdeB::Km*, since the c-di-GMP-degrading PDE enzyme has been knocked out. Complementation with the WT gene led to a drastic 11-fold decrease in intracellular c-di-GMP levels for C-*pdeA* and a 2.4-fold decrease for C-*pdeB*. In both the *akrA::Km* and C-*akrA* strains, the intracellular c-di-GMP content was similar to that of the WT strain.

Leptospira's biofilm does not promote virulence but protects against environmental stresses

We next looked at whether *Leptospira*'s ability to produce a biofilm was involved in virulence or colonization, using a hamster model of acute disease and a mouse model of chronic renal carriage. In hamsters infected with *pdeB::Km* (i.e. strain with high biofilm production but low motility), the median time to death (7.5 days) was longer than in WT infections (4 days) (Fig. 5a). The median time to death was also 4 days for the *dgcA::Km* and *akrA::Km* strains. Complementation of *pdeB::Km* with the WT gene substantially restored virulence, with a median time to death of 3.5 days.

Chronic carriage in mice was investigated by quantifying the bacterial load in urine and kidney (Fig. 5b). The bacterial loads in both urine and kidney were lower for *pdeA::Km* and *pdeB::Km* than for the WT—reflecting a lower colonization capacity. In

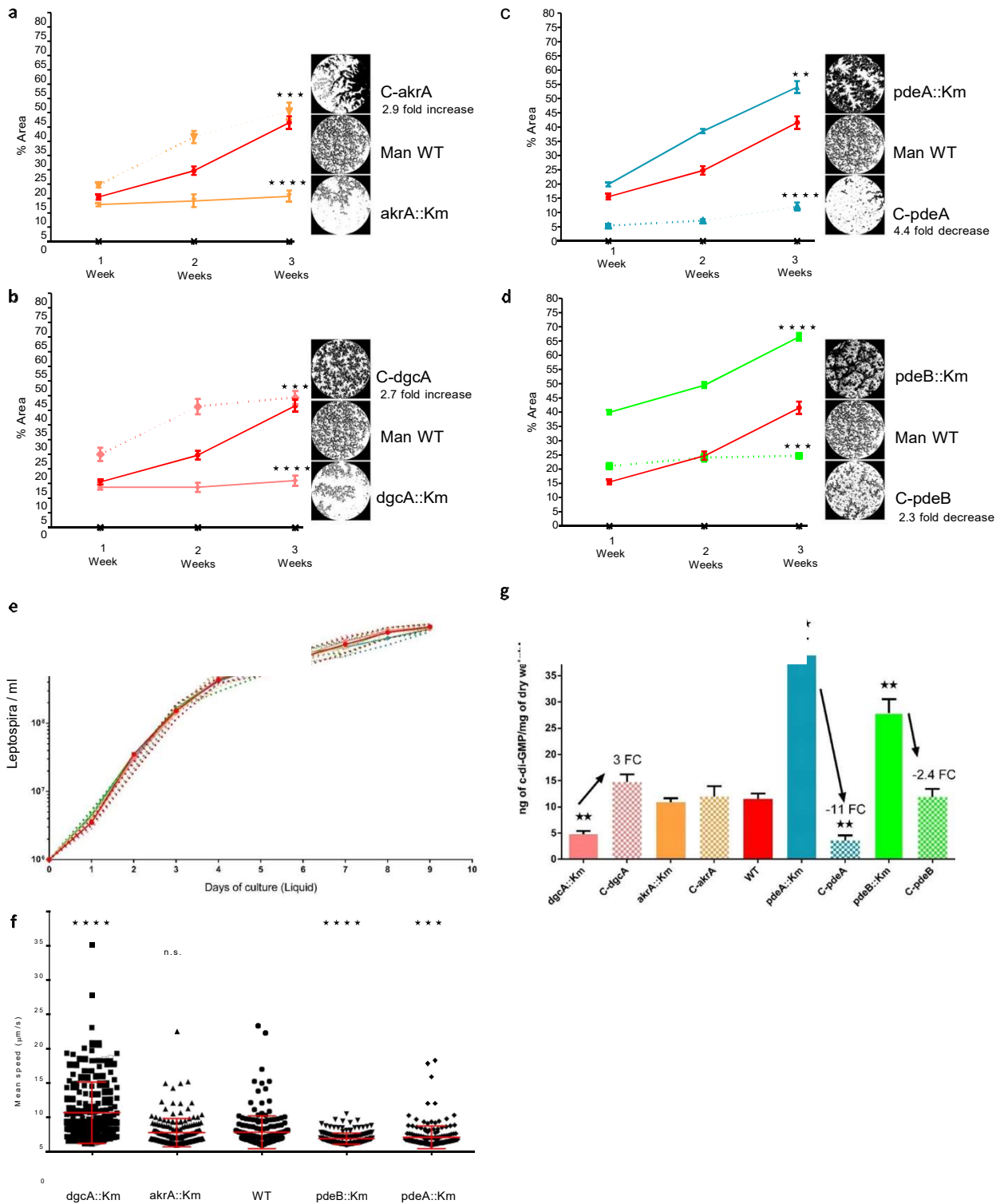


Fig. 4 C-di-GMP intracellular level regulates *Leptospira* motility and biofilm production. Mutant *akrA::Km* is shown in orange, *dgcA::Km* in pink, *pdeA::Km* in blue and *pdeB::Km* in green. Error bars represent the standard error of the mean. **a** Quantification of biofilm production at 1, 2 and 3 weeks post-inoculation for WT Manilae (red), Manilae mutants (solid line) and complemented mutants (dotted line): *C-akrA* (**a**), *C-dgcA* (**b**), *C-pdeA* (**c**), *C-pdeB* (**d**). Insets show a representative phase contrast image of the biofilm growth for the different strains. **e** Proliferation kinetics in liquid EMJH of WT and mutant strains represented as the concentration of *Leptospira* per mL over a 9-day period. **f** Mean displacement speed in $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ measured in vitro in liquid EMJH for WT and mutant Manilae strains. $n = 190$ cells per condition. **g** Quantification of intracellular c-di-GMP levels in WT, mutant and complemented mutant strains. **** indicates a p value < 0.0001 ; *** indicates a p value < 0.001 ; ** indicates a p value < 0.01 in two-tailed unpaired Mann–Whitney test compared to the WT strain.

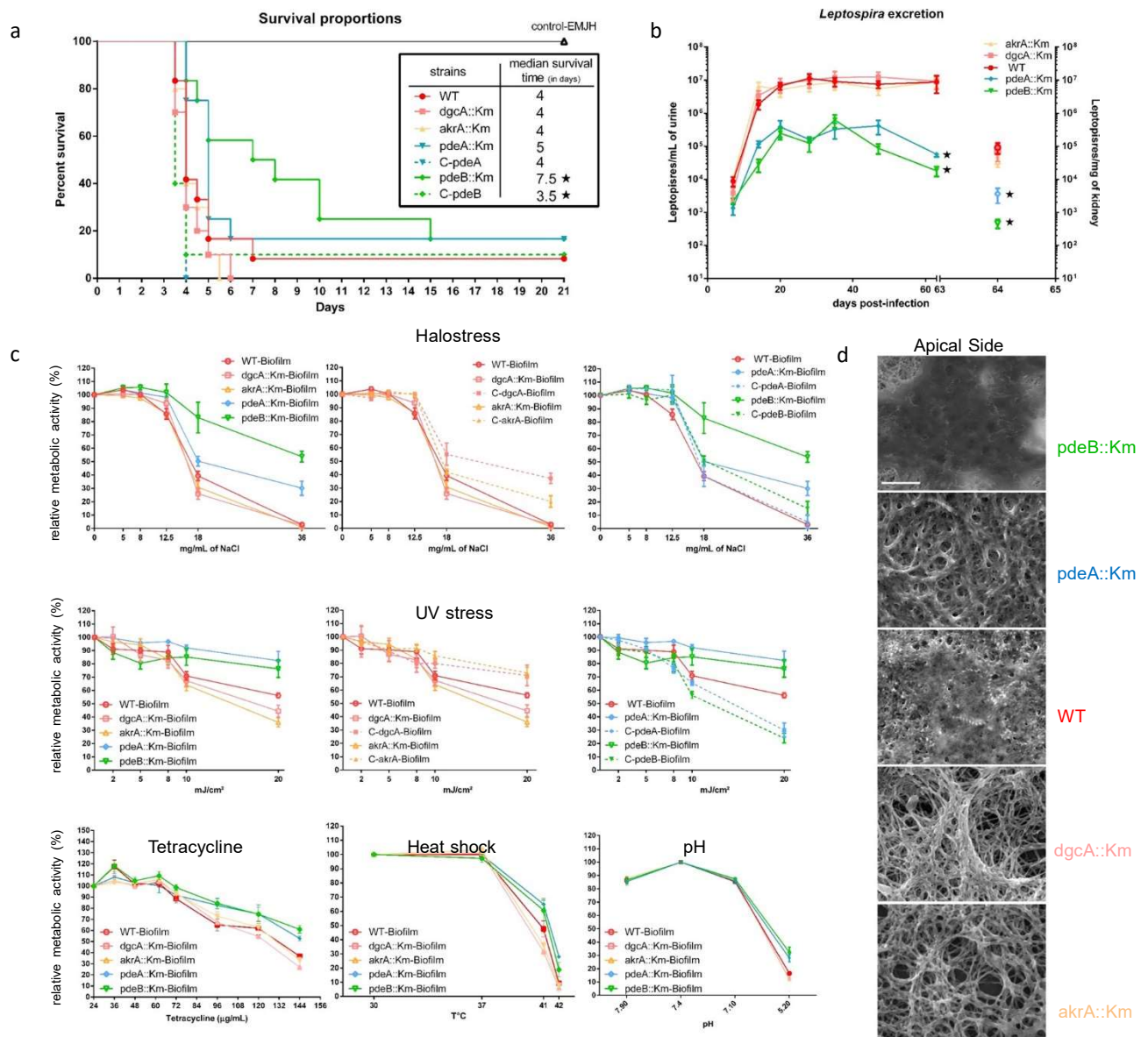


Fig. 5 *Leptospira* biofilm protects bacteria against environmental-like conditions. Solid lines represent mutant strains and dotted line complemented strains. Mutant *akrA::Km* is shown in orange, *dgcA::Km* in pink, *pdeA::Km* in blue and *pdeB::Km* in green. Control EMJH-injected hamsters are shown in black. Error bars represent the standard error of the mean. **a** Survival rate over 21 days for hamsters challenged with c-di-GMP mutants and WT strain. * Indicates a p value < 0.05 in Gehan–Breslow–Wilcoxon test. The table recapitulates the median survival time for each strain. **b** Quantification of *Leptospira* excretion over 63 days for mice challenged with c-di-GMP mutants and WT strain expressed as the number of *Leptospira* per mL of urine after challenge (plotted on the left axis). *Leptospira* kidney load in mice challenged with c-di-GMP mutants and WT strain is expressed as the number of *Leptospira* per mg of kidney at day 64 post-inoculation (plotted on the Right axis). **c** Relative metabolic activities of WT and c-di-GMP mutant biofilms under halostress, UV stress, tetracycline treatment, heat shock and exposure to various pH. Relative metabolic activities are expressed as a percentage of the metabolic activity of the untreated WT strain (Halostress, UV stress, Tetracycline) or WT strain under standard culture conditions (Heat and pH). Untreated, 3 weeks old biofilms were used as a positive control for metabolic activities (100%). The effect of simulated environmental stresses on treated biofilm were expressed in percentage of the control condition. Mean of at least five independent experiments are shown; error bars represent standard errors of the mean. **d** SEM micrograph illustrating matrix production by the different c-di-GMP mutants as compared to the WT strain. * Indicates a p value < 0.05 in two-tailed unpaired Mann–Whitney test compared to the WT strain. Scale bar: 5 μ m.

contrast, the bacterial loads for *dgcA::Km* and *akrA::Km* were similar to those observed for the WT.

We investigated the biofilm's role as a protective barrier against external stresses by exposing mature biofilms to simulated environmental stresses: elevated NaCl concentrations, ultraviolet light, the antibiotic tetracycline, heat, and acidic/basic pH conditions (Fig. 5c). The degree of protection was assessed by

measuring the metabolic activity of the bacteria contained in the biofilm after stress exposure. Our results revealed that regardless of the type of stress, the two biofilm-over-producing mutants (*pdeA::Km* and *pdeB::Km*) always displayed a higher level of cellular activity than biofilm-under-producing mutants (*dgcA::Km* and *akrA::Km*) (Fig. 5c); the WT strain was positioned between these two groups. Furthermore, we observed that biofilm-forming

bacteria were less sensitive to stress than their planktonic counterparts (Supplementary Fig. 3A). In particular, we found that biofilm-over-producing mutants survived exposure to the concentration of salt (36 mg/mL) found in sea water. Following exposure to intense UV light (20 mJ/cm²), the metabolic activity of biofilm-forming bacteria remained exceptionally high. In line with the results described above, complementation with the WT gene reverted the mutants' ability to withstand NaCl and UV exposure (Fig. 5c). Each strain's metabolic activity after NaCl or UV exposure was positively correlated with its biofilm production capacity (Supplementary Fig. 3B). Lastly, we examined the biofilm produced by these four mutants at the cellular level. Scanning electron micrographs (Fig. 5d) highlighted significant interstrain differences in ECM production. The *pdeA::Km* and *pdeB::Km* mutants were deeply enmeshed within a thick matrix that prevented individual bacteria from being seen, whereas individual bacteria could easily be seen in the ECM-poor biofilm produced by the *dgcA::Km* and *akrA::Km* mutants.

DISCUSSION

Our multidisciplinary analysis of the initial steps in biofilm formation provided detailed information on the strategies used by pathogenic *L. interrogans* to create resilient biofilms and thus protect itself against extracellular stresses. We also showed that the c-di-GMP pathway is functional in *L. interrogans* and has a pivotal role in motility and biofilm formation in this bacterium.

Firstly, we described the sequence of events that leads to the formation of a mature biofilm (Fig. 1). Furthermore, we demonstrated conclusively that the *L. interrogans* biofilms primarily contain live bacteria (Fig. 1c), and are not haphazard aggregates of sedimenting dead cells or cell debris.

We combined live and high-resolution imaging techniques to reveal differences in biofilm formation in *Leptospira*, relative to well-characterized structures produced by other bacteria¹⁵ (Fig. 1d, e, g). For example, we found that the initial steps in *Leptospira* biofilm formation result from the accretion of bacterial aggregates. Formation of these bacterial aggregates is not fully elucidated and the relative contribution of clonal growth and/or recruitment of planktonic cells in biofilm growth would deserve further studies.

The initial aggregates did not adhere firmly to the substratum and were exceptionally mobile for multicellular microbial communities. Similar observations have been made with flocs that settled on the substratum and kept moving solely based on convective currents or Brownian motion. However, leptospires are known to be fast swimmers and also able to crawl on a solid surface³⁴. This particular crawling motility could explain the movement of these multicellular aggregates and might challenge the current paradigm of a sessile biofilm attached to a surface.

We observed a number of unique organizational features. The *Leptospira* in the aggregates were able to organize with each other (Supplementary Fig. 1C and Supplementary Movie 2), which is suggestive of an efficient bacterial communication system. This particular cell migration produced a mushroom-like structure with an empty centre (Fig. 1g). Imaging of both the basal and apical sides of the mature biofilm (Fig. 2c, e) revealed a highly polarized, structurally organized biofilm. The latter's architectural features (such as interstitial voids and channels, resulting in a foam-like structure) appears well suited to the diffusion of nutrients, gases, and other metabolites³⁵ required for bacterial life (Fig. 2f, g). As seen in our SEM experiments, the *Leptospira* biofilm was massive (>1 cm long and several hundred μ m thick) after 3 weeks of culture. The interconnected channels can be likened to a microcirculatory system, and might favour further growth of the biofilm community by ensuring the influx of nutrients and oxygen and the efflux of waste products³⁶. On the exposed side of the biofilm (i.e. at the interface with the environment), the leptospires

were covered by a thick matrix, rather than the fibrous casing³⁷ or curli fibers³⁸ observed in other species. The presence of budding-like structures at the surface of the biofilm might be suggestive of a dissemination mechanism via spread of the biofilm progenitor's structures (Fig. 2h).

Our CLSM results showed that exDNA is one of the main ECM constituents of *Leptospira*'s biofilm matrix (Fig. 3a). Furthermore, the effect of DNase I treatment highlighted the exDNA's key role in maintaining a dense biofilm (Fig. 3b). In several pathogenic bacteria (such as *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, and *Pseudomonas aeruginosa*), exDNA is a major biofilm component³⁹ and autolysis is considered to be one of the sources of exDNA⁴⁰. Our results also showed that the *L. interrogans* biofilm matrix also contains extracellular polysaccharides (EPSs), although we were not able to determine the type (Supplementary File 6). Although alginate is hypothetically a constituent of the *Leptospira* biofilm^{41–43}, our use of alginate lyase did not trigger biofilm dissolution—indicating that alginate is not the main EPS constituent.

Recent work³⁰ suggested that the c-di-GMP regulatory pathway is functional in *L. interrogans*. Furthermore, the c-di-GMP pathway is known to be regulated during biofilm formation by *Leptospira biflexa*⁴³.

By studying *Leptospira* mutants with defects in c-di-GMP synthesis or degradation, we demonstrated that impaired c-di-GMP synthesis resulted in a low intracellular concentration of this metabolite (Fig. 4g). In turn, this resulted in low biofilm production (Fig. 4a) and enhanced motility (Fig. 4f). Although motility is a virulence factor in *L. interrogans*, we could not demonstrate a greater virulence in the animal models studied here (Fig. 5a). However, defects in biofilm production resulted in a lower degree of protection against simulated environmental stresses (Fig. 5c). This sensitivity was probably due to the massive relative reduction in the quantity of ECM—thought to act as a shield (Fig. 5d). Conversely, low phosphodiesterase enzymatic activity led to the intracellular accumulation of c-di-GMP (Fig. 4g), massive biofilm production (Fig. 4c, d), and low motility (Fig. 4f). In a hamster model, *pdeB::Km* showed a low level of virulence—possibly also a consequence of the loss of motility (Fig. 5a). We had expected greater biofilm production to lead to more effective colonization of the kidneys. However, chronic carriage in mice was low for the *pdeA::Km* and *pdeB::Km* mutants. The low observed urine levels did not result from greater retention of leptospires in the kidneys because the latter were less colonized than in a WT infection (Fig. 5b). This finding may be partly explained by the low levels of motility and virulence, which probably impaired the bacterium's ability to infect the host, spread in the body, and colonize the renal tubules⁴⁴. Nevertheless, both PDE mutants were extremely resistant to environmental stress (Fig. 5c), which was correlated with a thick biofilm ECM (Fig. 5d).

In conclusion, we used transposon mutants to demonstrate that DGC/PDE activities control intracellular c-di-GMP levels, which regulate motility and biofilm production in *Leptospira interrogans*. We showed that the intracellular accumulation of c-di-GMP is associated with enhanced biofilm production and greater ability to withstand environmental stresses. Once a mature biofilm has developed, it can be extremely difficult to eradicate *Leptospira*. The biofilm is a highly polarized, organized structure that successfully provides life-compatible conditions—notably due to the protective ECM layer and a complex network of voids for nutrient and gas exchanges. This is particularly true for saprophytic species, whose biofilm production is correlated with the ability to persist in the environment. Indeed, *in vitro* biofilm production is mostly prominent for *Leptospira* species in the saprophyte subclade S1 (Supplementary Fig. 3C). This is very interesting from an ecological viewpoint, since these species are fully adapted to an exclusively environmental lifestyle. In addition, environmental conditions such as low temperature, low glucose and nutrients, and oxidative stress are known to maximally induce

biofilm formation genes as compared to host-associated conditions⁴⁵. Of note, the optimum temperature of *Leptospira* is 30 °C rather than 37 °C like most pathogenic bacteria. The fact that multimicrobial environmental biofilms can spontaneously harbour *Leptospira* (including pathogenic species) *in situ*⁹ may explain why viable, virulent *Leptospira* can be found after prolonged periods of time in the environment⁴.

Lastly, by regulating biofilm formation, c-di-GMP signalling can also influence *Leptospira*'s ability to resist a wide variety of stresses. Manipulating and subverting c-di-GMP signalling might compromise biofilm formation, antimicrobial tolerance, and *Leptospira*'s persistence—thus opening up perspectives for the control of leptospirosis^{46,47}.

METHODS

Bacterial strains, culture conditions and transposon mutagenesis
Leptospira strains used in this study, including *Leptospira interrogans* serogroup Pyrogenes serovar Manilae strain L495 designated in this study as the wild type (WT) or parental strain, are listed in Supplementary Table 3 and were cultivated in Ellinghausen and McCullough as modified by Johnson and Harris (EMJH^{48,49}) growth medium at 30 °C under static conditions. For virulent strains, cultures were regularly passaged into hamsters and used until a maximum of five *in vitro* passages. Mutants *dgca::Km* (LMANV2_v2_150005 || Frame -2 || Begin: 1223263 || End: 1224255 || Length:993), *akrA::Km* (LMANV2_v2_50029 || Frame +3 || Begin: 242451 || End: 243287 || Length:837), *pdeA::Km* (LMANV2_v2_270021 || Frame +1 || Begin: 2272684 || End: 2274402 || Length:1719) and *pdeB::Km* (LMANV2_v2_90001 || Frame -2 || Begin: 631792 || End: 633144 || Length: 1353) were generated from the parental strain *L. interrogans* serovar Manilae strain L495 by transposon mutagenesis as described previously^{50,51} (Supplementary Fig. 4A) and grown under the same conditions. Transposon insertion was confirmed by PCR using primers flanking the insertion sites (Supplementary Fig. 4B). Complementation was performed as described previously by cloning genes into the spectinomycin resistant pMaORI plasmid to reintroduce the functional gene under the control of its native promoter⁵². Similarly, an empty pMaORI plasmid was also introduced into the mutants as a control (Supplementary Table 3). Complemented mutants were cultivated under selection pressure (50 µg/mL of Spectinomycin).

Biofilm formation

Bacterial strains were grown to exponential phase and counted using a Petroff-Hausser cell-counting chamber (Hausser Scientific Company, Horsham, PA, USA) under dark-field microscopy. Cultures were diluted in EMJH to a final concentration of 1×10^6 bacteria mL⁻¹. Under sterile conditions, 150 µL of diluted cultures were dispensed into the wells of a 96-well microtiter polystyrene plate (flat bottom, with low evaporation lid, Nest Biotechnology). As border effect is known to occur, the peripheral wells of the plate were not used, but instead filled with sterile water to minimize evaporation. For quantitative assays, 18 replicate wells were used for each strain. Microtiter plates were then incubated at 30 °C for 3 weeks under static conditions without changing the culture medium.

Crystal Violet (CV) staining and quantification

After 3 weeks of static incubation, planktonic cells were removed by gently pipetting the supernatant. The biofilm was gently rinsed with 200 µL of PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, and 2 mM KH₂PO₄) at room temperature. Fixation was performed by incubation with 150 µL of 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS at room temperature for 30 min. Fixative buffer was then removed and biofilm was rinsed two times with 200 µL of PBS prior to staining with 175 µL of 0.1% CV solution. After 10 min of incubation, the CV solution was removed. Biofilms were rinsed two times with 200 µL PBS and dried overnight. The stain was then released with 200 µL of destaining solution [50% (vol/vol) ethanol, 50% (vol/vol) glacial acetic acid]. The amount of stain released was quantified by measuring the absorbance at 570 nm with a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific). Alternatively, phase contrast images of stained biofilms were captured using an upright Leica DM4000 B microscope (Leica microsystems, Mannheim, Germany).

Quantification of biofilm formation by image analysis

Biofilm quantification was performed from phase contrast images using the ImageJ software⁵³ (<https://fiji.sc/>). Phase contrast images of the growing biofilm were acquired using an upright Leica DM4000 B microscope equipped with a 5X lens (HCX PL FLUOTAR 5×/0.15, 12 mm working distance). Pictures of six replicate wells per independent experiment were acquired and further analysed. Prior to quantification, the outer part of the image affected by spherical aberrations and field curvature artefacts was cropped. The 2D grayscale image was then binarized and analysed using the "Analyse Particles" function. The biofilm score was then expressed as a percentage of surface occupied by the biofilm. Alternatively, we quantified biofilm growth by CV solubilisation and absorbance measurement at 600 nm using a spectrophotometer (Multiskan FC, Thermo Scientific). Both methods captured correctly the increase of biofilm formation over time (Supplementary Fig. 5). In this study surface-based method was chosen for its better measurement accuracy and the advantage of limiting sample handling, thereby reducing erroneous quantification.

Time-lapse imaging

Time-lapse imaging of growing biofilm was acquired using the BioStation IM-Q Inverted Microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Five hundred µL of a bacterial suspension at 10^6 bacteria mL⁻¹ were inoculated into a 35-mm glass bottom Hi-Q4 dish (Ibidi, Martinsried, Germany). Glass bottom Hi-Q4 dish incorporate a plane parallel top plate, preventing light path distortion by the meniscus, therefore enabling high-quality phase contrast observations. Time-lapse imaging started 12 h after seeding under static condition at 30 °C and 95% of humidity. Phase contrast images were acquired every 30 min over a period of 9 days using a 20X objective (field of view: 413*311 µm).

Confocal laser scanning microscopy

Biofilms were prepared as described in the Biofilm Formation section except inoculation performed in µ-dish 35 mm (Ibidi, Martinsried, Germany). Biofilms were fixed in 4% PFA/PBS solution for 30 min or stained using the LIVE-DEAD Biofilm Viability Kit (Invitrogen™), wheat-germ agglutinin (WGA, 10 µg/mL) conjugated to Fluorescein (Invitrogen™), Concanavalin A (Con A, 10 µg/mL) conjugated to Fluorescein (Invitrogen™), BOBO-3 (3 nM, Invitrogen™), or the FilmTracer SYPRO Ruby Biofilm Matrix Stain (Invitrogen™), as described by the manufacturer's instructions. Staining with the Vybrant™ CFDA/SE Green Cell Tracer (10 µM, Thermo-Fisher Scientific) was performed prior to fixation. According to the manufacturer, WGA binds N-acetyl-d-glucosamine and N-acetylneuraminic acid residues, Con A selectively binds to x-mannopyranosyl and x-glucopyranosyl residues, BOBO-3 is a cell-impermeable DNA stain, and SYPRO Ruby stain labels most classes of proteins. The stained biofilms were visualized using an inverted SP8 confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). A super continuum white light laser tuneable between 470 and 670 nm was used for excitation and focused through a HC PL APO CS2 63×(N.A 1.4) oil immersion lens. Emission signals were captured by hybrid detectors. The system was controlled by Leica Application Suite X (LAS) software. 3D images were directly processed using LAS X, 3D module software.

Scanning electron microscopy

Leptospira strains were cultured as described in the biofilm formation section with minor modifications. Inoculation was performed by adding one mL of diluted culture in a 24-well plate (flat bottom, with low evaporation lid, Corning) each well containing a sterile 12 mm Glass coverslips (12 × 12 mm, Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). The supernatant was removed and biofilm was rinsed once in PBS, then fixed in 4% PFA / 1% glutaraldehyde for 15 min. Coverslips were rinsed again in PBS and stained with 1% osmium tetroxide (OsO₄ in PBS, Acros Organics) for 1 h. After staining, samples were dehydrated through a series of ethanol concentrations (25, 50, 70, 90, and 100% for 10 min each) before being desiccated using hexamethyldisilazane (HMDS, Acros Organics). HMDS drying is a reliable alternative to critical point drying in the preparation of the samples with no differences in term of distortion and shrinkage between the two methods regarding cellular ultrastructure⁵⁴. Before visualization, samples were submitted to carbon sputtering to increase their electrical conductance (Em ACE600, Carbon Coater, Leica

Microsystems, Mannheim, Germany) and examined under a Jeol JSM IT-300 IntouchScope microscope (SED detector, 10 kV, Jeol LTD, Tokyo, Japan).

Dissociation of biofilms by chemical or enzymatic treatments

WT biofilms were grown as described in the Biofilm Formation section, and after 21 days of incubation, twenty μL of DNase I (6.25–500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 ; 10104159001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 20 μL of proteinase K (6.25–500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl_2 ; 05323738001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 20 μL of alginate lyase (1–200 U in 20 mM Tris, 200 mM NaCl; A-1603-100MG, Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) and 20 μL of sodium periodate (1–100 mM in 50 mM sodium acetate; S1878-25G, Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) were added directly to the biofilms. Control wells were treated with 20 μL of the corresponding buffer only. Wells were incubated at 30 °C for 48 h. Phase contrast images of adherent biofilms were captured with an upright Leica DM4000 B microscope (5X objective HCX PL FLUOTAR 5x/0.15,) using a DFC450 digital CCD camera (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

C-di-GMP extraction and quantification

Forty mL of a 10^8 bacteria mL^{-1} suspension were inoculated into a 50 mL culture flask (Falcon) during 21 days at 30 °C under static conditions. Twenty mL were used for c-di-GMP extraction and 20 mL were used for normalization. Bacterial suspensions were centrifuged at $2500 \times g$ for 20 min at 4 °C. For c-di-GMP extraction, bacterial pellets were re-suspended in 300 μL of ice-cold extraction solution (acetonitrile/methanol/water; 2/2/1; v/v/v) for 15 min on ice prior to heat extraction at 95 °C during 10 min. After cooling, the suspension was centrifuged at $20,000 \times g$ for 10 min at 4 °C in order to separate insoluble material from the extracted nucleotides. The extraction procedure was repeated twice. The supernatant was collected and then evaporated until dryness at 30 °C using a Speed Vac (Concentrator plus, Eppendorf). The pellet was re-suspended in 200 μL of water using vigorous vortexing and then analysed by liquid chromatography (Series 200, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) coupled with an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (Concord, Ontario, Canada) as described elsewhere⁵⁵.

Growth rate measurements

Mutants, complemented and WT strains were counted using a Petroff-Hausser counting chamber under dark-field microscopy. Five mL of EMJH inoculated at 1.10^6 bacteria mL^{-1} of each strain were cultured over a 9-day period under static conditions. Growth was monitored at 30 °C by counting bacteria every day using a Petroff-Hausser counting chamber. Growth experiments were performed three times on different days and using independent cultures.

Bacterial speed displacement quantification

Bacterial strains were grown to exponential phase and 10 μL of bacterial suspension adjusted at 10^6 bacteria mL^{-1} were prepared for dark-field contrast microscopy using a #1.5H square coverslip. Motility was assessed in liquid medium by video microscopy using a BX53 Olympus microscope (Olympus Corporation, Nishi-Shinjuku, Tokyo, Japan) equipped with a Hamamatsu 2.8 Orca flash camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). For each strain, three experiments were performed on different days and using independent cultures. In total, 190 bacteria per strain were recorded over 60 s. Trajectory analysis and speed displacement were calculated using Olympus CellSens Dimension imaging software.

Animal infection and quantification of bacterial burden

1.10^8 leptospires in EMJH were inoculated intraperitoneally into 7–8-week-old golden Syrian hamsters (males and females) and 8-week-old Oncins-France 1 (OF-1, outbred) mice (males and females) whose progenitors originated from Charles River Laboratories. Hamsters were monitored twice daily for 21 days and subsequently euthanized by carbon dioxide inhalation. During follow-up, hamsters displaying poor or no reaction upon stimulation were humanely euthanized and considered dead. Kidneys were collected from animals sacrificed at day 21. Mice were monitored during 63 days and urine was collected at days 7, 14, 21, 28, 35, 47, 63 after infection. At day 64 mice were euthanized by carbon dioxide inhalation and kidneys were collected. DNA was extracted from urine (50 μL) and

kidney (25 mg) and analysed by a quantitative PCR targeting the conserved regions of the 16S rRNA gene⁵⁶. A PCR targeting the pMaORI plasmid was performed at the end of the 63 days of infection to ensure that complemented mutants were still carrying the complementation plasmid (primers pMaORI-1F, 5'-TCG-ATT-GGT-GTA-GTC-GGT-T-3'; pMaORI-1R, 5'-GCA-GCC-ATT-CAA-TTT-CTT-GAG-TTA-3'). Four experiments (12 animals) per condition were performed on different days and using independent bacterial cultures. Animal experiments were conducted according to the guidelines laid out by the Animal Care and Use Committee of the Institut Pasteur of Paris and of New Caledonia, and European Recommendation 2007/526/EC. Protocols and experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the Institut Pasteur of New Caledonia.

Susceptibility assay

Leptospira strains were cultured as described in the biofilm formation section. For each strain tested, six out of eighteen wells were vigorously resuspended by pipetting to mechanically disrupt the biofilm, in order to put the bacteria back in suspension. These wells were used to compare biofilm with planktonic cells with a similar metabolic status after three weeks of culture. Environmental-like stress was applied: NaCl (0, 5, 8, 12.5, 18 and 36 mg/mL); UV light (0, 2, 5, 8, 10, 20 mJ/cm²); tetracycline (24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 $\mu\text{g}/\text{mL}$); temperature (30, 37, 41, 42 °C) and pH (5.2, 7.1, 7.4, 7.9). After 24 h of stress exposure, 30 μL of resazurin solution (AlamarBlue Cell Viability Reagent, Life Technologies SAS) was added to each well, and the plates were incubated for 48 h at 30 °C. The chromogenic shift was measured by absorbance at 570 nm/620 nm with a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific). Negative controls without bacteria were included. Relative metabolic activity was calculated as recommended by the manufacturer and expressed in percentage. Experiments were repeated at least 4 times.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). The statistical tests used and P values are indicated within the text and figure legends. All experiments were performed a minimum of three times on separate days in duplicate or more.

Reporting summary

Further information on experimental design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 2 March 2020; Accepted: 14 May 2020;

Published online: 12 June 2020

REFERENCES

- Bharti, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3, 757–771 (2003).
- Costa, F. et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003898 (2015).
- Adler, B. & de la Pena Motezuma, A. Leptospira and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296 (2009).
- Thibeaux, R. et al. Seeking the environmental source of leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005414 (2017).
- Andre-Fontaine, G., Aviat, F. & Thorin, C. Waterborne leptospirosis: survival and preservation of the virulence of pathogenic leptospira spp. in fresh water. *Curr. Microbiol.* 71, 136–142 (2015).
- Goarant, C. et al. in *Global Water Pathogen Project* (eds. Rose, J. B. & Jiménez-Cisneros, B.) (Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO, 2019).
- Ristow, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* 154, 1309–1317 (2008).
- Brihuega, B., Samartino, L., Auteri, C., Venzano, A. & Caimi, K. In vivo cell aggregations of a recent swine biofilm-forming isolate of Leptospira interrogans strain from Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 44, 138–143 (2012).

9. Vinod Kumar, K., Lall, C., Raj, R. V., Vedhagiri, K. & Vijayachari, P. Molecular detection of pathogenic leptospiral protein encoding gene (lipL32) in environmental aquatic biofilms. *Lett. Appl Microbiol.* 62, 311–315 (2016).
10. Singh, R. et al. Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Appl Environ. Microbiol.* 69, 3412–3420 (2003).
11. Huang, K., Zhang, X. X., Shi, P., Wu, B. & Ren, H. A comprehensive insight into bacterial virulence in drinking water using 454 pyrosequencing and Illumina high-throughput sequencing. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 109, 15–21 (2014).
12. Monahan, A., Callanan, J. & Nally, J. Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet. Pathol.* 46, 792–799 (2009).
13. Sterling, C. R. & Thiermann, A. B. Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: an ultrastructural investigation. *Vet. Pathol.* 18, 628–637 (1981).
14. Werts, C. Interaction of *Leptospira* with the innate immune system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 415, 163–187 (2018).
15. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108 (2004).
16. Le Magre-Debar, E., Lemoine, J., Gelle, M. P., Jacquelin, L. F. & Choisy, C. Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 239–243 (2000).
17. McNeill, K. & Hamilton, I. R. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 25–30 (2003).
18. Espeland, E. M. & Wetzel, R. G. Complexation, stabilization, and UV photolysis of extracellular and surface-bound glucosidase and alkaline phosphatase: implications for biofilm microbiota. *Micro. Ecol.* 42, 572–585 (2001).
19. Stewart, P. S. & Costerton, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135–138 (2001).
20. Teitzel, G. M. & Parsek, M. R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ. Microbiol.* 69, 2313–2320 (2003).
21. Flemming, H. C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633 (2010).
22. Hengge, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 263–273 (2009).
23. Boyd, C. D. & O'Toole, G. A. Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 439–462 (2012).
24. Jenal, U., Reinders, A. & Lori, C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 271–284 (2017).
25. Ryjenkov, D. A., Tarutina, M., Moskvina, O. V. & Gomelsky, M. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J. Bacteriol.* 187, 1792–1798 (2005).
26. Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A. & Gomelsky, M. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol.* 187, 4774–4781 (2005).
27. Romling, U., Galperin, M. Y. & Gomelsky, M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 1–52 (2013).
28. Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. & Romling, U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.* 53, 1123–1134 (2004).
29. da Costa Vasconcelos, F. N. et al. Structural and enzymatic characterization of a cAMP-dependent diguanylate cyclase from pathogenic *Leptospira* species. *J. Mol. Biol.* 429, 2337–2352 (2017).
30. Xiao, G. et al. Identification and characterization of c-di-GMP metabolic enzymes of *Leptospira interrogans* and c-di-GMP fluctuations after thermal shift and infection. *Front Microbiol.* 9, 764 (2018).
31. Seshasayee, A. S., Fraser, G. M. & Luscombe, N. M. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res.* 38, 5970–5981 (2010).
32. Beenken, K. E. et al. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* 186, 4665–4684 (2004).
33. Mueller, R. S. et al. *Vibrio cholerae* strains possess multiple strategies for abiotic and biotic surface colonization. *J. Bacteriol.* 189, 5348–5360 (2007).
34. Tahara, H. et al. The mechanism of two-phase motility in the spirochete *Leptospira*: Swimming and crawling. *Sci. Adv.* 4, eaar7975 (2018).
35. Stewart, P. S. Diffusion in biofilms. *J. Bacteriol.* 185, 1485–1491 (2003).
36. Berlanga, M. & Guerrero, R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Micro. Cell Fact.* 15, 165 (2016).
37. Hung, C. et al. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *MBio* 4, e00645–13 (2013).
38. Erskine, E., MacPhee, C. E. & Stanley-Wall, N. R. Functional amyloid and other protein fibers in the biofilm matrix. *J. Mol. Biol.* 430, 3642–3656 (2018).
39. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487 (2002).
40. Montanaro, L. et al. Extracellular DNA in biofilms. *Int. J. Artif. Organs* 34, 824–831 (2011).
41. Picardeau, M. et al. The gapone sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 3, e1607 (2008).
42. Grassmann, A. A. et al. Discovery of novel leptospirosis vaccine candidates using reverse and structural vaccinology. *Front Immunol.* 8, 463 (2017).
43. Iraola, G. et al. Transcriptome sequencing reveals wide expression reprogramming of basal and unknown genes in *Leptospira biflexa* biofilms. *mSphere* 1, e00042–16 (2016).
44. Ratet, G. et al. Live imaging of bioluminescent *Leptospira interrogans* in mice reveals renal colonization as a stealth escape from the blood defenses and antibiotics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3359 (2014).
45. Hufnagel, D. A., Depas, W. H. & Chapman, M. R. The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiol. Spectr.* 3, 249–267 (2015).
46. Opoku-Temeng, C., Zhou, J., Zheng, Y., Su, J. & Sintim, H. O. Cyclic dinucleotide (c-di-GMP, c-di-AMP, and cGAMP) signalings have come of age to be inhibited by small molecules. *Chem. Commun. (Camb.)* 52, 9327–9342 (2016).
47. Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P. & Hall-Stoodley, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 740–755 (2017).
48. Johnson, R. C. & Rogers, P. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. *J. Bacteriol.* 88, 1618–1623 (1964).
49. Ellinghausen, H. C. Jr. & McCullough, W. G. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.* 26, 45–51 (1965).
50. Bourhy, P., Louvel, H., Saint Girons, I. & Picardeau, M. Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. *J. Bacteriol.* 187, 3255–3258 (2005).
51. Murray, G. L. et al. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect. Immun.* 77, 810–816 (2009).
52. Pappas, C. J., Benaroudj, N. & Picardeau, M. A replicative plasmid vector allows efficient complementation of pathogenic *Leptospira* strains. *Appl Environ. Microbiol.* 81, 3176–3181 (2015).
53. Schindelin, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682 (2012).
54. Braet, F., De Zanger, R. & Wisse, E. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. *J. Microsc.* 186, 84–87 (1997).
55. Burhenne, H. & Kaever, V. Quantification of cyclic dinucleotides by reversed-phase LC-MS/MS. *Methods Mol. Biol.* 1016, 27–37 (2013).
56. Merien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G. & Saint Girons, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2219–2224 (1992).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Johann Peltier, Nadia Benaroudj, Robert Antony Gaultney, Linda Guentas, Arnaud Tarantola and Catherine Inizan for technical assistance and critical discussions. The authors are indebted to Professor Jean-Marc Ghigo for critical discussions and support at the start of this project. We thank Julien Colot and the Laboratoire de Biologie Médicale at Centre Hospitalier Territorial Gaston Bourret for granting access to their MALDI-TOF facilities. We also thank the CRESICA consortium for granting access to the electron microscopy facilities. This work was funded by a postdoctoral fellowship awarded by the AXA Research Fund (reference: 15-AXA-PDOC-037). Lastly, we thank the UTechS Photonic Bioimaging facility (Imagopole, C2RT, Institut Pasteur) funded by the French National Research Agency (France Bioimaging; ANR-10-INSB-04; Investments for the Future programme).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.T., C.G. and M.P. designed the project. R.T. performed and analysed most of the experiments. E.B. and D.G. assisted with the biofilm experiments. M.E.S.G. and M.K. performed the animal infection and quantification of bacterial burden. H.B. performed the c-di-GMP quantification. J.F. assisted with fluorescent microscopy analysis. A.D. performed the scanning electron microscopy analysis. N.E. and J.V. performed the MALDI-TOF analysis. C.G., R.T. and M.P. wrote the paper. M.P. and C.G. supervised the study and edited the paper. All authors reviewed and approved the paper.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0134-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to R.T. or C.G.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give

appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Annexe IX

Bierque, E., Tramier, C., Genthon, P., Girault, D., Gunkel-Grillon, P., Juillot, F., Laporte-Magoni, C., Lemestre, M., Soupé-Gilbert, M.E., Thibeaux, R., Goarant, C. (2020). "ASSURPLUHYT (volet 1) Aspects sanitaires des eaux de surface : une approche pluridisciplinaire de la contamination hydrique par la leptospirose sur un site pilote à Touho". F. Cayrol et C. Tatin (editeurs), Au fil de l'eau, Nouméa 2019, Workshop des 17 et 18 septembre, p17-18, Presses universitaires de Nouvelle-Calédonie.

ASSURPLUHYT (volet 1)

Aspects sanitaires des eaux de surface : une approche pluridisciplinaire de la contamination hydrique par la leptospirose sur un site pilote à Touho



Programmation du préleveur automatique sur une des parcelles d'étude à Touho — © C. Goarant/IPNC

La leptospirose est une zoonose (maladie commune à l'homme et certains animaux) d'origine bactérienne sévère de répartition mondiale. Responsable de plus d'un million de cas et près de 60 000 morts chaque année, elle affecte tout particulièrement les populations rurales d'Océanie, continent où son incidence est la plus élevée au monde. La contamination, saisonnière et liée aux fortes pluies, se fait au contact de sols ou d'eaux contaminés.

En dépit de cette exposition élevée de la population et de la sévérité potentielle de la maladie dont les leptospires pathogènes sont responsables, le mode de vie et les mécanismes de survie dans l'environnement de ces bactéries sont mal connus. Le projet ASSURPLUHYT (2018-2020) vise à combler ces lacunes en décrivant l'habitat et les préférences écologiques des leptospires pathogènes et les modalités de leur mise en suspension dans les eaux lors des pluies.

En Nouvelle-Calédonie, 15 à 200 cas sont identifiés par an et la maladie est responsable de décès chaque année (entre 1 et 18 par an depuis 1997). De meilleures connaissances de la survie des leptospires dans l'environnement et de la durée de leur présence dans les eaux lors des pluies permettront d'améliorer la prévention.

Approche, méthode et compétences mobilisées

Le projet mobilise des compétences en microbiologie, hydrologie, hydrochimie et géochimie de l'IPNC, l'IRD et l'UNC. L'approche choisie combine des observations,

des prélèvements de terrain et des études en laboratoire. Elle se décompose en deux volets visant à :

- identifier et caractériser les sols favorables à la survie des leptospires ;
- quantifier la présence de leptospires dans l'eau pendant et après les crues.

Terrain(s) d'étude

Les terrains d'étude tiennent compte de ces deux volets. Du fait de la rareté des eaux de surface et de la maladie aux îles Loyautés, les échantillons de sols ont été prélevés uniquement sur la Grande Terre. Ces sols ont été sélectionnés de manière à représenter la diversité pédologique de l'île.

Touho a été choisi pour y mener la recherche hydrologique car la leptospirose y a une forte incidence. Le site d'étude est le bassin versant de la Thiem, initialement aménagé pour des études hydrologiques dans le cadre d'un projet régional « Restauration des Services Écosystémiques et Adaptation au Changement Climatique », RESCCUE (2014-2019), et dont les équipements ont été renforcés par la province Nord et le CRESICA. Ce projet a été financé par l'Agence française de développement (8,5 millions d'euros) et il associe la Polynésie française, Fidji, Vanuatu et la Nouvelle-Calédonie.

Trois parcelles de surfaces et de pentes comparables, représentant des couverts végétaux contrastés, sont aujourd'hui étudiées : savane à niaoulis, forêt impactée par les cerfs et les cochons sauvages et forêt mise en



Préleveur automatique en position à la sortie d'une des parcelles d'étude à Touho — © C. Goarant/IPNC

défens. L'objectif du projet est d'étudier l'hypothèse d'une persistance des leptospires dans les sols, et de leur mobilisation par les eaux de ruissellement lors des épisodes pluvieux.

Premiers résultats

Des travaux récents publiés par l'IPNC en amont du projet confirment que les sols constituent l'habitat originel des leptospires, supportant l'hypothèse d'ASSurPluHyT. En ce qui concerne le projet lui-même, un total de 37 sols représentatifs des différents types pédologiques existant sur la Grande Terre ont été prélevés puis analysés par le Laboratoire des Moyens Analytiques de l'IRD (LAMA). Des leptospires du groupe des espèces pathogènes ont été mis en évidence par qPCR sur 8 de ces 37 sols (21,6 %). Des solutions de ces sols ont été préparées, puis analysées (toujours par le LAMA) et utilisées pour évaluer leur capacité à permettre la survie des leptospires. Les leptospires montrent en effet des durées de survie contrastées dans ces solutions de sols, qui ne peuvent cependant pas être expliquées aujourd'hui par les paramètres dosés ou mesurés. D'autres hypothèses sont envisagées et d'autres mesures sont effectuées.

Les prélèvements d'eau réalisés en sortie de parcelle confirment la présence de leptospires dans les eaux de ruissellement lors des fortes pluies. Néanmoins, une quantification précise n'a pas été possible et nous avons montré en laboratoire que la conservation des échantillons dans le préleveur (inévitables du fait des



Microcosmes pour l'étude de la survie de *Leptospira interrogans* dans des solutions — © C. Goarant/IPNC

difficultés d'accès lors de fortes pluies) s'accompagne d'une baisse rapide de la concentration en leptospires. Différentes solutions sont envisagées permettant une meilleure conservation des échantillons, qui consisteraient à placer le préleveur à un endroit plus accessible ou à mettre au point une méthode permettant d'y bloquer la dégradation des ADN bactériens.



Microcosmes pour l'étude de la survie de *Leptospira interrogans* dans des sols — © C. Goarant/IPNC

Perspectives

Des analyses en métagénomique sont en cours à partir des ADN des sols et seront interprétées dans les prochains mois. Les études en microcosmes seront achevées. Dans le même temps, de nouvelles hypothèses à même d'expliquer les différences de survie des leptospires pathogènes dans les solutions de sols ont été proposées et seront testées. Une solution consistant à bloquer la dégradation des ADN bactériens dans le préleveur pour s'adapter au délai de collecte des échantillons du préleveur automatique sera elle aussi testée. En parallèle, l'IRD propose de mettre à disposition un second préleveur, qui sera installé sur un petit cours d'eau en aval de la parcelle équipée.

Un projet nommé SpiRAL (*Soils, Rainfall and Leptospirosis*), associant les partenaires d'ASSurPluHyT et d'autres collaborateurs (modélisatrice de l'UNC, mais aussi microbiologistes de l'Institut Pasteur à Paris), a été retenu pour un financement ANR pour la période 2020-2023.

Emilie Bierque (IPNC), Caroline Tramier (IRD), Pierre Genthon (IRD), Dominique Girault (IPNC), Peggy Gunkel-Grillon (UNC), Farid Juillot (IRD), Christine Laporte-Magoni (UNC), Monika Le Mestre (UNC), Marie-Estelle Soupé-Gilbert (IPNC), Roman Thiébaux (IPNC), Cyrille Goarant (IPNC)