

# Restitution stage 2025

**4 pages maximum, police 11 Aptos.**

Le Défi Clé Water Occitanie (WOc) est un programme financé par la Région Occitanie et porté par l'Université de Montpellier. Le réseau de recherche du Défi Clé WOc est le résultat d'une entente entre le Centre International UNESCO de l'Eau ICIREWARD de Montpellier et le GIS Eau Toulouse.

L'objectif du Défi Clé Water Occitanie est d'étudier les solutions locales de réusages de l'eau et leur pertinence au regard des enjeux du cycle de l'eau. Il soutient des projets de recherches interdisciplinaires en s'appuyant sur des projets à plusieurs échelles, associant une approche multi-acteurs au travers d'un réseau de six territoires « Living Labs » en Occitanie.

Au sein du Défi Clé WOc, un Living Lab correspond à un territoire où se rassemblent des chercheurs et des acteurs locaux afin de faire émerger des questions liées aux réusages de l'eau pertinentes dans ces territoires. Ce processus d'identification des problématiques et de co-construction des questions de recherches permet d'étudier les options de réusages et leur pertinence avec des stages de Master, dans un contexte de raréfaction de cette ressource. Chaque Living Lab explore différentes questions autour des options de réusages au regard d'une thématique spécifique à chaque territoire.

Cette courte fiche a pour but de servir de support de communication auprès des financeurs, des partenaires des autres Living Labs du Défi Clé, ou d'autres partenaires potentiels pour des collaborations futures au-delà du Défi Clé

## Stage 2025 sur le Living Lab Toulouse Métropole

**Titre du stage :** « Caractériser le risque microbiologique associé au développement de biofilm lors du stockage d'eaux non conventionnelles »

**Période de stage :** du 24/02/2025 au 08/08/2025

**Encadrement :** Ludovic Pilloux (Maître de Conférence) et Emma Bousquet (Doctorante)

### Présentation de l'étudiant-e :

VARACHAT Sarah

M1 Bio-Ingénierie, Recherche et Application Biomédicale

Stage de 6 mois au Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse (LGC)

Licence Biologie Cellulaire et Physiologie



### Objectif du stage :

L'objectif principal de ce stage est d'étudier l'impact microbiologique de la formation de biofilms de bactéries - n'étant pas déjà utilisées comme marqueurs de contamination fécale - lors du stockage des eaux usées traitées (EUT), dans le cadre de leur réutilisation.

Biofilms : bactéries adhérant à une surface et qui sont incluses dans une matrice extracellulaire qu'elles produisent.

### Missions :

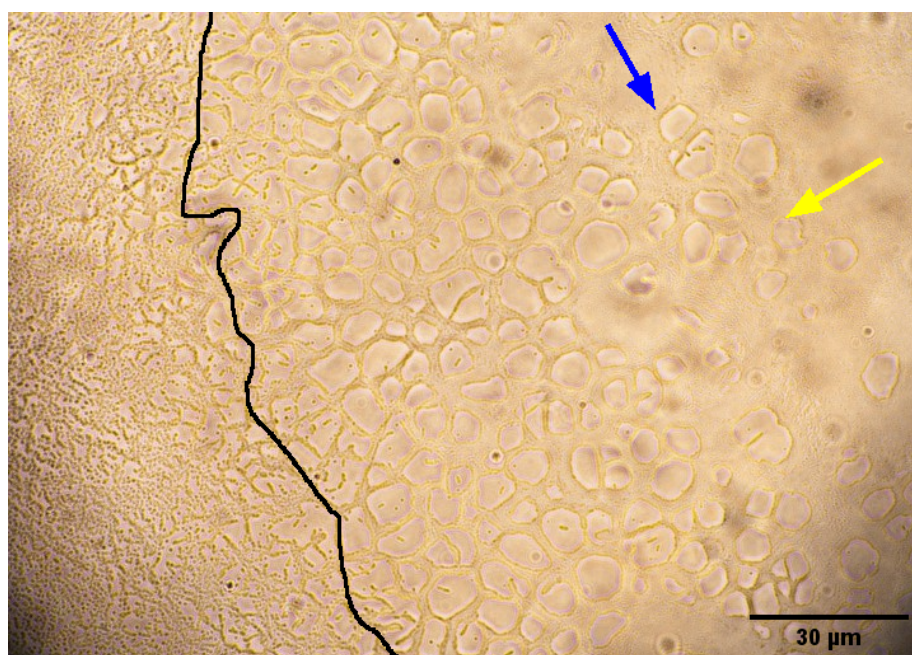
- Réaliser une recherche bibliographique sur les problématiques de stockage des eaux de Reuse

- Mettre en place un protocole de prélèvement et de stockage des eaux usées traitées issues d'un des sites pilotes du Living Lab Toulouse Métropole : le filtre planté de l'Université Paul Sabatier
- Isoler et caractériser des souches microbiennes (bactéries et protistes) présentes dans les échantillons collectés
- Analyser les biofilms formés lors du stockage à l'aide de techniques de culture et de biologie moléculaire (comparaison conditions de laboratoire versus conditions environnementales)
- Évaluer le potentiel infectieux des bactéries lors de co-cultures de protistes et de bactéries (comparaison conditions de laboratoire versus conditions environnementales)

### **Principaux résultats et conclusions :**

- Des amibes libres ont été systématiquement isolées dans les échantillons, confirmant leur présence persistante et divers phénotypes ont été identifiés :

Amibes : micro-organismes unicellulaires eucaryotes, qui vivent dans les eaux et qui sont capables de se déplacer et de se nourrir en formant des pseudopodes (extensions de leur membrane).



**Figure 1 :** Front de migration amibien isolé du premier prélèvement d'EUT, après une semaine de stockage (deuxième repiquage)

Observation au microscope optique (grossissement X100)

Ligne noire : délimitation entre bactéries (*E. coli* mortes) (partie de gauche) et le tapis amibien (partie de droite)

Flèche bleue : sens du dépôt de la solution correspondant aux amibes des EUT isolées

Flèche jaune : sens d'avancée du front amibien pour venir "brouter" les bactéries, perpendiculaire au dépôt



**Figure 2 :** Front de migration amibien isolé du premier prélèvement d'EUT, après deux semaines de stockage (deuxième repiquage)

Observation au microscope optique (grossissement X100)

Ligne noire : délimitation du front : en haut ce sont les amibes et en bas les bactéries mortes

### **Description de la méthodologie :**

- Les eaux usées traitées ont été prélevées en sortie d'un filtre planté et stockées dans des bidons pendant un mois en conditions contrôlées (intérieur vs extérieur).
- Des isolations d'amibes libres ont été réalisées sur un milieu solide pauvre de culture (NNA),ensemencé d'*Escherichia coli* mortes pour nourrir les amibes, afin d'isoler et d'observer des fronts de migration amibiens.
- En parallèle, l'abondance bactérienne a été suivie par culture sur milieu riche (TSA), avec dénombrement en unités formant colonies (UFC) pour comparer l'évolution selon les conditions de stockage.
- Des extractions d'ADN ont été effectuées à partir des culots d'EUT, en vue de futures analyses moléculaires (PCR) qui permettront d'identifier les espèces microbiennes des eaux.

- Un modèle expérimental de biofilm a été mis en place en laboratoire avec *Legionella pneumophila* sur différents milieux liquides et dans une microplaque 24 puits, pour tester sa capacité à adhérer aux surfaces selon les conditions nutritives.

- Enfin, plusieurs essais de mise en culture liquide des amibes ont été tentés : des bouts de gélose du milieu solide ont été prélevés et placés dans une plaque 24 puits contenant des milieux liquides.

### **Description des résultats et discussion :**

Les résultats confirment tout d'abord la présence systématique d'amibes libres dans les EUT stockées, avec une diversité morphologique importante. Cela confirme que ces milieux constituent des réservoirs écologiques propices aux protistes, en particulier aux FLA (Free Living Amoebae), connus pour héberger des bactéries pathogènes opportunistes. Ces observations répondent à l'objectif, en montrant que les EUT stockées peuvent abriter des communautés microbiennes complexes, invisibles aux analyses réglementaires classiques.

La croissance bactérienne mesurée sur TSA révèle une prolifération significative des bactéries poussant sur ce milieu durant le stockage, qui est plus rapide lors du stockage des eaux à l'extérieur. Cette dynamique confirme que la phase de stockage favorise l'augmentation de la charge microbienne, ce qui alimente les biofilms et augmente le risque sanitaire en cas de réutilisation. Cela corrobore l'idée que le stockage est une étape critique du processus de REUT.

Les quantités d'ADN extraites des échantillons attestent d'une biomasse importante et d'un potentiel pour des analyses moléculaires ciblées. Bien que les espèces présentes n'aient pas encore été identifiées par PCR, ces données constituent une base solide pour une évaluation plus fine du risque.

La formation de biofilms par *Legionella pneumophila* sur certains milieux pourrait refléter son potentiel de persistance environnementale ainsi que sa potentielle résistance aux traitements de l'eau. Ce résultat appuie l'intérêt de surveiller ces espèces dans un contexte de réutilisation d'eau.

Enfin, l'échec des cultures liquides d'amibes limite certaines perspectives expérimentales, mais ne remet pas en cause les objectifs initiaux.

Les résultats soutiennent la nécessité de compléter la réglementation actuelle par une surveillance biologique ciblée des pathogènes opportunistes émergents.

### **Difficultés rencontrées :**

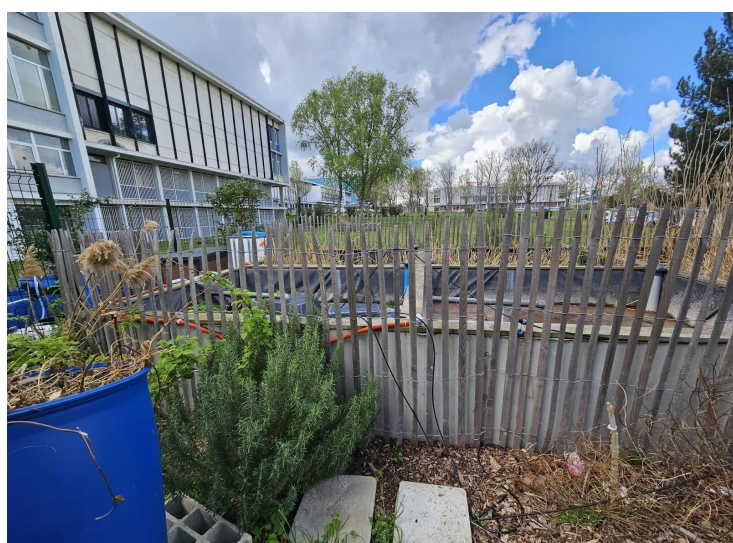
Plusieurs difficultés techniques ont été rencontrées au cours du stage :

- La mise en culture liquide des amibes libres s'est révélée complexe, avec des échecs répétés malgré plusieurs ajustements.
- De plus, certaines contaminations fongiques ont affecté les cultures solides, perturbant l'observation des amibes.
- Enfin, des variations dans la qualité des prélèvements ont entraîné des écarts dans les résultats, compliquant leur comparaison directe (météo, température, nature des eaux qui varient). Ces obstacles ont nécessité des adaptations méthodologiques et ont limité certaines analyses prévues.

### **Perspectives et recommandations (clés d'avancement technique dans la réflexion autour des réusages de l'eau) :**

Les résultats obtenus soulignent l'importance de mieux encadrer la phase de stockage dans les filières de réutilisation des eaux usées traitées. La présence d'amibes libres et la prolifération bactérienne observées appellent à renforcer la surveillance microbiologique, en intégrant des microorganismes opportunistes non ciblés par la réglementation actuelle. Le développement d'un modèle de biofilm avec *Legionella pneumophila* ouvre les perspectives pour étudier les interactions amibes-bactéries résistantes (FLA-ARB) en conditions contrôlées. À terme, des outils de détection moléculaire (PCRs ciblées) pourraient être intégrés dans les protocoles de suivi. Il serait donc préférable de limiter les durées de stockage et d'optimiser les conditions physiques (température, lumière) pour freiner le développement microbien. Ces pistes techniques et scientifiques contribueront à une réutilisation de l'eau plus sûre, en lien avec les exigences futures de santé publique et les évolutions réglementaires attendues.

### **Schémas et illustrations supplémentaires :**



Figures 3 et 4: Filtre planté de l'Université Paul Sabatier



*Figure 5 : Méthode de prélèvement  
d'EUT*