

---

---

## PROTOCOLE D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE SUBSTRATS THERMAUX, BOUE THERMALE ET SÉDIMENTS\*

---

---

C PIGASSE<sup>1</sup>, C ROQUES<sup>1</sup>, JF MERIC<sup>2</sup>

### Résumé

La qualité microbiologique de la boue thermale au sein des établissements nécessite une attention particulière afin de définir son état sanitaire. Exposée à un très large public, il est dans l'intérêt des stations thermales d'assurer la qualité microbiologique de leurs substrats thermaux ainsi que son maintien. L'élaboration du présent protocole a pour but de proposer des conditions standardisées de réalisation d'analyses microbiologiques pouvant être conduites par les laboratoires d'autosurveillance, sur les boues thermales ou bien sur les sédiments qui la constituent. Des travaux de recherche ont permis de concevoir un mode opératoire avec validation de différentes conditions permettant l'analyse microbiologique de boue thermale ou de sédiments.

Après une étape d'échantillonnage, les échantillons peuvent être examinés d'un point de vue flore totale et également flore spécifique avec l'utilisation de milieux sélectifs et confirmatifs, de manière à détecter et/ou numérer des micro-organismes potentiellement pathogènes au niveau cutané.

L'objectif est ici de proposer un protocole optimisé et validé, permettant la réalisation d'analyses dans des conditions reproductibles.

*Mots clés : Boue thermale, Flore microbienne, Analyse microbiologique, Pathogènes cutanés.*

### Abstract

#### Protocol for thermal substrates analysis, thermal mud and sediments.

The sanitary state of thermal mud quality in establishments needs a particular attention. Exposed to a large public, thermal stations must assured the microbiological quality of thermal substrats and the maintenance of this quality. The development of this protocol is to propose standardized conditions to realise microbiological analyses being able to be led by the laboratories of self-monitoring, on thermal muds or the sediments which constitute it. Research works allowed conceiving a procedure with validation of different steps allowing the microbiological analysis of thermal mud or sediments.

After sampling step, the total flora of samples can be examined and also specific micro-organisms by using selective and confirmative media, to revelate and/or numerate potential cutaneous pathogens.

The aim is to propose an optimized and validated protocol, allowing analysis in reproducible conditions.

*Key words : Thermal mud, Microbial flora, Microbial analysis, Cutaneous pathogens.*

---

\* Travail de recherche conduit avec le soutien financier de l'Afreth (Association française pour la recherche thermale)

<sup>1</sup> Laboratoire de microbiologie industrielle, Université P Sabatier de Toulouse

<sup>2</sup> Établissements thermaux, Balaruc-les-Bains

## Introduction

L'intérêt de la conception de ce protocole est de permettre à l'établissement thermal d'assurer la qualité de la boue thermale initiale ainsi que de la boue thermale recyclée. De par le mode de conception du péloïde de la station d'intérêt, une phase de recyclage du substrat (à hauteur d'environ 90 %) est réalisée au cours de la saison d'exercice (mars à novembre). Cette étape impose l'établissement d'un protocole d'analyse microbiologique rigoureux et reflétant de façon optimale l'état sanitaire de la boue thermale. Cette dernière étant appliquée au niveau cutané, une attention particulière sera portée sur les micro-organismes potentiellement pathogènes, à transmission interhumaine ou environnementale.

Le projet dans lequel s'inscrivent les travaux qui ont mené à la conception de ce protocole, démontre une originalité et une exclusivité, de par le faible nombre de travaux de recherche sur l'étude des boues thermales [1-7,9].

Le protocole présenté s'applique à l'analyse microbiologique de la boue thermale, ainsi qu'à l'analyse de sédiments dont elle est constituée.

L'eau thermale entrant dans la composition de la boue thermale est soumise à une réglementation [10,11,15], et répond à la circulaire relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux [8].

Afin d'assurer la qualité "marchande" et "hygiène" des produits, l'analyse inclut une évaluation quantitative globale ou spécifique sur la base d'une sélection d'indicateurs.

D'un point de vue global, la caractérisation de l'écosystème de substrats thermaux passe par le dénombrement des flores viables et cultivables aérobies, aéro-anaérobies facultatives et anaérobies stricts. Des méthodes alternatives peuvent être envisagées mais n'ont pas été évaluées lors de ces essais.

Sur le plan spécifique, divers pathogènes sont recherchés. L'attention est portée sur certains micro-organismes potentiellement nuisibles pour la santé humaine, en particulier *P. aeruginosa*, *S. aureus*, ou indicateurs de contamination, les coliformes et les *Clostridium* sulfito-réducteurs.

L'importance de la recherche de ces micro-organismes réside dans leur pathogénie au niveau cutané et des muqueuses (*S. aureus*, *P. aeruginosa*). De plus, ils permettent d'indiquer une contamination d'origine humaine (coliformes) ou une dégradation de la qualité de la boue thermale (*Clostridium* sulfito-réducteurs).

## Principe

L'analyse des substrats thermaux, sédiments ou boues thermales, s'articule en 2 étapes. La première consiste en l'échantillonnage, passant par l'hydratation du substrat, un vortexage de manière à dissoudre ou disperser les amas, et l'agitation de l'échantillon pour affiner la dispersion des particules les plus grossières.

L'analyse, à proprement parlé, permet une évaluation de la population présente au sein de l'échantillon. Ainsi, les flores totales aérobies ou anaérobies, ou bien les flores spécifiques peuvent faire l'objet de ces analyses. Pour se faire, nous réaliserons un

échantillonnage suivi de dénombrements sur milieu solide simple, ou bien spécifiques et sélectifs selon le cas. Après incubation, un dénombrement des UFC (Unité Formant Colonie) permettra de quantifier et de caractériser l'échantillon (par identification).

Pour l'analyse de la flore totale, le milieu de culture préconisé est la gélose Trypcase-Soja. Ce milieu nutritif permet une croissance des micro-organismes revivifiables et cultivables sans exercer de pression de sélection.

La recherche des flores spécifiques passe par l'ensemencement de l'échantillon sur 2 types de milieux. Le premier, appelé milieu sélectif, va restreindre le développement de certains micro-organismes pour ainsi mettre en évidence la croissance du micro-organisme recherché. La présence d'un germe donné est affirmée dans un second temps, sur milieu ou par test confirmatif. N'est présenté ici que le protocole final défini.

## Mode opératoire

### 1. Préparation de l'échantillon

Pour les essais réalisés, et afin de comparer les résultats entre les sédiments et la boue thermale, l'échantillon est hydraté à hauteur de 90 % avec de l'eau physiologique stérile. En considérant une hydratation de 29 % pour la boue thermale et 0 % pour des sédiments, sont rajoutés, respectivement 6, 10 mL ou 9 mL d'eau physiologique stérile à 1g de substrat.

Suite à un vortexage pendant 30 sec, une agitation mécanique de 30 min à 300 rpm permet de finaliser la préparation de l'échantillon. *Cette condition a été déterminée comme étant optimale pour l'obtention de l'échantillon à analyser. Aucun agent chimique ou physique n'a permis d'optimiser la récupération de flores.*

### 2. Ensemencement/Méthode de dénombrement/Incubation sur milieu présomptif

La technique choisie pour réaliser l'ensemencement est l'étalement au râteau. *Ce mode d'ensemencement est une condition définie, en comparaison à un ensemencement après filtration ou par inclusion. Il est également important de réaliser l'ensemencement dès la fin de la préparation, une sédimentation de l'échantillon montre une diminution d'un facteur 10 du nombre d'UFC.*

Après incubation, le dénombrement à partir de 100 µl d'échantillon se fait en UFC (Unité Formant Colonie) ramené par gramme de substrat.

#### Flore totale

Afin d'évaluer la quantité totale de micro-organismes cultivables présente dans le substrat, des dilutions sériées de raison 10 en eau physiologique sont nécessaires avant l'ensemencement sur gélose, de manière à obtenir entre 30 et 300 UFC dans les 100 µl déposés. Il est préconisé de réaliser des ensemencements en triplicata pour palier à un éventuel envahissement de la surface gélosée. L'étude de la cinétique de croissance des colonies a permis d'établir un dénombrement maximal de la flore à 6 jours d'incubation, mais dès 4 jours, 90 % des UFC sont mises en évidence.

## Flore spécifique

En fonction du seuil de détection du microorganisme retrouvé par gramme de sédiments que le laboratoire veut s'imposer, la dilution de l'échantillon à ensemercer sur la gélose peut être variable.

*Différents essais ont permis d'établir les conditions suivantes :*

*Les milieux de Chapman ou Baird Parker (pour *S. aureus*) et TTC (pour les coliformes) ensemençés sont incubés à 37°C pendant 48 h, les colonies sont visibles dès 24 h mais les pigmentations sont clairement lisibles à partir de 48 h d'incubation.*

**P. aeruginosa* est ensemençé sur gélose au cétrimide et donne des colonies qui s'étalent ; le dénombrement est donc facilité pour une lecture après 24 h d'incubation à 37°C, puis contrôlée à 48 h.*

*Une atmosphère anaérobie est nécessaire pour la culture des clostridies, à 37°C pendant 3 jours sur milieu TSC.*

### 3. Lecture

<b>Chapman</b>		
<b>Observations</b>	<b>Résultat</b>	<b>Interprétations</b>
Colonie jaune/ Halo jaune	Mannitol+	Suspicion de <i>S. aureus</i>
Colonie rouge	Mannitol-	
<b>Baird Parker</b>		
<b>Observations</b>	<b>Résultat</b>	<b>Interprétations</b>
Colonie noire/ Halo clair	Réduction des tellurites/ Protéase+ (protéines jaune d'œuf)	Suspicion de <i>S. aureus</i>
Autre		Flore diverse

**Considérer comme suspectes les colonies mannitol+ après incubation à 37°C sur gélose de Chapman ou bien les colonies noires à halo clair sur gélose Baird Parker. La colonie doit correspondre à des coques à Gram positif.**

<b>TTC</b>		
<b>Observations</b>	<b>Résultat</b>	<b>Interprétations</b>
Colonie jaune orangé/ halo jaune	TTC+/- Lactose+	Suspicion de <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterobacter aerogenes</i>
Colonie rose-rouge/ halo jaune	TTC+ Lactose+	Coliformes (autre que <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterobacter aerogenes</i> )
Colonie rouge foncée	TTC+ Lactose -	Flore diverse

**Considérer comme suspectes les colonies qui présentent, après incubation à 44°C, sur gélose lactosée au TTC et au tergitol 7, une coloration jaune ou orange avec un halo jaune plus ou moins net. La colonie doit correspondre à des bacilles à Gram négatif.**

<i>Cétrimide</i>		
Observations	Résultat	Interprétations
Croissance	Positif	Suspicion de <i>Pseudomonas</i>
Absence de croissance	Négatif	
Virage du milieu au bleu	Production du pigment pyocyanine	
Virage du milieu au jaune-vert	Production du pigment pyoverdine	Suspicion de <i>P. aeruginosa</i>

**Considérer comme suspectes toutes les colonies présentes, après incubation à 37°C, sur gélose cétrimide, et noter également leur pigmentation. La colonie doit correspondre à des bacilles à Gram négatif.**

<i>TSC</i>	
Observations	Résultat
Colonie noire/halo noir	Réduction des sulfites
Pas de coloration noire	Pas de réduction des sulfites

**Considérer comme *Clostridium* sulfito-réducteur, toute colonie noire entourée d'un halo noir. Contrôler qu'il s'agit de bacilles à Gram +, avec présence de spores.**

#### 4. Détection et identification des germes indicateurs

À partir de colonies suspectes obtenues, un isolement est réalisé sur le milieu sélectif correspondant, afin de poursuivre avec un test confirmatif.

##### Milieus confirmatifs et lecture

Afin de confirmer l'appartenance de l'isolat à un genre bactérien ou une espèce donnée, il y a nécessité de passer par un test confirmatif.

Pour valider la présence de *S. aureus*, il faut rechercher la présence de l'activité catalase [13] et la présence d'une coagulase A [14] pour les colonies correspondant à des coques à Gram positif.

Pour les coliformes, en tout premier lieu, s'assurer que la souche présentant une morphologie en bacille à Gram négatif est oxydase négative. Pour valider la présence de coliformes, il faut rechercher une tryptophanase. Cette enzyme permet de produire de l'indole à partir de tryptophane. La réaction enzymatique entre le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde (contenu dans le réactif de Kovacs) et l'indole produit un composé rouge. Pour valider la présence de *Pseudomonas aeruginosa*, s'assurer en tout premier lieu que

la souche présentant une morphologie en bacille à Gram négatif est oxydase positive. Dans un second temps, il faut vérifier que la souche produise une nitrate réductase. Selon la norme ISO 22717:2006 [12], il est également possible de valider l'identification de *P. aeruginosa* si la souche sur milieu présomptif fluoresce sous une lampe à ultraviolets ( $\lambda=360$  nm).

La présence de colonies typiques de *Clostridium* n'est pas soumise à une confirmation d'identification, notamment par leur croissance en anaérobiose et leur morphologie (bacilles à Gram positif ayant la capacité à sporuler).

## 5. Expression des résultats/Mode de calcul

Il est préconisé d'uniformiser les résultats en les exprimant par gramme de sédiments. En fonction du niveau de qualité sanitaire que l'établissement s'imposera en contrôle interne, des niveaux cibles sont à mettre en place. Ils doivent prendre en compte les limites de détection liées à la complexité du traitement du substrat. La réglementation sur l'eau est une base pour établir les seuils de tolérance sur les analyses bactériologiques.

## Références bibliographiques

1. Capdepu M. Les *Pseudomonas* et autres bacilles à Gram négatif dans les biogéolées thermales. *Journal Européen d'Hydrologie* 1996;fasc. 2,27:193-201.
2. Capdepu M. Sanitary aspects of thermal mud in Aquitaine. *International Journal of Environmental Health Research* 1994,4:1-6.
3. Capdepu M. Le comportement d'éventuels contaminants bactériens dans un péloïde végété-minéral. *Journal Français d'Hydrologie* 1983;fasc. 1,40:113-119.
4. Capdepu M. Les *Clostridium* potentiellement pathogènes dans les boues thermales. *Journal Français d'Hydrologie* 1986;fasc. 3,17:215-220.
5. Capdepu M. La survie de *Pseudomonas* et des bactéries apparentées dans les boues thermales mûries. *Journal Français d'Hydrologie* 1997;fasc. 2,28:223-234.
6. Capdepu M. Microbiologie du péloïde de Dax au cours de son utilisation en bain aux thermes Berot. Étude scientifique non publiée, 1988.
7. Capdepu M. La qualité sanitaire des bains de boue à Dax. *Press Therm Climat* 1988;125:3.
8. *Circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 du 19 juin 2000* relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux.
9. Counilh P. Caractéristiques du limon de l'Adour, application à la recherche de nouveaux gîtes. *Journal Français d'Hydrologie* 1982;fasc. 1,37:35-55.
10. Direction générale de la santé - *Eau et santé. L'eau dans les établissements de santé*, France, 2005.
11. Groupe Eau Santé. *Eau des établissements de santé - Qualité de l'eau aux points d'usage*, Bordeaux, 2003.
12. *ISO 22717:2006* : Cosmétiques – Microbiologie – Détection de *Pseudomonas aeruginosa*
13. *NF ISO 21148* : Cosmétiques – Microbiologie - Instructions générales pour les examens microbiologiques.
14. *NF ISO 22718* : Cosmétiques – Microbiologie – Détection de *Staphylococcus aureus*
15. Système normatif sur l'analyse des eaux  
*EN ISO 12 780* : Qualité de l'eau - Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* par filtration sur membrane.

*NF T 90-413* : Essais des eaux - Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants - Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP).

*NF T 90-414* : Essais des eaux - Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants - Méthode générale par filtration sur membrane.

*NF T 90-420* : Examens bactériologiques des eaux destinées à la consommation humaine.

*NT T 90-415* : Essais des eaux - Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de *Clostridium* sulfito-réducteurs - Méthode générale par incorporation en gélose en tubes profonds.

*NF T 90-421* : Examens bactériologiques des eaux de piscines.

*XP T 90-416* : Essais des eaux - Recherche et dénombrements de entérocoques - Méthode générale par filtration sur membrane.

*NF EN ISO 5667-3* : Qualité de l'eau - Échantillonnage

*XP T 90-401* : Essais des eaux - Dénombrement des micro-organismes revivifiables à 37°C.

*XP T 90-402* : Essais des eaux - Dénombrement des micro-organismes revivifiables à 22°C.