

Projet de recherche Afreth 2005/08

Évaluation et maintien de l'état sanitaire des boues thermales au cours de l'usage et du recyclage

Investigateur principal : Pr Christine Roques

Laboratoire de microbiologie industrielle, EA 3036, IFR 31.

UFR Pharmacie de Toulouse, 35 chemin des Maraîchers.

Établissement de rattachement : UFR Pharmacie, UPS Toulouse III.

Responsable scientifique : JF MERIC

Commune et Établissements thermaux de Balaruc-les-Bains.

1. Présentation de l'étude

La boue thermale est composée d'un substrat, la plupart du temps d'origine tellurique, mis en contact avec une eau thermale. La boue thermale peut donc être considérée comme un dérivé de l'eau thermale.

La boue thermale tient une place importante dans la thérapeutique thermale. En effet, 73 des 102 stations thermales françaises utilisent de la boue thermale dans leurs soins et cela concerne 90 % des curistes soignés en 2003. La boue thermale est principalement utilisée en rhumatologie qui est aussi la principale orientation thérapeutique thermale.

Cependant, dans de nombreux cas, l'obtention de ces boues est limitée dans le temps (une période annuelle) ce qui nécessite des phases de préparation (séchage, stockage), d'utilisation (réhydratation) et surtout de recyclage avec stockage sous forme hydratée. Les stations les plus importantes en rhumatologie pratiquent le recyclage global ou la réutilisation en usage individuel de leurs boues thermales.

Par ailleurs, les pouvoirs publics demandent que les exploitants garantissent la bonne qualité sanitaire de leurs produits thermaux et notamment de la boue thermale.

Cependant, il existe peu de données sur la qualité sanitaire de ces dernières que cela soit avant ou après utilisation ainsi que sur les risques iatrogènes liés à ces pratiques. Le contact de ces boues avec le revêtement cutané des curistes/patients conduit à considérer avec attention leur état sanitaire initial (absence de contamination de la zone géographique de prélèvement), les conditions de préparation/stockage, et surtout de réutilisation afin de maintenir un niveau de qualité microbiologique permettant d'assurer la sécurité sanitaire des patients.

Notre étude, outre la validation de méthodes microbiologiques pour la recherche des micro-organismes dans les boues thermales, propose de faire un état des lieux sanitaire significatif des boues recyclées dans une des grandes stations de rhumatologie (Balaruc-les-Bains), ainsi que le parallèle avec les données physico-chimiques, sur 3 ans. Il sera ainsi possible de déterminer les risques infectieux potentiels liés à l'utilisation de la boue

thermale et à la pratique du recyclage. La seconde phase de l'étude portant sur la ou les méthodologie(s) à employer pour préserver la qualité sanitaire de la boue thermale lors de sa fabrication, de son utilisation et de son éventuel recyclage, elle se basera sur l'analyse des points critiques de la production à la réutilisation de la boue thermale. Le recyclage fera l'objet d'un développement particulier : analyse du risque de contamination interhumaine, évaluation de procédés physiques et/ou chimiques dans la maîtrise du niveau de contamination et le maintien d'une flore résidante compatible avec le maintien des caractéristiques biologiques des boues étudiées.

Notre étude apportera aux professionnels du thermalisme une base de réflexion leur permettant d'appréhender d'une part les exigences des pouvoirs publics en terme de santé publique pour l'utilisation de la boue thermale. D'autre part, elle permettra également de mieux connaître et donc de mieux maîtriser la flore contaminante de ces boues. Ce projet s'inscrit donc comme un outil à destination des exploitants thermaux utilisant des boues pour les aider dans la gestion quotidienne de leur filière boue thermale au sein de leurs établissements afin d'en garantir la qualité sanitaire.

2. Justification de l'étude

Dans toutes les stations où les boues ont une place traditionnelle, la création d'établissements thermaux correspond au souhait de reproduire des conditions naturelles dans des lieux aménagés pour l'accueil des patients. Si l'on considère que le produit utilisé se doit d'être un produit contrôlé, issu d'une eau minérale ou du contact plus ou moins prolongé d'une eau minérale avec des matériaux résultant de processus géologiques et/ou biologiques et utilisés à des fins thérapeutiques dans la station thermale d'origine de l'eau minérale, les notions de contrôle et maîtrise sanitaires apparaissent rapidement prépondérants.

Certains produits tels que les péloïdes (Balaruc-les-Bains), péloses et fangoïdes font intervenir des processus biologiques de "maturation". Classiquement, la boue thermale est ici préparée à partir de sédiments limono-argileux prélevés en milieu lagunaire. Ce sédiment séché au soleil est tamisé pour éliminer les éléments grossiers et obtenir un produit homogène. Ce produit est ensuite imprégné d'eau minérale de Balaruc. Le contact entre ces deux éléments, sédiment et eau, va conduire en quelques jours à la substitution de l'eau interstitielle initiale du sédiment par l'eau minérale et donc à des échanges ioniques. L'eau, la chaleur, les éléments minéraux et organiques définissent un milieu dans lequel vont se développer des bactéries adaptées à de telles conditions.

Cette flore sélectionnée, associée aux caractéristiques physico-chimiques du produit va secondairement permettre le développement d'algues unicellulaires spécifiques. Par ailleurs, les conditions de prélèvement : site et période peuvent influencer sur la nature de cette phase biotique. La phase biotique fait ainsi intervenir des algues, des diatomées, des Cyanophycées et de nombreuses espèces microbiennes en équilibre fragile. Ce pool de matière organique néoformée est responsable de certains effets thérapeutiques revendiqués. C'est le produit transformé qui est appelé péloïde.

Ceci introduit la nécessité d'un contrôle de la flore présente, de sa qualité (absence de contamination) et de sa préservation sur le plan quantitatif et qualitatif afin de maintenir les qualités intrinsèques du produit utilisé et donc sa qualité marchande.

Cette "maturation" nécessite un temps de contact long entre le sédiment et l'eau thermale, temps allant de 4 semaines à plusieurs mois. Cette contrainte, alliée à des périodes de prélèvement limitées dans le temps et à une perte d'environ 10% de boue lors de l'usage, conduit à une réutilisation des boues qui sur le plan sanitaire peut conduire à une altération de la qualité hygiénique du produit. Le risque de présence de micro-organismes d'origine humaine dans les boues recyclées est encore mal évalué et met en balance le nombre élevé de micro-organismes qu'un curiste peut relarguer lors du contact boue/surface cutanée et le fait que la fraction de boue directement en contact avec le revêtement cutané est évacuée au jet et donc essentiellement non recyclée.

L'évolution de la réglementation sur les aspects sanitaires liés aux contacts produit-environnement/patient est en plein essor. Ceci est lié à une évolution de la notion de risque et d'évaluation de ceux-ci, ainsi qu'à une évolution de nos connaissances sur les écosystèmes, leur composition et leur évolution. Dans ce cadre, le recyclage des boues doit faire l'objet d'une attention particulière, avec validation des différentes étapes sur le plan microbiologique et physico-chimique.

Notre projet s'intègre dans une optimisation des méthodes d'évaluation des qualités marchande et hygiénique des boues (prélèvements, traitement des échantillons, ensemencement, analyse), actuellement basées sur les méthodes d'analyse des eaux ; ainsi que dans une approche rationnelle des process de traitement des boues en vue d'un recyclage.

3. Objectifs de l'étude

Le premier objectif de l'étude est d'optimiser les méthodes d'évaluation des caractéristiques microbiologiques (et physico-chimiques) des boues.

Il s'agit ici d'optimiser l'ensemble des étapes d'analyse, du prélèvement au rendu de résultats, en se basant sur les référentiels actuels (normes AFNOR et EN) et les données actuelles de la littérature. Ainsi, nous nous proposons :

- de valider des conditions de prélèvement et un milieu de transport propres à la conservation de la viabilité des différents groupes microbiens présents.

Le concept est ici basé sur l'utilisation d'un milieu de transport caractérisé par une base minérale assurant la préservation de la viabilité des micro-organismes, par la présence d'inhibiteurs de croissance (absence de multiplication durant la conservation) et de substances réductrices améliorant les conditions de préservation des bactéries anaérobies. Nos travaux portent sur une modification de la composition du milieu RTF, avec transfert de l'échantillon en RTF modifié dès le prélèvement.

- d'optimiser la dissociation des agrégats microbiens et biofilms présents au sein du péloïde.

La nature complexe des péloïdes constitue un écueil reconnu dans l'évaluation des caractéristiques microbiologiques et physico-chimiques de ces produits. Actuellement,

les analyses sur sédiments font appel à des méthodes d'homogénéisation mécanique suivie d'une décantation et d'un traitement du surnageant. La dissociation des agrégats microbiens et des floes sera optimisée par des essais de sonication associés ou non à la présence de molécules modifiant la capacité d'adhésion microbienne (notamment EDTA).

- de valider les méthodes de traitement des échantillons pour la détermination des UFC (Unités Formant Colonies) pour les micro-organismes indicateurs.

La réflexion des hygiénistes sur les risques sanitaires liés à l'usage et au recyclage des boues a conduit à différentes propositions basées sur les critères d'analyse de la qualité de l'eau, concernant essentiellement : l'absence de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Candida albicans* dans 1 gramme de boue ; moins de 10^2 coliformes fécaux et moins de 10^4 *Clostridium* par gramme de boue. Notre propos est de suivre les taux de micro-organismes indiqués, ainsi que la flore totale selon les indications normatives concernant l'eau. De plus, le travail envisagé comporte une évaluation sur milieux spécifiques et non spécifiques pour la caractérisation d'une flore environnementale. L'accent sera mis sur la détection des micro-organismes potentiellement d'origine humaine afin de plus particulièrement étudier l'impact du recyclage sur le risque de transmission inter-humaine.

- de valider des méthodes alternatives et plus rapides de caractérisation des flores présentes.

Le laboratoire de Microbiologie industrielle de la faculté de Pharmacie de Toulouse développe de nouveaux outils de caractérisation des écosystèmes microbiens.

Parallèlement aux outils de biologie moléculaire que nous utiliserons pour caractérisation de la flore et/ou identification de certaines espèces, l'analyse des échantillons en cytométrie de flux est envisagée. Cette méthode permet une numération de la flore totale, des micro-organismes viables (marquage différentiel iodure de Propidium - Thiazole orange), voire éventuellement de certains groupes microbiens (genres - espèces). Ainsi, la part non cultivable, mais viable, de la microflore présente sera prise en compte.

Ce premier travail, indispensable, a été démarré par les deux partenaires en ce qui concerne la partie culture sur milieux spécifiques et non spécifiques en accord avec les normes françaises et européennes. Il est indispensable à un suivi quantitatif et qualitatif valide de la flore des boues et péloïdes. Les données physico-chimiques essentielles (pH, ...) sont également suivies afin de définir une éventuelle corrélation avec des variations de flore.

Le deuxième objectif de l'étude est d'évaluer et de suivre la complexité de la flore microbienne au cours des différentes phases du process.

- Des prélèvements microbiens seront réalisés au moment du prélèvement, après épandage et séchage, lors de la reconstitution.

- Sur le même échantillon de base, des prélèvements réguliers seront réalisés au cours de l'usage, du stockage et de la réutilisation.

- Ce schéma de prélèvement et d'analyse est prévu sur 3 années ou campagnes successives (sites identiques et différents).

La première campagne de prélèvement a démarré en juillet 2004. Les premières analyses sont en cours sur la base des méthodes de référence et seront poursuivies selon ces méthodes. La mise en place de nouvelles procédures d'évaluation des flores aura lieu progressivement, au cours des campagnes suivantes. Ces données devraient nous permettre de définir :

- la flore de base des boues prélevées et des péloïdes, y compris entre sites et sur campagnes différentes,
- les variations de flore liées aux étapes de préparation des péloïdes,
- les variations de flore liées au recyclage.

Dans ce dernier cas, l'objectif est de définir si certaines conditions de recyclage (actuellement 2 process différents sur le site de Balaruc) permettent un maintien de la flore de base des péloïdes et parallèlement limitent le risque de sélection et de prolifération de micro-organismes d'origine humaine. Ainsi, les micro-organismes détectés seront contrôlés et identifiés pour certaines familles ou genres (*Staphylococcus*, entérobactéries, *Clostridium*...).

Les données physico-chimiques essentielles (pH, teneur en eau, chlorures, ...) sont également suivies afin de définir une éventuelle corrélation avec des variations de flore et de définir le rôle potentiel de ces variables en tant qu'indicateurs de qualité des péloïdes.

Le troisième objectif de l'étude est d'évaluer et éventuellement de valider de nouveaux process de traitement des boues en vue d'un recyclage.

- sur la base des résultats expérimentaux de caractérisation de la flore des boues aux différents stades, une analyse bibliographique sera réalisée sur les traitements physiques (température, UV, sonication,..) et/ou chimiques (inhibiteurs, biocides...) et leur efficacité attendue en fonction des espèces à préserver et à éliminer. Après sélection de process types sur la base de cette analyse et de leur faisabilité sur site, à grande échelle, une première évaluation de leur efficacité sera réalisée en laboratoire.
- Les données physico-chimiques essentielles (pH, teneur en eau, chlorures ...) sont également suivies afin de définir l'impact des traitements sur les caractéristiques physico-chimiques du produit.

Cette partie ne constitue qu'une première approche du problème. Des essais complémentaires sur la compatibilité du process avec les phases biotique et abiotique (maintien des caractéristiques) devront être mis en place. Enfin, des essais sur site devront ultérieurement être envisagés en fonction des résultats.

Au final, les trois objectifs de l'étude devraient nous permettre de proposer :

- des méthodes rationnelles d'évaluation et de suivi de la qualité sanitaire des boues,
- des méthodes rationnelles de suivi et de maîtrise de la qualité biologique des boues (maturation),
- de nouvelles préconisations concernant les conditions de stockage et de recyclage des boues.

4. Critères de jugement - statistiques

Les plannings de prélèvement démarrés en 2004 et prévus en 2005 intègrent les notions de points critiques.

La multiplicité des paramètres à prendre en compte lors de certaines étapes du projet nous amènera à définir des plans d'expérience.

Les résultats feront l'objet d'une analyse synthétique et d'une analyse statistique au fur et à mesure des essais, afin de formaliser rapidement :

- les meilleures conditions d'essai (prélèvement, transport, traitement des échantillons, analyses),
- les conditions optimales de traitement des boues au cours du stockage et du recyclage (entre les 2 process actuels).

Les critères de jugement sont à la fois quantitatifs et qualitatifs, sur les notions :

- de détection de nouvelles espèces,
- de disparition de certaines espèces,
- de modification des ratio entre groupes microbiens (Gram + /Gram - , aéro-anaérobies facultatifs / anaérobies stricts).

7. Rapport et publications

Le présent projet fera l'objet de rapports annuels et d'un rapport au bout des 3 ans de fonctionnement, reprenant les données des 2 investigateurs afin de formaliser l'analyse et l'interprétation des résultats.

Les travaux pouvant faire l'objet de communications écrites ou orales devront être validés par les 2 partenaires en terme de résultats, d'interprétation scientifique et de publication possible. Les remerciements feront apparaître la contribution de l'Afret à ces travaux.