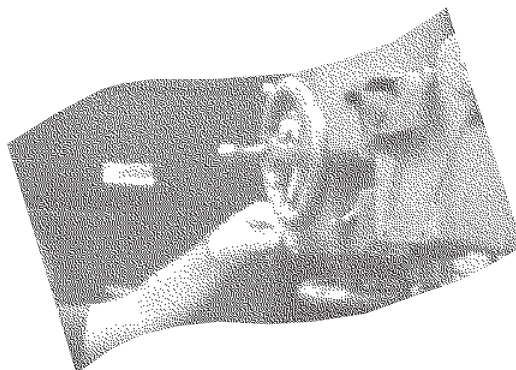


# Analyse microbiologique des fluides de coupe de métaux

Étude exploratoire



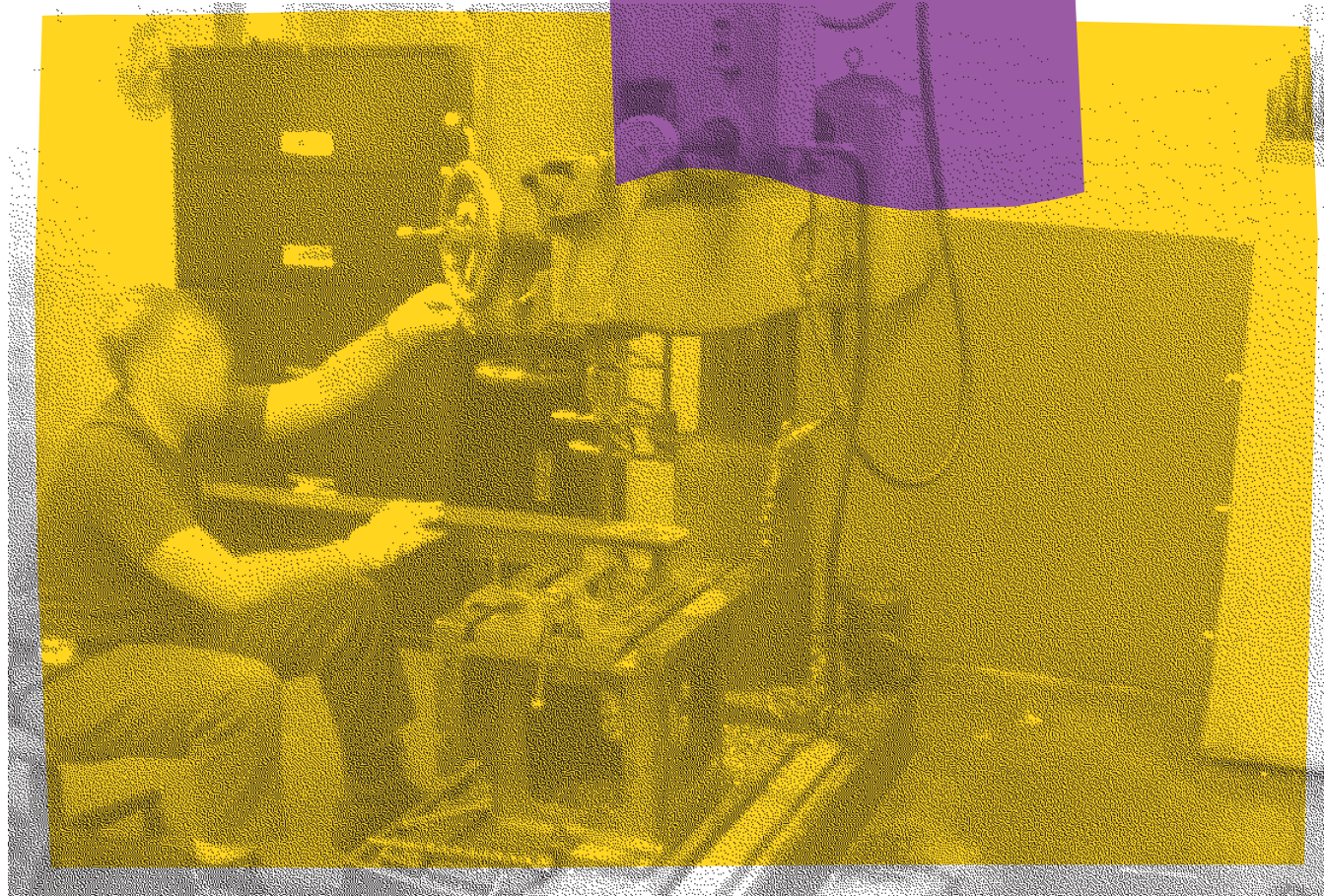
# ÉTUDES ET RECHERCHES

Caroline Duchaine  
Marc Veillette  
Yvon Cormier  
Jacques Lavoie  
France Desjardins  
Hakim Bouzid

Âout 2003

R-341

RAPPORT





Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

## NOS RECHERCHES *travaillent* pour vous !

### MISSION

- ▶ Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes.
- ▶ Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.
- ▶ Assurer la diffusion des connaissances, jouer un rôle de référence scientifique et d'expert.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

### POUR EN SAVOIR PLUS...

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour.  
De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement.  
[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par l'Institut et la CSST.  
Abonnement : 1-817-221-7046

IRSST - Direction des communications  
505, boul. De Maisonneuve Ouest  
Montréal (Québec)  
H3A 3C2  
Téléphone : (514) 288-1551  
Télécopieur : (514) 288-7636  
[publications@irsst.qc.ca](mailto:publications@irsst.qc.ca)  
**[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)**

© Institut de recherche Robert-Sauvé  
en santé et en sécurité du travail,  
août 2003.

# Analyse microbiologique des fluides de coupe de métaux

Étude exploratoire

Caroline Duchaine<sup>1,2</sup>, Marc Veillette<sup>1,2</sup>, Yvon Cormier<sup>2</sup>,  
Jacques Lavoie<sup>3</sup>, France Desjardins<sup>4</sup> et Hakim Bouzid<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Département de biochimie et de microbiologie, Université Laval

<sup>2</sup>Centre de recherche, Hôpital Laval, Institut universitaire de cardiologie  
et de pneumologie de l'Université Laval

<sup>3</sup>Hugiène du travail, IRSST

<sup>4</sup>RSP - Secteur fabrication de produits en métal et de produits électriques

<sup>5</sup>Département de génie mécanique, École de technologie supérieure, UQAM

ÉTUDES ET  
RECHERCHES

RAPPORT

Cliquez recherche  
[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)



Cette publication est disponible  
en version PDF  
sur le site Web de l'IRSST.

CONFORMÉMENT AUX POLITIQUES DE L'IRSST

Les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document  
ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

## **Résumé**

Les fluides de coupe de métaux (FCM) sont couramment utilisés dans l'industrie de la transformation du métal et de ses produits dérivés. Lors de l'application des FCM, des aérosols peuvent être générés. Les aérosols de FCM contiennent un mélange de substances incluant les composantes chimiques de ce dernier et des contaminants biologiques (des cellules ou parties de cellules, de bactéries, ou de moisissures). Si les fluides sont hautement contaminés par les microorganismes, l'exposition respiratoire des travailleurs risque d'être élevée compte tenu de la formation d'aérosols. Les problèmes de santé observés peuvent être causés par plusieurs facteurs dont les divers produits retrouvés dans les aérosols. Le facteur qui nous intéresse le plus dans cette étude exploratoire est la contamination microbienne à l'intérieur des FCM solubles. Les FCM représentent une excellente source nutritive pour supporter la croissance de bactéries ou de moisissures.

Les études disponibles dans la littérature n'ont utilisé que des méthodes classiques de culture de microorganismes. Toutefois, de nouvelles techniques de coloration à l'aide de molécules fluorescentes ainsi que des techniques de biologie moléculaire permettent la détection des micro-organismes spécifiquement ciblés (mycobactéries) et ce, dans un temps beaucoup plus court.

Nous voulions déterminer s'il est possible de mesurer des niveaux de contamination microbienne à l'intérieur des FCM solubles assez élevés pour justifier la poursuite de la recherche dans ce domaine. Les objectifs étaient 1) d'évaluer, en utilisant des techniques d'analyse de pointe, les niveaux de contamination microbienne à l'intérieur des fluides de coupe de métaux solubles dans trois usines du Québec; 2) d'établir les caractéristiques physico-chimiques des fluides solubles utilisés dans ces trois mêmes usines; 3) d'étudier la santé respiratoire des travailleurs d'une (1) usine dans laquelle nous aurons prélevé le FCM afin d'en analyser son contenu microbien.

Les travaux ont été réalisés dans 3 ateliers où des échantillons de FCM ont été prélevés. La prise d'échantillons avait pour objectif de permettre d'évaluer la flore microbienne présente à l'intérieur de ces échantillons par différentes méthodes. Enfin, une évaluation de la santé respiratoire des travailleurs dans une des trois usines visitées. Les microorganismes cultivables ont été évalués et les espèces majoritaires isolées pour identification. Le décompte total de cellules a été réalisé à l'aide de deux méthodes en microscopie à fluorescence. Une extraction d'ADN est nécessaire pour la réalisation des réactions PCR pour la recherche de *Mycobacterium* spp. Les propriétés physico-chimiques des fluides de coupe des trois usines ont aussi été testés.

Cette étude a permis d'étudier la contamination microbienne des fluides de coupe de métaux de 3 usines du Québec à l'aide d'outils jamais utilisés auparavant (microscopie à fluorescence, PCR). Des taux très élevés de contamination bactérienne sont retrouvés dans ces fluides. De même, le pH et la viscosité cinématique sont en accord avec la présence de fluides contaminés. Toutefois, les bactéries retrouvées de façon majoritaire ne semblent pas responsables du développement d'anomalies respiratoires (alvéolite allergique) mais l'hypothèse qu'elles pourraient avoir d'autres impacts sur la santé publique mériterait d'être vérifiée.

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>i</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>ii</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
CONTAMINATION MICROBIENNE DES FLUIDES DE COUPE .....	4
EFFET DE LA CROISSANCE MICROBIENNE DANS LES FLUIDES DE COUPE .....	5
RISQUES POUR LA SANTÉ RESPIRATOIRE DES TRAVAILLEURS RELIÉS À LA CONTAMINATION MICROBIENNE .....	6
<b>OBJECTIFS DES TRAVAUX ET HYPOTHÈSES</b> .....	<b>8</b>
<b>DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE</b> .....	<b>10</b>
CONTAMINATION MICROBIENNE DES FCM SOLUBLES .....	10
PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS .....	10
TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS .....	11
ÉTALEMENT DES ÉCHANTILLONS .....	11
DÉCOMPTE DES UNITÉS FORMATRICES DE COLONIES (UFC) .....	12
ISOLEMENT DES DIFFÉRENTES SOUCHES.....	12
IDENTIFICATION DES BACTÉRIES .....	12
DÉCOMPTE DES BACTÉRIES TOTALES EN FLUORESCENCE.....	12
COLORATION AU DAPI .....	13
ÉVALUATION DE LA VIABILITÉ .....	13
RECHERCHE DE <i>MYCOBACTERIUM</i> SP. ....	14
CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES FLUIDES .....	15
SANTÉ RESPIRATOIRE DES TRAVAILLEURS .....	15
LES CONTRÔLES (TÉMOINS) UTILISÉS POUR LES ESSAIS ELISA SONT DEUX TRAVAILLEURS DE TOURBIÈRES SENSIBILISÉS POUR LES CONTRÔLES POSITIFS ET UN SUJET NON EXPOSÉ COMME CONTRÔLE NÉGATIF. ....	<b>16</b>
<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>17</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>18</b>
MICROBIOLOGIE DES FLUIDES DE COUPES DE MÉTAUX : .....	18
SANTÉ RESPIRATOIRE DES TRAVAILLEURS .....	19

CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES.....	20
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>21</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>21</b>

## **INTRODUCTION**

Depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle, la contamination microbienne des fluides de coupe de métaux (FCM) à base d'eau (FCM solubles) pouvant soutenir la croissance d'une grande quantité de micro-organismes préoccupe les industries qui fabriquent ou utilisent ces huiles. Aux États-Unis, en 1992, 71,5 millions de gallons de FMC ont été produits<sup>16</sup>. On estime que 1,2 million de travailleurs regroupés en 39 secteurs industriels sont exposés aux FCM. Au Québec, en 2000, plus de 8000 travailleurs répartis dans plus de 860 établissements (selon les données de la CSST) utilisent des FCM.

Les FCM sont couramment utilisés dans l'industrie de la transformation du métal et de ses produits dérivés. Le terme « fluide de coupe » englobe des fluides de refroidissement et de lubrification utilisés lors de la transformation du métal. L'utilisation des FCM<sup>5</sup> a pour but de prolonger la vie des instruments de travail, enlever les particules de métal, refroidir la pièce de métal ainsi que l'outil utilisé, lubrifier et traiter le métal. On regroupe donc les FCM selon leurs utilisations en 4 principales catégories soit<sup>9</sup> :

1-Fluide d'enlèvement des particules

2-Fluide de formation du métal

3-Fluide de protection

4-Fluide de traitement

Les différents types de FCM sont aussi classés en quatre groupes selon leur composition soit :

1- Les huiles franches ou minérales : non solubles

2- Les huiles solubles ou émulsifiables : composées d'huiles minérales, végétales ou animales diluées à une teneur de 5-30 % dans l'eau.

3- Les huiles semi-synthétiques : une partie organique et une partie synthétique sont destinées à être diluées dans l'eau.



4- Les huiles synthétiques

Le tableau suivant montre le classement des fluides selon leur utilité et leur composition<sup>7</sup>.

**Classement des fluides selon leurs utilités et leur composition**

<b>Catégorie générale</b>	<b>Utilisation</b>	<b>Formulation</b>
Enlèvement des particules	Machinage, polissage	Franche, soluble, synthétique et semi-synthétique
Formation du métal	Forgement, perçage	Franche, soluble, synthétique et semi-synthétique
Protection	Entreposage	Franche, soluble
Traitement	Pliage	Franche, soluble, synthétique

Les FCM hydrosolubles (dilués dans l'eau) contiennent principalement des huiles minérales (parafiniques ou naphéniques) et une base d'huile à haute densité (animale ou végétale). Les FCM émulsifiés sont composés d'acides gras, d'huiles lourdes ou d'esters. Aux FCM utilisés sous haute pression, des composés sulfurés, chlorés, ou des dérivés phénoliques sont ajoutés<sup>16</sup>.

Des additifs sont employés afin de rendre les FCM plus performants, plus durables et plus spécifiques. Parmi les principaux additifs on retrouve des agents antimoussants et anticorrosifs, des lubrifiants, des émulsifiants et des biocides (antifongiques et antibactériens).

Les FCM peuvent être appliqués manuellement sur la zone de travail ou être appliqués sous forme de vapeur à l'aide d'un conduit d'air à haute vitesse ou encore, un flot continu de FCM est vaporisé à travers une buse grâce à une pompe à faible pression. Un système de distribution est généralement utilisé afin de contrôler le volume de FCM ainsi que la pression avec laquelle il est vaporisé. Par la suite, le fluide est récolté par un système gravitationnel, à vitesse ou par des convoyeurs, et envoyé dans des bassins de décantation dans le but de faire sédimenter les particules contenues dans le fluide souillé (éclats, limailles de métal, rebuts amassés lors de la récupération du FCM<sup>5,14</sup>).

Lors de l'application des FCM, des aérosols peuvent être générés. L'aérosolisation résulte d'une

combinaison de plusieurs facteurs :

- le type de FCM utilisé,
- la pression d'application,
- la nature de la buse,
- la température de la zone de travail,
- le type d'équipement et la vitesse utilisée,
- l'absence de garde éclaboussures,
- le type de ventilation.

Il n'existe présentement aucune norme d'exposition qui tient compte du contenu microbien des FCM. Toutefois, si les fluides sont hautement contaminés par les microorganismes, l'exposition respiratoire des travailleurs risque d'être élevée compte tenu de la formation d'aérosols.

Les aérosols de FCM contiennent un mélange de substances incluant les composantes chimiques de ce dernier ainsi que les additifs. On y retrouve aussi des particules de métal et des contaminants biologiques (des cellules ou parties de cellules, de bactéries, ou de moisissures).

L'organisme américain NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) reconnaît que l'environnement respirable auquel les travailleurs sont exposés, dans ce type de cas, contient des particules de métal, des résidus chimiques, des huiles, des biocides et des contaminants biologiques (toxines bactériennes et produits métaboliques)<sup>14,16</sup>. Cet organisme recommande donc une exposition maximale aux FCM de 0,4 mg/m<sup>3</sup> d'air et ce, pour un quart de travail allant jusqu'à 10 heures par jour à raison de 40 heures par semaine<sup>16</sup>. Cette concentration correspond approximativement à une mesure de 0,5 mg/m<sup>3</sup> de particules totales selon la méthode du NIOSH « Method 0500 »<sup>15</sup>. Cette nouvelle limite (0,4 mg/m<sup>3</sup> d'air) est recommandée dans le but de prévenir les désordres respiratoires associés à l'exposition aux FCM.

Depuis 1970, plus de 70 évaluations de santé des travailleurs ont été réalisées par le NIOSH<sup>16</sup> dans les usines utilisant des FCM. Les désordres les plus fréquemment observés sont des troubles de la peau (irritation, eczéma, acné), suivis d'irritations (nez, gorge, yeux) et des problèmes respiratoires (difficulté à respirer, toux, serrement thoracique). La moyenne des particules totales dans l'air lors de ces études était de 1,23 mg/m<sup>3</sup> (n=21) dans les années 70 et de 1,01 mg/m<sup>3</sup> dans les années 90 (n=3)<sup>16</sup>.

Les problèmes de santé observés peuvent être causés par plusieurs facteurs dont les divers produits retrouvés dans les aérosols. Le facteur qui nous intéresse le plus dans cette étude exploratoire est la contamination microbienne à l'intérieur des FCM solubles.

### **Contamination microbienne des fluides de coupe**

Les origines de la contamination microbienne des FCM peuvent être diverses, la plupart du temps, elle provient de l'environnement de travail. Les déchets alimentaires, mégots de cigarettes et déchets jonchant le plancher sont des exemples d'origines de contamination des fluides. Souvent, on trouvera des espèces microbiennes qui sont des contaminants naturels des cours d'eau<sup>3</sup>. La croissance des bactéries et moisissures peut causer des changements dans la nature et la viscosité du fluide, endommager les joints d'étanchéité et boucher les filtres et les conduits<sup>16</sup>. De plus, la croissance microbienne peut produire et accumuler des toxines et des allergènes dans le FCM<sup>20</sup>.

Afin de contrôler la croissance des micro-organismes, des biocides sont ajoutés aux fluides. Ces biocides font partie de la composition même du FCM et sont ajoutés au besoin au cours de l'utilisation.

Les types de biocides les plus utilisés sont des molécules hydrosolubles qui relâchent du formaldéhyde. Ces agents sont insolubles dans l'huile et sont plus efficaces contre les bactéries que contre les moisissures. Le formaldéhyde est un irritant des voies respiratoires reconnu pour causer de l'asthme occupationnel et est un agent soupçonné cancérigène chez l'homme<sup>16</sup>. Les Grotan®, Onyxide 200®, Busan 1060® et Bioban® GK, sont des biocides larguant du formaldéhyde.

D'autres biocides vont agir en relâchant du phénol qui est aussi un irritant et des nitrosamines qui sont carcinogènes<sup>16</sup>. Ces biocides sont plus efficaces contre les moisissures. Le Sodium Omadine® et le Dowcide® -1 sont des biocides relâchant du phénol. Il existe aussi des biocides dont l'activité est

causée par un relâchement de nitrite comme le Bioban® P-1487 et le Bronopol®. Il est à noter que les nitrites sont des agents potentiellement cancérigènes.

Les agents antimicrobiens se doivent d'être sélectionnés en fonction du type de FCM utilisé. Le pH, la température et le contact avec certains métaux peuvent déstabiliser les agents biocides et amplifier ou inhiber le largage de leurs éléments actifs<sup>16</sup>.

### **Effet de la croissance microbienne dans les fluides de coupe**

Historiquement, les FCM contaminés ont toujours représenté un problème pour les différentes industries impliquées dans la transformation du métal. La croissance microbienne affecte de différentes façons la qualité et la performance des fluides<sup>16</sup>. La dégradation du fluide peut résulter en des changements dans sa viscosité. La production d'acides, résultant de la fermentation, peut acidifier le FCM causant la corrosion des systèmes<sup>16</sup>. Les bactéries anaérobies (plus spécifiquement les sulforéductrices) peuvent produire du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) et autres gaz toxiques et nauséabonds<sup>16</sup>. Par ailleurs la croissance microbienne peut être telle que les filtres, buses et conduits peuvent être colmatés et ainsi interférer avec les opérations de transformation du métal.

Les FCM représentent une excellente source nutritive pour supporter la croissance de bactéries ou de moisissures. Les espèces bactériennes prédominantes dans les FCM solubles sont généralement identiques à celles retrouvées de routine dans les systèmes d'eau naturelle<sup>3</sup>. Elles possèdent une grande diversité nutritionnelle, démontrant une écologie microbienne complexe. Plusieurs espèces, ayant une bonne croissance dans le FCM propre, largueront des déchets qui serviront de nutriments à d'autres espèces ayant des besoins nutritionnels plus restrictifs, modifiant ainsi la composition du FCM et la nature de la charge microbienne<sup>14</sup>. Les conditions environnementales<sup>14</sup> comme le pH alcalin, la température élevée et la présence de métaux favorisent le développement d'une population microbienne capable de croître dans des conditions généralement considérées hostiles pour des micro-organismes.

Le contrôle de la population microbienne par l'ajout de biocide contribue à l'émergence de souches résistantes aux différents agents actifs des biocides<sup>17</sup>. Des interactions complexes entre les différentes espèces retrouvées dans les FCM peuvent favoriser la résistance globale de la charge microbienne. De plus, l'élimination comme l'apparition d'un groupe de micro-organismes peut permettre la croissance

de nouvelles espèces. Tous ces facteurs contribuent à l'établissement d'une communauté microbienne unique dont la composition est en changement continu.

### **Risques pour la santé respiratoire des travailleurs reliés à la contamination microbienne**

En plus de causer des problèmes de qualité et une usure prématurée des systèmes de FCM, cette croissance microbienne peut causer un risque pour les travailleurs exposés. Bien que peu d'études aient tenté de caractériser la flore microbienne des FCM, nous disposons de quelques références à ce sujet. Tant et Benett (1956)<sup>19</sup> ont isolé plus de 29 différentes espèces bactériennes d'un FCM soluble incluant plusieurs souches pathogènes et potentiellement pathogènes. La plupart du temps, le genre bactérien retrouvé est *Pseudomonas sp.* (*P.aeruginosa*, *P.oleovorans*). D'autres espèces comme *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* et *Enterobacter aerogenes* sont aussi fréquemment retrouvées<sup>12,13</sup>.

Le genre bactérien le plus souvent retrouvé étant *Pseudomonas* mais, il est important de mentionner que les infections à des bactéries du genre *Pseudomonas* sont très rares chez les personnes saines. Dans certains systèmes, on a compté jusqu'à  $1 \times 10^7$  UFC (unité formatrice de colonie)/ml et aucune des personnes en contact avec ce FCM n'avait d'infection à une souche du genre *Pseudomonas*<sup>12,13</sup>.

Toutefois, les infections ne sont pas le seul risque pour la santé des travailleurs. Toutes les cellules microbiennes produisent des antigènes (protéines ou polysaccharides) qui stimulent le système immunitaire. Une seule exposition à un antigène peut résulter en une sensibilisation à celui-ci. Si la personne sensible est re-exposée, une réponse allergique ou d'hypersensibilité peut subvenir et ce, à des doses sans effet pour des personnes non-sensibilisées<sup>7</sup>.

Les réactions allergiques causées par des antigènes inhalés peuvent être de nature différente : allergies de type I (rhinite allergique et asthme allergique) ou retardées (alvéolite allergique). L'intérêt porté à l'alvéolite allergique extrinsèque (aussi appelé pneumonite d'hypersensibilité) relié à l'exposition aux FCM est récent. La première étude à mettre à jour des problèmes d'alvéolite allergique dans les usines automobiles est celle de Bernstein et al. (1995)<sup>2</sup>. L'étude porte sur un petit atelier et implique six travailleurs atteints d'alvéolite allergique suite à l'introduction d'un nouveau fluide de coupe. Les symptômes et autres anomalies disparaissent après que les travailleurs aient été retirés de leurs milieux

de travail (et un traitement aux corticostéroïdes pour deux d'entre eux). Un échantillon de FCM a permis de trouver une contamination microbienne. Chacun des six travailleurs avaient des anticorps sériques dirigés contre le *Pseudomonas fluorescens*.

Rose et al. (1996)<sup>18</sup> rapportent six cas d'alvéolite allergique additionnels confirmés à l'aide de biopsies pulmonaires. Cette étude visait des travailleurs du milieu automobile et ce, dans trois ateliers différents. Dans tous les cas, les problèmes respiratoires symptomatiques et périodiques étaient relatés chez les travailleurs utilisant des FCM solubles à leur poste de travail.

Suite aux résultats publiés par Bernstein et al. (1995)<sup>2</sup> et Rose *et al.* (1996)<sup>18</sup>, une étude plus vaste subventionnée par UAW-Daimler Chrysler a été entreprise. Les travaux de Kreiss et Cox-Ganser (1997)<sup>11</sup> consistaient en un suivi de 8 ateliers d'usinage en industrie automobile. Lors de ce suivi, 98 cas d'alvéolite allergique ont été décrits. Trois conclusions générales peuvent être tirées de l'étude de Kreiss.

- 1- Un risque d'alvéolite allergique est associé à l'utilisation de FCM solubles si ces derniers sont contaminés par une flore microbienne prédominante indésirable (mycobactéries).
- 2- La plupart des cas rapportés sont apparus chez des travailleurs exposés à des concentrations de FCM aérosolisé inférieures à 0,5 mg/m<sup>3</sup> d'air (norme américaine).
- 3- Un agent pouvant causer l'alvéolite allergique a été retrouvé dans quatre des six ateliers testés (2 ateliers n'ont pas été testés). Il s'agissait ici d'une mycobactérie : *Mycobacterium chelonae*.

Jusqu'à récemment, les cas d'alvéolite allergique pouvaient sembler relativement inhabituels. Toutefois, cette maladie n'a pas été systématiquement étudiée chez les travailleurs exposés aux FCM. L'émergence récente de cas diagnostiqués dans les usines utilisant des FCM solubles stimule la recherche dans ce domaine. Il est possible que l'alvéolite allergique soit présente depuis toujours chez les travailleurs exposés aux FCM mais n'a jamais été diagnostiquée parce qu'elle est difficile à déceler et est souvent confondue avec d'autres maladies aux symptômes similaires (infections respiratoires, influenza). La seule solution lors de la détection d'alvéolite allergique est le retrait du milieu de travail (contact avec l'antigène) et parfois un traitement aux corticostéroïdes.

Les études disponibles dans la littérature n'ont utilisé que des méthodes classiques de culture de micro-organismes. Les décomptes étant basés sur les micro-organismes cultivables, les cellules mortes et les cellules vivantes mais non cultivables sont donc non répertoriées dans ces décomptes, menant à une sous estimation du nombre de micro-organismes pouvant induire des réactions d'hypersensibilité comme l'alvéolite allergique<sup>21</sup>.

Toutefois, de nouvelles techniques de coloration à l'aide de molécules fluorescentes ainsi que des outils informatiques puissants nous permettent d'obtenir des comptes cellulaires beaucoup plus proches de la réalité et, de cette façon, d'estimer avec une plus grande précision le risque réel auquel les travailleurs sont exposés. De plus, les techniques de biologie moléculaire permettent la détection des micro-organismes spécifiquement ciblés (mycobactéries) et ce, dans un temps beaucoup plus court.

### **Objectifs des travaux et hypothèses**

Nous voulions déterminer, à partir de cette étude exploratoire, s'il est possible de mesurer des niveaux de contamination microbienne à l'intérieur des FCM solubles assez élevés pour justifier la poursuite de la recherche dans ce domaine. Plus spécifiquement, les objectifs étaient :

O1 : Évaluer, en utilisant des techniques d'analyse de pointe, les niveaux de contamination microbienne à l'intérieur des fluides de coupe de métaux solubles dans trois usines du Québec. Bien qu'il n'existe aucune norme concernant la contamination des fluides, il devient donc possible de poser des hypothèses relatives aux niveaux d'exposition respiratoires des travailleurs et de vérifier si une étude plus exhaustive des usines utilisant des FCM solubles s'avère nécessaire.

H<sub>1</sub> : Les fluides de coupe de métaux des usines québécoises sont hautement contaminés par les bactéries et il est possible que les travailleurs soient exposés à de hauts niveaux de bioaérosols.

O<sub>2</sub> : Établir les caractéristiques physico-chimiques des fluides solubles utilisés dans ces trois mêmes usines. Les données ainsi obtenues permettront d'établir s'il y a un lien entre la dégradation microbienne et les changements des caractéristiques physico-chimiques des fluides solubles.

H<sub>2</sub> : La croissance microbienne dans un FCM modifie ses caractéristiques physico-chimiques initiales.

O<sub>3</sub> : Étudier la santé respiratoire des travailleurs d'une (1) usine dans laquelle nous aurons prélevé le FCM afin d'en analyser son contenu microbien.

H<sub>3</sub> : Bien qu'aucune étude québécoise n'ait porté sur l'étude de la santé des travailleurs manipulant les FCM solubles, il est possible que des problèmes de santé respiratoires soient présents. À niveaux d'exposition comparables, les problèmes de santé rencontrés seront les mêmes que dans les études d'usines américaines.



## **DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE**

### **Contamination microbienne des FCM solubles**

La présente étude exploratoire portait sur trois ateliers d'usinage où l'on utilise des FCM solubles. Les différents ateliers ont été choisis selon leur taille. Les travaux ont été réalisés dans un grand atelier (environ 40 travailleurs), un atelier de grandeur moyenne (environ 10 travailleurs) et un atelier de petite taille (moins de 5 travailleurs). En outre, seulement des fluides utilisés depuis au moins 60 jours ont été prélevés. À cette étape, nous n'avons pas considéré le type de biocide ou d'activité comme étant déterminants. Ces aspects seront considérés dans une étude ultérieure, si nécessaire.

Dans chacun des ateliers, des échantillons de FCM ont été prélevés par des représentants de l'ASP Métal Électrique et de l'IRSST. La prise d'échantillons de FCM solubles avait pour objectif de permettre d'évaluer la flore microbienne présente à l'intérieur de ces échantillons. Les différentes techniques utilisées nous ont permis de quantifier le nombre de micro-organismes et d'en évaluer la viabilité.

Enfin, une évaluation de la santé respiratoire des travailleurs dans une des trois usines visitées (la plus grande) a été effectuée. Cette évaluation a permis d'obtenir des données préliminaires concernant l'état de la santé respiratoire des travailleurs manipulant des FCM.

### **Prélèvement des échantillons**

La prise des échantillons a été faite en triplicata et ce à raison de 200 ml /échantillon. Les différents échantillons prélevés devaient être des FCM solubles utilisés depuis plus de 60 jours. Le temps d'utilisation du fluide, la quantité hebdomadaire utilisée ou rajoutée, la température et le nom et la concentration de tout additif rajouté, tel les biocides, ont été systématiquement colligés. Les fluides neufs, non dilués, non utilisés ont également été prélevés afin de vérifier la contamination bactérienne de ceux-ci avant utilisation. À la suite des prélèvements, les échantillons ont été placés sur la glace (4°C) pour la durée du transport jusqu'au laboratoire où ils ont été analysés.

## Traitement des échantillons

Lors de leur arrivée au laboratoire, les différents échantillons ont été aliquotés à raison de 50 ml/aliquote. Tous ces aliquotes ont été conservés dans un réfrigérateur à une température de 4°C. L'utilisation des différents aliquotes s'est faite tel que présenté au tableau 1 :

**Tableau 1 : Méthodes utilisées afin de caractériser la microbiologie des fluides de coupe de métaux.**

Méthodes	Objectif
Réaction en chaîne de la polymérase (PCR)	Détection des mycobactéries
Étalement sur gélose	Isolement et identification des bactéries et/ou moisissures
Microscopie à épifluorescence	Compte microbien total et évaluation de la viabilité

## Étalement des échantillons

Les étalements ont été effectués en triplicata, et ce à trois dilutions différentes. Les différentes dilutions étalées étaient de l'ordre de  $10^0$  jusqu'à  $10^{-6}$  et ont été réalisées dans de l'eau physiologique (NaCl 0,85%). Les milieux suivants ont été utilisés:

**Tableau 2 : Milieux de cultures et utilisation**

Types de milieux	Éléments microbiens recherchés	Conditions d'incubation
R2A	Bactéries mésophiles associées aux milieux aquatiques	25°C aérobie
R2A	Bactéries anaérobies associées aux milieux aquatiques	25 °C anaérobie
BHI	Bactéries mésophiles associées à la flore humaine	35 °C aérobie
Gélose sang	Bactéries anaérobies associées à la flore humaine	35 °C aérobie

RBA (rose bengal)	Moisissures mésophiles	25 °C
Middlebrook 7H10	Mycobactéries	35 °C aérobie (2,5% CO <sub>2</sub> )

Note : Chaque étalement a été réalisé en déposant 100µl de chaque dilution sur les différentes géloses.

### **Décompte des unités formatrices de colonies (UFC)**

Le nombre d'UFC a été calculé à l'aide des boîtes où la croissance était observée. La dilution utilisée était celle où l'on retrouvait entre 30 et 300 colonies/gélose. Par la suite la moyenne des trois comptes (triplicata) a été réalisée et le résultat final a été exprimé en UFC/ml d'échantillon sur les différents milieux à l'aide du calcul suivant :

$$\text{Moyenne / volume étalé (100}\mu\text{l)} \times 1/\text{facteur de dilution}$$

### **Isolement des différentes souches**

Les différentes espèces de micro-organismes retrouvées sur les différents milieux utilisés ont été repiquées et isolées sur milieux R2A et BHI. Ces souches étaient conservées en géloses inclinées à 4°C. Lorsque le temps de conservation a atteint 45 jours, les différents isolats ont été repiqués en milieux frais et après croissance, placés dans un milieu de conservation contenant 10% de glycérol et conservés à -70°C jusqu'à l'identification.

### **Identification des bactéries**

Les tests de base soit la coloration de Gram, coloration Ziehl-Neelsen, la catalase et l'oxydase ainsi que les observations générales tant microscopiques que macroscopiques ont été réalisés sur chaque souche. Les souches bactériennes majoritaires ont été identifiées à l'aide de l'analyse des acides gras membranaires (CFA) par chromatographie en phase gazeuse et du logiciel Sherlock disponibles à l'IRSST.

### **Décompte des bactéries totales en fluorescence**

Le décompte total de cellules a été réalisé à l'aide de deux méthodes en microscopie à fluorescence,

soit les colorations DAPI et LIVE/DEAD *Baclight* (Molecular Probes, Eugene, OR).

### **Coloration au DAPI**

Cette technique permet de colorer toutes les cellules ayant de l'ADN. Les différents échantillons ont été observés en microscopie en épifluorescence avec un spectre d'excitation de 358nm et une émission à 461 nm (bleu). La technique consiste à réaliser différentes dilutions de façon similaire à celles réalisées lors des étalements. Par la suite 1 ml des différentes dilutions est incubé en présence du colorant (concentration finale de 30 nM) pour une période de 10 minutes. Après coloration, l'échantillon est filtré sur une membrane de polycarbonate (noir) de 0,22µm. La membrane est placée entre lame et lamelle et observée en épifluorescence.

La dilution choisie est celle où l'on observait entre 30 et 300 événements par champ optique. Par la suite, 10 champs ont été photographiés aléatoirement et ce pour chaque réplicat. Le décompte s'est fait en calculant la moyenne des événements pour chaque réplicat. À l'aide du rapport de l'aire de filtration/aire d'un champ optique (20516) et connaissant le volume filtré ainsi que la dilution utilisée, il était possible de connaître la concentration cellulaire des échantillons et de l'exprimer en cellules totales/ml à l'aide de la formule suivante :

### **Moyenne des événements X 20516 X 1/facteur de dilution**

Ce test permet d'obtenir des comptes beaucoup plus proches de la réalité que les étalements sur gélose car les cellules mortes et les cellules non-cultivables sont intégrées dans le compte et ce dans un très court délai.

### **Évaluation de la viabilité**

La viabilité a été observée à l'aide de la coloration différentielle LIVE/DEAD *Baclight* (Molecular Probes, Eugene, OR) basée sur l'intégrité membranaire des cellules. Ce test utilise deux colorants, le SYTO 9, qui pénètre toutes les cellules mortes ou vivantes et les colore en vert avec un spectre d'émission de 500 nm. Le deuxième colorant, l'iodure de propidium (IP), est un colorant rouge avec un spectre d'émission de 635 nm qui ne peut pénétrer les cellules dont la membrane est intacte et donc colore seulement les cellules dont l'intégrité membranaire est perturbée (mortes). L'IP étant un colorant

plus fluorescent que le SYTO 9, les cellules mortes doubles positives apparaissaient en rouge et les cellules ayant des membranes intactes simples positives au SYTO 9 apparaissaient en vert.

La préparation des échantillons et les décomptes ont été effectués de façon similaire à la coloration DAPI. Le rapport de cellules vertes sur les cellules totales donne un indice de viabilité cellulaire. Les informations obtenues à l'aide de cette technique procurent des informations supplémentaires sur la nature de l'échantillon et permettent de comparer les résultats obtenus en culture avec ceux obtenus en épifluorescence.

### **Recherche de *Mycobacterium* sp.**

#### **Extraction de l'ADN des échantillons :**

Une extraction d'ADN est nécessaire pour la réalisation des réactions PCR. Pour ce faire, 2 ml d'échantillon ont été lavés à deux reprises à l'aide de PBS 1X (centrifugation à 13000 rpm), le culot digéré à l'aide de protéinase K (Sigma) à une température de 50°C et ce, pour une période de 2 heures, incubés à 100°C pendant un total de 30 minutes (3 X 10 min) dans 500 µl d'une solution contenant du DNAzol (Invitrogen, Missisoga, ON) et 15% de Chelex 100 (Bio-rad laboratories, San Diego, CA). Finalement 500 µl de DNAzol exempt de Chelex 100 ont été ajoutés.

Une précipitation à l'éthanol a été effectuée conformément aux recommandations du fabricant. L'ADN total a été resuspendu dans 50 µl de tampon TE (Tris 0.2M, EDTA 0.05M), dosé au spectrophotomètre et exprimé en µg/ml. Les extraits d'ADN peuvent être conservés à -20 °C et utilisés ultérieurement.

#### **Réaction PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Une réaction PCR (qualitative) a été réalisée sur l'ADN total extrait des différents échantillons de FCM solubles. Les amorces utilisées sont spécifiques à une région très conservée chez toutes les cellules du genre *Mycobacterium* soit les gènes codant pour l'ARNr 16s. Ces amorces sont d'une longueur de 18 nucléotides. Leur séquence est la suivante :

pMyc14 (5'-GRGRTACTCGAGTGGCGAAC-3') (R = A ou G)

pMyc7 (5'-GGCCGGCTACCCGTCGTC-3')

L'amplicon résultant de cette amplification sera d'une longueur de 212 paires de bases.

Après l'amplification, une partie du mélange PCR a été déposée sur un gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium (50µg/ml). Après migration à 70 V pendant 2 heures, le gel a été observé sous lampe U.V. afin de confirmer l'amplification. Un résultat positif indiquait la présence de bactéries du genre *Mycobacterium*. sp.

Le présent protocole a été mis au point sur des fluides de coupe de métaux solubles contaminés par *Mycobacterium chelonae* et ayant fait l'objet d'éclosion d'AAE dans une autre étude. Lors de cette étude, le protocole PCR a détecté des quantités de mycobactéries présentes dans les FCM aussi basses que  $10^3$  ufc/ml de fluide<sup>10, 21</sup>.

### **Caractéristiques physico-chimiques des fluides**

Les fluides de coupe des trois usines ont été testés par le laboratoire d'étanchéité de l'École de technologie supérieure (ETS) de l'Université du Québec à Montréal. La viscosité cinématique et le pH ont été mesurés.

La mesure de la viscosité cinématique a été effectuée à l'aide d'un viscomètre à tube du type Canon-Fenske Opaque selon les normes ASTM (American Society for Testing and Materials) D445 et D446<sup>1</sup>. Pour chaque fluide de coupe, la mesure a été répétée à trois reprises. Tous les essais ont été répétés deux fois. Les fluides à l'état neuf et usagé depuis au moins 60 jours ont été testés. Le rapport de dilution des fluides neufs a été effectué selon les proportions utilisées en usine.

Le pH a été mesuré de deux façons différentes. La première a consisté à le mesurer avec un papier indicateur. La deuxième mesure, plus précise, a été possible grâce à l'utilisation d'un indicateur électronique (Hanna instruments, Laval, Québec). Cet appareil est calibré avec des solutions standard de pH connus.

### **Santé respiratoire des travailleurs**

Afin d'évaluer la santé respiratoire des travailleurs, les tests suivants ont été effectués chez les travailleurs d'une des trois usines :

**Tableau 3. Tests respiratoires effectués**

Test	Utilité
Prise de sang veineux (volet 1)	Permet de doser la quantité d'anticorps (IgG) aux micro-organismes retrouvés dans les FCM recherchés par la méthode d'ELISA <sup>6</sup>
Test de fonction respiratoire CVF et VEMS (volet 1)	Évalue la capacité respiratoire et permet de comparer avec des données standardisées
Test d'allergie (volet 1)	Vérifie l'atopie
Questionnaire standardisé (volet 1)	Décrit l'état de santé respiratoire et l'histoire médicale
Lavage bronchoalvéolaire (volet 2)*	Analyse les cellules inflammatoires des poumons
Tomodensitomètre axial thoracique à haute résolution (Taco) (volet 2)*	Vérifie la présence d'infiltrations interstitielles ou alvéolaires

\* Chez cinq travailleurs considérés comme plus à risque (voir section résultats)

Les contrôles (témoins) utilisés pour les essais ELISA sont deux travailleurs de tourbières sensibilisés pour les contrôles positifs et un sujet non exposé comme contrôle négatif.

## RÉSULTATS

La figure 1 présente les concentrations de microorganismes obtenues à partir de la culture pour chaque milieu utilisé ainsi que la valeur moyenne. Aucune croissance n'a été obtenue à partir des géloses en anaérobie et les géloses pour le recouvrement des moisissures. Ces données ne sont donc pas présentées. Les 3 milieux de culture ont donné sensiblement les mêmes résultats. Le fluide de l'usine 3 est le plus contaminé et montre un taux moyen de  $1 \times 10^9$  UFC/ml de fluide. Les résultats moyens obtenus en culture sont comparés aux résultats obtenus en microscopie à épifluorescence à la figure 2. Tel que démontré dans plusieurs études<sup>8,21</sup>, les comptes en fluorescence sont beaucoup plus élevés que ceux obtenus en utilisant la culture : le taux de recouvrement de la culture peut être aussi bas que 0,3%. La viabilité bactérienne, évaluée à l'aide de la trousse LIVE/DEAD *Baclight* est basse mais n'explique pas l'écart de mesure entre la culture et la fluorescence (Tableau 4). L'état moribond ou quiescent des bactéries pourrait expliquer un tel écart. L'identité des bactéries isolées à partir des milieux de culture a été établie à partir d'analyse des acides gras membranaires et est présenté au tableau 5. Parmi ces isolats, certains étaient majoritaires et ont servi à l'analyse des sérums des travailleurs lors de la mesure des IgG.

La présence de mycobactéries dans les fluides de coupe a été vérifiée à l'aide de deux méthodes : la culture et le PCR. Aucune de ces méthodes n'a permis de détecter de mycobactéries dans les fluides (tableau 6).

Les travailleurs de l'usine #2 ont été rencontrés afin d'évaluer leur santé respiratoire puisque cette usine démontrait des taux très élevés de bactéries en microscopie à épifluorescence dans les fluides, de faibles taux de recouvrements et que l'usine avait accepté que l'étude de la santé des travailleurs ait lieu. Sur la base de certains résultats obtenus lors du volet 1 de l'étude de santé, certains travailleurs ont été convoqués afin de subir des tests plus complets (volet 2).

Le tableau 7 montre les résultats des tests d'allergie (atopie) (détails, voir annexe 1), la présence de symptômes respiratoires reliés au travail, les tests de fonctions respiratoires (VEMS et CVF), les habitudes de tabagisme et les résultats combinés des autres tests effectués à l'Hôpital Laval (volet 2).

Les mesures d'IgG sériques ont été réalisées chez les mêmes travailleurs par la méthode ELISA dirigé



contre des extraits protéiques totaux obtenus à partir des souches microbiennes isolées du FCM de l'usine #2. Les données sont résumées au tableau 7 et présentées en détail aux annexes 2, et 3. Les résultats des analyses de viscosité cinématique et de pH se retrouvent au tableau 8.

## **DISCUSSION**

### **Microbiologie des fluides de coupes de métaux :**

À la lecture des résultats, tant en culture qu'en microscopie à fluorescence, on constate que les échantillons de FCM reçus étaient très contaminés par les bactéries. On remarque que ces comptes sont largement supérieurs à l'eau traitée des villes ( $\approx 500$  ufc/ml). Ils sont plutôt comparables à des eaux usées ( $\approx 1 \times 10^8$  ufc/ml). Le travail en présence de fluide contaminé semble mener à une exposition à des bioaérosols générés lors du machinage puisque les anticorps dirigés contre les bactéries majoritaires retrouvées dans les fluides supportent l'hypothèse que les travailleurs ont été exposés à ces bactéries.

Nous sommes aussi en mesure d'observer que les comptes de cellules en cultures sous-estiment grandement la population réelle présente dans les échantillons. Les taux de recouvrement par culture sont aussi bas que 0,3% dans le cas de l'usine #2. Il est important de souligner que même si la culture ne permet pas une bonne estimation des taux de contamination, elle est essentielle afin d'isoler et de caractériser la population microbienne. Aussi, la mesure des anticorps passe nécessairement par la purification des souches microbiennes auxquelles les travailleurs sont exposés. L'identité de la population non-cultivée reste toutefois inconnue. Le faible taux de viabilité bactérienne observé dans les échantillons de l'usine #2 à l'aide de la trousse LIVE/DEAD *Baclight* (Molecular Probes) peut être expliqué par le contrôle rigoureux et l'utilisation massive de biocides. Il est donc fort probable que les biocides contribuent à tuer une partie de la population microbienne mais, de toute évidence, ne permettent pas un contrôle de leur propagation puisque les taux observés étaient très élevés. Les méthodes de gestion des fluides ne semblent pas adéquates à réduire les taux de contamination.

Nous n'avons pas isolé ou détecté de bactéries appartenant au genre *Mycobacterium* dans les échantillons provenant des 3 usines. Puisque les méthodes utilisées se sont montrées efficaces pour

détecter ces microorganismes dans plusieurs échantillons provenant d'autres usines que celles à l'étude, nous savons que les résultats sont fiables<sup>10</sup>. Il est toutefois possible qu'une quantité de mycobactéries plus faibles que la limite de détection soit présente dans les fluides. Une étude publiée<sup>22</sup> ainsi que des travaux effectués par notre équipe ont démontré que les espèces ciblées (*Mycobacterium immunogenum* et *Mycobacterium chelonae*) sont très difficiles à cultiver, que la biochimie et les besoins nutritionnels de ces espèces ainsi que l'écologie des fluides de coupe sont très méconnus. Pour ces raisons, nous avons utilisé le PCR, outil jamais utilisé dans les fluides de coupe jusqu'à maintenant et complément essentiel de la culture pour la détection des mycobactéries.

### **Santé respiratoire des travailleurs**

Les tests d'allergies cutanées aident à expliquer certains résultats observés. L'examen des fonctions respiratoires des travailleurs démontre des valeurs abaissées chez 3 travailleurs. Chez ces travailleurs, d'autres facteurs (tels l'asthme allergique et le tabac) peuvent expliquer cette baisse de fonctions.

Les IgG retrouvés dans le sang des travailleurs peuvent avoir deux significations. Premièrement, ces anticorps peuvent être considérés comme un indice d'exposition à certains antigènes. Ces marqueurs d'exposition diminuent de façon graduelle lors de la cessation de l'exposition. Un taux élevé d'IgG sériques signifie une exposition récente et intense à certains antigènes. Deuxièmement, les IgG sériques peuvent servir de détermination d'agent responsable de l'alvéolite allergique. Cinq travailleurs possédaient des IgG spécifiques aux souches bactériennes majoritaires du FCM et ont été recrutés afin de subir un examen complet incluant tomodensitométrie axiale à haute résolution, lavage bronchoalvéolaire et auscultation afin de déterminer la signification des IgG. Aucune anomalie n'a été détectée chez ces travailleurs. La présence d'IgG ne semble donc pas reliée à une alvéolite allergique.

Quatre travailleurs ont admis souffrir de symptômes respiratoires reliés au travail (essoufflement, fièvre, frissons, silements). Ces symptômes s'atténuent lors de l'arrêt de travail. Un de ces travailleurs possédait des IgG contre les souches bactériennes majoritaires du fluide tandis que les autres ne démontraient pas de sensibilisation. Ces travailleurs n'ont pas de baisses de leurs fonctions respiratoires.

Les bactéries retrouvées dans le fluide de l'usine #2 ne semblent donc pas induire d'alvéolite

allergique. Toutefois, la présence de *Pseudomonas* sp. dans les muqueuses nasales des travailleurs devrait être étudiée afin de vérifier l'hypothèse qu'une exposition massive à ce pathogène opportuniste pourrait favoriser sa propagation dans le public en général et ainsi avoir un impact de santé publique. Cette question demeure entière et devra être solutionnée dans une étude ultérieure.

Les conditions qui favorisent la contamination des fluides de coupe et déterminent la nature des contaminants sont méconnues. Il est essentiel de mieux documenter l'écologie microbienne de ces fluides en étudiant de façon plus exhaustive plusieurs systèmes de taille différente et subissant une gestion différente afin de mieux comprendre et déterminer les conditions favorables à la croissance microbienne et à l'établissement de certaines populations, telles les mycobactéries. Le choix du biocide utilisé<sup>3</sup> est une piste intéressante qui pourrait expliquer les caractéristiques de colonisation bactérienne. Plusieurs fluides de coupe provenant d'autres études que nous effectuons ont démontré de très hautes concentrations de mycobactéries. Nous devons comprendre les facteurs favorisant cette situation.

### **Caractéristiques physico-chimiques**

La mesure de la viscosité cinématique d'un fluide de coupe avant et après son utilisation permet une surveillance de sa dégradation<sup>4</sup>. Cette dégradation serait causée principalement par la dégradation bactérienne des fluides<sup>4</sup>. Les résultats présentés au tableau 8 montrent une diminution de la viscosité de l'ordre de 8% pour les fluides des usines # 1 et 2. Le FCM de l'usine 3 montre, quant à lui, une augmentation de la viscosité de la même valeur. Nous avons donc réalisé un essai supplémentaire avec une dilution différente de celle rapportée (30 :1), telle que recommandée par le fournisseur. La variation est passée à 4%. Le rapport de dilution utilisé par l'entreprise doit donc être vérifié avant de pouvoir émettre une conclusion finale.

Cette dégradation bactérienne des fluides influence aussi le pH. De fait, la dégradation bactérienne contribue à diminuer le pH original<sup>4,16</sup>. En outre, un pH entre 7 et 9 est favorable au développement des bactéries<sup>4</sup>. Le tableau 8 montre que le pH des trois fluides a diminué en moyenne de 15%; situation qui tend à favoriser le développement des bactéries.

## **CONCLUSION**

Aucune donnée scientifique n'est disponible concernant la contamination microbienne des fluides de coupe de métaux des usines québécoise et les données américaines démontrent des lacunes concernant cet aspect. La mauvaise utilisation des outils disponibles tels la biologie moléculaire et le manque de connaissances concernant la microbiologie des fluides expliquent ces lacunes. La caractérisation de l'exposition aux bioaérosols dans les usines utilisant les fluides de coupe de métaux et l'étude des risques encourus par les travailleurs passent par une meilleure compréhension de l'écologie microbienne des fluides et son contrôle.

Cette étude a permis d'étudier la contamination microbienne des fluides de coupe de métaux de 3 usines du Québec à l'aide d'outils jamais utilisés auparavant (microscopie à fluorescence, PCR). Des taux très élevés de contamination bactérienne sont retrouvés dans ces fluides et ce, malgré un système de gestion très rigoureux et sévère (usine #2). De même, le pH et la viscosité cinématique sont en accord avec la présence de fluides contaminés. Toutefois, les bactéries retrouvées de façon majoritaire ne semblent pas responsables du développement d'anomalies respiratoires (alvéolite allergique) mais l'hypothèse qu'elles pourraient avoir d'autres impacts sur la santé publique mériterait d'être vérifiée.

L'exposition à de hautes concentrations de bactéries peut avoir plusieurs impacts sur la santé humaine. Dans la littérature scientifique, le développement d'alvéolite allergique semble relié à la présence de *Mycobacterium chelonae*. Les conditions encourageant ou empêchant la croissance des mycobactéries et autres micro-organismes doivent être étudiées afin de proposer des solutions applicables à l'ensemble des systèmes de fluides de coupe de métaux.

## **RÉFÉRENCES**

1. **American Society for Testing and Materials (ASTM). (1997).** Specifications and operating instructions for glass capillary kinematic viscometers. Designation D 446 – 97, ASTM, Philadelphia, PA, pp. 194-197.
2. **Bernstein, DI, Lummus ZL, et al. (1995).** “Machine operator’s lung. A hypersensitivity pneumonitis disorder associated with exposure to metalworking fluid aerosols.” *Chest* 108(3) :

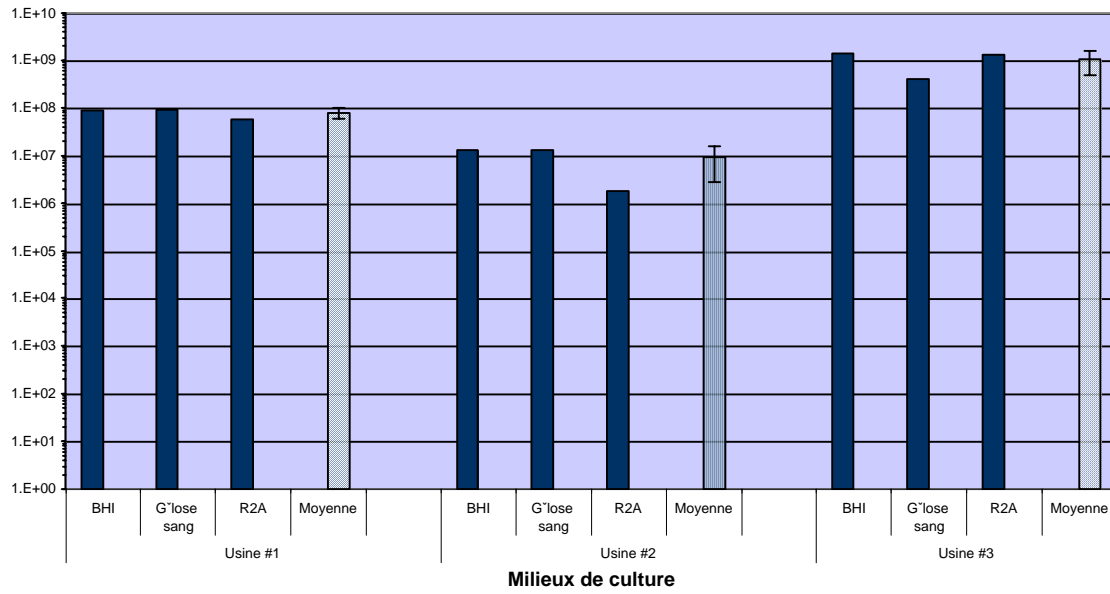
- 636-41.
3. **Carson LA, NJ Petersen, et al. (1978).** “Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants.” *Appl Environ Microbiol* 36(6) : 839-46.
  4. **Centre Technique des Industries Mécaniques (CETIM). (1989).** Guide d’emploi des fluides de coupe. Guide pratique. 2<sup>ème</sup> édition, CETIM, Cedex, France, 136 pages.
  5. **Cookson JO (1977).** An introduction to cutting fluids. *Tribiol. Int.* 10: 5-7.
  6. **Cormier Y, Mériaux A, and C Duchaine (2000).** Respiratory impact of working in eastern Canadian sawmills. *Archives of Environmental Health* 2000: 55: 424-430.
  7. **Eduard W, P Sandven, et al. (1992).** Relationships between exposure to spores from *Rhizopus microsporus* and *Paecilomyces variotii* and serum IgG antibodies in wood trimmers. *Int Arch Allergy Immunol* 97(4): 274-82.
  8. **Forest P, Mériaux A, Barbeau J and Duchaine C (2001).** Bioaerosol exposure in dental offices: usefulness of culture methods in comparison with fluorescence microscopy for the assessment of exposure. American Society for Microbiology 101<sup>st</sup> General Meeting, May 20-24 2001, Orlando, FL, USA.
  9. **Foxall-Vanaken (1986).** Common Components of Industrial Metal-working Fluids as Sources of Carbon for Bacterial Growth. *Appl Environ Microbiol* 51(6): 1165-1169.
  10. **Gordon T, Veillette M, Thorne PS, C Duchaine (2002).** Influence of Dynamic Changes in Chemical and Microbiological Characteristics on Metal Working Fluid Toxicity. Health effects of mineral oil mist and metalworking fluids Symposium, ACGIH worldwide, October 02-04 2002, Cincinnati, OH, USA.
  11. **Kreiss K and J Cox-Ganser (1997).** Metalworking fluid-associated hypersensitivity pneumonitis: a workshop summary. *Am J Ind Med* 32(4): 423-32.

12. **Mattsby-Baltzer I, Edebo L, et al. (1990).** Subclass distribution of IgG and IgA antibody response to *Pseudomonas pseudoalcaligenes* in humans exposed to infected metal-working fluid. *J Allergy Clin Immunol* 86(2): 231-8.
13. **Mattsby-Baltzer, I., L. Edebo, et al. (1989).** Serum antibodies to *Pseudomonas pseudoalcaligenes* in metal workers exposed to infected metal-working fluids. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 88(3): 304-11.
14. **Mattsby-Baltzer I, M Sandin, et al. (1989).** Microbial growth and accumulation in industrial metal-working fluids. *Appl Environ Microbiol* 55(10): 2681-9.
15. **National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) (1984).** Health hazard evaluation report: Torrington, Connecticut. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Center for Disease Control, NIOSH Report No. HHE 82-107-1444
16. **National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) (1998).** *Criteria for a recommended standard: Occupational Exposure to Metalworking Fluids* (DHHS [NIOSH] Publication no.98-102). Cincinnati, Ohio
17. **Pelletier PA, GC du Moulin, et al. (1988).** Mycobacteria in public water supplies: comparative resistance to chlorine. *Microbiol Sci* 5(5): 147-8.
18. **Rose C, Robins T, Harkaway P (1996).** Biopsy-Confirmed Hypersensitivity Pneumonitis in Automobile Production Workers Exposed to Metalworking Fluids - Michigan, 1994-1995. *MMWR* 45(28): 606-610.
19. **Tant CO and EO Benett (1956).** The isolation of pathogenic bacteria from used emulsion oils. *Appl Microbiol* (4): 332-338.
20. **Thorne PS and JA DeKoster (1996).** Pulmonary effects of machining fluids in guinea pigs and mice. *Am Ind Hyg Assoc J* 57(12): 1168-72.
21. **Veillette M, Thorne PS, O'Neill M, Mueller-Anneling L, Lester B, Gordon T and C**

**Duchaine (2002).** Six months follow-up of microbial contamination in metalworking fluid system after dumping, cleaning and recharging. American Thoracic Society Meeting, May 17-22 2002, Atlanta, GA, USA.

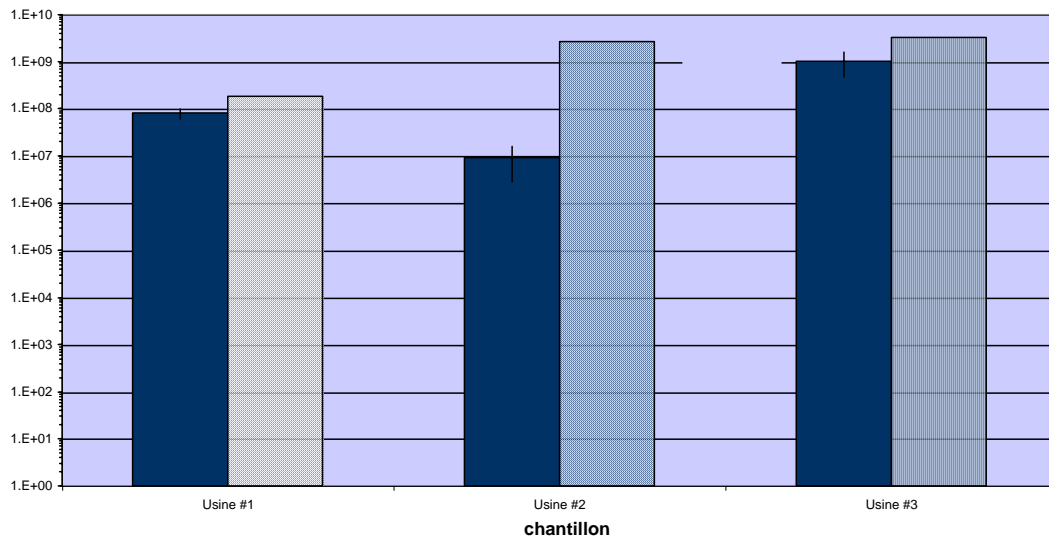
22. **Wilson RW, VA Steingrube, et al. (2001).** *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(Pt 5): 1751-64.

Figure 1 : Décompte des unités formatrices de colonies (UFC/ml) sur milieux de culture.





**Figure 2 : Décompte et comparaison entre les décomptes obtenus en culture et ceux en microscopie à épifluorescence.**



**Tableau 4 : Pourcentage de viabilité (intégrité membranaire) des bactéries des échantillons évalué à l'aide de la trousse LIVE/DEAD Baclight**

<b>Échantillon</b>	<b>Pourcentage de viabilité</b>
Usine #1	70%
Usine #2	10%
Usine #3	90%

**Tableau 5 : Identité probable des différentes souches isolées par culture à partir des différents échantillons**

<b>Échantillons</b>	<b>Souches majoritaires</b>	<b>Autres</b>
IR 01	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	<i>Staphylococcus sp</i> <i>Micrococcus sp.</i>
IR 02	<i>Xenorhabdus nematophilus*</i> <i>Leclercia adecarboxylata*</i>	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Acidovorax sp.</i>
IR 03	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Staphylococcus sp</i> <i>Micrococcus sp.</i> <i>Ochrobactrum anthropi</i> <i>Bacillus subtilis</i>

\*Font partie de la même classe (subdivision gamma des protéobacteries) que *Escherichia coli* et *Pseudomonas spp.*

**Tableau 6: Détection de mycobactéries par PCR et comparaison avec la culture sur milieu Middlebrook 7H10.**

Échantillon	Détectées par PCR	Détectées par culture
Usine #1	NON	NON
Usine #2	NON	NON
Usine #3	NON	NON

**Tableau 7 : Résultats de l'analyse de santé des travailleurs de l'usine #2.**

Travailleur	Atopie	Symptômes reliés au travail	IgG Pseudo	Tabagisme			CVF (% prédite)	VEMS (% prédite)	Examen* Volet 2 (Normal ou Anormal)
				Actuel	Passé	Pq/an			
# 1	+	-	-	N			121	107	nd
# 2	-	-	+	N			112	111	N
# 3	-	+	-	O		24	108	114	nd
# 4	+	-	+	N	O	7	154	141	N
# 5	-	+	-	N	O	6	106	102	nd
# 6	+	+	-	O		21	105	103	nd
# 7	-	-	+	O		7	99	106	N
# 8	-	-	-	N			113	116	nd
# 9	+	-	-	N			123	107	nd
# 10	-	-	-	N			113	116	nd

# 11	+	-	-	N			126	127	nd
# 12	+	-	-	N	O	7	96	97	nd
# 13	+	-	-	N	O	16	102	79	nd
# 14	-	+	+	O		13	120	94	N
# 15	-	-	-	N			111	101	nd
# 16	-	+	-	N			99	86	nd
# 17	+	-	+	N			125	116	N
# 18	+	-	-	N	O	9	109	106	nd
# 19	+	-	-	N			105	89	nd

**\*L'examen complet comprenait la todensitométrie axiale, l'auscultation et le lavage bronchoalvéolaire**

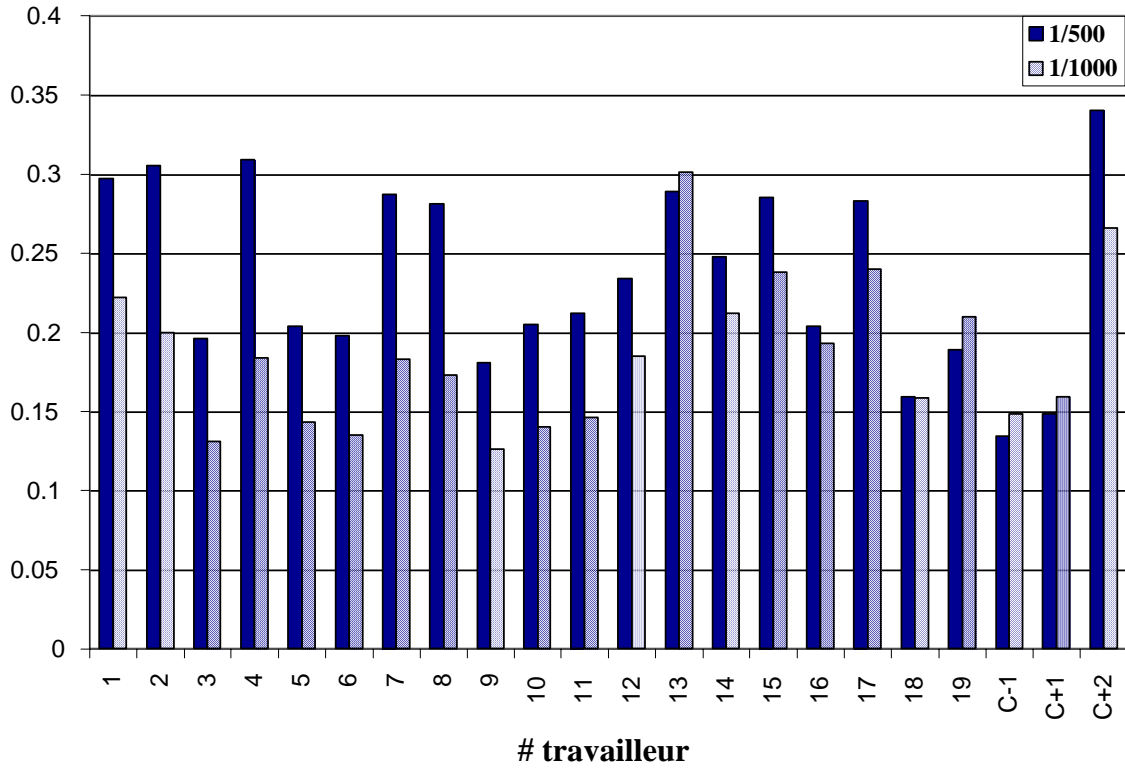
**Tableau 8 : Viscosité cinématique et pH des fluides de coupe**

	Viscosité						pH		
	Essai No 1		Essai No 2		Essai No 3		Valeur moyenne	numérique	papier
	Viscosité a	Viscosité b	Viscosité a	Viscosité b	Viscosité a	Viscosité b			
<b>Fluide 1 neuf 20 :1</b>	1,17	1,11	1,126	1,128	1,122	1,127	1,131	9,3	8,5
<b>Fluide 1 usagé</b>	1,044	1,042	1,058	1,021	1,043	1,04	1,041	7,4	6
<b>% de différence</b>	-11%	-6%	-6%	-9%	-7%	-8%	-8%	-20%	-29%
<b>Fluide 2 neuf 20 :1</b>	-	-	1,12	1,118	1,121	1,121	1,12	9	9
<b>Fluide 2 Usagé</b>	1,036	1,04	1,049	1,045	1,045	1,047	1,044	7,7	7
<b>% de différence</b>	-	-	-6%	-7%	-7%	-7%	-7%	-14%	-22%
<b>Fluide 3 neuf 40 :1</b>	1,015	1,018	1,029	1,02	1,033	1,02	1,023	8,8	8,5
<b>Fluide 3 usagé</b>	1,107	1,106	1,104	1,101	1,099	1,012	1,103	7,9	7
<b>% de différence</b>	9%	9%	7%	8%	6%	8%	8%	-10%	-18%
<b>Fluide 3 neuf 30 :1</b>	-	-	-	-	1,062	1,061	1,062	8,9	8,5
<b>% de différence</b>	-	-	-	-	3%	4%	4%	-11%	-18%

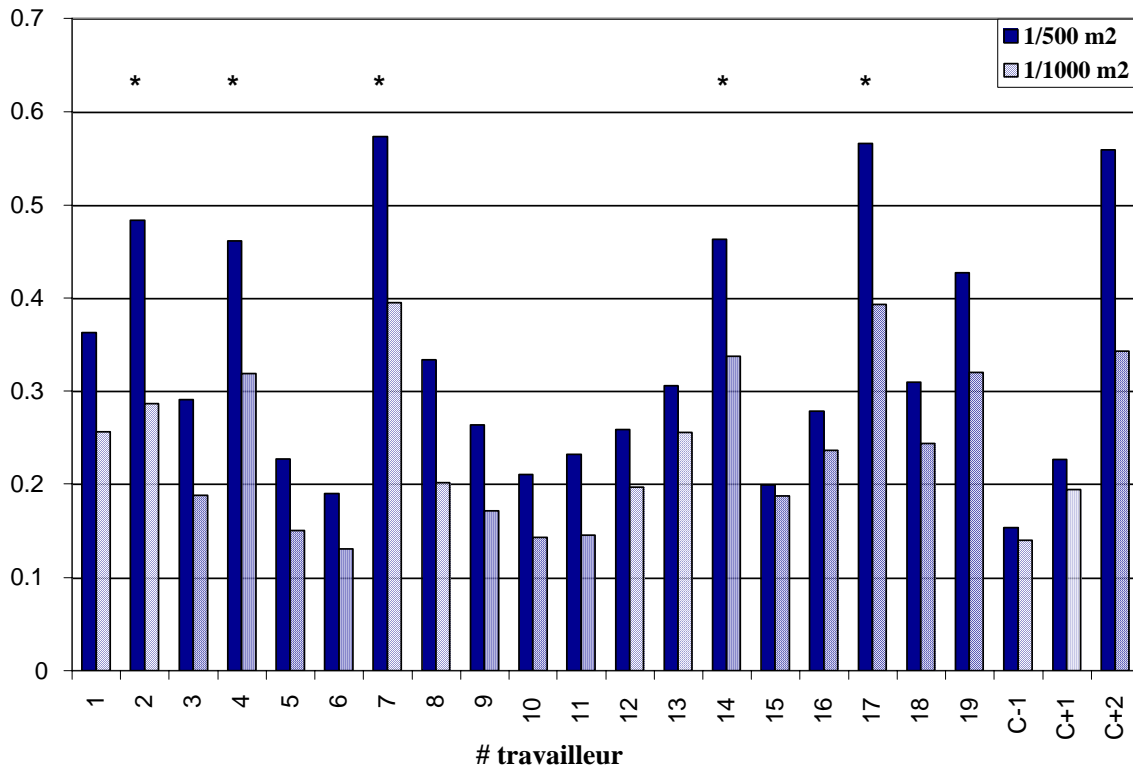
Annexe 1 : Tests d'allergies cutanées pour les 19 travailleurs de l'usine #2

Travailleurs	Nombre de tests positifs (sauf histamine)	Identité des allergènes
# 1	3	<i>D. farinae</i> Herbe à poux Mauvaises herbes
# 2	0	-
# 3	0	-
# 4	0	-
# 5	1	<i>D. farinae</i>
# 6	1	<i>D. farinae</i>
# 7	0	-
# 8	0	-
# 9	1	<i>Alternaria</i>
# 10	0	-
# 11	9	Poils de chat Poils de chien Poils de cheval Poussière <i>D. farinae</i> Graminés Bouleau Mauvaises herbes <i>Alternaria</i>
# 12	1	Poils de chat
# 13	2	Poils de chat Poils de chien
# 14	0	-
# 15	0	-
# 16	0	-
# 17	6	Poils de vache Poussière <i>D. farinae</i> Graminées Bouleau <i>Hormodendrum</i>
# 18	4	Poussières <i>D. farinae</i> Cèdre rouge Sapin
# 19	11	Poils de : chat, chien, cheval, vache <i>D. farinae</i> Poussière Graminée Bouleau Cèdre rouge <i>Alternaria</i> <i>Hormodendrum</i>

**Annexe 2 : Dosage des IgG sériques des 19 travailleurs de l'usine #2 dirigé contre la souche majoritaire #1 (*Xenorhabdus nematophilus*).**



**Annexe 3 : Dosage des IgG sériques des 19 travailleurs de l'usine #2 dirigé contre la souche majoritaire #2 (*Leclercia adecarboxylata*).**



\* Sujet qui ont reçu un examen au tomodensitomètre et un lavage bronchoalvéolaire (volet 2).