

MICROBIOTE ASSOCIE AUX BROUILLARDS DE FLUIDE DE COUPE

A. Simons^{*1}, C. Therial¹, R. Levilly², P. Duquenne², B. Facon³, A. Pedros³, V. Renevot³, I. Colina Moreno⁴ et F.S. Lucas¹

¹Laboratoire Eau, Environnement et Systèmes Urbains, Université Paris-Est Créteil, 94010 Créteil cedex,

²Laboratoire d'Analyses Spatio-Temporelles des Expositions Chimiques, Département Ingénierie des Procédés, 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex

³Laboratoire des Biocontaminants, CRAMIF, 75019 Paris

⁴Indra Analyse, 41170 Baillou

*Courriel de l'orateur : alexis.simons@u-pec.fr

MICROBIOTA ASSOCIATED WITH METAL-WORKING FLUIDS AEROSOLS

ABSTRACT

The use of cutting fluids can produce aerosols containing microorganisms, which represent a health risk for workers. However, the characteristics of the microbiota in these aerosols remain poorly understood. In order to better assess the links between initial contamination (cutting fluids, water) and the airborne microorganisms, samples were taken from 4 plants to characterize microbial concentration and diversity by culture and molecular approach. Preliminary results show that contamination of cutting fluids is not clearly linked to the quality of water or air in the facility.

RESUME

Lors de l'utilisation des fluides de coupe, la formation d'aérosols porteurs de microorganismes représente un risque sanitaire pour les ouvriers. Cependant les caractéristiques du microbiote de ces aérosols restent mal connues. Afin de mieux évaluer les liens entre la contamination initiale (fluides de coupe, eau de réseau) et les microorganismes présents dans l'air, des prélèvements ont été menés dans 4 usines pour caractériser par culture et par approche moléculaire la concentration et la diversité microbienne. Les résultats préliminaires ont mis en évidence une contamination des fluides de coupe qui n'est pas liée de manière évidente à la qualité de l'eau ou de l'air ambiant.

KEYWORDS: water-soluble metal-working fluid, bioaerosols, qPCR, biodiversity **MOTS-CLÉS :** fluides de coupe aqueux, bioaérosols, qPCR, biodiversité.

1. INTRODUCTION

Les fluides de coupe (FDC) sont couramment utilisés dans le domaine industriel (métallurgie, automobile et aéronautique) pour lubrifier et refroidir les pièces métalliques lors de leur usinage (Saha et Donofrio, 2012). Au cours de ces activités, des aérosols de FDC, appelés brouillard de fluide de coupe sont générés sous forme de gouttelettes en suspension. Ils contiennent des communautés bactériennes et fongiques pouvant comporter des pathogènes opportunistes (Gilbert *et al.*, 2010). Ces dernières décennies voient l'utilisation préférentielle de FDC aqueux (miscibles à l'eau) dilués dans l'eau du robinet à 2-10% générant ainsi une émulsion stabilisée par un tensioactif (ANSES 2012). Des additifs s'ajoutent à leur composition, notamment des biocides et des inhibiteurs de corrosion. Malgré l'ajout de biocides, des communautés microbiennes tendent à se développer au cours du temps dans les bains et à former des biofilms dans différentes zones des centres d'usinage en contact avec les FDC. Les bonnes pratiques de gestion des bains de FDC ainsi que le suivi et l'entretien des équipements sont donc essentiels pour limiter la prolifération de microorganismes dans le système.

La composition des communautés microbiennes présentes dans les bains de FDC, les biofilms et les brouillards est diversifiée et varie en fonction de la composition chimique du FDC, de la présence de biocides, du type d'activité de l'industrie, ainsi que de la température et du pH du FDC (Khan et Yadav, 2004). De plus, des pathogènes opportunistes tels que les mycobactéries non-tuberculeuses (e.g. *Mycobacteroides immunogenum*) et des moisissures telles que *Aspergillus* spp. peuvent présenter un danger pour les travailleurs (Wallace *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 2010). La communauté microbienne associée aux particules les plus fines des brouillards de FDC peut pénétrer dans les poumons par inhalation, et entraîner des pneumopathies d'hypersensibilité notamment (Nette *et al.*, 2021). Toutefois les études quantitatives explorant la composition microbienne des bains et des bioaérosols de FDC restent rares. De plus, la distribution granulométrique des bioaérosols est encore peu explorée alors que cette information est cruciale pour évaluer le risque d'exposition.

Ce travail a pour objectifs d'étudier les communautés bactériennes et fongiques dans les FDC et leurs brouillards afin d'améliorer les connaissances relatives aux risques liés à leur exposition. Des campagnes de mesures en entreprises ont été effectuées (eau du réseau, FDC, brouillard) afin de quantifier par PCR en temps réel (qPCR) les bactéries et les champignons avec un focus sur le genre *Mycobacterium*. La composition des communautés bactériennes a été analysée par séquençage à haut débit. La distribution des microorganismes dans différentes tailles de particules a été étudiée afin de caractériser le risque.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Échantillonnage :

Entre 2019 et 2022, 4 usines ont été suivies sur deux jours (codifiées FJ, U1, U2, DL) en prélevant l'eau du réseau (n=8), les fluides de coupes en utilisation (n=22), et les aérosols à < 1,5 m de haut. Six FDC différents étaient en utilisation sur l'ensemble des usines, dilués entre 2.1% et 11% dans l'eau du robinet. Après collecte, les échantillons de FDC, d'eau et d'air ont été transportés en glacière et congelés à -20°C jusqu'à leur analyse en biologie moléculaire. Pour étudier la distribution granulométrique de la population bactérienne et fongique dans les brouillards de FDC, un impacteur en cascade Andersen à 8 étages équipé de filtres en polycarbonates (TCR TECORA®, TISCH Environmental) a été utilisé sur un poste fixe en atelier, près d'une machine, pendant 2 à 3 jours consécutifs à un débit de 26L/min à 28L/min pendant 5 à 7h par jour (n=81 échantillons). Les seuils granulométriques pour chaque filtre sont : > 9 µm, [9- 5,8 µm], [5,8- 4,7 µm], [4,7- 3,3 µm], [3,3- 2,1 µm], [2,1- 1,1 µm], [1,1- 0,65 µm], [0,65- 0,43 µm] et < 0,43 µm. Avant échantillonnage, les filtres ont été stérilisés à 150°C en chaleur sèche, et stockés à 80°C. En fin d'échantillonnage, les filtres sont coupés en quart et répartis dans des tubes de 50 ml stériles. L'air ambiant a été échantillonné par filtration sur membrane en polycarbonate de 0,4 µm de porosité dans des cassettes fermées de 37 mm et une pompe individuelle selon la norme NF X43-257. En tout, ont été collectés 22 échantillons en atelier et 11 échantillons en extérieur pour chaque application (culture, qPCR, séquençage). Les débits utilisés étaient de 2L.min⁻¹ pendant 1 à 3 jours à raison de 5h.jour⁻¹ pour les mises en culture et de 8-10 L.min⁻¹ pendant 5 à 6 h pour la biologie moléculaire.

2.2 Dénombrement des microorganismes cultivables

Les bactéries et moisissures cultivables ont été dénombrées par culture, respectivement, sur milieu TSA supplémenté d'actidione et sur le milieu MEA, avec une incubation à 25°C pendant 5 jours (INRS, 2015). Les colonies développées ont été dénombrées et les résultats ont été exprimés en Unités Formant Colonies par mètre cube d'air prélevé (UFC.m⁻³).

2.3 qPCR :

Pour les FDC, 1,5 mL ont été centrifugés à 15600 rcf pendant 15 min à 20°C. Les échantillons d'eau (40 mL) ont été filtrés sur unités de filtration Sterivex TM (0.2 µm de porosité, Millipore). L'ADN a été extrait avec le kit FastDNA Spin kit for soil (MP Biomedicals) selon Roguet *et al.* (2018). Les filtres (Andersen, cassettes et sterivex) ont été découpés stérilement en morceaux de 1x1 mm environ avant extraction, et le culot des FDC a été utilisé pour l'extraction. Les bactéries totales ont été quantifiées par qPCR ciblant le gène de l'ARNr 16S avec les amorces BactQuant (Liu *et al.*, 2012). Les mycobactéries ont été quantifiées en ciblant le gène *atpE* (Radomski *et al.*, 2013). Enfin, les champignons ont été quantifiés par amplification du gène de l'ARNr 18S avec les amorces FungiQuant (Lang-Yona *et al.*, 2012 ; Zhou *et al.*, 2000). Un contrôle interne d'amplification avec un ajout dosé d'un plasmide contenant l'insert du gène de l'exon 5 de β -actine humaine a été multiplexé avec la quantification du gène *atpE* (selon Wurtzer *et al.*, 2014). Les résultats sont rapportés en copies de génome (cg) .m⁻³ (aérosols) ou .mL⁻¹ (eau et FDC).

2.4 Séquençage :

Le séquençage des communautés bactériennes a été réalisé à l'aide d'un séquenceur Illumina MiSeq par la plateforme iGenSeq ICM (Paris), en utilisant des amorces ciblant le gène de l'ARNr 16S (Amorces 341F 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' et 785R 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). De plus, deux échantillons mélangeant 10 souches bactériennes dans des proportions connues (Mock 1 et Mock2, laboratoire Leesu) ont été séquencés afin de servir de standard lors de l'analyse des données de séquençage. Les fichiers fastq ont été traités avec le package R DADA2 (version 1.16; Callahan *et al.*, 2016). Ce script a été amendé sous le serveur Galaxy (portail Europe). L'algorithme DADA 2, permet de regrouper les séquences en ASV (Amplicon Sequence Variant) et d'assigner taxonomiquement les ASV à l'aide de la base de données SILVA 132. Actuellement, seuls les sites FJ, U1 et U2 ont pu être analysés par séquençage.

2.5 Analyse statistique :

L'analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel R (RStudio Team, 2020) et la représentation graphique avec le package ggplot2. La distribution de chaque série de données a été testée avec le test de Shapiro-Wilk aux seuil d'erreur de 5%.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Concentration et diversité des communautés microbiennes dans l'air

Les concentrations bactériennes et fongiques de l'air ambiant (cassettes) dans les différentes usines ne différaient pas significativement entre les ateliers et l'extérieur, que ça soit par qPCR (Figure 1.A) ou par culture (Données non présentées). De même, aucune différence significative entre prélèvement interne et externe n'a été observée sur l'indice de diversité de Shannon des ASV (Figure 2.A). La diversité et la concentration des micro-organismes retrouvés dans les brouillards de FDC sont généralement proportionnelles aux communautés bactériennes et fongiques des FDC (Wang *et al.*, 2010). Sur nos différents sites, les FDC présentent des concentrations bactériennes supérieures à $3 \log_{10} \text{ cg.mL}^{-1}$ [$3,67 - 7,6 \log_{10} \text{ cg.mL}^{-1}$], ce qui correspond aux concentrations détectées dans d'autres usines (Saha et Donofrio, 2012 ; Gilbert *et al.*, 2010), et sont toujours supérieures à celle de l'eau du réseau local (Figure 1.B). Dans le cas des usines étudiées dans notre étude, les activités nécessitant des FDC ne semblent pas impacter sensiblement la concentration et la diversité microbienne de l'air ambiant des ateliers. Les protections mises en place localement pour limiter les risques d'aérosolisation ou une plus faible activité lors des campagnes de prélèvements pourraient être responsables du faible impact des contaminations des FDC sur l'air ambiant.

Il est à noter que bien qu'aucune différence entre site ne soit observée pour la méthode de prélèvement par cassette, les données des prélèvements d'Andersen présentent une diversité bactérienne significativement plus élevée sur le site FJ par rapport à U1 et U2 pour des mêmes granulométries (Figure 2.B), ce qui suggère un impact important du choix de la technique de prélèvement sur le profil des communautés obtenues.

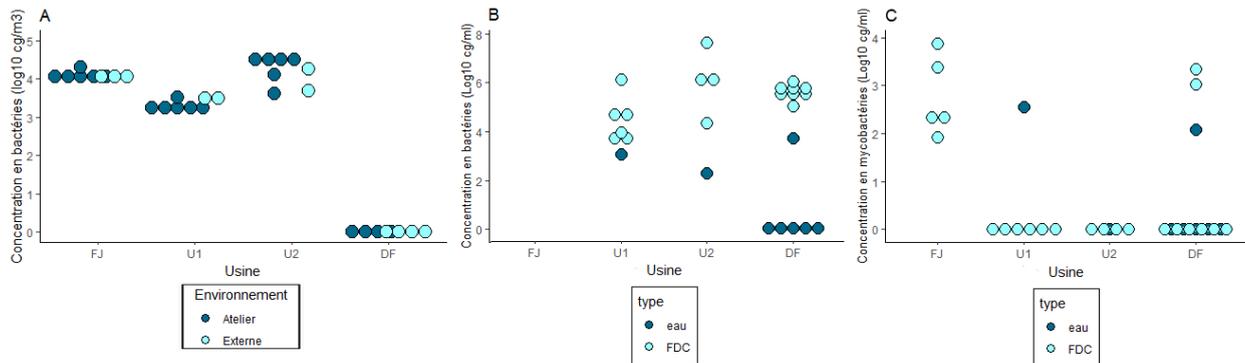


Figure 1. Concentrations en copies génome en : i) bactérie par m³ dans les prélèvements d'air (A) et par mL d'eau / FDC (B) obtenues par qPCR ; ou en ii) mycobactéries par mL d'eau / FDC (C)

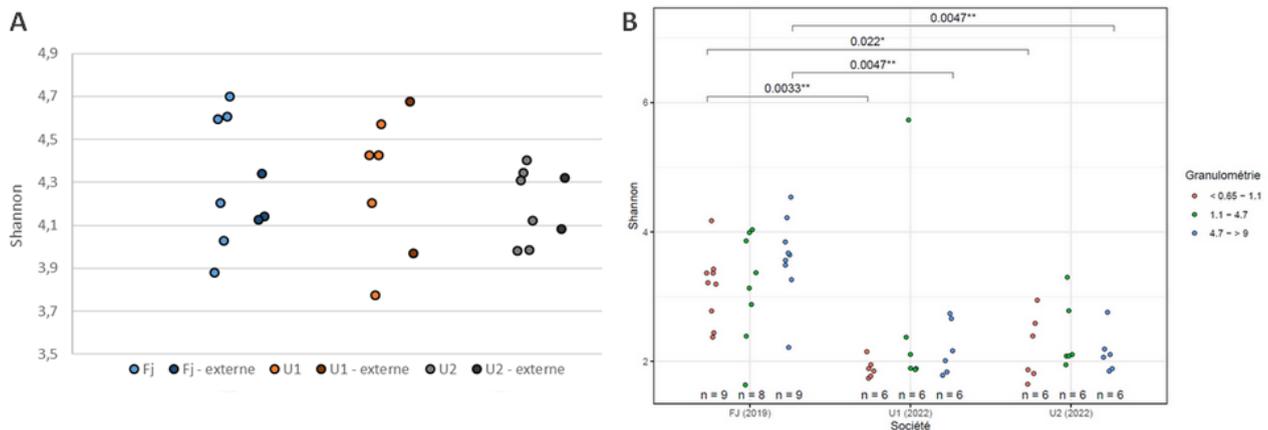


Figure 2. Indice de diversité de Shannon des ASV obtenues par séquençage de l'ARNr 16S pour les prélèvements d'air par cassette (A) ou par Andersen (B).

3.2 Présence du genre *Mycobacterium* dans les usines utilisant les FDC :

La présence potentielle de mycobactéries non-tuberculeuses pathogènes dans les FDC revêt un intérêt sanitaire majeur (Veillette *et al.*, 2002). Ainsi il a été observé que les mycobactéries étaient présentes dans les FDC de 2 des 4 sites étudiés (FJ et DF) (Figure 1.C). Les mycobactéries sont absentes de l'air ambiant à l'exception du site FJ ($1,7 \pm 0,3 \log_{10} \text{ cg.mL}^{-1}$). En parallèle, les analyses par metabarcoding sur l'ARNr 16S confirme bien la présence du genre *Mycobacterium* dans l'air ambiant avec une abondance relative

significative pour le site FJ par prélèvement avec l'impacteur Andersen (15,14% ± 19,65%), ainsi que pour l'eau de réseau du site U1 (30,53%). Le lien entre les concentrations en mycobactéries dans l'eau du robinet, le bain de FDC et l'air ambiant n'est pas évident et le transfert des mycobactéries depuis l'eau de réseau vers les FDC puis des brouillards de ceux-ci dans l'air ambiant reste encore à éclaircir.

4. CONCLUSION

L'exposition aux FDC présente une double problématique de santé au travail pour les travailleurs de par l'exposition chimique et biologique, soit par contact cutané direct avec ces produits, soit par inhalation des brouillards de FDC (Szabo-Gay *et al.*, 2011; Perol *et al.*, 1989). Ainsi, la caractérisation des microbiotes fongiques et bactériens associés à ces aérosols et à leurs sources potentielles reste nécessaire pour une meilleure évaluation des risques sanitaires associés.

A partir des travaux préliminaires réalisées dans cette étude, il a été possible de mettre en évidence certaines caractéristiques des microbiotes d'usines nécessitant l'usage de FDC, mais également l'importance de multiplier les techniques de prélèvement en parallèle dans le cas des suivis des brouillards de FDC pour avoir des échantillons plus exhaustifs et représentatifs du milieu d'intérêt. Par la suite, il est nécessaire de poursuivre les études de metabarcoding sur les sites manquants (DF) ainsi qu'avec les marqueurs génétiques pour les communautés fongiques pour l'ensemble des sites.

5. REMERCIEMENT

Nous remercions les responsables des différentes usines pour leur accueil. N. Liworo, R. Mellul et E. Jiang ont contribué grandement à ce travail lors de leurs stages de master au sein du Leesu.

6. REFERENCES

- ANSES. (2012). Les fluides de coupe État des connaissances sur les usages, les expositions et les pratiques de gestion en France, 75.
- Brinksmeier, E., Meyer, D., Huesmann-Cordes, A.G. and Herrmann C. (2015) Metalworking fluids—mechanisms and performance. *CIRP Annals*. 64, 605–628.
- Gilbert, Y., Veillette M., and Duchaine C. (2010) Metalworking Fluids Biodiversity Characterization. *J. Appl. Microbiol.* 108(2), 437–449.
- INRS (2015). "Fiche MétroPol : Microorganismes aérobies." M-147: available at www.inrs.fr.
- Lang-Yona, N., Dannemiller, K., Yamamoto, N., Burshtein, N., Peccia, J., Yarden, O., and Rudich, Y. (2012) Annual distribution of allergenic fungal spores in atmospheric particulate matter in the Eastern Mediterranean; a comparative study between ergosterol and quantitative PCR analysis, *Atmos. Chem. Phys.* 12, 2681–2690,
- Liu, C.M., Aziz, M., Kachur, S., Hsueh, P.R., Huang, Y.T., Keim, P., Price and L.B. (2012) BactQuant: an enhanced broad-coverage bacterial quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol.* Apr 17, 12-56.
- Lucchesi, E.G., Eguchi S.Y., and Moraes A.M.. (2012) Influence of a Triazine Derivative-Based Biocide on Microbial Biofilms of Cutting fluids in Contact with Different Substrates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39(5), 743–48.
- Nett, R.J., Stanton, M., Grimes, G.R. (2021) Occupational respiratory and skin diseases among workers exposed to metalworking fluids. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* Apr 1;21(2), 121-127.
- Radomski, N., Roguet, A., Lucas, F., Veyrier, F., Cambau, E. et al.. (2013) *atpE* gene as a new useful specific molecular target to quantify *Mycobacterium* in environmental samples. *BMC Microbiology, BioMed Central.* 13 (1), pp.277.
- Perol, M., Vallon, C., Vallon, J.J. and Guérin, J.C. (1989) Lipid pneumopathy caused by occupational exposure to cutting oil. *Rev Mal Respir.* 6(3), 271-274.
- Roguet, A., Therial, C., Catherine, A., Bressy, A., Varrault, G., Bouhdamane, L., Tran, V., Lemaire, B.J., Vincon-Leite, B., Saad, M., Moulin, L., Lucas, F.S.. (2018) Importance of Local and Regional Scales in Shaping *Mycobacterial* Abundance in Freshwater Lakes. *Microb Ecol.* 75(4), 834-846.
- Saha, R., and Donofrio, R. S. (2012). The microbiology of metalworking fluids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94(5), 1119–1130.
- Szabo-Gay, O., Benoit, N., Doutrelot-Philippon, C., Le Meunier, F., Sevestre, H. and Jounieaux V. (2011) Occupational lipid pneumonia induced by cutting fluids exposition. *Presse Med.* 40(6):656-659.
- Veillette, M., Pagé, G., Thorne, P. S. and Duchaine C. (2008) Real-Time PCR Quantification of *Mycobacterium Immunogenum* in Used Metalworking Fluids. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene.* 5(12), 755–760.
- Wallace, R. J., Zhang, Y., Wilson, R. W., Mann, L., and Rossmore, H. (2002). Presence of a single genotype of the newly described species *Mycobacterium immunogenum* in industrial metalworking fluids associated with hypersensitivity pneumonitis. *Appl Environ Microbiol.* 68(11), 5580–5584.
- Wang, H. X., Reponen, T., Adhikari, A., Willeke, K., Sergey, A., and Grinshpun, S. A. (2010). Effect of Fluid Type and Microbial Properties on the Aerosolization of Microorganisms from Metalworking Fluids, 6826.
- Wurtzer, S., Prevost, B., Lucas, F.S. and Moulin L. (2014) Detection of enterovirus in environmental waters: a new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits. *J Virol Methods.* 209:47-54

Zhou, G., Whong, W.Z., Ong, T. and Chen B. (2000) Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol Cell Probes*. 14(6):339-48