

2016

Détection des microorganismes par fluorescence/RAMAN UV dans des aérosols, des suspensions ou sur des surfaces : étude exploratoire

Michaela Skulinova
IRSST, INO

Geneviève Marchand
IRSST, genevieve.marchand@irsst.qc.ca

Jean-François Gravel
INO

Jacques Lavoie
IRSST

Yves Cloutier
IRSST

Suivez ce contenu et d'autres travaux à l'adresse suivante: <https://pharesst.irsst.qc.ca/rapports-scientifique>

Citation recommandée

Skulinova, M., Marchand, G., Gravel, J.-F., Lavoie, J. et Cloutier, Y. (2016). *Détection des microorganismes par fluorescence/RAMAN UV dans des aérosols, des suspensions ou sur des surfaces : étude exploratoire* (Rapport n° R-918). IRSST.

Ce document vous est proposé en libre accès et gratuitement par PhareSST. Il a été accepté pour inclusion dans Rapports de recherche scientifique par un administrateur autorisé de PhareSST. Pour plus d'informations, veuillez contacter pharesst@irsst.qc.ca.

Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-918



Détection des microorganismes par fluorescence/RAMAN UV dans des aérosols, des suspensions ou sur des surfaces Étude exploratoire

Michaela Skulinova
Geneviève Marchand
Jean-François Gravel
Jacques Lavoie
Yves Cloutier



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;

Assurer la diffusion des connaissances et jouer un rôle de référence scientifique et d'expertise;

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

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

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 : <https://abonnement.lacsst.com/prevention>

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec
2016
ISBN : 978-2-89631-870-4 (PDF)
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
et de la valorisation de la recherche
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
Mars 2016

Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-918

Détection des microorganismes par fluorescence/RAMAN dans des aérosols, des suspensions ou sur des surfaces Étude exploratoire

Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

*Michaela Skulinova^{1,2}, Geneviève Marchand¹,
Jean-François Gravel², Jacques Lavoie¹,
Yves Cloutier¹*

¹IRSST
²INO

Cliquez recherche
www.irsst.qc.ca



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

Cette étude a été financée par l'IRSST. Les conclusions et recommandations sont celles des auteurs.

ÉVALUATION PAR DES PAIRS

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.

REMERCIEMENTS

Il est difficile dans le cadre d'un projet tel que celui-ci, auquel deux instituts importants du Québec sont associés, de répertorier et de remercier toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à son exécution et nous nous en excusons.

Nous devons toutefois souligner la patience de Marie Jeanne Biyeyeme Bi Mve, étudiante à la maîtrise supervisée par la D^{re} Geneviève Marchand, qui a accepté de partager si aimablement l'enceinte d'exposition de la biomasse et qui nous a aidés occasionnellement dans l'exécution de ces travaux. Naturellement, les techniciennes du laboratoire de microbiologie de l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST), Carole Pépin et Nancy Lacombe, doivent absolument être citées en exemple pour leur accueil et leur aide.

Nous remercions aussi toutes les personnes de l'Institut national d'optique (INO) pour leur contribution administrative, scientifique et à d'autres niveaux, comme Anne Claire Jacob Poulin, François Châteauneuf et Jean-François Cormier, pour l'aide et le soutien qu'ils ont prodigués en facilitant les échanges avec l'institut et son personnel. Nous exprimons aussi notre reconnaissance envers l'INO pour avoir reconnu à sa juste valeur l'aspect novateur des travaux en acceptant d'y injecter les ressources financières et techniques supplémentaires nécessaires à la réalisation de notre étude exploratoire.

Finalement, nous tenons à remercier tout spécialement l'IRSST pour son soutien tant financier qu'administratif ainsi que son personnel pour l'accueil chaleureux réservé à l'équipe de recherche.

À tous ceux cités et à tous ceux oubliés,

Merci

SOMMAIRE

Les microorganismes et leurs sous-produits sont présents dans tous les milieux de travail. Ils se retrouvent en suspension dans l'air, dans un liquide ou déposés sur des surfaces. Ils peuvent avoir des impacts importants sur les entreprises et la santé des travailleurs. Leur détection, à l'aide d'approches classiques faisant appel au dénombrement sur milieux gélosés, exige du temps et des ressources considérables. Cette étude vise à explorer une approche alternative et novatrice soit l'utilisation des signaux de fluorescence émis à différentes longueurs d'onde pour la détection et la différenciation de microorganismes en milieu de travail.

Un système mobile de détection de la fluorescence permettant des excitations à des longueurs d'onde de 266 nm et de 355 nm a été construit par l'Institut national d'optique (INO). Le choix des longueurs d'onde a été fait à partir d'une revue de la littérature et de considérations techniques liées à la disponibilité des lasers. La première longueur d'onde (266 nm) permet d'obtenir des informations relatives à la composition des microorganismes et est plus adaptée à une classification microbienne. La seconde longueur d'onde de 355 nm permet la détection du matériel biologique et de l'état métabolique des microorganismes. Ces deux longueurs d'onde ne sont toutefois pas idéales pour l'étude des signatures Raman des microorganismes.

Des signatures de fluorescence ont été obtenues pour les microorganismes suivants : *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium digitatum* et *Ulocladium chartarum*. Les travaux ont porté sur 1) des suspensions pures et mélangées de ces microorganismes afin d'imiter celles retrouvées en milieu de travail, dans les biofontaines et dans les fluides de coupe ; 2) des dépôts de surface équivalents à ceux qu'on peut trouver dans les conduits de ventilation ; 3) des dépôts localisés imitant les gouttelettes asséchées sur des surfaces d'acier inoxydable qu'on retrouve, entre autres, dans les industries alimentaires ainsi que dans les hôpitaux.

La position des maxima de fluorescence avec des longueurs d'onde d'excitation à 266 nm semble différer d'une espèce à l'autre et permettre de les distinguer. Elles se situent pour les moisissures à des longueurs d'onde inférieures par rapport à celles des bactéries.

L'analyse des dérivés des signaux de fluorescence développée dans cette étude constitue une approche innovatrice non rapportée dans la littérature. Elle met en évidence des caractéristiques importantes du signal de fluorescence difficilement observable à l'œil nu. Ce traitement des signaux a démontré qu'il existait des différences fondamentales entre les dérivés des signaux de fluorescence provenant de bactéries à Gram – et à Gram +. Ceci permet une classification directe et rapide des bactéries à partir de leur signature de fluorescence.

Les signaux de fluorescence peuvent servir à qualifier et à quantifier instantanément l'importance des dépôts de poussières et de leur contenu bactérien comme ceux que l'on trouve dans les conduits de ventilation. Une adaptation du système est toutefois nécessaire pour confirmer ce constat pour les dépôts formés par l'assèchement de gouttelettes. La fluorescence produite par l'acide dipicolinique permet d'établir la présence de spores (bactériennes et mycologiques) dans les poussières déposées. Cette substance présente un intérêt pour la

détection des spores bactériennes et doit être considérée lors de l'étude de la fluorescence des microorganismes.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	I
SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	V
1. INTRODUCTION.....	1
2. FLUORESCENCE	3
2.1 Diffusion Raman	3
2.2 Biomolécules fluorescentes d'intérêt	3
2.2.1 Formes réduites de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) et de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD).....	4
2.2.2 Tryptophane, tyrosine et phénylalanine	4
2.2.3 Flavines	5
2.2.4 Pyridoxine	5
2.2.5 Chlorophylle, lignine, cellulose et acide férulique	5
2.2.6 Autres molécules d'intérêts (bases de purine et de pyrimidine)	5
2.3 Utilisation de la fluorescence.....	5
2.4 Objectifs	6
2.4.1 Objectif général.....	6
2.4.2 Objectifs spécifiques	7
3. MÉTHODOLOGIE ET MONTAGE.....	9
3.1 Microorganismes étudiés.....	9
3.2 Préparation des suspensions de microorganismes	10
3.3 Préparation des dépôts de surface.....	10
3.4 Préparation des dépôts localisés	11
3.5 Montage utilisé pour la mesure de la fluorescence	12
3.5.1 Mesure de la fluorescence sous la hotte.....	15
3.5.1.1 Vérification de l'efficacité du montage	15
3.5.1.2 Suspensions de microorganismes étudiées	15
3.5.1.3 Dépôts de surface sur des plaques	16
3.5.1.4 Dépôts localisés sur plaques	16

3.5.2	Mesure de fluorescence dans l'enceinte de biomasse.....	16
3.6	Essais de la spectroscopie Raman.....	17
3.6.1	Suspensions bactériennes.....	17
3.7	Analyse mathématique des signaux de fluorescence	17
4.	RÉSULTATS.....	19
4.1	Suspensions de microorganismes.....	19
4.1.1	Variation de la fluorescence en fonction de la concentration	24
4.1.2	Différence entre les bactéries à Gram négatif et celles à Gram positif.....	25
4.2	Dépôts de surface sur plaque	27
4.3	Dépôts localisés sur plaque.....	28
4.4	Bioaérosols.....	32
4.5	UV Raman	33
5.	DISCUSSION.....	35
5.1	Fluorescence des suspensions de microorganismes	36
5.1.1	Variation de la fluorescence en fonction de la concentration	37
5.1.2	Bactéries à Gram négatif et à Gram positif.....	38
5.2	Fluorescence des dépôts de surface sur plaque	39
5.3	Fluorescence des dépôts localisés sur plaque.....	40
5.4	Fluorescence des bioaérosols.....	41
5.5	UV Raman	41
6.	PORTÉES ET LIMITES	43
7.	CONCLUSIONS.....	45
8.	BIBLIOGRAPHIE.....	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Croissance des microorganismes	10
Tableau 2 : Spécifications des lasers	12
Tableau 3 : Spécifications des expanseurs de faisceaux	12
Tableau 4 : Spécifications de la lentille de collection.....	13
Tableau 5 : Spécifications des filtres coupe-bande.....	13
Tableau 6 : Spécifications du faisceau de fibres optiques	13
Tableau 7 : Spécifications du spectromètre	13
Tableau 8 : Spécifications de la caméra.....	13
Tableau 9 : Longueur d'onde des maxima d'émission de fluorescence pour les bactéries en suspension, pour différents réplicats	22

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Enceinte de biomasse pour la préparation des dépôts de surface (en bas à gauche, numérotation des plaques dans l'enceinte)	11
Figure 2 : Dépôts localisés sur plaque.	12
Figure 3 : Positionnement du système dans une hotte	14
Figure 4 : Positionnement du système sur la chambre de biomasse	16
Figure 5 : Photographie du montage sur l'enceinte de biomasse.....	17
Figure 6 : Fluorescence de <i>Staphylococcus epidermidis</i> (2 réplicats, $\lambda_{\text{excitation}} = 355 \text{ nm}$)	19
Figure 7 : Fluorescence d' <i>Enterobacter cloacae</i> , de <i>Staphylococcus epidermidis</i> , de <i>Bacillus subtilis</i> et d' <i>Escherichia coli</i> ($\lambda_{\text{excitation}} = 266 \text{ nm}$).	20
Figure 8 : Fluorescence de <i>Cladosporium cladosporoides</i> , de <i>Penicillium digitatum</i> et d' <i>Ulocladium chartarum</i> ($\lambda_{\text{excitation}} = 266 \text{ nm}$).....	20
Figure 9 : Première dérivée des signaux pour <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Escherichia coli</i>	21
Figure 10 : Première dérivée des signaux pour <i>Cladosporium cladosporoides</i> , <i>Penicillium digitatum</i> et <i>Ulocladium chartarum</i>	21
Figure 11 : Première dérivée des signaux pour un mélange de <i>Staphylococcus epidermidis</i> (SE) et de <i>Cladosporium cladosporoides</i> (CC).....	22
Figure 12 : Première dérivée des signaux pour un autre mélange de <i>Staphylococcus epidermidis</i> (SE) et de <i>Penicillium digitatum</i> (PD)	23
Figure 13 : Première dérivée des signaux pour un mélange d' <i>Enterobacter cloacae</i> et d' <i>Ulocladium chartarum</i>	23
Figure 14 : Première dérivée des signaux pour des suspensions d' <i>Enterobacter cloacae</i> (trois réplicats) et de <i>Staphylococcus epidermidis</i> (2 réplicats) et d'un mélange 1:1 des deux bactéries (2 réplicats)	24
Figure 15 : Première dérivée du signal de fluorescence d' <i>Escherichia coli</i> à différentes concentrations évaluées par densité optique	24
Figure 16 : Première dérivée du signal de fluorescence de <i>Staphylococcus epidermidis</i> à différentes concentrations évaluées par densité optique	25
Figure 17 : Première dérivée des signaux pour certaines bactéries à Gram négatif (<i>Escherichia coli</i> et <i>Enterobacter cloacae</i>) et à Gram positif (<i>Staphylococcus epidermidis</i> et <i>Bacillus subtilis</i>) à des concentrations semblables selon leur densité optique	25
Figure 18 : Deuxième dérivée des signaux de la figure 17	26
Figure 19 : Première dérivée des signaux pour certaines bactéries à Gram négatif (<i>Escherichia coli</i> et <i>Enterobacter cloacae</i>) et à Gram positif (<i>Staphylococcus epidermidis</i> et <i>Bacillus subtilis</i>) à des concentrations variables selon leur densité optique.....	26
Figure 20 : Deuxième dérivée des signaux de la figure 19.....	27

Figure 21 : Fluorescence pour différentes importances de dépôts de <i>Penicillium digitatum</i>	27
Figure 22 : Variation de l'importance des dépôts sur le radier de l'enceinte de biomasse.....	28
Figure 23 : Fluorescence des 18 réplicats d' <i>Escherichia coli</i> à une densité optique de 0,682A ...	29
Figure 24 : Première dérivée des signaux des 18 réplicats d' <i>Escherichia coli</i> à une densité optique de 0,682A	29
Figure 25 : Première dérivée des signaux des 9 mesures d' <i>Escherichia coli</i> à des concentrations variées	30
Figure 26 : Fluorescence des 12 réplicats de <i>Bacillus megaterium</i> à une densité optique de 0,217A.....	30
Figure 27 : Première dérivée des signaux des 12 réplicats de <i>Bacillus megaterium</i> à une densité optique de 0,217A.....	31
Figure 28 : Première dérivée des signaux des 9 mesures de <i>Bacillus megaterium</i> à des concentrations variées	31
Figure 29 : Fluorescence pour <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Escherichia coli</i> ($\lambda_{\text{excitation}} = 266 \text{ nm}$)	32
Figure 30 : Fluorescence (non lissée) pour <i>Penicillium digitatum</i> ($\lambda_{\text{excitation}} = 266 \text{ nm}$).....	32
Figure 31 : Spectres Raman pour différents microorganismes à des temps de mesure variant de 10 à 90 s ($\lambda_{\text{excitation}} = 266 \text{ nm}$).....	33
Figure 32 : Comparaison entre les parois des bactéries à Gram positif et celles des bactéries à Gram négatif	38
Figure 33 : Spectre Raman de la résonance pour différentes longueurs d'onde d'excitation pour la tyrosine (Asher, 2002).....	42

LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine-5'-triphosphate

AMP : adénosine monophosphate

CC : *Cladosporium cladosporoides*

DTC : dispositif à transfert de charges

EC : *Enterobacter cloacae*

EEM : matrices d'excitation et d'émission

GTP : guanosine triphosphate

INO : Institut national d'optique

IRSST : Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail

LIBS : spectroscopie sur plasma induit par laser (« Laser-induced breakdown spectroscopy »)

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : forme réduite de nicotinamide adénine dinucléotide

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPH : forme réduite de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

OD : densité optique (« optical density »)

PD : *Penicillium digitatum*

SE : *Staphylococcus epidermidis*

SST : santé et sécurité du travail

TSA : « trypticase soy agar »

UC : *Ulocladium chartarum*

UVR : résonance Raman ultraviolette

λ : longueur d'onde

1. INTRODUCTION

Les microorganismes et leurs sous-produits sont des agents qui jouent un rôle dans la transmission des maladies et dans le développement de plusieurs problèmes de santé incluant les troubles immunologiques et toxiques. Présents en milieu de travail, ils peuvent avoir des impacts importants sur la santé des travailleurs, sur le rendement et l'efficacité des entreprises. Les techniques actuelles permettant leur détection et leur identification exigent du temps et des ressources considérables, notamment parce que l'outil principal d'analyse demeure le dénombrement sur milieux gélosés et que celui-ci nécessite un délai inévitable attribuable au temps de croissance du microorganisme.

Des appareils utilisant la fluorescence de certains composés microbiens pour détecter et établir instantanément la concentration de microorganismes dans l'air apparaissent depuis peu sur le marché. Leur développement et leur commercialisation est attribuable à leur potentiel de réduction du temps associé à la détection de problèmes microbiologiques, à leur classification et, peut-être éventuellement, à une identification directe des microorganismes. Ces nouvelles techniques potentialisent une réduction des coûts par rapport à ceux des méthodes actuelles. Leur utilisation pour établir rapidement des sources de contamination microbienne en santé et en sécurité du travail (SST) et dans d'autres domaines tels ceux de l'industrie alimentaire, de la gestion des eaux et des analyses environnementales de l'air et de l'eau, a fait l'objet de plusieurs études. Ces appareils et techniques sont cependant encombrants, complexes à utiliser et coûteux ; ils n'ont été validés, en général, qu'en laboratoire.

2. FLUORESCENCE

Un fluorophore ou fluorochrome est une molécule particulière qui peut absorber l'énergie d'un photon à une longueur d'onde (λ) spécifique et la réémettre à une autre longueur d'onde tout aussi spécifique.

Le photon doit avoir une énergie bien précise pour être absorbé et former un état excité du fluorophore. Cet état excité n'existe que pendant 1 à 10 nanosecondes. Dans son état excité, le fluorophore est sujet à une multitude d'interactions vibrationnelles causant une dissipation partielle de son énergie. Cela l'entraîne dans un état d'énergie moindre à partir duquel la fluorescence est produite lorsque la molécule se désexcite pour reprendre son état fondamental. L'énergie du photon émis est alors légèrement inférieure à celle du photon incident. Il a donc une plus grande longueur d'onde.

2.1 Diffusion Raman

La diffusion Raman est une diffusion inélastique d'un photon par un milieu. La diffusion inélastique implique un échange d'énergie entre le photon et le milieu dans lequel il circule. La lumière ainsi diffusée aura une longueur d'onde légèrement différente de celle du photon incident. Ce décalage en longueur d'onde est caractéristique du milieu, de sa forme cristalline et de ses propriétés électroniques. Il est habituellement exprimé en cm^{-1} . Les décalages Raman sont toujours présents, très faibles en énergie et par le fait même, difficiles à détecter.

Lorsque la longueur d'onde d'excitation se situe près d'une bande d'absorption de l'énergie d'une molécule, l'intensité de la diffusion Raman augmente par un facteur pouvant atteindre 10^6 . Si cette bande d'absorption se situe dans l'ultraviolet, on appelle cette approche spectroscopie ultraviolette Raman de résonance (UVRR). Cet effet de résonance est relié aux bandes d'absorption et permet de cibler très spécifiquement certaines biomolécules utiles dans un but d'identification. C'est le cas du L-tryptophane, de la L-tyrosine et de la L-phénylalanine qui possèdent une importante bande d'absorption à des longueurs d'onde légèrement inférieures à 260 nm (Harz, Rösch et Popp, 2009 ; Rösch et coll., 2006 ; Asher, 2002 ; Smith et Dent, 2005).

Les niveaux d'énergie élevés des lasers UV peuvent entraîner la dégradation des échantillons et une perte des signaux de fluorescence, tout particulièrement des signaux Raman dans le cas de l'UVRR (McCreery, 2000 ; Smith et Dent, 2005).

2.2 Biomolécules fluorescentes d'intérêt

Tous les microorganismes et organismes biologiques contiennent une multitude de molécules pouvant fluorescer naturellement. La fluorescence émise par l'ensemble de ces molécules, lorsqu'exposées à des photons de longueurs d'onde adéquates, constitue un spectre caractéristique. Il faut, dans une stratégie de détection et de classification microbienne, cibler les molécules spécifiques à chaque microorganisme ou celles se retrouvant dans des proportions

permettant une discrimination sélective. Évidemment, l'intensité de la fluorescence doit être suffisamment forte pour en permettre la détection.

Les spectres de fluorescence produits par les molécules contenues à l'intérieur du matériel biologique dépendent de l'environnement intracellulaire et de son contenu en eau (Hill, Mayo et Chang, 2009). Ainsi, une molécule présente dans une spore ne fluorescera pas de la même façon que lorsqu'elle est dans une cellule végétative parce que la spore constitue un milieu plus sec (Hill et coll., 2009 ; Agranovski, Ristovski, Blackall et Morawska, 2004). Des différences ont aussi été observées entre la fluorescence de particules contenues dans des échantillons de procédé et celle des mêmes particules aéroportées (Hill et coll., 2009 ; Brosseau et coll., 2000). De plus, les spectres de fluorescence des bioaérosols peuvent interférer avec des aérosols non biologiques qui contiennent des hydrocarbures aromatiques ou d'autres aérosols biologiques comme ceux de champignons ou de pollen présents normalement dans l'environnement (Sivaprakasam, Huston, Scotto et Eversole, 2004 ; Saari et coll., 2014).

Certains autres produits présents dans les particules d'un bioaérosol peuvent fluorescer. C'est le cas, entre autres, des résidus provenant des milieux de croissance d'origine organique qui servent à la préparation de suspensions microbiennes utilisées lors de l'aérosolisation (Agranovski, Ristovski, Hargreaves, Blackall et Morawska, 2003). Les virus comme certaines protéines contiennent certains acides aminés qui émettent une fluorescence distincte pouvant servir dans une stratégie de classification.

On retrouve les molécules décrites aux sections 2.2.1 à 2.2.6 dans les moisissures ou dans les cellules bactériennes sous leur forme végétative ou sporulée. À cause de leur présence universelle, les spectres de fluorescence peuvent ainsi se ressembler d'une espèce à l'autre (Hill et coll., 2009).

2.2.1 Formes réduites de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) et de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)

Le NADH (forme réduite du NAD) et le NADPH (forme réduite du NADP) participent aux activités métaboliques cellulaires de tous les organismes vivants. Ils sont utilisés depuis très longtemps comme des indicateurs de l'état métabolique cellulaire (Chance, Cohen, Jobsis et Schoener, 1962) et sont présents dans les cellules eucaryotes et procaryotes. Ils absorbent les ultraviolets (UV) à 340 nm et fluorescent fortement entre 420 et 580 nm (Hill et coll., 2009 ; Ho, 2002 ; Sivaprakasam et coll., 2004 ; Hairston, Ho et Quant, 1997).

2.2.2 Tryptophane, tyrosine et phénylalanine

Le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine sont des acides aminés. Ils absorbent respectivement à 280 nm, 274 nm et 257 nm et fluorescent intrinsèquement à 348 nm, 303 nm et 282 nm. Ces acides aminés sont des constituants fondamentaux des protéines et sont impliqués dans les activités métaboliques des êtres vivants.

2.2.3 Flavines

Les flavines incluant la riboflavine sont des composés impliqués dans divers métabolismes et en particulier à celui de l'oxygène. Elles absorbent aux environs de 450 nm et leur fluorescence est émise autour de 520 nm (Farsund, Rustad et Skogan, 2012, Hill et coll., 2009, Ho, 2002, Sivaprakasam et coll., 2004).

2.2.4 Pyridoxine

La pyridoxine participe au métabolisme des acides aminés, des protéines, des glucides, des lipides et des acides nucléiques. Elle absorbe autour de 320 nm et produit une fluorescence près de 400 nm (Bridges, Davies et Williams, 1966 ; Pöhlker, Huffman et Pöschl, 2012, Bueno et Encinas, 2003).

2.2.5 Chlorophylle, lignine, cellulose et acide férulique

Quelquefois, d'autres molécules comme la chlorophylle, la lignine, la cellulose et l'acide férulique peuvent être présentes et contribuer à la fluorescence des particules biologiques. Elles modifient les spectres de fluorescence d'une particule en y ajoutant des caractéristiques distinctes utiles à une classification.

2.2.6 Autres molécules d'intérêts (bases de purine et de pyrimidine)

Les longueurs d'onde d'excitation en dessous de 260 nm permettent l'obtention de signaux de fluorescence autour de 334 nm provenant des bases de pyrimidine et de purine, composants prioritaires de l'ADN et de l'ARN (Pohlker et coll., 2012). Les résidus de purines se retrouvent également à l'intérieur de biomolécules importantes, telles que l'ATP, le GTP, l'AMP cyclique, le NADP, le SAM ou la coenzyme A.

2.3 Utilisation de la fluorescence

La présente étude vise l'utilisation de la fluorescence intrinsèque comme moyen de classification plutôt que comme outil de discrimination entre des particules biologiques et non biologiques, comme c'est le cas avec l'analyseur aérodynamique de particules utilisant la fluorescence ultraviolette (UV-APS, modèle 3314, TSI, MN, États-Unis).

Pour classifier ou identifier les microorganismes, il faut d'abord s'intéresser à la détection de biomolécules spécifiques à chaque microorganisme ou du moins arriver à en établir les proportions à partir de la fluorescence. Cette étude est basée sur l'hypothèse que des distinctions fondamentales existent entre les microorganismes et que les signaux de fluorescence sont spécifiques à chacun. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que des proportions différentes de biomolécules se retrouvent dans chacun des microorganismes selon leur structure microbiologique. Une telle application à des fins de santé et de sécurité du travail (SST) se heurte à plusieurs obstacles incluant le manque de données publiées relativement aux matrices

d'excitation et d'émission par fluorescence (EEM) pour les composés biologiques, les bactéries, les pollens, les moisissures et les particules non biologiques.

Trois longueurs d'onde approximatives d'excitation présentent un intérêt relié à la fluorescence intrinsèque des produits mentionnés plus haut et à leur spécificité pour les microorganismes : 450, 350, et 280 nm. Des techniques utilisant la fluorescence des bioaérosols pour deux longueurs d'onde d'excitation ont déjà démontré qu'il était possible de différencier les spores de bactéries des cellules bactériennes végétatives et des protéines (Sivaprakasam et coll., 2004). Des longueurs d'onde de 266 nm et 355 nm ont été sélectionnées pour la fabrication du montage utilisé dans cette étude. La première longueur d'onde a été choisie dans le but de cibler les acides aminés aromatiques comme le tryptophane qui sont présents dans les cellules microbiennes en tant que telles ou comme résidus dans plusieurs biomolécules. De plus, parce que plusieurs autres molécules émettent une fluorescence intrinsèque après excitation à cette longueur d'onde, sa sélection paraissait un bon choix. La deuxième longueur d'onde a été sélectionnée parce qu'elle était documentée dans plusieurs articles s'intéressant à la détection de matériel biologique basée sur le NADH, le NADPH et d'autres molécules.

Les méthodes basées sur la fluorescence de certains produits résultant de l'activité métabolique (NADH et NADPH) présentent moins de potentiel dans un système de classification parce que ces produits sont trop souvent non-spécifiques, qu'ils se retrouvent dans tous les organismes vivants et qu'en plus, les signaux de fluorescence émis ont tendance à varier pour un même microorganisme en fonction de son état métabolique. Toutefois, ces techniques se sont montrées efficaces et utiles pour discriminer le matériel biologique et celui non biologique contenus dans les particules d'un aérosol (Agranovski et coll., 2004, Agranovski et coll., 2003, Brosseau et coll., 2000).

La spectroscopie de fluorescence et principalement la spectroscopie Raman offrent le potentiel nécessaire à la détection et à la classification instantanée de contaminants biologiques en suspension dans l'air, dans un liquide ou sous forme de dépôts. De telles techniques peuvent être applicables en situation réelle et à distance des lieux contaminés, là où l'accessibilité est souvent réduite.

2.4 Objectifs

2.4.1 Objectif général

Cette activité est exploratoire et guidée par un potentiel d'utilisation. Le but premier était de vérifier l'utilisation de la fluorescence et des signaux Raman à différentes longueurs d'onde pour identifier et différencier certains microorganismes intéressant le milieu de la SST (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Cladosporium cladosporoides*, etc.), dans des dépôts, des suspensions ou des bioaérosols. Si ces techniques s'avèrent probantes, elles pourraient être utilisées pour la détection de *Legionella pneumophila* dans l'eau des tours de refroidissement ou d'autres réservoirs d'eau chaude. Certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* pourraient également être ciblées par les expérimentations futures.

2.4.2 Objectifs spécifiques

- Concevoir un système pour la détection à courte distance des microorganismes.
- Déterminer la longueur d'onde d'excitation ainsi que la plage spectrale de détection les plus appropriées pour le dépistage des microorganismes pertinents à la SST.
- Obtenir des spectres de fluorescence/Raman émis après excitation à une ou des longueurs d'onde pour des microorganismes (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Cladosporium cladosporoides*, etc), sous forme de bioaérosols ou déposées, dans une enceinte d'exposition.

3. MÉTHODOLOGIE ET MONTAGE

Les analyses de fluorescence ont été effectuées à l'aide d'un montage adaptable aux besoins spécifiques de chaque essai. Ce montage a été assemblé sur un support permettant de le déplacer facilement entre une hotte et une enceinte d'exposition à des bioaérosols, dite enceinte de biomasse (voir la figure 1 à la section 3.3).

Des essais dans une hotte ont été ajoutés aux expérimentations afin de parfaire la mise au point du système optique. Ils ont permis de vérifier la réponse adéquate du système sur des substances pures et connues, et ce, dans des conditions d'analyses optimales pour les signaux de fluorescence. Les substances testées étaient :

- a. des suspensions de microorganismes à concentrations variées (bactéries et moisissures) imitant les suspensions retrouvées dans les fluides de coupe et les biofontaines ;
- b. des dépôts de poussière sur les surfaces simulant ceux retrouvés dans les conduits de ventilation ;
- c. des dépôts localisés sur des plaques d'acier inoxydable imitant les gouttelettes asséchées sur des surfaces qu'on retrouve dans les industries alimentaire et pharmaceutique, ainsi que dans les hôpitaux.

Ces essais, effectués dans des conditions optimales, ont permis le développement des outils de traitement et d'analyses des signaux ainsi que l'acquisition de connaissances relatives aux signaux spécifiques à chaque type de microorganismes ciblé.

Les essais sur les bioaérosols, imitant ceux que l'on retrouve dans la réalité, ont été réalisés uniquement dans l'enceinte de biomasse. Ces essais ont permis une validation réaliste des données obtenues et des hypothèses formulées à partir des essais dans la hotte.

3.1 Microorganismes étudiés

La sélection des microorganismes a été faite afin de minimiser les dangers possibles pour les utilisateurs. Ils étaient tous reconnus comme non pathogènes pour l'homme selon la classification des lignes directrices de biosécurité produite par l'Agence de santé publique du Canada. Les bactéries utilisées étaient :

- *Staphylococcus epidermidis*
- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus megaterium*
- *Escherichia coli*
- *Enterobacter cloacae*

Les moisissures:

- *Cladosporium cladosporoides*
- *Penicillium digitatum*
- *Ulocladium chartarum*

3.2 Préparation des suspensions de microorganismes

Toutes les suspensions de microorganismes ont été préparées à partir de culture pure sur gélose. Les microorganismes provenaient de la banque de microorganismes de l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). Après inoculation sur une gélose et suivant la période de croissance, les microorganismes étaient récoltés en roulant un tampon d'ouate monté sur stylet sur la surface couverte de la gélose et en le lavant, par la suite, dans une solution d'eau « millipore-Q ». L'opération était répétée jusqu'à ce que la gélose soit débarrassée visuellement des colonies. Les prélèvements de microorganismes à l'aide de la ouate ont été effectués avec extrême précaution de façon à éviter l'entraînement du milieu de culture dans la suspension, puisque celui-ci peut affecter le spectre de fluorescence. La suspension bactérienne dans l'eau stérile constituait le concentré pour un microorganisme. Des suspensions moins concentrées étaient préparées par dilutions successives. Certaines des concentrations de bactéries ont été estimées à l'aide d'une méthode turbidimétrique basée sur la densité optique, mesurée à 595 nm (OD_{595}) à l'aide de l'appareil Bio-Photometer Plus (Eppendorf, Hamburg, Allemagne).

Le tableau 1 indique les temps d'incubation et le milieu de culture utilisés pour chaque microorganisme.

Tableau 1 : Croissance des microorganismes

Microorganisme	Milieu de culture	Incubateur	
		Température (°C)	Durée (jour)
<i>Staphylococcus Epidermidis</i>	Trypticase Soy Agar (TSA)	37	1
<i>Bacillus Subtilis</i>	Trypticase Soy Agar (TSA)	37	1
<i>Escherichia coli</i>	Trypticase Soy Agar (TSA)	37	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	Trypticase Soy Agar (TSA)	37	1
<i>Bacillus megaterium</i>	Trypticase Soy Agar (TSA)	37	1
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	Extrait de malt	25	5
<i>Penicillium digitatum</i>	Extrait de malt	25	5
<i>Ulocladium chartarum</i>	Extrait de malt	25	5

3.3 Préparation des dépôts de surface

La figure 1 illustre l'enceinte de biomasse utilisée pour la préparation des dépôts de surfaces. On peut y préparer douze échantillons à la fois.

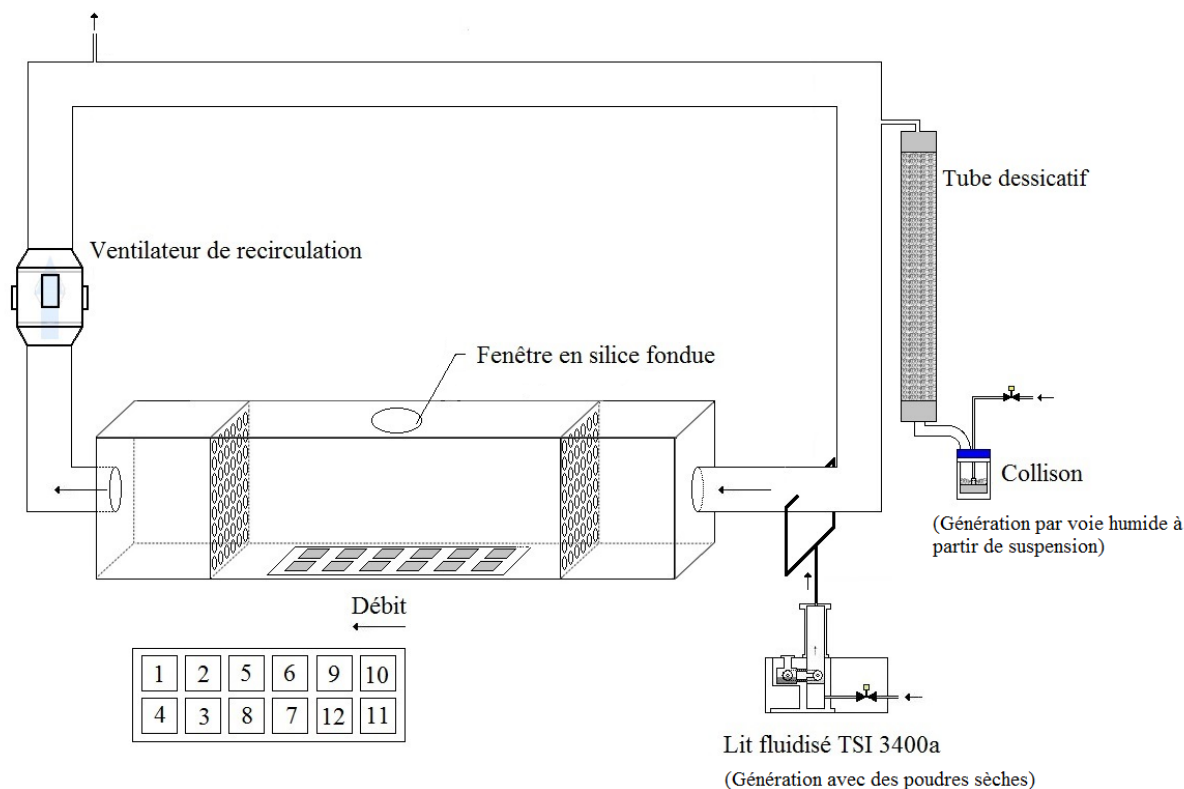


Figure 1 : Enceinte de biomasse pour la préparation des dépôts de surface (en bas à gauche, numérotation des plaques dans l'enceinte)

Les dépôts sur plaque ont été préparés en opérant simultanément ou individuellement un générateur Collision NSF CN31I (BGI Inc, Waltham, MA, USA) et un lit fluidisé TSI 3400a (TSI Inc., Shoreview, MN, USA). Ce dernier générateur était utilisé avec de la poussière stérilisée provenant d'aspirateurs de résidences privées et tamisée pour en retirer les plus grosses particules. L'importance et l'épaisseur du dépôt étaient ajustées par l'opération plus ou moins longue du système. Les dépôts ont tous été réalisés sur des plaques d'acier inoxydable carrées de 10 cm de côté et placées préalablement sur une matrice de support développée à cet effet. Les plaques étaient, par la suite, analysées sur le montage optique placé dans la hotte.

3.4 Préparation des dépôts localisés

Les dépôts localisés ont été préparés en mettant à sécher, à l'aide d'une micropipette, 10 µl de suspension bactérienne sur les plaques d'acier inoxydable. Afin d'obtenir des réplicats, trois endroits bien précis sur chaque plaque étaient contaminés (figure 2). Un 4^e dépôt servait de contrôle avec 10 µl d'une solution sans microorganisme (blanc). Après pipetage, les plaques échantillons étaient mises à sécher dans un incubateur à la température de 37 °C pendant une heure. Les plaques étaient, par la suite, analysées sur le montage optique placé dans la hotte.

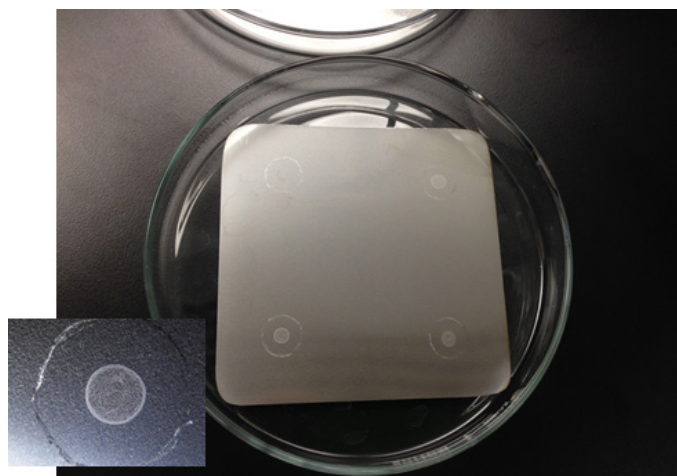


Figure 2 : Dépôts localisés sur plaque.

3.5 Montage utilisé pour la mesure de la fluorescence

Un montage adaptable aux différentes exigences de l'étude a été fabriqué. Il est constitué de deux lasers UV pulsés commerciaux (266 nm et 355 nm, tableau 2), de deux expanseurs de faisceaux (un pour chaque laser, tableau 3), d'une lentille de collection (tableau 4), de deux filtres coupe-bandes (tableau 5), d'un assemblage de fibres optiques circulaire à ligne (tableau 6), d'un spectromètre pour l'analyse des signaux émis (tableau 7) et d'une caméra à dispositif de transfert de charges (DTC) rétroéclairé (tableau 8).

Tableau 2 : Spécifications des lasers

Manufacturier	Modèle	λ (nm)	Durée de l'impulsion (ns)	Énergie de l'impulsion (μ J)	Fréquence (Hz)
Innolight (Dieburg, Allemagne)	Flare PQ UV 100-200	355	2,5	<200	Monocoup- 1000
CrystaLaser (Reno, NV, États-Unis)	QL266-50	266	11	20	100 – 1000

Tableau 3 : Spécifications des expanseurs de faisceaux

Manufacturier	Modèle	λ (nm)	Facteur d'expansion	Ouverture à la sortie (mm)
Sill Optics (Wendelstein, Allemagne)	S6ASS4107/075	355	7x	30,0
Sill Optics (Wendelstein, Allemagne)	S6ASS4105/199	266	5x	30,0

Tableau 4 : Spécifications de la lentille de collection

Manufacturier	Modèle	Matériau	Forme	Diamètre (mm)	Distance focale (f) (mm)
Thorlabs (Newton, NJ, États-Unis)	LA4545	Silice fondue	Plano-convexe	50,8	100

Tableau 5 : Spécifications des filtres coupe-bande

Manufacturier	Modèle	λ_{coupure} (nm)	Diamètre (mm)	Densité optique à λ_{coupure} (mm)
Semrock (Rochester, NY, États-Unis)	BLP01-355R-25	355	25,0	6
Semrock (Rochester, NY, États-Unis)	LP02-266RU-25	266	25,0	>6

Tableau 6 : Spécifications du faisceau de fibres optiques

Manufacturier	Configuration de l'assemblage	Type de fibres	Diamètre d'entrée (mm)	Longueur (m)	Nombre de fibres
CeramOptec. (Bonn, Allemagne)	Entrée circulaire – sortie linéaire	Optran UVNS UV50/60/70	0,8	5	127

Tableau 7 : Spécifications du spectromètre

Manufacturier	Modèle	Distance focale (f) (mm)	Ouverture (f/#)	Réseau
Princeton Instruments (Acton, MA, États-Unis)	Acton SpectraPro-2300i (imaging Czerny-Turner)	300	f/4	1200/mm, blazé 500 nm 300/mm, blazé 500 nm

Tableau 8 : Spécifications de la caméra

Manufacturier	Modèle	Format du détecteur	Courant d'obscurité à -70 °C (e ⁻ /pixel/s)	Logiciel
Princeton Instruments (Trenton, NJ, États-Unis)	PIXIS 1024B	1024x1024 pixels 13 µm x 13 µm pixels	0,02 (typique) 0,07 (max)	Win/Spec 32

Les deux systèmes d'émission d'un faisceau laser ont été montés de façon symétrique de part et d'autre du système de collection. Un seul des lasers est opéré à la fois. Le rayon émis est élargi par l'expandeur de faisceaux puis redirigé par un jeu de miroirs sur un volume ou sur une surface de mesure situé à 300 mm en dessous de la lentille de collection. Le rôle de cette lentille est de former l'image des signaux de fluorescence/Raman émis à l'entrée du faisceau de fibres optiques. Cette lentille est localisée à 150 mm de l'entrée circulaire du faisceau de fibres. Avant de pénétrer dans le faisceau de fibres, les rayons traversent un filtre dont la fréquence de coupure permet d'éliminer la contribution du laser en fonction. Dans cette configuration, le système optique produit une image du volume d'interrogation de taille deux fois plus petite que celle de l'objet. Un objet de 1 mm produira ainsi une image de 0,5 mm. Les signaux pénétrant par l'entrée circulaire du faisceau de fibres sont transmis à sa sortie linéaire (fibre de base : 50 μ m, ouverture numérique : 0,22) qui est utilisée directement comme fente d'entrée du spectromètre. La plage spectrale couverte par le détecteur passe de 140 à 33 nm et sa résolution en longueur d'onde varie de 0,8 à 0,2 nm en changeant le réseau de 300 lignes/mm par celui de 1200 lignes/mm.

Lors des expériences avec le laser à 266 nm, les plages spectrales couvertes s'étendaient de 280 à 420 nm ou de 266 à 299 nm, alors que pour celles effectuées avec le laser à 355 nm, les régions du spectre couvertes s'étendaient de 370 à 510 nm ou de 355 à 386 nm selon le réseau choisi. La figure 3 illustre le montage optique lors de son utilisation sous une hotte. En général, les temps d'acquisition des signaux ont été de 10 secondes sauf lorsque mentionné autrement.

Pour tous les essais, une mesure du bruit de fond sans le contaminant a été effectuée dans le but d'obtenir le signal de base devant être soustrait avant de poursuivre les analyses.

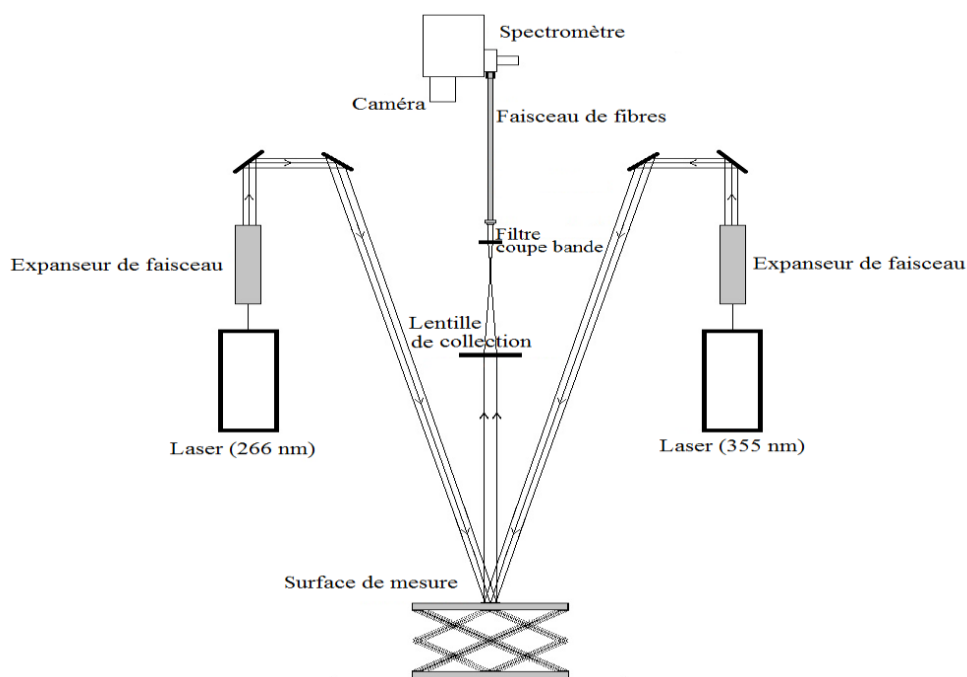


Figure 3 : Positionnement du système dans une hotte

3.5.1 Mesure de la fluorescence sous la hotte

Lors des mesures sous la hotte, une plateforme ajustable permettait de localiser les échantillons à la distance requise de 300 mm comme le montre la figure 3. Le montage sous la hotte a d'abord été utilisé pour la vérification du système et ensuite pour l'obtention des spectres de fluorescence pour les suspensions, les dépôts de surface et finalement pour les dépôts localisés.

3.5.1.1 Vérification de l'efficacité du montage

Les vérifications préliminaires du système de détection ont été effectuées sous la hotte en utilisant de l'aluminium comme support afin de minimiser le bruit de fond. Des produits purs ou des suspensions de ces derniers ont été déposés sur la surface de mesure. Les longueurs d'onde d'émission reliées à la fluorescence et obtenues pour un produit étaient comparées à celles rapportées dans la littérature. Les produits suivants ont été testés : nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH), nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite (NADPH), tryptophane, tyrosine et phénylalanine.

3.5.1.2 Suspensions de microorganismes étudiées

Le montage sous la hotte a servi à l'obtention des spectres de fluorescence pour certains microorganismes en suspension. Les suspensions étaient placées dans des cuvettes de quartz. Les cuvettes étaient ensuite déposées sur une plaque d'aluminium ajustée à une distance de 30 cm de la lentille de collection à l'aide de la plateforme du système. Les observations à 355 nm ont été limitées aux suspensions de *Staphylococcus epidermidis*. La majorité des tests ont donc été effectués avec des longueurs d'onde d'excitation à 266 nm pour des suspensions de :

- a. bactéries :
 - o *Escherichia coli*
 - o *Bacillus subtilis*
 - o *Enterobacter cloacae*
 - o *Staphylococcus epidermidis*
 - o *Bacillus megaterium*
- b. moisissures :
 - o *Ulocladium chartarum*
 - o *Penicillium digitatum*
 - o *Cladosporium cladosporoides*
- c. bactéries et moisissures :
 - o *Staphylococcus epidermidis* avec *Cladosporium cladosporoides*
 - o *Staphylococcus epidermidis* avec *Penicillium digitatum*
 - o *Enterobacter cloacae* avec *Ulocladium chartarum*
- d. deux bactéries :
 - o *Enterobacter cloacae* avec *Staphylococcus epidermidis*

3.5.1.3 Dépôts de surface sur des plaques

Des spectres de fluorescence ont été obtenus sous la hotte à 266 nm pour des dépôts de surface plus ou moins importants de poussière contaminée avec des moisissures de *Penicillium digitatum*. Les dépôts de surface sur plaques ont été préparés à l'aide de l'enceinte de biomasse décrit à la figure 1.

3.5.1.4 Dépôts localisés sur plaques

Plusieurs mesures de fluorescence sous la hotte ont été effectuées pour des dépôts localisés à des concentrations données d'*Escherichia coli* (n=18) et de *Bacillus megaterium* (n=12), ainsi que pour des concentrations variées d'*Escherichia coli* (n=9) et de *Bacillus megaterium* (n=9).

3.5.2 Mesure de fluorescence dans l'enceinte de biomasse

La figure 4 schématise le système lorsqu'il est positionné sur l'enceinte de biomasse. Une fenêtre ronde, en silice fondue, de 100 mm de diamètre et perméable aux ultraviolets, a été installée sur le dessus de la chambre. Elle permet la détection de la fluorescence dans un volume de mesure situé approximativement au centre de l'enceinte. Au niveau du radier de l'enceinte, il est possible de remarquer une trappe à lumière alimentée en air pur et placée derrière le volume de mesure. Son rôle est d'éliminer les signaux résiduels pouvant provenir de la poussière déposée en aval des rayons. Les bioaérosols ont été générés à l'aide du générateur NSF CN31I de type Collison (BGI Instruments, Waltham, MA, États-Unis). La suspension de microorganismes était placée dans le réservoir du générateur opéré à 20 psi. Un débit d'air d'évacuation était ajusté de façon à maintenir une pression négative à l'intérieur de l'enceinte, ceci afin de réduire les risques de contamination de la hotte de confinement où se situe le montage. La figure 5 montre une photographie du montage.

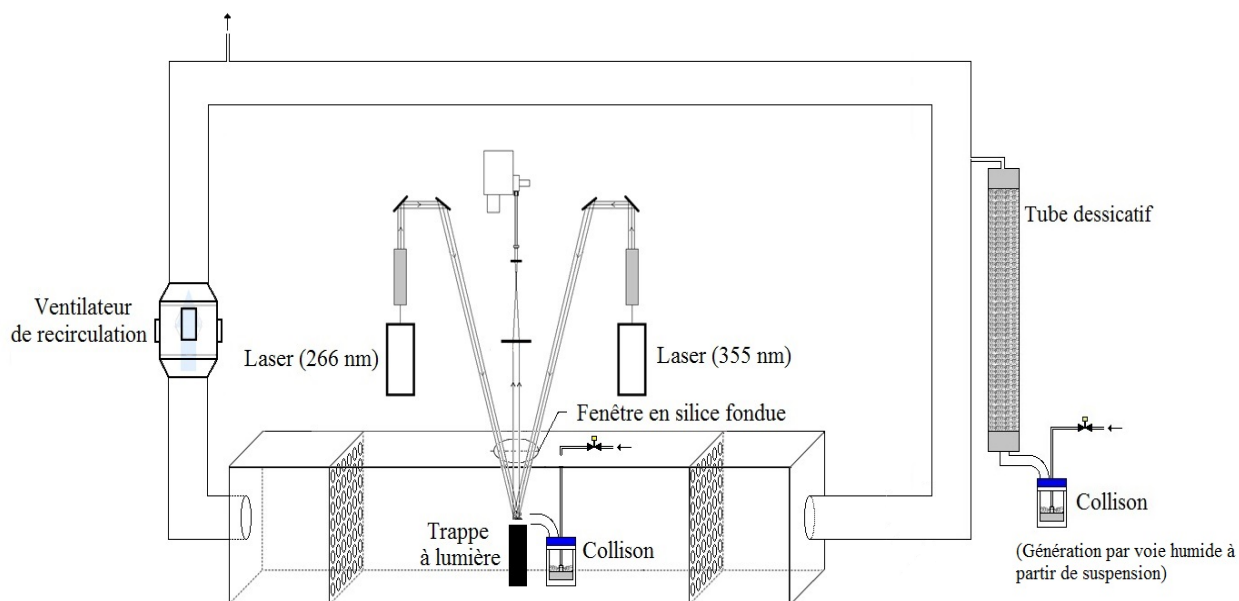


Figure 4 : Positionnement du système sur la chambre de biomasse

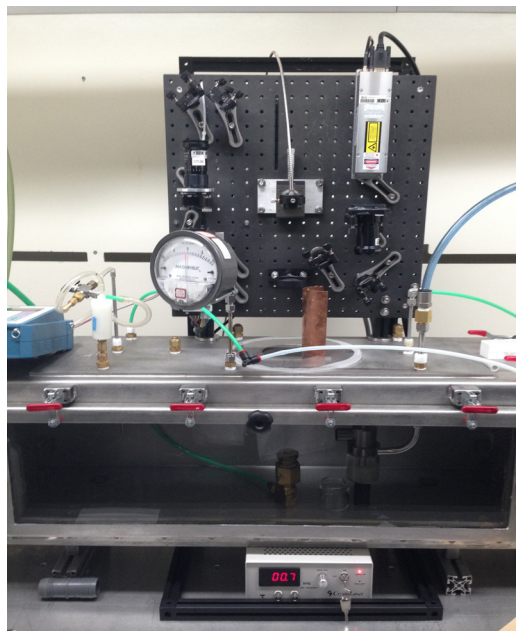


Figure 5 : Photographie du montage sur l'enceinte de biomasse

Le montage, placé sur le système de biomasse, a été utilisé pour obtenir les spectres de fluorescence des bioaérosols générés à partir de suspensions pures de *Staphylococcus epidermidis*, d'*Enterobacter cloacae*, de *Bacillus subtilis*, d'*Escherichia coli* et de *Penicillium digitatum*.

3.6 Essais de la spectroscopie Raman

3.6.1 Suspensions bactériennes

Tous les spectres de suspensions ont été obtenus pour une longueur d'onde d'excitation de 266 nm avec une puissance moyenne de 13 mW sur l'échantillon, une taille de faisceau de 6 mm et le réseau de 1200 lignes/mm. L'étendue spectrale obtenue couvrait 4000 cm^{-1} (266 à 299 nm) avec une résolution de 28 cm^{-1} (0,2 nm). Les temps d'acquisition de données ont varié de quelques secondes à quelques minutes. Une suspension pure de *Staphylococcus epidermidis* a été analysée par spectroscopie Raman avec deux temps d'acquisition, soit 10 et 90 secondes. Des suspensions pures de moisissures ont également été investiguées avec des temps d'acquisition différents soit *Ulocladium chartarum* pendant 60 secondes et *Cladosporium cladosporoides* pendant 10 secondes.

3.7 Analyse mathématique des signaux de fluorescence

La mesure du signal de référence a toujours été soustraite du signal détecté pour l'obtention du spectre final. Cette mesure était obtenue à partir des surfaces non contaminées (plaques d'acier inoxydable) ou à partir de solutions pures ne contenant pas de microorganismes (eau Millipore-Q). En plus d'effectuer l'analyse de la spécificité propre à chacun des spectres, les signaux de fluorescence ont été traités mathématiquement, en premier lieu par la méthode de régression locale et ensuite par dérivation aux premier et deuxième degrés.

4. RÉSULTATS

4.1 Suspensions de microorganismes

La figure 6 montre l'intensité des signaux de fluorescence en unité arbitraire (u.a.) mesurée à partir de deux répliquats d'une suspension de *Staphylococcus epidermidis*. Les concentrations ainsi que le temps d'acquisition utilisés étaient identiques.

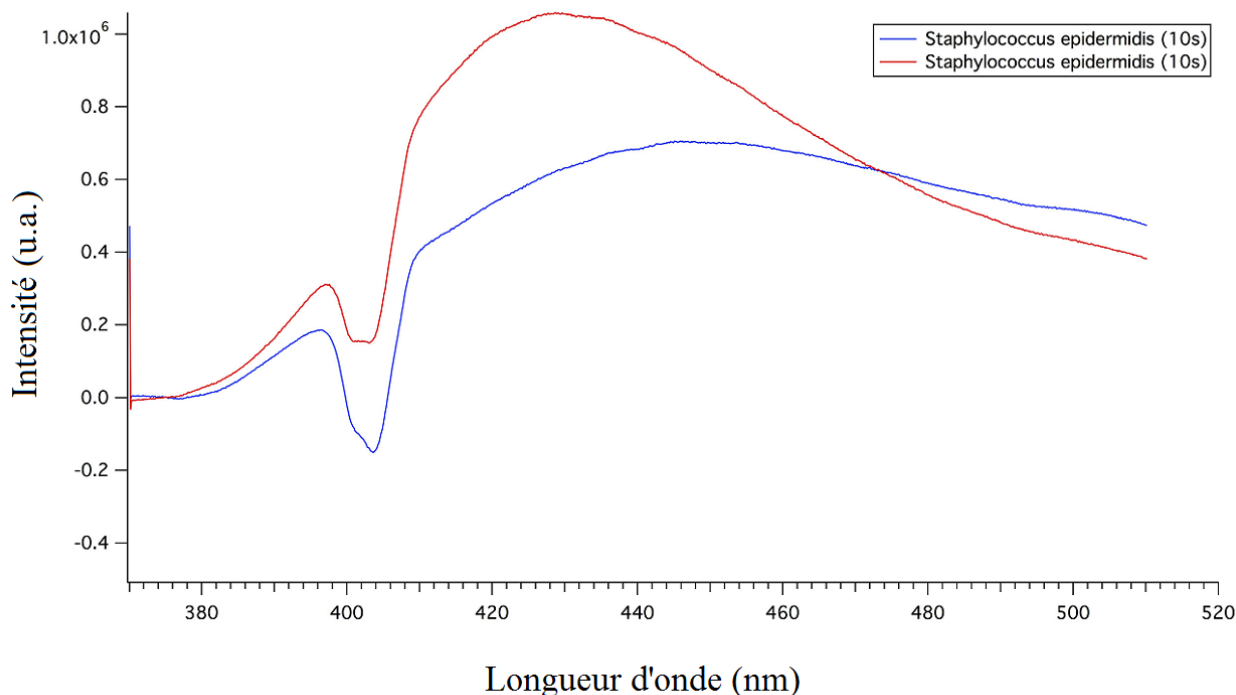


Figure 6 : Fluorescence de *Staphylococcus epidermidis* (2 répliquats, $\lambda_{\text{excitation}} = 355 \text{ nm}$)

Les figures 7 et 8 présentent respectivement les spectres obtenus pour différentes suspensions de bactéries et de moisissures. Elles mettent en évidence les maxima de fluorescence obtenus pour une longueur d'onde d'excitation à 266 nm.

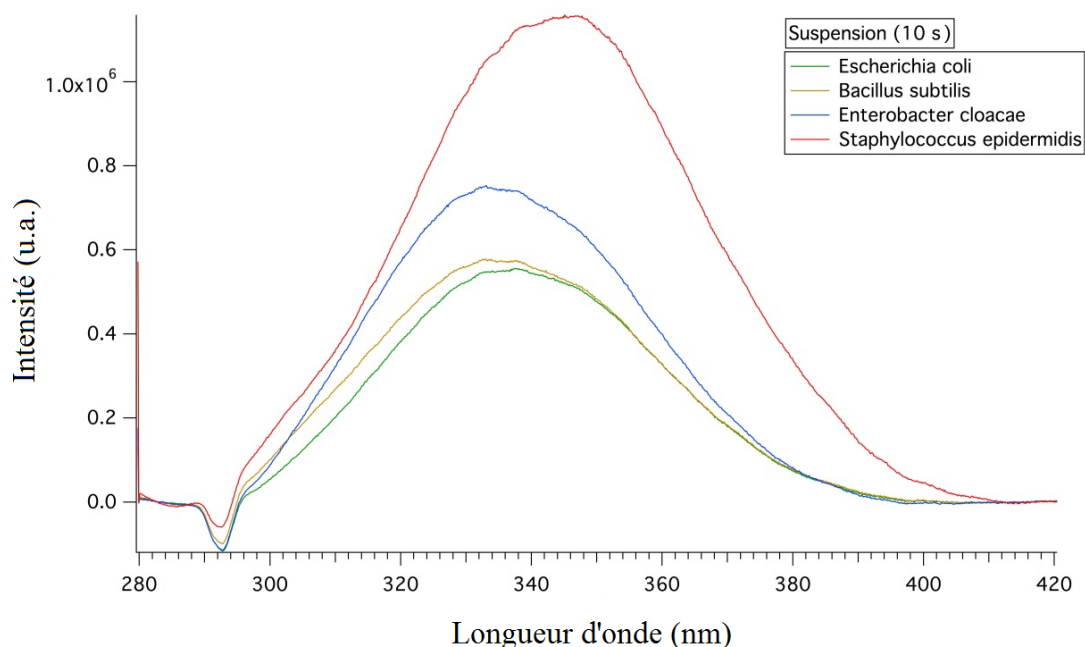


Figure 7 : Fluorescence d'*Enterobacter cloacae*, de *Staphylococcus epidermidis*, de *Bacillus subtilis* et d'*Escherichia coli* ($\lambda_{\text{excitation}} = 266 \text{ nm}$).

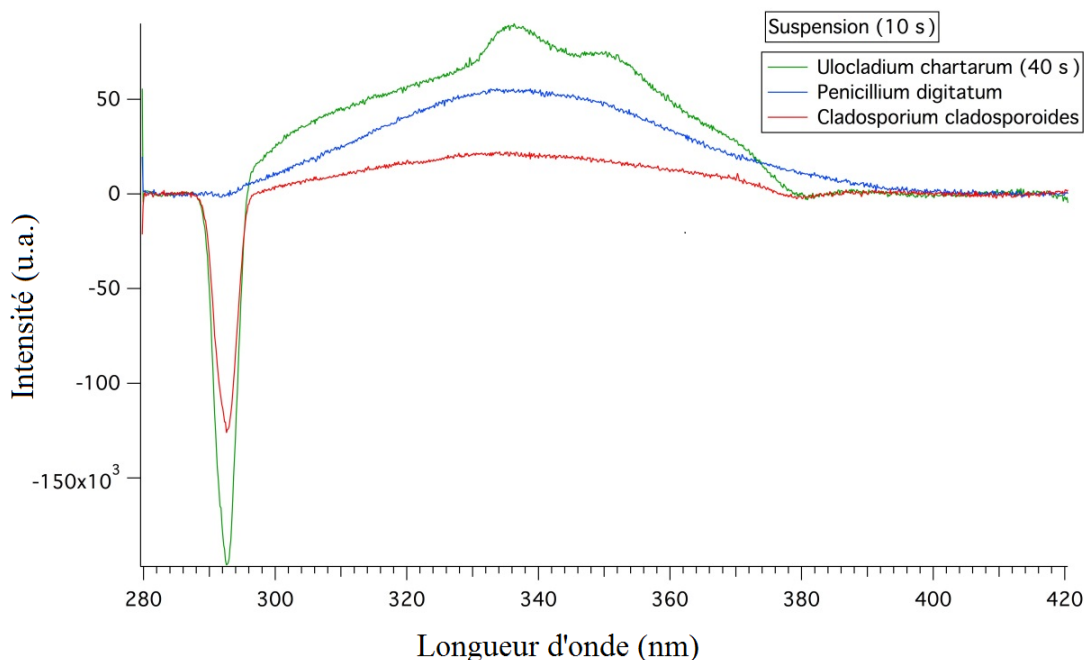


Figure 8 : Fluorescence de *Cladosporium cladosporoides*, de *Penicillium digitatum* et d'*Ulocladium chartarum* ($\lambda_{\text{excitation}} = 266 \text{ nm}$).

La figure 9 montre la première dérivée des signaux ($dI/d\lambda$) pour les bactéries de la figure 7, alors que la figure 10 montre celle des signaux présentés à la figure 8 et obtenus pour les moisissures.

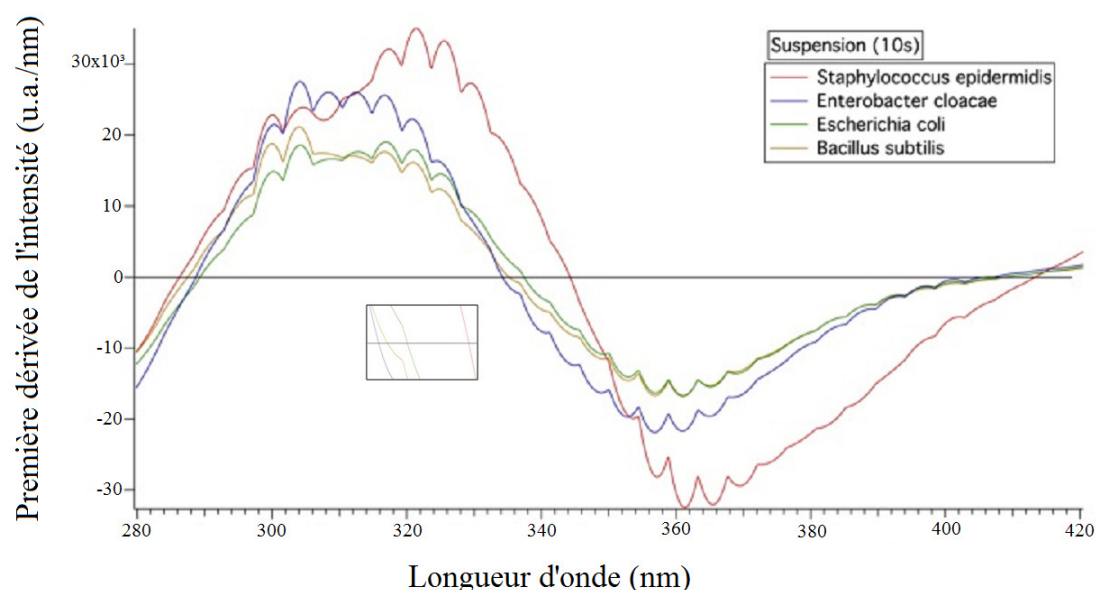


Figure 9 : Première dérivée des signaux pour *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*

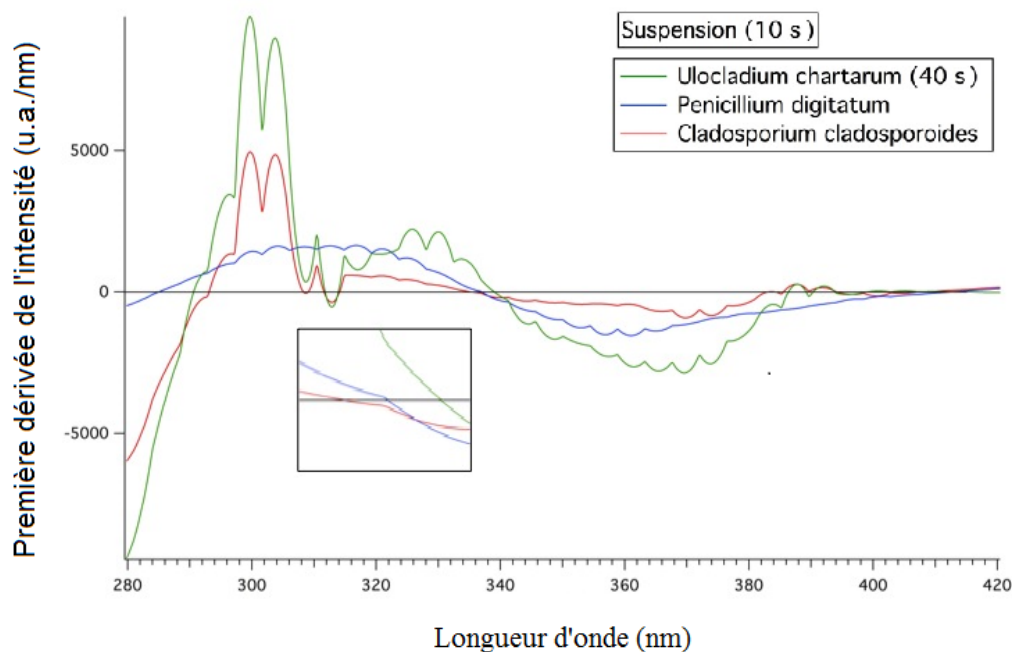


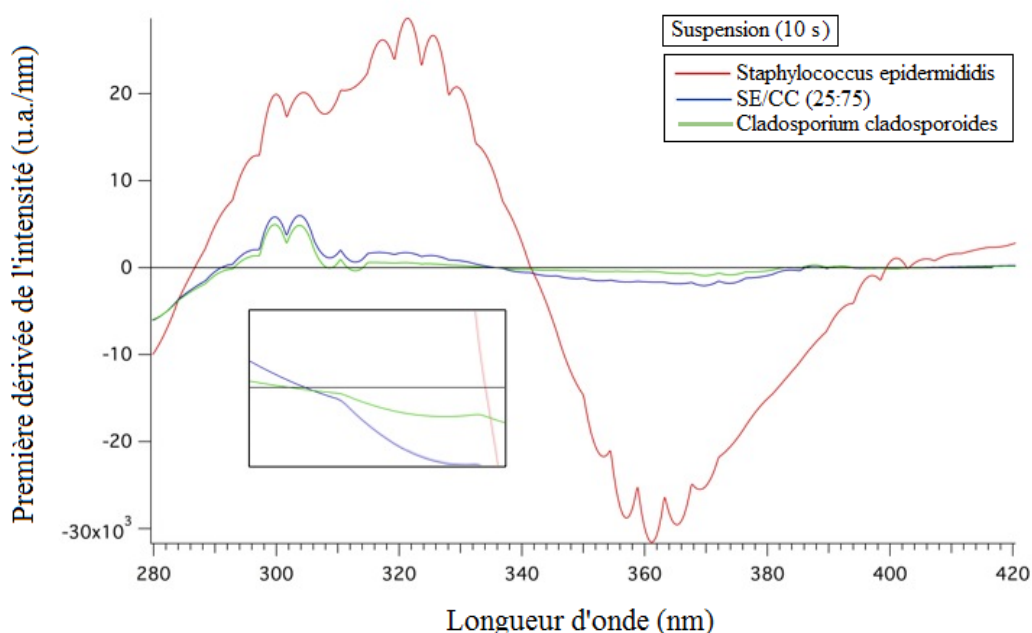
Figure 10 : Première dérivée des signaux pour *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium digitatum* et *Ulocladium chartarum*

Les positions observables des maxima de fluorescence obtenus pour trois ou quatre réplicats de suspensions bactériennes sont résumées au tableau 9. Les maxima présentés ont été déterminés par dérivation mathématique des signaux respectifs de fluorescence.

Tableau 9 : Longueur d'onde des maxima d'émission de fluorescence pour les bactéries en suspension, pour différents réplicats

Bactérie	Réplicat			
	I	II	III	IV
	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\lambda_{\max}$ (nm)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	342	344	344	344
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	334	335	335
<i>Escherichia coli</i>	-	338	338	339
<i>Bacillus subtilis</i>	-	335	340	336

Les figures 11 à 14 montrent les premières dérivées des signaux de fluorescence obtenus avec une longueur d'onde d'excitation de 266 nm pour différents mélanges de microorganismes. Ces figures mettent en évidence le déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale selon que les suspensions soient pures ou mélangées.

**Figure 11 : Première dérivée des signaux pour un mélange de *Staphylococcus epidermidis* (SE) et de *Cladosporium cladosporoides* (CC)**

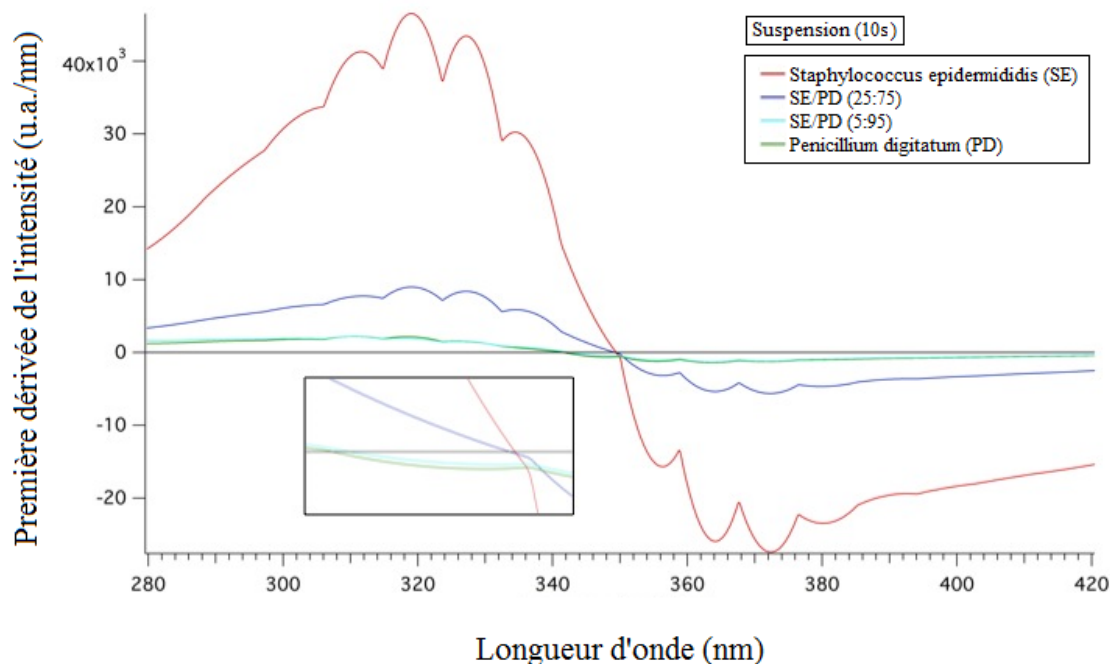


Figure 12 : Première dérivée des signaux pour un autre mélange de *Staphylococcus epidermidis* (SE) et de *Penicillium digitatum* (PD)

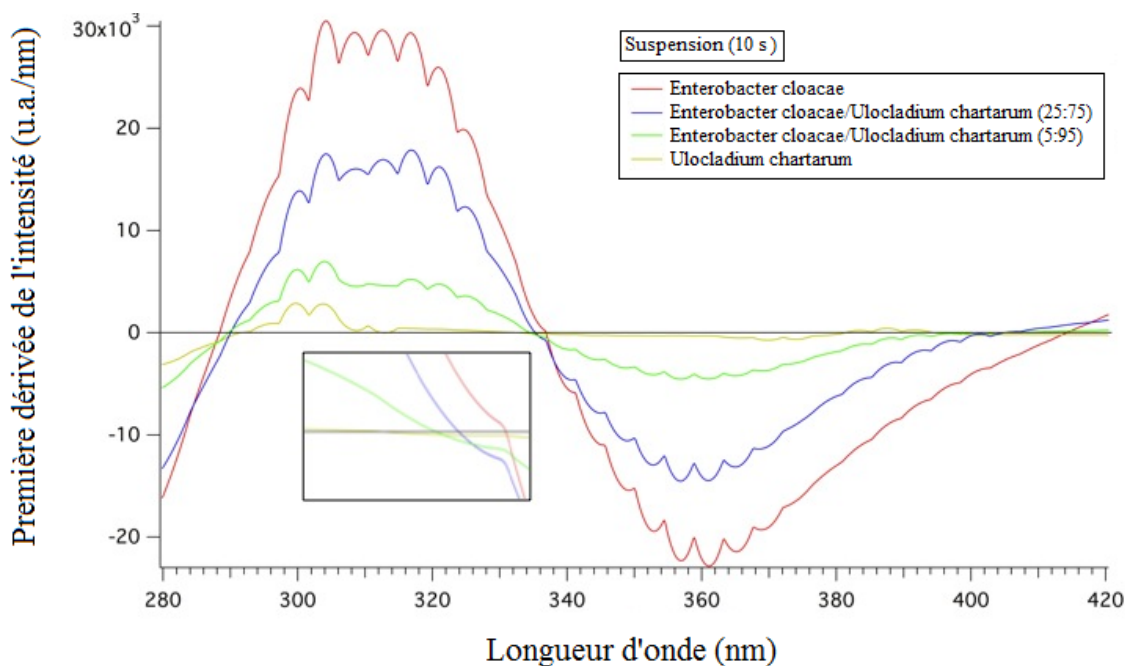


Figure 13 : Première dérivée des signaux pour un mélange d'*Enterobacter cloacae* et d'*Ulocladium chartarum*

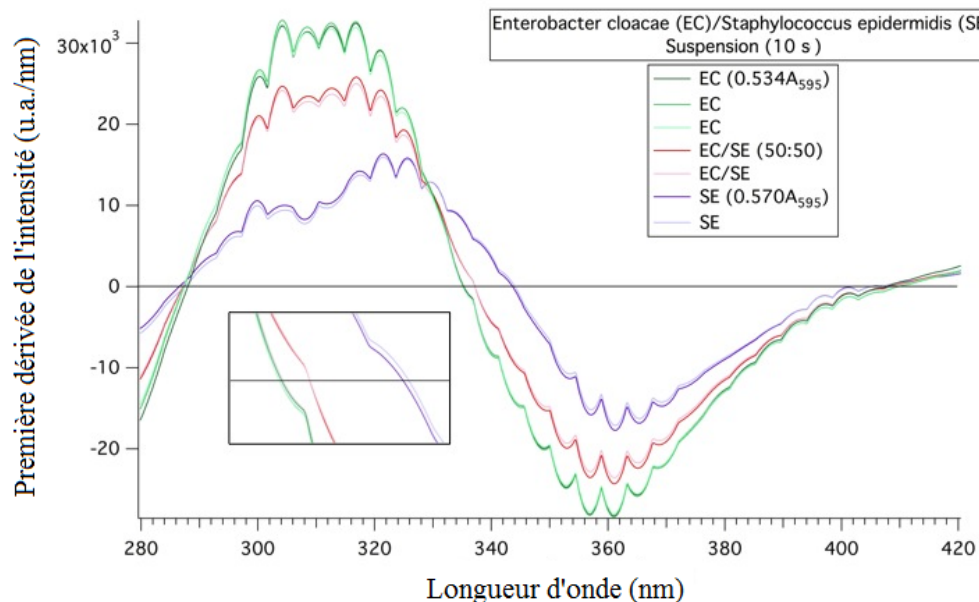


Figure 14 : Première dérivée des signaux pour des suspensions d'*Enterobacter cloacae* (trois réplicats) et de *Staphylococcus epidermidis* (2 réplicats) et d'un mélange 1:1 des deux bactéries (2 réplicats)

4.1.1 Variation de la fluorescence en fonction de la concentration

Les variations des signaux de première dérivée en fonction des concentrations des suspensions des bactéries *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis* sont données aux figures 15 et 16. Les concentrations présentées à la figure 15 sont exprimées en fonction de la densité optique (OD_{595}). Différents maxima sont observables selon les concentrations des suspensions analysées.

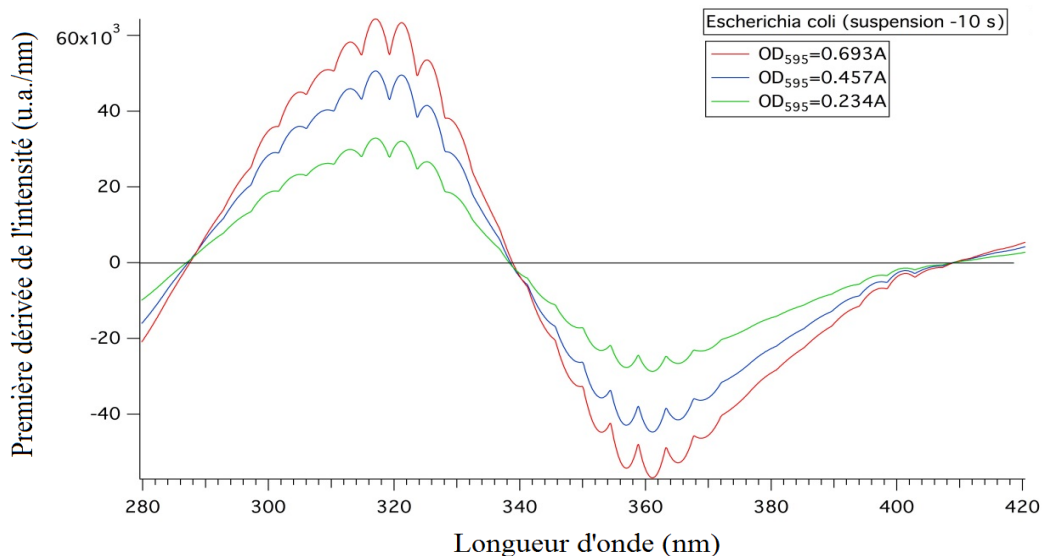


Figure 15 : Première dérivée du signal de fluorescence d'*Escherichia coli* à différentes concentrations évaluées par densité optique

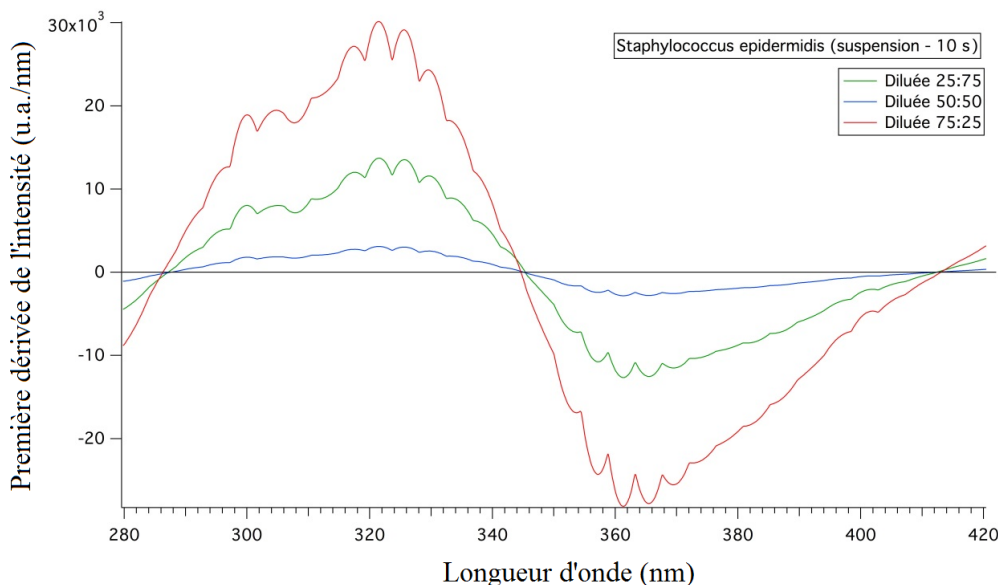


Figure 16 : Première dérivée du signal de fluorescence de *Staphylococcus epidermidis* à différentes concentrations évaluées par densité optique

4.1.2 Différence entre les bactéries à Gram négatif et celles à Gram positif

Les figures 17 à 20 présentent les caractéristiques des signaux de première et de deuxième dérivations qui montrent des différences entre les bactéries à Gram négatif et celles à Gram positif.

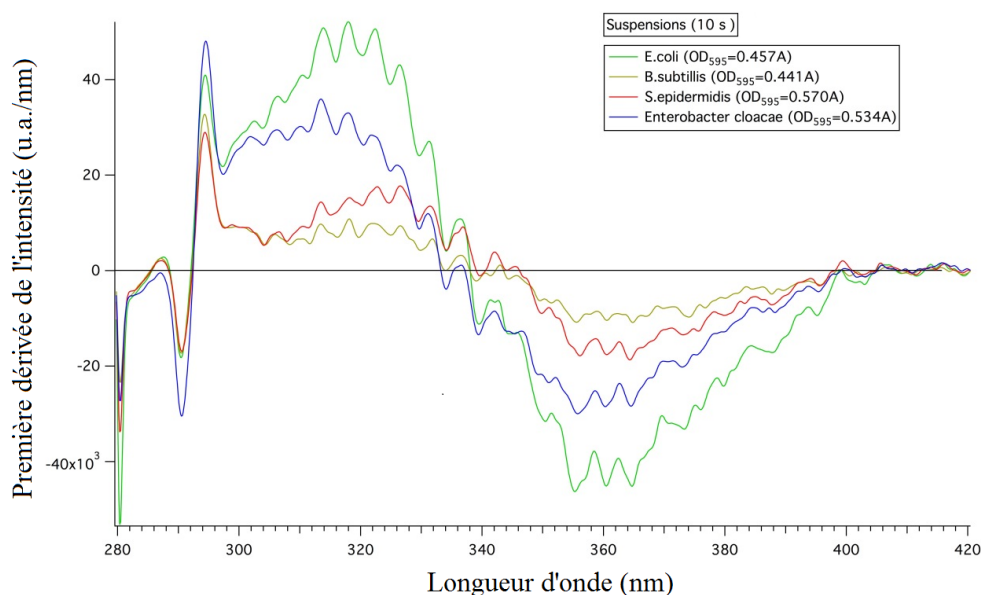


Figure 17 : Première dérivée des signaux pour certaines bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Enterobacter cloacae*) et à Gram positif (*Staphylococcus epidermidis* et *Bacillus subtilis*) à des concentrations semblables selon leur densité optique

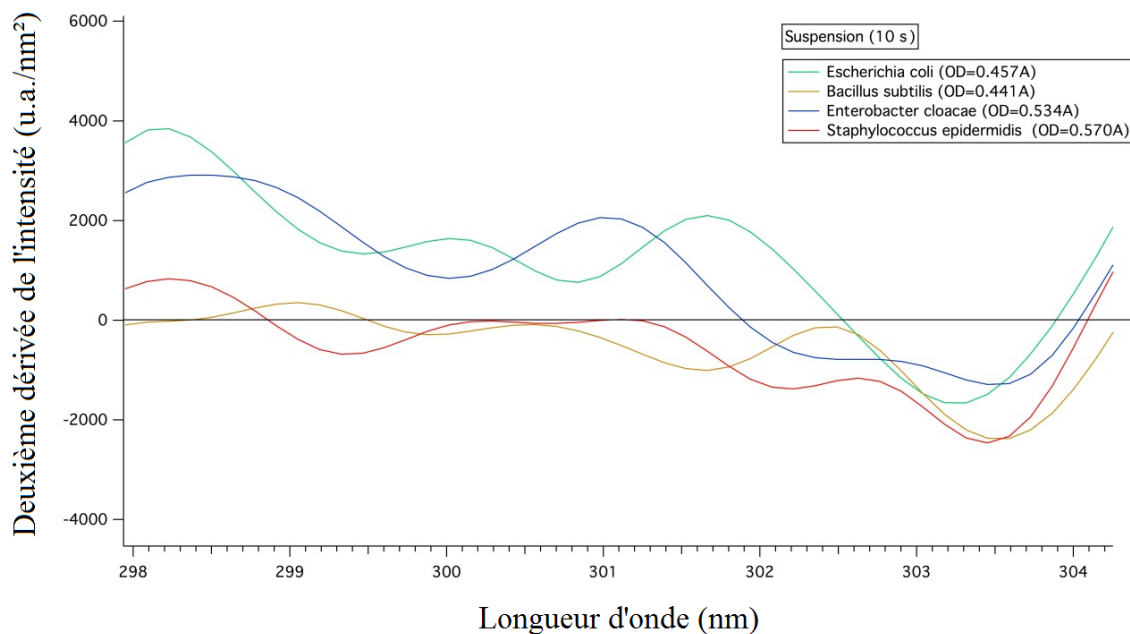


Figure 18 : Deuxième dérivée des signaux de la figure 17

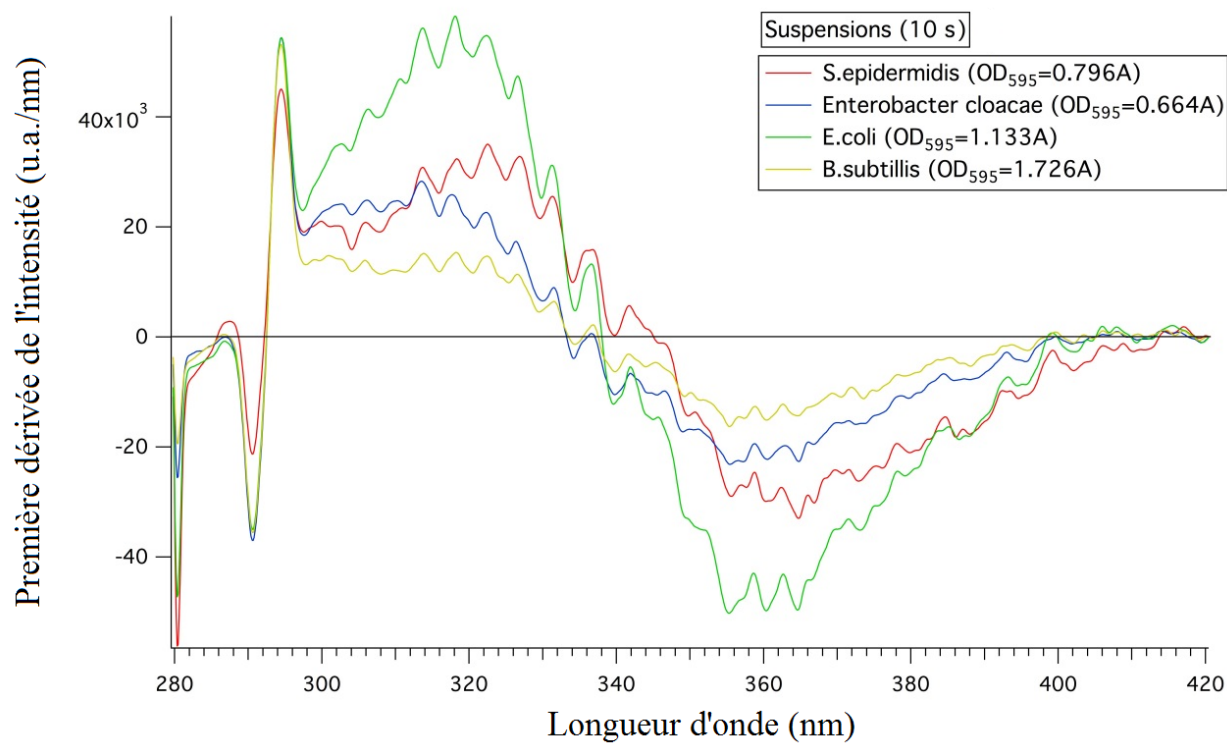


Figure 19 : Première dérivée des signaux pour certaines bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Enterobacter cloacae*) et à Gram positif (*Staphylococcus epidermidis* et *Bacillus subtilis*) à des concentrations variables selon leur densité optique

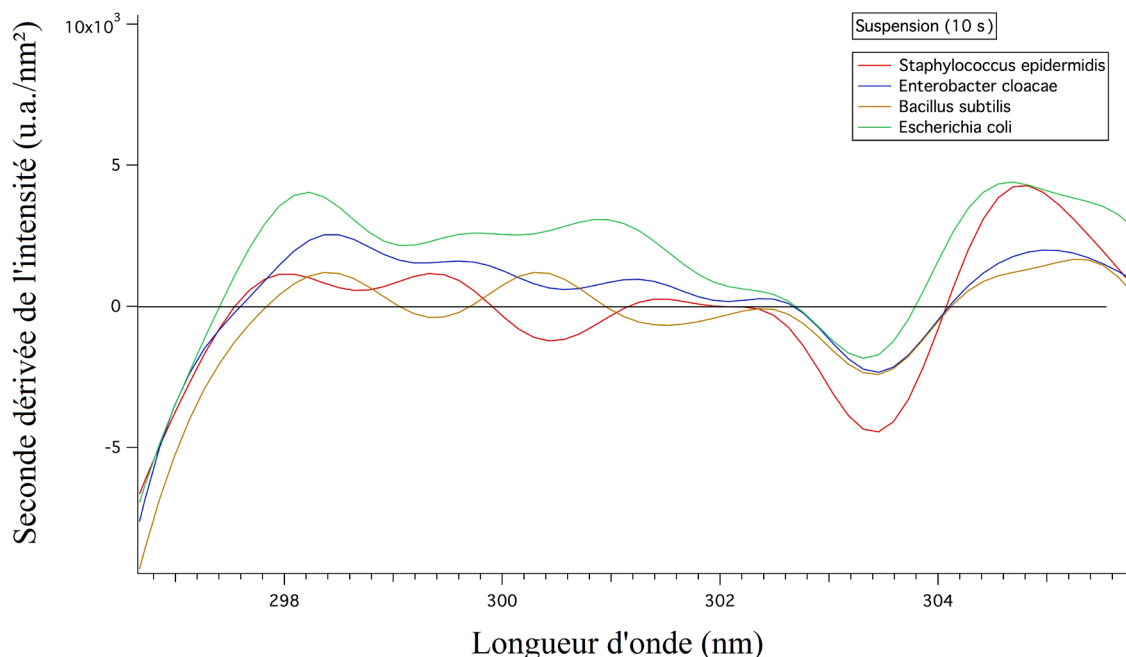


Figure 20 : Deuxième dérivée des signaux de la figure 19

4.2 Dépôts de surface sur plaque

La figure 21 montre les variations de l'intensité des signaux de fluorescence pour différentes importances de poussières déposées avec et sans contamination. Les signaux ont été obtenus en ciblant visuellement les endroits où les dépôts de surface étaient faibles, moyens et élevés sur la plaque #11. La même procédure a été effectuée pour la poussière contaminée sur la plaque #10.

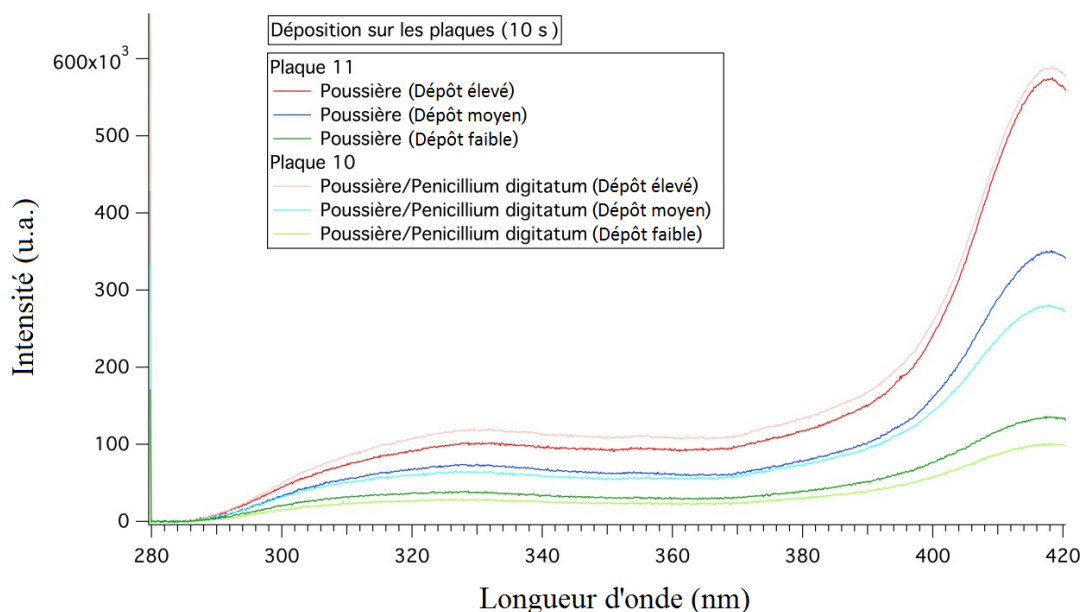


Figure 21 : Fluorescence pour différentes importances de dépôts de *Penicillium digitatum*

La figure 22 détaille les signaux de fluorescence mesurés au centre des plaques déposées sur le radier de l'enceinte de biomasse lors d'un empoussièrement, comme montré à la figure 1, afin d'évaluer la dispersion du dépôt sur le radier de l'enceinte.

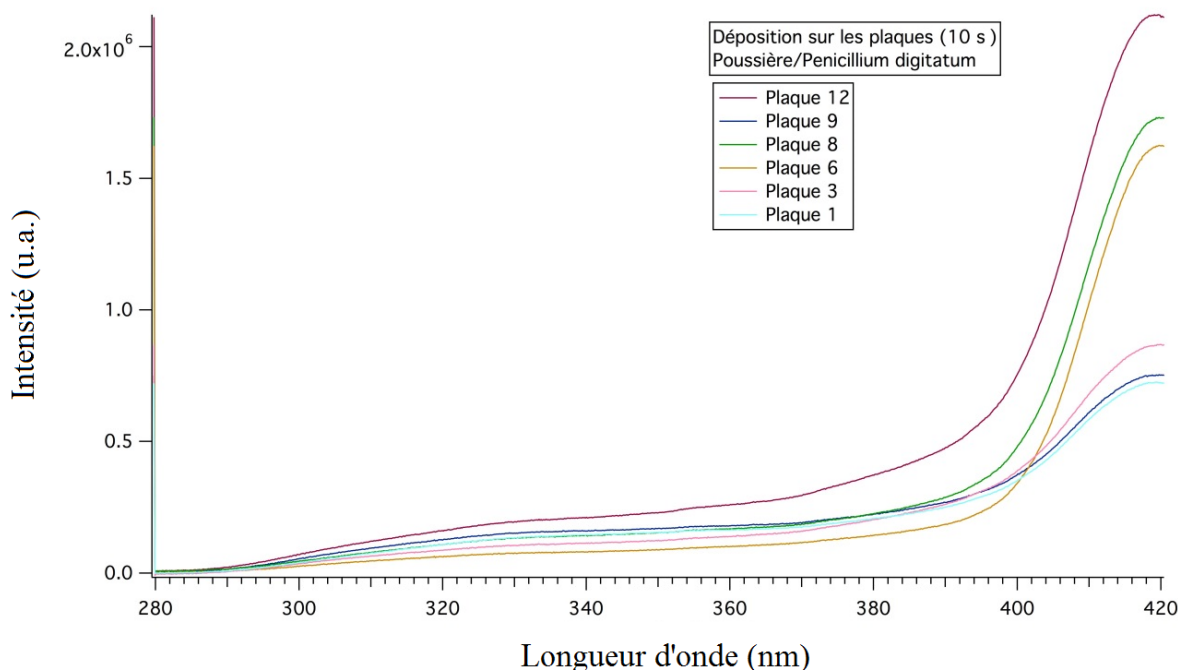


Figure 22 : Variation de l'importance des dépôts sur le radier de l'enceinte de biomasse

4.3 Dépôts localisés sur plaque

On trouve à la figure 23 les signaux de fluorescence obtenus avec une longueur d'onde d'excitation de 266 nm pour 18 répliquats d'une même concentration de dépôts localisés pour *Escherichia coli*. La figure 26 présente ceux pour 12 répliquats d'une même concentration de *Bacillus megaterium*. Les figures 24 et 27 donnent les dérivés des signaux pour ces mêmes répliquats permettant ainsi d'isoler les maxima de chacun. Les figures 25 et 28 regroupent respectivement les dérivés des signaux obtenus pour neuf mesures avec *Escherichia coli* et pour neuf mesures avec *Bacillus megaterium*. Ces derniers essais ont été effectués à des concentrations variées dans le but de vérifier la stabilité des maxima de chacune des espèces.

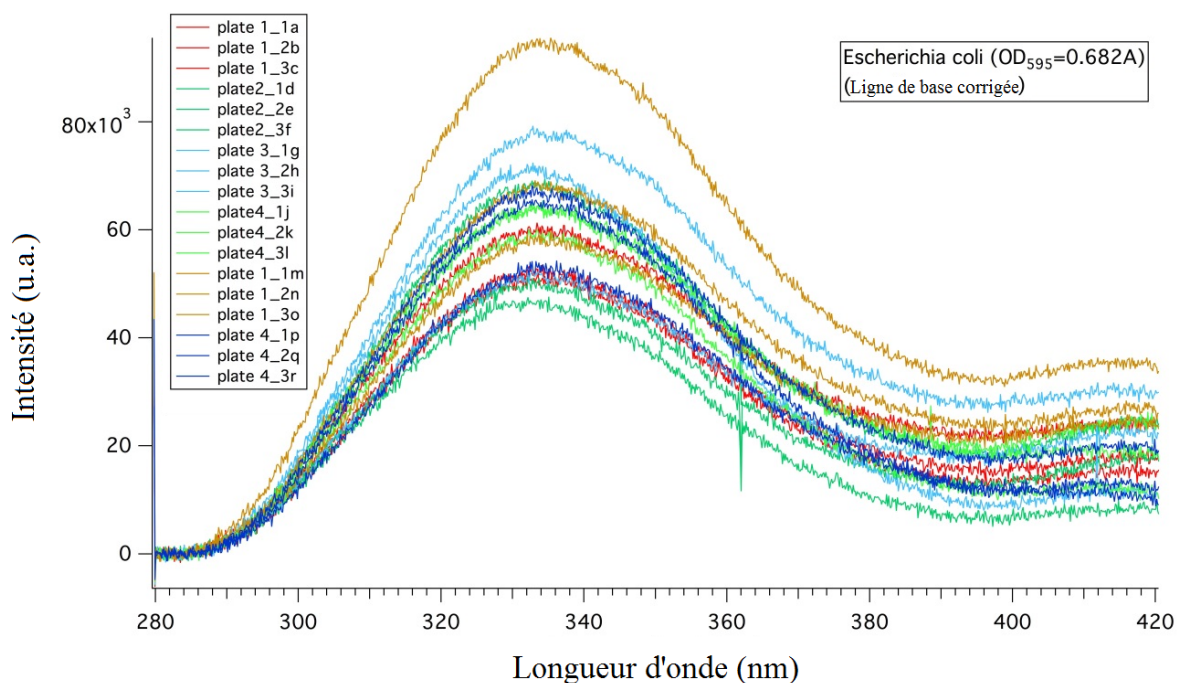


Figure 23 : Fluorescence des 18 répliquats d'*Escherichia coli* à une densité optique de 0,682A

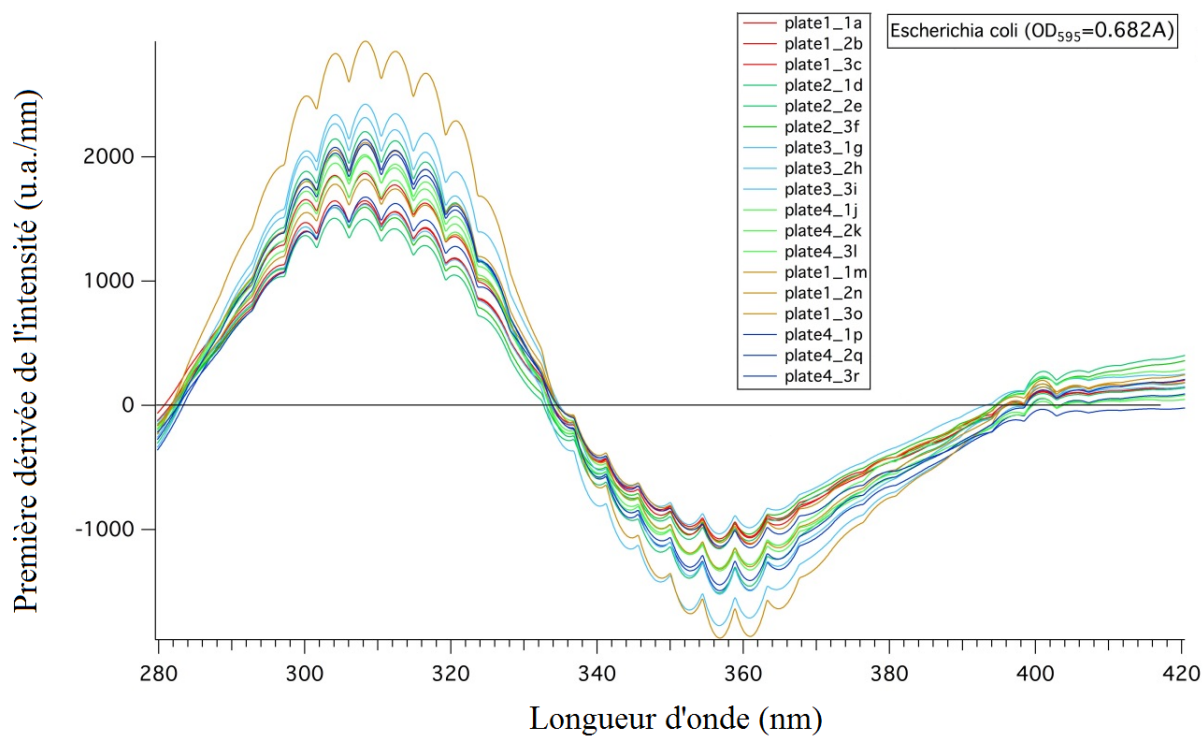


Figure 24 : Première dérivée des signaux des 18 répliquats d'*Escherichia coli* à une densité optique de 0,682A

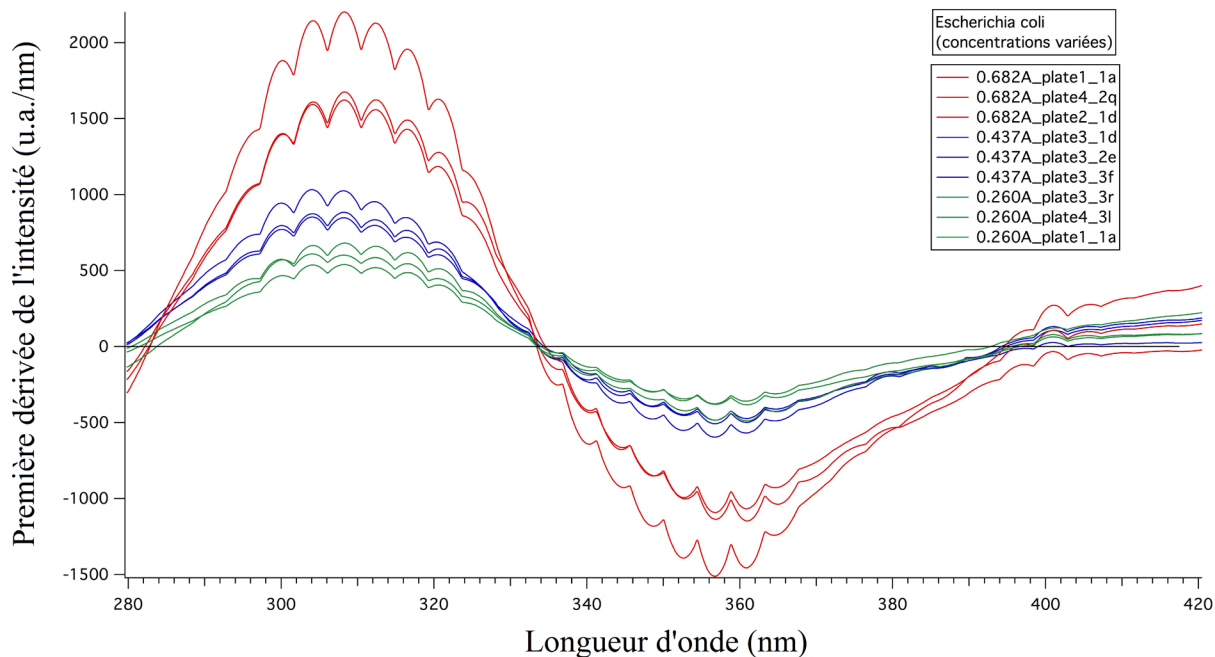


Figure 25 : Première dérivée des signaux des 9 mesures d'*Escherichia coli* à des concentrations variées

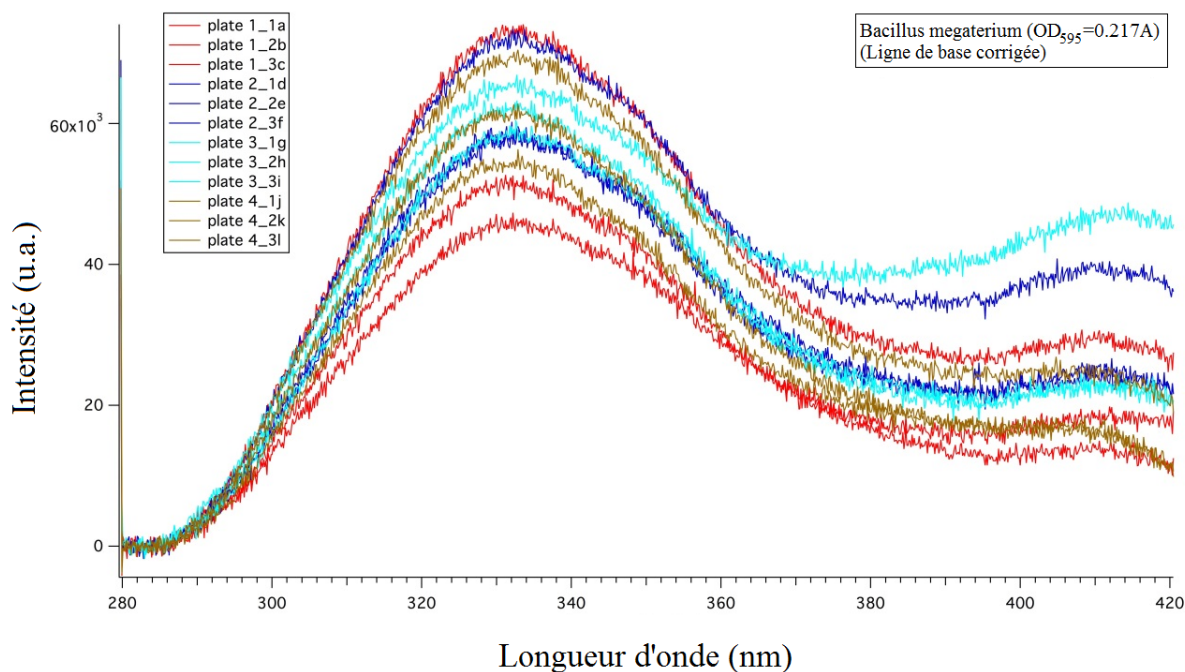


Figure 26 : Fluorescence des 12 réplicats de *Bacillus megaterium* à une densité optique de 0,217A

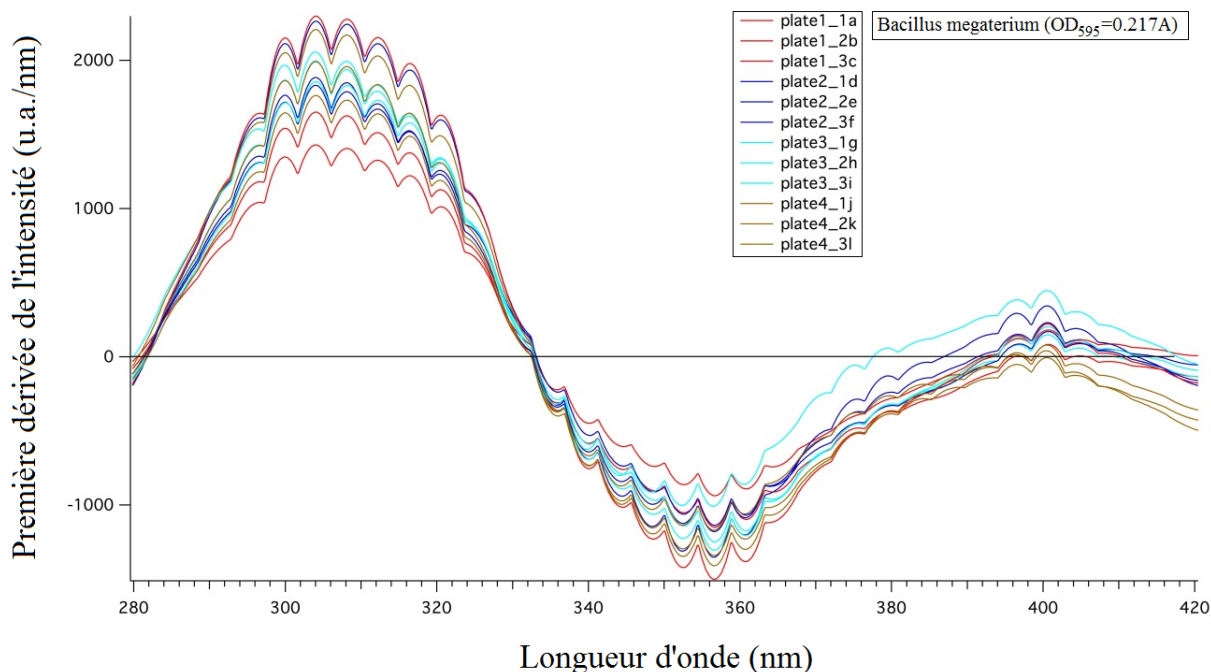


Figure 27 : Première dérivée des signaux des 12 réplicats de *Bacillus megaterium* à une densité optique de 0,217A

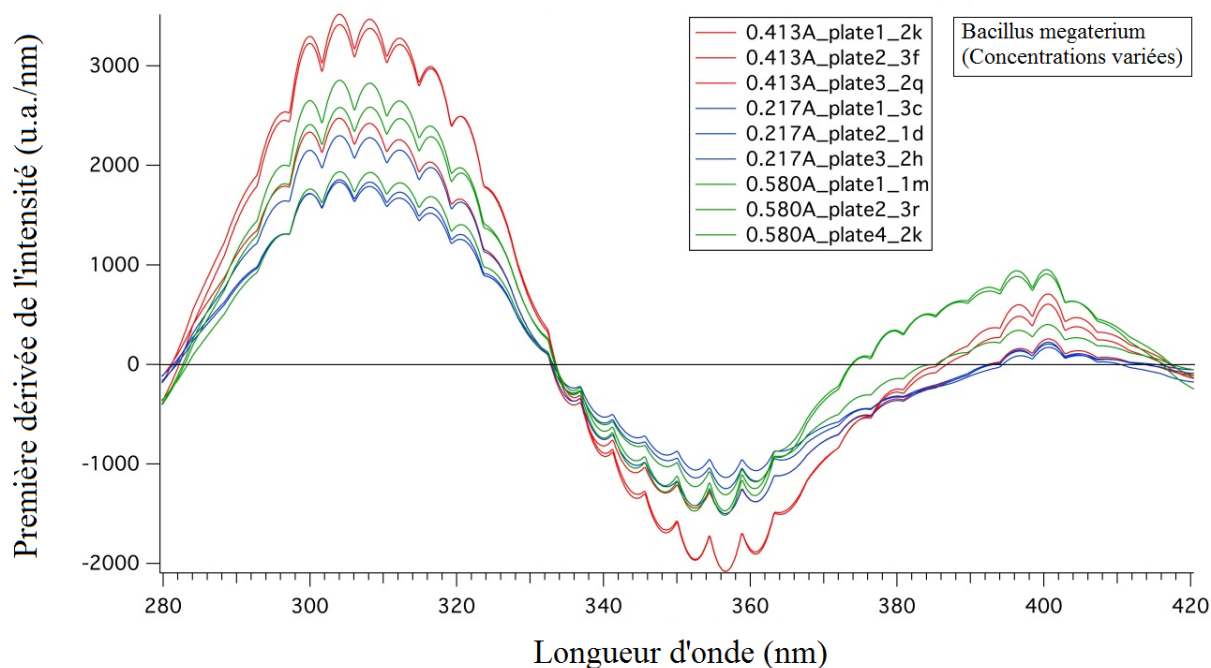


Figure 28 : Première dérivée des signaux des 9 mesures de *Bacillus megaterium* à des concentrations variées

4.4 Bioaérosols

La figure 29 met en évidence les signaux de fluorescence obtenus, à une longueur d'onde d'excitation de 266 nm, pour des bioaérosols de bactéries *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* générés dans l'enceinte de biomasse. La figure 30 montre ceux obtenus pour le bioaérosol d'une moisissure soit le *Penicillium digitatum*, pour une même longueur d'onde d'excitation.

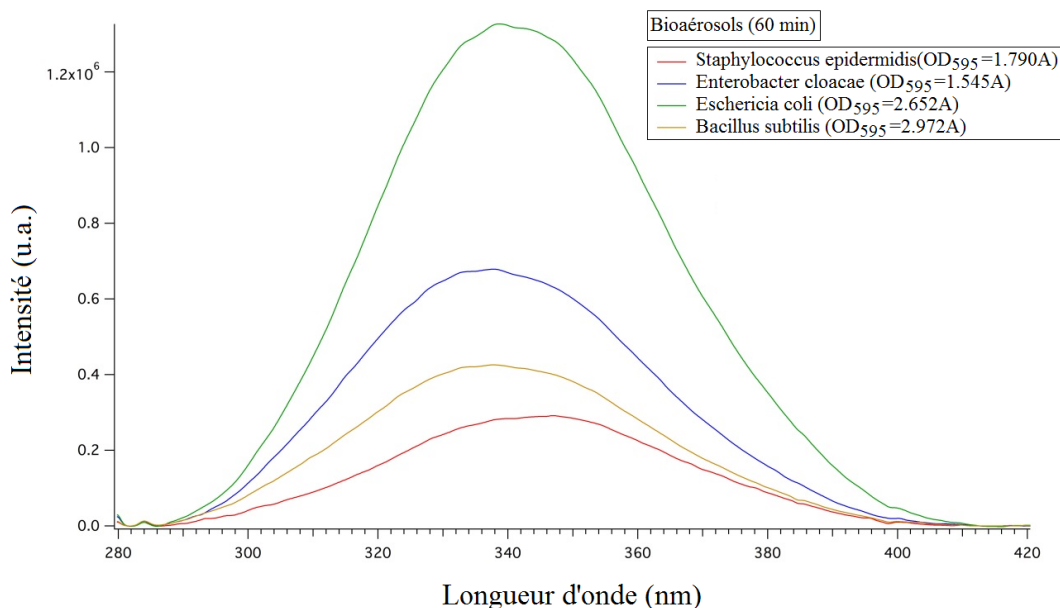


Figure 29 : Fluorescence pour *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* ($\lambda_{\text{excitation}} = 266 \text{ nm}$)

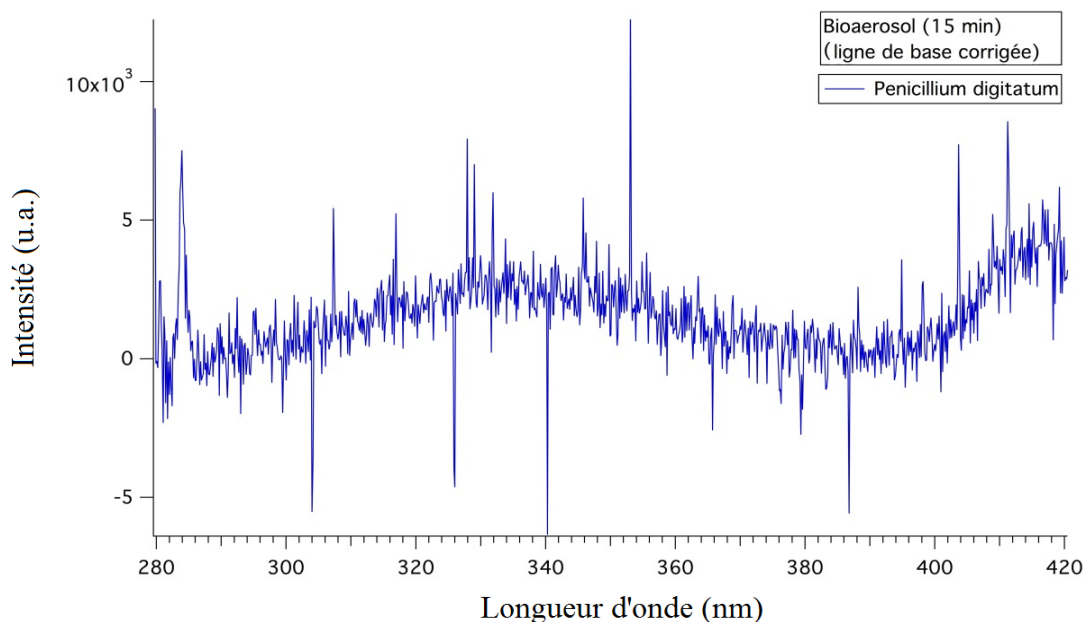


Figure 30 : Fluorescence (non lissée) pour *Penicillium digitatum* ($\lambda_{\text{excitation}} = 266 \text{ nm}$)

4.5 UV Raman

La figure 31 montre les signaux obtenus pour une bactérie (*Staphylococcus epidermis*) et deux moisissures (*Cladosporium cladosporoides* et *Ulocladium chartarum*) à une longueur d'onde d'excitation de 266 nm. L'abscisse de la figure accentue la région d'intérêt entre 0 et 2000 cm^{-1} , où devrait se situer ces signaux Raman.

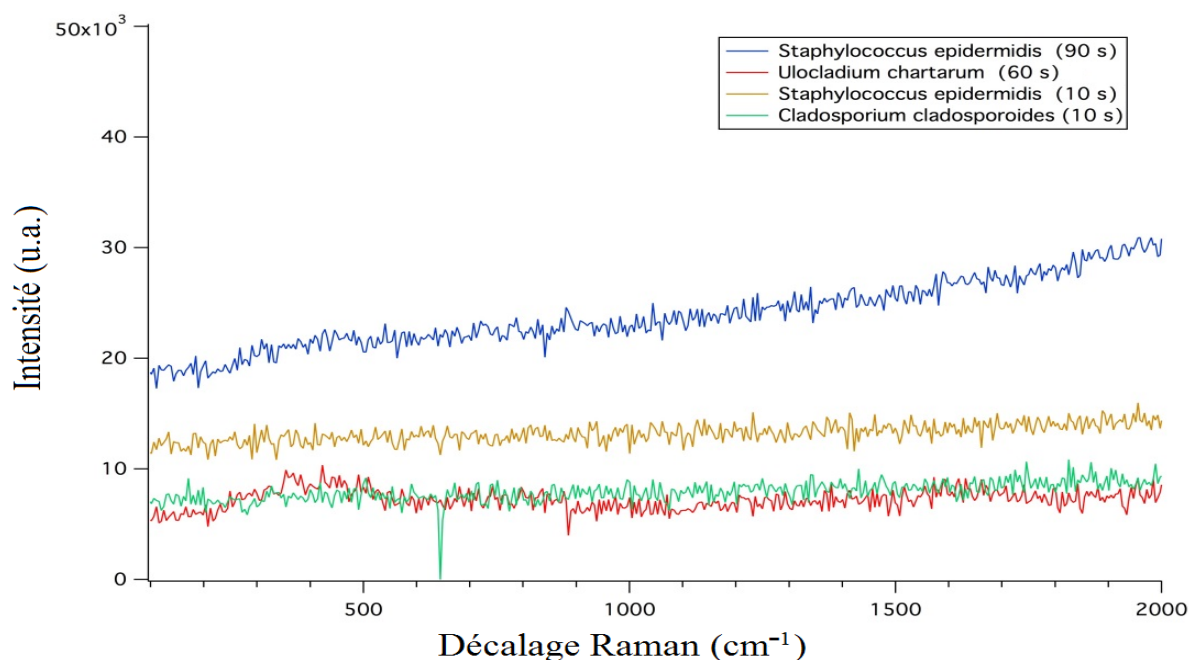


Figure 31 : Spectres Raman pour différents microorganismes à des temps de mesure variant de 10 à 90 s ($\lambda_{\text{excitation}} = 266 \text{ nm}$)

5. DISCUSSION

La revue de la littérature a permis de déterminer les principales biomolécules fluorescentes d'intérêt à cibler dans un but de détection, de classification et potentiellement d'identification des microorganismes et, conséquemment, les longueurs d'onde d'excitation à utiliser pour les mesures. Le NADH et le NADPH, mentionnés dans plusieurs articles, présentent un intérêt. Ces molécules sont présentes dans toutes les cellules vivantes et jouent un rôle dans la respiration cellulaire. Toutefois, puisqu'ils sont présents dans toutes les cellules vivantes et qu'ils dépendent très fortement de l'état métabolique de la cellule, ils ne possèdent pas, selon plusieurs auteurs, la spécificité recherchée pour la classification des espèces de microorganismes à partir des spectres de fluorescence (Vishwasrao, Heikal, Kasischke et Webb, 2005, Dartnell, Roberts, Moore, Ward et Muller, 2013). Ils produisent une fluorescence à 450 nm lorsqu'excités avec une longueur d'onde de 340 nm.

Les biomolécules susceptibles de permettre une classification des microorganismes sont principalement les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Ces acides aminés produisent une fluorescence lorsqu'excités à une longueur d'onde autour de 280 nm. Ces trois acides aminés aromatiques sont des constituants fondamentaux des protéines. La fluorescence intrinsèque des protéines est souvent attribuable à la présence de ces acides aminés ou de leurs résidus dans les structures. Le tryptophane ou ses résidus sont les principaux responsables de la fluorescence mesurée puisque la phénylalanine et la tyrosine possèdent une absorptivité et une efficacité quantique bien moindres. Les bases de purine et de pyrimidine sont également fluorescentes après excitation à une longueur d'onde autour de 260 nm. Les bases de purine se retrouvent dans plusieurs autres biomolécules importantes, tels que l'adénosine-5'-triphosphate, la guanosine triphosphate, l'adénosine monophosphate cyclique, le nicotinamide adénine dinucléotide ou des coenzymes (Rosemeyer, 2004). Tous ces produits fluorescents présentent des caractéristiques importantes pour un système de classification ou de détection rapide des microorganismes et sont les éléments clés à cibler.

Le montage conçu pour répondre aux besoins de ce projet permet l'excitation à deux longueurs d'onde soit à 266 nm et à 355 nm. Malgré cela, les essais, parce qu'ils étaient orientés vers un but de classification, ont été principalement concentrés sur la fluorescence observée avec une longueur d'onde d'excitation de 266 nm à cause de la spécificité des biomolécules discutées précédemment. Bien que certains lasers soient accordables en longueur d'onde, les modèles économiques et plus compacts sont disponibles seulement à certaines longueurs d'onde fixes et spécifiques à leur milieu de gain. Heureusement, la fluorescence moléculaire possède des bandes d'absorption larges qui permettent une latitude dans le choix de la longueur d'onde d'excitation de la molécule fluorescente. Les longueurs d'onde absorbées s'étalent en effet sur une gamme de plusieurs nanomètres centrée sur un pic d'absorption maximale.

Lors des essais, la fluorescence observée pour les excitations à 266 nm a exhibé des signaux qui se sont étalés la plupart du temps de 300 nm à 380 nm avec un pic autour de 340 nm. Ce signal de fluorescence constitue la somme de la fluorescence provenant de plusieurs biomolécules présentes et varie selon leurs proportions. Toutefois, c'est le signal provenant du tryptophane avec de très faibles contributions de ceux de la phénylalanine et de la tyrosine qui domine cette région.

5.1 Fluorescence des suspensions de microorganismes

Les signaux de fluorescence obtenus à une longueur d'onde d'excitation de 355 nm, pour une même concentration bactérienne (*Staphylococcus epidermidis*), présentent une variabilité non négligeable (figure 6). Uniquement deux réplicats ont été choisis pour des fins d'illustration. La fluorescence observée provient du NADH et du NADPH. Comme attendu, elle s'étale entre 410 et 520 nm, mais présente des maxima bien différents. Cette fluorescence est indicatrice de la présence d'une activité métabolique de cellules. Un tel signal est intéressant puisqu'il permet la détection de matériel d'origine biologique actif. Il a d'ailleurs été mis à profit par certains appareils commerciaux comme l'UVAPS de TSI. Toutefois, celui-ci présente peu d'intérêt dans un cadre d'identification puisqu'il est non répétitif et non spécifique. La différence entre les deux courbes observées est attribuable à la difficulté de préparer une suspension bactérienne contenant des cellules à un même stade métabolique. Il est facile de produire des suspensions à une même concentration, mais très difficile de placer les cellules dans un même état métabolique. Ce constat justifie que la majorité des essais subséquents aient été orientés vers l'identification des composants propres aux structures microbiennes et non sur leur état métabolique en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 266 nm.

Les spectres obtenus pour différentes suspensions de bactéries et de moisissures pures (voir figures 7 et 8) démontrent l'existence d'un maximum de fluorescence autour de 340 nm pour une longueur d'onde d'excitation à 266 nm. La plus grande partie de la fluorescence observée provient du tryptophane. S'il était possible de retirer la contribution de cet acide aminé, on pourrait y voir la faible contribution de deux autres acides aminés : la phénylalanine et la tyrosine.

Les figures 7 et 8 permettent de remarquer qu'en suspension, l'intensité des signaux pour les moisissures est plus faible que celles des bactéries. Le pic négatif, apparaissant sur ces graphiques, est relié à la diffusion Raman provenant du signal obtenu à partir d'une suspension d'eau pure (292 nm). Ce dernier sert de référence et est soustrait lors de l'analyse de tous les signaux de fluorescence pour les suspensions. Une fois soustrait du signal, il apparaît négativement sur les graphiques. Il affecte inévitablement les signaux dérivés des premier et deuxième degrés et se reconnaît par une pente négative marquée suivie d'une pente fortement positive.

Il est également possible d'observer sur ces deux figures que les maxima d'émission obtenus pour ces bactéries et ces moisissures se situent à des longueurs d'onde différentes. Les différences entre les maxima d'émission sont difficilement observables à l'œil nu sur ces figures. Toutefois, ces différences peuvent être mises en évidence en effectuant une transformation mathématique des signaux. En dérivant le signal de fluorescence, on peut déterminer avec précision les longueurs d'onde correspondantes aux maxima de fluorescence. L'analyse du signal de seconde dérivation permet d'isoler d'autres spécificités de ces signaux en ce qui a trait aux dérivées (pentes).

Les figures 9 et 10 montrent les signaux après une première dérivation. Les endroits où les courbes traversent l'abscisse sur les graphiques (là où la pente est nulle) représentent la position des maxima. Ces dérivations mettent en évidence les déplacements des longueurs d'onde d'émission maximale selon les microorganismes. Ces déplacements apparaissent spécifiques à

chacune des bactéries ou moisissures analysées. Les maxima d'émission pourraient être reliés aux différentes compositions en acides aminés entre les espèces. Des investigations plus poussées sont nécessaires pour comprendre les mécanismes impliqués dans ce déplacement.

L'utilisation d'un traitement mathématique du signal, pour mettre en évidence les déplacements des longueurs d'onde d'émission maximale en fonction des espèces, n'a pas été rapportée dans la littérature. Il s'agit d'une approche innovatrice qui permet de faire ressortir des différences qui étaient initialement peu visibles. Le tableau 9 rapporte les longueurs d'onde des maxima mesurés pour différents essais et montre qu'elles diffèrent d'une espèce à une autre. Les différences entre les espèces sont de l'ordre de quelques nanomètres. Ces différences dépendent de la capacité de résolution du spectromètre qui aurait avantage à être améliorée afin d'obtenir une meilleure spécificité. La résolution actuelle se situe autour de 1 nm. La technique de lissage utilisée pour l'analyse du signal n'a pas été optimisée. Une autre technique pourrait s'avérer plus performante.

Ceci permet de poser l'hypothèse que des maxima d'émission spécifique à certaines espèces de bactéries ou de moisissures pourraient être mis en évidence par l'analyse du signal de première dérivée et par l'utilisation d'une technique de lissage plus performante.

Les techniques d'analyse par dérivation ont permis de démontrer que le déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale est également observable sur des mélanges de microorganismes et que ce déplacement puisse être relié à la proportion de chaque microorganisme dans la suspension. Les figures 11 à 14 illustrent ce déplacement.

Le déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale pour la fluorescence semble être relié aux proportions des microorganismes présents dans la suspension. Ce déplacement en fonction de la proportion de microorganismes présents dans une suspension n'a jamais été rapporté dans la littérature.

5.1.1 Variation de la fluorescence en fonction de la concentration

Les premières dérivées de signaux pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis* apparaissent aux figures 15 et 16. Elles montrent respectivement la relation existant entre la concentration (densité optique) et l'amplitude du signal observé. Des concentrations plus élevées produisent des signaux plus intenses. Toutefois, il est important de souligner qu'il s'agit de travaux exploratoires et que des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de tenir compte des autres facteurs existants dans des conditions non idéales, comme dans des situations réelles, et susceptibles d'affecter l'intensité du signal.

Cette observation permet de suggérer que l'amplitude du signal puisse être utilisée pour la quantification rapide de la concentration d'une suspension bactérienne.

Les maxima de fluorescence obtenus pour une longueur d'onde d'excitation de 266 nm se situent tous sur ces figures à une même longueur d'onde pour une même bactérie.

Ceci appuie l'hypothèse que ce paramètre puisse être spécifique à l'espèce. Pour une même bactérie, le point de coupure de l'axe des x est identique pour toutes les concentrations testées. Seules les pentes varient entre les suspensions, selon leur concentration.

5.1.2 Bactéries à Gram négatif et à Gram positif

La figure 17 présente la première dérivée des signaux produits par l'analyse de suspensions bactériennes à des concentrations à peu près identiques, selon leur densité optique, tandis que la figure 19 montre celles des signaux produits pour des concentrations variables de différentes bactéries.

Il est possible de remarquer sur ces figures qu'entre 298 et 304 nm, c.-à-d. après les pics reliés aux signaux Raman, les pentes des courbes pour le *Bacillus subtilis* et le *Staphylococcus epidermidis* sont plus faibles que celles des courbes pour l'*Escherichia coli* et l'*Enterobacter cloacae*. Les bactéries à Gram + comme le *Bacillus subtilis* et le *Staphylococcus epidermidis* possèdent, à ce niveau, des pentes plus faibles que celles des deux autres bactéries qui sont à Gram -. La dérivation du deuxième degré qui apparaît aux figures 18 et 20 démontre ce phénomène mathématiquement. Il s'agit là d'une spécificité fondamentale qui pourrait être une propriété liée à la structure même des bactéries (figure 32).

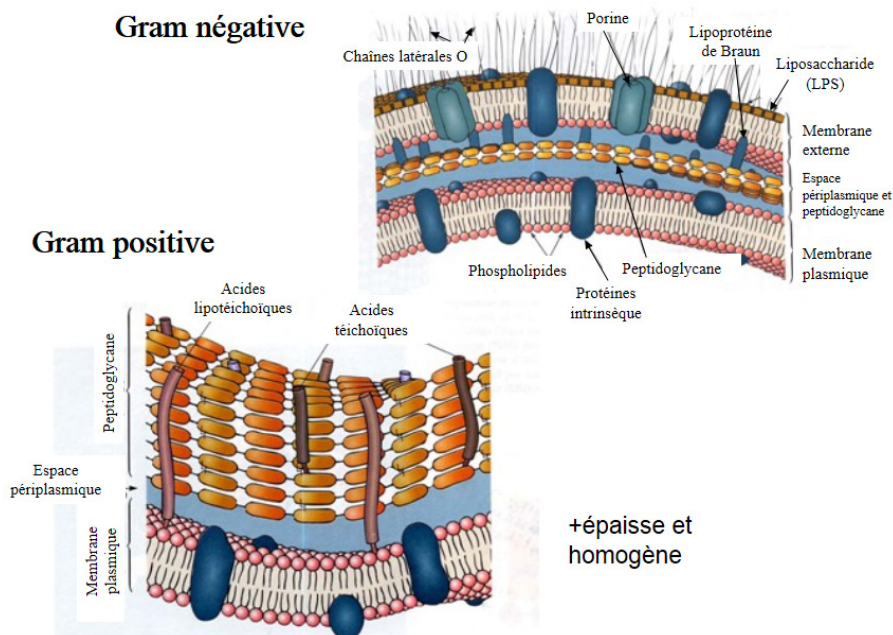


Figure 32 : Comparaison entre les parois des bactéries à Gram positif et celles des bactéries à Gram négatif

Les bactéries à Gram + possèdent effectivement une couche de peptidoglycane sur leur paroi extérieure beaucoup plus épaisse que celle des bactéries à Gram -, alors que les bactéries à Gram - possèdent une membrane extérieure contenant une quantité de protéines plus importante, formées d'acides aminés comme l'alanine, la lysine et de l'acide glutamique.

Une hypothèse serait que la fluorescence accrue observable chez les bactéries à Gram - est attribuable à cette quantité excédentaire de protéines par rapport aux bactéries à Gram + et que la pente du signal dans cette région, entre 298 et 304 nm, puisse être utilisée comme moyen de différenciation entre ces deux grands groupes de bactéries.

Des tests plus exhaustifs devront être effectués avant de pouvoir confirmer cette hypothèse.

5.2 Fluorescence des dépôts de surface sur plaque

La figure 21 montre les signaux de fluorescence obtenus pour des dépôts de poussières faibles, moyens et élevés qui sont contaminés par des spores de *Penicillium digitatum* et pour de la poussière non contaminée. Les expérimentateurs, en ciblant des endroits spécifiques sur une plaque où les dépôts étaient faibles, moyens et élevés, ont pu s'assurer que le signal obtenu par le système optique soit représentatif du dépôt désiré. L'intensité des signaux observés varie proportionnellement avec l'importance du dépôt de poussière sur la surface, que celle-ci soit contaminée ou non. Ce constat démontre qu'il est pensable de concevoir un appareil permettant une évaluation rapide des dépôts sur des surfaces comme ceux retrouvés dans des conduits de ventilation. Un tel appareil devra pouvoir analyser une fraction assez importante de la surface pour que celle-ci soit représentative de l'ensemble de la surface.

La figure 22 démontre l'importance de ce constat. Les signaux sur cette figure proviennent de mesures effectuées sur une toute petite partie de la surface totale du dépôt située au centre des plaques d'essai. Cette façon de prendre la mesure ne permet pas de garantir la représentativité du résultat pour l'ensemble du dépôt sur la plaque. Les plaques ayant les numéros les plus élevés étaient placées en général plus près de l'entrée du bioaérosol dans la chambre (figure 1) alors que celles avec les numéros plus petits en étaient plus éloignées. La sédimentation des particules fait en sorte que les plaques situées près de l'entrée présenteront des dépôts plus importants que celles qui en sont plus éloignées. Or, les signaux d'intensité présentés à la figure 22, principalement celui de la plaque 9, ne sont pas en relation directe avec les niveaux attendus sur les plaques selon leur positionnement dans l'enceinte. Ceci s'explique par des dépôts non uniformes sur les plaques et l'incapacité de garantir une mesure représentative de l'ensemble de la plaque en ciblant une zone de 1,6 mm de diamètre située au centre de la surface.

Les signaux de la figure 21 montre la présence de deux maxima : un autour de 330 nm et l'autre près de 418 nm, tandis qu'uniquement un maximum à 418 nm est facilement identifiable sur le graphique de la figure 22. Les maxima très distincts à 418 nm sont reliés à la présence d'acide dipicolinique alors que celui très faible autour de 330 nm provient de la fluorescence du tryptophane présent dans les moisissures.

La présence d'un deuxième pic à 418 nm est apparue suspecte. L'acide dipicolinique associée à ce pic est reliée à des spores bactériennes qui, selon toute vraisemblance, devaient être présentes dans la poussière. Une analyse effectuée par croissance sur gélose a permis de démontrer effectivement une contamination de la poussière par quatre espèces différentes de *Bacillus sp.* Les *Bacillus sp* forment des spores contenant jusqu'à 15 % d'acide dipicolinique (Slieman et Nicholson, 2001). La mise en évidence, à partir de l'observation du signal de fluorescence, d'une contamination de la poussière de référence par des spores, démontre le potentiel que présente

l'analyse des signaux de fluorescence. L'analyse du pic spécifique à l'acide dipicolinique présente un intérêt pour la détection des spores bactériennes que l'on retrouve dans des dépôts de poussière ou autres matériaux secs.

L'acide dipicolinique n'avait pas été ciblée à l'origine comme substance d'intérêt, mais les résultats obtenus démontrent qu'elle mérite d'être considérée à partir de maintenant.

Une autre observation intéressante, mise en évidence à la figure 22, est la variabilité observable dans l'ordre des signaux. L'ordre des signaux reliés à l'acide dipicolinique (418 nm) est différent de celui relié au tryptophane des moisissures (330 nm). Ceci démontre que les proportions de spores bactériennes par rapport aux moisissures varient d'une plaque à l'autre et cela pour une poussière de même origine.

La poussière contaminée avec de la moisissure a réduit l'intensité du signal par rapport à la poussière de référence (figure 21) pour les dépôts faibles et légers. Cette diminution a été associée à la façon dont les dépôts de surface ont été contaminés. Afin de préparer les plaques plus rapidement, une contamination de surface a tout simplement été ajoutée sur les dépôts déjà présents. En opacifiant le dépôt présent, cette couche a pu réduire le signal provenant des spores sous-jacentes. Des essais supplémentaires devraient permettre de clarifier ce phénomène d'occultation.

5.3 Fluorescence des dépôts localisés sur plaque

Les figures 23 et 24 montrent le signal de fluorescence et sa dérivée provenant de dépôts séchés sur des plaques d'acier inoxydable préparées par pipetage à partir d'une même suspension d'*Escherichia coli*. Les figures 26 et 27 montrent ceux obtenus pour une suspension de *Bacillus megaterium*. Les figures 25 et 28 montrent respectivement les dérivées des signaux obtenus pour 9 concentrations différentes d'*Escherichia coli* et de *Bacillus megaterium*. Lors de ces essais, les signaux détectés proviennent d'une petite zone à l'intérieur des dépôts séchés sur les plaques. La fluorescence de ces dépôts localisés a été investiguée parce qu'elle est représentative de gouttelettes pouvant provenir d'éternuements, de toux ou d'éclaboussures de fluide biologique qui se seraient asséchés sur une surface en acier inoxydable comme celles retrouvées dans les hôpitaux ou dans certains établissements du secteur alimentaire. On peut remarquer que les signaux de fluorescence obtenus ont des profils qui se ressemblent pour une même espèce. Toutefois de légères différences pour certaines parties de leur spectre respectif existent pour quelques signaux. Ces différences peuvent être mises en évidence à l'aide des dérivés des signaux (figures 24, 25, 27 et 28). Des recherches supplémentaires pourraient permettre d'expliquer ces différences. L'analyse des 18 signaux de première dérivée pour l'*Escherichia coli* et des 12 signaux de première dérivée pour le *Bacillus megaterium* permettent encore de conclure que les maxima (lorsque la dérivée est nulle) se situent toujours au même endroit pour une même bactérie. Les figures 25 et 28 qui regroupent respectivement les signaux de différentes concentrations pour l'*Escherichia coli* et le *Bacillus megaterium* renforcent l'hypothèse qu'une espèce possède un seul maximum très précis permettant de l'identifier.

Les variations dans l'intensité du signal, observables pour une même concentration d'*Escherichia coli*, sont attribuables au manque d'uniformité des dépôts qui s'étalent sur

plusieurs millimètres de diamètre comme démontré à la figure 2. Le système optique actuel ne focalise que sur une très petite partie de ce dépôt, soit environ 1,6 mm de diamètre, pouvant occasionner ainsi des variations du signal de fluorescence reliées directement à cette non-uniformité.

Une modification du système optique permettant d'échantillonner la totalité du dépôt sec ou encore utilisant une méthode d'échantillonnage multizone couvrant la totalité de la surface du dépôt permettrait une meilleure corrélation du signal de fluorescence avec la concentration de microorganismes dans le dépôt localisé.

5.4 Fluorescence des bioaérosols

La figure 29 illustre la fluorescence obtenue pour des bioaérosols générés dans l'enceinte d'exposition de la biomasse. Les essais pour quatre bactéries différentes mettent en évidence les mêmes caractéristiques spectrales que celles pour les bactéries en suspension. Comme pour les suspensions, l'intensité du signal varie selon la concentration et l'espèce. Les longueurs d'onde associées aux maxima semblent également spécifiques. D'autres essais sont nécessaires pour venir appuyer ces conclusions relatives aux variations selon les concentrations de bioaérosols. Sur ce graphique, un pic relié à la diffusion Raman et causé par l'azote de l'air apparaît à 284 nm.

La fluorescence d'un bioaérosol de *Penicillium digitatum* mesurée dans l'enceinte de biomasse est illustrée à la figure 30. Bien que le signal soit faible et erratique, il semble posséder un maximum autour de 340 nm propre au tryptophane et un pic de fluorescence à 418 nm propre à l'acide dipicolinique. L'acide dipicolinique peut être produit comme métabolite secondaire par certaines moisissures (Kalle et Khandekar, 1983) ou être présent dans les spores de bactéries comme vu précédemment (Powell, 1953, Perry et Foster, 1955).

5.5 UV Raman

Des signaux Raman distinctifs étaient attendus après excitation à 266 nm pour les suspensions de bactéries (figure 31), à cause des acides aminés aromatiques fluorescents et des bases de nucléotides qui ont des bandes d'absorption près de cette longueur d'onde et qui auraient normalement dû donner lieu à une amplification du signal. Les résultats obtenus à la figure 31 ne montrent aucun signal Raman.

Aucun pic Raman relié à ces biomolécules, pertinentes pour les microorganismes, n'est observable ni pour les bactéries ni pour les moisissures de la figure, et ce, même après correction avec le signal de fond (blanc). Les pics Raman peuvent être masqués par les signaux plus intenses de la fluorescence qui se situe surtout au-dessus de 280 nm. D'autre part, l'absence de pic Raman peut être expliquée parce que le maximum d'amplification attendu du signal relié à la résonance Raman des biomolécules qui nous intéressent se situe plutôt à des valeurs inférieures à 250 nm. Cet effet est décrit dans la littérature pour les acides aminés aromatiques et les bases d'ADN et d'ARN à une longueur d'onde de 220-250 nm (Manoharan et coll., 1991, Asher,

2002). La longueur d'onde de 266 nm, utilisée pour étudier la fluorescence des molécules dans le montage actuel, ne serait donc pas celle à utiliser pour l'étude des spectres Raman des biomolécules retenues. De plus, les lasers pulsés utilisés sur le montage émettent des impulsions de puissance crête considérables, ce qui peut entraîner la dégradation des molécules et de leur milieu (McCreery, 2000 ; Smith et Dent, 2005). Finalement, la faible intensité des signaux Raman impose d'étirer les temps d'acquisition des signaux accentuant l'effet de dégradation possible.

Un montage ciblant l'étude des signaux Raman devrait idéalement être constitué d'un système laser émettant à un haut taux de répétition avec des puissances crêtes faibles de façon à ne pas dégrader le milieu. Il devrait également permettre la sélection de plusieurs longueurs d'onde d'excitation afin de cibler spécifiquement les biomolécules pertinentes et de favoriser l'effet de résonance Raman (Manoharan et coll., 1990) relié à leur bande d'absorption. La figure 33 illustre l'effet d'amplification lié à la résonance du signal Raman en fonction de la longueur d'onde d'excitation pour la tyrosine. Il est facile de constater qu'au-dessus de 245 nm, il est presque impossible d'observer les structures Raman pourtant clairement visibles à 230 nm.

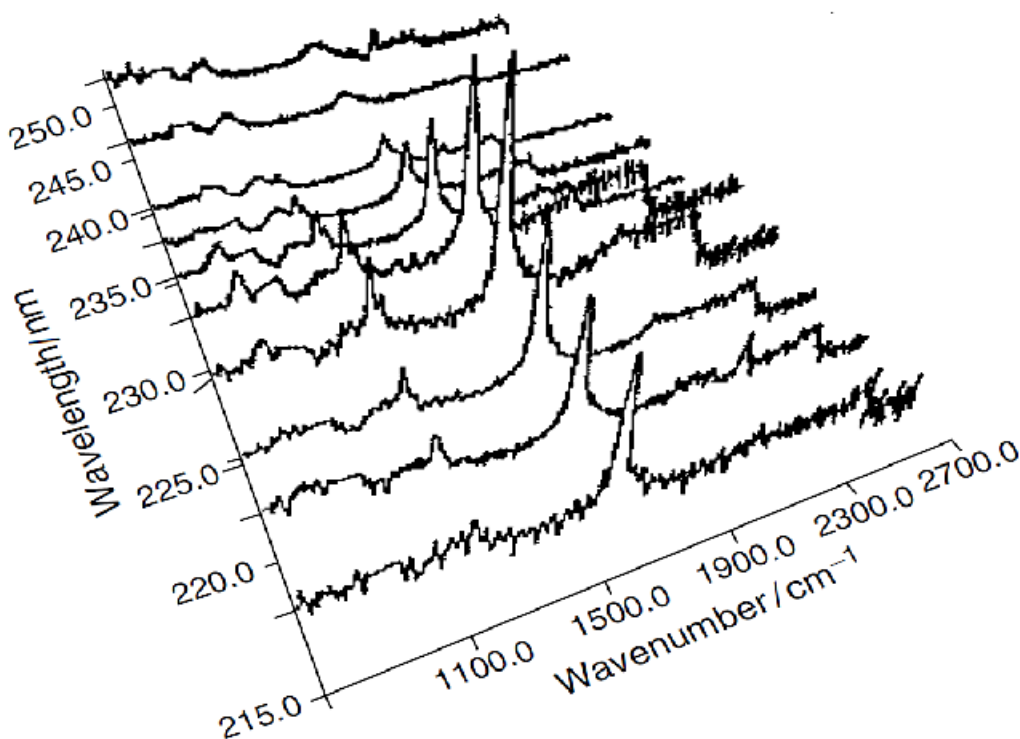


Figure 33 : Spectre Raman de la résonance pour différentes longueurs d'onde d'excitation pour la tyrosine (Asher, 2002)

Malgré le fait que le montage ne soit pas configuré idéalement pour une observation des signaux Raman, des pics ont quand même été observés lors de quelques expériences. En fait, les pics négatifs observés à 292 nm aux figures 7 et 8 ainsi que le pic positif à 284 nm à la figure 29 sont les seuls résultats observés de Raman.

6. PORTÉES ET LIMITES

Les résultats obtenus dans le cadre de cette activité exploratoire sont préliminaires et visaient l'orientation de futures recherches. Une étude plus approfondie des aspects ayant soulevé de l'intérêt ou mentionnés est nécessaire afin de confirmer systématiquement les différentes observations. De plus, la diversité microbienne évaluée était restreinte.

Dans chaque expérience, une seule variable à la fois a été modifiée afin de permettre un tri des avenues les plus prometteuses. Pour chacune d'entre elles, l'étape suivante est d'effectuer des mesures de validation puis d'évaluer la robustesse de chaque approche au regard des facteurs influençant les mesures en situations réelles. Cette dernière étape peut s'avérer complexe et laborieuse.

Même si les hypothèses de travail mettent en évidence la possibilité de développer des moyens de classification des microorganismes à partir de leur signature de fluorescence, la spectroscopie Raman, qui permet de cibler spécifiquement les biomolécules à caractériser et surtout d'amplifier par résonance le signal obtenu, devrait faire l'objet de travaux exécutés avec un montage conçu à cet effet.

7. CONCLUSION

Cette étude exploratoire a permis de mettre en évidence le potentiel qu'offre la fluorescence émise par des microorganismes pour leur classification et peut-être même leur identification, pour la qualification des dépôts sur des surfaces et pour l'évaluation de la concentration de microorganismes en suspension dans des liquides. Elle établit des pistes de recherche claires, avec des hypothèses de travail qui nécessitent d'être examinées par des travaux ciblés.

La fluorescence produite à la longueur d'onde d'excitation de 266 nm permet de cibler des biomolécules importantes relatives à la composition des microorganismes et permet une classification de ces derniers.

D'après les essais effectués, la position des maxima de fluorescence établie avec une longueur d'onde d'excitation à 266 nm est différente d'une espèce à l'autre. Ces maxima se situent à des longueurs d'onde inférieures pour les moisissures par comparaison aux bactéries. La position du maximum peut permettre de distinguer les espèces entre elles ou leur proportion dans des suspensions. L'intensité des signaux de fluorescence étant reliée à la concentration dans une suspension particulière.

L'analyse des dérivés des signaux de fluorescence constitue une approche innovatrice qui met en évidence des caractéristiques importantes du signal de fluorescence difficilement observables à l'œil nu. L'amélioration de la méthode de lissage permettra sans doute d'améliorer les performances de cette nouvelle approche. Cette technique démontre qu'il peut exister des différences entre les dérivés des signaux de fluorescence des bactéries à Gram négatif et positif, principalement au début de leur spectre. Ces différences pourraient permettre une classification de ces bactéries à partir de leur signature de fluorescence.

Les signaux de fluorescence peuvent être utilisés pour quantifier l'importance des dépôts sur une surface comme ceux présents dans les conduits de ventilation. Toutefois, plus d'essais expérimentaux sur un montage adapté à cet effet sont nécessaires pour confirmer ce constat pour les dépôts localisés.

Finalement, la présence d'un maximum dans les spectres de fluorescence à 418 nm correspondant au pic de l'acide dipicolinique permet la détection de la présence de spores bactériennes dans les poussières déposées.

8. BIBLIOGRAPHIE

Agranovski, V., Z. Ristovski, P.J. Blackall et L. Morawska (2004). Size-selective assessment of airborne particles in swine confinement building with the UVAPS. *Atmospheric Environment* 38(23): 3893-3901. Disponible en ligne à <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231004003073> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Agranovski, V., Z. Ristovski, M. Hargreaves, P.J. Blackall et L. Morawska (2003). Real-time measurement of bacterial aerosols with the UVAPS: Performance evaluation. *Journal of Aerosol Science* 34(3):301-317. Disponible en ligne à <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021850202001817> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Asher, S.A. (2002). Ultraviolet Raman spectrometry. Dans : Handbook of vibrational spectroscopy. P.R. Griffiths et J.M. Chalmers (éditeurs). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Disponible en ligne à <http://doi.wiley.com/10.1002/0470027320> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Bridges, J.W., D.S. Davies et R.T. Williams (1966). Fluorescence studies on some hydroxypyridines including compounds of the vitamin B 6 group. *Biochem J* 98:451-468. Disponible en ligne à <http://www.biochemj.org/bj/098/bj0980451.htm> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Brosseau, L.M., D. Vesley, N. Rice, K. Goodell, M. Nellis et P.P. Hairston (2000). Differences in detected fluorescence among several bacterial species measured with a direct-reading particle sizer and fluorescence detector. *Aerosol Science and Technology* 32(6):545-558. Disponible en ligne à <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/027868200303461> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Bueno, C. et M.V. Encinas (2003). Photophysical and photochemical studies of pyridoxamine. *Helvetica Chimica Acta* 86(10):3363-3375. Disponible en ligne à <http://doi.wiley.com/10.1002/hlca.200390279> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Chance, B., P. Cohen, F. Jobsis et B. Schoener (1962). Intracellular oxidation-reduction states *in vivo*: The microfluorometry of pyridine nucleotide gives a continuous measurement of the oxidation state. *Science* 137(3529):499-508. Disponible en ligne à <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.137.3529.499> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Dartnell, L.R., T.A. Roberts, G. Moore, J.M. Ward et J.-P. Muller (2013). Fluorescence Characterisation of Clinically-Important Bacteria. *Plos One*, 8(9):1-13,e75270

Farsund, Ø., G. Rustad et G. Skogan (2012). Standoff detection of biological agents using laser induced fluorescence – a comparison of 294 Nm and 355 Nm excitation wavelengths. *Biomedical Optics Express* 3(11):2964. Disponible en ligne à

<http://www.opticsinfobase.org/abstract.cfm?URI=boe-3-11-2964> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Hairston, P.P., J. Ho et F.R. Quant (1997). Design of an instrument for real-time detection of bioaerosols using simultaneous measurement of particle aerodynamic size and intrinsic fluorescence. *Journal of Aerosol Science* 28(3):471-482. Disponible en ligne à <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002185029600448X> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Harz, M., P. Rösch et J. Popp (2009). Vibrational spectroscopy - A powerful tool for the rapid identification of microbial cells at the single-cell level. *Cytometry Part A* 75A(2):104-113. Disponible en ligne à <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20682> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Hill, S.C., M.W. Mayo et R.K. Chang (2009). Fluorescence of bacteria, pollens, and naturally occurring airborne particles: Excitation/emission spectra. *Army Research Laboratory*. Disponible en ligne à <http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA494347> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Ho, J. (2002). Future of biological aerosol detection. *Analytica Chimica Acta* 457(1):125-148. Disponible en ligne à <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267001015926> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Kalle, G.P. et P.S. Khandekar (1983). Dipicolinic acid as a secondary metabolite in *Penicillium citreoviride*. *Journal of Biosciences* 5(1):43-52. Disponible en ligne à <http://link.springer.com/10.1007/BF02702592> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Manoharan, R., E. Ghiamati, K.A. Britton, W.H. Nelson et J.F. Sperry (1991). Resonance Raman spectra of aqueous pollen suspensions with 222.5-242.4-Nm pulsed laser excitation. *Applied Spectroscopy* 45(2):307-311. Disponible en ligne à <https://www.osapublishing.org/as/viewmedia.cfm?uri=as-45-2-307&seq=0> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Manoharan, R., E. Ghiamati, R.A. Dalterio, K.A. Britton, W.H. Nelson et J.F. Sperry (1990). UV resonance Raman spectra of bacteria, bacterial spores, protoplasts and calcium dipicolinate. *Journal of Microbiological Methods* 11(1):1-15. Disponible en ligne à <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167701290900425> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

McCreery, R.L. (2000). Raman spectroscopy for chemical analysis: McCreery/Raman spectroscopy. Hoboken, NJ, ÉTATS-UNIS: John Wiley & Sons, Inc. Disponible en ligne à <http://doi.wiley.com/10.1002/0471721646> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Perry, J.J. et J.W. Foster (1955). Calcium content of spores of *Bacillus Cereus* Var.*mycoides* in relation to heat resistance and content of dipicolinic acid. *Texas Repts. Biol. Medicine* (13):920-921.

Pöhlker, C., J.A. Huffman et U. Pöschl (2012). Autofluorescence of atmospheric bioaerosols – Fluorescent biomolecules and potential interferences. *Atmospheric Measurement Techniques* 5(1):37-71. Disponible en ligne à <http://www.atmos-meas-tech.net/5/37/2012/> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Powell, J.F. (1953). Isolation of dipicolinic acid (pyridine-2: 6-dicarboxylic acid) from spores of *Bacillus Megatherium*. *Biochemical Journal* 54(2):210. Disponible en ligne à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1268926/> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Rösch, P., Harz M., Peschke KD., Ronneberger O., Burkhardt H., Schüle A., Schmauz G., Lankers M., Hofer S., Thiele H., Motzkus H.W. et Popp J. (2006). On-line monitoring and identification of bioaerosols. *Analytical Chemistry* 78(7):2163-2170. Disponible en ligne à <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0514974> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Rosemeyer, H. (2004), The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products, *Chemistry & Biodiversity*, 2004, 1, 361-401.

Saari, S., J. Mensah-Attipoe, T. Reponen, A.M. Veijalainen, A. Salmela, P. Pasanen et J. Keskinen (2014). Effects of fungal species, cultivation time, growth substrate, and air exposure - Velocity on the fluorescence properties of airborne fungal spores. *Indoor Air*: DOI: 10.1111/ina.12166. Disponible en ligne à <http://doi.wiley.com/10.1111/ina.12166> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Sivaprakasam, V., A.L. Huston, C. Scotto et J.D. Eversole (2004). Multiple UV wavelength excitation and fluorescence of bioaerosols. *Optics Express* 12(19):4457. Disponible en ligne à <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=OPEX-12-19-4457> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Slieman, T.A. et W.L. Nicholson (2001). Role of dipicolinic acid in survival of *Bacillus subtilis* spores exposed to artificial and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 67(3):1274-1279. Disponible en ligne à <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.67.3.1274-1279.2001> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].

Smith, E. et G. Dent (2005). *Modern Raman spectroscopy: A practical approach*. Hoboken, NJ: J. Wiley.

Vishwasrao, H.D., A.A. Heikal, K.A. Kasischke et W.W. Webb (2005). Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy. *Journal of Biological Chemistry* 280(26):25119-25126. Disponible en ligne à <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M502475200> [Dernière consultation : 20 mai, 2015].