

תכנית עבודת גמר מוגשת לאישור

תאריך הגשה : 4/1/18

שם התלמיד : אמיר נקר Amir Nakar

ת.ז. : 305712952

שמות המנחים : פרופ' שלמה סלע, דר' זאב שמילוביץ'

חוג : החוג לביוכימיה ומדעי המזון והתזונה

זיהוי וכימות מהיר של חיידקים במי שתייה בספקטרוסקופיית ראמאן ופלואורסנציה

Rapid Detection and Quantification of Bacteria in Drinking Water Using Raman and Fluorescence Spectroscopies

אישור התוכנית :

תאריך :

חתימת התלמיד :

חתימת המנחים :

חתימת ראש החוג :

הצגת הבעיה ורקע מדעי

הצגת הבעיה

למרות המאמצים הרבים בשמירה על בטיחות מי השתייה, אנו עדיין מתמודדים עם זיהומים של חיידקים, כגון *Legionella*, *Salmonella*, *Escherichia* הגורמים למחלות בדרכי העיכול, מחלות עור ועוד [1, 2]. בשל כך, קיים צורך מתמיד בניטור המים מבחינה מיקרוביולוגית. זיהוי וטיפול בזיהום בזמן אמת יכול למנוע את הגעתם של פתוגנים למי שתייה, לחסוך למשק כסף רב וכמובן להקטין את הפגיעה הבריאותית באדם [3]. בתעשייה מתבצעות בדיקות רבות, כגון בדיקה לזיהוי כמות חיידקים כללית לפי עכירות, כימות חיידקים קוליפורמים וקוליפורמים צואתיים בעזרת מצעים סלקטיביים ואף זיהוי חיידקי סטרפטוקוקוס צואתיים בעזרת זריעה על מצע סלקטיבי, לזיהוי זיהום המים, לאורך כל שלבי הטיהור ובנקודות רבות בהזרמת המים לצרכן [4-6]. הקושי הנוצר מבדיקות מרובות אלה הוא הזמן הארוך הדרוש לבדיקות המיקרוביאליות אשר גורם לכך שבפועל מים מזוהמים מגיעים לצרכן הקצה [7].

השיטות המקובלות במעבדות מיקרוביולוגיות כוללות בעיקר זריעות על גבי מצעים סלקטיביים, גידול בתנאים אופטימליים וספירת מושבות או עכירות. הבעיה בשיטות אלה היא ששלב הגידול לוקח זמן רב, בין 12 שעות לשבוע, דבר המעכב את הבדיקה כולה ויוצר עומס על המערכת. נוסף על כך, הבדיקות מבוצעות על מרחב דגימה קטן – 0.1-1 ליטר מתוך מאות אלפי ליטרים שמוזרמים במערכת. הבדיקות נעשות באופן תקופתי ורוב המים לא נבדקים. כיוון שזיהומי חיידקים (ובמיוחד פתוגנים) הם תופעה בלתי צפויה, המופיעה באופן ספוראדי [8], ניתן להצביע כאן על כשל של מערכת הדגימה בתעשיית המים העלול לפגוע בבריאות הציבור. כשל זה מוכר בתעשייה אך כיום לא קיים תחליף איכותי ומשתלם לשיטת הדגימה הקיימת [7-9].

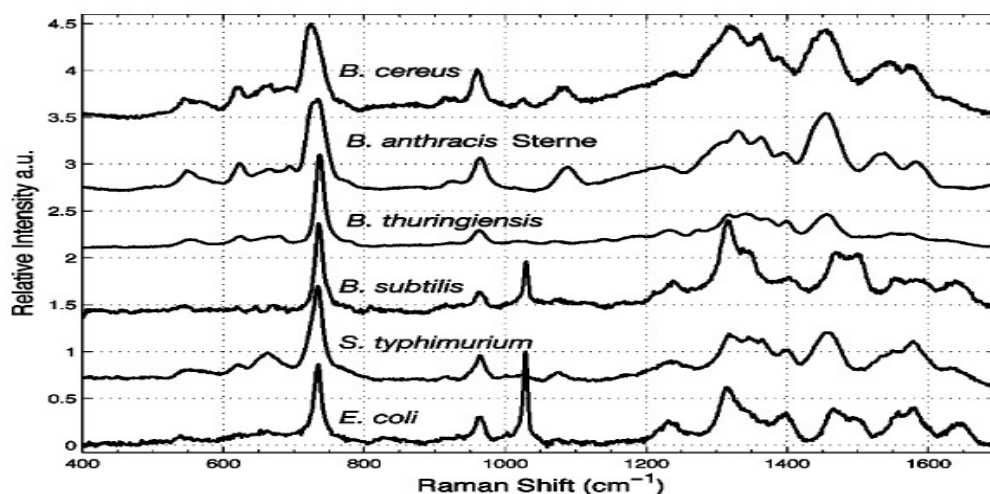
קיימות כיום מספר שיטות מתקדמות לזיהוי וכימות חיידקים במים. ישנן שיטות מולקולריות שונות, המתבססות על הגברת רצפי DNA חיידקי (PCR) והשוואתם למסדי נתונים ידועים, או זיהוי בעזרת היברידיזציה [7]. בדיקות אלה דורשות עבודה ידנית מרובה והן אורכות זמן רב (מספר ימים לרוב) [10]. השלב הדורש את הזמן הרב ביותר הוא שלב ההעשרה הנדרש ברוב השיטות הקיימות, בשל הרגישות הנמוכה של שיטות אלה [11]. שיטות מתקדמות עוד יותר, מבוססות על טכנולוגיית DNA Microarray ו-ELISA. שיטות אלה נחשבות מהירות מאוד, בעלות ספציפיות גבוהה ולעיתים ללא צורך בהעשרה (תלוי בשיטה). אך יחד עם זאת, השיטות יקרות מאוד לשימוש ודורשות כוח אדם מקצועי ביותר. עקב מגבלות השיטות הקיימות, נותר צורך אמיתי לשיטה לזיהוי וכימות מהיר של חיידקים במי שתייה, בעלות נמוכה וברמת דיוק גבוהה [7]. בעבודה זו אנחנו מציעים שימוש בגישות ספקטרוסקופיות מבוססת ראמאן ופלאורסנציה לזיהוי וכימות חיידקים במים הן לשתייה והן לשימוש אחר בתעשיות המזון.

ספקטרוסקופיית ראמאן

ספקטרוסקופיית ראמאן (Raman Spectroscopy) הינה כלי אנליטי מודרני, בעלות נמוכה יחסית ובעל תוצאות מהירות במיוחד. השיטה לשימוש בספקטרוסקופיית ראמאן מתבססת על תופעה המכונה Raman Shift. כאשר פוטונים באורך גל מסוים (לייזר) פוגעים במולקולה חלק מהפוטונים עוברים התמרת Raman Shift שבה משתנה רמת האנרגיה של הפוטון – ובהתאמה אורך הגל שלו. זאת עקב העברה של חלק מהאנרגיה הגלית של הפוטון בעירור לאנרגיה תנודתית במולקולה (vibrational energy). ההתמרה היא שונה בין חומר לחומר באורכי גל שונים, כך שלכל חומר ישנה "טביעת אצבע" של התמרה [12]. חשוב לציין שלמולקולות מים H_2O , התמרה טבעית חלשה מאוד ולכן מים מהווים רקע מצוין לבדיקת בטיחות

ספקטרוסקופיית ראמאן [13]. בשיטה זו אין צורך בשלב העשרת החיידקים, דבר המאפשר זיהוי חיידקים בזמן קצר באופן משמעותי. בנוסף, כיוון שאין צורך בהעשרת המצע - ניתן לבצע את הבדיקה באופן ישיר (In Situ). כדי לנצל את השיטה לזיהוי וכימות החיידקים נדרשת עבודה מקיפה ליצירת מאגר נתונים אמין שבו נותחו מספר רב של דוגמאות חיידקים. לאחר בניית מאגר נתונים אמין ומגוון ניתן לבנות מודל סטטיסטי לזיהוי מהיר של החיידקים לפי ספקטרום הראמאן שלהם [13].

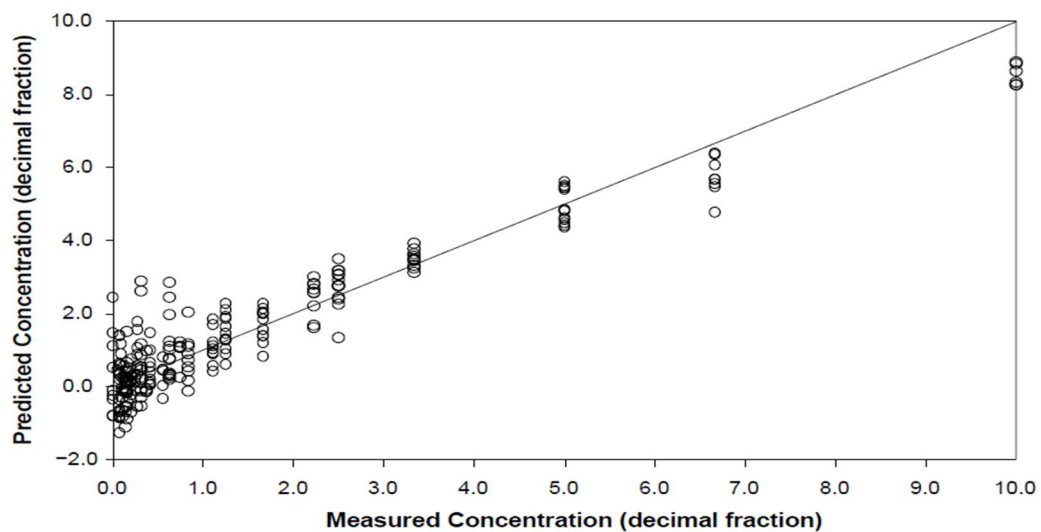
מחקרים קודמים הראו כי ניתן להבחין בין חיידקים שונים בהתאם לספקטרום הראמאן שלהם [13-21]. דוגמה לכך מובאת באיור 1 הנלקח מעבודה של Permasiri ושותפיו אשר הצליחו להבדיל בין חיידקים מסוגי *Bacillus*, *Escherichia* ו-*Salmonella* שונים [22]. עבודות רבות בתחום משתמשות בטכנולוגיה חדישה הנקראת Surface Enhanced Raman Scattering (SERS). בסריקות מבוססות SERS הדוגמה מוטענת על משטח ייחודי שעליו נמצאים חלקיקים עשויים מתכת עשירה באלקטרונים, כגון זהב או כסף. אלומת הלייזר "נכלאת" בין החלקיקים, וענן האלקטרונים הרחב סביב הדוגמה הנבדקת גורם לחיזוק אות התמרת הראמאן, זאת בעקבות תופעה המכונה Surface Plasmon Resonance. השימוש ב-SERS מאפשר זיהוי כימי בריכוזים הנמוכים פי 10^{-6} מיכולת הזיהוי בסריקה רגילה [12, 23]. בעבודות הכוללות שימוש ב-SERS הצליחו חוקרים לזהות זנים נוספים של חיידקים ואף לזהות חיידקים אשר גדלו בדוגמאות בשר וחלב [10], [21, 22, 24-26]. עד כאן דנו בנושא הבדלה בין חיידקים שונים. בכל העבודות שצוינו תרבויות החיידקים גודלו במשך לילה או 24 שעות, במדיום נוזלי או על גבי צלחות פטרי והחוקרים נעזרו במיקרוסקופ כדי להבחין בחיידקים.



איור 1. טביעת אצבע ספקטראלית של חיידקים שונים. נלקח מתוך עבודה של Permasiri ושותפיו [22]

בעבודות אחרות ניסו החוקרים לבחון את סף הרגישות של שיטת הראמאן לכמות החיידקים. בעבודות שונות הצליחו חוקרים לזהות חיידקים בריכוזים של 10^3 , 10^5 ואף 1 CFUs ml^{-1} . עבודות אלה נעשו בשימוש בטכנולוגיית SERS ומיקרוסקופיה (רגילה, וקונפוקלית) [27-29].

בעוד שרוב העבודות הנעשות בזיהוי חיידקים משתמשות במיקרוסקופיה, SERS או שילוב של השניים, עבודה של Schmilovitch ושותפיו [30] מ-2005 הראתה שניתן לזהות חיידקים בשיטת ספקטרוסקופיית ראמאן, ללא מיקרוסקופ. החוקרים הצליחו לזהות ולהבחין בחיידקים בנוזל בריכוזים של 10^{10} - 10^1 cells ml⁻¹. החוקרים השתמשו במודל מבוסס PLS, על מנת לייצר מודל חיזוי לריכוז החיידקים, כפי שניתן לראות באיור 2. המודל הצליח לחזות את ריכוז החיידקים ברמת דיוק סטטיסטית של מעל 90%. עבודה זו מצביעה על היתכנות של זיהוי חיידקים, בשיטות מבוססות ספקטרוסקופיית ראמאן, בריכוזים ובעלויות נמוכים ובכך מציגה אפשרות לפתרון מעשי לבעיית זיהוי החיידקים בתעשיית המזון.



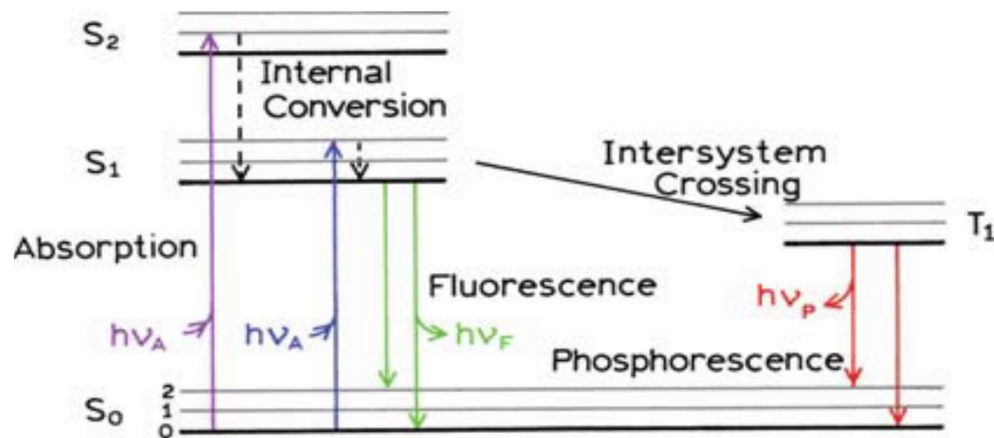
איור 2. ניתוח של אנליזת PLS. זיהוי ריכוז חיידקי *Erwinia carotovora* בעזרת מודל מתמטי. מתוך Schmilovitch ושותפיו [30].

פלואורסנציה

פלואורסנציה הינה תופעה טבעית המתרחשת כתוצאה מבליעת פוטון ע"י מולקולה או יון. הבליעה גורמת לעירור אלקטרון במולקולה מהרמה האנרגטית הנמוכה במצב היציב (ground state) שבה הוא נמצא לאחת הרמות האנרגטיות במצב מעורר (excited state). במצב מעורר, האלקטרון מאבד חלק מהאנרגיה כתוצאה מתנודות בקשרים תוך-מולקולריים, התנגשויות ואינטראקציות בין מולקולות ללא פליטת אור ודועך עד לרמה האנרגטית הנמוכה של המצב המעורר. מהרמה האנרגטית הנמוכה של המצב המעורר, האלקטרון חוזר תוך כדי פליטת פוטון בעל אנרגיה נמוכה יותר (אורך גל ארוך יותר) מהפוטון שנבלע, לאחת מרמות האנרגטיות במצב היציב. מהרמה האנרגטית אליה חזר במצב היציב, האלקטרון חוזר למיקומו המקורי (הרמה האנרגטית הנמוכה במצב היציב) ע"י איבוד אנרגיה ללא פליטת אור (איור 3) [31].

מדידה של תופעת הפלואורסנציה יכולה להוות כלי למדידת חומרים אורגניים בתמיסה. בחומרים אורגניים מסוימים, בעיקר כאלה בעלי מבנה טבעתי, מתקיימת פלואורסנציה כאשר הם מוארים באורך גל ספציפי. התופעה תוארה בעבר רבות ככלי לכימות קבוצות חומרים אורגניים ובמיוחד חומרים הומיים וחומרים "חלבוניים" (המכילים חומצות אמינו ארומטיות: טירוזין, טריפטופן ופניל-אלנין). החומרים החלבוניים יכולים להיות חומצות אמינו חופשיות, חלבונים, חלקי חלבון ופפטידים קצרים ואף מולקולות אורגניות

מורכבות המכילות חומצות אמינו. חומרים אלה במי שתייה מהווים אינדיקציה לנוכחות של מיקרואורגניזמים במים ויכולים לשמש לכימות המיקרואורגניזמים [32-35].



איור 3. תופעת פלורסנציה לפי דיאגרמת Jablonsky. נלקח מתוך Principles of Fluorescence Spectroscopy [31]

כיוון שבתעשיית המים נדרשת יכולת הערכה מהירה לאיכות טיפול במים (סינון, כלורינוציה וכו'), הוצע בעבודתו של Chen ושותפיו מ-2014 כי בדיקת פלואורסנציה יכולה לשמש להערכת איכות הטיפול במים. החוקרים בנו מפות תלת ממדיות המתבססות על עוצמת הפלואורסנציה לפי אורך גל העירור ואורך הגל ההארה, אותן כינו (EEM) Excitation/Emission Martix. החוקרים הצליחו להצביע על קשר בין עוצמת ההארה לנוכחות חיידקים במים [36]. בעבודת המשך שנעשתה ע"י Simelane נמצאה קורלציה בין עוצמה ההארה בקואורדינטות עירור-הארה 210/370, 225/336 ו-280/332 לכמות חיידקים כללית במי ברז, כפי שנמדדה בשיטות מסורתיות (ספירת מושבות לאחר גידול בתנאים אופטימליים). החוקרים הראו יכולת לזהות במים חיידקים ספציפיים (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*) אך לא הצליחו להבחין ביניהם. החוקרים הצליחו להבחין בחיידקים בריכוז מינימלי של 10^4 CFUs/ml [37]. עבודות אלו מראות לנו כי קיים קשר בין ריכוז החיידקים לעוצמת הפלואורסנציה שניתן לזהות במכשיר ספקטרופלואורומטר, דבר המצביע כי ייתכן וניתן להשתמש בטכנולוגיה זו לכימות עומס מיקרוביאלי במי שתייה בתעשייה.

השערות ומטרות העבודה

השערת המחקר

הדיווחים לעיל מדגימים יכולת טובה של זיהוי חיידקים בספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה גבוהה וכן היתכנות של זיהוי באמצעות פלואורסנציה. אנו משערים ששימוש בכלים לכריית מידע (Data mining) יכול לאפשר גילוי וזיהוי של חיידקים הן באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה נמוכה והן בפלואורסנציה, כאשר הכמות הגדולה של הנתונים תאפשר עיבוד מעמיק יותר.

מטרות העבודה

1. בחינת יכולת של ספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה נמוכה ופלואורסנציה לגילוי וכימות חיידקים במים.
2. בחינת יכולת של ספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה נמוכה ופלואורסנציה לזיהוי סוגי חיידקים במים.

תכנית המחקר

חלק I – ספקטרוסקופיית ראמאן

שלב 1 – אופטימיזציה

במהלך העבודה יבוצע תהליך אופטימיזציה למכשיר ספקטרוסקופיית הראמאן. שלב זה נדרש למרות שבעבודות קודמות הצליחו לזהות חיידקים בטכניקה דומה משום שהציוד ששימש בעבודה ב-2005 [30] אינו תקין, הוחלף ושודרג. כיוון שחלק מהמכשיר עצמו נבנה במכון להנדסה חקלאית, יש לנסות ולהגיע לשילוב הנכון לזיהוי חיידקים מבחינת אורך הגל של הלייזר, גובה המשדר, זמן החשיפה והקריאה, גודל הדוגמה, צורת התושבת (המשפיעה על צורתה הפיזית של הדוגמה), חומר התושבת (המשפיע על החזר הלייזר), שיטת הדגימה – בטבילה, דרך זכוכית או מהאוויר, עוצמת הלייזר, כמות החזרות להפחתת ה"רעש" ואופן הכנת הדוגמה לבדיקה. לשם כך נשתמש במשדר לייזר 785 nm וגלאי מסוג QE65, שניהם של חברת OceanOptics. במהלך האופטימיזציה ניצור מאגרי נתונים שעליהם תבוצע אנליזה סטטיסטית, מבוססת על מודל מתמטי PLS באמצעות תוכנות Matlab (MATLAB 2015a, Systematics, Natick, MA, ארה"ב) ו-JMP (JMP Pro 13, SAS Institute Inc., Cary, NC, ארה"ב). במידת הצורך יבחנו גם שיטות כימוטריות נוספות כגון רשתות עצביות (Neural Networks) או Support Vector Machine. לאורך העבודה הבדיקות תעשנה על חיידקי *E. coli* (DH5α). לאורך כל שלבי העבודה נשתמש בשיטות של Machine Learning כדי לאמן (Training) את מודל החיזוי שלנו על נתונים קיימים, לבצע תיקוף (Validation) של יכולת החיזוי ואף לבדוק את יכולת החיזוי בתנאי אמת (Prediction). זאת נעשה בעזרת שימוש מגוון במודלים מבוססי PLS, בצירוף עיבוד-מקדים (Preprocessing) מתמטי כמו גזירה (Derivative).

נאסוף בין 200-50 סריקות של חיידקים במים מזוקקים על מנת לבנות מודל אמין ואיכותי לזיהוי סגולי של החיידקים במים. ככל הנראה שלב האופטימיזציה הוא הארוך ביותר ועלול לקחת מעל לשנת עבודה עד להגעה לתנאים המתאימים לזיהוי החיידקים. שיפור הפלטפורמה אמור להיות יחסית פשוט.

שלב 2 - בחינת סף הרגישות של המכשיר לחיידקי *E. coli*

לאחר שתימצא הפלטפורמה המתאימה (כלומר, מצב מסוים של כלל הפרמטרים הנ"ל), תיערכנה בדיקות לבחינת יכולת המכשיר לזהות חיידקים בריכוזים נמוכים עד להגעה למינימום רגישות המכשיר. באופן זה נוכל לפתח מודל לכימות של חיידקים מזן יחיד על רקע מים מזוקקים. בחינה זו תעשה על ידי מיהול וסריקת דוגמאות בריכוזים ידועים וניתוח התוצאות בעזרת מודל מבוסס PLS.

שלב 3 - בחינת סף הרגישות של המכשיר לחיידקי *Bacillus subtilis*

בהמשך לזיהוי חיידק המודל (*E. coli*) ננסה להבחין בזן אחר של חיידקים – *B. subtilis* (זן NCIB 3610). חיידק זה נבחר היות והוא חיידק מסוג גראם חיובי, השונה באופן מהותי מבחינת הרכב החלבונים, השומנים והדופן שלו. תיערכנה בדיקות לבחינת יכולת המכשיר לזהות חיידקים בריכוזים נמוכים עד להגעה למינימום רגישות המכשיר. באופן זה נוכל לפתח מודל לכימות של חיידקים אלה על רקע מים מזוקקים. בחינה זו תעשה על ידי מיהול וסריקת דוגמאות בריכוזים ידועים וניתוח התוצאות בעזרת מודל מבוסס PLS.

שלב 4 – בחינת יכולת אבחנה בין חיידקי *E. coli* ו-*B. subtilis*

במידה ויימצא שקיים הבדל בין טביעת האצבע הספקטראלית של *E. coli* לזו של *B. subtilis*, אנו ננסה לפתח מודל סטטיסטי לזיהוי של החיידקים השונים. לשם כך נשתמש בדוגמאות מעורבות בריכוזים שונים של חיידקים על רקע מים מזוקקים, ניצור מאגר נתונים רחב וננסה לפתח את המודל.

במידה ולא נמצא הבדל בין טביעת האצבע הספקטראלית של חיידקים אלה, נבצע שיפור של המודל הסטטיסטי לכימות כלל החיידקים בדוגמה, ונייצר למעשה מודל לספירה כללית של חיידקים במים באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה נמוכה.

חלק II – ספקטרוסקופיית פלואורסנציה

עבודות קודמות במעבדה הראו כי ניתן לקשר בין ריכוז חיידקים במי שתייה ועוצמת פלורסנציה. עבודות אלה הראו יכולת לזהות חיידקים ידועים בריכוזים של עד 10^2 Cells ml^{-1} , והחוקרים קישרו בין התופעה לנוכחות נגזרות של טריפטופן. אנו ננסה להמשיך עבודות אלה כדי להראות שימוש בספקטרוסקופיית פלורסנציה לזיהוי חיידקים בדוגמאות סביבתיות מקידוחי מים בצפון הארץ, ובנוסף ננסה להשוות בין יכולת הזיהוי באמצעות פלורסנציה למכשיר הראמאן שלנו.

הקידוחים נבחרו מכיוון שבעבר נצפו בהם זיהומים מיקרוביאליים ספורדיים. אנו ננסה לזהות זיהומים אלה באמצעות ספקטרוסקופיית פלואורסנציה מבוססת עירור-הארה ולקשר בין תגובות הארה לנוכחות מיקרואורגניזמים במים. את הדוגמאות נבדוק באמצעות מכשיר ספקטרוסקופיית פלואורסנציה (מדגם RF-5301PC של חברת Shimadzu, קיוטו, יפן). לאחר סריקת הדוגמאות ואיסוף נתוני EEMs נבצע אנליזה סטטיסטית ראשונית באזורים הידועים מעבודות קודמות (עירור-הארה 210/370, 225/336 ו-280/332). בהמשך ייתכן ונבצע אנליזה מבוססת על המודל המתמטי PARAFAC (Parallel Factor Analysis) או PLS. מודלים אלו מאפשרים ניתוח רב-גורמי על מנת לאתר את "אזורי העניין" במפות ה-EEM. נשתמש בתוכנת Matlab (MATLAB 2015a, Systematics, Natick, MA) ארה"ב על מנת לבצע את האנליזה. נבחן את אזורי העירור-הארה שבין 210-400 nm.

בנוסף לכך, נבצע מדידות בריכוזי חיידקי *E. coli* ו-*B. subtilis* ידועים על מנת לכייל את המערכת ולהכין אוסף סריקות כדי שנוכל להשוות בין פלטפורמת הראמאן לפלורסנציה.

שלב 1 – איסוף נתוני פלורסנציה מדגימות קידוחי מים

לאורך שנה אחת (החל באוגוסט 2017 ועד אוגוסט 2018) נסרוק דוגמאות מים מקידוחים שונים בצפון הארץ על מנת לייצר מפות EEM בטווח עירור-הארה שבין 210-400nm. כל דוגמה תבחן לפני ואחרי הכלרת המים ולפני ואחרי סינון המים בפילטר 0.45µm על מנת לבדוק את השפעתם של מיקרואורגניזמים על מטריצת העירור-הארה. במקביל, ייאספו נתוני מיקרוביולוגיה (ספירה כללית, נוכחות קוליפורמים, קוליפורמים צואתיים, וסטרפטוקוקים צואתיים) לפי השיטות הסטנדרטיות [38]. הנתונים ייאספו לניתוח בהמשך העבודה.

שלב 2 – ניתוח ראשוני של הנתונים באורכי גל ידועים

בהמשך לעבודתו של Simelane, נבחן התאמה בין נתוני ספירה כללית (או נתוני מיקרוביולוגיה אחרים, אם יהיו רלוונטיים) במים שנתקבלו מבדיקות סטנדרטיות לעוצמות הארה באורכי גל עירור/הארה: 210/370, 225/336 ו-280/332. שלב זה יבוצע כאשר מאגר הנתונים יהיה בעל מעל 50 דוגמאות שעליהן ניתן לבצע ניתוח. איסוף הנתונים יימשך במקביל.

שלב 3 – ניתוח מתקדם של הנתונים

בהעדר קורלציה חזקה בין נתוני הספירה הכללית (או נתוני מיקרוביולוגיה אחרים, אם יהיו רלוונטיים) לעוצמות הארה באורכי הגל הידועים, נשתמש בשיטות מתקדמות על מנת לייצר יכולת חיזוי טובה יותר ממטריצות הפלורסנציה המלאות (EEMs). נשתמש במודלים מבוססי PLS, כולל מניפולציות מתמטיות כגון גזירה, Centering, נרמול התוצאות ועוד כנדרש. אם יהיה צורך נוכל גם להשתמש במודלים מבוססי אנליזת PARAFAC, רשתות עצביות (Neural Network) או SVM. שלב זה יבוצע כאשר מאגר הנתונים יהיה בעל מעל 50 דוגמאות שעליהן ניתן לבצע ניתוח. איסוף הנתונים יימשך במקביל.

שלב 4 – בחינת ספי רגישות לחיידקי *E. coli* ו-*B. subtilis*

במקביל לעבודה עם דוגמאות המים מהקידוחים, על מנת שנוכל להשוות בין העבודה בראמאן ובפלורסנציה, ניצור מאגר נתונים של EEMs של חיידקי *E. coli* ו-*B. subtilis* בריכוזים ידועים בטווח שבין 10^8 CFUs ל- 10^1 ml⁻¹ במים מזוקקים. את ריכוז החיידקים ננסה לחזות בשיטות שתוארו בשלבים 2 ו-3.

חלק III – השוואה בין ספקטרוסקופיות ראמאן ברזולוציה נמוכה לפלואורסנציה לזיהוי וכימות חיידקים במים

באמצעות מודלים סטטיסטיים ידועים המשווים דיוק (Accuracy), חוסן (Robustness) והדירות (Repeatability) נשווה בין יכולת החיזוי של המודלים שנפתח לספקטרוסקופיית ראמאן ולפלואורסנציה. נשתמש במודל ההשוואה של Ignat [48] המתבסס על ניתוח root mean square error of calibration (RMSEC) ו-root mean square error of cross validation (RMSECV) כדי לייצר ערך Standerdized Weighted Sum (SWS) שמהווה מדד לאיכות החיזוי של המודלים. מערך זה נוכל להסיק מי מהשיטות מתאימה יותר לזיהוי וכימות חיידקים במים.

את כל עבודת המעבדה, כולל גידול החיידקים, הכנת הדוגמה ומדידה בפועל יבצע התלמיד (אמיר נקר) בשיתוף פעולה מלא עם החוקרים מהמכון להנדסה חקלאית (ד"ר זאב שמילוביץ' וד"ר תימאה איגנת) וחוקרים מהמעבדה של פרופ' שלמה סלע מהמכון לאיכות ובריאות מזון של מרכז המחקר החקלאי. התלמיד יהיה שותף בתכנון ובניית פלטפורמת הראמאן (יחד עם עובדי המכון להנדסה חקלאית). בעבודה על ספקטרוסקופיית פלואורסנציה התלמיד יבצע את כל הסריקות והאנליזות בשיתוף פעולה עם חוקרים מהמעבדה של ד"ר מיכאל בוריסובר מהמכון למדעי הקרקע והמים של מרכז המחקר החקלאי. התלמיד יבצע את כל האנליזות הסטטיסטיות, פיתוח, שיפור והשוואת המודלים הסטטיסטיים לאחר הסריקות.

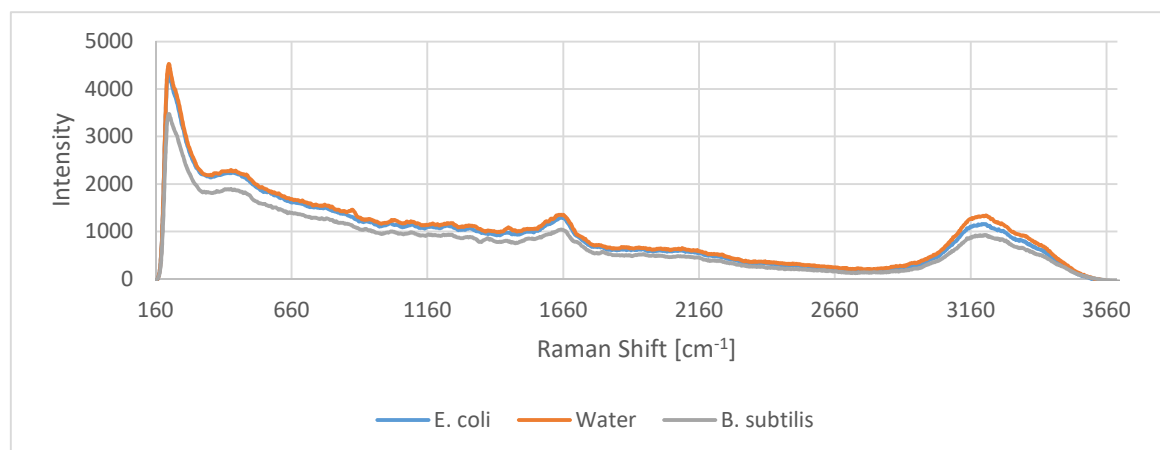
לוח הזמנים

| תאריך סיום משוער | תאריך התחלה משוער | פעולה |
|------------------------|-------------------------|--|
| 12/2017 | 11/2016 | אופטימיזציה של הפלטפורמה ושיטת הכנת הדוגמה לזיהוי חיידקי <i>E. coli</i> בעזרת מכשיר ראמאן. |
| 8/2018 | 8/2017 | איסוף נתוני פלורסנציה מדגימות קידוחי מים |
| 12/2017 | 10/2017 | בחינת סף הרגישות של פלטפורמת הראמאן לחיידקי <i>E. coli</i> |
| 12/2017 | 10/2017 | בחינת סף הרגישות של פלטפורמת הראמאן לחיידקי <i>B. subtilis</i> |
| 4/2018 | 12/2017 | ניתוח ראשוני ומתקדם של נתוני הפלורסנציה שנאספו עד כה |
| 4/2018 | 1/2018 | בחינת יכולת אבחנה סגולית בין חיידקי <i>E. coli</i> ו- <i>B. subtilis</i> בפלטפורמת ראמאן |
| 4/2018 | 1/2018 | בחינת ספי רגישות לחיידקי <i>E. coli</i> ו- <i>B. subtilis</i> |
| 8/2018 | 4/2018 | השוואה בין ספקטרוסקופיות ראמאן ברזולוציה נמוכה לפלואורסנציה לזיהוי וכימות חיידקים במים |
| 10/2018 | 8/2018 | כתיבת דוח העבודה והגשתו. |

תוצאות ראשוניות

ניסוי ראמאן

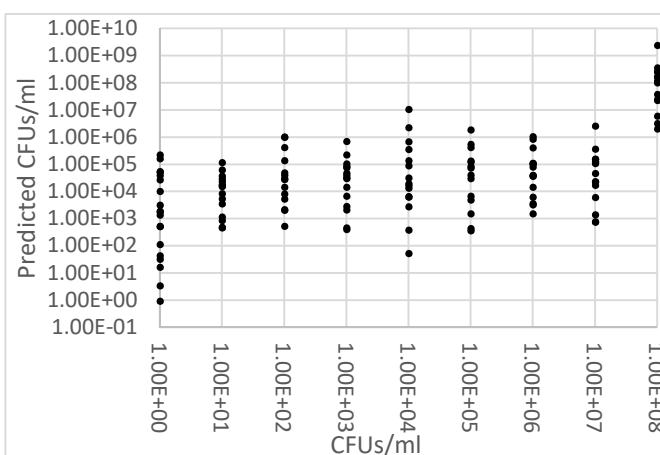
בניסוי הראמאן ניסינו להבחין בחיידקי *E. coli* ו-*B. subtilis* בריכוזים שונים. לשם כך בחנו את ספקטרום הראמאן של החיידקים בעירור ע"י לייזר באורך גל 785nm. דוגמה של הספקטרה מופיעה באיור 4.



איור 4. ספקטרום התמרת ראמאן של דוגמאות של חיידקי *E. coli* בריכוז 10^8 CFUs/ml ו-*B. subtilis* בריכוז 10^7 CFUs/ml בתרחיף מים מזוקקים. כביקורת מוצגת דוגמה של מים מזוקקים ללא חיידקים. הדוגמאות נסרקו בזמן חשיפה של 5 שניות ללייזר בעוצמה 175mW בכוסית אלומיניום.

מכיוון שלא ניתן להבחין בין הספקטרה נבחנה האפשרות לגלות את ריכוזי החיידקים באמצעות מודל מתמטי מבוסס PLS. לשם כך נסרקו כ-150 דוגמאות של חיידקי *E. coli* במיהולים עשורניים ונותרו ע"י המודל. באיור 5 מתוארות תוצאות החיזוי של המודל, ניתן לראות כי ישנו פיזור גבוה בתחזיות והן אינן אמינות. בטבלה 1 מתוארת בחינת המודל על דוגמאות שלא השתתפו בהכנת המודל. הצלחה בזיהוי (Hit) הוגדרה כטעות של פחות מסדר גודל 1. בחינה של תוצאות המודל הראתה שהמודל אינו מתאים לחיזוי ריכוז החיידקים והמודל מאפשר חיזוי בדיוק של פחות מ-50%. חשוב לציין שההצלחה לכאורה בזיהוי בטווחים 10^3 - 10^4 CFUs/ml היא נובעת מחיזוי לא נכון של כלל הקבוצות בטווח האמצע ועל כן אינה משמעותית.

| טבלה 1 - הצלחת מודל PLS בחיזוי על בסיס סריקות ראמאן | | | |
|---|----|------|------|
| CFUs/ml | n | Hits | Hit% |
| 0.00E+00 | 4 | 0 | 0% |
| 1.00E+00 | 4 | 1 | 25% |
| 1.00E+01 | 4 | 1 | 25% |
| 1.00E+02 | 2 | 1 | 50% |
| 1.00E+03 | 4 | 3 | 75% |
| 1.00E+04 | 3 | 2 | 67% |
| 1.00E+05 | 3 | 1 | 33% |
| 1.00E+06 | 3 | 0 | 0% |
| 1.00E+07 | 5 | 0 | 0% |
| 1.00E+08 | 5 | 0 | 0% |
| Totals | 30 | 9 | 30% |



איור 5. מודל PLS ראשוני לזיהוי חיידקים במיהולים עשורניים בספקטרוסקופיית ראמאן. בגרף ניתן לראות את הערכים החזויים ע"י המודל לעומת הערכים האמיתיים. מספר הדוגמאות הכוללות בהכנת המודל היה 150. המודל כולל תהליך של Scaling ו-Centering.

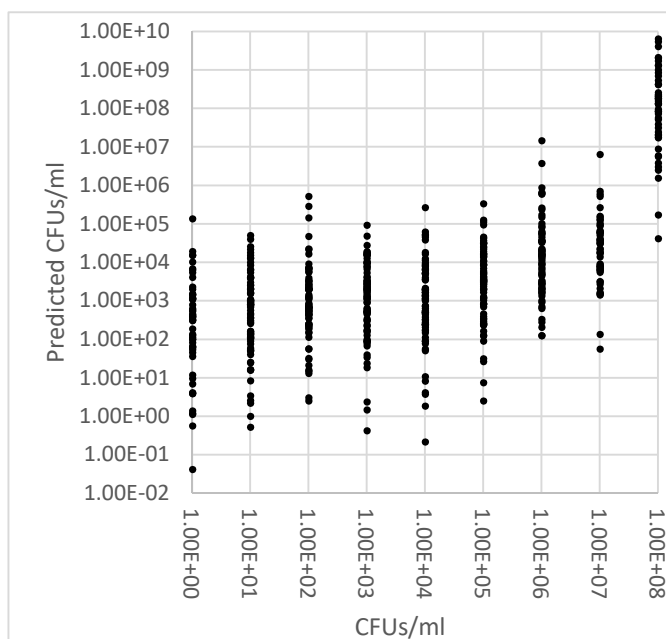
במהלך שנת המחקר הראשונה בוצעו ניסויים על מנת לשפר את רגישות המכשיר. כחלק מעבודה זו נבחנו השפעות של:

- א. הגדלת אוסף הסריקות מ-150 ל-250.
 - ב. זמן הקרנת החיידקים בלייזר בטווח שבין 0.5 שניות ל-300 שניות
 - ג. הפעלת עקת קור (על ידי ביצוע כל תהליך הכנת הדוגמה ב-4 מע"צ). עקה זו אמורה לגרום לייצור מוגבר של חומרים בעלי התמרת ראמאן [20]
 - ד. עוצמת הלייזר (בטווח שבין 70mW ל-525mW)
 - ה. הרחפת החיידקים בתמיסת מלח (0.9% NaCl) לעומת מים מזוקקים.
 - ו. ייבוש על גבי משטחי זכוכית ואלומיניום לפני הסריקה
 - ז. ייבוש על גבי משטחי SERS המכילים חלקיקי כסף לפני הסריקה.
- ניסיונות אלה לא הראו שיפור ברגישות המכשיר.

גישה נוספת שנבדקה היא השפעות של מניפולציות מתמטיות / סטטיסטיות, כגון, התמקדות באזורי התמרה מסוימים, נרמול הנתונים במספר גישות, 'עיבוד מקדים' הכולל Centering, Scaling, Exclusions.

המודל המוצלח ביותר שהתקבל עד כה מוצג באיור 6. ניתן לראות הפרדה טובה יותר של בריכוזי חיידקים 10^8 CFUs/ml אך המודל נותר לא אמין בשאר ריכוזי החיידקים. בטבלה 2 ניתן לראות כי המודל בעל סף רגישות לחיידקי *E. coli* בריכוז 10^8 CFUs/ml ברמת דיוק של 86% אך אינו מצליח לגלות את החיידקים בריכוזים נמוכים יותר.

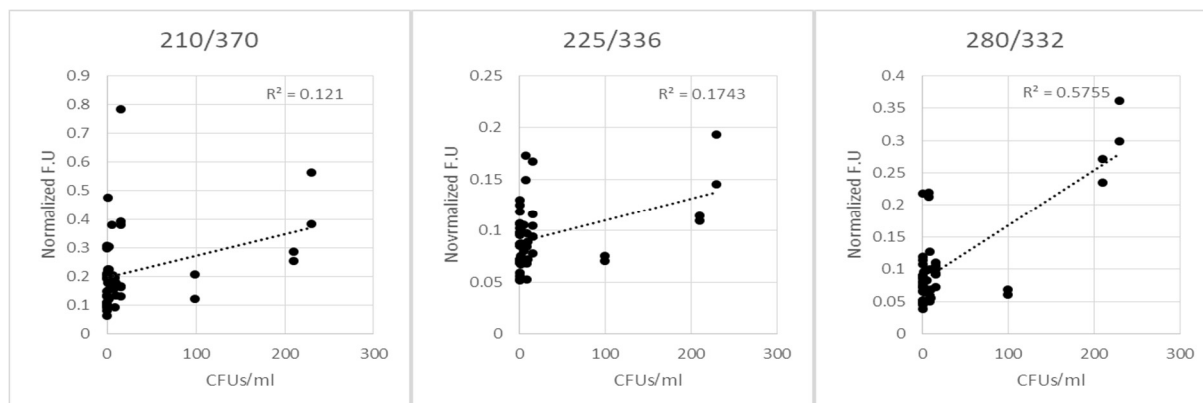
| טבלה 2 - הצלחת מודל PLS בחיזוי על בסיס סריקות ראמאן לאחר אופטימיזציה | | | |
|--|-----|------|------|
| CFU/ml | n | Hits | Hit% |
| 0E+00 | 11 | 3 | 27% |
| 1E+00 | 5 | 0 | 0% |
| 1E+01 | 14 | 2 | 14% |
| 1E+02 | 18 | 8 | 44% |
| 1E+03 | 20 | 10 | 50% |
| 1E+04 | 17 | 10 | 59% |
| 1E+05 | 15 | 3 | 20% |
| 1E+06 | 15 | 1 | 7% |
| 1E+07 | 11 | 0 | 0% |
| 1E+08 | 7 | 6 | 86% |
| Total | 133 | 43 | 32% |



איור 6. מודל PLS לזיהוי חיידקים בספקטרוסקופיית ראמאן. בגרף ניתן לראות את הערכים החזויים ע"י המודל לעומת הערכים האמיתיים. מספר הדוגמאות שהוכללו בהכנת המודל היה 659, לאחר הסרת 7 דוגמאות חריגות. המודל כולל תהליך של Scaling, Centering, ונרמול לערך מקסימום בהתמרת ראמאן באורך גל 208.8 cm^{-1} .

ניסוי פלורסנציה

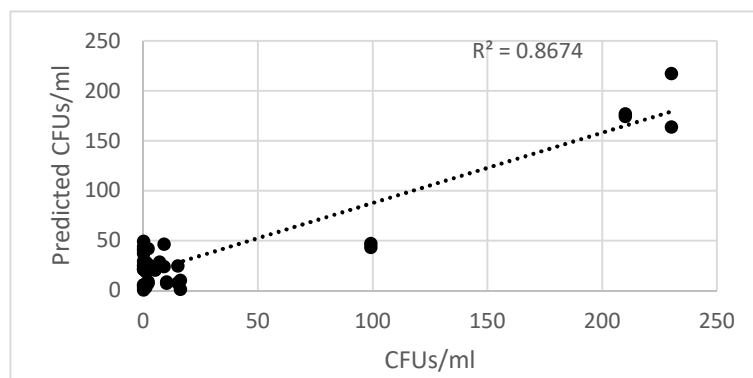
בחלק זה של העבודה נסרקו דוגמאות מי תהום מקידוחים בצפון הארץ ע"י מכשיר פלורסנציה ונלקחו מטריצות פליטה/עירור בטווח 210-420nm. בעקבות עבודות קודמות התמקדנו בעיקר בניתוח הנתונים באורכי גל פליטה/עירור 210/370, 225/336 ו-280/332. לא נמצאה התאמה בין עוצמת הפליטה באורכי הגל הנ"ל לריכוז החיידקים ולכן נראה שלא ניתן למצוא קשר מובהק בין ריכוז החיידקים בדוגמה לאורך גל עירור/פליטה יחיד (איור 7).



איור 7. התאמה בין עוצמת עירור באורכי גל פליטה/עירור שונים לריכוז חיידקים. עוצמת העירור מנורמלת לערכי עירור ראמאן באורך גל פליטה/עירור 275/305. $n=49$.

מכיוון שבכל אורך גל נראה קשר חלש בין עוצמת ההארה לריכוז החיידקים, נבחנו האפשרות לשילוב של מספר משתנים כדי לייצר יכולת כימות חיידקים טובה יותר. לשם כך נבחנו הנתונים באמצעות מודל מבוסס PLS. הצלחת המודל (hit) הוגדרה כטעות של פחות מסדר גודל 1. כפי שניתן לראות באיור 8 וטבלה 3 המודל הצליח להפריד בחלוקה איכותית בין קבוצות 'מעל 100 CFUs/ml' ו-'מתחת ל-100 CFUs/ml' ולמצוא התאמה בין חיזוי המודל לכמות החיידקים ($R^2 = 0.867$).

| טבלה 3 - הצלחת מודל PLS בחיזוי על בסיס סריקות מטריצות פליטה/עירור | | | |
|---|---|------|------|
| CFUs ml ⁻¹ | n | Hits | Hit% |
| Over 100 | 2 | 2 | 100% |
| Under 100 | 7 | 7 | 100% |
| Totals | 9 | 9 | 100% |



איור 8. מודל PLS לזיהוי חיידקים לפי מטריצות עירור/פליטה. בגרף ניתן לראות את הערכים החזויים ע"י המודל לעומת הערכים האמיתיים. מספר הדוגמאות שהוכללו בהכנת המודל היה 40. המודל כולל תהליך של Centering ונרמול עוצמת העירור לערכי עירור ראמאן באורך גל עירור/פליטה 275/305.

יש לציין כי הנתונים מגיעים מדוגמאות סביבתיות בהן ריכוז החיידקים נמוך. בנוסף, נמצא כי מניפולציה מתמטית של Centering, Scaling, ושימוש בערכים מוחלטים (Absolute values) שיפרה את המודל.

כפי שניתן לראות בטבלה 3, כאשר המודל נבחן על ידי דוגמאות שלא שימשו בהכנת המודל (Validation), נמצאה התאמה של 100% (9/9) ל-2 הקבוצות. אנליזה זו מראה כי קיים פוטנציאל לזיהוי חיידקים בריכוזים של 10^2 CFUs/ml באמצעות ספקטרוסקופיית פלורסנציה.

1. Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E: Microbial Agents Associated with Waterborne Diseases. *Critical Reviews in Microbiology* 2002, 28(4): 371-409.
2. Ashbolt NJ: Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. *Curr Environ Health Rep* 2015, 2(1): 95-106.
3. Collier SA, Stockman LJ, Hicks LA, Garrison LE, Zhou FJ, Beach MJ: Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water. *Epidemiol Infect* 2012, 140(11): 2003-2013.
4. Israeli Ministry of Health: People's health regulation - sanitary quality of drinking water and drinking water facilities. 2013 (in hebrew).
5. Israeli Ministry of Health: Standards of water sampling. 2016 (in hebrew).
6. Israeli Ministry of Health: Instructions for plan application, operating and monitoring of drinking water treatment facility. 2017 (in hebrew).
7. Rompré A, Servais P, Baudart J, de-Roubin M-R, Laurent P: Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods* 2002, 49(1): 31-54.
8. Cabral JP: Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int J Environ Res Public Health* 2010, 7(10): 3657-3703.
9. Edberg SC, Rice EW, Karlin RJ, Allen MJ: Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2000(29): 106S-116S.
10. Jarvis RM, Goodacre R: Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal Chem* 2004, 76(1): 40-47.
11. Willemse-Erix DF, Scholtes-Timmerman MJ, Jachtenberg JW, van Leeuwen WB, Horst-Kreft D, Bakker Schut TC, Deurenberg RH, Puppels GJ, van Belkum A, Vos MC *et al*: Optical fingerprinting in bacterial epidemiology: Raman spectroscopy as a real-time typing method. *J Clin Microbiol* 2009, 47(3): 652-659.
12. Bernhard S: Special techniques and applications. In: *Infrared and Raman Spectroscopy - Methods and Application*. Edited by Bernhard S. Weinheim, Federal Republic of Germany: VCH Verlagsgesellschaft; 1995.
13. Stöckel S, Kirchhoff J, Neugebauer U, Röscha P, Popp J: The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms. *Journal of Raman Spectroscopy* 2015(47): 89-109.
14. Pahlow S, Meisel S, Cialla-May D, Weber K, Rösch P, Popp J: Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. *Adv Drug Deliv Rev* 2015, 89: 105-120.

15. Kusić D, Kampe B, Ramoji A, Neugebauer U, Rösch P, Popp J: Raman spectroscopic differentiation of planktonic bacteria and biofilms. *Anal Bioanal Chem* 2015, 407(22): 6803-6813.
16. Fehrmann A, Franz M, Hoffmann A, Rudzik L, Wüst E: Dairy product analysis: identification of microorganisms by mid-infrared spectroscopy and determination of constituents by Raman spectroscopy. *JAOAC Int* 1995, 78(6): 1537-1542.
17. Maquelin K, Choo-Smith LP, van Vreeswijk T, Endtz HP, Smith B, Bennett R, Bruining HA, Puppels GJ: Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium. *Anal Chem* 2000, 72(1): 12-19.
18. Meisel S, Stöckel S, Elschner M, Melzer F, Rösch P, Popp J: Raman spectroscopy as a potential tool for detection of *Brucella* spp. in milk. *Appl Environ Microbiol* 2012, 78(16): 5575-55.83
19. Meisel S, Stöckel S, Rösch P, Popp J: Identification of meat-associated pathogens via Raman microspectroscopy. *Food Microbiol* 2014, 38: 36-43.
20. Wang J, Xie X, Feng J, Chen JC, Du XJ, Luo J, Lu X, Wang S: Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in milk using confocal micro-Raman spectroscopy and chemometric analysis. *Int J Food Microbiol* 2015, 204: 66-74.
21. Sundaram J, Park B, Hinton A, Lawrence KC, Kwon Y: Detection and differentiation of *Salmonella* serotypes using surface enhanced Raman scattering (SERS) technique. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2013, 7(1): 1-12.
22. Premasiri WR, Chen Y, Williamson PM, Bandarage DC, Pyles C, Ziegler LD: Rapid urinary tract infection diagnostics by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) :identification and antibiotic susceptibilities. *Anal Bioanal Chem* 2017, 409(11): 3043-3054.
23. Zeiri L, Bronk BV, Shabtai Y, Eichler J, Efrima S: Surface-enhanced Raman spectroscopy as a tool for probing specific biochemical components in bacteria. *Appl Spectrosc* 2004, 58(1): 33-40.
24. Jarvis RM, Brooker A, Goodacre R: Surface-enhanced Raman spectroscopy for bacterial discrimination utilizing a scanning electron microscope with a Raman spectroscopy interface. *Anal Chem* 2004, 76(17): 5198-5202.
25. Jarvis RM, Brooker A, Goodacre R: Surface-enhanced Raman scattering for the rapid discrimination of bacteria. *Faraday Discuss* 2006, 132: 281-292; discussion 309-219.
26. Sundaram J, Park B, Kwon Y, Lawrence KC: Surface enhanced Raman scattering (SERS) with biopolymer encapsulated silver nanosubstrates for rapid detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2013, 167(1): 67-73.

27. Kumar S, Verma T, Mukherjee R, Ariese F, Somasundaram K, Umapathy S: Raman and infra-red microspectroscopy: towards quantitative evaluation for clinical research by ratiometric analysis. *Chem Soc Rev* 2016, 45(7): 1879-1900.
28. Zhou H, Yang D, Ivleva NP, Mircescu NE, Niessner R, Haisch C: SERS detection of bacteria in water by in situ coating with Ag nanoparticles. *Anal Chem* 2014 , .1525-1533: (3)86
29. Witkowska E, Korsak D, Kowalska A, Księżopolska-Gocalska M, Niedziółka-Jönsson J, Roźniecka E, Michałowicz W, Albrycht P, Podrażka M, Hołyst R *et al*: Surface-enhanced Raman spectroscopy introduced into the International Standard Organization (ISO) regulations as an alternative method for detection and identification of pathogens in the food industry. *Anal Bioanal Chem* 2016.
30. Schmilovitch Z, Mizrach A, Alchanatis V, Kritzman G, Korotic R, Irudayaraj J, Debroy C: Detection Of Bacteria With Low-Resolution Raman Spectroscopy *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 2005, 48(5): 1843-1850.
31. Lakowicz JR: Introduction to Fluorescence. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Edited by Lakowicz JR, 3rd edn .Maryland, USA: Springer; 2006.
32. Borisover M, Laor Y, Parparov A, Bukhanovsky N, Lado M: Spatial and seasonal patterns of fluorescent organic matter in Lake Kinneret (Sea of Galilee) and its catchment basin. *Water Research* 2009, 43(12): 3104-3116.
33. Hua B, Dolan F, Mcghee C, Clevenger T, Deng B: Water-source characterization and classification with fluorescence EEM spectroscopy: PARAFAC analysis. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 2007, 87(2): 135-147.
34. Stedmon C, Markager S ,Bro R: Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry* 2003, 82(3-4): 239-254.
35. Stedmon C, Seredynska-Sobecka B, Boe-Hansen R, Le Tallec N, Waul C, Arvin E: A potential approach for monitoring drinking water quality from groundwater systems using organic matter fluorescence as an early warning for contamination events. *Water Research* 2011, 45(18): 6030-6038.
36. Chen W, Westerhoff P, Leenheer JA, Booksh K: Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environ Sci Technol* 2003, 37(24): 5701-5710.
37. Simelane KS: Application of Fluorescence Spectroscopy for Monitoring Microbial Contamination of Drinking Water. Hebrew University of Jerusalem; 2013.
38. Rice EW, Baird BR, Eaton A D, Clesceri LS: Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. In: *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. 22 edn; 2012: 77-87.