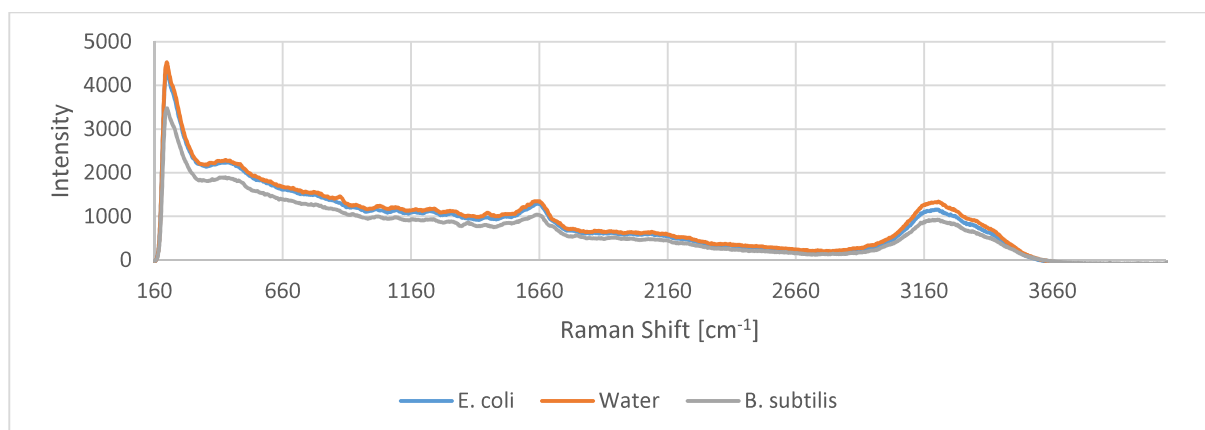


תוצאות ראשוניות

ניסוי ראמאן

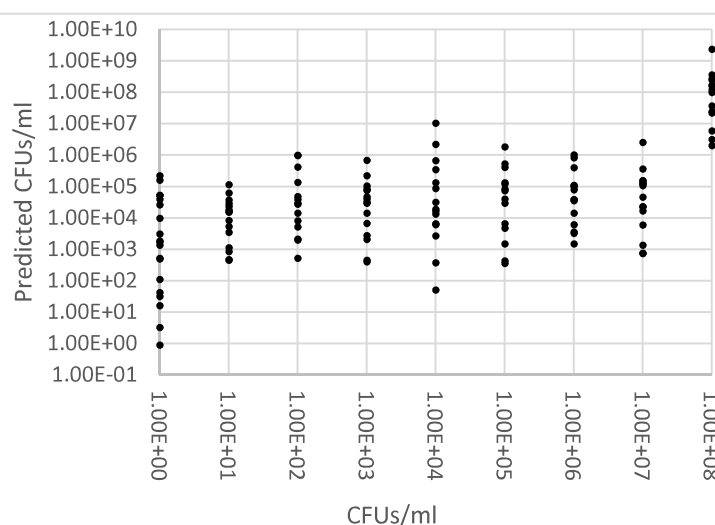
בניסוי הראמאן ניסינו להבחין בחיידקי *E. coli* ו-*B. subtilis* בריכוזים שונים. לשם כך בחנו את ספקטרום הראמאן של החיידקים בעירור ע"י לייזר באורך גל 785nm. דוגמה של הספקטרה מופיעה באיור 5.



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. בטבלה 1 ובאיור 6 ניתן לראות את ניתוח המודל. הצלחה בזיהוי ('Hit') הוגדרה כטעות של פחות מסדר גודל 1. בחינה של תוצאות המודל הראתה שהמודל אינו מתאים לחיזוי ריכוזי החיידקים והמודל מאפשר חיזוי בדיוק של פחות מ-50%. חשוב לציין שהצלחה 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:

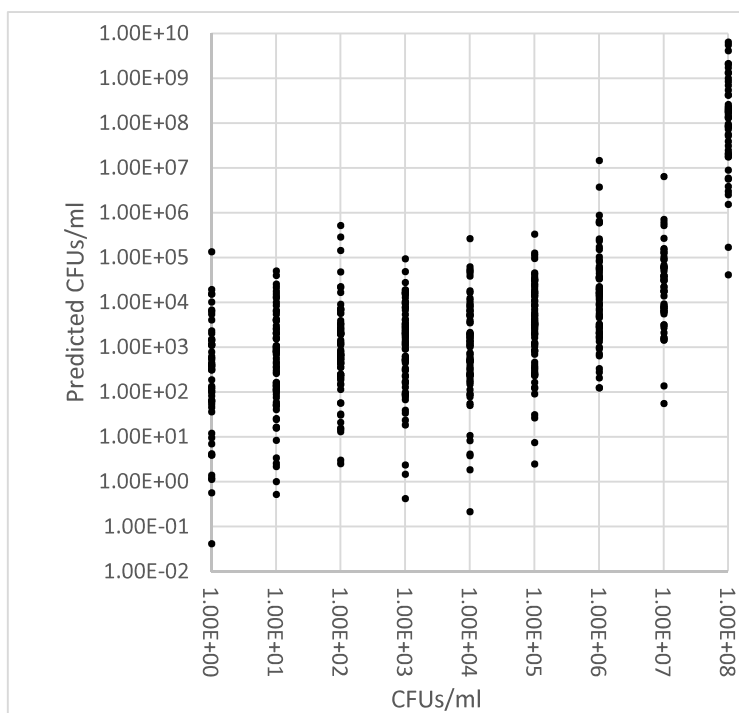
- הגדלת אוסף הסריקות מ-150 ל-250.
- זמן הקרנת החיידקים בלייזר בטווח שבין 0.5 שניות ל-300 שניות
- הפעלת עקת קור (על ידי ביצוע כל תהליך הכנת הדוגמה ב-4 מע"צ). עקה זו אמורה לגרום לייצור מוגבר של חומרים בעלי התמרת ראמאן [20]
- עוצמת הלייזר (בטווח שבין 70mW ל-525mW)
- הרחפת החיידקים בתמיסת מלח (0.9% NaCl) לעומת מים מזוקקים.
- ייבוש על גבי משטחי זכוכית ואלומיניום לפני הסריקה
- 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 7 וטבלה 2 והוא בעל סף רגישות לחיידקי *E. coli* בריכוז 10^8 CFUs/ml ברמת דיוק של 86%.

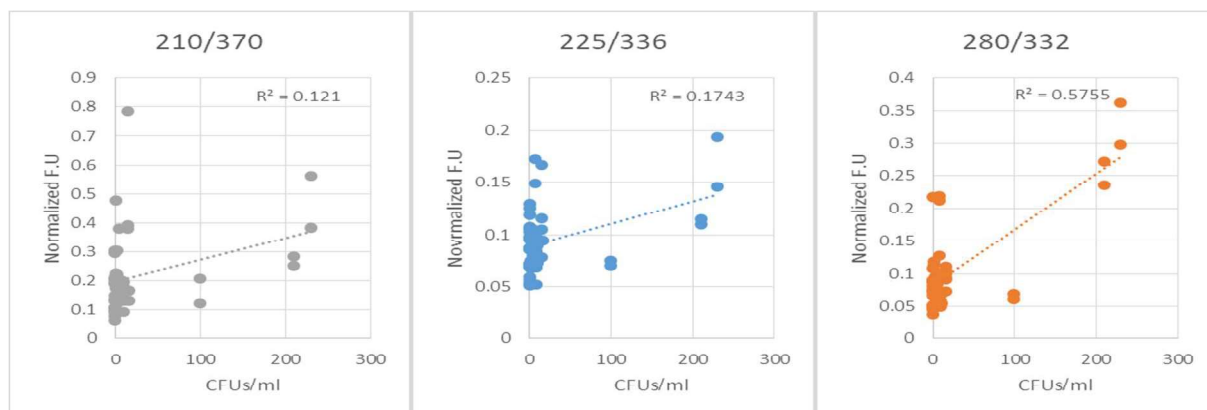
טבלה 2 - הצלחת מודל PLS בחיזוי על בסיס סריקות ראמאן לאחר אופטימיזציה				
CFU/ml	n	Hits	Hit%	
0E+00	11	3	27%	
1E+00	5	0	0%	
1E+01	14	2	14%	
1E+02	18	8	44%	
1E+03	20	10	50%	
1E+04	17	10	59%	
1E+05	15	3	20%	
1E+06	15	1	7%	
1E+07	11	0	0%	
1E+08	7	6	86%	
Total	133	43	32%	



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

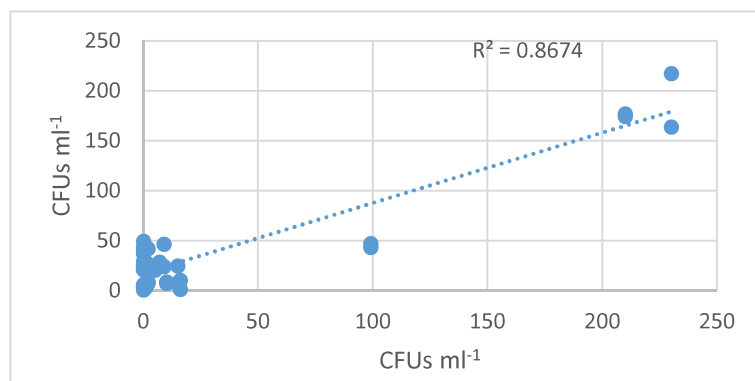
בחלק זה של העבודה נסרקו דוגמאות מי תהום מקידוחים בצפון הארץ ע"י מכשיר פלורסנציה ונלקחו מטריצות פליטה/עירור בטווח 200-400nm. בעקבות עבודות קודמות התמקדנו בעיקר בניתוח הנתונים באורכי גל פליטה/עירור 210/370, 225/336 ו-280/332. לא נמצאה התאמה בין עוצמת הפליטה באורכי הגל הנ"ל לריכוז החיידקים ולכן נראה שלא ניתן למצוא קשר מובהק בין ריכוז החיידקים בדוגמה לאורך גל עירור/פליטה יחיד (איור 8).



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, נראה שיש אפשרות ששילוב של מספר משתנים יוביל ליכולת כימות חיידקים טובה יותר. לשם כך נבחנו הנתונים באמצעות מודל מבוסס PLS. הצלחת המודל ('hit') הוגדרה לפי חלוקה לקבוצה הנכונה בערכים גבוהים או נמוכים מ-100. כפי שניתן לראות באיור 9 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 Scaling, 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.