

תכנית עבודת גמר מוגשת לאישור

תאריך הגשה : 17/8/2017

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* [1]. מדי שנה, כ-90,000 בני אדם נפגעים מזיהום מיקרוביולוגי של מי שתיה בארה"ב בלבד [2]. מקורם של הפתוגנים יכול להיות בזיהום במקורות המים, בצנרות ההובלה, בברזים ביתיים ומוסדיים ובבעיות סניטציה בעיבוד ואריזת מים בבקבוקים. ריבוי נקודות הסכנה מהווה קושי גדול בזיהוי הסיכונים וטיפול נכון בזיהומי מים.

מכוני טיהור המים משתמשים בשיטות מגוונות על מנת למנוע זיהומים מיקרוביאליים במי השתייה. המים המגיעים למכון טיהור עוברים סינון ברמות שונות, סניטציה כימית (בעזרת כלור או אוזון) ולפעמים אף אולטרה-פילטציה בשיטות של אוסמוזה הפוכה. בהמשך שרשרת אספקת המים, ישנם מכוני טיהור מקומיים ואף יחידות טיהור במפעלים ומוסדות גדולים (כמו בתי חולים). שם חוזרים על תהליכי הסינון ולעיתים משתמשים בשיטות פיזיקליות כמו הקרנה ב-UV. ברמה הביתית ישנה עלייה בשימוש במתקני מים ("בר מים") שבהם סננים מיקרוניים, סנן פחם פעיל ומערכת חיטוי בעזרת UV. בתעשייה המים בבקבוקים ישנה גם מערכת מניעתית ומבקרת דומה. למרות כל מאמצי החיטוי, לעיתים מגיעים חיידקים פתוגניים אל הצרכן. במקרים כאלה, נאלצת הרשות המקומית לסגור את אספקת המים ולספק מים ממקור אחר עד לפתרון הבעיה. במקרים מסוימים אף ממליצים לצרכן על הרתחת המים לפני השתייה, כאמצעי לקטילת החיידקים, עד לפתרון הבעיה [3-6].

למרות הפעילות המניעתית הרבה שצוינה, קיים צורך מתמיד בניטור מי שתייה מבחינה מיקרוביולוגית. זיהוי וטיפול בזיהום בזמן יכול למנוע את הגעתם של פתוגנים למי שתייה, לחסוך למשק כסף רב וכמובן להקטין את הפגיעה הבריאותית באדם. 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. הקושי הנוצר מבדיקות מרובות אלה הוא הזמן הארוך הדרוש לבדיקות המיקרוביאליות אשר גורם לכך שבפועל מים מזוהמים מגיעים לצרכן הקצה. יתרה מזאת, רוב הבדיקות המתבצעות אינן ספציפיות אלא בודקות נוכחות של קוליפורמים המהווים אינדיקטור כללי בלבד ולא יכולות לזהות נוכחות של פתוגנים ספציפיים כמו *Legionella* ו-*Campylobacter*. בדיקה מקובלת נוספת היא בדיקת עומס מיקרוביולוגי, בדיקה זו גם היא אינה ספציפית ומהווה אינדיקטור של כמות החיידקים הכללית במים מבלי להבחין בין פתוגנים לחיידקים שאינם מזיקים [7].

השיטות המקובלות במעבדות מיקרוביולוגיות כוללות בעיקר זריעות על גבי מצעים סלקטיביים, גידול בתנאים אופטימליים וספירת מושבות או עכירות [8]. מדד ספירת המושבות מהווה אינדיקציה לכמות החיידקים ונמדד בכמות מושבות חיידקיות הגדלות על צלחת אגר ומנומל

לערכים של colony forming units per ml או בקיצור CFU/ml. הבעיה בשיטות אלה היא ששלב הגידול לוקח זמן רב, בין 12 שעות לשבוע, דבר המעכב את הבדיקה כולה ויוצר עומס על המערכת. שיטות מבוססות עכירות ללא גידול הן גסות מאוד, יעילות רק במצבים חריגים ביותר ("מים עכורים", רגישות החל מ- $10^7$  CFUs/ml) ואינן ספציפיות. חסרונות אלה מהווים כיום את אחד האתגרים הגדולים בתעשיית המים והמזון, וגורמים לסיכון בריאות הציבור [9, 1]. חסרון נוסף של השיטות הנ"ל הוא שהן דורשות צוות גדול של אנשי מקצוע מוסמכים לביצוע הבדיקות וכמות גדולה של חומרי גלם (מצעי גידול, צלחות פטרי, טיפים וכו'). גורמים אלה משפיעים מאוד על עלות הבדיקות [7]. נוסף על כך, הבדיקות מבוצעות על מרחב דגימה קטן – 1-0.1 ליטר מתוך אלפי ומאות אלפי ליטרים שמוזרמים במערכת. הבדיקות נעשות באופן תקופתי ורוב המים לא נבדקים. כיוון שזיהומי חיידקים (ובמיוחד פתוגנים) הם תופעה בלתי צפויה, המופיעה באופן ספוראדי [10], 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 הדיגום הקיימת [7].

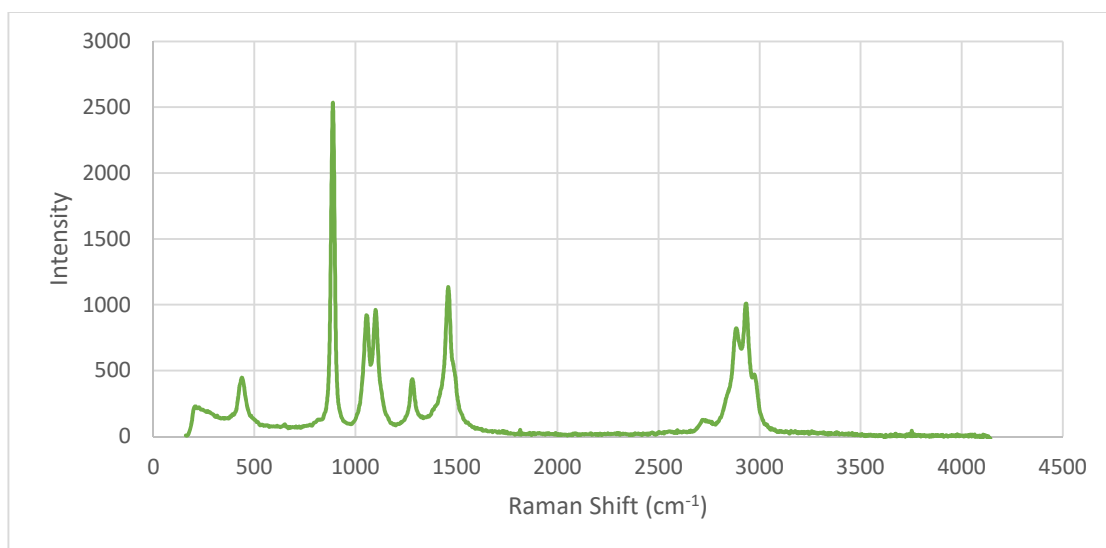
קיימות כיום מספר שיטות מתקדמות לזיהוי וכימות חיידקים במים. ישנן שיטות מולקולריות שונות, המתבססות על הגברת רצפי DNA חיידקי (PCR) והשוואתם למסדי נתונים ידועים, או זיהוי בעזרת היברידיזציה [7]. יתרון של שיטות אלה הוא היכולת לזהות באופן ספציפי פתוגנים בקלות. אולם בדיקות אלה דורשות עבודה ידנית מרובה והן אורכות זמן רב (מספר ימים לרוב) [11]. השלב הדורש את הזמן הרב ביותר הוא שלב ההעשרה הנדרש ברוב השיטות הקיימות, בשל הרגישות הנמוכה יחסית של שיטות אלה. [12]. 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. גישה אחרת לזיהוי חיידקים כוללת את השימוש בשיטות ספקטרוסקופיות שונות. שיטה אחת מבוססת על שימוש בספקטרומטר מסות (MS). אחת הגרסאות המוכרות לגישה זו היא שיטת MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) המשתמשת ביינון עוצמתי של מושבת חיידקים ובחינת תוצרי היינון ב-MS. יתרונה הגדול של השיטה הוא היכולת לזיהוי כמעט מיידי של החיידקים, בדיוק גבוה ובצורך קטן יותר של עובדים מקצועיים, שכן המכשיר יחסית פשוט לשימוש. אך השיטה דורשת זמן ארוך לקבלת מושבות חיידקים ובעיקר יקרה מאוד. יתרה מזו, השיטה אינה מתאימה לכימות החיידקים אלא רק לזיהוי. 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 מבוססות ראמאן ופלאורסנציה לזיהוי וכימות חיידקים במים הן לשתייה והן לשימוש אחר בתעשיות המזון.

## ספקטרוסקופיית ראמאן

### הרקע המדעי

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 שתוארה לראשונה ע"י C.V Raman, שזכה על כך בפרס נובל בשנת 1930 [13]. כפי שתיאר ראמאן, 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) [14]. ההתמרה היא שונה בין חומר לחומר באורכי גל שונים, כך שלכל חומר ישנה "טביעת אצבע" של התמרה [14, 15]. חשוב לציין שההתמרה תלויה מאוד בתכונה פיסיקאלית של החומר – "גמישות" ענן האלקטרונים (Polarizability). זאת מכיוון שהאנרגיה עוברת דרך ענן אלקטרונים, ובמקרה שענן האלקטרונים אינו גמיש (Low Polarizability) הפוטון לא יוכל להעביר אליו את האנרגיה והאור יוחזר ללא התמרה [14]. חשוב לציין שלמולקולות מים  $H_2O$ , ישנו ענן אלקטרונים בעל גמישות נמוכה ולכן מים מהווים רקע מצוין לבדיקת בשיטת ספקטרוסקופיית ראמאן כי הם בעלי קריאת רקע חלשה מאוד [16].

בספקטרוסקופיית ראמאן ההתמרה נמדדת באמצעות גלאי הקולט את אורכי הגל של האור לאחר המעבר דרך החומר הנבדק (לדוגמה, תא חיידקי) וממיר אותו לאות דיגיטלי למחשב [15]. הספקטרום הדיגיטאלי, למעשה, מציג את כמות הפוטונים שנקלטו בכל אורך גל, כאשר הגלאי "חותך" את כל אורכי הגל הקצרים מאורך גל של הלייזר (ישנן התמרות מסוגים אחרים בהן אורך הגל מתקצר). כך למעשה מתקבלת קריאה אך ורק של הפוטונים אשר עברו התמרה מסוג ראמאן והחלוקה של הפוטונים בין אורכי הגל היא הספקטרום (תמונה 1). אורך הגל מוצג לעיתים כאורך הגל האבסולוטי, בערכים של ננומטר (nm) אך לרוב הוא מוצג ברמת ההתמרה מאורך הגל של הלייזר, בערכים של  $cm^{-1}$ .



תמונה 1 טביעת אצבע ספקטראלית של אתנול

בשיטה זו אין צורך בשלב העשרת החיידקים, דבר המאפשר זיהוי של מגוון רחב יותר של חיידקים בזמן קצר באופן משמעותי. בנוסף, כיוון שאין צורך בהעשרת המצע - ניתן לבצע את הבדיקה באופן ישיר (In Situ). כך ניתן לחסוך תהליכים רבים אשר מעלים את הסיכון לזיהום חיצוני, מאריכים ומייקרים את התהליך. יתרון נוסף של השיטה היא יכולת הבחנה וזיהוי גם כאשר החיידקים נמצאים במצעים מורכבים כמו מזון, נוזלי גוף ודגימות קרקע [16, 17].

מחקרים קודמים מראים כי ניתן להבחין בין חיידקים שונים בהתאם לספקטרום הראמאן שלהם [18, 19]. הבדלים אלה נובעים מההרכב הכימי של התא החיידקי (הן של החלל הציטופלסמטי, של הממברנה והדופן ואף של סביבת החיידק אליה הוא מפריש חומרים) ובעיקר מנוכחות של טבעות ארומטיות וסוכרים שונים, שהם בעלי Polarizability גבוהה. הספקטרום הוא למעשה התמרת הראמאן המשולבת של כל המרכיבים הכימיים של החיידק, כולל היחס הכמותי ביניהם. נמצא שהספקטרום הינו ספציפי לכל זן חיידקי, אך נדרש למצוא בדיוק באילו אורכי גל ואילו עוצמות התמרה נמצא ההבדל המבחין בין החיידקים השונים. בעבודות של Zeiri ושותפיו [18, 19] הראו החוקרים שהמולקולות הנראות בראמאן בחיידקים הן בעיקר צורונים של DNA, הכוללים אדנין ואף פלבין-אדנין (FDA). החוקרים מצאו שניתן בנוסף להבחין בקשרי זרחן וקשרים קרבווקסיליים. בעבודה אחרת של Premasiri ושותפיו מ-2017 [20] הראו החוקרים שוב כי האות המתקבל מקריאת ראמאן של חיידקים מתבסס על צורונים שונים של DNA ובעיקר אדנין וגואנין. ישנה גם קורלציה מסוימת בין עוצמת ההתמרה לכמות החיידקים, לפי חוק Beer-lambert [21], שכן ככל שריכוז החיידקים גבוה יותר כך כמות הפוטונים המותמרים עולה. יכולות אלה של השיטה הוצעו כפתרון לבעיית זיהוי וכימות החיידקים בתעשיית המים, המזון והבריאות. כדי לנצל את השיטה לזיהוי וכימות החיידקים נדרשת עבודה מקיפה ליצירת מאגר נתונים אמין שבו נותחו מספר רב של דוגמאות חיידקים [16]. לאחר בניית מאגר נתונים אמין ומגוון ניתן לבנות מודל סטטיסטי לזיהוי מהיר של החיידקים לפי ספקטרום הראמאן שלהם. פתרון כזה יענה על דרישות התעשייה כיוון שהוא מהיר, מדויק, בעל יכולת זיהוי וכימות של חיידקים וגם זול באופן יחסי. יתרון נוסף הוא שלאחר עבודה ראשונית מעמיקה ויצירת מאגר הנתונים, אין צורך בעבודה ידנית מרובה ומורכבת (או בעובדים מוסמכים) וזיהוי וכימות החיידקים יכול להתבצע באופן אוטומטי ורציף, ללא מגע אדם [16, 17].

#### זיהוי מהיר של חיידקים בספקטרוסקופיית ראמאן

בשנים האחרונות התבצע מחקר רב בתחום הזיהוי המהיר של חיידקים בספקטרוסקופיית ראמאן, זאת בעקבות היתרונות הרבים שצינו. המחקרים התמקדו בהיבטים שונים של השימוש בטכנולוגיה, החל בזיהוי מהיר של חיידקים בבתי חולים, דרך הבחנה אנליטית בין סרוטיפים ותת-זנים של חיידקים, בדגימה למחקר ועד זיהוי של חיידקים בדגימות מזון לצרכי תעשייה [16, 22, 23]. מחקרים אחרים, התמקדו במהירות יכולת הדגימה, עבודה in-situ, יכולת כימות החיידקים ואף בתקפות הרגולטורית של הבדיקות לתקני ISO (שהם תנאי אבטחת איכות ורגולציה סטנדרטיים בתעשיית המים והמזון).

כבר בשנת 1995, הציעו Fehrman [24] ושותפיו גישה לשימוש בספקטרוסקופיית ראמאן לזיהוי חיידקים ממחלקת ה-*Clostridia* (ביניהם מספר פתוגנים ידועים) בחלב משוחזר. החוקרים הראו

לראשונה כי הם מצליחים להבחין בין מיני זני החיידקים השונים ע"י גידול החיידקים בחלב וסריקת החיידקים בספקטרוסקופ ראמאן תחת מיקרוסקופ, כך שהלייזר מכווון על תא חיידקי יחיד. הניסוי היה ראשוני מאוד, והוא נחשב לאחת מהוכחות ה-Proof of Concept של טכנולוגיית הראמאן לזיהוי חיידקים. חסרונותיו של ניסוי זה הם שהחוקרים לא השתמשו בכמות דגימות גדולה ( $n=30$ ) ומגוונת אלא בסריקות בודדות לביצוע האנליזה, דבר המעיב על חוסן (Robustness) הבדיקה.

בניסוי אחר בשנת 2000, Maquelin [25] ושותפיו הראו יכולת זיהוי ראשונה של חיידקים פתוגנים כמו *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, וזאת אחרי 6 שעות גידול על צלחות פטרי, כאשר כיום בתעשייה, נדרש לחכות כ-24 שעות לגדילת חיידקים אלו [9]. החוקרים גידלו את החיידקים בתנאים אופטימליים עד להגעה לביומסה מינימלית (Micro-colonies), ולאחר מכן העבירו את המושבות למשטחי  $\text{CaF}_2$ , אותם סרקו בעזרת מיקרוסקופ המחובר לספקטרומטר ראמאן. הספקטרום הנמדד הופק מלייזר באורך גל 830nm. החוקרים הראו יכולת גילוי ואבחנה בין החיידקים, והיו הראשונים שהראו יכולת זיהוי מגוונת, על משטח מוצק. חוקרים אלה השתמשו במודל מתמטי מבוסס Partial Least Squares (PLS) על מנת לעבד את מאגר הנתונים הראשוני שלהם. אף על פי שעבודה זו הייתה חדשנית וחשובה, היא עדיין לוקה בחסר. הבדיקה עדיין מסתמכת על חיידקים מתורבתים, הגדלים על מצע בדומה לבדיקות בקטריולוגיות אחרות, והיא אינה מתייחסת למצב בו ריכוז החיידקים הוא נמוך או שאין חיידקים.

#### שימוש בספקטרוסקופיית ראמאן בתעשיית המזון

במחקר של Meisel ושותפיו מ-2012 [26], הצליחו החוקרים להבחין בחיידקי *Brucella* בחלב. במהלך הניסוי בנו החוקרים מאגר מידע של ספקטרום ראמאן של דוגמאות חלב שלהן הוסיפו חיידקים שונים אשר נפוצים בחלב ביניהם זנים של *Brucella*, *Escherichia*, *Yersinia* ועוד. את הסריקות ביצעו החוקרים בעזרת לייזר באורך גל של 532nm ובזמן חשיפה 20 שניות. בנוסף, נעזרו החוקרים במיקרוסקופ כדי למקד את אלומת הלייזר ולסרוק רק את החיידקים עצמם. לאחר שביצעו סדרת לימוד-מכונה וסרקו מעל 2,000 ספקטרומים ידועים, בנו החוקרים תוכנה שמצליחה להבחין בחיידקי *Brucella* בדגימת חלב במעל 95%. החוקרים בניסוי זה אמנם גידלו את החיידקים בחלב, אך בהכנת הדוגמה ניקו את החיידקים מהחלב וזיהו אותם במים. חשוב לציין כי אחד הקשיים בעבודה זו הוא בזיהוי החיידקים בחלב, הנחשב מדיום אטום למעבר אור, אם כי קיימים תקדימים לבדיקות ספקטראליות דרכו [27].

במחקר אחר, בדקו אותם החוקרים [28] את האפשרות לזהות חיידקים בדוגמאות בשר. הקושי המרכזי בבחינת חיידקים בבשר בשיטות פיזיקאליות הוא במורכבות המדיום. למרות זאת, הצליחו החוקרים לזהות בבשר חיידקי *Escherichia coli*, *Listeria*, *Salmonella* ואחרים, בסגוליות (ספציפיות) גבוהה מאוד (85-100% לכל סוגי החיידקים מלבד *Yersinia*). גם כאן השתמשו בסדרת לימוד-מכונה אשר הפרידה את החיידקים, ראשית לפי סיווגם לגרם שלילי וחיובי, בהמשך להפרדה בין סוגים (genera) ולבסוף להבחנה ברמת המין (species). החוקרים מצאו שפירוק הניתוח לשלבים שיפר באופן משמעותי את יכולת ההבחנה.

בשני המחקרים הנ"ל החוקרים השתמשו באנליזה סטטיסטית מבוססת על Support Vector Machine (SVM), ככל הנראה מכיוון שבדוגמאות שמקורן בבשר וחלב ישנה התנהגות לא-ליניארית של הספקטרום ביחס לזהות החיידקים. חולשתם של המחקרים היא בכך שהחוקרים הצליחו להבחין בחיידקים, רק בכמויות יחסית גבוהות, בהן ניתן כבר לומר שהבשר והחלב אינם ראויים לצריכה. בנוסף, בשני המחקרים הנ"ל לא בחנו החוקרים מקרים של אילוח משולב, כפי שקיים בתעשייה, בו עלולים להיות מספר חיידקים פתוגניים באותה הדגימה. אך עבודות אלה משמשות כ-Proof of Concept ראשוני ליכולת השיטה לאפשר זיהוי חיידקים בתעשיית המזון כאשר נדרש מחקר נוסף לשיפור הרגישות.

Wang ושותפיו [29] הראו בשנת 2015 כי יכולת האבחנה שלהם בחיידקי מזון גבוהה מאוד, והם מסוגלים להבחין בין מינים שונים של *Listeria* מדוגמאות חלב. גם במחקר זה השתמשו החוקרים במיקרוסקופיה, אך לפיהם מיקרוסקופיה קונפוקאלית מאפשרת זיהוי ברזולוציה גבוהה יותר, ולכן מאפשרת זיהוי מדויק יותר (ספציפיות) ומקטינה את הצורך בשלבי ניקיון הדוגמה. החוקרים הראו שהם משפרים את המודל כאשר הם "מאמנים" אותו על שילוב של דוגמאות שמקורן במצע גידול מעבדתי (Brain Heart Infusion BHI, Luria-Bertani LB) או בחלב. "אימון" המודל על דוגמאות מגוונות אפשר לחוקרים זיהוי בסגוליות טובה יותר מכיוון שהמודל המשופר מצליח להתעלם מגורמים סביבתיים ושינויים פיזיולוגיים וביוכימיים של החיידק (גודל וצורת התא לדוגמה, הקשורים למצע הגידול) ובכך להתמקד בתכונות קבועות של החיידקים שאינן תלויות בתנאי הסביבה. גם חוקרים אלה, בסופו של דבר, ביצעו את הבדיקה רק בריכוזים גבוהים מאוד של חיידקים ( $10^8$  CFUs/ml) והשתמשו לבדיקה במים מזוקקים.

במחקר אחר שהתמקד בחלב, הצליחו Nicolaou ושותפיו [21] להראות התפתחות של חיידקי *Staphylococcus aureus* ו-*Lactococcus lactis* בחלב. החוקרים לקחו דגימות של חלב מאולח, שטפו אותן במים מזוקקים ובחנו אותן במיקרוסקופ. בחלק מן הניסויים החוקרים השתמשו בטכנולוגיה דומה לספקטרוסקופיית ראמאן המכונה Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. החוקרים הצליחו להבחין בחיידקים החל מסדר גודל של  $10^5$  CFUs/ml וליצור מודל חיזוי מבוסס PLS המתאים לטווח שבין  $10^5$ - $10^8$  CFUs/ml. בהמשך, החוקרים בחנו את מודל החיזוי שלהם במקרים של אילוח-משולח של שני מיני חיידקים והצליחו לזהות את שניהם בדוגמה יחידה. עבודה זו היא פורצת דרך, בתחום זה, מכיוון שהיא מצביעה על כך שלכל מין חיידקי ישנה טביעת אצבע ספקטראלית שאינה אובדת ב"רעש" של מערכות משולבות. חסרונותיה של עבודה זו הם בכך שהחוקרים לא יכלו לזהות ריכוזים הנמוכים מ- $10^5$  CFUs/ml. בנוסף, החוקרים נאלצו להשתמש הן בספקטרוסקופיית ראמאן ובספקטרוסקופיה מבוססת FTIR, אשר עלויות ההפעלה שלה גבוהות יותר. חשוב להוסיף כי החוקרים אינם יודעים בדיוק אילו חומרים גורמים לטביעת האצבע הספקטראלית, ככל הנראה מכיוון שבחיידקים ישנה תערובת מגוונת מאוד של חומרים שלכולם התמרות ראמאן שונות, אך אופייניות לשילוב הספציפי.



## שימוש ב-SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) לשיפור יכולת הזיהוי

Sundaram [30] ושותפיו התמקדו ביכולת האבחנה בין סוגי חיידקים שונים. במחקר מ-2013 הצליחו החוקרים להבחין בין סרוטיפים שונים של סלמונלה בעלי משמעות קלינית. סרוטיפים הם זנים שונים של המין הנבדלים זה מזה במבנה האנטיגני שלהם המזוהה ע"י מערכת החיסון. רמת אבחנה זו היא גבוהה מאוד, שכן לחיידקים מסוג סלמונלה לדוגמה אנו מכירים 2 מינים (species) המתחלקים למעל 2,500 סרוטיפים [31]. במחקר הצליחו החוקרים לאפיין בספקטרום שיאים (picks) מסוימים לחיידקים משני הסרוטיפים שנבדקו, ולקשר ביניהם לבין שינויים בהרכב החלבוני של החיידקים. כך לדוגמה, הראו החוקרים ששיא של המרת ראמאן  $730 \text{ cm}^{-1}$  הוא חזק ואופייני לשני מיני החיידקים, עובדה זו יכולה לעזור באבחנה ראשונית. אך פיק של המרת ראמאן  $658 \text{ cm}^{-1}$  הוא אופייני לחיידקי *Salmonella Enteritidis* בלבד. החוקרים קישרו פיק זה לריכוז גבוה יותר של טבעות ארומטיות מחומצת האמינו טירוזין, כפי שתואר כבר בעבר ע"י Zeiri et al ב-2005 [19].

במחקר של Sundaram ושותפיו [32] נעזרו החוקרים בטכנולוגיה יחסית חדשה 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 האות של התמרת הראמאן, זאת בעקבות תופעה המכונה Surface Plasmon Resonance. השימוש ב-SERS מאפשר זיהוי כימי בריכוזים הנמוכים פי  $10^{6-10}$  מיכולת הזיהוי בסריקה רגילה, וכך מסבירים החוקרים את יכולתם לזהות את ההבדלים המזעריים בין החיידקים. החוקרים השתמשו בחיידקים בריכוז גבוה מתרבות לאחר הדגרה של 24 שעות.

מחקר זה מראה את הפוטנציאל הגדול ביכולת ההבחנה של שיטת ה-SERS. חשוב לציין כי החוקרים השתמשו בדוגמאות חיידקים בריכוז גבוה, והשתמשו במיקרוסקופ קונפוקאלי על מנת לאתר את החיידקים לפני הסריקה. תנאים אלה אינם מדמים מצב תעשייתי בו ריכוז החיידקים הוא נמוך ואין גישה למיקרוסקופ קונפוקאלי (ציוד יקר במיוחד) ולכן נדרש מחקר נוסף בנושא.

במחקר אחר של Sundaram ושותפיו מ-2013 [32] מציגים החוקרים שימוש בפלטפורמה אחרת של SERS, המבוססת על זיהוי ספקטרום הראמאן מתוך צלוחיות מצופות כסף. החוקרים הצליחו לזהות בניסוי חיידקים מסוגי *Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria* ו-*Staphylococcus*. החוקרים אמנם בחנו את החיידקים בריכוזים גבוהים (החיידקים נלקחו מתרבויות שגודלו במשך 18 שעות בתנאים אופטימליים) אך הם הצליחו לראות שיפור משמעותי ביכולת הזיהוי בשיטת ה-SERS. גישות המבוססות על SERS תוארו כבר ב-2004 ע"י Jarvis ושותפיו [11, 33, 34] כבעלות יכולת אבחנה גבוהה פי  $10^3-10^8$ , ביחס לעבודות בספקטרוסקופיית ראמאן ישירה, אך ניסויים לגבי יישום SERS לזיהוי חיידקים בוצעו בעיקר בשנים האחרונות.

## אבחנה כמותית ובריכוזים נמוכים

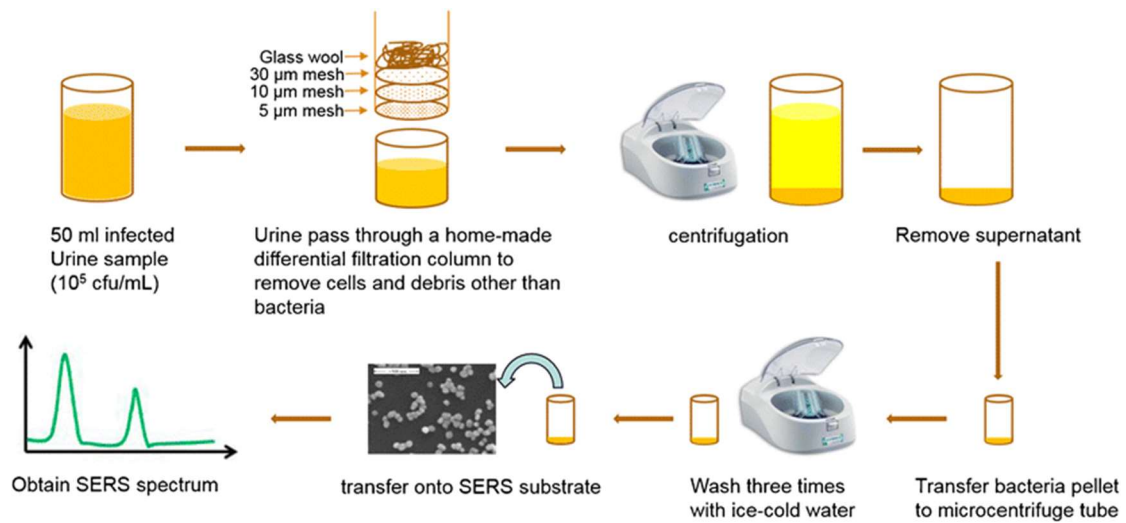
שיטת ה-SERS מתייחסת למעשה לאחד האתגרים הגדולים בזיהוי חיידקים המבוסס על ספקטרוסקופיית ראמאן. מכיוון שהתמרת ראמאן היא יחסית מועטה, כלומר, מעט פוטונים

עוברים התמרה מסוג זה, קשה מאוד להבחין בריכוז נמוך של חיידקים. יחד עם זאת נמצאו מספר תקדימים לזיהוי נוכחות של חיידקים בריכוזים נמוכים. באופן עקרוני, עוצמת האות של ספקטרום הראמאן נמצאת בקורלציה לריכוז החומר הגורם להתמרה, זאת לפי חוק בר-למברט, ולכן עוצמת הספקטרום כולו נמצאת בקורלציה לכמות החיידקים [35]. בעבודות קודמות שהוצגו, סף הזיהוי של המערכת היה לרוב בין  $10^5$ - $10^8$  CFU/ml [12, 24-26, 28, 29]. בעוד שסף זיהוי זה הוא מעניין בפני עצמו, הוא לרוב אינו רלוונטי לזיהוי של חיידקים פתוגנים במי שתייה (חיידקים בודדים למ"ל) [4]. ישנם מספר תקדימים לזיהוי של ריכוזים נמוכים של חיידקים בעזרת SERS, ביניהם עבודה של Zhou ושותפיו שזיהו חיידקי *E. coli* בריכוז  $10^2$  CFUs/ml ואף חיידקים בודדים בדוגמה בנפח  $3 \mu\text{L}$ . עבודה זו היא חדשנית ומשתמשת בטכנולוגיית SERS מבוססת זהב לזיהוי. בעבודה בנו החוקרים חלקיקים מצופים זהב שהוספו לדוגמה, ובכך העצימו את תגובת הראמאן במרחב. כך נוצר אפקט SERS מחוזק ומרחבי שאינו תלוי במשטח הדגימה. בשיטה זו הצליחו החוקרים להבחין בריכוזים של  $10^3$  cells/ml של חיידקי *E. coli* ואף להבחין בין חיידקי *E. coli* מזנים שונים. יתר על כן, כאשר השתמשו בטכנולוגיית החלקיקים על משטח זכוכית, הצליחו החוקרים לזהות חיידקים בודדים. החוקרים הראו שכאשר הם מכינים דוגמה של מים יחד עם החלקיקים המצופים וחיידקים, ומניחים  $3 \mu\text{L}$  מהדוגמה על זכוכית נושאת, הם מסוגלים לסרוק בעזרת מיקרוסקופ המחובר לספקטרומטר ראמאן את שטח הזכוכית, לזהות ולכמת את החיידקים עד רמת התא הבודד. הנחה זו אינה מדויקת שכן החוקרים מזהים רק תאים הנמצאים במצב של שכבה יחידה (monolayer), אך היא נותנת הערכה טובה מאוד לריכוז החיידקים בדוגמה. מחקר זה מראה כי קיים פוטנציאל לזיהוי חיידקים בריכוזים נמוכים מאוד, כאלה הרלוונטיים לתעשיית המים והמזון. חסרונותיה של הטכנולוגיה המוצעת היא בעיקר בעלות הגבוהה של המכשור, ובצורך להכין חלקיקים בכמויות גדולות. החלקיקים הם מצופי זהב ויצירתם דורשת מיומנות מיוחדת בנוסף על מחיר הזהב ועל כן סך כל עלויות ההפקה הן גבוהות מאוד [36].

#### מהירות הבדיקה

בתעשיית המים והמזון וכמובן במערכת הבריאות ישנה חשיבות גדולה מאוד למהירות זיהוי הפתוגנים. בעבודה של Permasiri ושותפיו [20] מ-2017, התמקדו החוקרים בתזמון יכולת העבודה בשיטת ספקטרוסקופיית ראמאן. שיטת הכנת הדוגמה של החוקרים דומה לזאת של כל המחקרים האחרים שהוצגו, ולכן זמן ההכנה המצוין בעבודה זו הוא רלוונטי לכולן. בעבודה הראו החוקרים יכולת אבחנה בין מספר חיידקים הקשורים לדלקות בדרכי השתן, בדוגמאות שתן אמיתיות, לאחר תהליך הכנת דוגמה בסיסי. בתהליך הכנת הדוגמה, ראשית סיננו את השתן סינון גס להסרת משקעים, ולאחר מכן שטפו את החיידקים במים מזוקקים 3 פעמים. החיידקים נלקחו מיד לסריקה על משטח SERS, שם החיידקים עברו ייבוש, נסרקו מספר פעמים ובוצעה סריקה של מספר "אתרים" על משטח ה-SERS. נתוני הסריקה הועברו למחשב ונותחו בעזרת Matlab (MATLAB 2015a, Systematics, Natick, MA, ארה"ב) לפי מודל ספקטראלי לחיזוי המבוסס PLS. החוקרים הראו שכל שלבי הסריקה (כמתואר בתמונה 2), מקבלת דוגמת השתן ועד לזיהוי החיידקים עורך פחות משעה, כאשר הזמן מחולק כדלהלן: עיבוד ראשוני כ-30 דק', שטיפה במים

כ-5 דק', הטענה וייבוש על משטח SERS – כ-5 דק', סריקה בספקטרומטר ראמאן כ-10 דק', זיהוי במחשב כ-1 דק'.



תמונה 2 – תהליך קבלת מידע מדוגמה – מתוך Permasiri et al 2017[20]

#### התאמה לתקנות ורגולציה קיימת

ריבוי העבודות בנושא זיהוי חיידקים בשיטות ספקטרוסקופיית ראמאן הוביל את Witkowska [37] ושותפיה מפולין לנסות ולהתאים את השיטה לתקני ISO לזיהוי חיידקים במזון. החוקרים התמקדו בתקנות ISO המתייחסות לזיהוי של חיידקים ספציפיים מסוגי *Salmonella*, *Listeria* ו-*Cronobacter* בדגים, ביצים, חלב ותבלינים. החוקרים השוו בין השיטות הסטנדרטיות המוכתבות כיום בתעשייה לשיטה מבוססת ספקטרוסקופיית ראמאן והראו שהשיטה מתאימה כחלופה טובה לשיטות הקיימות. היתרון העיקרי של זיהוי בספקטרוסקופיית ראמאן הוא בזמן הזיהוי, המתקצר מכ-144 שעות לכ-24 שעות. בנוסף, החוקרים הראו הצלחה בזיהוי בסגוליות (Specificity) של 98%, דבר המצביע על חוסן (Robustness) הבדיקה. חשוב לציין שהשיטה שהציעו Witkowska ושותפיה עדיין דורשת עבודת מעבדה הכוללת זריעת החיידקים על מצע סלקטיבי והכנת הדוגמה, והיתרון הצנוע שהציעו החוקרים הוא רק בזמן ההדגרה. ייתכן מאוד, לפי מחקרים קודמים, שניתן לצמצם את זמן הבדיקה עוד יותר, לזהות חיידקים נוספים ולחסוך בכוח אדם, הכשרה ושעות עבודה על ידי זיהוי חיידקים בשיטה המבוססת ספקטרוסקופיית ראמאן.

#### ספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה נמוכה

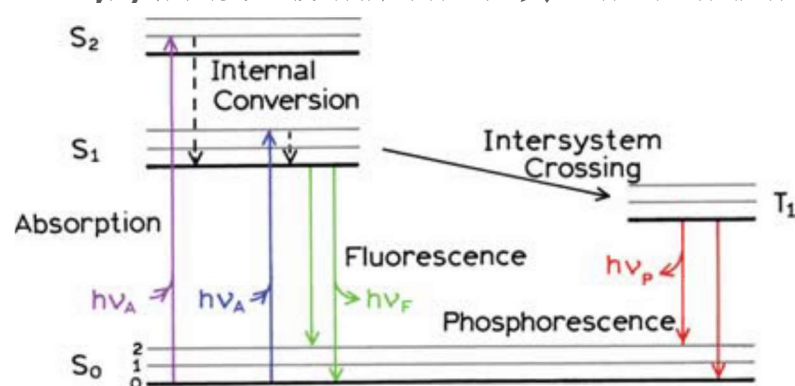
בעוד שרוב העבודות הנעשות בזיהוי חיידקים משתמשות במיקרוסקופיה, SERS או שילוב של השניים, עבודה של Schmilovitch ושותפיו [38] מ-2005 הראתה שניתן לזהות חיידקים בשיטת ספקטרוסקופיית ראמאן, ללא מיקרוסקופ, בעזרת ספקטרומטר בלבד, המצויד במערכת לייזר המשדרת באורך גל 785nm (בדומה למספר עבודות אחרות [29, 30, 32], דרך סיב אופטי אשר בהמשך קולט את הלייזר ומעביר את המידע לחיישן המחובר למחשב. החוקרים הצליחו לזהות ולהבחין בין ריכוזי חיידקים מסוג *Erwinia* ו-*Clavibacter* בנוזל במים בריכוזים של  $10^{10}$ - $10^1$

cells/ml. החוקרים השתמשו בשיטה מבוססת PLS, על מנת לייצר מודל חיזוי לריכוז החיידקים ברמת דיוק סטטיסטית של מעל 90%. עבודה זו מצביעה על היתכנות של זיהוי חיידקים, בשיטות מבוססות ספקטרוסקופיית ראמאן, בריכוזים נמוכים ובעלויות זולות ובכך מציגה אפשרות לפתרון מעשי לבעיית זיהוי החיידקים בתעשיית המזון. עבודה זו מהווה Proof of concept למרות שאינה מתמקדת בפתוגנים הקשורים לתעשיית המים והמזון אלא דווקא בחיידקים צמחיים [38]. עבודות נוספות שנעשו בטכנולוגיה ברזולוציה נמוכה נעשו על ידי Mello ושותפיו ב-2005 [39] לזיהוי חיידקי מעיים וע"י Lin ו-Luo ב-2008 [40] לזיהוי פתוגנים בשיטה משולבת עם SERS.

## פלאורסנציה

### הרקע המדעי

פלאורסנציה 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 [41]



תמונה 3 – תופעת פלורסנציה לפי דיאגרמת Jablonsky. נלקח מתוך Principles of Fluorescence Spectroscopy [41]

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 [42-45].

### שימוש בפלואורסנציה לזיהוי חיידקים במי שתייה

כיוון שבתעשיית המים נדרשת יכולת הערכה מהירה לאיכות טיפול במים (סינון, כלורנציה וכו'), הוצע בעבודתו של Cohen ושותפיו מ-2014 כי בדיקת פלואורסנציה יכולה לשמש להערכת איכות הטיפול במים. בעבודתם בחנו החוקרים את כלל תגובות הפלואורסנציה המתקבלות מהארה באור באורכי הגל שבין 200-800 nm (בקפיצות של 5 nm). מן הנתונים בנו החוקרים מפות תלת ממדיות המתבססות על עוצמת הפלואורסנציה לפי אורך גל העירור ואורך הגל ההארה, אותן כינו (EEM) Excitation/Emission Martix. החוקרים מצאו קשר בין תופעות פלורסנטיות ב-5 "איזורי פלורסנציה" ב-EEMs. אזור אחד כזה, אשר כונה "חלבוני", נראה במפת ה-EEM כאשר עירור באורכי גל 240, 275 < (עקב סטיית מכשירים ייתכן וישנם אורכי גל מעט קטנים מ-240) גרם להארה באורך גל 346 nm. הכינוי "חלבוני" ניתן היות ותגובה זו תוארה כבר בספרות בעבר כקשורה לנוכחות של חומצות אמינו פלורסנטיות טירוזין, טריפטופן ופניל-אלנין [42-46]. החוקרים גם הראו שלאחר טיפול במים להסרת החיידקים (בכלורנציה, סינון ובשיטת בִּוּצָה משפעת – Activated Sludge) עוצמת ההארה יורדת באופן משמעותי, דבר המצביע על איכות הטיפול הביולוגי להסרת מיקרואורגניזמים. בעבודת המשך שנעשתה ע"י Simelane נמצאה קורלציה בין עוצמה ההארה בטווח הנ"ל 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 עד ריכוז של  $10^4$  CFUs/ml [47]. עבודות אלו מראות לנו כי קיים קשר ברור 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 נתונים יכולה לאפשר 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 [38] 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. בנוסף תבחן האפשרות לשימוש במכשיר בספקטרומטר FTIR (מדגם Nicolet iS50 של חברת ThermoFisher Scientific, MA, Tewksbury, ארה"ב). 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 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* (זן 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

חלק זה של העבודה יבוצע במקביל לחלק I. נשתמש בספקטרוסקופיית פלואורסנציה מבוססת עירור-הארה על מנת לאפיין דוגמאות מים 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 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 200-800 nm.

### שלב 1 - בחינת סף הרגישות של המכשיר לחיידקי *E. coli*

כמתואר לגבי ספקטרוסקופיית הראמאן, תיערכנה בדיקות לבחינת יכולת המכשיר לזהות חיידקי *E. coli* בריכוזים נמוכים עד להגעה למינימום הרגישות. 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 מפות ה-EEM בעזרת מודל מבוסס PARAFAC או PLS.

### שלב 2 - בחינת סף הרגישות של המכשיר לחיידקי *B. subtilis*

תיערכנה בדיקות לבחינת יכולת המכשיר לזהות חיידקי *B. subtilis* בריכוזים נמוכים עד להגעה למינימום הרגישות. באופן זה נוכל לפתח מודל לכימות של חיידקים אלה על רקע מים מזוקקים.



בחינה זו תעשה על ידי מיהול וסריקת דוגמאות בריכוזים ידועים וניתוח מפות ה-EEM בעזרת מודל מבוסס PARAFAC או PLS.

### שלב 3 – בחינת יכולת אבחנה סגולית בין חיידקי *E. coli* ו-*B. subtilis*

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

במידה ולא קיים הבדל בין טביעת האצבע הספקטראלית של חיידקים אלה, נשפר את המודל הסטטיסטי לכימות כלל החיידקים בדוגמה, ונייצר למעשה מודל לספירה כללית של חיידקים באמצעות פלואורסנציה.

### 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 ובטיחות 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 התחלה משוער	תאריך סיום משוער	פעולה
11/2016	10/2017	חלק I, שלב 1 - אופטימיזציה של הפלטפורמה ושיטת הכנת הדוגמה לזיהוי חיידקי <i>E. coli</i> בעזרת מכשיר ראמאן.
7/2017	9/2017	חלק II, שלב 1 – בחינת סף הרגישות של ספקטרוסקופיית פלואורסנציה לחיידקי <i>E. coli</i>
10/2017	12/2017	חלק II, שלב 2 – בחינת סף הרגישות של ספקטרוסקופיית פלואורסנציה לחיידקי <i>B. subtilis</i>
10/2017	12/2017	חלק I, שלב 2 - בחינת סף הרגישות של פלטפורמת הראמאן לחיידקי <i>E. coli</i>
10/2017	12/2017	חלק I, שלב 3 - בחינת סף הרגישות של פלטפורמת הראמאן לחיידקי <i>B. subtilis</i>
1/2018	4/2018	חלק I, שלב 4 - בחינת יכולת אבחנה סגולית בין חיידקי <i>E. coli</i> ו- <i>B. subtilis</i> בפלטפורמת ראמאן
1/2018	4/2018	חלק I, שלב 4 - בחינת יכולת אבחנה סגולית בין חיידקי <i>E. coli</i> ו- <i>B. subtilis</i> בספקטרוסקופיית פלואורסנציה
4/2018	7/2018	השוואה בין ספקטרוסקופיות ראמאן ברזולוציה נמוכה לפלואורסנציה לזיהוי וכימות חיידקים במים
06/2018	10/2018	כתיבת דוח העבודה והגשתו.

1. Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E: **Microbial agents associated with waterborne diseases**. *Crit Rev Microbiol* 2002, **28**(4): 371-409.
2. 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.
3. Ashbolt NJ: **Microbial contamination of drinking water and human health from community water systems**. *Curr Environ Health Rep* 2015, **2**(1): 95-106.
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 MR, Laurent P: **Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches**. *J Microbiol Meth* 2002, **49**(1): 31-54.
8. 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.
9. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S: **Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation**. *FEMS Microbiol Rev* 2012, **36**(4): 815-836.
10. Cabral JP: **Water microbiology. Bacterial pathogens and water**. *Int J Environ Res Public Health* 2010, **7**(10): 3657-3703.
11. Jarvis RM, Goodacre R: **Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy**. *Anal Chem* 2004, **76**(1): 40-47.
12. 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: **Optical fingerprinting in bacterial epidemiology: Raman spectroscopy as a real-time typing method**. *J Clin Microbiol* 2009, **47**(3): 652-659.
13. Nobelprize.org: **Sir Chandrasekhara Venkata Raman – biographical**. Nobel Media AB 2014.
14. 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.
15. Kaiser Optical Systems: **Raman spectroscopy - a tutorial**. Retrieved from [kosi.com/na\\_en/products/raman-spectroscopy/raman-technical-resources/raman-tutorial.php](http://kosi.com/na_en/products/raman-spectroscopy/raman-technical-resources/raman-tutorial.php)
16. Stöckel S, Kirchhoff J, Neugebauer U, Röscha P, Popp J: **The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms**. *J Raman Spectrosc* 2015(47): 89-109.
17. 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.

18. 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.
19. Zeiri L, Efrima S: **Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria: the effect of excitation wavelength and chemical modification of the colloidal milieu.** *J Raman Spectrosc* 2005, **36**(6-7): 667-675.
20. 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.
21. Nicolaou N, Xu Y, Goodacre R: **Fourier transform infrared and Raman spectroscopies for the rapid detection, enumeration, and growth interaction of the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* in milk.** *Anal Chem* 2011, **83**(14): 5681-5687.
22. Chen F, Flaherty BR, Cohen CE, Peterson DS, Zhao Y: **Direct detection of malaria infected red blood cells by surface enhanced Raman spectroscopy.** *Nanomedicine* 2016, **12**(6): 1445-1451.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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): 5575-5583.
27. Albanell E, Cáceres P, Caja G, Molina E, Gargouri A: **Determination of fat, protein, and total solids in ovine milk by near-infrared spectroscopy.** *J AOAC Int* 1999, **82**(3): 753-758.
28. Meisel S, Stöckel S, Rösch P, Popp J: **Identification of meat-associated pathogens via Raman microspectroscopy.** *Food Microbiol* 2014, **38**: 36-43.
29. 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.
30. Sundaram J, Park B, Hinton A, Lawrence KC, Kwon Y: **Detection and differentiation of *Salmonella* serotypes using surface enhanced Raman scattering (SERS) technique.** *J Food Meas Charact* 2013, **7**(1): 1-12.
31. Su LH, Chiu CH: ***Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature.** *Chang Gung Med J* 2007, **30**(3): 210-219.
32. 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.

33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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, **86**(3): 1525-1533.
37. Witkowska E, Korsak D, Kowalska A, Książkowska-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.
38. Schmilovitch Z, Mizrach A, Alchanatis V, Kritzman G, Korotic R, Irudayaraj J, Debroy C: **Detection of bacteria with low-resolution Raman spectroscopy.** *Trans ASAE* 2005, **48**(5): 1843-1850.
39. Mello C, Ribeiro D, Novaes F, Poppi RJ: **Rapid differentiation among bacteria that cause gastroenteritis by use of low-resolution Raman spectroscopy and PLS discriminant analysis.** *Anal Bioanal Chem* 2005, **383**(4): 701-706.
40. Luo BS, Lin MIN: **A portable Raman system for the identification of foodborne pathogenic bacteria.** *J Rapid Methods Autom Microbiol* 2008, **16**(3): 238-255.
41. Lakowicz JR: **Introduction to Fluorescence.** In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed.* Edited by Joseph R. Lakowicz, Maryland, USA: Springer; 2006.
42. 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 Res* 2011, **45**(18): 6030-6038.
43. Stedmon C, Markager S, Bro R: **Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy.** *Mar Chem* 2003, **82**(3-4): 239-254.
44. 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 Res* 2009, **43**(12): 3104-3116.
45. Hua B, Dolan F, McGhee C, Clevenger T, Deng B: **Water-source characterization and classification with fluorescence EEM spectroscopy: PARAFAC analysis.** *Int J Environ Anal Chem* 2007, **87**(2): 135-147.
46. Gueguen C, Granskog M, McCullough G, Barber D: **Characterisation of colored dissolved organic matter in Hudson Bay and Hudson Strait using parallel factor analysis.** *J Mar Syst* 2011, **88**(3): 423-433.

47. Simelane KS: **Application of Fluorescence Spectroscopy for Monitoring Microbial Contamination of Drinking Water**. MSc Thesis: Hebrew University of Jerusalem; 2013.
48. Ignat T, Schmilovitch Z, Fofoldi J, Steiner B, Alkalai-Tuvia S: **Non-destructive measurement of ascorbic acid content in bell peppers by VIS-NIR and SWIR spectrometry**. *Postharvest Biol Technol* 2012, **74**(10): 91-99.