גילוי מיקרואורגניזמים במזון באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה לחקלאות, המזון ואיכות הסביבה
של אוניברסיטה העברית בירושלים
לשם קבלת תואר
"מוסמך למדעי החקלאות"

על ידי

רעיה קורוטיק

סיון, תשס"ו רחובות יוני 2006

עבודה זו נעשתה בהדרכת

ד"ר רוני שפירא
המכון לביוכימיה, למדעי המזון והתזונה
הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה
אוניברסיטה העברית בירושלים

ד"ר עמוס מזרח
המכון להנדסה חקלאית
מנהל המחקר החקלאי
מרכז וולקני

תודות

אני רוצה להודות למנחים שלי ד"ר עמוס מזרח, וד"ר רוני שפירא על תרומתם לתזה שלי. הרבה פגישות מועילות, תשומת לב לפרטים, סבלנות ותמיכה, אשר אפשרו לי לסיים את עבודתי.

כמו כן אני מודה לחברי בעבודה ד"ר זאב שמילוביץ וד"ר ויקטור אלחנתי על העזרה והתמיכה המקצועית בעבודתי.

אני מודה לבעלי, גנאדי, ולאימי, ריטה ולחמתי, גלינה, על תמיכתם ועזרה אינסופית.

תוכן עניינים

רשימת איורים 6

רשימת טבלאות.. 7

תקציר 8

רשימת סמלים וקיצורים.. 10

1. מבוא ורקע ספרותי 11

1.1. מיקרואורגניזמים במזון 11

1.1.1. מיקרואורגניזמים בעבודת מחקר זו 11

1.1.1.1. תאור החיידקים מסוג *Erwinia* 12

1.1.1.2. תאור החיידקים מסוג *Clavibacter*.. 12

1.1.1.3. תאור הפטרייה מסוג *Saccharomyces* 13

1.1.2. צורך לגילוי חיידקים במזון.. 14

1.2. שיטות לגילוי וזיהוי מיקרואורגניזמים.. 15

1.2.1. זריעת מיקרואורגניזמים על מצע סלקטיבי 15

1.2.2. שיטות ביוכימיות.. 16

1.2.2.1. קליטת אור הנפלט ממולקולת ATP.. 16

1.2.2.2. קליטת אור נפלט באמצעות Flow cytometry.. 16

1.2.2.3. עכבה חשמלית.. 17

1.2.3. גילוי DNA בעזרת תגובת שרשרת של פולימראז (PCR).. 18

1.2.4. שיטות אימונולוגיות.. 19

1.2.5. שיטות ספקטראליות 20

2. מטרות העבודה.. 24

3. חומרים ושיטות 25

3.1. חומרים 25

3.1.1. כתובות של יצרני מכשור.. 25

3.1.2. מיקרואורגניזמים.. 25

3.1.3. מצעי גידול 25

3.2. מערך ספקטרוסקופית ראמאן.. 26

3.2.1. מערך המדידה של תמיסה בבקבוק.. 27

3.2.2. מערך המדידה של תמיסה על משטח זכוכית.. 27
3.3. הכנת עקומת גידול 28
3.4. הכנת דגימות תרחיף 28
3.4.1. מיהול תרחיף עם חיידקים 29
3.4.2. מיהול תרחיף עם שמרים... 30
3.5. שיטות סטטיסטיות 31
4. מהלך העבודה 32
4.1. הליך מדידת ספקטרום ראמאן 32
4.2. אנליזה ספקטרלית של הנתונים.. 32
5. תוצאות העבודה 34
5.1. גילוי מיקרואורגניזמים בתרחיף 34
5.1.1. ספקטרום אופייני.. 34
5.1.2. חיזוי ריכוז של פתוגנים.. 35
5.1.3. גילוי נוכחות הפתוגנים 39
5.2. גילוי חיידקים על משטח 43
5.3. גילוי שמרים בתוך מיץ תפוחים על משטח.. 44
6. דיון.. 47
6.1. גילוי וזיהוי חיידקים בתרחיף 48
6.2. גילוי חיידקים בתרחיף מים מלוחים על משטח 49
6.3. גילוי שמרים בתרחיף מיץ תפוחים על משטח 49
7. המלצות 51
8. רשימת מקורות.. 52
נספח 1 57
נספח 2 61

רשימת איורים

איור 1: השחרת תפוח אדמה..12
איור 2: התרככות השורש של בצל...12
איור 3: צילום של עגבניות פגועות ב- *Clavibacter michiganense*.....................13
איור 4: *Saccharomyces cerevisiae* - שמר האפייה..13
איור 5: תיאור שיטת PCR 18
איור 6: ספקטרום ראמאן מקליפת תפוח עץ מאולח עם *E. coli*.........................22
איור 7: מערך לניסויים בספקטרוסקופית ראמאן...26
איור 8: מערכת הניסוי עם דגימה נוזלית על פני משטח זכוכית.........................27
איור 9: כוונון המוקד של קרן הלייזר...28
איור 10: ריכוזי תמיסות של חיידקים מסוג *ECC* ו- *CBM*...................................30
איור 11: תיאור ההליך מחיקת נתונים חורגים עבור *CBM* בטווח ריכוזים רחב.......33
איור 12: ספקטרום ראמאן אופייני...34
איור 13: מדידה של *ECC* בתמיסה בריכוזים מ- 0.0 עד 1.0..................................36
איור 14: מדידה של *ECC* בתמיסה בריכוזים מ- 0.0 עד 0.1..................................37
איור 15: מקדם רגרסיה של PLS לספקטרום בסיסי של *CBM*
בריכוזים מ- 0.0 עד 0.1..38
איור 16: מקדם רגרסיה של PLS לספקטרום בסיסי של *ECC*
בריכוזים מ- 0.0 עד 0.1..38

רשימת טבלאות

טבלה 1: DNA פרימרים המשמשים לזיהוי פתוגנים במזון בעזרת PCR................19
טבלה 2: מיקום הקשרים הכימיים בספקטרום ראמאן על פני קליפת
תפוח עץ מאולח ב- E. coli (כולל O 157:H7)....................................23
טבלה 3: שגיאת חיזוי סטנדרטית (SEP) ומספר פקטורים של רגרסית PLS
של ספקטרום בסיסי וספקטרום מעובד..35
טבלה 4: אנליזת מיון של דגימות ללא ועם חיידקים בתמיסה
באמצעות נגזרת ראשונה של ספקטרום בסיסי עם 9 משתני PLS.........40
טבלה 5: אנליזת מיון של *CBM* ו-*ECC* בטווחי ריכוז
בין 0.01 עד 0.30 40
טבלה 6: אנליזת מיון של *CBM* ו- *ECC* בטווחי ריכוז
בין 0.01 עד 0.10 41
טבלה 7: אנליזת מיון בטווחי ריכוז בין 10^2 עד 10^6 CFU למ"ל..........................42
טבלה 8: אנליזת מיון של דגימות ללא ועם חיידקים מסוג
ECC ו- *CBM* באמצעות הנגזרת הראשונה של הספקטרום הבסיסי 43
טבלה 9: אנליזת מיון של CBM ו- ECC בטווחי ריכוז
בין 10^0 – 10^3 CFU למ"ל 44
טבלה 10: אנליזת מיון של דגימות מיץ תפוחים צלול ומיץ מאולח
בשמרים באמצעות הנגזרת הראשונה של הספקטרום הבסיסי...........45
טבלה 11: אנליזת מיון של מיץ תפוחים מאולח
בריכוזים שונים של שמרים...45

תקציר

מזון הינו מצע אידיאלי להתפתחות מיקרואורגניזמים, חלקם מועיל ליצירת מוצרי מזון, כמו *Lactobacillus bulgaricus* (חיידק מועיל ביצור יוגורט), וחלקם גורמים לקלקול מזון, כמו *Brenneria paradisiaca* (חיידק גורם למחלות בבננות). חיידקים פתוגניים הינם המיקרואורגניזמים המוכרים ביותר, לדוגמא *Salmonella*, חיידק שנקשר רבות עם זיהומי מזון בשל היגיינה לקויה במטבח. לפי נתונים של שירות המזון הארצי ישנם בין כ- 3000 ל- 5000 מקרים לשנה של מחלות המועברות באמצעות מזון, כמו *Campylobacteriosis*, *Salmonellosis*, *Shigellosis* והרעלות של מזון הנגרמות על ידי *Staphylococcus*, *Clostridium* ו-*Bacillus cereus* .

בתקן הישראלי, מוגדרת רמה מקסימאלית של מיקרואורגניזמים במזון ולכן קיימת דרישה לבדיקות סדרתיות בשיטות מדויקות. השיטה לגילוי וזיהוי מיקרואורגניזמים הנפוצה ביותר כיום בתעשיית המזון היא זריעה על מצעים כלליים וסלקטיביים, כמו כן קיימות שיטות חדשניות יחסית Flow cytometry, עכבה חשמלית, בדיקת ביולומינציה (*Adenosine triphosphate*), בדיקות גנטיות ואימונולוגיות. שיטות אלו יקרות ודורשות כוח אדם מיומן. בעבודה זו מתוארות שיטות ספקטראליות מהירות וקלות לשימוש יחסית לשיטות המיקרוביאליות והביוכימיות. מכשירים הפועלים בטכנולוגיה זו ברזולוציה גבוהה יקרים למדי. לאחרונה פותחו מכשירים הפועלים בספקטרוסקופית ראמאן, ברזולוציה נמוכה שמחירם נמוך יחסית. ספקטרוסקופית ראמאן, מבוססת על עבוד ספקטרום אופייני לקשרים כימיים במוצר מזון נבחן. ניתן לבחון את ספקטרום האור החוזר מתוך נוזלים ומעל פני שטח באמצעות חישנים בזמן קצר. שיטת מדידה במכשיר מסוג זה, אשר פותחה במנהל המחקר החקלאי, מציעה להשתמש במכשירים אלו כאמצעי לגילוי מיקרואורגניזמים במזון. שיטה זו הינה מהירה, זולה יחסית, ומדויקת וניתן לבצע את המדידות תוך כדי תהליך הייצור.

מטרת העבודה הינה להעריך את היכולת של ספקטרוסקופית ראמאן לגלות נוכחות של מיקרואורגניזמים במוצרי מזון באמצעות מכשיר ראמאן ברזולוציה נמוכה.

העבודה כללה מספר כווני מחקר: גילוי חיידקים בתרחיף המים, גילוי וזיהוי חיידקים בטיפת תרחיף של מים המצויה על משטח זכוכית, גילוי וזיהוי שמרים בטיפת תרחיף מיץ תפוחים המצויה על משטח זכוכית.

במחקר, לא נמצאו "טביעות אצבע" פשוטות, האמורות להתבטא בשיאים של תדרים של הסטת-ראמאן, ניתוח חיידקים ושמרים בתרחיפים בספקטרום של פיזור ראמאן עם רזולוציה נמוכה ועל כן עובדו התוצאות באנליזה סטטיסטית ספקטראלית. עיבוד של הספקטרומים אשר התקבלו בספקטרוסקופית ראמאן עבור כל ניסוי במערך הניסויים נעשה באמצעות שיטות סטטיסטיות (Partial Least Squares Regression) ואנליזת מיון (Classification analysis). באמצעות שיטות אלו, ניתן היה לקבוע את ריכוז החיידקים והשמרים בתרחיף המים ומיץ תפוחים, בהתאמה. ניתן היה להבדיל בין הסוגים השונים של החיידקים גרם שליליים *Erwinia Cartovora pv. Cartovora* וגרם חיובים *Clavibacter michiganese* בדיוק של עד 100 CFU למ"ל.אפשרות להבדיל בין גרם מינוס לפלוס נובע משוני במעטפת, כלומר ריכוז שונה של קשרים כימיים. השמרים במיץ תפוחים הובחנו עד לריכוז של 1 CFU למ"ל (הדיוק אפשרי גם בבדיקה של ליטר מיץ, אם לשפוך אותו בשכבה מתאימה). מאחר ותסיסה בלתי רצויה הנגרמת על ידי שמרים יכולה לקרות גם בנוכחות תא שמר יחיד, חשוב לגלותו בריכוז נמוך שכזה.

יכולתה של שיטת המדידה והאנליזה בספקטרום ראמאן לזיהוי מיקרואורגניזמים בדיוק גבוה באמצעות מכשיר ברזולוציה נמוכה, זול למדי, מהיר, וקל להפעלה עם אפשרות לישומים on-line, מקרבת אותנו ליישומים עתידיים ומכוונים בתעשייה.

רשימת סמלים וקיצורים

ATP – Adenosine triphosphate

bp - base pair

CBM - *Clavibacter michiganense*

CCD – Charge Coupled Device

CFU – Colony forming units

cm - Centimeter

ECC - *Erwinia Cartovora pv. Cartovora*

ddH_2O – Double distilled water

dH_2O – Distilled water

FACS - Fluorescent Activated Cell Sorter

FTIR – Fourier Transform Infra Red

IR – Infra Red

L – Liter

mg – Milligram

ml – Milliliter

mm – Millimeter

NIR – Near Infra Red

O.D. – Optical Density

PCA - Principal Components Analysis

PCR - Polymerase Chain Reaction

PLS - Partial Least Squares

sec – second

SEC - Standard Error of Calibration

SEP – Standard Error of Prediction

UV – Ultra Violet

λ - Wavelength

1. מבוא ורקע ספרותי

זיהום מיקרוביולוגי של תוצרת חקלאית טרייה יכול לקרות בכל שלב בתהליך היצור, העיבוד, האיסוף והאריזה. פירות וירקות הגדלים קרוב לקרקע (כמו תות, מילון, תפוח אדמה, חסה, ברוקולי וכו'), או אלו שנופלים לקרקע נמצאים בסיכון של מגע עם זיהומים שונים על פני הקרקע ובתוכה כמו שפכים עירוניים, תעשייתיים או חומרים אורגאניים אחרים הנושאים מיקרואורגניזמים פתוגנים. הדבקת הפירות והירקות עלולה לגרום לקלקול ולהרעלת מזון כדוגמא, תפוחים אשר הזדהמו על האדמה ונאספו להכנת סידר (Buck et al., 2003) .

1.1. מיקרואורגניזמים במזון

מוצרי מזון הינם מאחסן פוטנציאלי למיקרואורגניזמים שונים שחלקם רצויים וחלקם בלתי רצויים. מיקרואורגניזמים רצויים כגון שמרים, מוסיפים בתהליכי יצור של משקאות חריפים ובמוצרי מאפה. לסוגי גבינה רבים נוהגו להוסיף חיידקים שתפקידם להעלות את רמת החומציות של הגבינה ולהשפיע על מרקמה. לגבינות מסוימות, מוסיפים מיני עובש התורמים לטעמה של הגבינה.

למעט הימצאות מיקרואורגניזמים רצויים בתהליכים תעשייתיים, ישנם מיקרואורגניזמים מזהמים הגורמים לתהליכים בלתי רצויים במזון כגון, תסיסה במיץ תפוחים. מיקרואורגניזמים יכולים לגרום לקלקול המוצר; מזון מזוהם בחיידקים פתוגנים גורם וגרם בעבר, למקרים רבים של התפרצויות מחלות מעיים קשות אשר הסתיימו בחלק מהמקרים אך במוות. הנפגעים העיקריים ממחלות אלה היו אנשים שמערכת החיסון שלהם חלשה (Madigan et al., 1997).

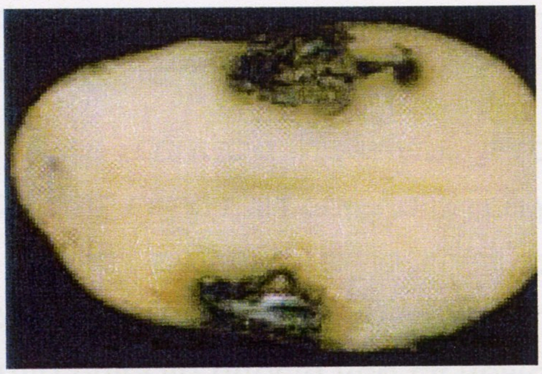
1.1.1. מיקרואורגניזמים בעבודת מחקר זו

הפתוגנים השכיחים בתוצרת חקלאית ובמזון הם: *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Campylobacter Staphylococcus*, ו-*Listeria*. עבור עבודת מחקר זו, נבחרו שני מיקרואורגניזמים נוחים לניסויים בשלבים הראשונים של הדמיית השימוש בשיטת ספקטרום ראמאן המוצעת במחקר. מיקרואורגניזמים אלו מהווים פתוגנים לתוצרת חקלאית, אינם מסכנים את בריאות מבצע המחקר בתנאי מעבדה

רגילה. נבחר חיידק גרם שלילי מסוג *Erwinia carotovora pv. Carotovora* המייצג פתוגנים בקבוצת *Entrobacteriacea* כמו *E. coli*, וחיידק גרם חיובי מסוג *Clavibacter michiganese* המייצג פתוגנים מקבוצת *Staphylococcus* ופתוגנים גרם חיובים אחרים. בנוסף בוצע ניסוי במוצר מזון (מיץ תפוחים) מזוהם בשמרים (*Saccharomyces cerevisiae*) הגורמים לתסיסה (Madigan et al., 1997).

1.1.1.1. תאור החיידקים מסוג *Erwinia*

Erwinia הינו פתוגן ממשפחת *Enterobacteriaceae*. זו משפחה גדולה של חיידקים הכוללת מספר פתוגנים מוכרים, כמו *Salmonella* ו- *Escherichia coli* הידוע יותר כ- *E. coli*. החיידקים ממשפחה זו הינם בצורת מקלונים, בדרך כלל באורך 1-5 µm, הם גרם שליליים, ואנארוביים פקולטטיביים. *Erwinia* הינו סוג של פתוגן צמחי שאחד הזנים שלו הינו *Erwinia carotovora*. זן זה הינו פתוגן צמחי הגורם להתרכבות השורש והשחרה של תפוח אדמה (Madigan et al., 1997).

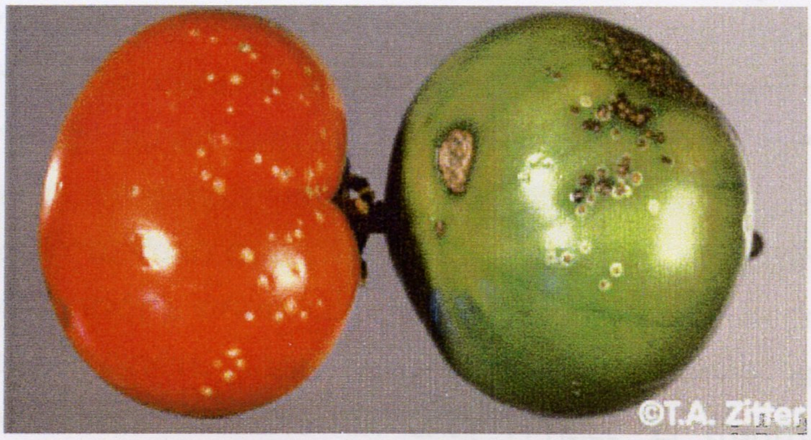


איור 1: השחרת תפוח אדמה
(ע"פ www.syngenta.ca)

איור 2: התרכבות השורש של בצל
(ע"פ Zitter, T.A., Cornell University)

1.1.1.2. תאור החיידקים מסוג *Clavibacter*

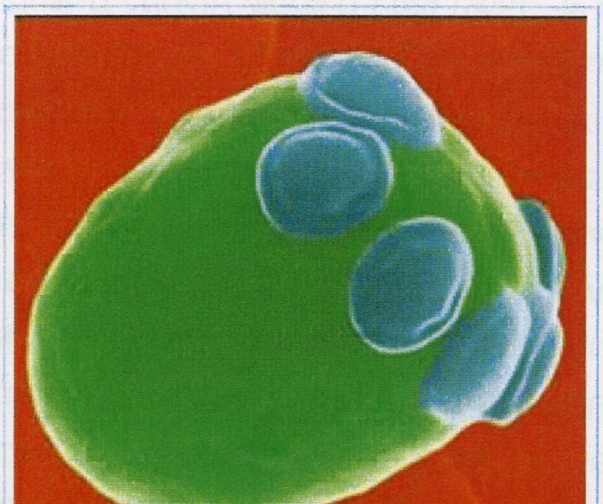
Clavibacter הינו פתוגן ממשפחת *Micrococcaceae*. החיידקים ממשפחה זו הם גרם חיוביים בצורת קוקים. *Clavibacter* הינו סוג פתוגן צמחי שאחד הזנים שלו הוא *Clavibacter michiganense*. זהו חיידק חשוב הגורם לפגיעה בעגבניות על ידי יצירת כתמים בצורת "עיני ציפור" על פני הפרי (Madigan et al., 1997).



איור 3: צילום של עגבניות פגועות ב- *Clavibacter michiganense*.
(ע"פ Zitter, T.A., Cornell University)

1.1.1.3. תאור הפטרייה מסוג *Saccharomyces*

שמר האפייה (*Saccharomyces cerevisiae*) הוא מין של פטרייה המהווה את אחד מהאורגניזמים הנחקרים ביותר בביולוגיה. השמר משמש כמודל ביולוגי במחקרים רבים. שמר האפייה הוא כנראה החשוב ביותר לאדם בשל שימושיו באפייה ולהכנת שיכר.



איור 4: *Saccharomyces cerevisiae* - שמר האפייה
(Microbiol. Rev. 1990. 54: 381-431)

הסיבה העיקרית לשימוש בשמרים אלו לאפיה הינו תהליך התסיסה. תסיסה היא תהליך המתרחש בתאים של יצורים מסוימים שאינו דורש חמצן, ומטרתו היא ייצור אנרגיה לצורכי התא. תהליך התסיסה מפיק מולקולות ATP מעטות בהרבה מזרחון חמצוני ולכן הוא מתרחש רק באורגניזמים חד תאיים וכן בשרירי בעלי חיים, לטווח הקצר, או ביצורים חסרי נשימה תאית מורחבת (מעגל קרבס ושאר התהליך). נוהגים להבחין בין שני סוגי תסיסה מרכזיים: תסיסה לקטית ותסיסה כוהלית. התסיסה הכוהלית, מתבצעת על-ידי שמרים. אחד התוצרים של תסיסה הכוהלית הוא פחמן דו-חמצני בו משתמשים האופים להתפחת בצק וליצירת לחם. תוצר נוסף הינו אתנול בו משתמשים לייצור משקאות חריפים, כגון יין ובירה. האפיה מתרחשת בטמפרטורות גבוהות מאוד והאתנול מתאדה מהמוצר. חלק מהשמרים נמצא על קליפת ענבים, וחלקם מוסף בצורה מלאכותית על-ידי היצרן (Madigan et al., 1997).

.1.1.2 צורך לגילוי חיידקים במזון

פירות וירקות טריים, או כאלו המעובדים באופן ראשוני וכן כאלו שמפיקים מהם מיצי פירות, מקושרים למחלות שמקורם במזון (Beuchat et al., 1996). מחלות זיהומיות כמו דיזנטריה הנגרמת על-ידי חיידקים ואמבות מועברים למוצרי מזון בשל היעדר היגיינה או בשל תנאי תברואה לקויים. הם מתרבים בגוף החי ותוך כדי כך מפרישים רעלנים אשר משבשים בדרכים שונות את פעילותם התקינה של תאים סמוכים. בדיזנטריה החיידקים מתרבים בעיקר במעי; הנזק לתאים מתבטא בשיבושים בעיכול, בהפרשה מוגברת של מים מהתאים (הגורמת לשלשול) ובכאב. לאחר שהגוף מזהה את הטפילים הזרים הוא מנסה להילחם בהם באמצעות מערכת החיסון. "לחימה" זו גורמת לעייפות ולעליית חום הגוף. מסלול מחלה זה (טפילים המפיצים רעלנים) הינו מהנפוצים ביותר. האופן בו הטפיל מזיק לגוף וגורם לתסמיני המחלה נקרא פתוגניות. הטיפול הקיים הוא על ידי תרופות אנטיביוטיות. בין האתגרים שתעשיית המזון מוצבת מולם הינו פיתוח אסטרטגיה מתאימה לגילוי וזיהוי מוצרים מזוהמים בפתוגנים על מנת למנוע מחלות ובכדי להבטיח איכות ובטיחות המוצר בכל שלב של יצור מזון (Beuchat et al., 1998).

1.2. שיטות לגילוי וזיהוי מיקרואורגניזמים

השיטות המקובלות כיום לגילוי פתוגנים במזון כרוכות בצורך לגידול מקדים של מיקרואורגניזמים על מצע סלקטיבי. כללי בטיחות במזון דורשים גילוי פתוגנים בשיטות אימונולוגיות. שיטות אחרות אשר שימשו לגילוי כזה הן מולקולאריות, כמו ; Polymerize Chain Reaction (PCR) של החיידק הנבדק מזוהה בעזרת פרימרים אוליגונוקלאוטידים (Hill et al., 1996). חיישן, המכיל חלקי הגן מהחיידק הנבדק, יכול לשמש גם להברידיזציה עם הפתוגן הנמצא במזון ועל ידי כך לזהותו אך שיטות אלו כרוכות בידע מיוחד, יקרות, וצורכות זמן רב עד לקבלת תוצאה (Levine, et al., 1987; DebRoy, et al., 1994; DebRoy and Dangler et al., 1996).

1.2.1. זריעת מיקרואורגניזמים על מצע סלקטיבי

זריעת מיקרואורגניזמים על מצע סלקטיבי הינה השיטה הנפוצה ביותר כיום לגילויים. זריעת המיקרואורגניזמים מתבצעת על צלחת פטרי עם מצע סלקטיבי. מבחינה תזונתית, החיידקים הם רב-גוניים ביותר לכן מספקים לחיידקים המתפתחים חומרי מזון המכילים מקור פחמן, חנקן, מינרלים (זרחן, סידן, גופרית, אשלגן, ברזל וכו') ואנרגיה כדי שיתרבו. בנוסף לכך מספקים להם ויטמינים וחומרים מורכבים אחרים שהחיידקים זקוקים להם לצורך התפתחותם. לצורך גידול המיקרואורגניזמים, דרושים תנאים פיסיקליים מתאימים להתפתחותם (pH, טמפרטורה).

את צלחת הפטרי מכניסים לאינקובאטור להדגרה בטמפרטורה מתאימה לאותו מיקרואורגניזם למספר יממות. בסוף התהליך, סופרים את המיקרואורגניזמים שגדלו בכל צלחת. הספירה מתבצעת בשיטת הספירה החיה. בשיטה זו משטיחים תרבית חיידקים בנפח ידוע על גבי צלחת הפטרי המכילה מצע אגר מוצק. המצע מספק למיקרואורגניזמים את כל החומרים המזינים הדרושים לו לשם קיום וחלוקה. לאחר הדגרה מתאימה מתקבלים גושי תאים (מושבות) אשר בולטים על המצע. בהנחה שתא חיידק אחד מביא ליצירת מושבה בודדה, מספר המושבות המתפתחות על פני מצע הוא מספר החיידקים המקורי שהיה בחומר שנזרע על פני המצע. בשיטה זו מודדים את מספר החיידקים החיים המסוגלים להתרבות וליצור

מושבות. ההסתברות ששני חיידקים ייצרו מושבה אחת, עולה ככל שצפיפות החיידקים על הצלחת גבוהה יותר, לכן לא סופרים צלחות שמספר המושבות בהן גבוה מ- 10 (Madigan et al., 1997).

1.2.2. שיטות ביוכימיות

1.2.2.1. קליטת אור הנפלט ממולקולת ATP

מולקולת ATP (*Adenosine triphosphate*) נמצאת בתאים חיים ולוקחת חלק בכל התהליכים המטבוליים של התאים כל עוד הם בחיים. במותם של התאים, משתחררות מולקולות ATP לסביבה. אחת מתכונות המולקולה הינה שחרור אור פלורוצנטי (ביולומינציה) שעוצמתו פרופורציונאלית לכמות התאים בו היא נמצאת. התכונה של פליטת האור על ידי מולקולת ATP בפתוגנים נוצלה לצורך מדידה של רמת הזיהום המיקרוביאלי במזון. בהתאם לכך פותחו מכשרים שפעולתם מבוססת על תכונה זו ואשר נמצאים בשימוש בתהליך יצור מזון ומשקאות.

השימוש בשיטה זו לצורך ספירת פתוגנים במזון אינה יעילה בשל נוכחות ATP גם במזון עצמו. הדבר גורם לשגיאה במדידה. גם נוכחות של מלחים, מתכות או חומרים כימיים אחרים יכולה להוות בעיה פוטנציאלית בהערכת האות האמיתי של מולקולת ה- ATP ומביא למדידה מוטעית של רמת נוכחות החיידקים.

בשיטה זו ניתן לזהות שמרים וחיידקים בפרק זמן של פחות מ-2 דקות לעומת 4-7 ימים הנדרשים בשיטת התרבות הקונבנציונאלית. רגישות השיטה מגיעה ל- 200 CFU למ"ל (Trudil et al., 2000).

1.2.2.2. קליטת אור נפלט באמצעות Flow cytometry

אחת השיטות המהירות הנמצאות כיום בשימוש במעבדה לצורך ספירה וזיהוי פתוגניים היא Flow cytometry. למכשיר הפועל בשיטה זו (FACS) גלאי פלורוסנטי שמזהה מולקולות ספציפיות לפתוגן ומאפשר בכך מדידה של מגוון תכונות פנוטיפיות, ביוכימיות ומולקולריות של הפתוגן. תמיסה המשמשת לניסוי ומכילה פתוגנים זורמת בצינורית שאליה ממקדים קרן לייזר באורך גל רצוי. הקרינה הפלואורסנטית נאספת באמצעות הגלאי ומתורגמת לאות אלקטרוני שערכו

משתנה בהתאם לכמות האור הנקלט. כאשר קרן הלייזר פוגעת בתא הנבדק ניתן אף לקבל מידע לגבי הגודל היחסי והגרעיניות שלו מהאופן שבו מתפזר האור. המכשיר FACS הפועל בשיטה זו מיועד לבדוק נוזלים בלבד ואף מאפשר להבדיל בין תאים חיים ומתים (Nebe-von-Caron, et al., 2000). בשיטה זו ניתן לזהות עד 1 CFU למ"ל ומשך הבדיקה הינו מספר דקות (Krutzik et al., 2006). חסרונותיה של שיטה זו הינה הגבלה לנוזלים בלבד ומחירו הגבוה.

1.2.2.3. עכבה חשמלית

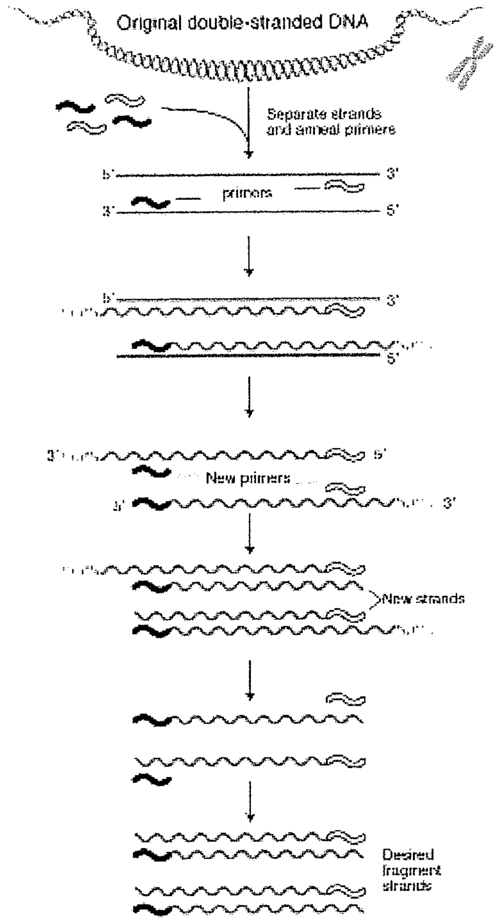
השיטה לגילוי וזיהוי מיקרואורגניזמים בעזרת עכבה מודדת התנגדות חשמלית בתוך נוזלים. במזון יש סוגי מולקולות טעונות במטען חשמלי וכאלו שאינן טעונות. רק למולקולות טעונות יש התנגדות חשמלית. מיקרואורגניזמים במצע מזון צורכים סוכרים וחומרים אחרים בלתי טעונים ומיצרים תוצרים כמו חומצות הטעונים במטען חשמלי. ככל שיש יותר מיקרואורגניזמים העכבה החשמלית קטנה יותר.

רגישות הבדיקה גבוהה יחסית עם סף גילוי בן כ- 10 CFU למ"ל. הבדיקה יכולה להמשך מספר שעות (עד מספר יממות) מאחר וזמן המדידה תלוי בכמות האורגניזמים. בשל רגישות לטמפרטורה ואילוצים אחרים נדרשים תנאיי מעבדה מיוחדים (Gómez-Sjöberg, et al., 2005).

1.2.3. גילוי DNA בעזרת תגובת שרשרת של פולימראז (PCR)

מרקמה בודדת או ממושבת חיידקים אפשר להפיק רק מעט עותקים של גן מסוים בגנום. אבל, כאשר רוצים לזהות גן מסוים, צריכים להפיק מאות מיליונים מולקולות של דנ"א כדי שיהיה אפשר לבצע ריאקציות מולקולות בשיטות מקובלות. לשם כך משתמשים בתגובת שרשרת של פולימראז (Polymerase PCR-Chain Reaction).

עיקרון הפעולה של מכשיר הפועל על פי שיטת PCR כולל שלושה שלבים בכל מחזור: דנטורציה בחום, חיבור של פריימרים מתאימים לקצוות המקטע שאותו רוצים לשכפל - איחוי, והארכת המקטע שאותו רוצים לשכפל באמצעות האנזים DNA פולימראז (אלונגציה).



איור 5: תיאור שיטת PCR

עם סיום מחזור אחד של הכפלה, מיד מתחיל משנהו שחוזר בדקדקנות על השלבים של קודמו, וכך כמה עשרות פעמים עד להגברה המבוקשת של המקטע. עבור האנזים Taq דנ"א פולימראז וחוזר חלילה.

הסיבה שבגללה עובד המכשיר במחזוריות של שלושה שלבים נעוצה ביכולתו לשנות את טמפרטורת הסביבה של הדגימה בהתאם לכל שלב בבדיקה. לפיכך, הדנטורציה נעשית בחום של 90 מעלות צלזיוס בקירוב, בעוד שהתחברות הפריימרים נעשית בטמפרטורה של כ-50 מעלות צלזיוס וההתארכות נעשית בטמפרטורה של 70 מעלות צלזיוס שהיא טמפרטורה אופטימאלית עבור האנזים Taq שמשתמשים בו בשיטה זו וחוזר חלילה. תוצרי ה- PCR הינן מקטעי דנ"א שאותם מריצים בג'ל אלקטרופוריזיס עם פריימרים מתאימים (טבלה 1). שיטה זו

דורשת מספר שעות עד לקבלת תוצאות. יתרונה הוא בכך שהיא מאוד ספציפית וחסרונה הוא מידת מורכבותה ועלותה הגבוהה.

טבלה 1: DNA פריימרים המשמשים לזיהוי פתוגנים במזון בעזרת PCR

סימוכין	תוצר PCR	איזור המטרה	מיקרואורגניזם
Mengaud *et al*, 1990	520 bp	Listerolysin O	*Listeria monocytogenes*
Tsen *et al*, 1994	1179 bp	1.8 Kb HIND III	*Salmonella spp.*
Oyofo *et al*, 1992	450 bp	Flagellin A gene	*Campylobacter jejuni*
Paton & Paton 1998	multiplex	H7, O157, *eae*A, *ehylA*, *vt*1 and *vt*2 gene	*E. coli* O157:H7

1.2.4. שיטות אימונולוגיות

כושרם של נוגדנים להגיב באופן ייחודי עם אנטיגן (antigen), ואגב כך ליצור תצמיד אנטיגן-נוגדן, נוצל לפיתוח שיטות מעבדה פשוטות לזיהוי ולמדידה כמותית של חומרים שונים על פני רקמות ובתמיסות המכילות דגימות מנוזלי גוף כגון דם ושתן. שיטות אלה קרויות שיטות סרולוגיות או שיטות אימונולוגיות והן מצטיינות בפשטות, ספציפיות ורגישויות גבוהות ומאפשרות אבחון נוכחותו של גורם נושא דטרמיננטה אנטיגנית בתערובות מורכבות ותערובות בריכוז נמוך ביותר.

אנטיגן הינו מולקולה המעוררת תגובה חיסונית שגורמת ליצירת נוגדנים וכמו כן, משמשת לסימון תאים שונים בביולוגיה ובהיסטולוגיה. האנטיגן מפעיל את מערכת החיסון בעזרת הדטרמיננטה האנטיגנית שלו. הגוף מזהה את הדטרמיננטה כלא-עצמית (זרה), ותאים שונים, המשתתפים בתגובת מערכת החיסון, מתחילים לפעול נגדו. נוגדן הוא מולקולת חלבון השייכת למערכת החיסון. תפקיד הנוגדנים הוא להיקשר למולקולות המצויות על-פני השטח של פולשים (אנטיגנים) שעלולים להזיק לבריאות. חיבור הנוגדן לאנטיגן מאפשר את חיסולו של הפולש. נוגדנים מהווים כלי מחקר נפוץ בביולוגיה. עושים שימוש בנוגדנים המיוצרים במיוחד עבורם במהלך מחקריהם (Kilbride et al., 2000).

ערכות מסחריות לבדיקות אימונולוגיות הם זמינות פשוטות לשימוש ומהירות, אבל אינן מדויקות וספציפיות. רגישות הבדיקה תלוי בסוג הערכה.

.1.2.5 שיטות ספקטראליות

בנוסף לשיטות הנזכרות, קיים צורך בפיתוח שיטות אמינות ומהירות לגילוי פתוגנים. אחת השיטות שנחקרה לאחרונה לצורך הערכה מהירה של בטיחות המוצר משתמשת בשיטות ספקטראליות - שיטה אופטית המבוססת על פיזור אור וניתוח ספקטרום האור החוזר מהמוצר הנבחן (Schmilovitch, et al , 2005).

שיטות ספקטראליות בתחום האינפרא-אדום (IR) מאפשרות גילוי מהיר ורגיש של מיקרואורגניזמים. עירור של מולקולות על ידי תאורת IR נותן פרופיל ספקטראלי מורכב ואופייני למולקולה מסוימת בחומר. הדבר מתבטא בתנודות של מולקולה מאופיינות על ידי מומנט דיפול משתנה. בליעת גל אינפרא-אדום נעשה על ידי קשרים כימיקלים מסוימים אשר גורמים לתנודה ספציפית בקרוב לטווחים הצרים של התדר. תדרים אלו נקראים "קבוצת תדרים" וערכם הספקטראלי נע בין 10^{14} Hz -ל 10^{12} Hz או בעלות אורך הגל – $4000\ cm^{-1}$ -עד $50\ cm^{-1}$ (Hendra, et al., 1991). בליעת IR גורמת לשינוי אופייני במומנט דיפול של המולקולה המתנדנדת.

בשנים האחרונות פותחה שיטת אבחון המשתמשת בספקטרוסקופית ראמאן של אור תת-אדום (FTIR) ובמערכת המבוססת על אפקט של ראמאן לייזר. בתהליך זה, משודרת אלומת אור קוהרנטית הנובעת ממקור מוגדר ומאופנן כמו קרן לייזר בתחום האור הנראה או האינפרא אדום אל תווך מסוים. חלק מהאור מועבר, חלק אחר מתפזר וחלק אחר נבלע בתווך. מידת הבליעה או העברה תלוי בסוג התווך, אורך הגל המשודר ועוצמתו. התווך יכול להיות כל הרכב של מוצק-נוזל בתרחיף (כמו *Saline*) או מוצק (כמו מוצר מזון). רוב האור מתפזר מבלי שיחול שינוי באורך הגל שלו אך חלקו מפוזר תוך כדי שינויי באורך הגל. שינוי זה נקרא אפקט ראמאן. מידת השינוי, המכונה "הסטת-ראמאן" (Raman-shift), נמדדת במספר הגל (wavenumber) ביחידות של cm^{-1}. קרינת אור בטכנולוגיה זו גורמת להרעדת מולקולות החומר, לשינויים בפולאריות ולפיזור האלקטרונים. כאשר מולקולה מתנודדת, שינוי הפולאריות שלה או פיזור אלקטרונים במולקולה מעלה

אפקט ראמאן. קבוצות פולאריות, כמו C=O ו- O-H, מראות בליעה אינטנסיבית של רוחב פס בתחומי האינפרא אדום (IR) בעוד שקבוצות אשר אינם פולאריות כמו C=C מראות פיזור ניכר של רוחב הפס (פיזור ראמאן). הערכים של הסטת-ראמאן דומים לערכי התדירויות המתקבלות כתוצאה מתנודות הנגרמות בעירור בתחום האינפרא אדום ומהווים ערכי בליעות אופייניות לחומר הנבחן. טכניקה זו מיושמת בהצלחה רבה לזיהוי של מרכיבים פנימיים בחומרים שונים בתעשייה ובמחקר, ברמת דיוק רבה יותר מאשר מקובל בטכנולוגית אינפרא אדום וניתן ליישמה בחומרים שונים.

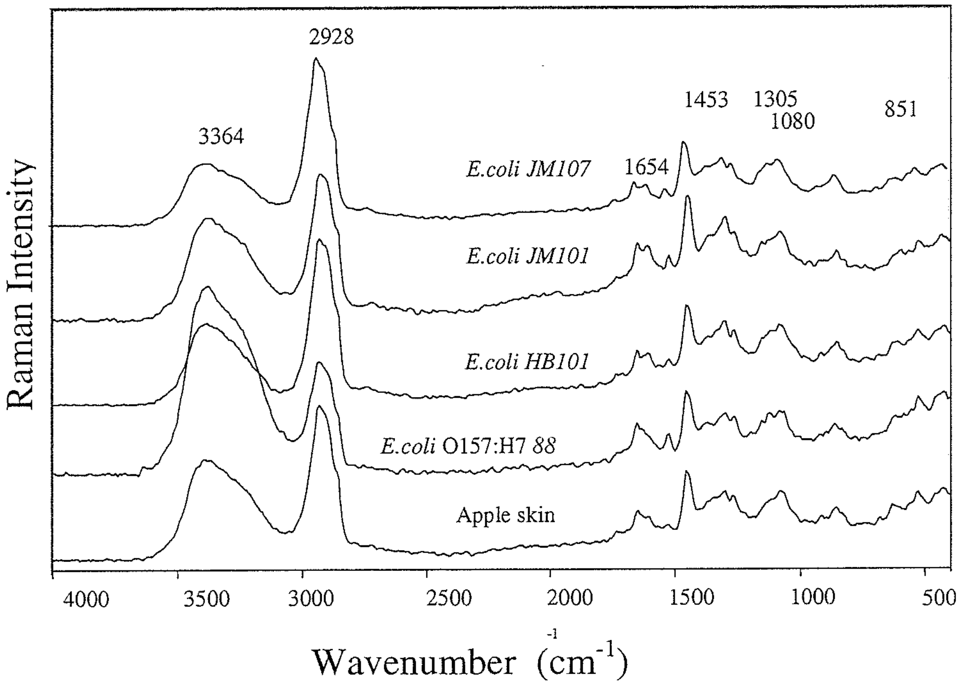
בספקטרוסקופיה פיזור ראמאן אופיינית, משתמשים באור בתחום ה- UV, אור נראה או אור קרוב לתת-אדום (NIR) וכן בחיישנים דיפרקציונאליים או חישני CCD (מטריצת סיליקון), כאמצעי לאיסוף נתונים המחלק סיגנאל אופטי לפי שיאים האופניים לקשרים כימיים של החומר הנבדק.

האור מופק בלייזר ומשמש כמקור אשר מקרין על הדגימה. האור המתפזר מועבר לרשת דיפרקציאונלית אשר שוברת את האלומה לתדרים חלקיים בדומה לפעולת פריזמה. חיישן CCD מבחינה בתדרים הללו דרך מטריצת גילוי. עוצמת האות הנקלט פרופורציונאלי לערך של-$1/\lambda^4$ כאשר, λ הינו אורך הגל של מקור הלייזר. לפיכך, כאשר אורך הגל קצר יותר, עוצמת אות הראמאן, גבוהה יותר. דבר זה, ביחד עם יעילות קוונטית גבוהה של חיישן CCD, מספקת רגישות יוצאת דופן. יתרון של שיטות פיזור ראמאן הם רגישות גבוהה, אופטיקה משולבת במלואה, תוכנה המבקרת את המערך ואפשרות של כיול של דגימה ללא הרס.

שיטה ספקטראלית מהירה לקבלת טביעות אצבע של אורגניזמים שלמים מסוג *E. coli* ו- *Bacillus subtilus* באמצעות ראמאן מיקרוספקטרומטרי הוצגה בספרות (Jarvis, et al., 2004). העתק של הספקטרום נאסף על ידי פיזור ראמאן משני סוגי הבקטריות הראה יכולת שיחזור גם על ידי בחינה חזותית ועל ידי הצגה של אנליזה של PCA. מיקרוספקטרוסקופיית ראמאן קונפוקלית שימשה לזיהוי מיקרואורגניזמים קליניים הגדלים על מצע גידול מוצק (Maquelin, et al., 2000). נמצא כי אפשר לקבל ספקטרום ראמאן ישירות ממושבות מיקרוביאליות הגדלות על גבי מצע מוצק, לאחר שש שעות של גידול תרבית של אורגניזמים כמו *E. coli* ו- *Staphylococcus*. לפי תוצאות אפשר לראות שלמיקרוספקטרוסקופית ראמאן

קונפוקלית יש פוטנציאל באבחנה קלינית. אנליזה של תא בודד נעשתה בהצלחה באמצעות מיקרוסקופית ראמאן קונפוקלית של פתוגן Clostridium acetobutylicum ATTC 824 שנמצא בתרבית נקייה (Schuster et al., 2000).

גילוי וזיהוי מדויק של חיידקים מזנים שונים של *E. coli* כולל זן הפתוגני O157:H7 במזון התאפשר באמצעות שימוש במכשיר ספקטרוסקופית ראמאן בעל רזולוציה גבוהה (Sivakesava et al., 2004). המחברים זיהו שיאים בספקטרום המוחזר, ערך אורך הגל של כל שיא אופייני לקשר כימי של הדגימה הנבדקת (איור 6). הגרפים מסודרים אחד מעל השני, כך שאפשר להשוות עוצמת השיאים בהתאם. למשל ב - *E. coli* פתוגני ריכוז קשרי O-H הכי גבוהה.



איור 6: ספקטרום ראמאן מקליפת תפוחי עץ עם *E. coli*
(ע"פ Irudayarj, 2000)

עוצמת השיאים משתנה בהתאם לקבוצות פונקציונאליות המתבטאים באורכי גל אופייניים לכל זן של חיידקים בספקטרום הכללי המוחזר מפני שטח של תפוחי עץ. אורכי הגל העיקריים בספקטרום המוחזר מפני שטח הפרי השלם והקבוצות הפונקציונאליות הקשורות אליהם, מתוארים בטבלה 2.

בשל הרזולוציה הגבוהה של המכשיר מחירו גבוה ביותר ולא משתלם לשימוש בתעשייה. לכן נובע צורך בפיתוח השיטה לשימוש במכשיר בעל רזולוציה נמוכה שמחירו נמוך בסדרי גודל.

טבלה 2: מיקום הקשרים הכימיים בספקטרום ראמאן על קליפת תפוח עץ מאולח

ב- *E. coli* (כולל O 157:H7)

קשרים כימיים	אורך גל (cm^{-1})
O-H	3364
C-H	2928
C=C	1654
C-H	1453
C-H	1305
C-O-C	1080
C-C	723

לאחרונה, ניתן למצוא בשוק מכשירי ספקטרוסקופית ראמאן ניידים בעלי רזולוציות נמוכה, זולים יחסית ועמיד לטלטול, אשר בהם פועלים בעזרת מספר דיודות לייזר בעלות אורכי גל קצרים המתאימים לגילוי הסטת-ראמאן ברמות נמוכות. מכשירים אלו יכולים לשמש כתחלופה למערכות ראמאן יקרות.

2. מטרות העבודה

מטרת העבודה הינה להעריך את היכולת של ספקטרוסקופית ראמאן לגלות נוכחות של מיקרואורגניזמים במוצרי מזון באמצעות מכשיר ראמאן ברזולוציה נמוכה.

מטרות מפורטות הם:

- גילוי חיידקים בתרחיף:
  - קביעת ריכוז חיידקיים בתרחיף,
  - הבחנה בין שני סוגי חיידקים שונים בתוך תרחיף,
  - קביעת רגישות המערכת וסף גילוי.
- גילוי חיידקים על פני משטח זכוכית מאולח.
- גילוי שמרים במיץ תפוחים מאולח.

3. חומרים ושיטות

3.1. חומרים

Apple Juice – Prigat – Gat, Givat Haim, 38100, Israel.

Proteose peptone, Bacto peptone, Bacto yeast extract –
BD – Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA.

Glycerol - BioLab – Jerusalem, Israel.

Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumsulfat-Heptahydrat –
Merck – Darmstardt, Germany.

Agar - Solufix – Petach Tikva, Israel.

3.1.1. כתובות של יצרני מכשור

1001 UV-VIS Spectrophotometer - Bausch & Lomb Spectronic – USA.

Raman spectrometer - Raman Systems, Inc. – Watertown, MA, USA.

3.1.2. מיקרואורגניזמים

Erwinia Cartovora pv. Cartovora - אוסף המחלקה להגנת הצומח במכון וולקני

Clavibacter michiganense - אוסף המחלקה להגנת הצומח במכון וולקני

Saccharomyces cerevisiae - אוסף המחלקה לביוכימיה בפקולטה לחקלאות

שני החיידקים נזרעו על מצע King B ושמרים על YPG. זריעה בעזרת מחט בקטריולוגית בצורת קווים מוצלבים. צלחות פטרי הוכנסו לאינקובאטור להדגרה ב-30°C לשלושה ימים. לצורך ניסוי נלקח חצי מהגידול בצלחת פטרי.

3.1.3. מצעי גידול

כל המצעים עברו עיקור באוטוקלב בטמפרטורה של 121°C במשך 20 דקות.

King B – 0.15% Kaliumhydrogenphosphat, 0.15% Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 2% Proteose peptone, 1% Glycerol, 2% Agar.

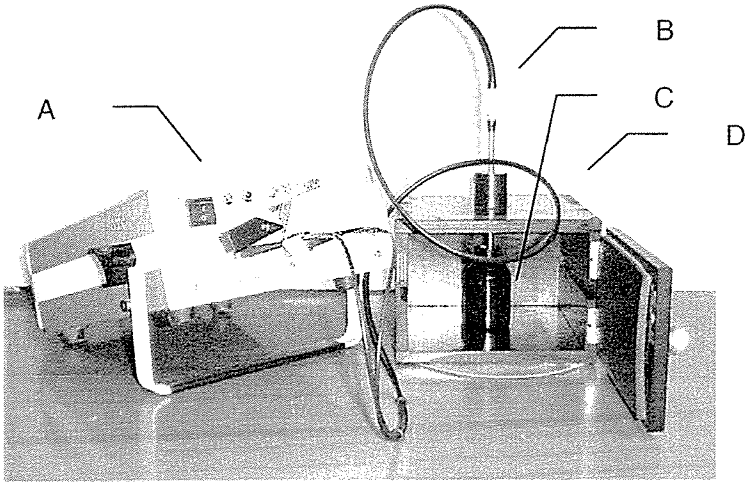
YPG – 1% Bacto yeast extract, 2% Bacto peptone, 3% [V/V] Glycerol, 2% Agar

Saline - 8.5 g/l sodium chloride

3.2. מערך ספקטרוסקופית ראמאן

המחקר נעשה בעזרת ספקטרומטר ראמאן (דגם R-2001, Ocean Optics Inc., PA, USA). המערכת כוללת מקור אור של דיודת לייזר, חיישן, סיב-אופטי, ספקטרומטר, ממיר אנלוגי-דיגיטאלי (A/D) ותוכנה תפעולית. אור דיודת הלייזר מעובר דרך סיב אופטי לחיישן. אור המוחזר על ידי הדגימה מעובר לספקטרומטר דרך סיבי הקליטה האופטיים בחיישן. הספקטרומטר מודד את כמות האור בכל פיקסל של הספקטרום המתקבל מהדגימה. כרטיס A/D ממיר אות אנלוגי לנתונים דיגיטאליים, ותוכנה תפעולית מעבירה את הנתונים הדיגיטאליים אל מכשיר המדידה ולתצוגה.

אור דיודת הלייזר הינו באורך גל של 785 nm והספקטרומטר בעל חיישן בתחום של 790-1100 nm אשר מתאים לערכי הסטת-ראמאן מ- $200\ cm^{-1}$ ל- $2400\ cm^{-1}$. הסיגנל האנלוגי הנמדד מתורגם באופן דיגיטאלי על ידי כרטיס A/D 12 ביט וערכים הדיגיטאליים מועברים אל מחשב אישי דרך ממשק RS232. תא ניסוי במימדים של 12×12×9 סמ' נבנה כדי לאפשר מדידה בחושך על מנת למזער השפעות סביבתיות והחזרי אור. המדידות נערכו במעבדה ממוזגת עם טמפרטורה מבוקרת קבועה בערך של 24°C במהלך הניסוי. חיישן מכשיר הלייזר ראמאן מורכב על גבי תא הניסוי כאשר החיישן האופטי חודר אל תוך התא (איור 7).



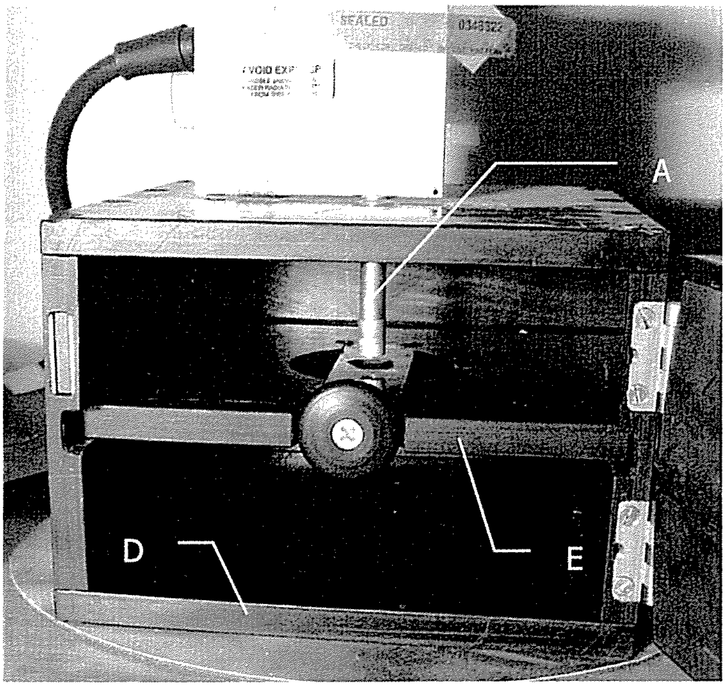
איור 7: מערך לניסוי בספקטרוסקופית ראמאן. A- יחידת ראמאן RS2001,
B- חיישן סיבי-אופטי דו-כיווני, C- בקבוקון עם דגימה, D- תא חושך.

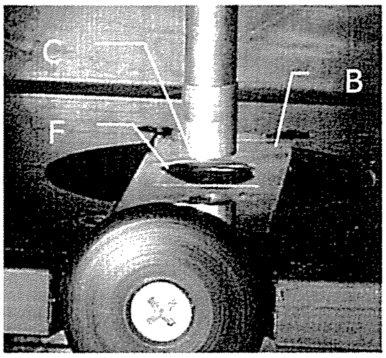
3.2.1. מערך המדידה של תמיסה בבקבוק

לצורך מדידת החזר של אור לייזר מתמיסה הנמצאת בתוך בקבוקון נעשה שימוש במערך ספקטרוסקופית ראמאן כאשר תא הניסוי הוסב לקליטת הבקבוקון. בקבוקון מזכוכית חומה בנפח של כ- 60 מ"ל הכולל את התמיסה הנבדקת בנפח 40 מ"ל מונח על קרקעית התא. החיישן טבול בתוך הנוזל בבקבוקון כך שהוא משוקע כ- 1 ס"מ מתחת לפני התרחיף (איור 7).

3.2.2. מערך המדידה של תמיסה על משטח זכוכית

בתוך תא חושך, D, הותקנה מגרה, E, בה מגרעת לדיפון לוח זכוכית דגימה של מיקרוסקופ, B.



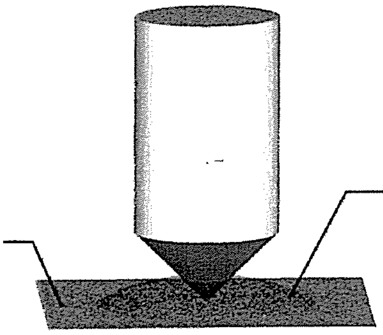


איור 8: מערכת ניסוי עם דגימה נוזלית על משטח זכוכית.

A- חיישן אופטי, B- משטח זכוכית, C- טיפת דגימה נוזלית, D- תא חושך, E- מגרה, F- זכוכית מכסה.

על לוח זכוכית הדגימה הונחה זכוכית מכסה של מיקרוסקופ, F, שממדיה 18×18 מ"מ ועובי 0.15 מ"מ. טיפת הדגימה הנוזלית, C, נמצאת על זכוכית המכסה ועובייה כ- 1.5 עד 2 מ"מ. המרחק בין מקור הלייזר ופני זכוכית המכסה נקבע ל- 4

מ"מ. אורך המוקד של חיישן הלייזר הינו כ- 3.9 מ"מ כך שמוקד קרן הלייזר נמצא בתוך טיפת הנוזל (איור 9).



איור 9: כוונון המוקד של קרן הלייזר

3.3. הכנת עקומת גידול

מהולים עשרוניים של תרחיף חיידקים בוצע תוך שימוש בתמיסה פיזיולוגית מעוקרת ועבודה בתנאים סטריליים. נמדדו ערכי הצפיפות האופטית של המהולים השונים ובמקביל נזרעו צלחות סטריליות, והודגרו למשך יום-יומיים בתנאים המתאימים. מספר החיידקים על כל צלחת נספר ונרשם ונבדק הקשר המתמטי בין הנתונים.

3.4. הכנת דגימות תרחיף

תמיסת *Saline* סטנדרטית הכוללת חיידקים נבחרה כבסיס התחלתי לניסויי גילוי פתוגנים של צמחים באמצעות ספקטרוסקופית ראמאן. השימוש בתמיסה הסטנדרטית הכרחי על מנת למזער רעשי רקע במדידות ולמניעת שונות במצע.

לניסוי זה נבחרו שני פתוגנים *Erwinia cartovora pv. cartovora (ECC)* ו - *Clavibacter michiganense (CBM)*, המיצגים חיידקים גרם חיוביים וגרם שליליים, בהתאמה. גידול חיידקים נעשה במצע King's B (King, et al., 1954). תרחיף בסיסי של חיידקים הוכן בתמיסת *Saline*. מספר מושבות של חיידקים שגודלו על צלחות פטרי הוספו אל תוך אלנמיירים בנפח של 100 מ"ל המכילים 20 מ"ל *Saline*. תרחיף החיידקים נמהל בתמיסה תוך בחינת הצפיפות האופטית שלו (O.D. – optical density) באמצעות ספקטרופוטומטר. הליך המיהול נמשך עד לקבלת ערכי O.D.

של 0.600 ± 0.015 ו-0.680 ± 0.015 של *ECC* ו - *CBM*, בהתאמה. בשלב זה, תרחיף החיידקים הבסיסי הכיל 10^9 ו- 10^{10} CFU למ"ל של *ECC* ו- *CBM*, בהתאמה. רמת ה - pHשל התרחיף נמדד ונתקבל הערך של 6.8. תרביות החיידקים חודשו שבועית על מנת למנוע זיהום על ידי מיקרואורגניזמים אחרים, כגון פטריות.

3.4.1. מיהול תרחיף עם חיידקים

יכולת המערכת למדוד את ריכוז החיידקים נעשתה בשלב ראשון בתמיסה המכילה סוג פתוגן יחיד ובשלב שני בתמיסה המכילה שני סוגי פתוגנים. במהלך הניסוי נבדקו מספר קבוצות של תמיסות המכילות ריכוזים שונים של חיידקים. בשני שלבי הניסוי נערכו המדידות בתמיסות המכילות ריכוזים גבוהים של חיידקים וכאלו בתמיסות עם ריכוזים נמוכים.

יחסי המיהול של תרחיף בסיסי עם חיידקים נתקבלו בצורה עקבית על פי מספר חלוקות; יחסי מיהול של 1:2 ו- 1:3 נתבצעו כדי ליצור מגוון מהולים מ- 1:1 עד 1:128, יחסי מיהול של 1:10 נתבצעו על מנת ליצור תשע מהולים הנעים בין 1:10 עד 9:10 לכל אחד מהחיידקים (*ECC* ו- *CBM*). במערכת נבחנו גם מהולים גבוהים משמעותית, הנעים מ- $1{:}10^4$ עד $1{:}10^8$ על מנת לקבל תרחיפים בריכוזים מ- 10^6 עד 10^2 ו- 10^5 עד 10 CFU למ"ל ל- *ECC* ו- *CBM*, בהתאמה. תרחיף בסיסי, ללא חיידקים (*Saline*), שימש לביקורת.

בשלב השני של הניסויים הוכנו מגוון תמיסות עם תערובת חיידקים *ECC* ו- *CBM* בתמיסה בסיסית. איור 10 מציג את הריכוזים של *ECC* ו- *CBM* בתמיסות הנחקרות: מערכת הצירים הראשונית מסמנת את ריכוז החיידקים ביחידות של מספר CFU למ"ל ומערכת הצירים השניונית מסמנת ריכוזים ביחידות של שברים עשרוניים ביחס לתרחיפים בסיסיים. הריכוזים של התרחיפים הבסיסיים של החיידקים היו 10^{10} ו- 10^9 CFU למ"ל ל- *CBM* ו- *ECC*, בהתאמה. הערך החלקי החיידקים בשני סוגי התמיסות נע בין 0.0 ל- 0.3 ומאפשר בסיס משותף לצורך של אנליזה סטטיסטית. תמיסה בסיסית שאינה כוללת חיידקים (*Saline*) נחשבה כתמיסה עם ריכוז אפס וסומנה בערך של 0.0.

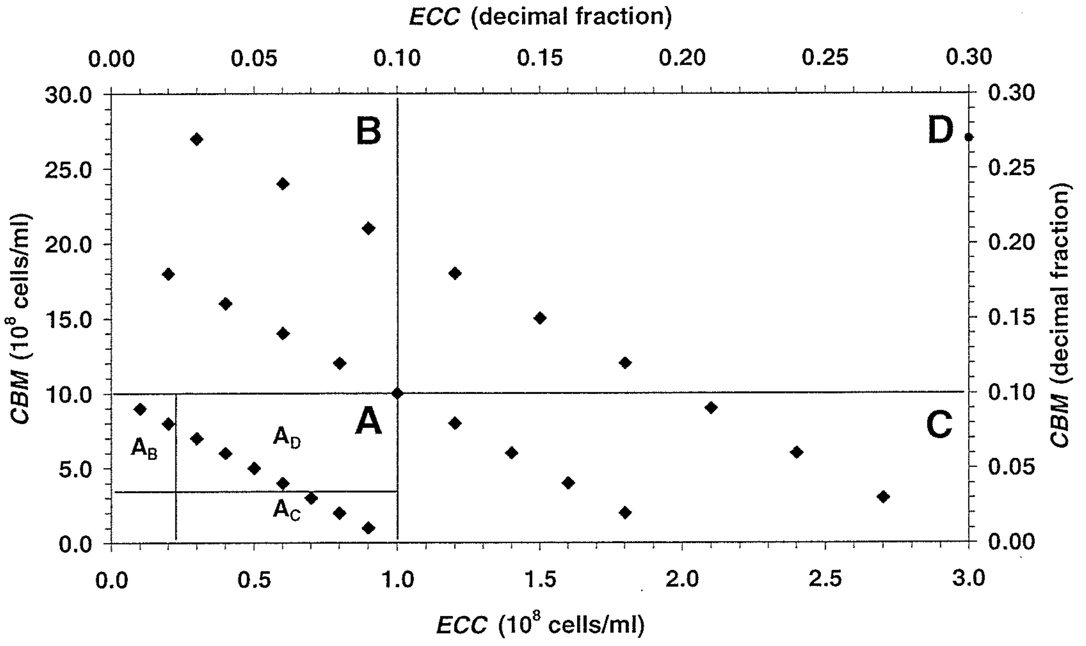
התמיסות חולקו לארבע קבוצות ריכוז לפי ריכוז יחסי של חיידקים מסוג *ECC*ו- *CBM* בתמיסה. איור 10 מתאר גרפי טווח ריכוזים לכל קבוצה;

"A" - ריכוזים נמוכים של *CBM* ונמוכים של *ECC* בתמיסה,

"B" - ריכוזים גבוהים של *CBM* ונמוכים של *ECC* בתמיסה,

"C" - ריכוזים נמוכים של *CBM* וגבוהים של *ECC* בתמיסה,

"D" - ריכוזים גבוהים של *CBM* וגבוהים של *ECC* בתמיסה.



איור 10: ריכוזי תמיסות של חיידקים מסוג *ECC* ו- *CBM*.

טווח הריכוז הגבוה הוגדר: A, B, C ו- D. טווח ריכוז הנמוך הוגדר: A_B, A_C, A_D

תרחיפים עם חיידקים בבקבוק נמהלו בשתי שיטות; מהולים חציונים, מהולים עשרוניים בריכוז גבוה מ-10^8 עד 10^6 CFU למ"ל, ונמהלו לפי סדרי גודל עד לריכוז נמוך 100 CFU למ"ל. תרחיפים עם חיידקים שטופטפו על גבי משטחי זכוכית נמהלו בריכוז נמוך משמעותית עד תא יחיד למ"ל.

3.4.2. מיהול תרחיף עם שמרים

יכולת המערכת למדוד את ריכוז השמרים במיץ תפוחים צלול נבחנה עם מיהול נמוך משמעותית, רמת תא שמר יחיד למ"ל מיץ תפוחים. לחלק זה של ניסוי נבחרו שמרי אפיה *Saccharomyces cerevisiae*. גידול השמרים נעשה על מצע YPG (Rose et al., 1990). תרחיף בסיסי של שמרים הוכן בתמיסת מיץ תפוחי עץ צלול.

3.5. שיטות סטטיסטיות

עיבוד הנתונים נעשה בפרוצדורות כמומטריות והליך רגרסיה בשיטת הריבועים המינימאליים החלקיים (נספח 1), Partial Least Squares, פותח ליישום בתוכנת MATLAB 6.13 ע"י EigenVectors (USA) ושימש לפיתוח מודל סטטיסטי. רגרסית PLS (Partial Least Squares) שימשה סטטיסטית כשיטה לגילוי וזיהוי חיידקים ומיקרואורגניזמים אחרים באמצעות ספקטרוסקופיה במספר מחקרים (Holt et al., 1995; Sivakesava et al., 2004; Naumann et al., 1990).

פרוצדורה כמומטרית שנייה אפשרה לקבוע ריכוז המיקרואורגניזמים בדגימה באמצעות מיון. המיון נעשה באמצעות אנליזת מיון (נספח 2).

4. מהלך העבודה

4.1. הליך מדידת ספקטרום ראמאן

המדידות הספקטראליות באמצעות לייזר ראמאן נתבצעו בדגימות של תמיסות טהורות וכאלו המכילות חיידקים או שמרים אשר הוכנו ממגוון המהולים במחקר. המדידות של התמיסות השונות בבקבוק, ואלו אשר נעשו על טיפת תמיסה הנמצאת על משטח זכוכית נערכו בתא חשוך כאשר מוקד קרן הלייזר מכוון אל תוך התמיסה. מכשיר המדידה כוון לפעולה במוד החזר, ללכידת ספקטרום האור החוזר מתוך הדגימה. על כל דגימה נעשו שלוש מדידות ספקטראליות. הנוזל נחשף לאור לייזר ראמאן באורך גל של 785 nm, ברזולוציה של $30\ cm^{-1}$ ובזמן אינטגרציה של שתי חשיפות בנות 40 שניות כל אחת של תמיסה בבקבוק ושלוש חשיפות בנות 30 שניות כל אחת של תמיסה על גבי משטח זכוכית. ממוצע החשיפות נדרש בכדי לשפר את יחס אות-רעש (SNR) בקריאת המכשיר. משך הניסוי עבור כל תמיסה בריכוז ידוע היה כשבוע ימים.

4.2. אנליזה ספקטרלית של הנתונים

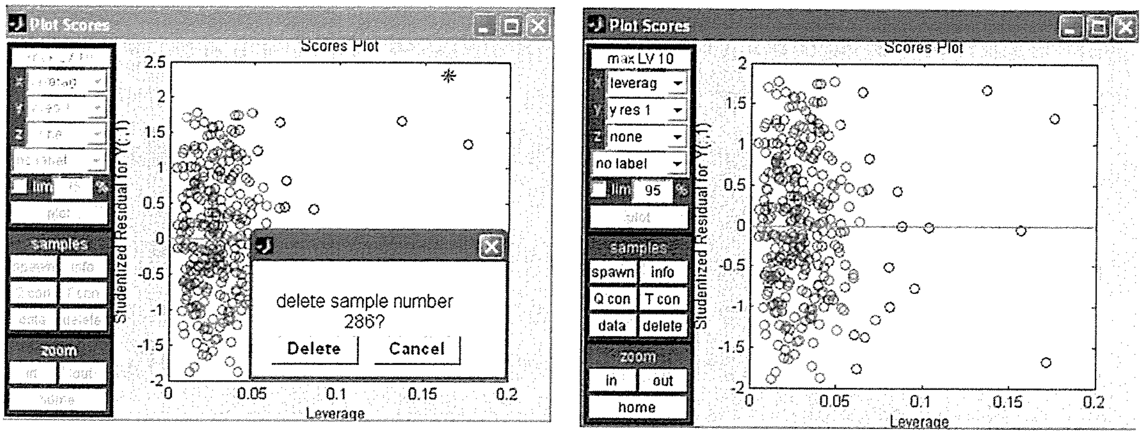
עבודה עם רגרסית PLS מבטיחה שהשונות שמקבלים מעיבוד הקלט והפלט של האותות מתייחסת לערכי מגוון הריכוזים של המרכיבים על ידי שילוב של המידע של הריכוזים אל תוך הליך הפחתת נתונים (Martens and Naes, 1989). אנליזה של הספקטרום המקורי, הנגזרת הראשונה שלו והנגזרת השנייה של הלוגריתם ((log (1/R)) נעשתה על ידי תוכנת MATLAB® ver13.

כחלק מהליך עבוד הנתונים וחישוב הרגרסיה היה צורך בחישוב השגיאה הסטנדרטית של החיזוי (Standard Error of Prediction), SEP, מתוארת בספרות (Biddy and Toutenburg, 1977) ומשמשת כמדד לסטייה סטנדרטית. השגיאה הסטנדרטית של חיזוי (SEP) ומוגדרת כ-:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i}^{n} (y_r - y_p)^2}{n}}$$

כאשר y_r מתייחסת לריכוז הדגימה, y_p ריכוז התרחיף החזוי ו- n מספר הדגימות.

SEP הוערך על ידי הערכה מוצלבת (cross-validation): דגימה אחת נמחקה ממערכת נתוני הכיול, פותח מודל על ידי החלה של רגרסית PLS על שאר הדגימות ונחזה הריכוז של הדגימות אשר הוסרו בראשונה. נערכו חזרות בהליך זה עבור כל דגימה בקבוצת הכיול. מספר אופטימאלי של הפקטורים ברגרסיה PLS הוא מספר פקטורים הנדרשים לאנליזה מתקבלים על ידי חיזוי מערך דגימות בלתי תלוי בכמות שונה של פקטורים רגרסיה PLS וקביעת מספר פקטורים רגרסיה PLS בשביל זה שגיאת חיזוי שורש של ממוצע בריבוע מינימאלית או לא משמעותית שונה ממינימום. ערכים חורגים (outlier), נמחקו לפי קריטריונים סטטיסטיים (Rousseeuw and van Zomeren, 1990).



איור 11: תיאור של תהליך מחיקת נתונים חורגים עבור *CBM* בטווח ריכוזים רחב.

ספקטרום הסטת-ראמאן שימש אף למיון הדגימות לקבוצות על פי ריכוז. המיון נעשה באמצעות אנליזת מיון. המשתנים הקנוניים מוצגים על ידי משתנים סמויים של מודלים של PLS אשר נבנו מספקטרום הסטת-ראמאן. עבור כל דגימה, חושבו N משתנים קנונים ראשוניים אשר שימשו באנליזת מיון כדי ליחס את הדגימות לקבוצות המתאימות. המשתנים הקנוניים שימשו כמשתנים בלתי תלויים, וטווחי הריכוז (A, B, C או D כפי שהוגדרו למעלה) שימשו ככינוי לקבוצות שיוך. המיון נעשה לפי שיטת סבירות מכסימאלית. שליש מהנתונים שימשו להכשרת ממיין ושאר הנתונים שימשו לאימות (Duda, et al., 2001).

5. תוצאות העבודה

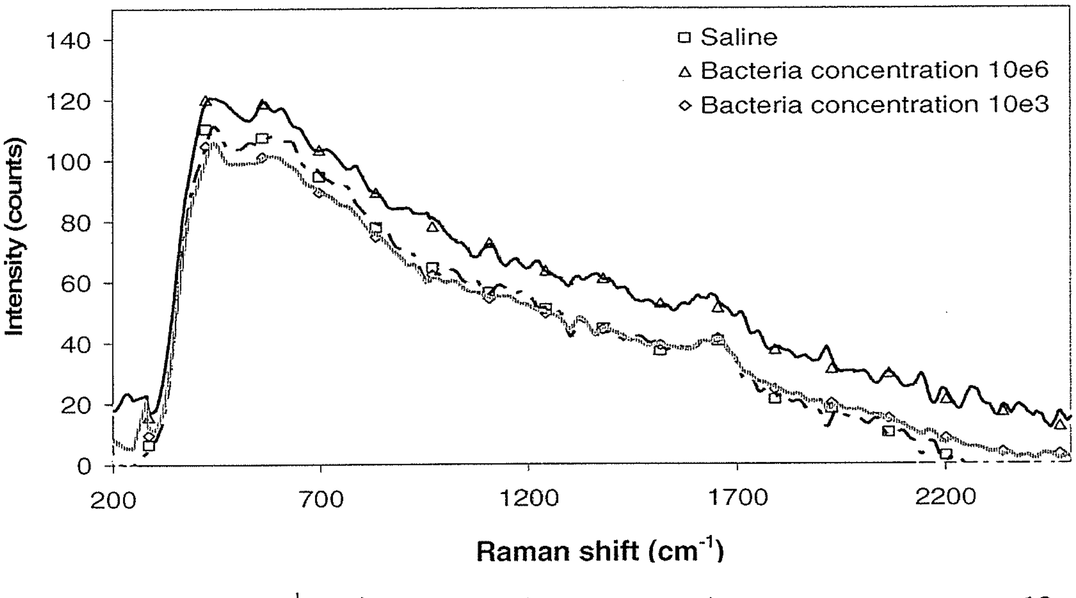
תוצאות המדידות בשיטות השונות, עבור ההרכבים השונים של התמיסות הטהורות ואלו שמכילות מיקרואורגניזמים שונים מתוארות בהמשך. חלקם של תוצאות המדידה מוצגים בטבלאות ובגרפים מאפיינים. בפרק זה יש התייחסות לתוצאות הניתוח הסטטיסטי של הספקטרום הנמדד.

5.1. גילוי מיקרואורגניזמים בתרחיף

גילוי וזיהוי מיקרואורגניזמים בתרחיף נעשה באמצאות מערכת ראמאן לייזר. ספקטרום האור המוחזר מתוך תמיסה נתונה נבחן לשם קבלת אותות אופייניים להחזרים מהמרכיבים של התמיסה. העוצמות שנמדדו בשיאים של האותות וניתוח תוצאות העיבוד הסטטיסטי של המדידה אפשר להבדיל בין רמות ריכוז שונות של מיקרואורגניזמים בתמיסה אפילו ברמת ריכוז נמוכה ביותר.

5.1.1. ספקטרום אופייני

דוגמא לספקטרום אופייני של תמיסה טהורה של *Saline* וספקטרה של שני מהולים שונים של תרחיף עם חיידקים מתוארת באיור 12.



איור 12: ספקטרום ראמאן אופייני (זמן אינטגרציה 40 שניות, רזולוציה $30\ cm^{-1}$)

בדיקה חזותית של ספקטרה אינה מגלה שיא משמעותי של הסטת-ראמאן. המרחק הקטן בין האותות וחפיפות בין הספקטרומים הופך את הזיהוי של טביעת אצבע המבוססת על סוג החיידק ומידת ריכוזו בתמיסה לבלתי אפשרי. לפיכך, נעשה בעבודה זו שימוש בסטטיסטיקה רב-ברירתית (כימומטריה) שהיא יישומית לאנליזה ספקטראלית כללית ומתאימה אף לאנליזה של ספקטרום ראמאן.

5.1.2. חיזוי ריכוז של פתוגנים

תוצאות חישוב שגיאת החיזוי הסטנדרטית, SEP, ומספר הפקטורים לכל מדידה התקבלו מרגרסית PLS של זן יחיד וערוב של שני זנים של חיידקים, מוצגים בטבלה 3. הטבלה מציגה תוצאות החישוב של הספקטרום המקורי של הסטת-ראמאן (R) וספקטרום מעובד בצורה מתמטית שכלל את הנגזרת הראשונה של הספקטרום המקורי (1stD) והלוגריתם של הופכית הספקטרום המקורי ((Log(1/R)).

השימוש בערכי ריכוז עשרוני חלקי בחישוב רגרסיה רב-ברירתית אפשר את נרמול המדידה והשוואה של SEP לכל מערך הנתונים. תחומי הריכוז, ביחידות של מספר CFU למ"ל והערכים העשרוניים החלקיים שווי הערך שלהם, נתונים בטבלה יחד עם תוצאות אנליזת PLS ביחידות של ריכוזים חלקיים.

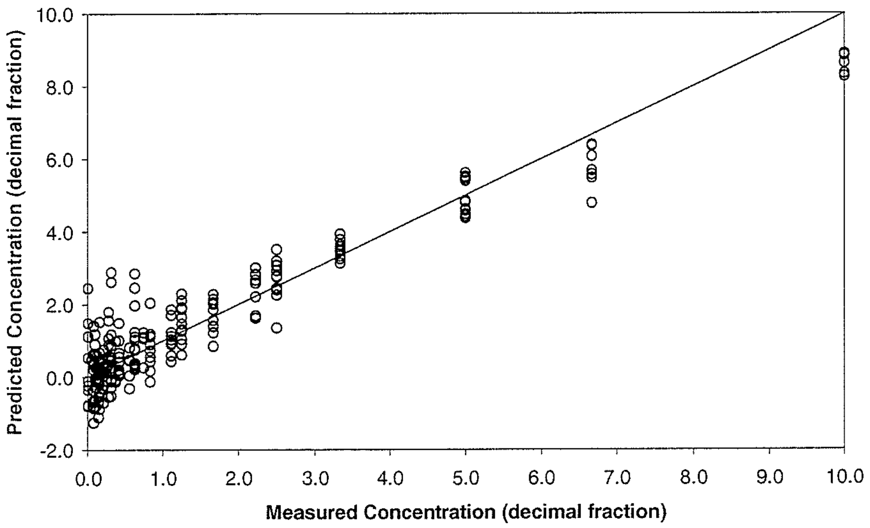
טבלה 3: שגיאת חיזוי סטנדרטית (SEP) ומספר פקטורים של רגרסית PLS של ספקטרום בסיסי וספקטרום מעובד.

	Concentration range		Pathogen	R		1st D		log (1/R)	
	cells/ml	Fractional		SEP	PLS factor	SEP	PLS factor	SEP	PLS factor
Single pathogen (Preliminary)	0.0 – 10^9	0.0 – 1.0	*ECC*	0.070	7	0.092	4	0.053	8
	0.0 –10^{10}	0.0 – 1.0	*CBM*	0.064	9	0.082	5	0.057	9
Single pathogen Narrow range	0.0 – 10^8	0.0 – 0.1	*ECC*	0.024 0.020	9 9	0.025 0.023	5 8	0.023 0.023	7 9
	0.0 – 10^9	0.0 – 0.1	*CBM*	0.023 0.022	7 7	0.023 0.022	5 8	0.023 0.022	4 7
Mixture	***ECC* in *ECC* plus *CBM***			0.024	9	0.026	5	0.025	7
	CBM* in *ECC* plus *CBM			0.023	11	0.026	7	0.025	7

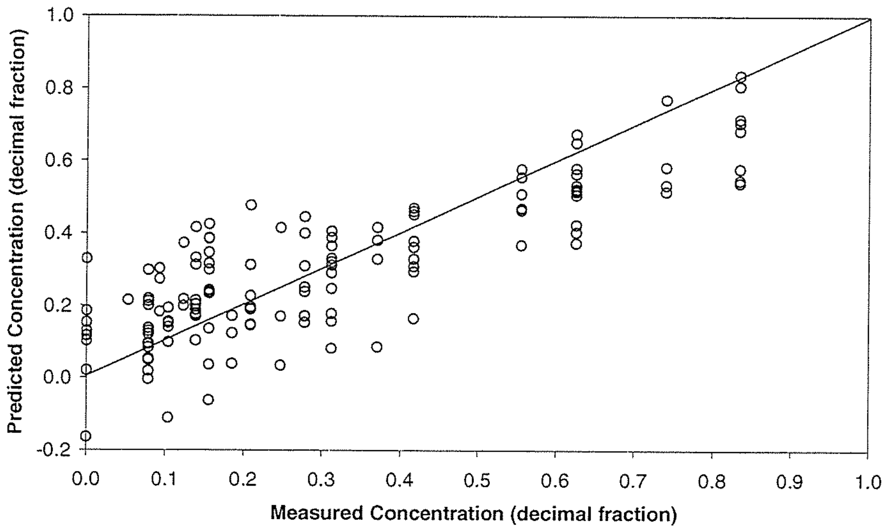
הערך SEP מבוטא כשבר עשרוני של ריכוז תרחיף החיידקים הבסיסי.
השוואה בין המודלים של רגרסית PLS מבוססת על תוצאות SEP שהופקו ממשוואות הרגרסיה הנבחרות. לשם חיזוי של ריכוז החיידקים בתרחיפים המכילים סוג פתוגן יחיד, מדדי PLS הופקו עבור שני תחומי ריכוז: התחום הראשוני, הינו תחום רחב הכולל ריכוז חיידקים שנע בין 0.0 ל- 1.0; והתחום הצר, המעניין יותר וכולל ריכוז חידקים שנע בין 0.0 ל- 0.1.

משוואות של רגרסית PLS חושבו גם עבור תחומי ריכוז נמוכים, אבל השונות של הריכוזים החזויים היה גבוה מסדר-גודל אחד. לכן, שימוש ברגרסית PLS נמצא בלתי מתאים ותוצאותיה אינם מוצגות כאן. גילוי ריכוזים נמוכים מאוד הושג על ידי אנליזת קבוצות, כפי שמתואר בהמשך.

כאשר נעשה שימוש בתחום הריכוזים רחב (0.0 – 1.0) לצורך כיול של המודלים, SEP הגיע לערכים גבוהים יחסית שבין 0.053 עד 0.092. איור 13 הינו דוגמא לייצוג גרפי של תוצאות החיזוי של בקטריה מסוג *ECC* המתקבלת ממודל רגרסית PLS. הקו בשיפוע של 45 מעלות מיצג מודל אידיאלי ופיזור התוצאות סביב הקו מתייחס לשגיאת החיזוי. התוצאות מראות ששגיאות החיזוי בתחום הריכוזים הנמוך, גבוהות יותר מאשר אלו שבתחום הריכוזים הגבוה.

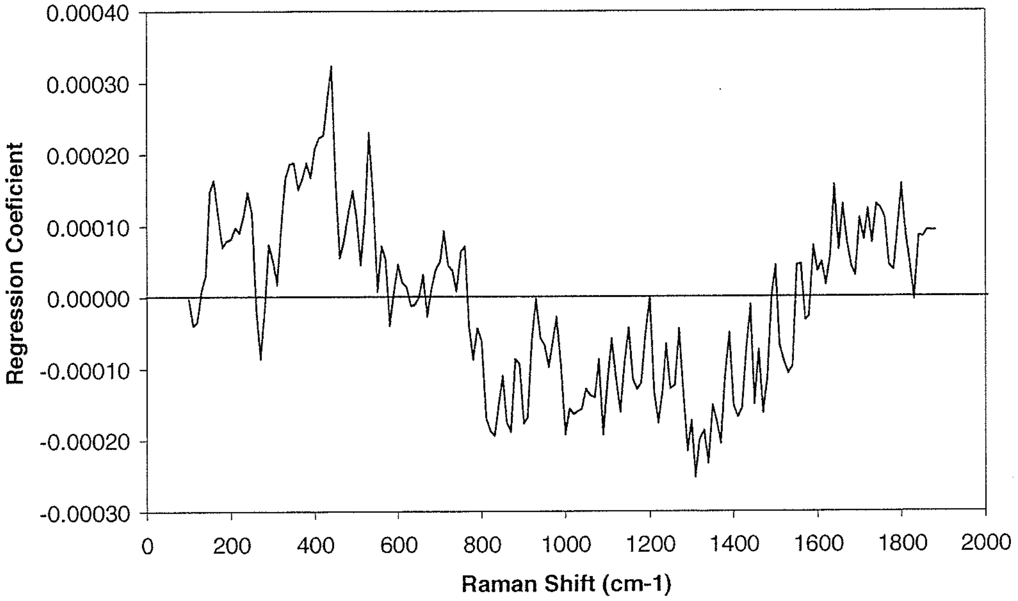


איור 13: מדידה של *ECC* בתמיסה בריכוזים מ- 0.0 עד 10.0 עבור ספקטרום בסיסי, 7 פקטורים של PLS, SEP = 0.07

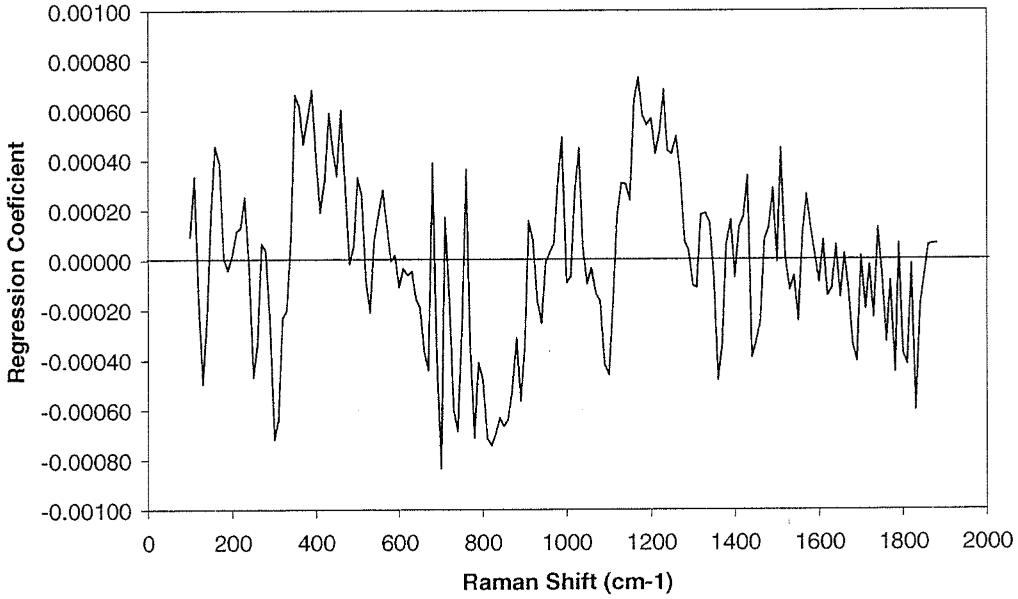


איור 14: מדידה של *ECC*, בתמיסה בריכוזים מ- 0.0 עד 1.0 עבור ספקטרום בסיסי, 9 פקטורים של PLS, SEP = 0.02

כדי למזער את שגיאת החיזוי, נעשה שימוש בנתונים מתחום הריכוזים הנמוך (ריכוזים מ- 0.0 עד 0.1) לצורך בניית המודלים של רגרסית PLS. עבור המודלים החדשים, הערכים של SEP נעו בין 0.020 ו- 0.025, שהוא תחום טוב יותר מזה שהתקבל עבור מודלים המבוססים על תחום ריכוזים רחב. איור 14 מיצג באופן גראפי את תוצאות החיזוי אשר התקבלו עבור *ECC*, עם אחד מהמודלים החדשים של רגרסית PLS. איורים 15 ו-16 מיצגים את מקדמי הרגרסיה שהתקבלו בעזרת מודל המבוסס על הספקטרום הבסיסי של *CBM* ו-*ECC*, בהתאמה. להתוויות של מקדמי הרגרסיה בגרפים המוצגים בהמשך העבודה יש תבניות שונות: התרשים עבור *CBM* מתחלק לשני תחומים עיקריים: מקדמים חיוביים להסטת-ראמאן מתחת ל- 700 cm^{-1} וגדולים יותר מ- 1600 cm^{-1}; מקדמים שליליים של הסטת-ראמאן בין 700 cm^{-1} ל- 1600 cm^{-1}, שם מקדמי הרגרסיה של מודל *ECC* יותר מתחלפים לסירוגין. ייתכן כי ההבדל בין משוואות הרגרסיה עבור שני סוגי החיידקים קיים בשל ההבדלים במבנה התא המיקרוביאלי. בנוסף, טווחי ריכוז של שני סוגי החיידקים שונה, דבר שתורם להבדלים אלו. דיוק החיזוי, כפי שמתבטא בערכי SEP, שופר ב- 0.050 עד 0.070 (תלוי במודל הספציפי) על ידי שימוש בטווח צר של ריכוזים נמוכים (0.0 - 0.1) ברגרסית PLS.



איור 15: מקדם רגרסיה של PLS לספקטרום בסיסי של *CBM* בריכוזים מ- 0.0 עד 0.1, 7 פקטורים, SEP=0.022



איור 16: מקדם רגרסיה של PLS לספקטרום בסיסי של *ECC* בריכוזים מ- 0.0 עד 0.1, 9 פקטורים, SEP=0.020

המודל הטוב ביותר לחיזוי של ריכוז *ECC* על פי קריטריון SEP (SEP=0.020), התקבל ממודל ספקטראלי של ספקטרום בסיסי בריכוזים מ- 0.0 עד 0.1

וספקטרום בסיסי עם 9 משתני PLS. המודל הטוב ביותר לחיזוי של ריכוז *CBM* היה SEP = 0.022, והתקבל באמצעות שימוש באותם הריכוזים (מ- 0.0 עד 0.1) וספקטרום בסיסי עם 7 משתני PLS. ערכי SEP היו דומים עבור שני סוגי החיידקים.

יש לציין כי המודלים אשר נבנו מהנגזרת הראשונה של הספקטרום הבסיסי דרשו לדחות מעט יותר נתונים חורגים מאשר המודלים שנבנו על הספקטרום הבסיסי. בין 5 ל- 9 אחוז של הדגימות נדחו כנתונים חורגים, זהו תחום מקובל על פי קריטריון דחיית נתונים חורגים. התוצאות המוצגות כאן מבוססות על כל שאר הנתונים.

מודלים נוספים של PLS פותחו כדי לחזות ריכוז חיידקים בתרחיפים אשר מכילים תערובת של שני סוגי חיידקים. הריכוזים של תרחיפי חיידקים נעו בין 0.0 ל- 0.3, קרוב לטווח הריכוזים הצר והנמוך של התרחיפים עם סוג יחיד של חיידקים. תוצאות החיזוי (ערכי SEP) עבור תרחיף מעורב משני סוגי החיידקים; *ECC* ו-*CBM*, התקבלו בתחום של 0.023 עד 0.026. ערכים אלו דומים לערכים שהתקבלו מתרחיפים עם סוג חיידק יחיד (טבלה 3). אפשר להסיק מהתוצאות כי מודל PLS שנתקבל מגלה את התרומה האופיינית של כל סוג החיידק התואמת את מידת הסטת-ראמאן של חיידק זה. למרות שספקטרום הסטת-ראמאן של תרחיף מעורב מכיל תרומה חופפת של שני סוגי החיידקים, המודל חזה בהצלחה את הריכוז של כל חיידק בדיוק דומה לזה שהתקבל בתרחיף המכיל סוג חיידקים יחיד.

5.1.3. גילוי נוכחות הפתוגנים

אנליזת מיון שימשה לגילוי נוכחות חיידקים בתרחיף ללא קביעת ריכוזם. טבלה 4 מתארת מטריצה להפרדה בין דגימות ללא חיידקים ודגימות עם חיידקים מסוג *ECC* ו- *CBM*. כלל הדגימות ללא חיידקים, 28 במספר, נמצאו מסווגים נכון כנקיים מחיידקים וכלל הדגימות המכילות חיידקים, 289 במספר, זוהו נכון כמזוהמים. אפשר לראות את ההפרדה הקנונית לפי הערך אשר שווה אפס למספרים שאינם נמצאים על האלכסון של המטריצה. שיטה זו מראה הפרדה ברורה בין דגימות המכילות חיידקים ודגימות נקיות מחיידקים.

טבלה 4: אנליזת מיון של דגימות עם וללא חיידקים בתמיסה באמצעות נגזרת ראשונה של הספקטרום הבסיסי עם 9 משתני PLS

		Lab Group	
		bacteria-free	bacteria-containing
Predicted Group	bacteria-free	28	0
	bacteria-containing	0	289
Total bacteria number		28	289

נעשה שימוש בתרחיפים המכילים חיידקים לזיהוי סוגי תערובות לפי ארבע קבוצות אשר הוגדרו קודם לכן באיור 10 כאזורים A, B, C ו-D. טבלה 5 מייצגת תוצאות המיון בצורה של מטריצה מורכבת. האלמנטים האלכסוניים, משמואל-מעלה לימין-מטה, מתארים תוצאות מדויקות של הפרדה ובאופן אידיאלי, סיכומם אמור להיות שווה לסך כול הדגימות. ערכם של האלמנטים אשר אינם על האלכסון המרכזי אמור להיות אפס. מצד שני, ככל שערך האלמנטים שאינם נמצאים על האלכסון המרכזי גבוה יותר, כך גדולה יותר שגיאת הגילוי.

טבלה 5: אנליזת מיון של *CBM* ו-*ECC* בטווחי ריכוז בין 0.01 עד 0.30

		Lab group – range 0.01-0.30			
		A	B	C	D
Predicted group	A	207	9	2	3
	B	1	14	1	1
	C	0	6	24	3
	D	0	1	3	14
Total bacteria number		208	30	30	21

הדיוק של כל קבוצה חושב כיחס בין האלמנטים הנמצאים על האלכסון המרכזי וסך הדגימות בקבוצה. קבוצות A, B, C ו-D זיהו הפרדה בדיוקים של 99.5%, 47%, 80% ו- 67%, בהתאמה. עבור הקבוצות A ו- C, התוצאות הללו יכולת להיחשב כבעלות דיוק זיהוי גבוה מאחר ומספר האלמנטים מחוץ לאלכסון היה

נמוך מאוד או אפס. הזיהוי של קבוצה B היה בעל הדיוק הנמוך ביותר מאחר ורק 14 דגימות זוהו נכון מתוך 30 דגימות (47%).

במטרה לזהות חיידקים בריכוזים נמוכים ביותר, חולקה קבוצה A (בטווח ריכוזים של 0.01 עד 0.10 וכוללת 208 דגימות) לשלוש תת-קבוצות, המסומנות: A_B, A_C ו-A_D. ריכוזי החיידקים לכל תת-קבוצה מתוארים באיור 10. טבלה 6 מציגה את תוצאות אנליזת הסיווג להבחנה בין שלוש תת-הקבוצות עם הריכוזים הנמוכים ביותר; הדיוקים של תוצאת הסיווג בקבוצות A_B, A_C ו-A_D היו 72%, 86% ו- 50%, בהתאמה. לתת-קבוצות A_B ו- A_C תוצאות אלו נחשבות כבעלות דיוק זיהוי גבוה. את הדיוק הנמוך בסיווג קבוצה A_D אפשר לייחס למספר מועט של דגימות בקבוצה. לכן, השיטה מספקת הבחנה טובה בין קבוצות בריכוזים שונים של חיידקים, וברוב המקרים, במספר נמוך של טעויות בזיהוי נכון.

טבלה 6: אנליזת מיון של *CBM* ו-*ECC* בטווחי ריכוז בין 0.01 עד 0.10

		Lab group– range 0.01-0.10		
		A_B	**A_C**	**A_D**
Predicted group	**A_B**	66	10	0
	A_C	26	80	11
	A_D	0	3	11
Total bacteria number		92	93	22

יכולת המערכת לזהות חיידקים מסוג *ECC* ו- *CBM* בתרחיפים עם ריכוזים נמוכים (10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 ואפס CFU למ"ל) מוצגת בהמשך. טבלה 7 מתארת את ריכוז התוצאות של אנליזת מיון שנוצרו באמצעות הנגזרת הראשונה של הספקטרום הבסיסי עם עשרה משתני PLS.

טבלה 7: אנליזת מיון של *CBM* ו- *ECC*בטווחי ריכוז בין 10^2 עד 10^6 CFU למ"ל

		Lab group of *CBM* (cells/ml)					
		10^6	**10^5**	**10^4**	**10^3**	**10^2**	**0**
Predicted group (cells/ml)	**10^6**	19	7	1	0	0	0
	10^5	3	17	1	0	0	0
	10^4	2	0	21	2	0	0
	10^3	0	0	1	21	4	0
	10^2	0	0	0	1	18	1
	0	0	0	0	0	2	11
Total bacteria number		24	24	24	24	24	12
		Lab group of *ECC* (cells/ml)					
		10^5	**10^4**	**10^3**	**10^2**	**10^1**	**0**
Predicted group (cells/ml)	**10^5**	27	5	0	0	0	0
	10^4	3	25	4	1	0	0
	10^3	0	0	19	1	0	0
	10^2	0	0	7	23	6	0
	10^1	0	0	0	5	24	2
	0	0	0	0	0	0	13
Total number		30	30	20	30	30	15

באמצעות אנליזת מיון נמצא כי בריכוזים נמוכים של חיידקים מסוג *CBM* ו- *ECC* אפשר להשיג הבחנה טובה בין קבוצות עם ריכוזים שונים של חיידקים. אחוז זיהויים נכונים לקבוצות עם מגוון ריכוזים נע בין 63% ל- 93%, ודומה לשני סוגי החיידקים *ECC* ו- *CBM*. רוב השגיאות זיהוי היו בין דרגות ריכוז סמוכות. רק 2% ו- 0.5%, בהתאמה. דגימות של *CBM* ו-*ECC* היו ממוינות בצורה מוטעה לקבוצה אשר נבדלה מריכוזה הנכון ביותר משני יחידות לוגריתמיות; דהיינו היו מעט שגיאות זיהוי בדרגה שנייה. גם כאשר הריכוז הופחת בצורה דרמתית בהשוואה עם מדידות קודמות, הובחן דיוק זיהוי גבוה לכל קבוצות ריכוז.

5.2. גילוי חיידקים על משטח

טבלה 8 מתארת את מטריצת המיון בין דגימות תמיסה ללא חיידקים ודגימות נפרדות של חיידקים מסוג *ECC* ו- *CBM*. אנליזת המיון נערכה על נתונים אשר נתקבלו על ידי הפעלת נגזרת ראשונה על נתוני הספקטרום הבסיסי.

טבלה 8: אנליזת מיון של דגימות עם וללא חיידקים מסוג *ECC* ו- *CBM* על משטח באמצעות נגזרת ראשונה של הספקטרום הבסיסי

			Lab Group		
			bacteria-free	bacteria-containing	
				ECC	*CBM*
Predicted Group	bacteria-free		26	6	0
	bacteria-containing	*ECC*	3	141	11
		CBM	0	9	145
Total bacteria number			29	156	156

ניתן לראות את דיוק הסיווג על פי הערכים אשר נמצאים על האלכסון הראשי של המטריצה יחסית לסך כל החיידקים בקבוצה. על ידי חישוב נמצא כי כ-90% מהדגימות ללא חיידקים, 90% מהדגימות הכוללות חיידקים מסוג *ECC* ו-93% מהדגימות הכוללות חיידקים מסוג *CBM*, זוהו נכון. תוצאות אלו מצביעות על יכולת המערכת מסוג לייזר ראמאן ושיטת עבוד התוצאות להבחין, בדיוק גבוה, בין דגימות נקיות ודגימות המכילות חיידקים וכמו כן, לסווג נכון את הסוגים השונים של החיידקים.

טבלה 9 מציגה את תוצאות אנליזת הסיווג של תרחיפים המכילים ריכוזים נמוכים יחסית (10^4, 10^3, 10^2, 10^1, 10^0 ואפס CFU למ"ל) של חיידקים מסוג *ECC* ו-*CBM*. אנליזת המיון נערכה על נתונים אשר נתקבלו על ידי הפעלת הנגזרת ראשונה על הנתונים של ספקטרום הסטת-ראמאן הבסיסי. מהתוצאות נמצא כי יש הבחנה טובה בין הקבוצות השונות בריכוזים נמוכים יחסית של חיידקים.

טבלה 9: אנליזת מיון של *CBM* ו- *ECC* בטווחי ריכוז בין $10^0 - 10^3$ CFU למ"ל

		Lab group of *CBM* (cells/ml)				
		0	**10^0**	**10^1**	**10^2**	**10^3**
Predicted group (cells/ml)	**0**	12	0	0	0	0
	10^0	3	37	1	0	0
	10^1	0	2	36	4	0
	10^2	0	0	2	30	2
	10^3	0	0	0	5	37
Total bacteria number		15	39	39	39	39
		Lab group of *ECC* (cells/ml)				
		10^5	**10^4**	**10^3**	**10^2**	**10^1**
Predicted group (cells/ml)	**0**	13	2	0	0	0
	10^0	1	36	0	0	0
	10^1	0	1	33	2	0
	10^2	0	0	6	34	2
	10^3	0	0	0	3	37
Total bacteria number		14	39	39	39	39

הטבלה מתארת את תוצאות אנליזת המיון בין ריכוזים שונים של חיידקים מסוג *CBM* בחלק העליון ו-*ECC* בחלק התחתון. קבוצות המיון זוהו בדיוק גבוה לכל קבוצות הריכוז בשני סוגי החיידקים. אחוז הזיהויים הנכונים לקבוצות בריכוזים השונים נע בין 85% ל- 95% ל- *ECC* ובין 77% ל- 95% ל- *CBM*. נראה כי הדיוק שהושג בזיהוי החיידקים משני הסוגים דומה, וההבדל ביניהם אינו משמעותי. כמו כן ניתן לראות כי כל שגיאות הזיהוי נמצאות בדרגות הריכוז הסמוכות (לוג אחד יותר או פחות).

5.3. גילוי שמרים בתוך מיץ תפוחים על משטח

טבלה 10 מייצגת מטריצה הפרדה בין דגימות ללא ועם שמרים (*Saccharomyces cerevisiae*). אנליזת המיון נעשתה על נתונים אשר נתקבלו באמצעות הפעלת נגזרת ראשונה על ספקטרום הסטת-ראמאן בסיסי. כל הדגימות

ללא שמרים (סה"כ 18) סווגו נכון כמיץ תפוחים נקי וכל אלו הכוללים שמרים (156) מזוהים נכון בתור מאולחים בשמרים.

טבלה 10: של אנליזת מיון של דגימות מיץ תפוחים צלול ומיץ מאולח בשמרים באמצעות הנגזרת הראשונה של הספקטרום הבסיסי

		Lab Group	
		yeast-free	**yeast -containing**
Predicted Group	**yeast -free**	18	0
	yeast -containing	0	156
Total yeast number		18	156

מהטבלה ניתן לראות כי מתקבלת הפרדה מלאה בין דגימות המכילות שמרים ודגימות מיץ תפוחים צלול, זאת על פי אפוס הערכים של המטריצה שאינם נמצאים על קו האלכסון.

יכולת מערכת לייזר ראמאן לקבלת ספקטרום האור החוזר ממספר תרחיפים המכילים ריכוזים נמוכים (10^4, 10^3, 10^2, 10^1, 10^0 ואפס CFU למ"ל) של שמרים מסוג *Saccharomyces cerevisiae* בתוך מיץ תפוחים צלול הוצגו בטבלה 11. אנליזת המיון הופעלה על הנגזרת ראשונה של ספקטרום הסטת-ראמאן בסיסי.

טבלה 11: אנליזת מיון של מיץ תפוחים מאולח בריכוזים שונים של שמרים

		Lab group of *Saccharomyces cerevisiae* (cells/ml)				
		0	**10^0**	**10^1**	**10^2**	**10^3**
Predicted group *Saccharomyces cerevisiae* (cells/ml)	**0**	15	0	0	0	0
	10^0	3	39	4	0	0
	10^1	0	0	34	0	0
	10^2	0	0	1	38	0
	10^3	0	0	0	1	39
Total yeast number		18	39	39	39	39

מהטבלה נראה כי בריכוזים נמוכים של שמרים במיץ תפוחים אפשר היה לזהות נכון ובהבחנה טובה בין קבוצות המכילות ריכוזים שונים של שמרים. התוצאות שנתקבלו מראות כי אחוז הזיהוי הנכון של שמרים, בקבוצות הכוללות מגוון ריכוזים, נע בין 83% ל- 100%. כל שגיאות הזיהוי נמצאות בדרגות הריכוז הסמוכות (לוג אחד יותר או פחות). ההפרדה המכסימאלית (100%) התקבלה בריכוזים של שמר יחיד למ"ל ו- 10^3 שמרים למ"ל. כמות של 10^2 שמרים למ"ל זוהו עם דיוק 97% וזה אף נחשב כדיוק גבוה. רק ב- 10 שמרים למ"ל ההבחנה הייתה 87% בשל ההבדל הקטן בין נוכחותם של 10 שמרים למ"ל לשמר יחיד למ"ל, מאותה סיבה זוהתה דגימת מיץ תפוחים טהור בדיוק נמוך ביותר (83%) בין חמשת קבוצות. בסך הכול זוהו השמרים בדיוק גבוה בכל קבוצות ריכוז.

התוצאות אשר נתקבלו במיון של דגימות מיץ תפוחים מתייחסות למודל מזון אמיתי ביצור מיץ התפוחים אשר בו יש בעיה קריטית. השימוש בשיטת הזיהוי והמיון באמצעות טכנולוגיית לייזר-ראמאן בתעשייה עשוי להוביל לפיתוח אמצעים למניעת תסיסה בלתי רצויה במיץ תפוחים או מיץ אחר.

6. דיון

העבודה עוסקת בפיתוח שיטה לגילוי וזיהוי מיקרואורגניזמים בתמיסות הגורמים למחלות המועברות באמצעות מזון. השיטות הקיימות כיום הינם יקרות ודורשות זמן עבוד רב. לדוגמא, שיטת Flow cytometry, שממבט ראשון נראית דומה לספקטרוסקופית ראמאן, מזהה מיקרואורגניזמים בכמות של עד 1 CFU למ"ל ומבדילה בין תאים חיים ומתים (Krutzik et al., 2006), אורכת מספר דקות אך הינה יקרה, מתאימה רק לנוזלים (Nebe-von-Caron, et al., 2000). לספקטרוסקופית ראמאן אין אפשרות להבדיל בין תא מת לחי כמו ב- Flow cytometry, אבל יש אפשרות לבדיקת חומרים מוצקים. בדיקות של חומרים עם מרקם סמיך מוגבלות ביכולת חדירות של הלייזר. הקרנה בלייזר בניגוד להקרנה באור דורשת אמצעי בטיחות מיוחדים. בדיקה בשיטה ספקטרוסקופית ראמאן לוקחת פחות משתי דקות, אבל זה בכל זאת אומר שצריך זמן עירור. לשם ביצוע בדיקות תוך כדי הליך היצור בעתיד צריך למזער זמן עירור.

קיים צורך במציאת שיטה ללא-הרס מהירה, עם אפשרות לקבלת תוצאות תוך כדי ביצוע הליך תעשייתי. שיטה ללא-הרס מולעילות במיון פרטני של פירות, ירקות, ביצים ומוצרי מזון אחרים. בעבודה זו נעשה שימוש בספקטרוסקופית לייזר-ראמאן בה נמדדים אותות ושיאים של הסטת-ראמאן מספקטרום אור חוזר מתמיסה נבדקת. יתרונותיה של שיטה זו היא ברגישותה הגבוהה לשינויים זעירים בהרכב התמיסות תוך כדי שימוש באופטיקה המאפשרת בדיקה ללא הרס. קיימים יישומים של ספקטרוסקופית ראמאן ברפואה בהם נעשה שימוש במיקרוספקטרוסקופית ראמאן קונפוקאלית באבחנה קלינית. באמצעות ספקטרוסקופית הסטת-ראמאן נעשה בהצלחה גילוי וזיהוי של תא פתוגן בודד *מסוג Clostridium acetobutylicum* ATTC 824 הנמצא בתרבית נקייה (Schuster, et al., 2000). גילוי וזיהוי מדויק של חיידקים במזון נערכו בהצלחה באמצעות מכשיר ספקטרוסקופית הסטת-ראמאן בעל רזולוציה גבוהה אשר חסרונו הוא מחירו הגבוה (Sivakesava, et al., 2004). לאחרונה, הפכו לזמינים מכשירי ספקטרוסקופית ראמאן ניידים זולים יחסית (כעשרת אלפים דולר) בעלי רזולוציות נמוכות, בהם מותקנים דיודות לייזר בעלות

אורכי גל קצר המתאים לגילוי הסטת-ראמאן ובאפשרותם לשמש כחלופה למערכות הראמאן היקרות.

בעבודה זו נעשה, בשלב ראשון, גילוי של חיידקים גורמי מחלות בירקות: גרם שלילי *Erwinia Cartovora pv. Cartovora* וגרם חיובי *Clavibacter michiganese*. בשלב השני נערך גילוי וזיהוי של שמרי אפיה מסוג *Saccharomyces cerevisiae* אשר גורמים לקלקול מיץ תפוחים בשל תסיסה בלתי רצויה. המחקר בעבודה זו נערך עם מכשיר מסוג זה בתרחיפים של תמיסות מלח המכילים חיידקים משני סוגים ותערובותיהם וכן בתרחיף של מיץ תפוחים צלול מעורב עם שמרים.

6.1. גילוי וזיהוי חיידקים בתרחיף

לצורך ביצוע הניסויים נעשה שימוש בשני סוגי חיידקים מסוג גרם שלילי (*ECC*) וגרם חיובי (*CBM*). תמיסת מים מלוחים (*Saline*) שימשו כבסיס לתרחיפים הנבדקים.

במחקר קודם שנערך באמצעות עם מכשיר בעל רזולוציה גבוהה ניתן היה להראות טביעות אצבע פשוטות וגלויות לעין, בצורת שיאים, של זנים שונים של *E. coli* (Irudayarj, et al., 2000). בעבודה זו עם מכשיר ראמאן, ברזולוציה נמוכה לא נתקבלו שיאים בעלי משמעות בספקטרום הסטת-ראמאן והעדרם מצביע על כך שלא ניתן להראות טביעות אצבע של חיידקים בתרחיפים הנבדקים. היה צורך להשתמש בשיטות כימומטריות בהן נערך עיבוד נתונים של המידע המתקבל מהאות החוזר של ספקטרום הסטת-ראמאן. שימוש בשיטות כימומטריות מביא למסקנה שלצרכים תעשייתיים יש צורך לבניית ספריה לזיהוי של מיקרואורגניזמים, אשר תענה לדרישות ספציפיות של כל מפעל מזון. אנליזה של הדגימות דרשה שימוש בחילוץ תוצאות חריגות בלתי אופייניות. נמצא כי במודלים של תרחיפים בריכוזים גבוהים של חיידקים נדרשה הוצאה של חריגים רבים יותר מהמודלים של תרחיפים עם ריכוזי חיידקים נמוך. בעבודה הנוכחית נמצא כי טיפול מתמטי בתהליכי כיול וחיזוי מוקדמים שנערכו בספקטרום ראמאן, לא הניבו כל יתרון משמעותי לעומת השימוש בספקטרום אשר לא עבר עיבוד כזה. בכל זאת, יש להתייחס לעיבוד כזה בעתיד מאחר והוא מציע הפחתת פוטנציאלית של רעשים

במודל ויאפשר הורדת מספר היוצאים מן הכלל בתוצאות המדידה והורדת מספר הפקטורים הנדרשים במודל.

הטעות שנמצאה בחיזוי ריכוזי החיידקים נעה בין 5% ל- 9% יחסית לתרחיפים בסיסיים בהם ריכוזי החיידקים גבוהים יחסית. שגיאת החיזוי הופחתה בערך של כ- 2% עבור ריכוזים נמוכים יותר.

השימוש באנליזת מיון אפשרה לגלות את נוכחותם של חיידקים מסוגים *ECC* ו- *CBM*, הנבדקים בתרחיפים המכילים בין 10 ל- 100 CFU למ"ל של *ECC* ו- *CBM*, בהתאמה. לשיטת העכבה החשמלית רגישות גבוהה של עד 10 CFU למ"ל, אך היא צורכת זמן ניכר ונדרשים עבורה תנאיי מעבדה מיוחדים שגורים לתוספת עלות הבדיקה (Gómez-Sjöberg, et al., 2005).

דיוק הבדיקה בעזרת ספקטרוסקופית ראמאן ומהירותה מראה כי יש לה יכולת פוטנציאלית גבוהה לזיהוי נוכחות פתוגנים במוצרי מזון ולענות בכך על דרישות איכות של התעשייה.

6.2. גילוי חיידקים בתרחיף מים מלוחים על משטח

בשלב שני של המחקר נבחנה אפשרות לגלות חידקים מסוג *ECC* ו- *CBM* בטיפת תרחיף *Saline* הנמצאת על פני משטח זכוכית. ניסויים על פני המוצק נועדו לבדוק יכולת של ספקטרוסקופית ראמאן לבדוק פני שטח של מוצקים, הדבר אינו אפשרי בשיטות מתקדמות כמו Flow cytometry (Nebe-von-Caron, et al., 2000) או עכבה חשמלית (Gómez-Sjöberg, et al., 2005).

נמצא כי ניתן לגלות את נוכחות החיידק הנבדק ומידת ריכוזו בתרחיפים בהם יש עד תא בודד למ"ל, עם 10% טעות. בניסויים אלו נמצא כי רגישות הזיהוי הייתה גבוהה יותר מאלו אשר נעשו בבקבוק. רגישות בסדר גודל כזה חשובה מאוד בתעשיית מזון. העבודה על פני משטח הזכוכית מראה כי יש פוטנציאל לביצוע בדיקות בלתי הרסניות של פני מוצר מזון כמו פירות, ירקות, ביצים או גבינות.

6.3. גילוי שמרים בתרחיף מיץ תפוחים על משטח

בשלב שלישי של המחקר נבחנה המערכת והשיטה עם מיץ תפוחים צלול ומיץ מאולח בשמרים בכדי להעריך את אפשרות השימוש בה במוצרי מזון.

מעיבודים נמצא כי ניתן לגלות נוכחות שמרים במיץ תפוחים מאולח הנמצא על פני משטח עם אמינות גבוה מאוד 96% בריכוזים נמוכים של שמרים. סף גילוי של הבדיקה הינו כ- 1 CFU למ"ל. גילוי זה הינו בעל חשיבות גבוהה ביותר שכן תסיסה בלתי רצויה יכולה להתפתח גם בנוכחות של תא בודד למ"ל. אם משווים שיטה זו עם שיטה מהירה אחרת, שיטת ביולומינציה (ATP), אשר אמינותה גדולה מ-90% ורגישותה עד כ- 200 CFU למ"ל (Trudil, et al., 2000), ניתן להראות שלספקטרוסקופית ראמאן רגישות גבוהה בשני סדרי גודל.

7. המלצות

הממצאים שנתקבלו בעבודה זו יכולים לתמוך בתכנון ניסויים עתידיים ולהביא בכך לפיתוח מערכת ניידת מהירה וזולה יותר. בין השאר, נדרשת עבודה ניסויית נוספת אשר מבוססת על חיישני לייזר אחרים, בתדרים ו/או מקורות אור אחרים. המשך המחקר אמור להתייחס גם לאנליזת FTIR, שלא נעשתה בעבודה זו בכדי לנסות ולצמצם את טווח הפיזור הספקטראלי. מלבד זאת, יש לערוך ניסויים עתידיים באמצעות מערכת לייזר ראמאן ברזולוציה גבוהה יותר בכדי לאפשר סף זיהוי מדויק יותר.

רצוי לערוך ניסויים נוספים עם מיקרואורגניזמים שונים בכדי לבנות ספריית נתונים אשר תעזור לתעשייה בזיהוי פתוגנים ומזיקים אחרים.

גילוי ריכוז חיידקים בשיטה זו עשוי להועיל בהליכי ייצור של מוצרי חלב כמו יוגורט פרו-ביוטי.

8. רשימת מקורות

Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.* 59: 204_216.

Beuchat, L. R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Food Safety Unit, World Health Organization (WHO/FSF/FOS/98.2).

Biddy, J. and H. Toutenburg. 1977. Prediction and improved estimation in linear models. 16-19. New York, NY: John Wiley & Sons.

Buck, J. W., Walcott, R. R., Beuchat, L. R. 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2003-0121-01-RV

DebRoy, C. and C. Dangler. 1996. Generation of Nucleic Acid Probe Molecules. In *Nucleic Acid Analysis, Principles and Bioapplications*, ed. C.A. Dangler. 31-45. New York, NY: Wiley-Liss Publications.

DebRoy, C., D.B. Bright, M.K., Bhan, R. Kumar, R.A. Wilson, and J. Yealy. 1994. Plasmid encoded DNA fragment developed as a specific gene probe for identification of entero-aggregative *Escherichia coli*. *J. Med. Micro.* 41, 393-398.

Duda, O., P. E. Hart, and D. G. Stork. 2001. *Pattern Classification*, 2nd ed, New York, NY: John Wiley and Sons.

Gómez-Sjöberg, R., D. T. Morisette and R. Bashir. 2005. Impedance microbiology-on-a-chip: Microfluidic bioprocessor for rapid detection of bacterial metabolism. *Journal of Microelectromechanical system.* Vol. 14(4) : 829-838.

Hendra, P., C. Jones and G. Warnes. 1991. Fourier Transform Raman Spectroscopy – Instrumental and Chemical Applications. New York, NY: Ellis Horwood.

Hill, W.E. 1996. The polymerase chain reaction: Applications for the detection of foodborne pathogens. *Crit. Rev. Food. Sci.* 36 (1-2): 123-173.

Holt, C., D. Hirst, A. Sutherland, and F. McDonald. 1995. Discrimination of species in the genus Listeria by Fourier Transform infrared spectroscopy and canonical variate analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* Jan. 377-378.

Irudayaraj, J., Yang, H., and Sivakesava, S. 2000. Characterization of surface coating and microorganisms on the surface of fruits. *Applied Spectroscopy* 55 (5):310-329.

Jarvis, R., A. Brooker, and R. Goodacre. 2004. Surface-enhanced Raman spectroscopy for bacteria discrimination utilizing a Scanning Electron Microscope with a Raman spectrometry interface. 76:5198-5202.

Kilbride, B., Sheridan, J.J., McDowell and Blair, I.S. 2000. A rapid membrane immunofluorescent viability staining technique for the detection of Salmonella spp. from fresh and processed meat samples. *Journal of Applied Microbiology* 89: 587-594.

King, E. O., M. K. Ward and D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.

Krutzik P.O. and G.P. Nolan. 2006. Fluorescent cell barcoding in flow cytometry allows high-throughput drug screening and signaling profiling. *Nature Methods.* 3: 361 – 368.

Levine, M.M., Y. Jian-guo, J.B. Kaper, H. Lior, V. Prado, B. Tall, J. Nataro, H. Karch, I.K. Wachsmuth and C. Roggs. 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagiccolitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 156:175-182.

Madigan, M.T., J.M. Martinko and J. Parker. 1997. Brock Biology of microorganisms. Eight edition. New Jersey, Prentice-Hall, Inc.

Maquelin, K., L.P. Choo-Smith, T. van Vreeswijk, H.P. Endtz, B. Smith, R. Bennett, H.A. Bruining, and G.J. Puppels. 2000. Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium. *Anal Chem.* 72: 12-19.

Martens, H. and T. Naes. 1989. *Multivariate calibration.* 97-165. New York, NY: John Wiley & Sons.

Mengaud, J., Vicente, M.F., Chenevert, J., Pereira, J.M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C., and Cossart, P. 1988. Expression in Escherichia coli and sequence analysis of listeriolysin O determinant of Listeria monocytogenes. *Infection and Immunity* 56: 4, 766-772.

Naumann, D., H. Labischinski, D. Helm, and P. Giesbrecht. 1990. The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), p. 43-96. In W.H. Nelson (ed.), Modern techniques for rapid microbiological analysis. VCH Publishers, New York, N.Y.

Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA. 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods.* 42:97-114

Oyofo, B.A., Thornton, S.A., Burr, D.H., Trust, T.J., Pavlovskis, O.R. and Guerry, P. 1992. Specific detection of Campylobacter jejuni and Campyobacter coli by using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 2613-2619.

Paton, A.W. and Paton, J.C.1998 Detection and characterisation of shiga toxigenic Escherichia coli by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfbO11, and rfbO157. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 598-602.

Rose, M.D., F. Winston, and P. Hieter. 1990. Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Rousseeuw, P.J. and B.C. van Zomeren. 1990. Unmasking multivariate outliers and leverage points. *JASA* 85:633-651.

Schmilovitch, Z., A. Mizrach, G. Kritzman, R. Korotic, J. Irudayaraj, and C. Debroy. (2005). Detection of food borne pathogens using Raman spectroscopy. *Transactions of the ASAE*. Vol. 48(5) :1-8.

Schuster, K.C., E. Urlaub, and J.R. Gapes. 2000. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: information on the chemical composition of cells and heterogeneity in a culture. *Journal of Microbiological methods*. 42: 29-38.

Sivakesava, S., J. Irudayaraj, and C. Debroy. 2004. Differentiation of microorganisms by FTIR-ATR and FT-NIR spectroscopy. *Transactions of the ASAE*. 7(3):951-957.

Steinkraus, K. H., Ed. (1995). Handbook of Indigenous Fermented Foods. New York, Marcel Dekker, Inc.

Trudil, D., L. Loomis, R. Pabon, J. A. K Hasan, and C. L. Trudil. 2000. Rapid ATP method for the screeningand identification of bacteria in food and watersamples. International conference "Biocatalysis-2000: Fundamentals&Applications", June 10-15, 2000, Moscow, Russia.

Tsen, H.Y., Liou, J.W. and Lin, C.K. 1994. Possible use of a polymerase chain reaction method for the specific of Salmonella in beef. *Journal of fermentation and Bioengineering* 77, 137 - 143.

נספח 1: אלגוריתם של איבוד נתונים ע"י PLS

שלבי העבודה הם כדלקמן:

1. יש לשמור את הנתונים בתכנת Excel בתבנית (format) - (Tab delimited) Text-

filename.txt.

הערה: ניתן לשמור בקובץ אחד- ספקטרה ורכיבים או רכיבים בקובץ נפרד filename1.txt filename2.txt.

2. פתח תכנת MATLAB (קליק כפול על האייקון)
3. יש להכניס את הנתונים ל-MATLAB ע"י פקודה Import Data. הפקודה תייצר מטריצות, לכל מטריצה יש לתת שם נפרד. נסמן את מטריצת הספקטרומים T ומטריצת רכיבים ing (כגון TA, TSS, firmness).

```
T=filename1;
ing=filename2;
```

<u>הערה:</u> כאשר יש בקובץ אחד- ספקטרה ורכיבים.

לדוגמא: שורה ראשונה אינדקס מספרים רץ,ושורה 2 רכיב ושורה שלישית עד שורה n ספקטרום נרשום:

```
T=filename (3:n,:);
ing=filename (2,:);
```

4. **פקודות לעיבוד מתמטי של נתונים:**

נגזרת ראשונה - (חלון חישוב 5 נקודות, פולינום 1, נגזרת ראשונה)	Td1=savgol(T,5,1,1);
לוגריתם – פונקצית min מבטלת מספרים שליליים (נובעים מרעש ותיקון יתר לחושך)	Tlog=log(1./T+(min(min(T))));
נגזרת שנייה של לוגריתם – (חלון חישוב 5 נקודות, פולינום 3, נגזרת שנייה)	Td2=savgol(Tlog,5,3,2);

5. להפעלת PLS כותבים את הפקודה: modlgui. בפקודה זו נפתחים שני חלונות:

Regression Parameters -ו Linear Regression

6. בחלון Linear Regression בוחרים MOLD_File ואח"כ בחלון זה- Load Data.

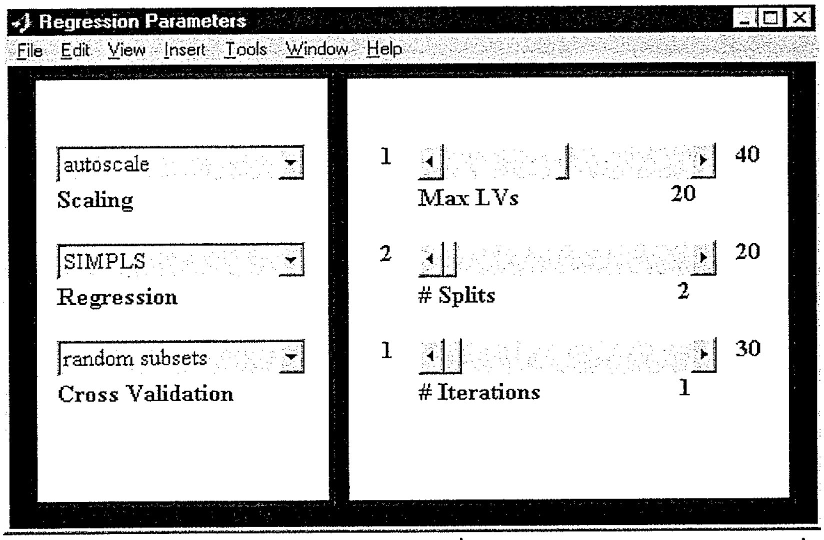
מעלים קודם את T אחר כך את ing.

7. בחלון Regression Parameters

7.1. ב- Cross Validation בוחרים אחת האפשריות לדוגמא: leave one out.

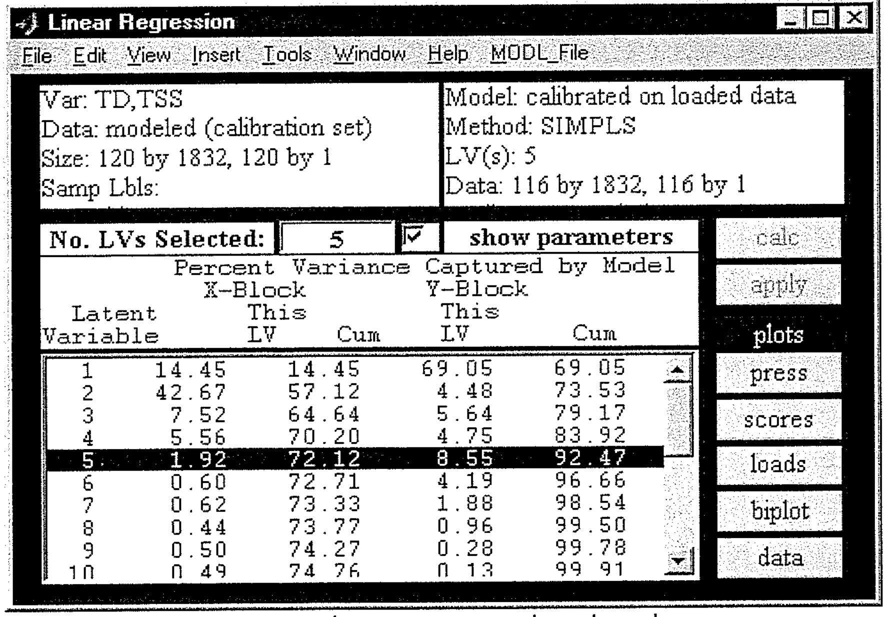
(אפשר גם אחרות ראה ציור)

7.2. ב- Max LVs לוקחים 10% מגודל (מספר הדוגמאות)-T.

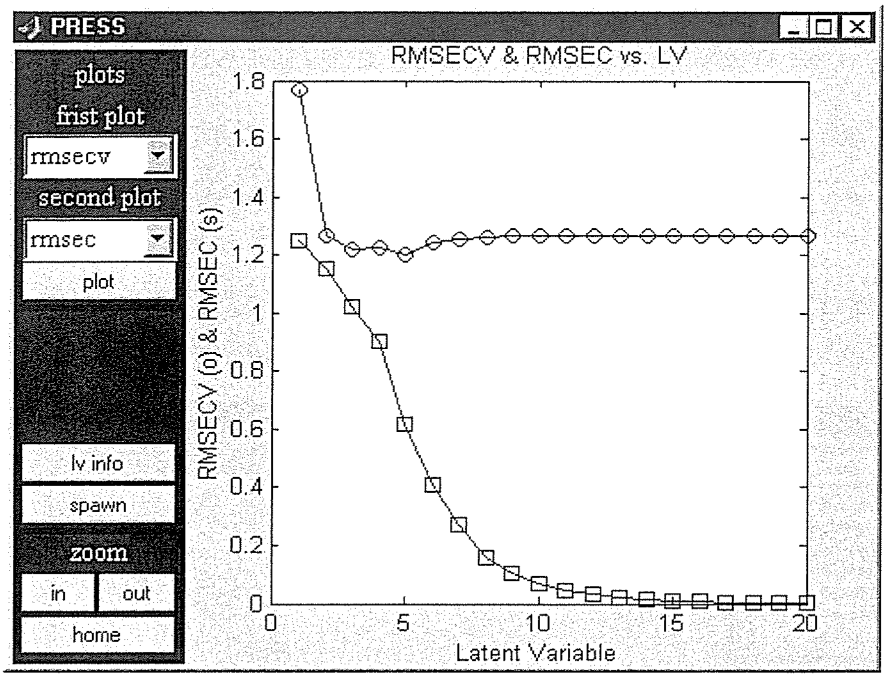


8. לוחצים calc, זו פקודת חישוב מודל. המחשב מוצא נקודה מינימאלית ומסמן בטבלה בכחול.

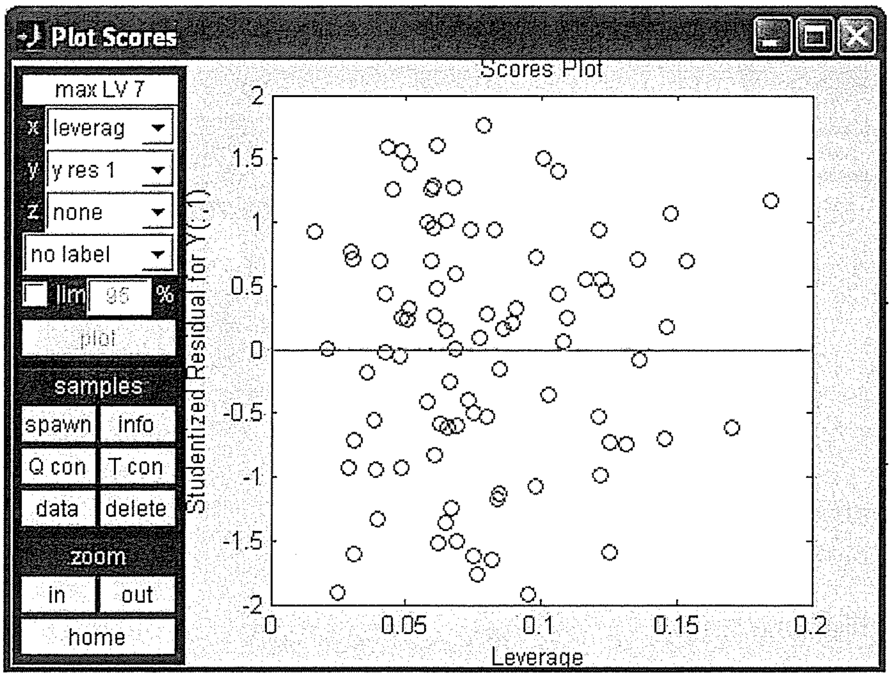
כדי לבדוק האם מתאים לקחת את נקודה המומלצת קודם מסתכלים על העמודה האחרונה, אשר מראה אחוזים של אוכלוסיית המדגם המתוארת על ידי המודל, במקרה אידיאלי מקבלים בין 85% ל-95% .



המדד השני הוא גרפי. לקבלתו לוחצים press. לפי הגרף המתקבל אפשר לבחור נקודה שלפי דעתכם יותר מתאימה (החלטה על סמך ניסיון).



9. לוחצים scores, בחלון הנפתח (Plot Scores) בוחרים עבור X במקום LV1 את leverageועבור Y במקום LV2 בוחרים y res 1 ולוחצים plot מקבלים פיזור, אשר אמור להיות בגבולות מ-2 עד 2- ומאפס עד 0.2.

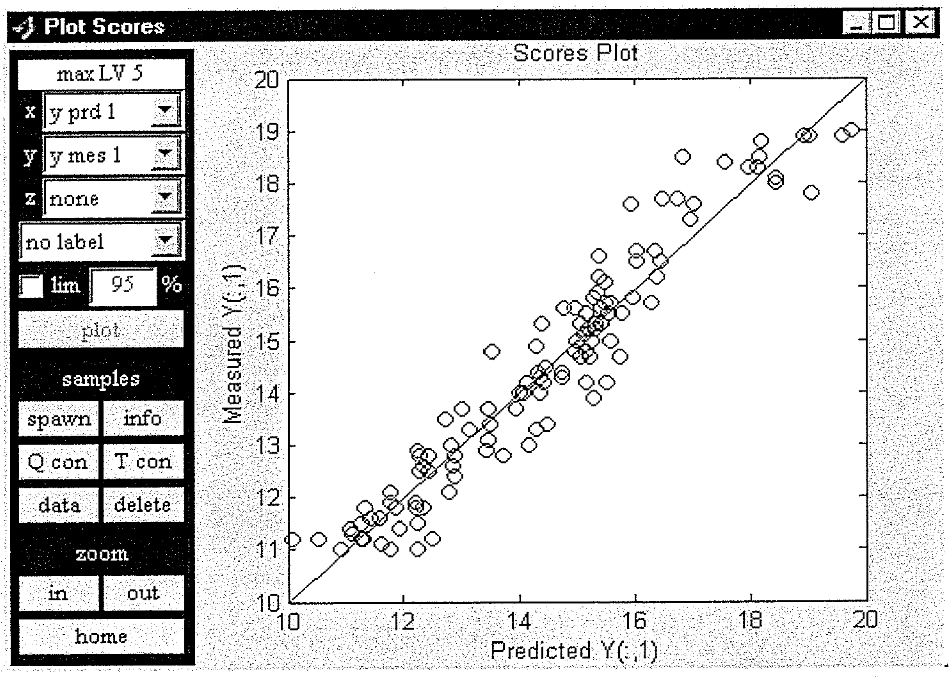


10. כאשר ישנן נקודות אשר חורגות מן הגבולות, מגדירים אותם כיוצאים מן הכלל ומוחקים.

הערה: לא למחוק יותר מ-10% מה-T!
חוזרים לסעיף 7. על הפעולה חוזרים עד לקבלה גבולות הנדרשות או עד שמוחקים 10% מה-T.

11. לוחצים scores, בחלון הנפתח (Plot Scores) בוחרים במקום LV 1 y mes ובמקום LV 2 בוחרים y prd 1 ולוחצים plot מקבלים גרף התאמה בין בדיקה ספקטראלית והרסנית.

12. לוחצים spawn ומקלים גרף שאפשר להכניס בו כותרות, לשמור כגרף ב-MATLAB או ע"י בחירת Export בתפריט File לשמור כתמונה.



13. חוזרים לחלון Linear Regression וב- MOLD_File בוחרים Save Model.

14. יוצרים קובץ Excel בתבנית Text מ- MATLAB

בכדי לראות את רשימת הרכיבים שלו:
Modelname + enter
כל רכיב אפשר לקבל ע"י:
Modelname.item
ולכן:

```
Y= modelname.ypred
X=delsamps(ing, modelname.drow)
p=[X Y];
wk1write ('filename.txt',p)
```

נספח 2: אלגוריתם של אנליזת מיון "Cluster analyses"

שלבי העבודה הם כדלקמן:

1. יש לשמור את הנתונים בתכנת Excel בתבנית (format) - (Text (Tab delimited- filename.txt.

   הערה: ניתן לשמור בקובץ אחד- ספקטרה ורכיבים או רכיבים בקובץ נפרד filename1.txt filename2.txt.

2. פתח תכנת MATLAB (קליק כפול על האייקון)

3. יש להכניס את הנתונים ל-MATLAB ע"י פקודה Import Data. יש בקובץ אחד- ספקטרה ורכיבים.

   לדוגמא: שורה ראשונה אינדקס מספרים רץ,ושורה 2 רכיב ושורה שלישית עד שורה n ספקטרום נרשום:

```
SpT =filename (3:n,:);
ing=filename (2,:);
```

4. **תוכנות אשר חייבות להיות בתיקיה על מנת לבצע מיון:**

   Prepare_data, erro_matr, Run_models

5. **פקודות לעיבוד מתמטי של נתונים:**

נגזרת ראשונה - (חלון חישוב 5 נקודות, פולינום 1, נגזרת ראשונה)	SpT d1=savgol(SpT,5,1,1);
לוגריתם – פונקצית min מבטלת מספרים שליליים (נובעים מרעש ותיקון יתר לחושך)	SpT l=log(1./ SpT +(min(min(SpT))));
נגזרת שנייה של לוגריתם – (חלון חישוב 5 נקודות, פולינום 3, נגזרת שנייה)	SpT d2=savgol(SpT l,5,3,2);

6. **התאמת קוד לקבוצות מיון:**

   לדוגמא:

```
CodeT=(ing==0)*1+(ing>0&ing<=0.1)*2+(ing>0.1&ing<=0.2)*3;
```

7. **לשמור קובץ בשני צורות:**

עם שם	save filename
בלי שם	save

שמירה בלי שם נותנת **matlab.mat** שהוא הכרחי להרצת תוכנה.

8. פקודה לשמירת תוצאות: **diary('filename.txt')**

לאחר מכן מריצים תוכנת Prepare_data

פקודת סוף שמירה **diary off**

Detection of food borne pathogens using Raman spectroscopy

M.Sc. Thesis

Submitted to the Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences
The Hebrew University of Jerusalem
For The Degree
'Master of Science'

By

Raya Korotic

Rehovot June 2006

The Thesis Was Done Under The Supervision of

Dr. Roni Shapira
Institute of Biochemistry, Food Science and Nutrition
Faculty of Agricultural Science, Food and Environment
The Hebrew University of Jerusalem

Dr. Amos Mizrach
Institute of Agricultural Engineering
Agricultural Research Organization
Volcani Center

Acknowledgments

I would like to acknowledge gratefully my supervisors, D.Sc Amos Mizrach and Ph.D Roni Shapira, for their clear guidance. The many valuable discussions, attention to details, patience and encouragement when most needed, enabled me to complete this work.

To my associates Ph.D Ze'ev Schmilovich and Ph.D Victor Alchanatis for their assistance in this work.

I thank my husband, Gennady, and our mothers, Rita and Galina, for support and endless help.

Contents

List of figures **6**

List of tables **7**

Abstract **8**

List of symbols and shorts **10**

1. Introduction **11**

1.1. Microorganisms in food 11

1.1.1. Microorganisms in the research 11

1.1.1.1. Description of bacteria of *Erwinia* type 12

1.1.1.2. Description of bacteria of *Clavibacter* type 12

1.1.1.3. Description of yeast of *Saccharomyces* type 13

1.1.2. Foundation for detection food born bacteria 14

1.2. Method for detection and identification microorganisms 15

1.2.1. Culturing on selective medium 15

1.2.2. Biochemistry methods 16

1.2.2.1. Absorption of light that have been emitted from ATP molecule 16

1.2.2.2. Absorption of emitted light by Flow cytometry 16

1.2.2.3. Electrical impedance 17

1.2.3. Detection of DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) 18

1.2.4. Immunological methods 19

1.2.5. Spectroscopic methods 20

2. Objective **24**

3. Materials and methods **25**

3.1. Materials 25

3.1.1. Company addresses 25

3.1.2. Microorganisms 25

3.1.3. Nurturing media 25

3.2. Spectroscopic layout 26

3.2.1. Test layout of solution in bottle 27
3.2.2. Test layout of solution on glass surface........................27
3.3. Preparation of growth curve 29
3.4. Preparation samples of suspension...................................... 29
3.4.1. Dilution of suspension with bacteria........................... 29
3.4.2. Dilution of suspension with yeast.............................. 31
4. Work procedure 32
4.1. Procedure of Raman Spectrum tests 32
4.2. Spectral analysis of data.. 32
5. Results 34
5.1. Detection of pathogenic bacteria in suspension..................... 34
5.1.1. Characteristic spectrum.. 34
5.1.2. Prediction of pathogens concentration........................ 35
5.1.3. Detection of pathogen presence................................ 39
5.2. Detection of bacteria on surface.. 43
5.3. Detection of yeast in apple juice on surface 44
6. Discussion 47
6.1. Detection and identification of bacteria in suspension............ 48
6.2. Detection of bacteria in saline solution on surface 49
6.3. Detection of yeast in apple juice solution on surface 49
7. Recommendations 50
8. References 51

Abstract

Food is an ideal medium for development of microorganisms, part of them are useful for production of food products, such as *Lactobacillus bulgaricus* (useful bacteria yogurt production), and part of them cause food damage, such as *Brenneria paradisiacal* (bacteria cause banana disease).Pathogen bacteria are well known microorganisms, for example *Salmonella*, bacteria that related a lot to food contamination as a result of impropriate hygiene in the kitchen. Data collected by the state food service of Israel shows that there are about 3000 to 5000 incidents in a year of diseases that caused by contaminated food, such as *Campylobacteriosis, Salmonellosis, Shigellosis* and food poisoning causing by *Staphylococcus, Clostridium* and *Bacillus cereus*.

Maximal level of microorganisms in food specified in Israeli standards, therefore there is a requirement for a serial testing with accurate methods. The most common method today for detection and identification of microorganisms in the food industry is culturing on general and selective medium, also thee are relatively modernistic methods Flow cytometry, Electrical impedance, test of biolumination (*Adenosine triphosphate*), genetic and immunological tests. Those methods are expensive and labor intensive. Spectroscopic methods are described in this research as rapid and easy for use, relatively to microbiological and biochemical methods. Raman spectrophotometers with high resolution are very expensive. Recently were developed Raman spectrophotometers with low resolution and relatively inexpensive. Raman spectroscopy based on processing of typical spectrum of chemical bond in tested food product. Spectrum of light returned from liquid and above surface can be tested by the sensors in short time. Method of measurement by this type of device, which was developed in Agricultural Research Organization, suggesting to use it as a tool for detection of

microorganisms in food. Method is rapid, relatively inexpensive, and accurate, and can be caring out during production process.

The objective of the work is to evaluate the ability of low-resolution dispersive Raman spectroscopy to detect the presence of microorganisms in food products.

The present study focused on number research directions: detection of bacteria in saline solution; detection and identification of bacteria in drop of saline solution, located on glass surface; detection and identification of yeast in drop of apple juice solution, located on glass surface.

Research observations leading to conclusion that, simple Raman shift fingerprints were not found, which suppose to be expressed by peaks of wavelength of Raman shift, for bacteria and yeast in solutions of low-resolution Raman dispersive spectra. In such instances chemometric methods should be used, along with data pretreatment. Pretreatment of Raman-shift spectra for each experiment in the research has done by statistical methods such as Partial Least Squares and Cluster analysis. By those methods, it's possible to determinate concentration of bacteria and yeast in solution of saline and apple juice, relatively. In saline solution it's possible to distinguish between different types of bacteria at a sensitivity of 100 cells per ml. Yeast in apple juice were detected at a sensitivity of one cell per ml. Since unnecessary fermentation which caused by yeast can happen also in presence of one yeast-cell only, it's important to detect it in such a low concentration.

The detection threshold and analytical method in Raman spectroscopy to identification microorganisms with high sensitivity by low-resolution device, quite cheap, rapid and easy to operate, brining us to future applications and directions in industry.