**תכנית עבודת גמר מוגשת לאישור**

**תאריך הגשה: ???**

**שם הסטודנט: אמיר נקר**

**ת.ז: 305712952**

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

**חוג: החוג לביוכימיה ומדעי המזון והתזונה**

זיהוי וכימות חיידקים מהיר במים וחלב באמצעות טכנולוגיית ראמאן ברזולוציה נמוכה

**Rapid Detection and Quantification of Bacteria in Water and Milk Using Low Resolution Raman Technology**

**אישור התוכנית:**

**תאריך:**

**חתימת הסטודנט:**

**חתימת המנחה:**

**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 Escherichia, Salmonella, Legionella ועוד הגורמים למחלות בדרכי העיכול, מחלות עור ועוד [1]. מדי שנה, כ-900,000 בני אדם נפגעים מזיהום מיקרוביולוגי של מי שתיה בארה"ב בלבד (ref CDC).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-פילטרציה 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 מסננים 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 סוגרים את אספקת המים ומספקים ממקור אחר עד לפתרון הבעיה. במקרים מסוימים בהם לא ניתן לשנות את מקור המים, לדוגמה כאשר הבעיה היא בצנרת מקומית, ממליצים לצרכן על הרתחת המים לפני השתייה – ובכך קוטלים את החיידקים[2-5].

האתגרים בתעשיית החלב דומים לאתגרים בתעשיית מי השתייה. הבעיה המרכזית בחלב ומוצריו היא כאשר המוצר מזדהם לאחר שלב הפסטור (אשר אמור להרוג חיידקים פתוגנים) או כאשר הפסטור אינו תקין מסיבה זו או אחרת. במצב כזה, החיידקים מנצלים את הסביבה העשירה וחסרת התחרות ויכולים לזהם את המוצר הסופי באופן כזה שלא יהיה ראוי למאכל [1]. החיידקים הפתוגנים הנפוצים בחלב הם מסוגי Campylobacter, Brucella, Listeria ועוד הגורמים למספר מחלות ואף למוות (ref [CDC](https://www.cdc.gov/foodsafety/rawmilk/raw-milk-questions-and-answers.html)). בתעשיית החלב ידוע כי בחומר הגלם נמצאים חיידקים פתוגנים הנמצאים ברפת באופן טבעי, או במערכת ההובלה ולכן נעשית פעילות מניעתית ענפה. ראשית, מיד בהגעת החלב למחלבה הוא עובר פסטור בחום, על מנת להרוג את הפתוגנים ואת רוב החיידקים. לאחר מכן החלב נשמר לאורך כל שרשרת הייצור בקירור על מנת למנוע שגשוג של המיקרואורגניזמים וקלקול החלב. בנוסף, במוצרים בהם קיים חשש שהמוצר לא יישמר בקירור או שהיצרן מעוניין בחיי מדף ארוכים (כמו גבינה צהובה) היצרן מוסיף חומרי שימור אנטי בקטריאליים שמונעים את גדילת החיידקים וקלקול המוצר. ראוי לציין כי "חלב עמיד" הינו מוצר ייחודי בכך שהוא מוצר החלב היחידי שהוא סטרילי. חלב זה עובר תהליכים של עיקור בחום גבוה [1, 6, 7].

למרות הפעילות המניעתית הרבה שצוינה, קיים צורך מתמיד בניטור החלב והמים מבחינה מיקרוביולוגית. זיהוי וטיפול בזיהום בזמן יכול למנוע את הגעתם של פתוגנים למי שתייה ולמוצרי החלב ולהציל חיי אדם. בתעשייה מתבצעות בדיקות רבות לזיהוי סימני זיהום המים, לאורך כל שלבי הטיהור ובנקודות רבות בהזרמת המים לצרכן. בתעשיית החלב נבדק המוצר גם כן מספר פעמים לאורך שרשרת הייצור. הקושי הנוצר מבדיקות מרובות אלה הוא בעיבוד איטי ומורכב של התוצאות אשר גורם לכך שבפועל מים מזוהמים ומוצרי חלב המכילים פתוגנים 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 והיא רק מהווה אינדיקטור של כמות החיידקים הכללית במים ובחלב מבלי להבחין בין פתוגנים לחיידקים שאינם מזיקים [6, 7].

השיטות המקובלות במעבדות מיקרוביולוגיות כוללות בעיקר זריעות על גבי מצעים סלקטיביים, גידול בתנאים אופטימליים וספירת מושבות או עכירות [8]. 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-107 CFUs/ml) ואינן ספציפיות. חסרונות אלה מהווים כיום את אחד האתגרים הגדולים בתעשיית המזון, וגורמים לאיבוד רב של מזון ולסיכון לבריאות הציבור [1, 9]. חסרון נוסף של השיטות הנ"ל הוא שהן דורשות צוות גדול של אנשים מוסמכים לביצוע הבדיקות וכמות גדולה של חומרי גלם (מצעי גידול, צלחות פטרי, טיפים וכו'). גורמים אלה משפיעים מאוד על עלות הבדיקות (ref). נוסף על כך, כל הבדיקות הקיימות הן הרסניות, כלומר – דוגמה שנלקחה לבדיקה לא תוכל להגיע לצרכן. עובדה זאת גורמת לכך שהבדיקות מבוצעות על מרחב דגימה קטן – 0.1-1 ליטר מתוך אלפי ועשרות אלפי ליטרים שמוזרמים במערכת. הבדיקות נעשות באופן תקופתי ורוב התוצרים לא נבדקים. כיוון שזיהומי חיידקים (ובמיוחד פתוגנים) הם תופעה בלתי צפויה, המופיעה באופן ספוראדי (ref) – ניתן להצביע כאן על כשל של מערכת הדגימה בתעשיית המים והחלב העלול לפגוע בבריאות הציבור. כשל זה מוכר בתעשייה אך כיום לא קיים תחליף איכותי ומשתלם לשיטת הדיגום הקיימת.

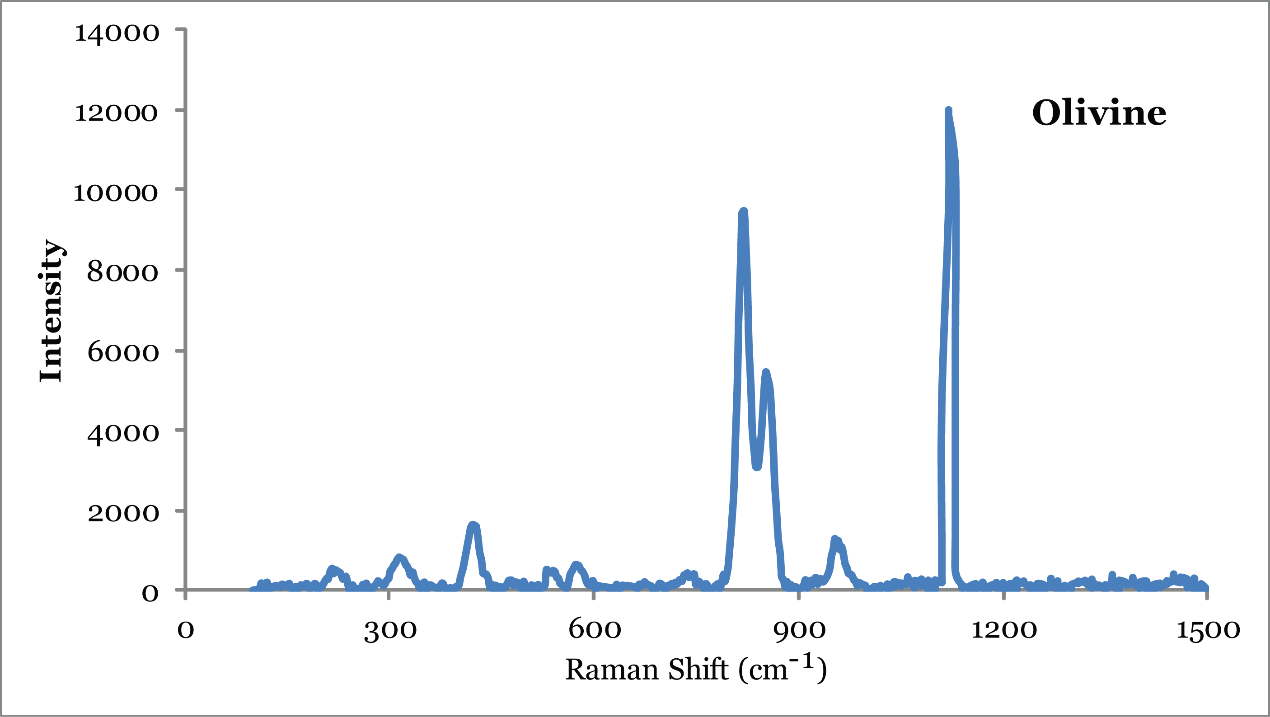
קיימות כיום מספר שיטות מתקדמות לזיהוי חיידקים בחלב ובמים. ישנן שיטות מולקולריות שונות, המתבססות על הגברת רצפי DNA חיידקים (PCR) והשוואתם למסדי נתונים ידועים או זיהוי בעזרת היברידיזציה [6]. יתרונן של שיטות אלה הוא היכולת לזהות באופן ספציפי פתוגנים בקלות. אולם בדיקות אלה דורשות עבודה ידנית מרובה, עורכות זמן רב (מספר ימים לרוב) והן הרסניות לדגימה [10]. השלב הדורש את הזמן הרב ביותר הוא שלב ההעשרה הנדרש ברוב השיטות הקיימות. בעיה נוספת היא שלא כל החיידקים ניתנים כיום להעשרה – גורם המגביל את השימוש בשיטות אלה [11]. שיטות מתקדמות עוד יותר מבוססות על טכנולוגיית DNA Microarray ו-ELISA. שיטות אלה נחשבות מהירות מאוד, בעלות ספציפיות גבוהה ולעיתים ללא צורך בהעשרה (תלוי בשיטה). אך יחד עם זאת השיטות יקרות מאוד לשימוש ודורשות כוח אדם מקצועי ביותר. מכיוון אחר, ישנן שיטות ספקטרוסקופיות לזיהוי החיידקים. שיטה אחת מתבססת על שימוש בספקטרומטר מסות (MS). אחת הגרסאות המוכרות לגישה זו היא שיטת MALDI-TOF המשתמשת ביינון עוצמתי של מושבת חיידקים ובחינת תוצרי היינון ב-MS. יתרונה הגדול של השיטה הוא היכולת לזיהוי כמעט מידי של החיידקים, בדיוק גבוה ובצורך קטן יותר של עובדים מקצועיים (שכן המכשיר יחסית פשוט לשימוש). שיטה זו אינה מדויקת מספיק, דורשת העשרה ארוכה (לקבלת מושבת 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 בחלב ובמי שתייה, בעלות נמוכה וברמת דיוק גבוהה [6]. בעבודה זו אנחנו מציעים שימוש בגישה ספקטרוסקופיית מבוססת ראמאן לזיהוי וכימות חיידקים במי שתייה וחלב.

### ספקטרוסקופיית ראמאן

ספקטרוסקופיית ראמאן (Raman Spectroscopy) הינה כלי אנליטי מודרני, בעלות נמוכה ובעל תוצאות מהירות במיוחד. 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 והבדיקה אינה הרסנית - 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 דרך מצעים מורכבים כמו מזון, נוזלי גוף ודגימות קרקע [12, 13].

השיטה לזיהוי מהיר של חיידקים בספקטרוסקופיית ראמאן מתבססת על תופעה המכונה Raman Shift שתוארה לראשונה ע"י סיר C.V Raman, שזכה על כך בפרס נובל בשנת 1930 [14]. כפי שתיאר ראמאן, כאשר פוטונים באורך גל מסוים (לייזר) פוגעים במולקולה חלק מן הפוטונים 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) (ref). ההתמרה היא שונה בין חומר לחומר באורכי גל שונים, כך שלכל חומר ישנה "טביעת אצבע" של התמרה [15]. חשוב לציין שההתמרה תלויה מאוד בתכונה פיסיקאלית של החומר – "גמישות" ענן האלקטרונים (Polarizability) (ref). 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 (ref). חשוב לציין שלמים, H2O, ישנו ענן אלקטרונים בעל גמישות יחסית נמוכה ולכן מים מהווים רקע מצוין לבדיקת בשיטת ספקטרוסקופיית ראמאן כי הם בעלי קריאת רקע חלשה מאוד גם בריכוז גבוה (ref).

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. כך למעשה מתקבלת קריאה אך ורק של הפוטונים אשר עברו התמרה מסוג ראמאן (ישנן התמרות מסוגים אחרים בהן אורך הגל מתקצר) והחלוקה של הפוטונים בין אורכי הגל היא הספקטרום (תמונה 1). אורך הגל מוצג לעיתים כאורך הגל האבסולוטי, בערכים של nm אך לרוב הוא מוצג ברמת ההתמרה מאורך הגל של הלייזר, בערכים של cm-1.



תמונה 1 טביעת אצבע של Olivine [16]

מחקרים קודמים מראים כי ניתן להבחין בין חיידקים שונים בהתאם לספקטרום הראמאן שלהם. נמצא שהספקטרום הינו ספציפי לכל זן חיידקים, אך נדרש למצוא בדיוק באילו אורכי גל ואילו עוצמות התמרה נמצא ההבדל המבחין בין החיידקים השונים. ישנה גם קורלציה מסוימת בין עוצמת ההתמרה לכמות החיידקים – זאת לפי חוק בר-למברט, שכן ככל שריכוז החיידקים גבוה יותר כך כמות הפוטונים המותמרים עולה. יכולות אלה של השיטה הוצעו כפתרון לבעיית זיהוי החיידקים בתעשיית המים, המזון והבריאות. כדי לנצל את השיטה לזיהוי החיידקים נדרשת עבודה מקיפה ליצירת מאגר נתונים אמין שבו נותחו מספר רב של דוגמאות חיידקים [13]. 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 מאוד, 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 החיידקים יכול להתבצע באופן אוטומטי ואף באופן ישיר ללא מגע אדם [12, 13].

### מחקרים ועבודות קודמות בנושא

בשנים האחרונות התבצע מחקר רב בתחום הזיהוי המהיר של חיידקים בספקטרוסקופיית ראמאן, זאת בעקבות היתרונות הרבים שצוינו. מחקרים שונים 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 [13, 17, 18]. מחקרים אחרים התמקדו במהירות יכולת הדגימה, עבודה in-situ, יכולת כימות החיידקים ואף בתקפות הרגולטורית של הבדיקות לתקני ISO.

#### Proof of concept

כבר בשנת 1995, הציעו Fehrmann ושותפיו גישה לשימוש בספקטרוסקופיית ראמאן לזיהוי חיידקים ממחלקת ה-*Clostridia* (ביניהם מספר פתוגנים ידועים) בחלב משוחזר. החוקרים הראו לראשונה כי הם מצליחים להבחין בין זני ומיני החיידקים השונים ע"י גידול החיידקים בחלב וסריקת החיידקים בספקטרוסקופ ראמאן תחת מיקרוסקופ, כך שהלייזר מכוון 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 ומגוונת אלא בסריקות בודדות לביצוע האנליזה, דבר המעיב על חסינות (Robustness) הבדיקה [19].

בניסוי אחר בשנת 2000, Maquelin ושותפיו הראו יכולת זיהוי ראשונה של חיידקים פתוגנים כמו *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* וכו', וזאת אחרי 6 שעות גידול על צלחות פטרי (בתעשייה, נדרש לחכות כ-24 שעות לגדילת חיידקים אלו (ref)). החוקרים גידלו את החיידקים בתנאים אופטימליים עד להגעה לביומסה מינימלית (Micro-colonies), ולאחר מכן העבירו אתה המושבות למשטחי CaF2, אותם סרקו בעזרת מיקרוסקופ המחובר לספקטרומטר ראמאן. הספקטרום הנמדד הופק מלייזר באורך גל 830nm. החוקרים הראו יכולת זיהוי 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 במספר פגמים. הבדיקה כפי שנעשתה היא הרסנית לדוגמה (לא ניתן להפיק את החיידקים ולהחזירם אח"כ למצע), 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 [20].

ניסויים אלה ועוד היוו את התקדימים הראשונים לשימוש בספקטרוסקופיית ראמאן לזיהוי חיידקים מהיר. המחקרים הובילו בהמשך לעבודות מתקדמות יותר.

#### תקדימים בתעשיית המזון

במחקר של Meisel ושותפיו מ-2012, הצליחו החוקרים להבחין בחיידקי *Brucella* בחלב [21]. 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 וזיהו אותם במים. חשוב להזכיר כי אחד הקשיים בעבודה זו הוא בזיהוי החיידקים בחלב, הנחשב מדיום אטום, אם כי קיימים תקדימים לבדיקות ספקטראליות דרכו [22].

במחקר אחר, בדקו אותם החוקרים את האפשרות לזהות חיידקים בדוגמאות בשר. הקושי המרכזי בבחינת חיידקים בבשר בשיטות פיזיקאליות הוא במורכבות המדיום ("הרקע"). במחקר הצליחו החוקרים לזהות חיידקי *Escherichia coli, Listeria, Salmonella* ועוד, בדיוק גבוה מאוד (85-100% לכל סוגי החיידקים מלבד *Yersinia*). גם כאן השתמשו בסדרת לימוד מכונה אשר הפרידה את החיידקים ראשית לפי סיווגם לגראם שלילי וחיובי, בהמשך להפרדה בין סוגים ולבסוף להבחנה ברמת המין. החוקרים מצאו שפירוק הניתוח לשלבים שיפר באופן משמעותי את יכולת ההבחנה, ובכך הצליחו להתגבר על קשיים רבים בזיהוי [23].

בשני המחקרים הנ"ל החוקרים דווקא השתמשו באנליזה סטטיסטית מבוססת על Support Vector Machine (SVM), ככל הנראה מכיוון שבדוגמאות שמקורן בבשר וחלב ישנה איזושהי התנהגות א-ליניארית של הספקטרום ביחס לחיידקים. חולשתם של המחקרים היא בכך שהחוקרים הצליחו להבחין בחיידקים רק בכמויות יחסית גבוהות, בהן ניתן כבר לומר שהבשר והחלב אינו ראוי לצריכה. בנוסף, בשני המחקרים הנ"ל לא בחנו החוקרים מקרים של אילוח משולב, כפי שקיים בתעשייה, בו ישנם מספר מינים פתוגניים באותה הדגימה. אך הם משמשים כ-Proof of Concept ראשוני ליכולת זיהוי חיידקים בתעשיית המזון, ולכן נדרש מחקר מעמיק יותר לשיפור השיטה וזיהוי גם בריכוזי חיידקים נמוכים.

Wang ושותפיו 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 רמת זיהוי גבוהה אף יותר, וזמן הכנת דוגמה מקוצר הנובע מכך. החוקרים הצליחו גם להראות שהם משפרים את המודל כאשר הם "מאמנים" אותו על שילוב של דוגמאות שמקורן במצע גידול מעבדתי (Luria-Bertani LB, Brain Heart Infusion BHI) או בחלב. "אימון" המודל על דוגמאות מגוונות איפשר לחוקרים זיהוי טוב יותר מכיוון שהמודל המשופר מצליח להתעלם מגורמים סביבתיים ושינויים פיזיולוגיים וביוכימיים של החיידק (גודל וצורת התא לדוגמה) ובכך להתמקד באלמנטים הקבועים בחיידקים. גם חוקרים אלה בסופו של דבר ביצעו את הבדיקה רק בריכוזים גבוהים מאוד של חיידקים (108 CFUs/ml) וסרקו למעשה על רקע של מים מזוקקים [24].

במחקר אחר המתמקד בתעשיית החלב, הצליחו Nicolaou ושותפיו להראות התפתחות של חיידקי *Staphylococcus aureus ו-Lactococcus lactis* בחלב. החוקרים לקחו דגימות של חלב מאולח, ניקו את הדגימה במים מזוקקים ובחנו את הדוגמה במיקרוסקופ. בחלק מן הניסויים החוקרים השתמשו בטכנולוגיה דומה לספקטרוסקופיית ראמאן המכונה Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). החוקרים הצליחו להבחין בחיידקים החל מסדר גודל של 105 CFUs/ml וליצור מודל חיזוי מבוסס PLS המתאים לטווח שבין 105-108 CFUs/ml. בהמשך, החוקרים בחנו את מודל החיזוי שלהם במקרים של אילוח-משולח של שני מיני חיידקים שונים 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-105 CFUs/ml ולכן לא ידעו להבחין בהעדר חיידקים. 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 [25].

#### ספציפיות האבחנה

Sundaram ושותפיו התמקדו ביכולת האבחנה בין סוגי חיידקים שונים. במחקר מ-2013 הצליחו החוקרים להבחין בין סרוטיפים שונים של סלמונלה בעלי משמעות קלינית. סרוטיפ הינה אבחנה מתחת לרמת המין והזן, אשר מבחינה בתוך אותו המין בין הרכב המעטפת 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 [26]. במחקר הצליחו החוקרים לאפיין פיקים מסוימים לחיידקים משני הסרוטיפים שנבדקו, ולקשר את המאפיינים לשינויים בהרכב החלבוני לש החיידקים. כך לדוגמה הראו החוקרים שפיק של המרת ראמאן 730 cm-1 הוא חזק ואופייני לשני מיני החיידקים (עובדה זו יכולה לעזור בזיהוי ראשוני) אך פיק של המרת ראמאן 690 cm-1 הוא אופייני לחיידקי *Salmonella enteriditis* בלבד*.* החוקרים קישרו פיק זה לריכוז גבוה יותר של טבעות guanine ב-DNA ו-RNA, כפי שתואר כבר בעבר ע"י Zeiri et al ב-2005 [27]. במחקר נעזרו החוקרים בטכנולוגיה יחסית חדישה הנקראת Surface Enhanced Raman Scattering (SERS). בסריקות מבוססות SERS הדוגמה מוטענת על משטח ייחודי שעליו נמצאים חלקיקים עשויים מתכת עשירה באלקטרונים כגון זהב או כסף. אלומת הלייזר "נכלאת" בין החלקיקים, וענן האלקטרונים הרחב סביב הדוגמה הנבדקת גורם לחיזוק האות של התמרת הראמאן (זאת בעקבות תופעה המכונה Surface Plasmon Resonance, עליה לא נרחיב בעבודה זו) (ref). השימוש ב-SERS מאפשר זיהוי כימי בריכוזים הנמוכים פי 106-10 מיכולת הזיהוי בסריקה רגילה, וכך מסבירים החוקרים את יכולתם לזהות את ההבדלים המזעריים בין החיידקים.

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 [28].

#### שימוש ב-SERS לשיפור יכולת הזיהוי

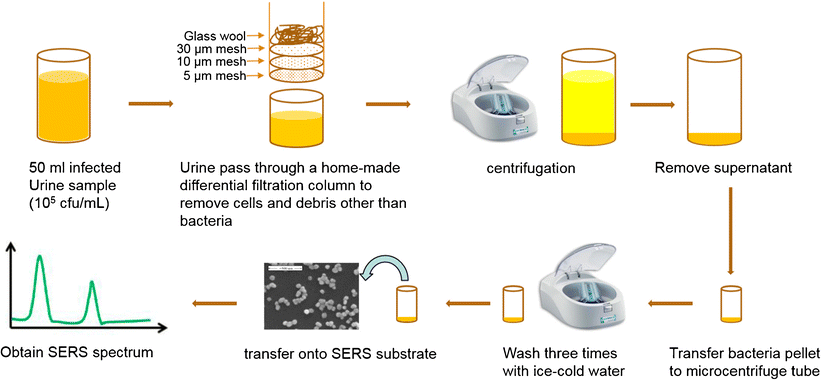
במחקר אחר של Sundaram ושותפיו מ-2013 מציגים החוקרים שימוש בפלטפורמה אחרת של SERS, המבוססת על זיהוי ספקטרום הראמאן מתוך צלוחיות מצופות כסף. החוקרים הצליחו לזהות בניסוי חיידקים מסוגי *Salmonella, Escherichia, Listeria ו-Staphylococcus.* בניסוי החוקרים אמנם בחנו את החיידקים בריכוזים גבוהים אך הם הצליחו לראות שיפור משמעותי ביכולת הזיהוי בשיטת ה-SERS. גישות אלה המבוססות על SERS תוארו כבר ב-2004 ע"י Jarvis ושותפיו כבעלות יכולת אבחנה גבוהה פי 103-108, אך ניסויים פרקטיים בחיידקים בוצעו בעיקר בשנים האחרונות ע"י מגוון קבוצות [10, 29-31].

#### 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 [32]. בעבודות קודמות שהוצגו, סף הזיהוי של המערכת היה לרוב בין 105-108 CFU/ml [11, 19-21, 23, 24]. בעוד שסף זיהוי זה הוא מעניין בפני עצמו, הוא לרוב אינו רלוונטי לזיהוי של חיידקים פתוגנים במי שתייה (הרף הנדרש שם הוא יכולת לזהות פתוגנים יחידים למ"ל, וכך גם בתעשיית החלב [3, 7]). ישנם מספר תקדימים לזיהוי של ריכוזים נמוכים של חיידקים בעזרת SERS, ביניהם עבודה של Zhou ושותפיו שזיהו חיידקים בריכוז 102 CFUs/ml ואף חיידקים בודדים בדוגמה. 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 בחיידקים בריכוזים של 103 cells/ml של חיידקי *E. coli* ואף להבחין בין חיידקי *E. coli* מזנים שונים. יתר על כך, כאשר השתמשו החוקרים בטכנולוגיית החלקיקים שלהם על משטח זכוכית, הצליחו החוקרים לזהות חיידקים בודדים. החוקרים הראו שכאשר הם מכינים דוגמה של מים יחד עם החלקיקים שלהם וחיידקים, ושפים 3µL 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. חסרונותיו של המחקר הם בעיקר בעלות המכשור שלו, וביכולת הכנת החלקיקים בכמויות גדולות. החלקיקים שנוצרו הם מבוססים על זהב, ויצירתם דורשת מיומנות מיוחדת ועל כן עלויות ההפקה הן ככל הנראה גבוהות מאוד [33].

#### מהירות הבדיקה

בתעשיית המזון ובמערכת הבריאות ישנה חשיבות גדולה מאוד למהירות זיהוי הפתוגנים. בעבודה של Permasiri ושותפיו 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. משם 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 לפי מודל מבוסס 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' [34].

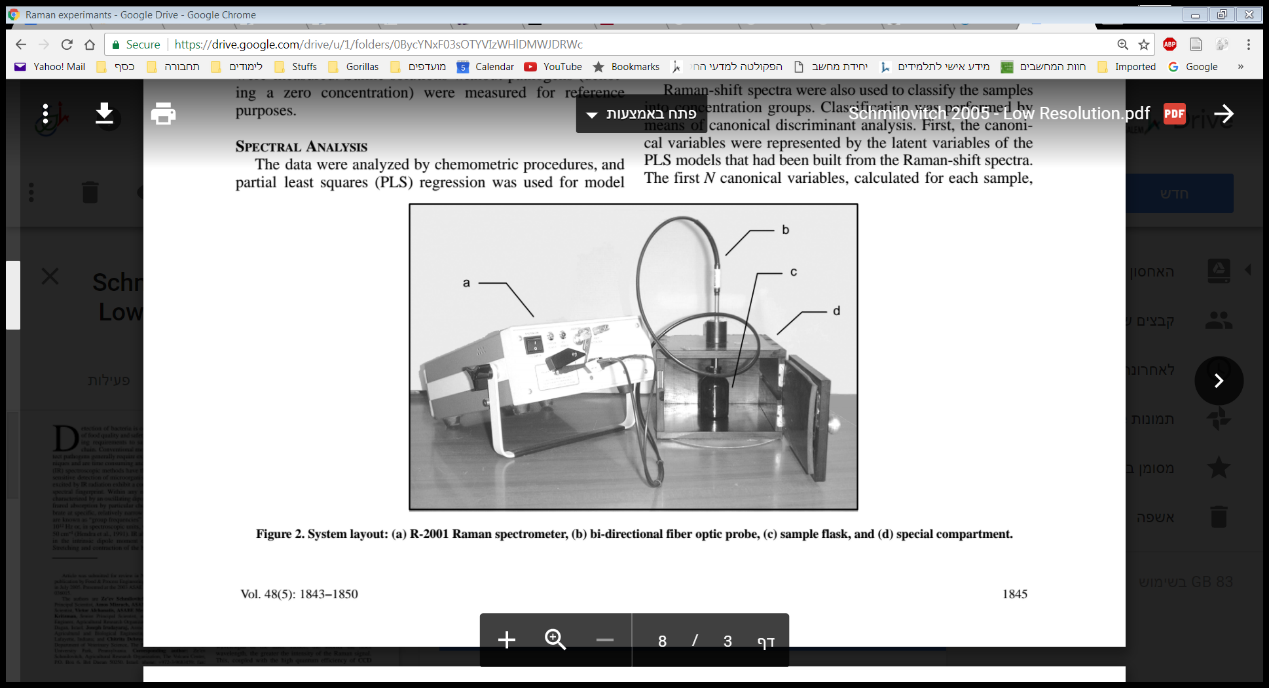


תמונה 2 – תהליך קבלת מידע מדוגמה – מתוך [34]Permasiri et al 2017

#### התאמה לתקנות ורגולציה קיימת

ריבוי העבודות בנושא זיהוי חיידקים בשיטות ספקטרוסקופיית ראמאן הוביל את Witkowska 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 בדיוק של 98%, דבר המצביע על חסינות 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 האינקובציה. 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 [35].

#### עבודה ברזולוציה נמוכה

בניגוד לכלל העבודות האחרות בתחום, בעבודה זו נתמקד דווקא בזיהוי החיידקים ברזולוציה נמוכה. בעוד שרוב העבודות הנעשות בזיהוי חיידקים משתמשות במיקרוסקופיה, SERS או שילוב של השניים, עבודה של Schmilovitch ושותפיו מ-2005 הראתה שניתן לזהות חיידקים בשיטת ספקטרוסקופיית ראמאן בעזרת ספקטרומטר , מערכת לייזר המשדרת באורך גל 785nm (בדומה למספר עבודות אחרות (refs) וסיב אופטי המשדר וקולט את הלייזר. החוקרים הצליחו לזהות ולהבחין בין ריכוזי חיידקים מסוג *Erwinia* ו*-Clavibacter* בנוזל בריכוזים של 1010-101 cells/ml. החוקרים השתמשו בשיטה מבוססת PLS, על מנת לייצר מודל חיזוי לריכוז החיידקים בדיוק של מעל 90%. עבודה זו מצביעה על היתכנות של זיהוי חיידקים, בשיטות מבוססות ספקטרוסקופיית ראמאן, בריכוזים נמוכים ובעלויות זולות – ובכך מציגה אפשרות לפתרון בעיית זיהוי החיידקים בתעשיית המזון. חסרונותיה של עבודה זו הם שהיא התמקדה בעבודה עם חיידקים שאינם רלוונטיים לתעשיית החלב והמים, שכן מדובר בחיידקים צמחיים שאינם נפוצים במערכות אלו [36]. המחקר שלנו יתמקד בשימוש בכלים שיצרו Schmilovitch ושותפיו לזיהוי של חיידקים רלוונטיים לתעשיית המזון.

# השערות ומטרות העבודה

## מטרות העבודה

מטרת העבודה היא לבחון האם ניתן לזהות כמות כללית של חיידקים ו/או פתוגנים ספציפיים בדוגמת מים וחלב באמצעות מספר שיטות ספקטראליות מבוססות ספקטרוסקופיית ראמאן ו-FTIR . המחקר ישווה בין יכולת האבחנה של ספקטרומטר ראמאן ו-ATR-FTIR בחיידקי *E. coli* ו-*Bacillus subtilis* בריכוזים שונים. העבודה תכלול אופטימיזציה של תנאי הסריקה, הכנת הדוגמה ועיבוד הנתונים על מנת לבנות מודל חיזוי איכותי לכמות חיידקים ו/או נוכחות של פתוגנים בדוגמה נוזלית.

## השערות המחקר

1. אנו משערים כי ניתן לזהות חיידקים בסדרי גודל נמוכים (עד 103 CFUs ml-1) באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן.
2. אנו משערים כי ניתן להבחין בין חיידקים קוליפורמים (ספציפית *E. coli*) לאחרים באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן
3. אנו משערים כי ניתן לזהות את החיידקים הן ברקע של מים והן ברקע של חלב.
4. אנו משערים כי ניתן לבצע את הבדיקה בזמן קצר (פחות מ-90 דקות) לקבלת תשובה ברמת וודאות מעל 90%.

# תכנית ושלבי העבודה

במהלך העבודה עלינו ראשית לבצע תהליך אופטימיזציה למכשיר ספקטרוסקופיית הראמאן. כיוון שחלק מהמכשיר עצמו נבנה במכון להנדסה חקלאית, והוא כולל מספר חלקים – תושבת, כוסית הטענה, ספקטרומטר, משדר לייזר ועוד מספר חלקים קטנים 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", אופן הכנת הדוגמה לבדיקה ועוד.

לאחר שמצאנו פלטפורמה (כלומר, מצב מסוים של כלל הפרמטרים הנ"ל) עלינו לאמת את יכולת המכשיר לזהות חיידקים בריכוזים נמוכים עד להגעה למינימום רגישות המכשיר לזיהוי של חיידקים מזן יחיד בריכוז ידוע על רקע מים מזוקקים.

לאחר מכן עלינו לבחון את השפעתם של מי ברז על המערכת, ולבצע חידודים הן במודל החיזוי והן בשיטת הכנת הדוגמה והפלטפורמה על מנת לבחון האם ניתן לשמר את יכולת החיזוי גם במי ברז.

בשלב הבא נבחן את יכולת הזיהוי בחלב לפי אותם עקרונות מנחים של שיפור מודל החיזוי, שיטת הכנת הדוגמה והפלטפורמה.

בהינתן ונמצאה יכולת מסוימת לזיהוי חיידק המודל (*E. coli*) ננסה להבחין בין זן אחר של חיידקים – *B. subtilis*. ננסה לבחון את האפשרות של המערכת להבחין בין החיידקים השונים או להפעיל את מודל הכימות שלנו על שניהם יחד ולקבל למעשה ספירה כללית של חיידקים.

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).

ככל הנראה שלב האופטימיזציה הוא הארוך ביותר ועלול לקחת מעל לשנת עבודה עד להגעה לתנאים המתאימים לזיהוי החיידקים, אך בסופו שיפור הפלטפורמה לזיהוי משופר עד גבול מסוים אמור להיות יחסית פשוט.

במקביל לעבודה עם ספקטרומטר ראמאן נבצע תהליך דומה במכשיר ATR-FTIR, אם כי מכשיר זה פשוט יותר לאופטימיזציה כיוון ואינו מיוצר על ידי המחלקה להנדסה חקלאית.

לבסוף נוכל להשוות בין יכולת החיזוי של המודל במכשיר ראמאן לעומת מכשיר ATR-FTIR ולאשש או להפריח את השערת המחקר.

את כל שלבי העבודה יבצע התלמיד (אמיר נקר) בשיתוף פעולה מלא עם החוקרים מהמכון להנדסה חקלאית (בדגש על ד"ר תימאה איגנט) וחוקרים מהמעבדה של פרופ' שלמה סלע מהמכון לאיכות ובטיחות מזון של מרכז המחקר החקלאי.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| תאריך התחלה משוער | תאריך סיום משוער | פעולה |
| נוב' 2016 | אוקטובר 2017 | אופטימיזציה של הפלטפורמה ושיטת הכנת הדוגמה לזיהוי חיידקי *E. coli* בעזרת מכשיר ראמאן. |
| אפריל 2017 | ספטמבר 2017 | אופטימיזציה של הפלטפורמה ושיטת הכנת הדוגמה לזיהוי חיידקי *E. coli* בעזרת מכשיר ATR-FTIR. |
| ספטמבר 2017 | אוקטובר-נובמבר 2017 | יצירת מודל לכימות חיידק מודל במים מזוקקים והשוואה בין ראמאן ל-FTIR-ATR |
| אוקטובר 2017 | דצמבר 2017 | בחינת השפעת מי ברז על יכולת החיזוי ושיפור הפלטפורמה, הכנת הדוגמה ומודל החיזוי |
| אוקטובר 2017 | דצמבר 2017 | בחינת יכולת החיזוי על רקע חלב ושיפור הפלטפורמה, הכנת הדוגמה ומודל החיזוי |
| דצמבר 2017 | מרץ 2018 | בחינת יכולת הבחנה בחיידקי *B. subtilis*, שיפור המודל |
| דצמבר 2017 | אפריל 2018 | בחינת יכולת אבחנה בין חיידקי *E. coli ו-B. subtilis* במודל יחיד לזיהוי "פתוגנים" בחיידקי מודל |
| דצמבר 2017 | אפריל 2018 | בחינת יכולת כימות כמות חיידקים כללית בדוגמה מעורבת של *E. coli* ו-*B. subtilis*. |
| אפריל 2018 | יוני 2018 | חידוד המודל לעבודה במי ברז וחלב הן בכימות בדוגמאות מעורבות והן באבחנה בין חיידקים |
| אפריל 2018 | ספטמבר 2018 | בדיקת המודל על דוגמאות אמיתיות של מי ברז וחלב לכימות וזיהוי פתוגנים והשוואה לשיטות סטנדרטיות. |
| יוני 2018 | אוקטובר 2018 | כתיבת דוח העבודה והגשתו. |

# מקורות

1. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA: **Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications**. *Foodborne Pathog Dis* 2005, **2**(2):115-129.

2. Ashbolt NJ: **Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems**. *Curr Environ Health Rep* 2015, **2**(1):95-106.

3. **תקנות בריאות העם - איכותם התברואית של מי־שתיה ומיתקני מי שתיה**. In*.*; 2013.

4. **הנחיות לדיגום מים**. In*.*; 2016.

5. **הנחיות המנהל להגשת תכנית, לתפעול וניטור מתקן טיפול במי שתיה**. In*.*; 2017.

6. Tabit FT: **Advantages and limitations of potential methods for the analysis of bacteria in milk: a review**. *J Food Sci Technol* 2016, **53**(1):42-49.

7. **צו הפיקוח על מצרכים ושירותים - איכות חלב**. In*.*; 1958.

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. Jarvis RM, Goodacre R: **Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy**. *Anal Chem* 2004, **76**(1):40-47.

11. Willemse-Erix DF, Scholtes-Timmerman MJ, Jachtenberg JW, van Leeuwen WB, Horst-Kreft D, Bakker Schut TC, Deurenberg RH, Puppels GJ, van Belkum A, Vos MC *et al*: **Optical fingerprinting in bacterial epidemiology: Raman spectroscopy as a real-time typing method**. *J Clin Microbiol* 2009, **47**(3):652-659.

12. 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.

13. Stöckel S, Kirchhoff J, Neugebauer U, Röscha P, Popp J: **The application of Raman spectroscopy for the  detection and identification of microorganisms***Journal of Raman Spectroscopy* 2015(47):89-109.

14. **Sir Chandrasekhara Venkata Raman - Biographical**

15. **Kaiser Optical Systems -  Raman Spectroscopy - A Tutorial**. In*.*

16. **Infrared and Raman Spectroscopy**

17. 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.

18. 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.

19. 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**. *J AOAC Int* 1995, **78**(6):1537-1542.

20. 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.

21. 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.

22. 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.

23. Meisel S, Stöckel S, Rösch P, Popp J: **Identification of meat-associated pathogens via Raman microspectroscopy**. *Food Microbiol* 2014, **38**:36-43.

24. 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.

25. 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.

26. Su LH, Chiu CH: **Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature**. *Chang Gung Med J* 2007, **30**(3):210-219.

27. L Z, S E: **Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria: the effect of excitation wavelength and chemical modification of the colloidal milieu**. *Journal of Raman Spectroscopy* 2005, **36**(6-7):667-675.

28. Sundaram J, Park B, Hinton A, Lawrence KC, Kwon Y: **Detection and differentiation of Salmonella serotypes using surface enhanced Raman scattering (SERS) technique**. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2013, **7**(1):1-12.

29. 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.

30. 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.

31. 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.

32. 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.

33. 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.

34. 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.

35. Witkowska E, Korsak D, Kowalska A, Księżopolska-Gocalska M, Niedziółka-Jönsson J, Roźniecka E, Michałowicz W, Albrycht P, Podrażka M, Hołyst R *et al*: **Surface-enhanced Raman spectroscopy introduced into the International Standard Organization (ISO) regulations as an alternative method for detection and identification of pathogens in the food industry**. *Anal Bioanal Chem* 2016.

36. Z S, A M, V A, G K, R K, J I, C D: **DETECTION OF BACTERIA WITH LOW-RESOLUTION  RAMAN SPECTROSCOPY***Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 2005, **48**(5):1843-1850.