דוח התקדמות – אמיר נקר – 12 נובמבר 2017

הדוח הקודם שנכתב נכתב ב-6 ליולי 2017

# מה נעשה עד חודש מרץ

1. יצרנו פרוטוקול להכנת הדוגמה (שטיפת החיידקים במים 3 פעמים)
2. יצרנו פרוטוקול לסריקה במכשיר הרמאן, במים ובחלב
3. סרקנו בעזרת מכשיר הרמאן:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| רקע | חיידק | טווח | כמות ספקטרומים שנאספו |
| מים מזוקקים | *E. coli* | 1-108 CFUs/ml + Blank | 488 |
| חלב עמיד (UHT) | *E. coli* | 1-107 CFUs/ml + Blank | 130 |
| מים מזוקקים | *B. subtilis* | 1-106 CFUs/ml + Blank | 145 |
|  |  |  | סה"כ – 763 |

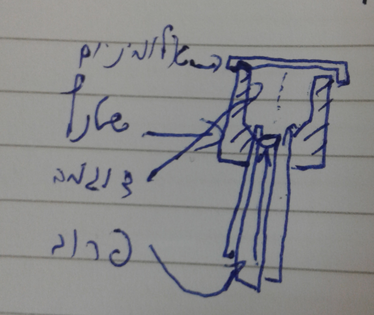
1. ביצענו אנליזות סטטיסטיות – בעיקר PLS (Partial Least Square) אך גם מעט NN (Neuron Networks) ונמצא כי ניתן להבחין בחיידקי *E. coli* כאשר הם בריכוז של 108 CFUs/ml.  
   נמצא גם שלא ניתן להבחין בהבדל משמעותי מהמים בריכוזים האחרים של החיידקים.

בנוסף, מצאנו שניתן להבחין סטטיסטית בין ימי הבדיקה – מה שמצביע ככל הנראה על השפעה של גורם חיצוני (טמפ' הבדיקה, זמן הבדיקה, זמן הגידול) על איכות הספקטרום.

1. נקרא חומר מקצועי והוכנה טיוטה של סקירת ספרות.
2. נבדק ונמצא שהחיידקים אכן מגיעים לכוסית הבדיקה בהתאם למיהול (**עדיין דורש חזרה על הניסוי**)

# מה עד חודש יולי

1. לנסות ולבדוק בעזרת מבחן סטטיסטי האם ניתן להבחין בין מים, *E. coli ו-B. subtilis* (במחשב) – נבדק ונמצא שלא ניתן להבחין מתחת לסף של 108 CFUs/ml באנליזת PLS, כולל נסיונות על נגזרות (dirivitive) והפרשים מול "ביקורת".
2. לשפר את יכולת הזיהוי ע"י שינוי פרמטרים של intensity ו-integration time של הלייזר והחיישן. ייתכן שתהליכי העירור של המולוקולות הם כאלה שדורשים יותר זמן ולכן איננו מבחינים בהם בחשיפה של 5 שניות – בוצעה סדרת ניסויים לבידוד הפרמטרים אך לא נמצאו פרמטרים בהם רואים תבנית משמעותית שונה. נבחן טווח עוצמת הלייזר: 0.2, 0.4, 0.8, 1 וטווח זמן החשיפה (בשניות): 1, 5, 10, 15, 30, 60, 300 כאשר ב-300 אנו מגיעים לרוויה. הוצע כי בעוצמת לייזר גבוהה אנחנו גורמים לעירור מחוץ לטווח הפוקוס (מקבלים פידבק מהתושבת). **מסקנה – לא ניתן לזהות את החיידקים בפלטפורמה של כוסית אלומיניום ולזירה מלמעלה בתנאים שונים של זמן חשיפה ועוצמת לייזר (מרץ 23)**
3. לבחון את ההשפעה של שלמות התאים במדידה – האם רק תאים שלמים מזוהים או שגם תאים שבורים מזוהים בספקטרום? – נבחנה האפשרות כי אולי פיצוץ של התאים בהרתחה או ליזיס כימי באמצעות אתנול ישפרו את יכולת הזיהוי אך לא התקבלו תוצאות שניתן מהן לשפר את יכולת הזיהוי (מרץ 26)
4. בוצע ניסוי לבחינה של השפעה של קירור על יכולת הזיהוי – זאת לפי Premasiri et al 2016. גם בטיפול קור לא נמצאה יכולת אבחנה מתחת לסף 108 CFUs/ml
5. נבחנה האפשרות שהחיידקים לא מגיעים לכוסית האלומיניום ע"י זריעה בצלחות – **החיידקים מגיעים לכוסית האלומיניום בריכוז כמו במבחנה** (מרץ 6)
6. נבדק האם כאשר אני סורקים רק משקע של חיידקים (ניסוי "שליכטה") אנו מזהים פיק אופייני – **הניסוי בוצע אך לא נמצאו תוצאות מעניינות ולכן נזנח** (אפריל 4, 24)
7. נבדק האם ניתן לשפר את יכולת הזיהוי ע"י סריקה על גבי זכוכית נושאת (של מיקרוסקופ) – **נמצא שלזכוכית יש טביעת אצבע ספקטראלית חזקה שממסכת את הקריאה** (אפריל 18)
8. נבחנה השפעה של מרחק הלזירה, ע"י סריקה בכוס כימית ושינוי גובה ההמשדר – **נמצא שהשינוי בגובה גורם לשינוי באות, אך לא לחלוטין הובהר מדוע. בבחינה מול OceanOptics. השערה – ייתכן והפלסטיק של הכוסית הכימית משפיע על הקריאה או שפני השטח של הנוזל משפיעים. הניסוי נזנח והוחלט להמשיך לבדיקה בטבילה** (אפריל 19)
9. נבחנה יכולת זיהוי של חיידקים במכשיר FTIR(מאי 1-24) – בעקרון נבחנו 2 שיטות
   1. סריקת נוזל (600µL). בוצעו כ-120 סריקות בריכוזים שונים (מאי 10~)
   2. סריקת "swab" – השתמשנו במקל אוזניים שמרחנו על הקריסטל של ה-FTIR (מאי 10~). בוצעו כ-50 סריקות. נבדק גם בניסוי נפרד כמה חיידקים עוברים מה-swab ונמצא כי עוברת למשטח כמות הדומה ל10µL של נוזל (מאי 24).

**מניתוח PLS שנעשה, לא ניתן להבחין בחיידקים בריכוז נמוך מ-108 CFUs/ml. הפרוייקט נזנח עד להתקנת ונטה לחדר – כיוון שיש שימוש בחומרים נדיפים מזיקים. (מאי 24)**

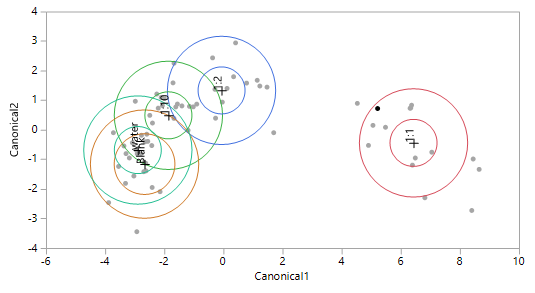
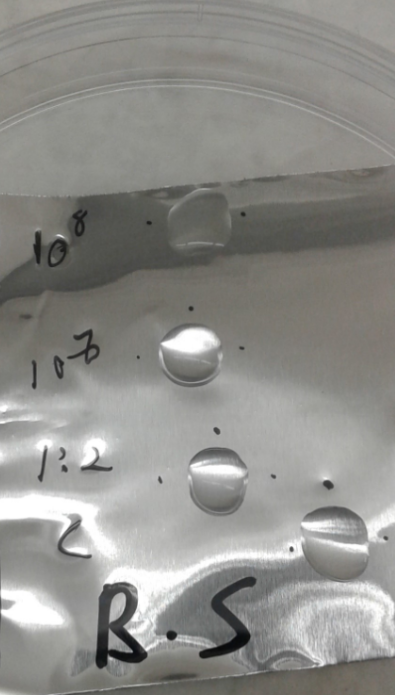
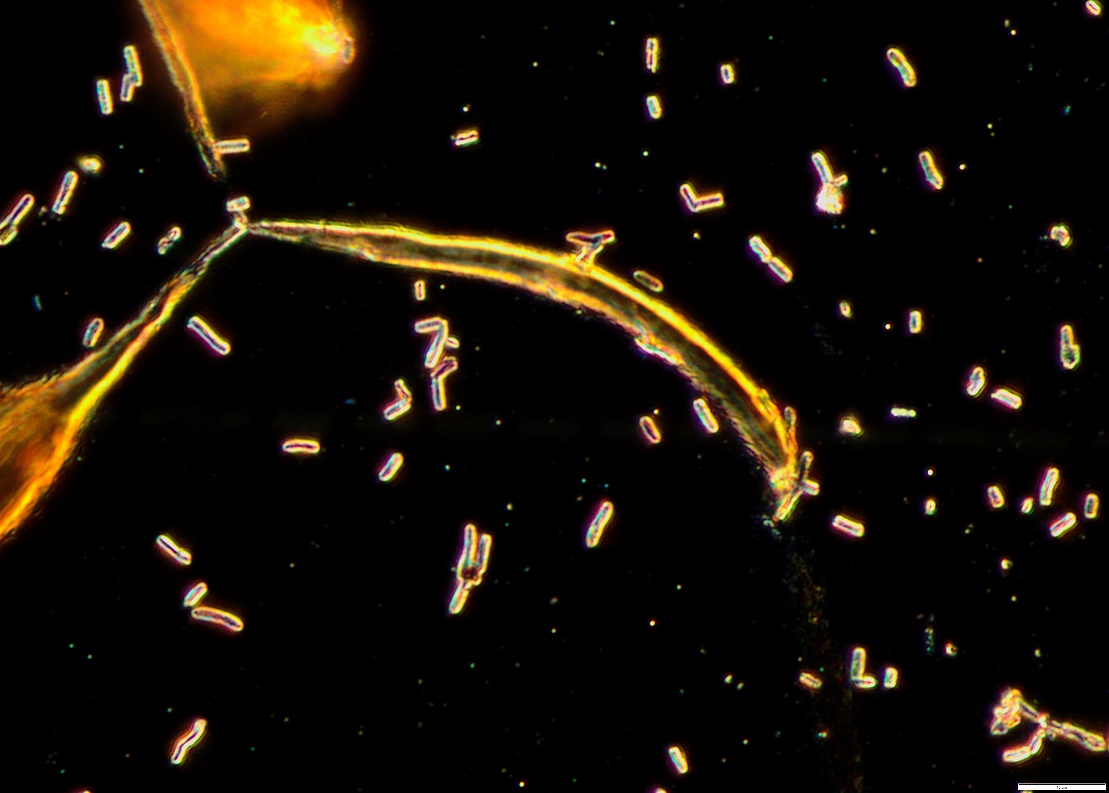
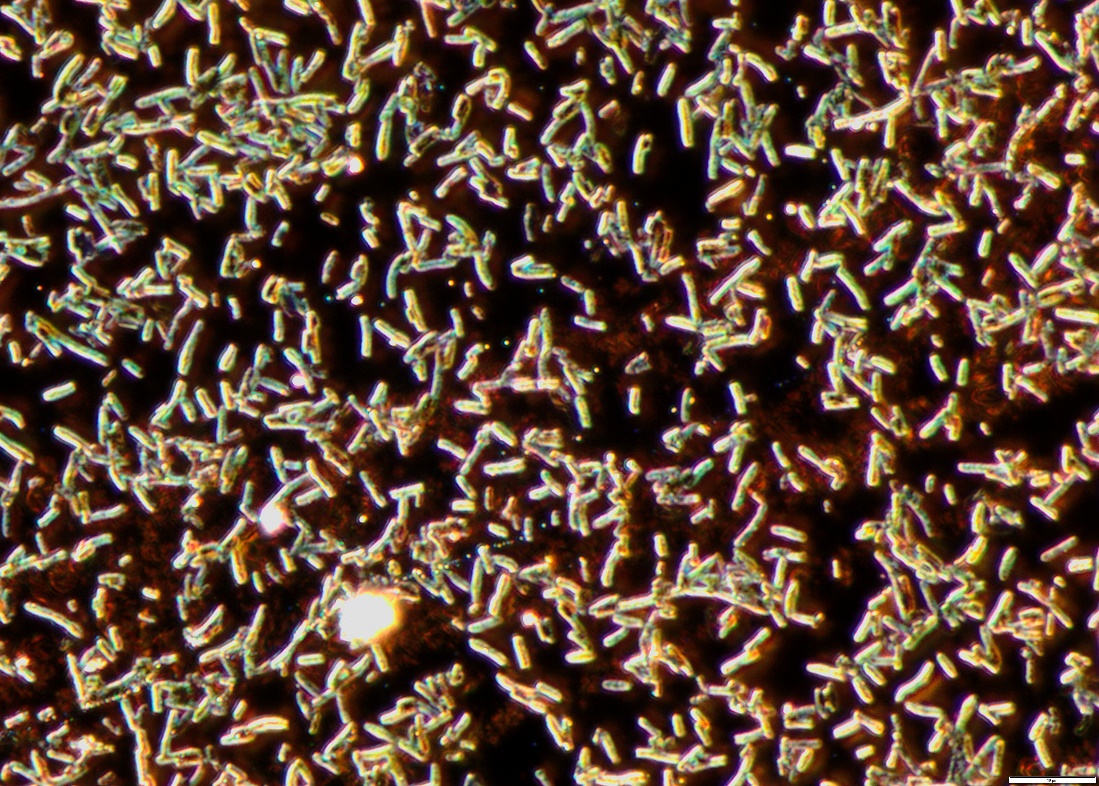
1. רצינו לבחון את ההשפעה של סריקה של המשדר בטבילה. לשם כך תוכננה ונבנתה התושבת "ההפוכה" (reversed dip). כאן אין את הפיזור מפני השטח שיש בסריקה "מהאוויר". נבדקה ההשפעה של כמות החומר ובוצעה אופטימיזציה לכמות של 3 מ"ל לבדיקה (מאי 29).  
   בהמש ניסינו לזהות את החיידקים בריכוז של 105 CFUs/ml ולא התקבלו תוצאות ברורות. **לא נעשתה אנליזה כמומטרית מלאה, כיוון שהתוצאות נראו זהות לאלו שנלקחו ללא התושבת החדשה.** (יוני 13)
2. נבחנה השפעה של saline (בניגוד למים) על יכולת הזיהוי – **לא נמצאה יכולת זיהוי משופרת ב-Saline** (אם כי משפר את יכולת הפקת החיידקים בהכנת הדוגמה) (יוני 13)
3. נבחנה יכולת זיהוי בפלטפורמת **SERS** (Surface Enhanced Raman Scattering) שהוכנה ע"י גאורגי בפרוטוקול אחד, בריכוז גבוה של חלקיקי זהב (1M). **נתקלנו במספר בעיות טכניות בזיהוי, וכעת מתכננים את המשך הפעילות במישור זה**. לא הצלחנו לזהות את החיידקים, נראו קריאות "משונות" המצביעות על השפעה של הפלטפורמה (סיליקה) על הקריאה.
4. הועלתה השערה שאנו בכלל לא רואים את החיידקים, כיוון שהם מכסים חלק קטן מאוד מהמשטח (כ-5%), ולכן הצענו בהמשך **לסרוק את המשטח**. (יוני 19)

אני חושב ששווה לבחון את התוכנית לטווח הארוך ולחשוב מה עושים אם עד אוגוסט עדיין אין תוצאות ראשוניות, לתכנן אסטרטגיות חדשות לתקיפת הבעיה.  
הפרויקט (לפי הנחיות האוניברסיטה) אמור להסתיים עד סוף אוגוסט 2018 – כך שאנחנו כבר קרובים לנקודת ה-50% ועדיין לא נראתה התקדמות מהותית בזיהוי החיידקים מעבר לסף 108 CFUs/ml או מציאת טביעת אצבע ספקטראלית (למרות ניסיונות רבים ומגוונים לפתרון הבעיה).

# מה נעשה מאז חודש יולי

1. יש להגיש תוכנית עבודה (הצעת מחקר) למכון לביוכימיה ומדעי המזון והתזונה של הפקולטה עד סוף אוגוסט – **בוצע, נשלח ואושר**
2. יש לתכנן ולבנות שולחן XY שבעזרתו נוכל לסרוק את פלטפורמת ה-SERS ולאתר את החיידקים במרחב – **מחכים לייצור שולחן XY ראשוני ע"י דקל מהנדסה חקלאית**

**הערה – דיברתי עם דקל, חשוב לתכנן את השולחן כך שנוכל להכניס אותו לקופסה השחורה של הראמאן או למצוא דרך למנוע כניסה ויציאה של אור בדרך אחרת– עדיין לא בוצע. הסטטוס של זה לא ברור, אם כי כרגע זה לא נראה מאוד רלוונטי**

1. יש לבחון שימוש בפלטפורמות SERS שונות לזיהוי של החיידקים – **מחכים לגאורגי לייצור הפלטפורמות. הערכת זמנים: בתוך יולי  
   מבחינת SERS ביצענו מספר ניסויים**
2. **נעשו מספר ניסויי SERS קטנים. השתמשנו במספר פלטפורמות SERS לפי המלצות של גיאורגי אך ללא הצלחה (לא נראה הבדל כלל בין הדוגמאות). [14 ליוני, 31 יולי, 2 אוגוסט]  
     
   מכיוון שחששנו שהחיידקים אינם נשארים על משטח הSERS ביצענו ניסויים אחרים מעט על גבי רדיד אלומיניום וזכוכית נושאת (כדי לראות איך מתנהגים החיידקים בייבוש). בנוסף שלחנו את ה-SERS למיקרוסקופ של אמיר חליבה.**
3. **ניסוי של רדיד אלומיניום וייבוש שמשמש לנו מעיין "משטח SERS". התוצאות בניסוי היו לא טובות כאשר ב-3 ניסויים הצלחנו לזהות רק חיידקים בריכוז 108 cfu/ml [אוגוסט 29, 24, ספטמבר 7]  
   \* 3 ניסויים כיוון שאני ביצעתי 2 לבד, ועוד אחד יחד עם אמיר חליבה  
   לאחר שניסיונות אלה כשלו החלטנו שחייבים לעשות ניסוי נוסף, מבוקר, שבו ישתתפו משתתפים רבים כדי לנסות ו"לפצח" מה הבעיה. הניסוי נקבע ל-17 לאוקטובר.**
4. **ניסוי SERS מבוקר – 17 אוקטובר – סרקנו דוגמאות רבות (5 חזרות בכל ריכוז X2 משטחי SERS. בוצעו 70 סריקות שנשמרו ועוד מספר סריקות "הערכה"). לאחר שלא נראו הבדלים מהותיים בין הבדיקות בהערכה "לפי העין". רצינו לוודא שמכשיר הראמאן שלנו תקין ולכן בדקנו גם במכשיר ראמאן של אמיר חליבה מטוגה. התוצאות היו כמעט זהות (לאמיר יש ראמאן ברזולוציה מעט גבוהה יותר).  
   שלחנו את משטחי ה-SERS למיקרוסקופ על מנת לוודא שישנם בכלל חיידקים על גבי המשטח.**

**גם אנליזת PLS לא הניבה פירות**

1. **ניסינו להשתמש ב-SERS של OCEANOPTICS מחשש שהפלטפורמה של גאורגי אולי לא תקינה. גם כאן לא הצלחנו להבחין בין הקבוצות. [7 נובמבר]**
2. יש לבחון אפשרות לשימוש ב-.ATR-FTIR ייתכן שבשינוי תנאי העבודה יהיה ניתן לזהות את החיידקים, **אולי בייבוש או על גבי ממברנות** – מחכים לבניית ונטה בחדר + הכנת ממברנות – טיפול שלי.  
   **בוצע ניסוי ממברנות על גבי ATR-FTIR, ללא הצלחה [31 אוקטובר]**
3. יש לשקול חזרה לניסויים קודמים ושימוש **במיקרוסקופ** כפי שנראה בספרות
4. יש לשקול אפשרות לשימוש בפלטפורמה של גאורגי שהיא מבוססת נוגדנים אשר קושרים את החיידקים במקומם.
5. **בנוסף אנחנו מנסים לחזור כמה שיותר אחורה לניסויים המקוריים של רעיה קורוטויק מ-2006. לשם כך השגנו חיידקי *Clavibacter* ו-*Erwinia*. את חיידקי ה-Erwinia לא הצלחנו לגדל (לא בלתי אפשרי). עם חיידקי ה-Clavibacter ביצענו ניסוי דומה לניסוי של קורוטיק. לא נראו תוצאות טובות [6 נובמבר] אבל מצאנו שיש בעיה בשיטת העבודה כפי שנכתבה:**

**לפי המאמר היא ביצעה רק 5 חזרות על כל מיהול. וכאשר עושים את זה קשה לעשות PLS רלוונטי... לפחות כאשר אתה עובד עם מעט מיהולים. בעיה זו הובילה אותנו לעבודת המאסטר שלה שבה גילינו שהיא עבדה מיקרוביולוגית שונה.  
בניגוד אלינו, קורוטיק גידלה את החיידקים על גבי צלחות ומן הצלחות גירדה מושבות והוסיפה לתמיסת saline, אותה היא מהלה לפי OD והמשיכה את הניסוי. אנחנו מנקים את החיידקים לחלוטין לפני העבודה מהמצע וייתכן מאוד שקורוטיק מדדה רכיבים פעילי ראמאן מהמצע. ניתן לבצע ניסוי בדיקה לתיאוריה הזו. [9 נובמבר]**