**תכנית עבודת גמר מוגשת לאישור**

**תאריך הגשה: 17/8/2017**

**שם התלמיד: אמיר נקר Amir Nakar**

**ת.ז: 305712952**

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

**חוג: החוג לביוכימיה ומדעי המזון והתזונה**

זיהוי וכימות מהיר של חיידקים במי שתייה בספקטרוסקופיית ראמאן ופלואורסנציה

**Rapid Detection and Quantification of Bacteria in Drinking Water Using Raman and Fluorescence Spectroscopies**

**אישור התוכנית:**

**תאריך:**

**חתימת התלמיד:**

**חתימת המנחים:**

**חתימת ראש החוג:**

# הצגת הבעיה ורקע מדעי

## הצגת הבעיה

למרות המאמצים הרבים בשמירה על בטיחות מי השתייה, אנו עדיין מתמודדים עם זיהומים של חיידקים, כגון *Escherichia*, *Salmonella, Legionella* הגורמים למחלות בדרכי העיכול, מחלות עור ועוד [1]. 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. למרות כל מאמצי החיטוי, לעיתים מגיעים חיידקים פתוגניים אל הצרכן. במקרים כאלה, נאלצת הרשות המקומית לסגור את אספקת המים ולספק מים ממקור אחר עד לפתרון הבעיה. במקרים מסוימים אף ממליצים לצרכן על הרתחת המים לפני השתייה, כאמצעי לקטילת החיידקים, עד לפתרון הבעיה [3-6].

בשל הסכנות הטמונות במי שתייה, קיים צורך מתמיד בניטור המים מבחינה מיקרוביולוגית. זיהוי וטיפול בזיהום בזמן יכול למנוע את הגעתם של פתוגנים למי שתייה, לחסוך למשק כסף רב וכמובן להקטין את הפגיעה הבריאותית באדם. בתעשייה מתבצעות בדיקות רבות, כגון בדיקה לזיהוי כמות חיידקים כללית לפי עכירות, כימות חיידקים קוליפורמים וקוליפורמים צואתיים בעזרת מצעים סלקטיביים ואף זיהוי חיידקי סטרפטוקוקוס צואתיים בעזרת זריעה על מצע סלקטיבי, לזיהוי זיהום המים, לאורך כל שלבי הטיהור ובנקודות רבות בהזרמת המים לצרכן. הקושי הנוצר מבדיקות מרובות אלה הוא הזמן הארוך הדרוש לבדיקות המיקרוביאליות אשר גורם לכך שבפועל מים מזוהמים מגיעים לצרכן הקצה [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. נוסף על כך, הבדיקות מבוצעות על מרחב דגימה קטן – 0.1-1 ליטר מתוך אלפי ומאות אלפי ליטרים שמוזרמים במערכת. הבדיקות נעשות באופן תקופתי ורוב המים לא נבדקים. כיוון שזיהומי חיידקים (ובמיוחד פתוגנים) הם תופעה בלתי צפויה, המופיעה באופן ספוראדי [10], ניתן להצביע כאן על כשל של מערכת הדגימה בתעשיית המים העלול לפגוע בבריאות הציבור. כשל זה מוכר בתעשייה אך כיום לא קיים תחליף איכותי ומשתלם לשיטת הדיגום הקיימת [7].

קיימות כיום מספר שיטות מתקדמות לזיהוי וכימות חיידקים במים. ישנן שיטות מולקולריות שונות, המתבססות על הגברת רצפי DNA חיידקי (PCR) והשוואתם למסדי נתונים ידועים, או זיהוי בעזרת היברידיזציה [7]. יתרונן של שיטות אלה הוא היכולת לזהות באופן ספציפי פתוגנים בקלות. אולם בדיקות אלה דורשות עבודה ידנית מרובה והן אורכות זמן רב (מספר ימים לרוב) [11]. השלב הדורש את הזמן הרב ביותר הוא שלב ההעשרה הנדרש ברוב השיטות הקיימות, בשל הרגישות הנמוכה של שיטות אלה. [12]. שיטות מתקדמות עוד יותר, מבוססות על טכנולוגיית DNA Microarray ו-ELISA. שיטות אלה נחשבות מהירות מאוד, בעלות ספציפיות גבוהה ולעיתים ללא צורך בהעשרה (תלוי בשיטה). אך יחד עם זאת, השיטות יקרות מאוד לשימוש ודורשות כוח אדם מקצועי ביותר. גישה אחרת לזיהוי חיידקים כוללת את השימוש בשיטות ספקטרוסקופיות שונות. שיטה אחת מבוססת על שימוש בספקטרומטר מסות (MS) המשתמשת ביינון עוצמתי של מושבת חיידקים ובחינת תוצרי היינון ב-MS. יתרונה הגדול של השיטה הוא היכולת לזיהוי כמעט מידי של החיידקים ובדיוק גבוה. אך השיטה דורשת זמן ארוך לקבלת מושבות חיידקים ובעיקר יקרה מאוד. יתרה מזו, השיטה אינה מתאימה לכימות החיידקים אלא רק לזיהוי. עקב מגבלות השיטות הקיימות, נותר צורך אמיתי לשיטה לזיהוי וכימות מהיר של חיידקים במי שתייה, בעלות נמוכה וברמת דיוק גבוהה [7]. בעבודה זו אנחנו מציעים שימוש בגישות ספקטרוסקופיות מבוססת ראמאן ופלואורסנציה לזיהוי וכימות חיידקים במים הן לשתייה והן לשימוש אחר בתעשיות המזון.

## ספקטרוסקופיית ראמאן

### רקע מדעי

ספקטרוסקופיית ראמאן (Raman Spectroscopy) הינה כלי אנליטי מודרני, בעלות נמוכה יחסית ובעל תוצאות מהירות במיוחד. השיטה לשימוש בספקטרוסקופיית ראמאן מתבססת על תופעה המכונה Raman Shift. כאשר פוטונים באורך גל מסוים (לייזר) פוגעים במולקולה חלק מהפוטונים עוברים התמרת Raman Shift שבה משתנה רמת האנרגיה של הפוטון – ובהתאמה אורך הגל שלו. זאת עקב העברה של חלק מהאנרגיה הגלית של הפוטון בעירור לאנרגיה תנודתית במולקולה (vibrational energy) [14]. ההתמרה היא שונה בין חומר לחומר באורכי גל שונים, כך שלכל חומר ישנה "טביעת אצבע" של התמרה [14, 15]. חשוב לציין שלמולקולות מים H2O, התמרה טבעית חלשה מאוד ולכן מים מהווים רקע מצוין לבדיקת בשיטת ספקטרוסקופיית ראמאן [16].

בספקטרוסקופיית ראמאן ההתמרה נמדדת באמצעות גלאי הקולט את אורכי הגל של האור לאחר המעבר דרך החומר הנבדק (לדוגמה, תא חיידקי) וממיר את רמת ההתמרה לאות דיגיטלי במחשב (תמונה 1) [15].

תמונה 1 טביעת אצבע ספקטראלית של אתנול

בשיטה זו אין צורך בשלב העשרת החיידקים, דבר המאפשר זיהוי חיידקים בזמן קצר באופן משמעותי. בנוסף, כיוון שאין צורך בהעשרת המצע - ניתן לבצע את הבדיקה באופן ישיר (In Situ).

מחקרים קודמים מראים כי ניתן להבחין בין חיידקים שונים בהתאם לספקטרום הראמאן שלהם [18, 19]. הבדלים אלה נובעים מההרכב הכימי של התא החיידקי (הן של החלל הציטופלסמטי, של הממברנה והדופן ואף של סביבת החיידק אליה הוא מפריש חומרים) ובעיקר מנוכחות של טבעות ארומטיות וסוכרים שונים. הספקטרום הוא למעשה התמרת הראמאן המשולבת של כל המרכיבים הכימיים של החיידק, כולל היחס הכמותי ביניהם. נמצא שהספקטרום הינו ספציפי לכל זן חיידקים, אך נדרש למצוא בדיוק באילו אורכי גל ואילו עוצמות התמרה נמצא ההבדל המבחין בין החיידקים השונים. \*\*\*להוסיף התייחסות לאיור 1 \*\*\* בעבודות של Zeiri ושותפיו [18, 19] ובעבודתם של Permasiri ושותפיו [20] הראו החוקרים שהמולקולות הנראות בראמאן בחיידקים הן בעיקר צורונים של DNA, הכוללים אדנין, גואנין ואף פלבין-אדנין (FDA). כדי לנצל את השיטה לזיהוי וכימות החיידקים נדרשת עבודה מקיפה ליצירת מאגר נתונים אמין שבו נותחו מספר רב של דוגמאות חיידקים [16]. לאחר בניית מאגר נתונים אמין ומגוון ניתן לבנות מודל סטטיסטי לזיהוי מהיר של החיידקים לפי ספקטרום הראמאן שלהם. פתרון כזה יענה על דרישות התעשייה כיוון שהוא מהיר, מדויק, בעל יכולת זיהוי וכימות של חיידקים וגם זול באופן יחסי.

1.

### שימוש בספקטרוסקופיית ראמאן לזיהוי מהיר של חיידקים

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

בשנת 2000, Maquelin [25] ושותפיו הראו יכולת זיהוי ראשונה של חיידקים פתוגנים כמו *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, S. epidermidis* ו*-Enterococcus faecium*, וזאת אחרי 6 שעות גידול על צלחות פטרי, כאשר בתעשייה, נדרש לחכות כ-24 שעות לגדילת חיידקים אלו [9]. חוקרים אלה השתמשו במודל מתמטי מבוסס Partial Least Squares (PLS) על מנת לעבד את מאגר הנתונים הראשוני שלהם.

במחקר של Meisel ושותפיו מ-2012 [26], הצליחו החוקרים להבחין בחיידקי *Brucella* בחלב. במהלך הניסוי בנו החוקרים מאגר מידע של ספקטרום ראמאן של דוגמאות חלב שלהן הוסיפו חיידקים שונים אשר נפוצים בחלב ביניהם זנים של *Brucella, Escherichia*, *Yersinia* ועוד. לאחר שביצעו סדרת לימוד-מכונה וסרקו מעל 2,000 ספקטרומים ידועים, בנו החוקרים תוכנה שמצליחה להבחין בחיידקי *Brucella* בדגימת חלב בדיוק מעל 95%.

במחקר אחר [28], בדקו אותם החוקרים את האפשרות לזהות חיידקים בדוגמאות בשר. הקושי המרכזי בבחינת חיידקים בבשר בשיטות פיזיקאליות הוא במורכבות המדיום. למרות זאת, הצליחו החוקרים לזהות בבשר חיידקי *Escherichia coli, Listeria, Salmonella* ואחרים, בסגוליות (ספציפיות) גבוהה מאוד (85-100% לכל סוגי החיידקים מלבד *Yersinia*). גם כאן השתמשו בסדרת לימוד-מכונה.

בשני המחקרים הנ"ל החוקרים השתמשו באנליזה סטטיסטית מבוססת על Support Vector Machine (SVM), ככל הנראה מכיוון שבדוגמאות שמקורן בבשר וחלב ישנה התנהגות לא-ליניארית של הספקטרום ביחס לזהות החיידקים. עבודות אלה משמשות כ-Proof of Concept ראשוני ליכולת השיטה לאפשר זיהוי חיידקים בתעשיית המזון כאשר נדרש מחקר נוסף לשיפור הרגישות.

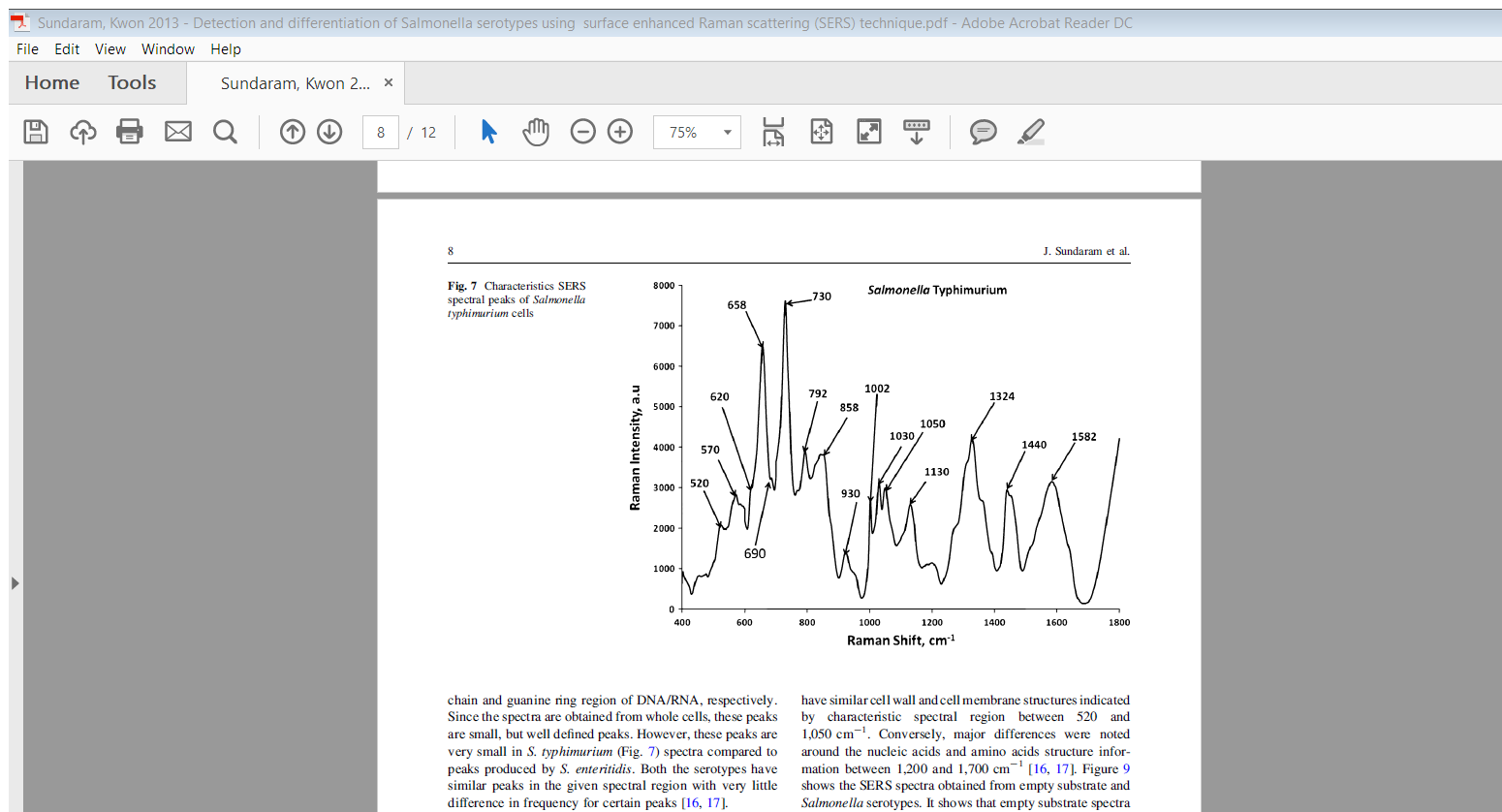
\*\*\* כל המאמרים הנ"ל עבדו עם מושבות ותרביו גידול OVERNIGHT \*\*\*

במחקר אחר שהמתמקד בחלב, הצליחו Nicolaou ושותפיו [21] להראות התפתחות של חיידקי *Staphylococcus aureus ו-Lactococcus lactis* בחלב. החוקרים לקחו דגימות של חלב מאולח, שטפו אותן במים מזוקקים ובחנו אותן במיקרוסקופ. בחלק מן הניסויים החוקרים השתמשו בטכנולוגיה דומה לספקטרוסקופיית ראמאן המכונה Fourier Transform Infrared 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-משולב של שני מיני חיידקים והצליחו לזהות את שניהם בדוגמה יחידה. עבודה זו היא פורצת דרך, בתחום זה, מכיוון שהיא מצביעה על כך שלכל מין חיידקי ישנה טביעת אצבע ספקטראלית שאינה אובדת ב"רעש" של מערכות משולבות.

חשוב להוסיף כי בעבודות שתוארו לעיל אינם יודעים בדיוק אילו חומרים גורמים לטביעת האצבע הספקטראלית הייחודית של כל חיידק.

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

Sundaram [30] ושותפיו התמקדו ביכולת האבחנה בין סוגי חיידקים שונים. במחקר מ-2013 הצליחו החוקרים להבחין בין סרוטיפים שונים של סלמונלה בעלי משמעות קלינית. סרוטיפים הם זנים שונים של המין הנבדלים זה מזה במבנה האנטיגני שלהם. במחקר הצליחו החוקרים לאפיין בספקטרום שיאים (picks) ספציפיים לחיידקים משני הסרוטיפים שנבדקו, ולקשר ביניהם לבין שינויים בהרכב החלבוני של החיידקים. כך לדוגמה, שיא של התמרת ראמאן 658 cm-1 הוא אופייני לחיידקי *Salmonella* Enteriditisבלבד \*\*\* ראה איור X \*\*\**.* החוקרים קישרו שיא זה לריכוז גבוה יותר של טבעות ארומטיות מחומצת האמינו טירוזין, כפי שתואר כבר בעבר ע"י Zeiri et al ב-2005 [19].



איור 2. טביעת אצבע ספקטרלית של Salmonella Typhimurium. מתוך עבודה של Sundaram ושותפיו [30]

במחקר נעזרו החוקרים בטכנולוגיה 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 . 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. החוקרים השתמשו בחיידקים בריכוז גבוה מתרבית לאחר הדגרה של 24 שעות.

\*\*\* להכניס את הפסקה שמסבירה מה זה SERS לפני העבודה של SUNDARAM \*\*\*

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

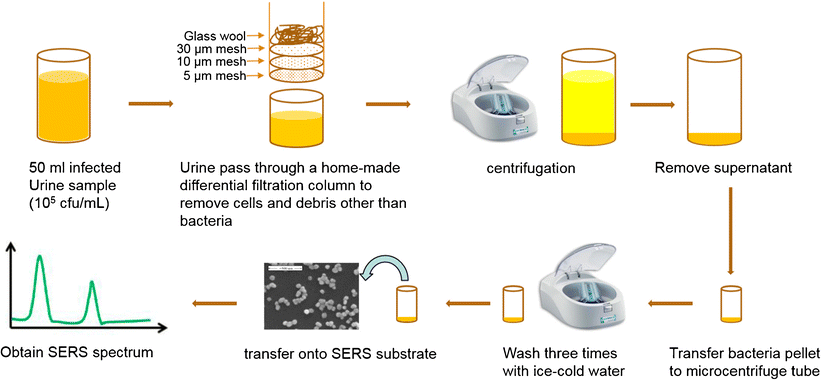
במחקר אחר של Sundaram ושותפיו מ-2013 [32] מציגים החוקרים שימוש בפלטפורמה אחרת של SERS, המבוססת על זיהוי ספקטרום הראמאן מתוך צלוחיות מצופות כסף. החוקרים הצליחו לזהות בניסוי חיידקים מסוגי *Salmonella, Escherichia, Listeria ו-Staphylococcus* בריכוזים גבוהים (החיידקים נלקחו מתרביות שגודלו במשך 18 שעות בתנאים אופטימליים). במחקר זה הצליחו החוקרים לראות שיפור משמעותי ביכולת הזיהוי בשיטת ה-SERS.

### אבחנה כמותית ובריכוזים נמוכים

שיטת ה-SERS מתייחסת למעשה לאחד האתגרים הגדולים בזיהוי חיידקים המבוסס על ספקטרוסקופיית ראמאן. מכיוון שהתמרת ראמאן היא יחסית מועטה, כלומר, מעט פוטונים עוברים התמרה מסוג זה, קשה מאוד להבחין בריכוז נמוך של חיידקים. יחד עם זאת נמצאו מספר תקדימים לזיהוי נוכחות של חיידקים בריכוזים נמוכים. באופן עקרוני, עוצמת האות של ספקטרום הראמאן נמצאת בקורלציה לריכוז החומר הגורם להתמרה, זאת לפי חוק בר-למברט, ולכן עוצמת הספקטרום כולו נמצאת בקורלציה לכמות החיידקים [35]. בעבודות קודמות שהוצגו, סף הזיהוי של המערכת היה לרוב בין 105-108 CFU/ml [12, 24-26, 28, 29]. בעוד שסף זיהוי זה הוא מעניין בפני עצמו, הוא לרוב אינו רלוונטי לזיהוי של חיידקים פתוגנים במי שתייה (חיידקים בודדים למ"ל) [4]. ישנם מספר תקדימים לזיהוי של ריכוזים נמוכים של חיידקים בעזרת SERS, ביניהם עבודה של Zhou ושותפיו [36] שזיהו חיידקי *E. coli* בריכוז 102 CFUs/ml ואף חיידקים בודדים בדוגמה בנפח 3 µL. עבודה זו היא חדשנית ומשתמשת בטכנולוגיית SERS מבוססת זהב לזיהוי. בעבודה בנו החוקרים חלקיקים מצופים זהב שהוספו לדוגמה, ובכך העצימו את תגובת הראמאן במרחב. כך נוצר אפקט SERS מחוזק ומרחבי שאינו תלוי במשטח הדגימה. בשיטה זו הצליחו החוקרים להבחין בריכוזים של 103 cells/ml של חיידקי *E. coli* ואף להבחין בין חיידקי *E. coli* מזנים שונים. יתר על כך, כאשר השתמשו בטכנולוגיית החלקיקים על משטח זכוכית, הצליחו החוקרים לזהות חיידקים בודדים. מחקר זה מראה כי קיים פוטנציאל לזיהוי חיידקים בריכוזים נמוכים מאוד, כאלה הרלוונטיים לתעשיית המים והמזון. חסרונותיה של הטכנולוגיה המוצעת היא בעיקר בעלות הגבוהה של המכשור, ובצורך להכין חלקיקים בכמויות גדולות.

### מהירות הבדיקה

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

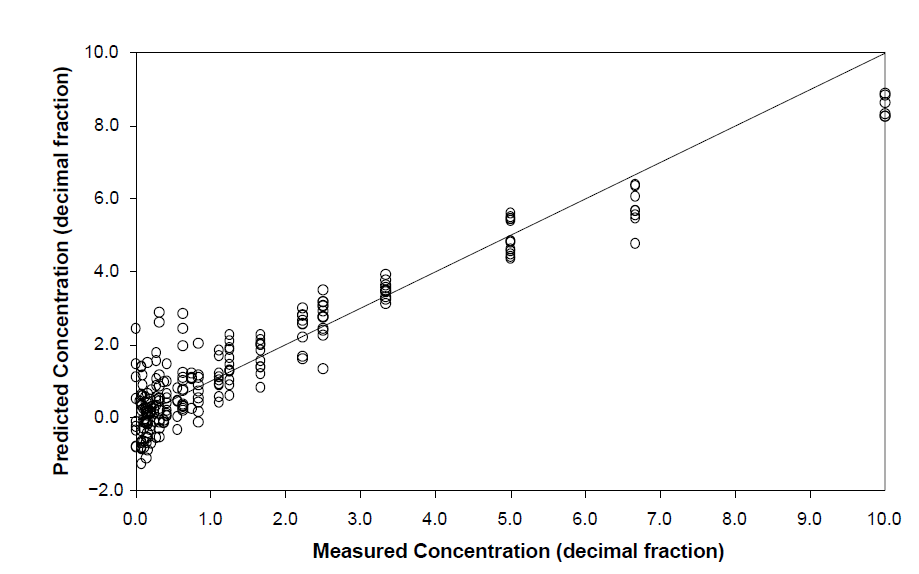


תמונה 2 – תהליך קבלת מידע מדוגמה – מתוך Permasiri ושותפיו [20]

### התאמה לתקנות ורגולציה קיימת

ריבוי העבודות בנושא זיהוי חיידקים בשיטות ספקטרוסקופיית ראמאן הוביל את Witkowska [37] ושותפיה מפולין לנסות ולהתאים את השיטה לתקני ISO לזיהוי חיידקים במזון. החוקרים התמקדו בתקנות ISO המתייחסות לזיהוי של חיידקים ספציפיים מסוגי *Salmonella, Listeria* ו-*Cronobacter*. החוקרים השוו בין השיטות הסטנדרטיות המוכתבות כיום בתעשייה לשיטה מבוססת ספקטרוסקופיית ראמאן והראו שהשיטה מתאימה כחלופה טובה לשיטות הקיימות. חשוב לציין שהשיטה שהציעו Witkowska ושותפיה עדיין דורשת עבודת מעבדה הכוללת זריעת החיידקים על מצע סלקטיבי והכנת הדוגמה, והיתרון הצנוע שהציעו החוקרים הוא רק בזמן ההדגרה. ייתכן מאוד, לפי מחקרים קודמים, שניתן לצמצם את זמן הבדיקה עוד יותר, לזהות חיידקים נוספים ולחסוך בכוח אדם, הכשרה ושעות עבודה על ידי זיהוי חיידקים בשיטה המבוססת ספקטרוסקופיית ראמאן.

### ספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה נמוכה

בעוד שרוב העבודות הנעשות בזיהוי חיידקים משתמשות במיקרוסקופיה, SERS או שילוב של השניים, עבודה של Schmilovitch ושותפיו [38] מ-2005 הראתה שניתן לזהות חיידקים בשיטת ספקטרוסקופיית ראמאן, ללא מיקרוסקופ. החוקרים הצליחו לזהות ולהבחין בין ריכוזי חיידקים מסוג *Erwinia* ו*-Clavibacter* בנוזל במים בריכוזים של 1010-101 cells/ml. החוקרים השתמשו במודל מבוסס PLS, על מנת לייצר מודל חיזוי לריכוז החיידקים ברמת דיוק סטטיסטית של מעל 90%. עבודה זו מצביעה על היתכנות של זיהוי חיידקים, בשיטות מבוססות ספקטרוסקופיית ראמאן, בריכוזים ובעלויות נמוכים ובכך מציגה אפשרות לפתרון מעשי לבעיית זיהוי החיידקים בתעשיית המזון. עבודות נוספות שנעשו בטכנולוגיה ברזולוציה נמוכה נעשו על ידי Mello ושותפיו ב-2005 [39] לזיהוי חיידקי מעיים וע"י Luo ו-Lin ב-2008 [40] לזיהוי פתוגנים בשיטה משולבת עם SERS.****

איור 3 – ניתוח של אנליזת PLS. זיהוי ריכוז חיידקי E. coli בעזרת מודל מתמטי. מתוך Schmilovitch ושותפיו [38].

## פלואורסנציה

### הרקע המדעי

פלואורסנציה הינה תופעה טבעית המתרחשת כתוצאה מבליעת פוטון ע"י מולקולה או יון. הבליעה גורמת לעירור אלקטרון במולקולה מהרמה האנרגטית הנמוכה במצב היציב (ground state) שבה הוא נמצא לאחת הרמות האנרגטיות במצב מעורר (excited state). במצב מעורר, האלקטרון מאבד חלק מהאנרגיה כתוצאה מתנודות בקשרים תוך-מולקולריים, התנגשויות ואינטראקציות בין מולקולות ללא פליטת אור ודועך עד לרמה האנרגטית הנמוכה של המצב המעורר. מהרמה האנרגטית הנמוכה של המצב המעורער, האלקטרון חוזר תוך כדי פליטת פוטון בעל אנרגיה נמוכה יותר (אורך גל ארוך יותר) מהפוטון שנבלע, לאחת מרמות האנרגטיות במצב היציב. מהרמה האנרגטית אליה חזר במצב היציב, האלקטרון חוזר למיקומו המקורי (הרמה האנרגטית הנמוכה במצב היציב) ע"י איבוד אנרגיה ללא פליטת אור [41]

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

מדידה של תופעת הפלואורסנציה יכולה להוות כלי למדידת חומרים אורגניים בתמיסה. בחומרים אורגניים מסוימים, בעיקר כאלה בעלי מבנה טבעתי, מתקיימת פלואורסנציה כאשר הם מוארים באורך גל ספציפי. התופעה תוארה בעבר רבות ככלי לכימות קבוצות חומרים אורגניים ובמיוחד חומרים הומיים וחומרים "חלבוניים" (המכילים חומצות אמינו ארומטיות: טירוזין, טריפטופן ופניל-אלנין). החומרים החלבוניים יכולים להיות חומצות אמינו חופשיות, חלבונים, חלקי חלבון ופפטידים קצרים ואף מולקולות אורגניות מורכבות המכילות חומצות אמינו. חומרים אלה במי שתייה מהווים אינדיקציה לנוכחות של מיקרואורגניזמים במים ויכולים לשמש לכימות המיקרואורגניזמים [42-45].

### שימוש בפלואורסנציה לזיהוי חיידקים במי שתייה

כיוון שבתעשיית המים נדרשת יכולת הערכה מהירה לאיכות טיפול במים (סינון, כלורינציה וכו'), הוצע בעבודתו של Cohen ושותפיו מ-2014 כי בדיקת פלואורסנציה יכולה לשמש להערכת איכות הטיפול במים. בעבודתם בחנו החוקרים את כלל תגובות הפלואורסנציה המתקבלות מהארה באור באורכי הגל שבין 200-800 nm (בקפיצות של 5 nm). מן הנתונים בנו החוקרים מפות תלת ממדיות המתבססות על עוצמת הפלואורסנציה לפי אורך גל העירור ואורך הגל ההארה, אותן כינו Excitation/Emission Martix (EEM). החוקרים מצאו קשר בין תופעות פלורסנטיות ב-5 "איזורי פלורסנציה" ב-EEMs. אזור אחד כזה, אשר כונה "חלבוני", נראה במפת ה-EEM כאשר עירור באורכי גל <240, 275 (עקב סטיית מכשירים ייתכן וישנם אורכי גל מעט קטנים מ-240) גרם להארה באורך גל 346 nm. הכינוי "חלבוני" ניתן היות ותגובה זו תוארה כבר בספרות בעבר כקשורה לנוכחות של חומצות אמינו פלורסנטיות טירוזין, טריפטופן ופניל-אלנין [42-46]. החוקרים גם הראו שלאחר טיפול במים להסרת החיידקים (בכלורינציה, סינון ובשיטת בֻוצָה משֻפעלת – Activated Sludge) עוצמת ההארה יורדת באופן משמעותי, דבר המצביע על איכות הטיפול הביולוגי להסרת מיקרואורגניזמים. בעבודת המשך שנעשתה ע"י Simelane נמצאה קורלציה בין עוצמה ההארה בטווח הנ"ל לכמות חיידקים כללית במי ברז, כפי שנמדדה בשיטות מסורתיות (ספירת מושבות לאחר גידול בתנאים אופטימליים). החוקרים הראו יכולת לזהות במים חיידקים ספציפיים (*E. coli, P. aeroginusa, B. subtilis*) אך לא הצליחו להבחין ביניהם. החוקרים הצליחו להבחין בחיידקים עד ריכוז של 104 CFUs/ml [47]. עבודות אלו מראות לנו כי קיים קשר ברור בין ריכוז החיידקים לעוצמת הפלואורסנציה שניתן לזהות במכשיר ספקטרופלואורומטר, דבר המצביע כי ייתכן וניתן להשתמש בטכנולוגיה זו לכימות עומס מיקרוביאלי במי שתייה בתעשייה.

# השערות ומטרות העבודה

## השערת המחקר

הדיווחים לעיל מדגימים יכולת טובה של זיהוי חיידקים בספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה גבוהה וכן היתכנות של זיהוי באמצעות פלואורסנציה. אנו משערים ששימוש בכלים לכריית מידע (Data mining) יכול לאפשר גילוי וזיהוי של חיידקים הן באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה נמוכה והן בפלואורסנציה, כאשר הכמות הגדולה של נתונים יכולה לאפשר עיבוד מעמיק יותר.

## מטרות העבודה

1. בחינת יכולת של ספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה נמוכה ופלואורסנציה לגילוי וכימות חיידקים במים.
2. בחינת יכולת של ספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה נמוכה ופלואורסנציה לזיהוי סוגי חיידקים במים.

## תכנית המחקר

### **חלק I – ספקטרוסקופיית ראמאן**

#### שלב 1 – אופטימיזציה

במהלך העבודה יבוצע תהליך אופטימיזציה למכשיר ספקטרוסקופיית הראמאן. שלב זה נדרש למרות שבעבודות קודמות הצליחו לזהות חיידקים בטכניקה דומה משום שהציוד ששימש בעבודה ב-2005 [38] אינו תקין, הוחלף ושודרג. כיוון שחלק מהמכשיר עצמו נבנה במכון להנדסה חקלאית, יש לנסות ולהגיע לשילוב הנכון לזיהוי חיידקים מבחינת אורך הגל של הלייזר, גובה המשדר, זמן החשיפה והקריאה, גודל הדוגמה, צורת התושבת (המשפיעה על צורתה הפיזית של הדוגמה), חומר התושבת (המשפיע על החזר הלייזר), שיטת הדגימה – בטבילה, דרך זכוכית או מהאוויר, עוצמת הלייזר, כמות החזרות להפחתת ה"רעש" ואופן הכנת הדוגמה לבדיקה. לשם כך נשתמש במשדר לייזר 785 nm וגלאי מסוג QE65, שניהם של חברת OceanOptics. בנוסף תבחן האפשרות לשימוש במכשיר בספקטרומטר FTIR (מדגם Nicolet iS50 של חברת ThermoFisher Scientific, Tewksbury, MA, ארה"ב). במהלך האופטימיזציה ניצור מאגרי נתונים שעליהם תבוצע אנליזה סטטיסטית, מבוססת על מודל מתמטי PLS באמצעות תוכנות Matlab (MATLAB 2015a, Systematics, Natick, MA, ארה"ב) ו-JMP (JMP Pro 13, SAS Institute Inc., Cary, NC, ארה"ב). במידת הצורך יבחנו גם שיטות כימומטריות נוספות כגון רשתות עצביות (Neural Networks) או Support Vector Machine. לאורך העבודה הבדיקות תעשנה על חיידקי *E. coli* (זן DH5α). לאורך כל שלבי העבודה נשתמש בשיטות של Machine Learning כדי לאמן (Training) את מודל החיזוי שלנו על נתונים קיימים, לבצע תיקוף (Validation) של יכולת החיזוי ואף לבדוק את יכולת החיזוי בתנאי אמת (Prediction). זאת נעשה בעזרת שימוש מגוון במודלים מבוססי PLS, בצירוף עיבוד-מקדים (Preprocessing) מתמטי כמו גזירה (Derivitive).

נאסוף בין 50-200 סריקות של חיידקים במים מזוקקים על מנת לבנות מודל אמין ואיכותי לזיהוי סגולי של החיידקים במים. ככל הנראה שלב האופטימיזציה הוא הארוך ביותר ועלול לקחת מעל לשנת עבודה עד להגעה לתנאים המתאימים לזיהוי החיידקים. שיפור הפלטפורמה אמור להיות יחסית פשוט.

#### שלב 2 - בחינת סף הרגישות של המכשיר לחיידקי *E. coli*

לאחר שתימצא הפלטפורמה המתאימה (כלומר, מצב מסוים של כלל הפרמטרים הנ"ל), תיערכנה בדיקות לבחינת יכולת המכשיר לזהות חיידקים בריכוזים נמוכים עד להגעה למינימום רגישות המכשיר. באופן זה נוכל לפתח מודל לכימות של חיידקים מזן יחיד על רקע מים מזוקקים. בחינה זו תעשה על ידי מיהול וסריקת דוגמאות בריכוזים ידועים וניתוח התוצאות בעזרת מודל מבוסס PLS.

#### שלב 3 - בחינת סף הרגישות של המכשיר לחיידקי *Bacillus subtilis*

בהמשך לזיהוי חיידק המודל (*E. coli*) ננסה להבחין בזן אחר של חיידקים – *B. subtilis (*זןNCIB3610*)*. חיידק זה נבחר היות והוא חיידק מסוג גראם חיובי, השונה באופן מהותי מבחינת הרכב החלבונים, השומנים והדופן שלו. תיערכנה בדיקות לבחינת יכולת המכשיר לזהות חיידקים בריכוזים נמוכים עד להגעה למינימום רגישות המכשיר. באופן זה נוכל לפתח מודל לכימות של חיידקים אלה על רקע מים מזוקקים. בחינה זו תעשה על ידי מיהול וסריקת דוגמאות בריכוזים ידועים וניתוח התוצאות בעזרת מודל מבוסס PLS.

#### שלב 4 – בחינת יכולת אבחנה בין חיידקי *E. coli* ו-*B. subtilis*

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

במידה ולא נמצא הבדל בין טביעת האצבע הספקטראלית של חיידקים אלה, נבצע שיפור של המודל הסטטיסטי לכימות כלל החיידקים בדוגמה, ונייצר למעשה מודל לספירה כללית של חיידקים במים באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן ברזולוציה נמוכה.

### **חלק II – ספקטרוסקופיית פלואורסנציה**

חלק זה של העבודה יבוצע במקביל לחלק I. נשתמש בספקטרוסקופיית פלואורסנציה מבוססת עירור-הארה על מנת לאפיין דוגמאות מים ולקשר בין תגובות הארה לנוכחות מיקרואורגניזמים במים. את הדוגמאות נבדוק באמצעות מכשיר ספקטרוסקופיית פלואורסנציה (מדגם RF-5301PC של חברת Shimadzu, קיוטו, יפן). לאחר סריקת הדוגמאות ואיסוף נתוני EEMs נבצע אנליזה מבוססת על המודל המתמטי PARAFAC (Parallel Factor Analysis) או PLS. מודלים אלו מאפשרים ניתוח רב-גורמי על מנת לאתר את "אזורי העניין" במפות ה-EEM. נשתמש בתוכנת Matlab (MATLAB 2015a, Systematics, Natick, MA, ארה"ב) על מנת לבצע את האנליזה. נבחן את אזורי העירור-הארה שבין 200-800 nm.

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

כמתואר לגבי ספקטרוסקופיית הראמאן, תיערכנה בדיקות לבחינת יכולת המכשיר לזהות חיידקי *E. coli* בריכוזים נמוכים עד להגעה למינימום הרגישות. באופן זה נוכל לפתח מודל לכימות של חיידקים מזן יחיד על רקע מים מזוקקים. בחינה זו תעשה על ידי מיהול וסריקת דוגמאות בריכוזים ידועים וניתוח מפות ה-EEM בעזרת מודל מבוסס PARAFAC או PLS.

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

תיערכנה בדיקות לבחינת יכולת המכשיר לזהות חיידקי *B. subtilis* בריכוזים נמוכים עד להגעה למינימום הרגישות. באופן זה נוכל לפתח מודל לכימות של חיידקים אלה על רקע מים מזוקקים. בחינה זו תעשה על ידי מיהול וסריקת דוגמאות בריכוזים ידועים וניתוח מפות ה-EEM בעזרת מודל מבוסס PARAFAC או PLS.

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

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

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

### **חלק III – השוואה בין ספקטרוסקופיות ראמאן ברזולוציה נמוכה לפלואורסנציה לזיהוי וכימות חיידקים במים**

באמצעות מודלים סטטיסטיים ידועים המשווים דיוק (Accuracy), חוסן (Robustness) והדירות (Repeatability) נשווה בין יכולת החיזוי של המודלים שנפתח לספקטרוסקופיית ראמאן ולפלואורסנציה. נשתמש במודל ההשוואה של Ignat [48] המתבסס על ניתוח root mean square error of calibration (RMSEC) ו-root mean square error of cross validation (RMSECV) כדי לייצר ערך Standerdized Weighted Sum (SWS) שמהווה מדד לאיכות החיזוי של המודלים. מערך זה נוכל להסיק מי מהשיטות מתאימה יותר לזיהוי וכימות חיידקים במים.

את כל עבודת המעבדה, כולל גידול החיידקים, הכנת הדוגמה ומדידה בפועל יבצע התלמיד (אמיר נקר) בשיתוף פעולה מלא עם החוקרים מהמכון להנדסה חקלאית (ד"ר זאב שמילוביץ' וד"ר תימאה איגנת) וחוקרים מהמעבדה של פרופ' שלמה סלע מהמכון לאיכות ובטיחות מזון של מרכז המחקר החקלאי. התלמיד יהיה שותף בתכנון ובניית פלטפורמת הראמאן (יחד עם עובדי המכון להנדסה חקלאית). בעבודה על ספקטרוסקופיית פלואורסנציה התלמיד יבצע את כל הסריקות והאנליזות בשיתוף פעולה עם חוקרים מהמעבדה של ד"ר מיכאל בוריסובר מהמכון למדעי הקרקע והמים של מרכז המחקר החקלאי. התלמיד יבצע את כל האנליזות הסטטיסטיות, פיתוח, שיפור והשוואת המודלים הסטטיסטיים לאחר הסריקות.

## לוח הזמנים

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

# תוצאות ראשוניות

## ניסוי ראמאן

בחנו ראמאן בקולי ובצילוס. דוגמאות מוצגות באיור ...

בעין לא ניתן להבחין בין הספקטרה, מודל PLS הצליח להבחין ב108.

במהלך שנת המחקר הראשונה נעשה תהליך של אופטימיזציה של תהליך סריקת החיידקים, הן במישור הכנת הדוגמה והן במישור תהליך הסריקה ותכנון מכשיר הסריקה בראמאן על מנת להגיע לרגישות גבוהה יותר של הבדיקה. עד היום המאמצים לא עלו יפה...

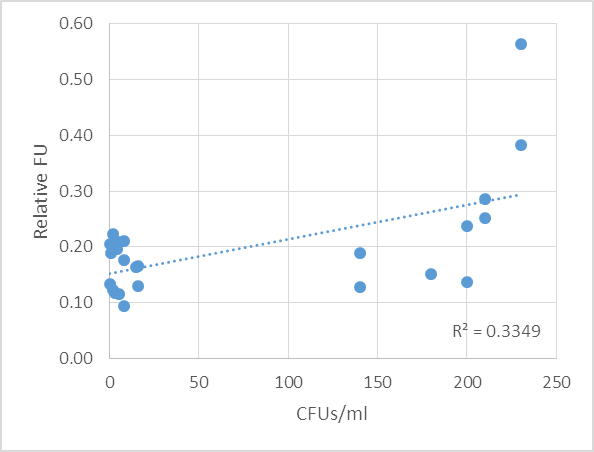
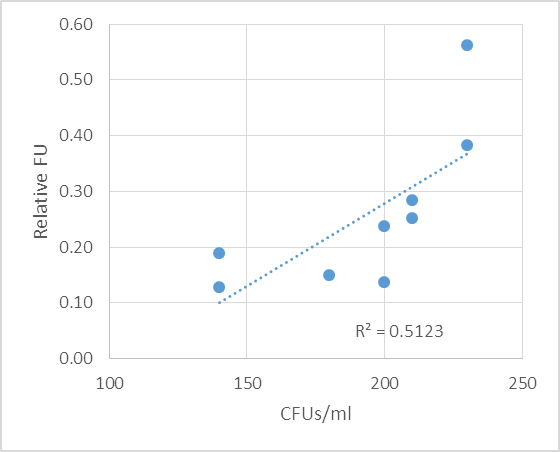
כחלק מעבודה זו נבחנו השפעות זמן הקרנת החיידקים בלייזר, פיצוץ התאים באמצעים כימיים ופיזיקליים, הפעלת עקת קור (בהתאם לעבודה של Premasiri ושותפיו [20]), עוצמת הלייזר, ייבוש החיידקים על גבי משטחי זכוכית, אלומיניום ומשטח SERS ניסיוני וסריקת החיידקים על רקע של סליין. בנוסף נבחנו השפעות של מניפולציות מתמטיות / סטטיסטיות כגון התמקדות באיזורי התמרה מסויימים, נרמול הנתונים במספר גישות, מודלים סטטיסטיים מבוססי PLS הכוללים "עיבוד מקדים" (Centering, Scaling, Exclusions). המודל המוצלח ביותר שהתקבל עד כה בעל סף רגישות לחיידקי *E. coli* או *B. subtilis* בריכוז 108 CFUs ml-1 ואינו מסוגל להבחין בין מיני החיידקים שנבדקו.

\*\*\* לפרט טווחים, להחליף פוצצו לפורקו, לשנות את הסדר. להזכיר את עקת קור (ולהוסיף מעלות!). להזכיר שהשימוש ב-SERS לא תרם לשיפור הרגישות.

גישה נוספת שנבדקה היא השפעות מניפולציות...

## ניסוי פלורסנציה

החל מחודש אוגוסט אנו בודקים את ה-EEM בדגימות מים. בעקבות עבודות קודמות התמקדנו בעיקר עד כה בניתוח הנתונים באורכי הגל עירור 210nm ופליטה בטווח 220-400. נמצאה התאמה נמוכה (R2=???) בין עוצמת הפליטה בעירור 210nm ופליטה 270nm לכמות החיידקים. היות והנתונים מגיעים מדוגמאות סביבתיות בהן ריכוז החיידקים נמוך נראה שרבות מהדוגמאות נמצאות מתחת לסף הרגישות. ניתן לראות את ההתאמה באיור X. נמצא שיש לנרמל את ערכי הפלורסנציה לערכי פלורסנציה קבועים של פליטת ראמאן בעירור 275nm ופליטה ב-305nm



איור 4 – התאמה בין ריכוז החיידקים לפליטת אור. ריכוז החיידקים נמדד במעבדת שירות לפי שיטות סטנדרטיות לבדיקת מי שתייה. ערכי הפלורסנציה מגיעים מעירור באורך גל 210nm ופליטה באורך גל 270nm והם מנורמלים לערכי פליטת ראמאן 275/305. הקורלציה ליניארית. הגרף השמאלי מראה דוגמאות שבהן מעל 100 CFUs/ml.

\*\*\* חייבים להזכיר מראש את זה שעובדים עם קידוחים. ולהבהיר שבוצעה כבר עבודה של אילוח ולא לכתוב דגימות סביבתיות\*\*\*

# מקורות

1. Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E: **Microbial agents associated with waterborne diseases**. *Crit Rev Microbiol* 2002, **28**(4):371-409.

2. Collier SA, Stockman LJ, Hicks LA, Garrison LE, Zhou FJ, Beach MJ: **Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water**. *Epidemiol Infect* 2012, **140**(11):2003-2013.

3. Ashbolt NJ: **Microbial contamination of drinking water and human health from community water systems**. *Curr Environ Health Rep* 2015, **2**(1):95-106.

4. Israeli Ministry of Health: **People's health regulation - sanitary quality of drinking water and drinking water facilities.** 2013 (in hebrew).

5. Israeli Ministry of Health: **Standards of water sampling.** 2016 (in hebrew)..

6. Israeli Ministry of Health: **Instructions for plan application, operating and monitoring of drinking water treatment facility.** 2017 (in hebrew).

7. Rompré A, Servais P, Baudart J, de-Roubin MR, Laurent P: **Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches**. *J Microbiol Meth* 2002, **49**(1):31-54.

8. Edberg SC, Rice EW, Karlin RJ, Allen MJ: **Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection**. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2000(29):106S-116S.

9. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S: **Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation**. *FEMS Microbiol Rev* 2012, **36**(4):815-836.

10. Cabral JP: **Water microbiology. Bacterial pathogens and water**. *Int J Environ Res Public Health* 2010, **7**(10):3657-3703.

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

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

13. Nobelprize.org: **Sir Chandrasekhara Venkata Raman – biographical.** Nobel Media AB 2014.

14. Bernhard S: **Special techniques and applications**. In: *Infrared and Raman Spectroscopy - Methods and Application.* Edited by Bernhard S. Weinheim, Federal Republic of Germany: VCH Verlagsgesellschaft; 1995.

15. Kaiser Optical Systems: **Raman spectroscopy - a tutorial**. Retrieved from *kosi.com/na\_en/products/raman-spectroscopy/raman-technical-resources/raman-tutorial.php*

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

17. Pahlow S, Meisel S, Cialla-May D, Weber K, Rösch P, Popp J: **Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy**. *Adv Drug Deliv Rev* 2015, **89**:105-120.

18. Zeiri L, Bronk BV, Shabtai Y, Eichler J, Efrima S: **Surface-enhanced Raman spectroscopy as a tool for probing specific biochemical components in bacteria**. *Appl Spectrosc* 2004, **58**(1):33-40.

19. Zeiri L, Efrima S: **Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria: the effect of excitation wavelength and chemical modification of the colloidal milieu**. *J Raman Spectrosc* 2005, **36**(6-7):667-675.

20. Premasiri WR, Chen Y, Williamson PM, Bandarage DC, Pyles C, Ziegler LD: **Rapid urinary tract infection diagnostics by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): identification and antibiotic susceptibilities**. *Anal Bioanal Chem* 2017, **409**(11):3043-3054.

21. Nicolaou N, Xu Y, Goodacre R: **Fourier transform infrared and Raman spectroscopies for the rapid detection, enumeration, and growth interaction of the bacteria Staphylococcus aureus and Lactococcus lactis ssp. cremoris in milk**. *Anal Chem* 2011, **83**(14):5681-5687.

22. Chen F, Flaherty BR, Cohen CE, Peterson DS, Zhao Y: **Direct detection of malaria infected red blood cells by surface enhanced Raman spectroscopy**. *Nanomedicine* 2016, **12**(6):1445-1451.

23. Kusić D, Kampe B, Ramoji A, Neugebauer U, Rösch P, Popp J: **Raman spectroscopic differentiation of planktonic bacteria and biofilms**. *Anal Bioanal Chem* 2015, **407**(22):6803-6813.

24. Fehrmann A, Franz M, Hoffmann A, Rudzik L, Wüst E: **Dairy product analysis: identification of microorganisms by mid-infrared spectroscopy and determination of constituents by Raman spectroscopy**. *J AOAC Int* 1995, **78**(6):1537-1542.

25. Maquelin K, Choo-Smith LP, van Vreeswijk T, Endtz HP, Smith B, Bennett R, Bruining HA, Puppels GJ: **Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium**. *Anal Chem* 2000, **72**(1):12-19.

26. Meisel S, Stöckel S, Elschner M, Melzer F, Rösch P, Popp J: **Raman spectroscopy as a potential tool for detection of Brucella spp. in milk**. *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**(16):5575-5583.

27. Albanell E, Cáceres P, Caja G, Molina E, Gargouri A: **Determination of fat, protein, and total solids in ovine milk by near-infrared spectroscopy**. *J AOAC Int* 1999, **82**(3):753-758.

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

29. Wang J, Xie X, Feng J, Chen JC, Du XJ, Luo J, Lu X, Wang S: **Rapid detection of Listeria monocytogenes in milk using confocal micro-Raman spectroscopy and chemometric analysis**. *Int J Food Microbiol* 2015, **204**:66-74.

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

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

32. Sundaram J, Park B, Kwon Y, Lawrence KC: **Surface enhanced Raman scattering (SERS) with biopolymer encapsulated silver nanosubstrates for rapid detection of foodborne pathogens**. *Int J Food Microbiol* 2013, **167**(1):67-73.

33. Jarvis RM, Brooker A, Goodacre R: **Surface-enhanced Raman scattering for the rapid discrimination of bacteria**. *Faraday Discuss* 2006, **132**:281-292; discussion 309-219.

34. Jarvis RM, Brooker A, Goodacre R: **Surface-enhanced Raman spectroscopy for bacterial discrimination utilizing a scanning electron microscope with a Raman spectroscopy interface**. *Anal Chem* 2004, **76**(17):5198-5202.

35. Kumar S, Verma T, Mukherjee R, Ariese F, Somasundaram K, Umapathy S: **Raman and infra-red microspectroscopy: towards quantitative evaluation for clinical research by ratiometric analysis**. *Chem Soc Rev* 2016, **45**(7):1879-1900.

36. Zhou H, Yang D, Ivleva NP, Mircescu NE, Niessner R, Haisch C: **SERS detection of bacteria in water by in situ coating with Ag nanoparticles**. *Anal Chem* 2014, **86**(3):1525-1533.

37. Witkowska E, Korsak D, Kowalska A, 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.

38. Schmilovitch Z, Mizrach A, Alchanatis V, Kritzman G, Korotic R, Irudayaraj J, Debroy C: **Detection of bacteria with low-resolution Raman spectroscopy.** *Trans ASAE* 2005, **48**(5):1843-1850.

39. Mello C, Ribeiro D, Novaes F, Poppi RJ: **Rapid differentiation among bacteria that cause gastroenteritis by use of low-resolution Raman spectroscopy and PLS discriminant analysis**. *Anal Bioanal Chem* 2005, **383**(4):701-706.

40. Luo BS, Lin MIN: **A portable Raman system for the identification of foodborne pathogenic bacteria**. *J Rapid Methods Autom Microbiol* 2008, **16**(3):238-255.

41. Lakowicz JR: **Introduction to Fluorescence**. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed.* Edited by Joseph R. Lakowicz, Maryland, USA: Springer; 2006.

42. Stedmon C, Seredynska-Sobecka B, Boe-Hansen R, Le Tallec N, Waul C, Arvin E: **A potential approach for monitoring drinking water quality from groundwater systems using organic matter fluorescence as an early warning for contamination events**. *Water Res* 2011, **45**(18):6030-6038.

43. Stedmon C, Markager S, Bro R: **Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy**. *Mar Chem* 2003, **82**(3-4):239-254.

44. Borisover M, Laor Y, Parparov A, Bukhanovsky N, Lado M: **Spatial and seasonal patterns of fluorescent organic matter in Lake Kinneret (Sea of Galilee) and its catchment basin**. *Water Res* 2009, **43**(12):3104-3116.

45. Hua B, Dolan F, Mcghee C, Clevenger T, Deng B: **Water-source characterization and classification with fluorescence EEM spectroscopy: PARAFAC analysis**. *Int J Environ Anal Chem* 2007, **87**(2):135-147.

46. Gueguen C, Granskog M, McCullough G, Barber D: **Characterisation of colored dissolved organic matter in Hudson Bay and Hudson Strait using parallel factor analysis**. *J Mar Syst* 2011, **88**(3):423-433.

47. Simelane KS: **Application of Fluorescence Spectroscopy for Monitoring Microbial Contamination of Drinking Water**. MSc Thesis:Hebrew University of Jerusalem; 2013.

48. Ignat T, Schmilovitch Z, Fofoldi J, Steiner B, Alkalai-Tuvia S: **Non-destructive measurement of ascorbic acid content in bell peppers by VIS-NIR and SWIR spectrometry.** *Postharvest Biol Technol* 2012, **74**(10): 91-99.